

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” (UNESP)
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E QUÍMICA ORGÂNICA

NAIARA MAIA PEREIRA

**Desenvolvimento de filme transdérmico associado a peptídeos
RGD e KTTKS para aplicação na cicatrização de tecidos.**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia,
Instituto de Química, da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto

Araraquara
2024

P436d Pereira, Naiara Maia
Desenvolvimento de filme transdérmico associado a
peptídeos RGD e KTTKS para aplicação na cicatrização
de tecidos / Naiara Maia Pereira. -- Araraquara, 2024
81 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual
Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara
Orientador: Reinaldo Marchetto

1. Peptídeos. 2. Biocurativo. 3. Cicatrização. 4. Pele. 5.
Regeneração tecidual dirigida. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca
do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

A proposição de um filme transdérmico para estimular a cicatrização tecidual pode melhorar a saúde de indivíduos com feridas de difícil cicatrização, além de favorecer sua qualidade de vida e reestabelecer sua autonomia. Este avanço pode auxiliar na redução de despesas e manejo do ferimento, minimizando a utilização de recursos médicos.

POTENTIAL RESEARCH IMPACT

The proposal of a transdermal film aiming to stimulate tissue healing can improve the health of individuals with wounds that are difficult to heal, improving their quality of life and reestablishing their autonomy. This advancement can help reduce expenses and wound management, minimizing the use of medical resources.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Desenvolvimento de filme transdérmico associado a peptídeos RGD e KTTKS para aplicação na cicatrização de tecidos"

AUTORA: NAIARA MAIA PEREIRA

ORIENTADOR: REINALDO MARCHETTO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Biotecnologia, pela Comissão Examinadora:

 Documento assinado digitalmente
REINALDO MARCHETTO
Data: 07/03/2024 11:26:44-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. REINALDO MARCHETTO (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Profa. Dra. ANA PAULA GIROL (Participação Virtual)
Laboratório Multidisciplinar / Centro Universitário Padre Albino - UNIFIPA - Catanduva

Prof.^a Dr.^a MARIA ELENIR NOBRE PINHO RIBEIRO (Participação Virtual)
Centro de Ciências / Universidade Federal do Ceará - UFC - Fortaleza

Araraquara, 01 de fevereiro de 2024

DADOS CURRICULARES

DADOS PESSOAIS

Nome: Naiara Maia Pereira

Nome em citações bibliográficas

PEREIRA, Naiara Maia; PEREIRA, N.M.; PEREIRA NM.

Endereço Profissional

Rua Francisco Degni, 55 – Quitandinha – Araraquara/SP – CEP: 14800-060

Endereço Eletrônico: maia.pereira@unesp.br

Formação Acadêmica/Titulação

2021-

Mestrado em Biotecnologia

Instituto de Química de Araraquara

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto

Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Projeto de Pesquisa: Desenvolvimento de Hidrogel Formador de Filme com Peptídeos RGD e KTTKS para Aplicação na Cicatrização de Tecidos.

2017-2021

Graduação em Licenciatura em Química

Instituto de Química de Araraquara

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil

2019-2021

Iniciação Científica

Instituto de Química de Araraquara

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto

Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Projeto de Pesquisa: Biocelulose funcionalizada com peptídeos para aplicação em processos de cicatrização

2009 - 2010

Curso técnico/profissionalizante em Técnico em Química.

Escola Municipal "Adelino Bordinon".

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

Iniciação Científica Júnior

Instituto de Química de Araraquara

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil

Orientador: Prof. Dr. Carlos de Oliveira Paiva Santos

Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Programa de Iniciação Científica - Junior (PIBIC Jr)

Projeto de Pesquisa: Desenvolvimento de uma metodologia de preparação de um padrão para análise quantitativa de fases de fármacos por difração de raios X.

Formação Complementar

2023

Curso de Inverno - Temas Avançados de Bioquímica e Biologia Molecular, ministrado pelo Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Disciplina tópico especial "Special topics: Alternative methods to replace tests with mammals", na modalidade Aluno Especial, oferecido pelo Curso de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp – Campus de Araraquara-SP.

Curso de Verão: A escrita acadêmica além do mal-estar: 50 estratégias para escrever teses, dissertações e monografias em tempo de crise política, ministrado pela Faculdade de Psicologia PUC-Minas.

2022

Curso de Extensão Universitária na modalidade de Difusão: Capacitação no Uso e Manejo de Animais de Laboratório, ministrado pelo Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo.

Curso Preparatório para Exame de Proficiência TOEFL, ministrado pelo Centro de Línguas e Desenvolvimento de Professores (CLDP), da UNESP/IBILCE – Campus de São José do Rio Preto/SP.

Minicurso CRISPR/CAS: Teoria e Prática, ministrado pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp – Campus de Araraquara.

Participação em Eventos Científicos

Apresentação de pôster intitulado “Development of a Transdermal Film Containing RGD-KTTKS Peptides for Application in Tissue Healing.” No 52º Encontro anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), ocorrido em Águas de Lindóia, SP, 2023

Participação e apresentação de pôster intitulado “Biocelulose funcionalizada com peptídeo adesivo RGD: um biomaterial promissor para aplicações biomédicas” na primeira e segunda fases o XXXIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, ocorrido no segundo semestre de 2021, na modalidade online.

Participação e apresentação de pôster intitulado “Membranas de Biocelulose contendo peptídeos quiméricos para aplicação em processos de regeneração do tecido cutâneo” na primeira e segunda fases do XXXII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, ocorrido no segundo semestre de 2020, na modalidade online.

Prêmios/Menção Honrosa

Menção Honrosa: Melhores trabalhos de Iniciação Científica, área Ciências da Vida - XXXII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2020.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Sonia e Oclair, minha fortaleza diante de todos os obstáculos da vida e minhas melhores companhias, sempre.

Aos meus amigos que em tantos momentos entenderam as minhas ausências e me deram apoio para seguir.

A Deus, Nossa Senhora Aparecida e Nanã, pela saúde, pela proteção aos meus e a mim, pelas vitórias e pelos aprendizados ao longo deste caminho de evolução espiritual.

A todos os que contribuíram de alguma forma, para que eu pudesse chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Não poderia começar esta seção sem novamente mencionar meus pais. Meu eterno agradecimento a eles, os amores da minha vida, por todo o suporte, todo amor e todo o apoio que eu poderia ter. Eu jamais teria chegado até aqui sem vocês.

Aos meus queridos amigos, especialmente à Gabriela Zolin, minha metadinha e neurônio compartilhado, e Fauller Fonseca, um dos melhores amigos que eu poderia ter. Pela companhia de todos os dias, pelo riso sincero, por serem abrigo durante as tempestades que só a pós-graduação pode oferecer, pelo aprendizado e apoio incondicional - sem esquecer os incríveis cafezitos, obviamente.

A Sabrina Okada, amiga, família e minha parceira de vida, que mesmo com o passar do tempo, com as mil voltas que a vida dá, sempre esteve e eu sei que sempre vai estar ao meu lado, aconteça o que acontecer. Eu sempre farei o mesmo por você.

Ao meu querido namorado, Vitor Hage, pelo amor, incentivo e pela motivação a me tornar sempre a minha melhor versão.

Ao meu querido médico, Dr. Silvio Rizzo, que por inúmeras vezes salvou a minha vida e me ajudou a ter saúde para seguir e bom humor para enfrentar as dificuldades.

Aos demais amigos – e aqui merecem destaque especial a Beatriz Bolini, Camila Marcantonio e Renata Merlos - que tantas vezes me ouviram falar deste trabalho, das dificuldades às conquistas. Que torceram por mim, que me apoiaram nas dificuldades, que me ajudaram de todas as formas. Obrigada por serem os melhores que eu poderia ter.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Reinaldo Marchetto, pela confiança, pelo exemplo e pelos ensinamentos de química, bioquímica e da vida acadêmica.

Aos professores que tive a oportunidade de conviver ao longo destes anos, por todo o conhecimento compartilhado. Uma parte de cada um está nas entrelinhas deste trabalho e, sem eles, nada disso teria sido feito.

Aos funcionários do IQ, que direta ou indiretamente contribuíram, seja com um sorriso gentil ou uma conversa amigável em algum momento.

Aos queridos Me. Fauller H. da Fonseca e Marcos William Gualque pelo auxílio no tratamento estatístico dos dados.

Meu especial agradecimento à querida Prof. Dra. Cristiane Damas Gil e à Ma. Rebeca Silva, pelos ensinamentos e contribuição com a linhagem celular de queratinócitos, essenciais para a finalização deste trabalho.

Aos colegas de pesquisa, alguns do grupo, alguns de outros grupos, que faço questão de nomear, um a um: Beatriz Sanches, Bruna Carolina, David Spressão, Jéssica Oliveira (Jéss), José Bedoya (Gregs), Karla Lima, Neide Felício, William Gualque, Jonatas Angelo, Marisa Polesi, Rodolfo, Angélica, Ana e Wlad. Todos contribuíram substancialmente para o meu aprendizado, compartilhando muito mais que seus conhecimentos com paciência e disposição às mil dúvidas que eu tive.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por financiar este projeto através da Chamada/Edital: GM GD 2020 – Apoio a Projetos de Pesquisa Científica, Tecnológica e de Inovação – Bolsas de Mestrado, sob número 146999/2021-5.

“É melhor acender uma vela do que praguejar contra a escuridão.”

Adágio

RESUMO

Responsável pela proteção contra estímulos externos que podem provocar danos ao organismo por meio de rupturas de natureza física, química ou microbiológica, a pele é capaz de desencadear processos biologicamente complexos que visam a recuperação de sua integridade e capacidade funcional quando danificada. Problemas relacionados a estes processos podem levar a formação de feridas crônicas, em que há dificuldade de cicatrização e maior demanda de tempo para a recuperação do tecido. A literatura indica que peptídeos RGD e KTTKS apresentam potencial estímulo à Matriz Extracelular para adesão, proliferação celular e favorecimento à produção de colágeno. Além disso, estudos apontam para a utilização de filmes transdérmicos como uma possibilidade de rota alternativa à administração oral de fármacos, evitando processos metabólicos que levam a degradação dos compostos antes de sua efetiva ação, pela liberação direta à microcirculação. Neste sentido, o objetivo deste trabalho é associar um sistema transdérmico a peptídeos com potencial favorável aos processos de cicatrização, de modo a obter um produto que diminua o tempo necessário para a cicatrização do tecido cutâneo. Assim, foram desenvolvidos seis fragmentos de peptídeos compostos a partir da sequência nativa de fibronectina, que contem a sequência RGD, associados a um subfragmento de colágeno tipo I, contendo a sequência KTTKS. As sequências propostas apresentam regiões em comum e variações tais que permitiram avaliar comparativamente o seu desempenho, como a adição do ácido ϵ -amino hexanóico (Ahx) usado como espaçador inerte e região hidrofóbica nas sequências, bem como o uso de diferentes resinas para a síntese. Estes foram sintetizados pela metodologia de síntese de fase sólida, obtidos com elevado grau de pureza por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), identificados por espectrometria de massas e não apresentaram indícios de citotoxicidade nos testes realizados com linhagem celular de fibroblastos (MRC-5), em ensaio colorimétrico com MTT. Então, três sequências peptídicas foram selecionadas sob concentrações específicas, NMC ($10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$), NMD ($20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) e NME ($5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$), e adicionados a um filme de hidrogel, V3005, que foi selecionado a partir de outras sete composições celulósicas desenvolvidas inicialmente para uso como sistema transdérmico, compondo F-NMC, F-NMD e F-NME, que não apresentaram indícios de citotoxicidade frente as linhagens fibroblástica (MRC-5) e queratinocítica (HaCaT) utilizadas, em ensaio colorimétrico com MTT. Os sistemas estudados apresentaram ainda importantes resultados de proliferação celular e indicaram o favorecimento da biossíntese de colágeno tipo I após 72h, além de indicarem o potencial controle da atividade bacteriana para a espécie gram-positiva analisada, *Staphylococcus aureus*, em cerca de 90% para F-NME. Assim, os resultados obtidos se mostraram promissores acerca dos objetivos propostos e apresentam grande potencial para aplicação como produto que possa propiciar uma cicatrização mais rápida e eficaz.

Palavras-chave: Peptídeos. Biocurativo. Cicatrização. Pele. Regeneração tecidual dirigida.

ABSTRACT

The skin is responsible for protecting the body against external stimuli that can cause physical, chemical, or microbiological damage. When damaged, the skin triggers biologically complex processes aimed at recovering its integrity and functional capacity. Problems related to these processes can lead to the formation of chronic wounds, which are difficult to heal and take longer for the tissue to recover. According to the literature, RGD and KTTKS peptides have the potential to stimulate the Extracellular Matrix in terms of adhesion, cell proliferation, and collagen production. Additionally, studies suggest that transdermal films may serve as an alternative route to oral drug administration, bypassing metabolic processes that can lead to compound degradation before their effective action, by directly releasing into the microcirculation. The objective of this study was to associate a transdermal system with peptides that promote healing processes, in order to reduce the time required for skin tissue to heal. Six peptide fragments were developed from the native fibronectin sequence, which contains the RGD sequence, associated with a type I collagen subfragment containing the KTTKS sequence. The proposed sequences have common regions and variations that allow for comparative assessment. For example, the addition of ϵ -amino hexanoic acid (Ahx) as an inert spacer and hydrophobic region in the sequences, as well as the use of different resins for synthesis, could affect their performance. The compounds were synthesized using solid-phase synthesis methodology. They were obtained with a high degree of purity through high-performance liquid chromatography (HPLC) and identified by mass spectrometry. In tests carried out on the fibroblast cell line (MRC-5) using a colorimetric assay with MTT, no signs of cytotoxicity were observed. Three peptide sequences, NMC ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$), NMD ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$), and NME ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$), were selected and added to a hydrogel film, V3005. The hydrogel film, V3005, was chosen from seven other cellulose compositions initially developed for use as a transdermal system. The resulting compositions, F-NMC, F-NMD, and F-NME, showed no signs of cytotoxicity against the fibroblastic (MRC-5) and keratinocytic (HaCaT) strains used in the MTT colorimetric assay. The studied systems yielded significant results in terms of cell proliferation and favored the biosynthesis of type I collagen after 72 hours. Additionally, they showed potential for controlling bacterial activity in the gram-positive species analyzed, specifically *Staphylococcus aureus*, with a reduction of around 90% for F-NME. The obtained results show promise in achieving the proposed objectives and have potential for use as a product that can promote faster and more effective healing.

Keywords: Peptides. Biocurative. Wound Healing. Skin. Targeted tissue regeneration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do processo de obtenção dos filmes V3005 e VetOH.	32
Figura 2. Esquema ilustrativo da síntese de peptídeo pela metodologia da fase sólida e estratégia Fmoc ( = representa um protetor de cadeia lateral de um resíduo de aminoácido trifuncional genérico).....	34
Figura 3. Curva analítica para quantificação de colágeno tipo I em solução.	39
Figura 4. Filmes preparados com base nas formulações de Patel et al. (2009) e Vijaya et al. (2015), obtidos após a etapa de secagem (identificados de A à E – Tabela 2) 45	45
Figura 5. Filmes V3005 (A) e VetOH (B) e os respectivos discos de 5 mm (C) dispostos de modo comparativo com as composições A,B,C,D e E.	46
Figura 6. Estrutura primária da região 1511-1540 da fibronectina humana.....	47
Figura 7. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica do peptídeo NMB antes (A) e após purificação (B). Coluna de fase reversa C18 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 ⁻¹ e detecção a 220nm 48	48
Figura 8. Ensaio de viabilidade celular para as células MRC-5, na presença dos peptídeos NMA a NMF, expressa em %, com tempo de incubação das amostras de 24 horas.	50
Figura 9. Ensaio de viabilidade celular para as células MRC-5, na presença dos peptídeos NMA a NMF, expressa em %, com tempo de incubação das amostras de 48 horas.	51
Figura 10. Ensaio de viabilidade celular para as células MRC-5, na presença dos peptídeos NMA a NMF, expressa em %, com tempo de incubação das amostras de 72 horas.	52
Figura 11. Ensaio de viabilidade celular para as células HaCaT, na presença dos peptídeos NMC, NMD e NME, expressa em %, com tempo de incubação das amostras de 24 horas	53
Figura 12. Ensaio de viabilidade celular para as células HaCaT, na presença dos peptídeos NMC, NMD e NME, expressa em %, com tempo de incubação das amostras de 48 horas	54
Figura 13. Ensaio de viabilidade celular para as células HaCaT, na presença dos peptídeos NMC, NMD e NME, expressa em %, com tempo de incubação das amostras de 72 horas	54
Figura 14. Ensaio de viabilidade celular para as células MRC-5, na presença dos filmes A, B, V3005 e VetOH, expressa em %, com tempo de incubação das amostras de 24, 48 e 72 horas.	61

Figura 15. Imagem comparativa de placa, após tratamento com MTT, na ausência de filme (A), na presença do filme C (B) e na presença do filme D (C).....	61
Figura 16. Imagem comparativa de placa após tratamento com MTT contendo o filme E sem células (A) e poços vazios que receberam o mesmo tratamento (B).	62
Figura 17. Resultados do tratamento estatístico para o ensaio de viabilidade celular para as células MRC-5, na presença dos filmes A, B, V3005 e VetOH, expressa em %, com tempo de incubação das amostras de 24, 48 e 72 horas.	63
Figura 18. Análise da viabilidade celular de filmes modificados pela adição de peptídeos em linhagem de queratinócitos, para os períodos de 24, 48 e 72 horas. .	65
Figura 19. Padrões de difração de DRX dos filmes V3005 (azul) e V3005P (vermelho) com os respectivos picos assinalados	73
Figura 20. Espectro vibracional na região do infravermelho obtido para os filmes V3005 (cinza) e V3005P (magenta)	74
Figura 21. Micrografia de MEV do filme V3005 (A) e V3005 contendo o peptídeo NMB (B)	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composições de referência utilizadas como base na elaboração dos filmes	29
Tabela 2. Composição dos filmes preparados	30
Tabela 3. Filmes produzidos a partir de adaptações das formulações propostas por Khan et al. (2015) e Vijaya et al. (2015)	31
Tabela 4. Estrutura primária dos peptídeos modelados e sintetizados	33
Tabela 5. Massas moleculares teóricas e obtidas por espectroscopia de massas. ...	49
Tabela 6. Quantidade de colágeno tipo I produzido após 24 h de tratamento com os diferentes peptídeos. C+: Células em meio de cultivo na ausência de peptídeo.	55
Tabela 7. Quantidade de colágeno tipo I produzido após 48 h de tratamento com os diferentes peptídeos. C+: Células em meio de cultivo na ausência de peptídeo	55
Tabela 8. Quantidade de colágeno tipo I produzido após 72 h de tratamento com os diferentes peptídeos. C+: Células em meio de cultivo na ausência de tratamentos.	56
Tabela 9. Conjunto de dados tratados estatisticamente, em porcentagem de colágeno tipo I produzido após 24 h de tratamento com os diferentes peptídeos.	57
Tabela 10. Conjunto de dados tratados estatisticamente, em porcentagem de colágeno tipo I, produzido após 48h de tratamento com os diferentes peptídeos.....	58
Tabela 11. Conjunto de dados tratados estatisticamente, em porcentagem de colágeno tipo I, produzido após 72 h de tratamento com os diferentes peptídeos....	59
Tabela 12. Valores de absorbância médios para o ensaio de viabilidade celular em linhagem celular HaCaT com filmes modificados ou não pela adição de peptídeos. C+: Células em meio de cultivo na ausência de tratamentos; C-: Meio de cultivo adicionado de filmes, sem células.	64
Tabela 13. Quantidade de colágeno tipo I, em $\mu\text{g.mL}^{-1}$, produzido após 24 h, 48 h e 72 h de incubação com os diferentes filmes modificados, após o tratamento estatístico. C+: Células em meio de cultivo.	66
Tabela 14. Determinação de Concentração Inibitória Mínima dos diferentes peptídeos em solução, sobre a <i>Escherichia coli</i> . C+: Microrganismos em meio de cultivo. C-: Meio de cultivo.	68
Tabela 15. Determinação de Concentração Inibitória Mínima dos diferentes peptídeos em solução, sobre a <i>Staphylococcus aureus</i> . C+: Microrganismos em meio de cultivo. C-: Meio de cultivo.....	68
Tabela 16. Determinação de Concentração Inibitória Mínima dos diferentes peptídeos em solução sobre a <i>Candida albicans</i> (ATCC 90028). C+: Microrganismos em meio de cultivo; C-: Meio de cultivo.....	70

Tabela 17. Determinação de Concentração Inibitória Mínima dos diferentes peptídeos em solução sobre a *Candida albicans* (ATCC 10231). C+: Microrganismos em meio de cultivo; C-: Meio de cultivo.....70

Tabela 18. Avaliação Concentração Inibitória Mínima dos diferentes filmes sobre *Escherichia coli*.71

Tabela 19. Avaliação Concentração Inibitória Mínima dos diferentes filmes sobre *Staphylococcus aureus*.72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ahx	Ácido ε -amino hexanóico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
cP	Unidade de medida centipoise
DBF	N-dibutilftalato
DCM	Diclorometano
DIC	Diisopropilcarbodiimida
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade ótica
DRX	Difratometria de Raios-x
E15LV	Polímero de hidroxipropilmetilcelulose de viscosidade de 15 cP
EC	Etilcelulose
ESI-MS	Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray
EtOH	Etanol
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
Fmoc	9- Fluorenilmetiloxycarbonila
FT-IR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
HaCaT	Linhagem celular de queratinócitos humanos
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
IL-1	Interleucina-1
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
ISO	<i>International Standards Organization</i>
K100M	Polímero de hidroxipropilmetilcelulose de viscosidade de 100.000 cP
K4M	Polímero de hidroxipropilmetilcelulose de viscosidade de 4000 cP
LC/MS	Cromatografia Líquida Acoplada ao Espectrômetro de Massas
MBHA	4-metilbenzidrilamina

MEC	Matriz extracelular
MET	Metolose
MetOH	Metanol
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MH	Meio de cultivo Muller Hinton
MHA	Meio de cultivo Muller Hinton contendo ágar
MM/z	Razão entre massa e carga eletrônica do peptídeo
MRC-5	Linhagem celular de fibroblastos fumanos
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio
PB	Polímero base de Patel
PBM	Polímero base de Patel Modificado
PBS	Solução salina de fosfatos
PBV	Polímero base de Vijaya
PBVK	Polímero base de Vijaya Modificado com Khan
PBVM	Polímero base de Vijaya Modificado
PEG	Polietilenoglicol
PEG 200	Polietilenoglicol de peso molecular médio de 200 g mol ⁻¹
PEG 400	Polietilenoglicol de peso molecular médio de 400 g mol ⁻¹
PG	Propilenoglicol
pH	Potencial Hidrogeniônico
RPM	Rotações por minuto
SD	Desvio padrão
SDA	Caldo Sabouraud Dextrose contendo ágar
SDB	Caldo Sabouraud Dextrose
t-Bu	Terc-butílico
TFA	Ácido trifluoracético
TIS	Triisopropilsilano
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa
UFC	Unidades formadoras de colônias
UFLC	<i>Ultra Fast Liquid Chromatography</i>
VC	Viabilidade Celular

LISTA DE AMINOÁCIDOS

Ala	(A)	Alanina
Arg	(R)	Arginina
Asn	(N)	Asparagina
Asp	(D)	Ácido aspártico
Glu	(E)	Ácido glutâmico
Cis/Cys	(C)	Cisteína
Gli/Gly	(G)	Glicina
Gln	(Q)	Glutamina
His	(H)	Histidina
Ile	(I)	Isoleucina
Leu	(L)	Leucina
Lis/Lys	(K)	Lisina
Met	(M)	Metionina
Fen/Phe	(F)	Fenilalanina
Pro	(P)	Prolina
Ser	(S)	Serina
Tir/Tyr	(Y)	Tirosina
The/Thr	(T)	Treonina
Trp	(W)	Triptofano
Val	(V)	Valina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Hidrogéis formadores de filme	22
1.2. Peptídeos RGD e KTTKS e processos de cicatrização	24
1.3. Justificativa e hipótese	26
2. OBJETIVOS	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1. Obtenção dos filmes	28
3.2. Síntese Química dos Peptídeos.....	32
3.3. Ensaio com culturas celulares.....	35
3.3.1. Avaliação de viabilidade celular de peptídeos.....	37
3.3.2. Avaliação da viabilidade celular em filmes	38
3.3.3. Biossíntese de colágeno	38
3.4. Avaliação da atividade antimicrobiana.....	40
3.4.1. Preparação do inóculo.....	41
3.4.1.1. Avaliação da Concentração Inibitória Mínima para Bactérias (CBM)	41
3.4.1.2. Avaliação da Concentração Inibitória Mínima em Leveduras (CIM)	42
3.5. Caracterização dos Filmes.....	43
3.5.1. Difractometria de Raios-X (DRX)	43
3.5.2. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).....	43
3.5.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	43
3.6. Cálculo estatístico	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.2. Síntese e caracterização dos peptídeos	47
4.3. Ensaio com culturas celulares.....	49
4.3.1. Peptídeos livres	50
4.3.1.1. Avaliação da viabilidade celular em fibroblastos	50
4.3.1.2. Avaliação da viabilidade celular em queratinócitos	53
4.3.1.3. Avaliação da biossíntese de colágeno	55
4.3.2. Filmes e Filmes combinados com peptídeos.....	60
4.3.2.3. Avaliação da biossíntese de colágeno	66
4.4. Avaliação da atividade antimicrobiana.....	67
4.4.1. Peptídeos livres	67
4.4.1.1. Avaliação da concentração inibitória mínima para bactérias (CBM).....	67

4.4.1.2. Avaliação da concentração inibitória mínima para leveduras (CIM).....	69
4.4.2. Filmes.....	71
4.4.2.1. Avaliação da concentração inibitória mínima para bactérias (CBM).....	71
4.5. Caracterização dos filmes.....	72
4.5.1. DRX.....	73
4.5.2. FT-IR	74
4.5.3. MEV.....	75
5. CONCLUSÕES	76
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

1. INTRODUÇÃO

A pele constitui aproximadamente 20% da massa corpórea humana e é o órgão responsável pela permeabilidade, seletividade e proteção contra estímulos externos de natureza física, química e microbiológica (ALKILANI et al., 2015; LOPES, 2015; KATHE, KATHPALIA, 2017, PRZEKORA, 2020).

Danos à integridade deste tecido levam a rupturas e formação de ferimentos que imediatamente desencadeiam processos dinâmicos e biologicamente complexos, dependentes de fatores locais e sistêmicos, para promover a regeneração tissular, para restaurar sua capacidade funcional, bem como sua aparência (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; LOPES, 2015; LAUREANO, RODRIGUES, 2011, JAMES et al., 2009, PRATS, 2021).

Estes processos ocorrem em quatro fases principais: a de coagulação/homeostase, a inflamatória, a proliferativa e a de remodelação. (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005, LAUREANO, RODRIGUES, 2011, PRZEKORA, 2020, PRATS, 2021, RAZIYEVA et. al, 2021). Variações nos mecanismos envolvidos nas diferentes fases podem desencadear o surgimento de feridas crônicas, que requerem entre outros, maior tempo para a recuperação dos danos e para a completa cicatrização, o que pode gerar sofrimento e diminuição na qualidade de vida dos afetados. (LAUREANO, RODRIGUES, 2011, AITCHESON et al. 2021). Ferimentos deste tipo, acometem milhares de pessoas todos os anos e ocorrem especialmente em membros inferiores de pessoas acometidas por doenças vasculares crônicas e diabéticas, ou em diferentes regiões do corpo, tais como aquelas que possuem limitações de movimento por longos períodos de hospitalização, levando a formação de úlceras por pressão (FERREIRA et al., 2006, VIEIRA, ARAÚJO, 2018, AITCHESON et al. 2021, RAZIYEVA et. al, 2021). No Brasil, a alta prevalência e incidência de feridas crônicas são apontadas principalmente para pessoas idosas hospitalizadas e aquelas residentes em instituições de vivência, porém dados estatísticos sobre o acometimento da população em geral ainda é escasso (VIEIRA, ARAÚJO, 2018).

Destacam-se ainda, os fatores complicadores capazes de retardar ou dificultar o desenvolvimento do processo de cicatrização. Tais fatores podem ser inerentes às condições gerais de saúde da pessoa ferida, como a idade, estado nutricional, uso de medicamentos ou ainda a existência de patologias que, reconhecidamente

comprometem etapas importantes da cicatrização bem como diabetes e doenças imunossupressoras (TAZIMA et al., 2008; GUO, DI PIETRO, 2010, PRATS, 2021). Também existem os fatores de natureza externa como limpeza, contaminação fúngica e/ou bacteriana e a forma de tratamento a qual está submetida (TAZIMA et al., 2008, RAZIYEVA et. al, 2021). A presença de agentes contaminantes, especialmente bactérias, endotoxinas, fungos e biofilmes podem provocar aumento prolongado nos níveis de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e prolongar o processo inflamatório para além do ideal, desencadeando o estado crônico do ferimento (GUO, DI PIETRO, 2010, RAZIYEVA et. al, 2021). A inflamação persistente promove a permanência do excesso de células pró-inflamatórias por um período além do ideal - tais como leucócitos, monócitos, fatores de crescimento e quimiocinas - que além de promover os sinais característicos da inflamação como calor, rubor e dor, tornam o processo mais lento, doloroso e suscetível a contaminação por microorganismos (PRATZ, 2021, PRZEKORA, 2020, RAZIYEVA et. al, 2021).

Em muitos casos, biomateriais, filmes ou curativos sintéticos, especialmente aqueles que funcionam como carreadores de fármacos e com alta biocompatibilidade, podem ser necessários para reduzir o tempo estimado ou para melhorar a taxa de sucesso da regeneração, bem como para reparar ou reconstruir um tecido danificado (JAMES et al., 2009, PRZEKORA, 2020).

1.1. Hidrogéis formadores de filme

Sistemas de carreadores transdérmicos têm sido desenvolvidos (PATEL et al., 2009, MURTHY; HIREMATH, 2001, KATHE; KATHPALIA, 2017, FREDERIKSEN et al, 2015), como alternativa às rotas convencionais de administração, oral ou injetável, de forma que o fármaco possa ser utilizado em aplicação direta sobre a pele, favorecendo a diminuição da frequência de administração e otimizando a absorção pela microcirculação (ALKILANI et al., 2015). Filmes de hidrogéis e correlatos podem ser utilizados para a administração de fármacos, sendo geralmente transparentes, flexíveis e finos que, em contato com a pele, são capazes de promover a liberação prolongada e contínua do fármaco com ação local ou transdérmica (KATHE; KATHPALIA, 2017; FREDERIKSEN et al. 2015).

Embora o tecido íntegro possa constituir uma barreira física contra micro e macromoléculas nesta via, devido à baixa permeabilidade conferida pela presença do

estrato córneo (KATHE; KATHPALIA, 2017; ALKILANI et al., 2015, PRZEKORA, 2020), há a possibilidade de que o fármaco penetre para as camadas profundas da derme e epiderme e torne-se disponível para a absorção sistêmica, evitando a atividade metabólica presente em outras vias, aumentando sua biodisponibilidade (ALKILANI et al., 2015). Além disso, considerando uma ferida complexa que apresenta dificuldades de cicatrização e contendo altas concentrações de células de defesa (PRATZ, 2021, PRZEKORA, 2020, RAZIYEVA et. al, 2021), a aplicação tópica de compostos que favoreçam a cicatrização e que possam controlar o processo inflamatório e proteger a superfície, mimetizando o tecido cutâneo íntegro, tal como um curativo, a absorção de peptídeos e fármacos poderia ser favorecida, além de diminuir o período de cicatrização do ferimento.

Kathe e Kathpalia (2017) em seu artigo de revisão apresentam dados comparativos sobre a utilização de materiais adesivos transdérmicos e a absorção de fármacos. Descrevem que a liberação do medicamento pode ocorrer lentamente após sua aplicação, e sua absorção ocorre pelos capilares, de onde é transportado para a circulação sistêmica ou então, de acordo com sua formulação, pode penetrar na pele para atuar diretamente sobre o tecido alvo, em uma ação tópica. Afirmam ainda que para a administração sistêmica de fármacos, há a limitação de ação devido a fatores endógenos do organismo e em contrapartida, compostos film-forming tendem a favorecer a ação tópica e transdérmica (KATHE; KATHPALIA, 2017).

Patel e colaboradores (2009) descreveram os benefícios da utilização de uma composição mista entre etilcelulose (EC) e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) utilizando propilenoglicol (PG) para a aplicação de furosemida por via transdérmica. Por meio dos filmes obtidos, em análises *in vitro*, descreveram melhorias na capacidade de entrega do medicamento via transdérmica (PATEL et al., 2009). A utilização destes polímeros são justificadas, devido as características não tóxicas, não alergênicas e não irritantes dos mesmos, associadas a boa capacidade de formação de filmes que, dada a baixa permeabilidade de EC, torna-se conveniente a adição de HPMC para aprimorar estas características (PATEL et al., 2009).

Vijaya e colaboradores (2015), em um estudo de caracterização *in vitro* e utilização de HPMC para o desenvolvimento de filmes transdérmicos contendo amitriptilina, descreveram que uma combinação de HPMC de diferentes viscosidades - sendo a melhor delas a combinação de K4M e K100M numa proporção de 3:4 - apresentou os melhores resultados para a entrega deste fármaco (VIJAYA et al.,

2015).

Khan e colaboradores (2015) em seu trabalho sobre o desenvolvimento de filmes mucoadesivos para uso como carreadores de omeprazol em pacientes pediátricos, descreveram a utilização de hidrogéis compostos por metolose 1%, PEG 400 0,5% como agente plastificante, em composições contendo etanol 20% e L-arginina como estabilizador, na proporção 1:2, como os que oferecem as melhores características esperadas para um hidrogel, como transparência e flexibilidade, sendo essa a melhor combinação selecionada para investigações futuras do grupo (KHAN et al., 2015).

Neste sentido, a utilização de filmes em associação a fármacos – ou peptídeos, como aplicado neste trabalho – que apresentem ação que favoreçam o processo de cicatrização, poderiam atuar como película protetora e flexível (KATHE; KATHPALIA, 2017), diminuindo a frequência de manipulação de curativos devido a sua flexibilidade e entrega prolongada dos mesmos (FREDERIKSEN et al. 2015).

A vantagem da utilização de sistemas compostos por filmes e peptídeos sintéticos ao invés de métodos convencionais de substituição de tecidos por enxertos ou ainda pelo uso de compostos nativos da Matriz Extracelular (MEC) se dá pelo menor risco de reações imunológicas, desencadeadas pela presença de material exógeno extraído e purificado de outros organismos (BELLIS, 2011; HERSEL et al., 2003).

1.2. Peptídeos RGD e KTTKS e processos de cicatrização

O trabalho de Balbino, Pereira e Curi (2005) descreve que o reparo de danos teciduais pode ocorrer pela “regeneração com recomposição da atividade funcional do tecido” ou pela “cicatrização com restabelecimento da homeostasia do tecido com perda da sua atividade funcional pela formação de cicatriz fibrótica”, sendo que as fases inerentes à cicatrização não ocorrem de forma isolada, mas simultaneamente. Descrevem ainda que as observações imediatas após o dano ao tecido como rubor, calor e dor são resultantes da ativação e sinalização celular e de fragmentos dos elementos que compõem a MEC, como colágenos, elastinas e fibronectinas, além do acúmulo de líquidos e a ação de mediadores inflamatórios, como os liberados por plaquetas e mastócitos.

Além de tais fatores e alterações bioquímicas como a baixa tensão de O₂, alteração de pH, produção de mediadores lipídicos e peptídicos, uma onda de ativação

celular tende a promover a migração de células epiteliais, queratinócitos e fibroblastos de regiões adjacentes para a região afetada (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

Importante para este processo são os queratinócitos da camada basal, que exerce papel crucial acerca da resposta epidermal na cicatrização de ferimentos. Constituindo cerca de 95% da epiderme, ao se replicarem, favorecem a movimentação das células mais antigas, progressivamente em direção à superfície dos tecidos, alterando sua morfologia e firmando o epitélio escamoso estratificado e queratinizado. A ausência destas células em feridas recentes e enxertos de pele, tornam o tecido mais suscetível a traumas pela falta das projeções estruturais em que se organizam (GANTWERKER; HOM, 2011).

Na tentativa de favorecer esses processos intrínsecos à atividade reparadora do tecido danificado, recorreu-se à literatura que descreve a sequência tripeptídica Arginina-glicina-ácido aspartico (RGD) como uma sequência peptídica que, entre outros, é capaz de estimular processos de adesão celular principalmente pela ativação de receptores de adesão celular das integrinas (HERSEL et al., 2003; PIERSCHBACHER; RUOSLAHTI, 1984). As integrinas compõem um grupo de receptores transmembrana capazes de se ligar a proteínas existentes na MEC, como fibronectinas e colágenos que apresentam grande importância inclusive em processos de embriogênese, diferenciação celular, resposta imunológica, cicatrização de feridas e homeostasia (PIERSCHBACHER; RUOSLAHTI, 1984; HERSEL et al., 2003).

Analogamente, a sequência peptídica Lisina-treonina-treonina-lisina-serina (KTTKS) é descrita como a mínima sequência capaz de promover a síntese de compostos na MEC, como colágeno e fibroblastos. Esta sequência tem sido utilizada principalmente em compostos que objetivam a redução do envelhecimento da pele, dada a provável regulação positiva de fatores de crescimento celular e estímulos da fase fibroblástica, além da síntese de colágeno novo, sendo caracterizado como um peptídeo sinal (ABU SAMAH; HEARD, 2011). Alguns estudos sinalizam a dificuldade da permeabilidade desta sequência peptídica (ABU SAMAH; HEARD, 2011), porém, o comprometimento do estrato córneo em ferimentos, torna-o momentaneamente incapaz de atuar como barreira protetora, especialmente em feridas crônicas, (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005) o que pode favorecer a permeabilidade do peptídeo com foco na recuperação da integridade anatômica e funcional do tecido.

Embora a literatura descreva peptídeos antimicrobianos como moléculas pequenas, naturalmente anfipáticas e positivamente carregadas contendo

considerável porção hidrofóbica em sua estrutura (ULLIVARRI et al., 2020; SILVA et al., 2022), a compreensão acerca da atividade antimicrobiana dos peptídeos que compõem este trabalho adquire relevância uma vez que infecções fúngicas e bacterianas compõem fatores complicadores em ferimentos e feridas crônicas (TRØSTRUP et al., 2013).

A proposição de uso de sequências contendo peptídeos RGD e KTTKS, baseia-se na ideia de que com o início do processo inflamatório, tem-se entre outros, a fase fibroblástica que em consequência da migração e ativação de fibroblastos bem como sinalização de fatores de crescimento, há o consequente aumento no número de fibroblastos ativados para a produção de colágeno e formação de tecido conjuntivo mais forte e elástico (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; LAUREANO; RODRIGUES, 2011).

1.3. Justificativa e hipótese

Feridas complexas e crônicas representam um desafio significativo para os sistemas de saúde em todo o mundo, afetando milhões de pessoas e gerando um impacto substancial na qualidade de vida dos pacientes, embora esses dados não sejam adequadamente documentados. Essas feridas, além de representarem um transtorno para os indivíduos afetados, também exercem pressão sobre os recursos de saúde, demandando tratamentos especializados, terapias de longo prazo e intervenções multidisciplinares.

Estudos anteriores apontam para o potencial favorecimento do processo de cicatrização pela utilização de peptídeos contendo as sequências RGD, em ensaios *in vitro*, associados a celulose bacteriana (HERSEL et al., 2003). Sua utilização combinada com a sequência KTTKS em um carreador de fármaco do tipo hidrogel formador de filme, pode promover o aumento da biossíntese de colágeno e a proliferação celular de linhagens fibroblásticas e queratinocíticas, importantes no processo de cicatrização de ferimentos.

Assim, almeja-se que esse projeto propicie o desenvolvimento de um produto que possa oferecer a administração direta de peptídeos ao tecido danificado e que tornem o processo de cicatrização mais rápido e eficaz.

2. OBJETIVOS

1. Obter e purificar peptídeos quiméricos contendo sequências RGD e KTTKS, conhecidas respectivamente por sua atividade de favorecimento da proliferação celular e de síntese de colágeno;
2. Desenvolver filmes sintéticos a partir de hidroxipropilmetilcelulose e etilcelulose, para aplicação como camada protetora e via de administração direta de peptídeos para o tecido cutâneo;
3. Verificar a atividade da combinação filme-peptídeo quanto ao favorecimento na biossíntese de colágeno e sua potencialidade antimicrobiana.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção dos filmes

Com base na literatura que compreende o uso de sistemas de entrega de fármacos por via transdérmica e oral (PATEL et al., 2009; KHAN et al., 2015; VIJAYA et al., 2015), foram iniciadas as preparações dos filmes poliméricos constituídos de HPMC como polímero base, associado a diferentes agentes, poliméricos ou não, variando combinações e concentrações além da composição de solventes, descritas na Tabela 1. Características específicas como flexibilidade, transparência e resistência, desejáveis para uso como camada protetora de superfícies do tecido injuriado, foram inicialmente avaliadas no desenvolvimento dos filmes.

As composições de referência (Tabela 1) utilizam em conjunto mais de um exemplar de HPMC, uma vez que cada um deles, K4M, K100M e E15LV, contém diferentes proporções de grupamentos metoxila e hidroxipropila que conferem características específicas aos filmes, dada a capacidade de promoverem diferentes viscosidades. Foram utilizados, em alguns casos, associados a etilcelulose (EC), bem como a agentes plastificantes como N-dibutilftalato (DBF) e Polietilenoglicol (PEG), além de Propilenoglicol (PG) como intensificadores da entrega do fármaco. Composições descritas por Patel et al. (2009) e Vijaya et al. (2015), utilizam ainda combinações de solventes como Diclorometano (DCM), Metanol (MetOH) e Etanol (EtOH) para a solubilização e polimerização, com a indicação de que se mantenha o conjunto estático para a formação do filme, por um período de 24 h sob temperatura ambiente.

A partir destas informações, foram elaboradas cinco formulações, adaptadas a partir daquelas propostas por estes autores, inicialmente sem a adição dos peptídeos. As combinações entre polímero, agente plastificante e intensificador de entrega do fármaco, que apresentaram características tais como resistência mecânica, transparência e boa elasticidade estão listadas na Tabela 2. Diferentemente do constante na literatura, foram feitas variações na quantidade e proporção dos solventes utilizados na preparação dos filmes, as quais influenciaram significativamente nas características dos mesmos, tornando-os com maior ou menor resistência e com textura áspera e quebradiça.

Tabela 1. Composições de referência utilizadas como base na elaboração dos filmes

Referência	Identificação	Composição	(% m/m)	Descrição
Patel et al. (2009)	PB	EC	85	Polímero base
		E15LV	15	
	PBM	PB	50,36	Polímero base
		DBF	15	Agente plastificante
		PG	10	Intensificador de entrega do fármaco
Vijaya et al. (2015)	PBV	PEP	24,64	Fármaco/peptídeo*
		K4M	75	Polímero base
	PBVM	K100M	25	
		PBV	65	Polímero base
		DBF	30	Agente plastificante
		PEP	5	Fármaco/peptídeo

* A proporção de fármaco/peptídeo sugerida deverá ser adaptada de acordo com a concentração final de peptídeo a ser utilizado.

Elaborado pela autora, 2023.

As diferentes combinações propostas na Tabela 2 apresentam variações desde a composição de polímero base (PB) até a quantidade e/ou presença de agente plastificante ou ainda na quantidade e/ou presença de intensificador de entrega do fármaco.

Com exceção das formulações D e E, as demais foram obtidas por solubilização dos polímeros em uma mistura DCM/MetOH (1:1), sob agitação magnética, por um período suficiente para a obtenção de uma solução homogênea, na qual foram então, adicionados os demais componentes. A formulação D foi preparada em ordem específica para a adição dos componentes, uma vez que após a dissolução do polímero em DCM, a adição de EtOH tornava a mistura imediatamente viscosa e de difícil manipulação, o que impossibilitava a homogeneização dos demais componentes. Desta forma, a formulação foi preparada pela dissolução inicial do polímero base em 10 mL de DCM, homogeneizada por agitação magnética, seguida da adição e respectiva homogeneização de DBF e PG, tendo ao final, a adição de 6 mL de EtOH. A preparação da formulação E difere das demais, não só pela combinação de polímeros, mas essencialmente pelo volume de solventes utilizados, sendo 10 mL de DCM para dissolução inicial do polímero, seguida da adição de 10 mL de EtOH e dos demais componentes, solubilizados sob agitação magnética por tempo suficiente para que a solução estivesse homogênea.

Tabela 2. Composição dos filmes preparados

Identificação	Sigla	Composição	Concentração/Quantidade
A	PB	EC	85%
		E15LV	15%
	PBM	PB	76,45%
		DBF	15,95%
B	PB	PG	7,60%
		Solventes	5 mL
	PBM	DCM:MetOH (1:1)	5 mL
C	PB	EC	85%
		E15LV	15%
	PBM	PB	61,57%
		DBF	25,68%
D	PB	PG	12,75%
		Solventes	10 mL
	PBM	DCM:MetOH (1:1)	10 mL
E	PB	EC	50%
		E15LV	20%
	PBM	K100M	30%
		PB	61,57%
	PB	DBF	25,68%
		PG	12,75%
	PBM	DCM	10 mL
		EtOH	6 mL
	PB	K4M	75%
		K100M	25%
	PBM	PBV	76,17%
		DBF	23,83%
	Solventes	DCM	10 mL
		EtOH	10 mL

Elaborado pela autora, 2023.

Imediatamente após o preparo das soluções que deram origem aos filmes, estas foram vertidas sobre Placas de Petri de vidro, limpas, secas, identificadas e niveladas sobre uma bancada, de modo que a secagem dos filmes pudesse ocorrer sem que houvesse variação significativa de espessura entre as diferentes regiões da placa, por um período de 48 horas, à temperatura ambiente. A seguir, com exceção de A, onde foi requerida a adição de 20 mL de água ultrapura, seguida de repouso por 72 h para a liberação do filme aderido ao fundo da placa, os filmes foram destacados das placas com o auxílio de uma espátula.

Também foram preparados filmes com formulações baseadas nos constituintes utilizados por Khan e col em 2015, tais como Metolose (MET) como polímero base, associada a água (H₂O), PEG 400 e EtOH, as quais não se mostraram adequadas. Desta forma, novas adaptações, incluindo componentes utilizados por Vijaya et al. (2015), tais como as HPMC K4M e K100M, juntamente com PEG 200, foram realizadas. Assim, duas novas formulações foram obtidas e denominadas V3005 e VetOH (Tabela 3).

Tabela 3. Filmes produzidos a partir de adaptações das formulações propostas por Khan et al. (2015) e Vijaya et al. (2015)

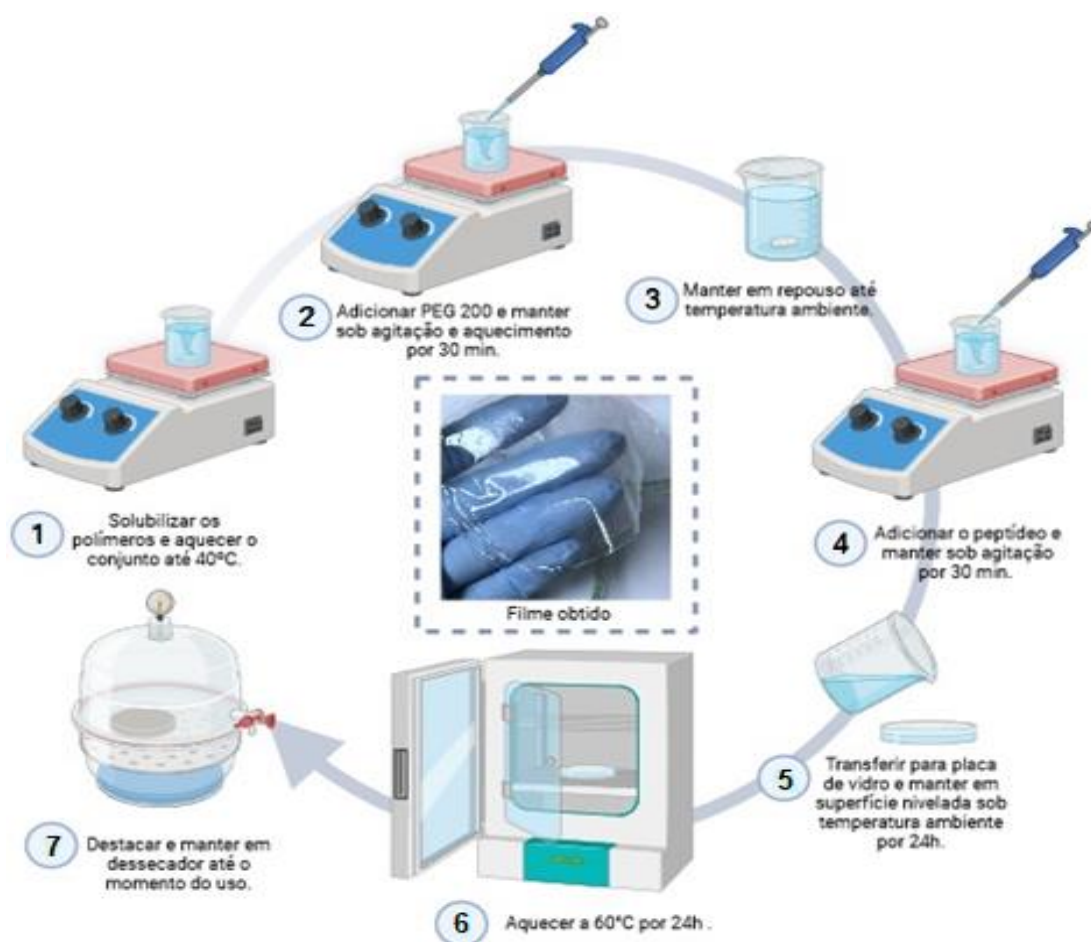
Identificação	Sigla	Composição	Concentração/Quantidade
V3005	PBV	K4M	75%
		K100M	25%
	PBVK	PBV	50%
		PEG200	50%
	Solvente	H ₂ O	20mL
VetOH	PBV	K4M	75%
		K100M	25%
	PBKE	PBV	50%
		PEG200	50%
	Solventes	H ₂ O	20mL
		EtOH	4mL

Elaborado pela autora, 2023.

Estes filmes foram obtidos a partir da dissolução do polímero base (PBV) na proporção indicada, em 20 mL de água ultrapura, sob agitação, até que o polímero estivesse completamente hidratado e não houvesse a presença de aglomerados do polímero (Etapa 1 – Figura 1). Após, aqueceu-se o conjunto até 40°C e então foi adicionado PEG200, na proporção indicada, mantendo-se a agitação e aquecimento por 30 minutos (Etapa 2 – Figura 1). Neste ponto, para a composição VetOH, foram adicionados 4 mL de Etanol, e o conjunto foi mantido sob agitação por mais 5 minutos. Após esta etapa, retirou-se o aquecimento e o conjunto foi mantido em repouso para que a solução atingisse a temperatura ambiente (Etapa 3 – Figura 1). Para os filmes contendo peptídeos, é nesta fase em que feita a adição do peptídeo, em quantidade equivalente ao que se deseja obter por área do filme. Em seguida, as soluções foram levadas novamente a agitação por 30 minutos (Etapa 4 – Figura 1) e ao final deste período, foram vertidas sobre placas de vidro, niveladas sob a superfície da bancada

e deixadas por 24h com a tampa parcialmente aberta para a eliminação das bolhas contidas nos géis (Etapa 5 – Figura 1). Ao final deste período, as placas foram levadas a estufa aquecida a 60°C por 24 h para secagem final (Etapa 6 – Figura 1). Os filmes assim obtidos foram destacados das placas, identificados e deixados em dessecador até o momento de uso (Etapa 7 – Figura 1), quando então foram recortados em discos de 5 mm de diâmetro para a realização dos ensaios.

Figura 1. Representação esquemática do processo de obtenção dos filmes V3005 e VetOH.



Elaborado pela autora com auxílio do BioRender, 2023.

3.2. Síntese Química dos Peptídeos

Peptídeos lineares, com sequências de aminoácidos baseadas na sequência derivada da fibronectina humana e nas reconhecidas propriedades descritas para a sequência KTTKS (ABU SAMAH; HEARD, 2011), foram projetados para serem associados a filmes transdérmicos com aplicação na cicatrização de tecido cutâneo.

Os peptídeos (Tabela 4) foram sintetizados quimicamente pelo método da fase sólida (AMBLARD et al., 2006; JARADAT, 2018) de acordo com o protocolo padrão que emprega o grupamento base-lábil Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonila) como protetor dos α -amino grupos, e derivados t-butílicos (t-Bu) para a proteção das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos trifuncionais (BEHRENDT; WHITEB; OFFERC, 2016), em seringas de polipropileno de 10 mL, contendo um filtro de polietileno poroso, conectadas a um sistema à vácuo com frasco coletor de resíduos (Figura 2).

Tabela 4. Estrutura primária dos peptídeos modelados e sintetizados

Identificação	Sequência	MM (g.mol ⁻¹)
NMA	KTTKS	563,65
NMB	WTGRGDSPKTTKS	1.420,53
NMC	WTGRGDSP-Ahx-KTTKS	1.533,68
NMD	Ahx-KTTKS	676,80
NME	Acetil-KTTKS-Ahx-NH ₂	717,85
NMF	Acetil-Ahx-KTTKS-Ahx-NH ₂	831,01

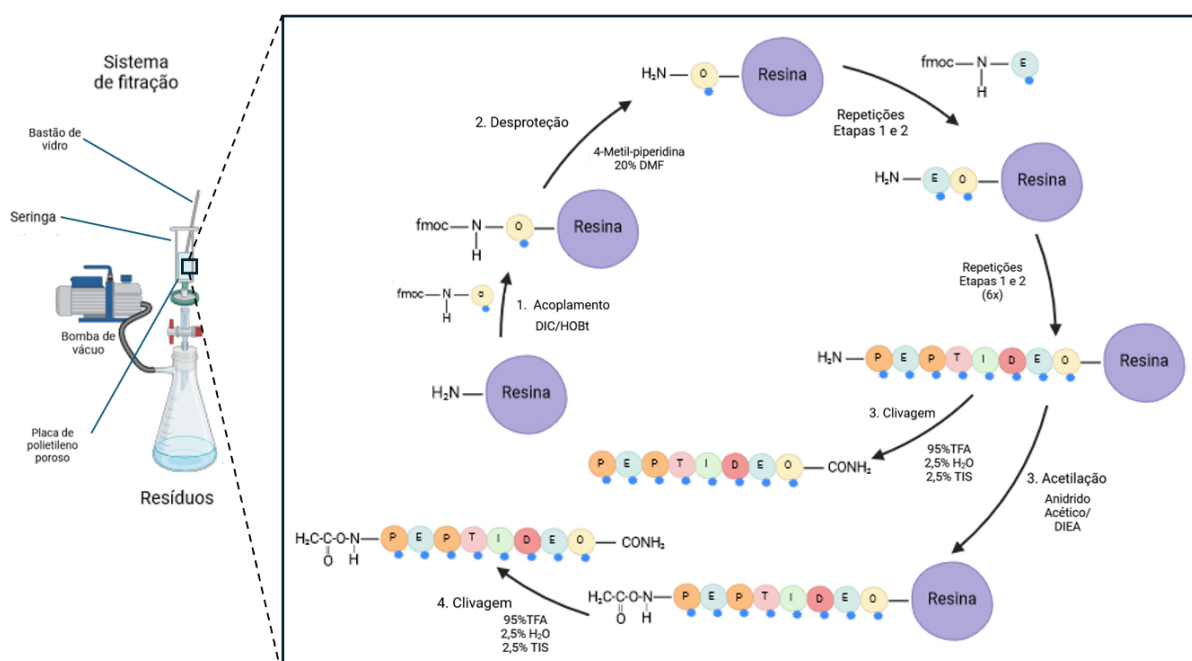
Elaborado pela autora, 2023.

Foram utilizadas 500 mg da resina Fmoc-Ser(tBu)-Wang com grau de substituição de 0,33 mmol.g⁻¹, como polímero de partida para as sequências NMA, NMB, NMC e NMD. Para as sequências NME e NMF, foram utilizadas 500 mg de uma Rink Amida MBHA, com grau de substituição de 0,5 mmol.g⁻¹. O uso dessa resina fundamenta-se no fato de que, ao final da síntese, ambos peptídeos apresentarão 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 do colágeno tipo I. 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. O ácido ϵ -amino hexanóico (Ahx) foi utilizado ainda como espaçador inerte em NMB, obtendo-se a sequência NMC, e ainda para aumentar a hidrofobicidade da sequência NMA, obtendo-se as sequências NME e NMF, acetiladas posteriormente.

Nas sínteses, foram utilizados Diisopropilcarbodiimida/1-hidroxibenzotriazol

(DIC/HOBt) como agentes de condensação. Na etapa de acoplamento de cada aminoácido (Etapa 1 – Figura 2), foi utilizado um excesso molar de 3 vezes, em relação à escala inicial de síntese, tanto para os Fmoc-aminoácidos quanto para os agentes de condensação, inicialmente em DCM:DMF (1:1), por um período de 90 minutos. A desproteção dos grupos α -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 por 20 minutos (Etapa 2 – Figura 2). A eficiência das etapas de entrada de cada Fmoc-aminoácido foi monitorada pelo teste de ninidrina (KAISER et al., 1970) e, quando positivo (condensação incompleta), o processo era repetido com 50% da quantidade inicial dos reagentes. A acetilação dos peptídeos NME e NMF foi feita com anidrido acético e Diisopropiletilamina (10 equivalentes cada) em DMF, por 30 minutos (Etapa 4 – Figura 2).

Figura 2. Esquema ilustrativo da síntese de peptídeo pela metodologia da fase sólida e estratégia Fmoc (= representa um protetor de cadeia lateral de um resíduo de aminoácido trifuncional genérico)



Elaborado pela autora com auxílio do BioRender, 2024.

A clivagem final dos peptídeos da resina 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 TIS (2,5%),

a 25°C por 2 horas (Etapa 3 – Figura 2). Cada peptidil-resina foi submetida então a três lavagens com éter dietílico gelado e o conjunto foi mantido em banho de gelo por aproximadamente 15 minutos, sendo que a cada lavagem, o conteúdo era submetido a agitação e posteriormente centrifugação a 4500 rpm por 5 minutos, seguidos da retirada do sobrenadante. Ao final, manteve-se os frascos abertos em capela por cerca de 12 h para a evaporação dos resquícios de éter previamente a etapa de extração.

Para a extração dos peptídeos, o precipitado obtido foi solubilizado em uma solução de ácido acético 10% (v/v) seguida de centrifugação (4500 rpm por 5 min) por 7 vezes. Todo o sobrenadante proveniente desta etapa foi submetido a filtração simples em placa de polietileno porosa, seguido de rotoevaporação (aproximadamente 45 min) e liofilização por 24 h.

Uma pequena fração de cada peptídeo bruto liofilizado (cerca de 2 mg) obtido, foi dissolvida em 50 µL de solvente “A” (água contendo 0,045% de TFA), filtrada (0,22 µm) e submetida à análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em escala analítica. Para isso, foi utilizado um UPLC Shimadzu Prominense, empregando coluna de fase reversa C18 Phenomenex Júpiter (250 x 4,6 mm), diâmetro das partículas 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 contendo 0,036% de TFA), em gradiente de 5 a 95% de B em 30 minutos, com fluxo de 1,0 mL/minuto e detecção a 220 nm. A partir dos resultados de tempo de retenção e porcentagem de solvente obtidos nestas análises, foram definidas as condições relativas à concentração de solvente para purificação, em escala semi-preparativa (coluna C18, Zorbax Eclipse XDB (250 x 10 mm); d=10 µm; 300 Å), efetuada em um cromatógrafo Shimadzu LC-20AT/SPD-20A/CBM-20A.

3.3. Ensaios com culturas celulares

Para os ensaios de toxicidade, foram cultivadas células da linhagem MRC-5 (ATCC CCL-171), correspondente a fibroblastos de tecido humano, e HaCaT (BCRJ 0341), correspondente a queratinócitos de tecido humano, em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Lonza) e DMEM alta glicose (Lonza), respectivamente. Ambos foram suplementados pela adição de 10% de soro fetal bovino inativado (Gibco), gentamicina a 4 mg/100 mL de meio de cultura, estreptomicina a 1 µL/mL de meio de cultura, que passaram a serem denominados

DMEM completo (DMEM-C) e DMEM completo high (DMEM-CH).

Durante o período de expansão celular, a troca do meio de cultura foi realizada a cada dois dias e os repiques foram realizados uma vez por semana. O repique foi realizado retirando-se o excesso de meio de cultura da garrafa, seguido de lavagem com solução salina tamponada de fosfato (PBS) estéril para remoção de células mortas e resíduos do metabolismo celular, e posterior aplicação de 2 mL de solução padrão de tripsina por 5 minutos para desprender o conteúdo celular da garrafa de cultura estéril (Kasvi). Em seguida, foram adicionados 4 mL de meio de cultura para neutralização da ação de clivagem da solução anterior e então todo o conteúdo obtido foi transferido para tubos cônicos de 15 mL e submetidos à centrifugação a $400 \times g$ por 5 min (SOLAB SL-700). Por fim, o sobrenadante foi removido e o pellet celular foi ressuspensionado em 1 mL de meio DMEM-C ou DMEM-CH para contagem em câmara de Neubauer (Boeco, Germany) pelo método de exclusão do Azul de Trypan a 0,04%.

No período de expansão, o conteúdo celular obtido em cada garrafa foi utilizado para o cultivo de duas novas garrafas, de modo semelhante ao descrito anteriormente, até que fosse obtido conteúdo celular suficiente para a realização dos ensaios.

Com a linhagem MRC-5 foram realizados ensaios de toxicidade necessários para a seleção dos melhores filmes e melhores peptídeos a serem combinados posteriormente, bem como para os ensaios de biossíntese de colágeno antes e após a seleção da combinação. De posse das informações que permitiram a seleção dos melhores filmes e peptídeos a serem combinados, foram realizados ensaios de toxicidade utilizando a linhagem de queratinócitos, HaCaT.

Os ensaios de toxicidade dos filmes, peptídeos e filmes modificados pela adição de peptídeos em ambas as linhagens, foram realizados por meio da análise da viabilidade celular mitocondrial, utilizando ensaio colorimétrico de MTT ((brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio, Sigma).

Para tanto, após a etapa inicial de expansão celular e contagem pelo método de exclusão de Azul de Trypan, um volume de 100 μL da suspensão celular foi adicionado a cada poço de placas de cultura estéril de 96 poços a uma densidade celular de 5×10^4 e 5×10^3 células.mL⁻¹ para ensaios com filmes e peptídeos, respectivamente, para ambas as linhagens. As placas assim preparadas, foram então incubadas por 24 horas a 37°C e 5% CO₂ para que as células pudessem aderir ao fundo dos poços. A variação da densidade celular utilizada nesta etapa se justifica pelo elevado aumento no número de células nos poços, observado durante a

realização de ensaios preliminares que levou a resultados imprecisos.

3.3.1. Avaliação de viabilidade celular de peptídeos

Para avaliar a influência dos peptídeos sobre a viabilidade celular das linhagem fibroblástica, MRC5, e queratinocítica, HaCaT, foram preparadas soluções por diluição seriada em tubos Eppendorf, totalizando 6 diferentes diluições para cada peptídeo. A concentração final dos peptídeos, considerando o volume de meio em cada poço foi de $160 \mu\text{mol.L}^{-1}$ a $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Após o preparo das placas e correspondente período de incubação, $50 \mu\text{L}$ de solução de cada um dos peptídeos na sua respectiva diluição foi adicionado a cada um dos poços, mantendo-se como controle positivo de crescimento, células em meio DMEM completo apropriado ao tipo de célula e o controle negativo apenas meio sem células. As placas foram então incubadas por períodos de 24, 48 e 72 horas a 37°C e 5% de CO_2 . Ao final de cada período, de modo análogo ao realizado para os filmes, os sobrenadantes foram descartados e aos poços foram adicionados $100 \mu\text{L}$ de solução tampão PBS estéril para remoção de células mortas e demais resíduos metabólicos presentes, que foi então removida e descartada.

Para o tratamento colorimétrico foram adicionados aos poços $180 \mu\text{L}$ de solução composta por DMEM e PBS estéril, na proporção de 1:4, e então $20 \mu\text{L}$ de solução de MTT a $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$. Após, as placas foram incubadas por 4 horas a 37°C e 5% CO_2 . Ao final deste período, os sobrenadantes foram descartados e a cada poço foi adicionado $100 \mu\text{L}$ de álcool isopropílico e DMSO na proporção de 1:1 para a dissolução dos cristais formados, mantendo o conjunto protegido da luz e sob agitação por 1 hora. A leitura das absorvâncias (DO) foi realizada utilizando espectrofotômetro leitor de microplacas EPOCH da Biotek Instruments, a 540 nm . Os testes foram realizados em triplicata, para os diferentes períodos, e a viabilidade celular (VC) calculada aplicando-se a equação 1. Os resultados obtidos foram expressos em percentual de viabilidade celular, considerando o controle positivo, C+, como 100%.

$$VC (\%) = \left(\frac{(DO_{am} - DO_{c-})}{(DO_{c+} - DO_{c-})} \right) * 100 \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

DO_{am} = densidade ótica média de cada amostra analisada;

DO_{c-} = densidade ótica média do controle negativo;

DO_{c+} = densidade ótica média do controle positivo.

3.3.2. Avaliação da viabilidade celular em filmes

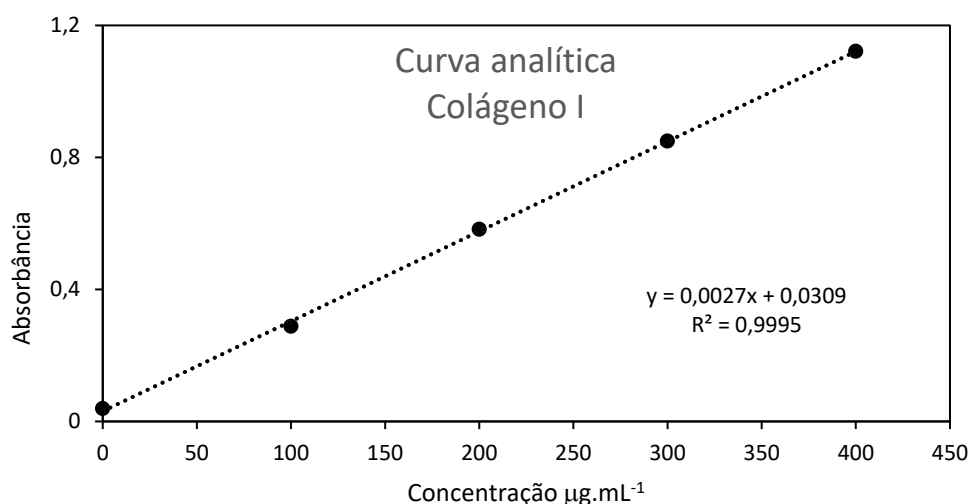
Após o preparo das placas, os discos dos filmes foram depositados sobre a superfície de cada poço, mantendo-se como controle positivo uma coluna contendo células em meio DMEM completo apropriado e o controle negativo apenas sendo o mesmo meio, sem células. A título de comparação sobre o desempenho dos filmes, foram utilizados discos obtidos a partir de embalagens de soro fisiológico (identificados por FIG) analogamente ao descrito na técnica de Figueiredo (FIGUEIREDO et al, 2017). As placas foram então incubadas por períodos de 24, 48 e 72 horas sob as mesmas condições descritas anteriormente. Ao final de cada período, as membranas foram retiradas (com exceção das membranas C, D e E que foram desfeitas em contato com o meio de cultura e se depositaram ao fundo da placa), os sobrenadantes foram descartados e aos poços foram adicionados 100 µl de solução tampão PBS estéril para remoção de células mortas e demais resíduos metabólicos presentes. A solução resultante foi então removida e descartada. A seguir, foram adicionados 180 µL de solução composta por DMEM apropriado e PBS na proporção de 1:4, seguida da adição de 20 µL de solução de MTT a 1,0 mg.mL⁻¹ e então as placas foram incubadas por 4 horas sob as mesmas condições de temperatura e CO₂ descritas anteriormente. Por fim, os sobrenadantes foram descartados e a cada poço foi adicionado 100 µL de álcool isopropílico e DMSO, na proporção 1:1 para a dissolução dos cristais formados, mantendo o conjunto protegido da luz e sob agitação, por 1 hora. A leitura das absorbâncias (DO) foi realizada utilizando leitor de microplacas EPOCH da Biotek Instruments, a 540 nm. Os testes foram realizados em triplicata, para os diferentes períodos, e a viabilidade celular (VC) calculada de acordo com a equação 1.

3.3.3. Biossíntese de colágeno

Para o estudo de biossíntese de colágeno pelos fibroblastos, foi necessário inicialmente, preparar uma curva analítica padrão a ser utilizada como referência. Para isso, soluções de diferentes concentrações de colágeno tipo I (Sigma, C9791), foram utilizadas. Foram adicionados 100 µL de cada uma das concentrações preparadas, em tubos tipo Eppendorf, seguidas da adição de 200 µL da solução corante Picrosirius red. Os tubos foram mantidos sob agitação por 30 minutos e em seguida, levados para centrifugação por 5 minutos a 2000 RPM. Os sobrenadantes foram removidos por aspiração a vácuo, e o precipitado lavado com 200 µL de ácido acético 0,05 mol.L⁻¹ e

então ressuspensos com 200 μL de hidróxido de sódio 10 mmol.L^{-1} , mantendo-se durante 30 minutos sob agitação até que as soluções obtidas fossem transferidas para uma placa de 96 poços para a leitura das absorbâncias utilizando espectrofotômetro leitor de microplacas EPOCH da Biotek Instruments, a 540 nm. Com os resultados, foi traçada uma curva analítica (Figura 3), a qual foi utilizada para quantificar a produção de colágeno pelos fibroblastos.

Figura 3. Curva analítica para quantificação de colágeno tipo I em solução.



Elaborado pela autora, 2023.

Para a avaliação da influência dos peptídeos sobre a expressão de colágeno, de modo análogo ao realizado para o ensaio de toxicidade, foram preparadas soluções por diluição seriada em tubos Eppendorf, totalizando 6 diferentes diluições para cada peptídeo de modo que a concentração final em cada poço foi de $160 \mu\text{mol.L}^{-1}$ até $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Após o preparo das placas com densidade celular de $5 \times 10^3 \text{ células.mL}^{-1}$ e correspondente período de incubação, 50 μL de solução de cada um dos peptídeos na sua respectiva diluição foi adicionado a cada um dos poços, mantendo-se como controle positivo de crescimento, células em meio DMEM-C e o controle negativo apenas em DMEM-C, sem células. Além disso, de modo semelhante aos ensaios de toxicidade, para a análise da influência dos filmes, o tratamento realizado nas placas consistiu na aplicação de discos dos filmes, contendo ou não peptídeos, para a avaliação do desempenho ao longo do tempo, mantendo-se como controle positivo de crescimento, células em meio DMEM-C e o controle negativo apenas o filme sem

peptídeo, em meio DMEM-C.

A título de comparação entre os resultados de toxicidade e expressão de colágeno, os períodos analisados foram padronizados para ambos os ensaios e desta forma, as placas foram então incubadas por 24, 48 e 72 horas a 37°C e 5% de CO₂.

Ao final de cada período, os sobrenadantes foram removidos e as células foram fixadas pela adição de 200 µL de solução de Bouin e mantida durante 1 hora à temperatura ambiente. Após o período, os poços foram lavados com 200 µL de água destilada e mantidos a temperatura ambiente para secagem, pelo período de 2 horas. Em seguida, foram adicionados 200 µL de corante Picrosirius red, (Direct Red 0,1% em solução aquosa saturada de ácido pícrico), e então a placa foi mantida sob agitação leve e ao abrigo da luz por 1 hora. Posteriormente o corante foi retirado e os poços lavados com 200 µL de ácido clorídrico 10 mmol.L⁻¹ para remoção do excesso de corante e, ao final, foram adicionados 150 µL de hidróxido de sódio 10 mmol.L⁻¹ em cada poço, mantendo-se então a placa sob agitação por 1 hora para dissolução das fibras colágenas. A leitura das absorbâncias foi realizada utilizando espectrofotômetro leitor de microplacas EPOCH da Biotek Instruments, a 540 nm, com os ensaios realizados em triplicata para cada um dos períodos.

3.4. Avaliação da atividade antimicrobiana

Para avaliar a atividade antimicrobiana dos peptídeos livres e dos filmes contendo ou não peptídeos, foi utilizado o método de microdiluição em placa com modificações de acordo com as normas descritas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI – documentos M7-A10, 2015 e M27-A3, 2017). Para tanto, foram utilizadas cepas padrão de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, respectivamente, *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458) e *Escherichia coli* (ATCC 43895) - além de duas diferentes cepas de leveduras patogênicas do gênero *Candida*, sendo elas a cepa padrão *Candida albicans* (ATCC 90028) e outra de maior virulência com tendência a formação de biofilmes, *Candida albicans* (ATCC 10231), todas adquiridas do Laboratório de Microrganismos de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS da Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

Os tratamentos a que foram submetidas as placas foram realizados utilizando solução aquosa dos peptídeos livres, diluídos seriadamente em concentrações entre 160 µmol.L⁻¹ e 5 µmol.L⁻¹ no poço. Para a avaliação dos filmes, discos de 5 mm dos

filmes modificados e não pela adição dos peptídeos foram utilizados. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.4.1. Preparação do inóculo

Alíquotas de cada microrganismo foram descongeladas e reativadas em meio de cultivo adequado, sendo Mueller Hinton (MH) para bactérias e caldo Sabouraud Dextrose (SDB) para leveduras, por incubação a 37°C por 24 horas. Após este período, os microrganismos foram semeados em placas de cultivo contendo meio ágar específico, Mueller Hinton ágar (MHA) e Sabouraud Dextrose ágar (SDA), para bactérias e leveduras, respectivamente, e incubadas em estufa de crescimento a 37°C durante 24 h para as bactérias e 48 h para as leveduras.

Os inóculos a serem utilizados nos ensaios de Concentração Inibitória Mínima em Leveduras (CIM) e Concentração Inibitória Mínima para Bactérias (CBM) foram preparados a partir da cultura obtida em placa de cultivo de onde foram retirados o equivalente a 5 colônias isoladas de cada microrganismo. Com o auxílio de uma alça de platina, as colônias foram transferidas para tubos de ensaio contendo 10 mL de meio estéril específico que foram incubados sob agitação a 140 RPM por 24 horas a 37°C.

3.4.1.1. Avaliação da Concentração Inibitória Mínima para Bactérias (CBM)

Para a realização do ensaio de CBM, cada um dos inóculos, de *S. aureus* e *E. coli*, foi utilizado para obter a suspensão celular em meio de cultivo MH por ajuste da turbidez com medidas de absorbância a 600 nm, até que fosse obtido o equivalente à 0,5 da escala de McFarland, que corresponde a aproximadamente $1,0 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL). A partir desta, uma nova solução de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL foi preparada por diluição na escala de 1:10 em meio MH e utilizada para a realização dos ensaios.

Para os peptídeos, placas de 96 poços foram preparadas pela adição de 80 µL de meio MH por poço, seguido da diluição seriada de 100 µL de cada um dos peptídeos NMA, NMB, NMC, NMD, NME, NMF, com 6 diferentes concentrações, sendo a máxima de $160 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e a mínima de $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ no poço. Então, 20 µL da suspensão de microrganismos foi adicionado a cada poço e as placas foram incubadas por um período de 24 h a 37°C, sem agitação. Peptídeos selecionados, com atividade inibitória contra bactérias, foram utilizados para preparar os filmes

modificados com peptídeos e usados neste ensaio. Desta forma, discos de 5 mm de cada filme a ser analisado foram depositados sobre os poços após a adição dos microrganismos. Os controles positivos (C+) de crescimento foram compostos por meio MH adicionado de suspensão bacteriana, em todos os casos, enquanto os controles negativos (C-) de crescimento foram compostos apenas pelo meio MH para os ensaios contendo peptídeos, e filmes sem peptídeos para os ensaios com filmes.

Ao final do período de incubação, a concentração inibitória mínima em bactérias foi avaliada por leitura espectrofotométrica em leitor de microplacas (EPOCH, Bioetk Instruments) no comprimento de onda de 595 nm. O cálculo da porcentagem de inibição do crescimento bacteriano foi determinado pela análise comparativa dos controles positivo e negativo, segundo a equação 2.

$$\% \text{ inibição} = \left(1 - \left(\frac{DO_{amostra} - DO_{C-}}{DO_{C+} - DO_{C-}} \right) \right) \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

$DO_{amostra}$ = densidade ótica média de cada amostra analisada;

DO_{C-} = densidade ótica média do controle negativo;

DO_{C+} = densidade ótica média do controle positivo

3.4.1.2. Avaliação da Concentração Inibitória Mínima em Leveduras (CIM)

O ensaio de CIM foi realizado a partir da diluição de cada um dos inóculos das cepas de levedura de modo análogo ao realizado para CBM, no entanto, a concentração da suspensão celular foi ajustada para uma faixa de densidade ótica (DO) entre 0,100 e 0,150 a 530 nm, correspondente a aproximadamente $1,0 \times 10^6$ UFC/mL (RODRÍGUEZ-TUDELA et al., 2001). Então, uma nova solução a $1,0 \times 10^3$ UFC/mL foi preparada por diluição na escala de 1:1000 em meio SDB e utilizada para a realização dos ensaios por técnica de diluição em microplacas.

Placas de 96 poços foram preparadas pela adição de 100 µL de meio SDB por poço, seguido da diluição seriada de 100 µL cada um dos peptídeos NMA, NMB, NMC, NMD, NME, NMF, com concentração entre $160 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Então, 100 µL da suspensão de leveduras foi adicionada a cada poço e as placas foram incubadas por um período de 48h a 37°C sem agitação. Os controles positivo (C+) de

crescimento foram compostos por meio SDB adicionado de suspensão de levedura, enquanto os controles negativos (C-) de crescimento foram compostos apenas por meio SDB. Ao final do período de incubação, a concentração inibitória mínima do crescimento fúngico foi avaliada como descrito para o ensaio CBM, segundo a equação 2.

3.5. Caracterização dos Filmes

Os melhores filmes obtidos, com resultados promissores de viabilidade celular frente a linhagem de fibroblastos foram selecionados para a sequência dos ensaios e, modificados ou não por peptídeos selecionados, foram submetidos a diferentes ensaios de caracterização para avaliar a influência da inserção do peptídeo sobre a estrutura polimérica utilizada.

3.5.1. Difratometria de Raios-X (DRX)

A determinação da estrutura cristalina dos filmes com e sem peptídeo foi realizada pelo Laboratório Computacional de Análises Cristalográficas e Cristalinas (LAbCACC) do Instituto de Química da UNESP – Campus de Araraquara, SP, utilizando difratômetro Rigaku SmartLab SE, com filtro de radiação $K\beta$ para cobre ($K\beta\text{Cu}$), fenda de emissão 2 e detecção de $\frac{1}{4}$, ângulo de varredura teta (θ) entre 4° e 80° e passo de $0,02$ a $5^\circ.\text{min}^{-1}$.

3.5.2. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

As análises espectroscópicas dos filmes foram realizadas no Laboratório Multiusuários do Instituto de Química da UNESP – Campus de Araraquara, SP, utilizando espectrofotômetro de absorção na região do infravermelho médio com transformada de Fourier por meio de reflexão total atenuada (cristal de diamante) modelo VERTEX 70 da marca BRUKER com equipamento ATR acoplado, detector tipo DLaTGS e faixa de leitura de 500 a 4000 cm^{-1} .

3.5.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises microscópicas dos filmes foram realizadas no Laboratório Multiusuários do Instituto de Química da UNESP – Campus de Araraquara, SP, utilizando Microscópio Eletrônico de Varredura TOPCOM, modelo SM-300) acoplado ao detetor de EDS (BRUCKER; xflash 6130) e parametro de tensão de 2.0kV . As

amostras foram recobertas por uma camada de carbono de espessura de 6 nm (20 s, tensão de 3 Kv e corrente de 15 mA).

3.6. Cálculo estatístico

Os dados que foram coletados e analisados seguiram os testes adequados de acordo com as variáveis do experimento e quando necessário, foi realizado pós-teste para múltiplas comparações, utilizando o software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). Todos os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

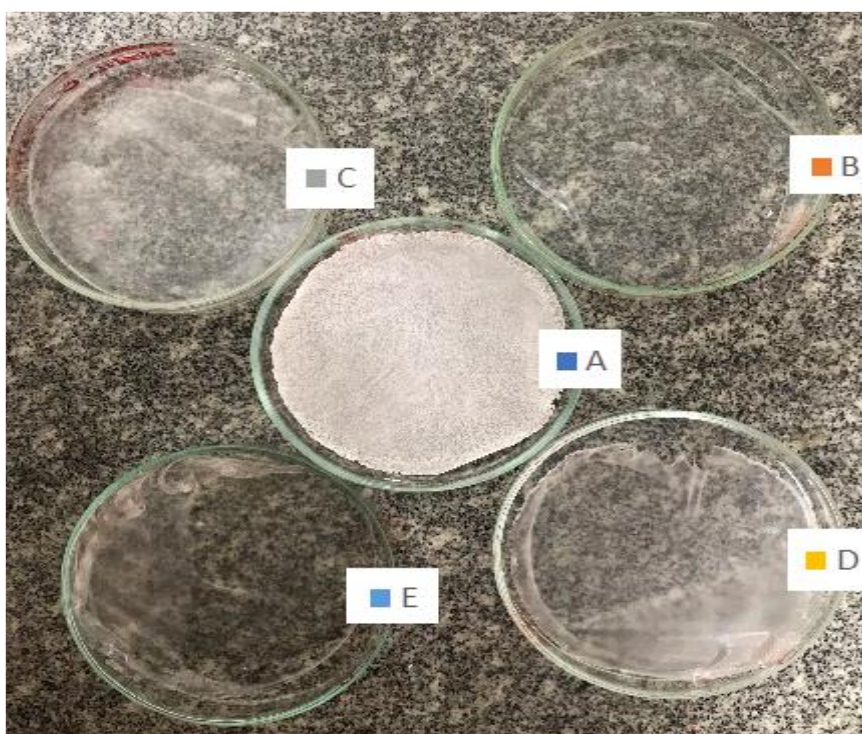
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Preparo e obtenção dos filmes

Os primeiros filmes obtidos e identificados de A a E (Tabela 2) apresentaram características próprias, mesmo tendo sido preparados com formulações muito parecidas.

Os filmes obtidos pela formulação A, imediatamente após a secagem apresentaram aspecto seco, translúcido e brilhante e se tornaram brancos, opacos e quebradiços após a adição de água e novo período de secagem. Os filmes obtidos a partir de B apresentam aspecto liso, resistente e translúcido ao final da secagem, sendo possível a sua retirada sem a necessidade de adição de água. Filmes obtidos pela formulação C apresentam textura áspera ao toque, porém com resistência, leve transparência e pouca elasticidade. Filmes obtidos a partir da formulação D apresentam características próximas a formulação C, porém com menor elasticidade e pouca maleabilidade. Já os filmes obtidos a partir da formulação E tem aspecto frágil, pouca maleabilidade e é o mais áspero em comparação aos demais (Figura 4).

Figura 4. Filmes preparados com base nas formulações de Patel et al. (2009) e Vijaya et al. (2015), obtidos após a etapa de secagem (identificados de A à E – Tabela 2)

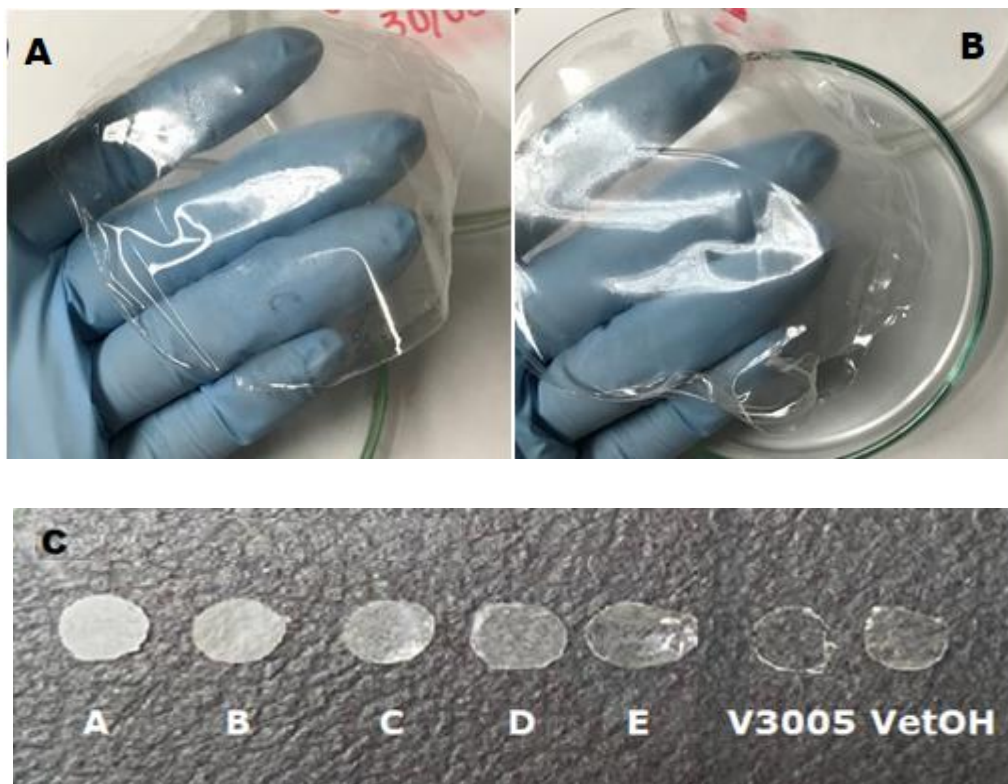


Com a realização de alguns ensaios preliminares com estes filmes e considerando as características de um ferimento com dificuldades de cicatrização, deduziu-se que os mesmos seriam de pouca utilidade. Assim, para aprimorar as características idealizadas para filmes com aplicação em tecidos sensibilizados pelos ferimentos, novas formulações foram desenvolvidas e testadas, agora incluindo novos componentes tais como HPMC K4M e K100M, juntamente com PEG 200 (VIJAYA et al, 2015), sendo obtidos ao final, os filmes V3005 e VetOH (Tabela 3).

Estes filmes apresentaram boa elasticidade, flexibilidade, transparência e maleabilidade (Figura 5). A diferença entre as composições V3005 (Figura 5A) e VetOH (Figura 5B) se dá na maleabilidade, sendo a composição V3005 a mais elástica, flexível e resistente. Comparativamente às demais formulações, estas foram as que apresentaram características físicas mais próximas ao idealizado na proposição deste trabalho.

Nos discos de 5 mm (Figura 5C) obtidos para todas as formulações preparadas, é possível observar, comparativamente, as diferenças como brilho, opacidade e transparência entre os discos de cada uma das composições.

Figura 5. Filmes V3005 (A) e VetOH (B) e os respectivos discos de 5 mm (C) dispostos de modo comparativo com as composições A,B,C,D e E.



4.2. Síntese e caracterização dos peptídeos

As sequências peptídicas propostas para este trabalho foram escolhidas a partir dos resultados de modelagem computacional obtidos anteriormente para a sequência derivada da fibronectina humana (LOPES, 2015), especificamente os resíduos 1521 a 1528 (Figura 6) e das propriedades descritas para a sequência KTTKS, um subfragmento de colágeno tipo I que possui efeito estimulante na produção de colágeno (tipo I e tipo III) e de fibronectina na pele (ABU SAMAH; HEARD, 2011).

Figura 6. Estrutura primária da região 1511-1540 da fibronectina humana

1511VDYTITVVYGV¹⁵²¹TGRGDSP¹⁵²⁸ASSKPISINYRT¹⁵⁴⁰

Elaborado pela autora, 2023.

Sequências peptídicas adicionais foram sintetizadas, incluindo alterações, tais como a substituição do resíduo de Valina (V) 1521 por triptofano (W) e a inclusão de resíduos de ácido ϵ -amino hexanóico (Ahx) como espaçador ou para aumentar a hidrofobicidade dos peptídeos (Tabela 4).

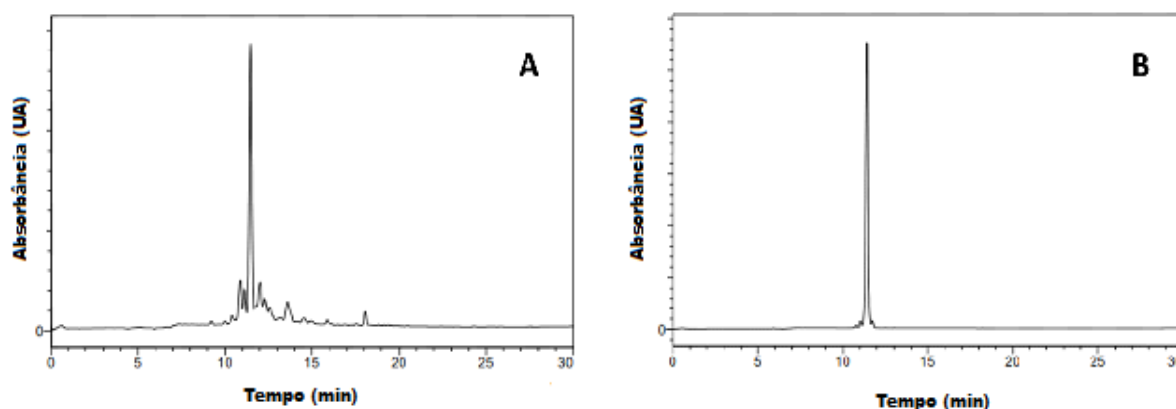
O resíduo de triptofano foi introduzido na sequência em substituição à valina para que o peptídeo pudesse ser detectado por espectroscopia de fluorescência, no caso de necessidade de identificação em estudos futuros. Estudos computacionais prévios evidenciaram que esta substituição não altera significativamente as interações intermoleculares que dão origem a um complexo estável da fibronectina com as integrinas (LOPES, 2015).

O ácido ϵ -amino hexanóico foi utilizado na sequência NMC, como um espaçador inerte, entre as duas sequências distintas, a título de comparação com NMB, que têm as duas sequências fundidas. Também foi adicionado a NMA, a fim de criar um ambiente hidrofóbico na extremidade N-terminal, obtendo-se NMD. Também foi inserido em ambas extremidades, N e C-terminais a fim de observar o fator permeabilidade, na expressão do colágeno em NME e NMF (Tabela 4).

Ao final de todo processo de síntese para obtenção dos peptídeos constantes na Tabela 4, uma pequena quantidade de cada peptídeo liofilizado (aproximadamente 2 mg) foi dissolvida em 1 ml de água ultrapura, filtrada e submetida à análise qualitativa

em CLAE, sob condições analíticas, conforme descrito em Materiais e Métodos. A partir dos resultados de tempo de retenção e porcentagem de solvente obtidos nestas análises, foram definidas as condições relativas à concentração de solvente para purificação dos peptídeos em escala semi-preparativa, que foram semelhantes para cada um deles. As frações provenientes do processo de purificação foram submetidas novamente a análises por CLAE em modo analítico. O conteúdo dos tubos denominados puros foi reunido e liofilizado. Posteriormente foram analisados por CLAE em modo analítico para confirmação da pureza. Os perfis cromatográficos obtidos antes e após purificação, para o peptídeo NMB representado como exemplo, estão representados na Figura 7.

Figura 7. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica do peptídeo NMB antes (A) e após purificação (B). Coluna de fase reversa C18 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⁻¹ e detecção a 220nm



Elaborado pela autora, 2023.

As análises por CLAE das frações puras mostraram que as purificações foram bem-sucedidas, atingindo para todas as amostras pureza relativa superior a 95%. A caracterização dos peptídeos puros foi realizada por determinação da massa molecular, a partir dos dados de razão massa/carga (MM/z) obtidas em um sistema LC/MS constituído por UFLC Shimadzu acoplado a um espectrômetro de massas Bruker Amazon SL empregando o modo de ionização por electrospray (ESI-MS positivo). Os valores de massa molecular obtidos [ES m/z: (M + H)⁺], estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Massas moleculares teóricas e obtidas por espectroscopia de massas.

Peptídeo	Massa Molecular teórica (g.mol ⁻¹)	ES+	ES m/z Obtido (g.mol ⁻¹)	Massa Molecular Obtida (g.mol ⁻¹)
NMA	563,65	+1	564,76	563,53
		+2	282,15	
NMB	1.420,53	+1	1421,81	1421,52
		+2	711,40	
		+3	474,98	
NMC	1.533,68	+1	1535,69	1534,67
		+2	767,90	
		+3	512,33	
		+4	384,80	
NMD	676,80	+1	677,88	677,48
		+2	339,54	
NME	717,85	+1	718,93	718,52
		+2	360,06	
NMF	831,01	+1	832,07	832,66
		+2	416,63	

Elaborada pela autora, 2023.

Os resultados foram coincidentes com o teórico esperado, confirmando a identidade dos peptídeos sintetizadas. O conjunto de resultados, permite concluir que os procedimentos utilizados para síntese, clivagem de peptidil-resina e metodologias de purificação desenvolvidas foram adequados, levando à obtenção das sequências peptídicas esperadas.

4.3. Ensaios com culturas celulares

Fibroblastos e queratinócitos constituem a maior porção celular durante as fases proliferativas e de reepitelização do processo de cicatrização, essenciais para o sucesso da reparação de ferimentos (GANTWERKER; HOM, 2011). Deste modo, ensaios de viabilidade celular foram realizados para avaliar os potenciais efeitos dos peptídeos, filmes e suas combinações sobre estas linhagens celulares. Para isso foi utilizado o método colorimétrico de MTT, uma vez que a atividade mitocondrial das células viáveis promove a reação de redução da molécula de MTT, em cristais de formazan, a qual relaciona-se proporcionalmente à viabilidade celular.

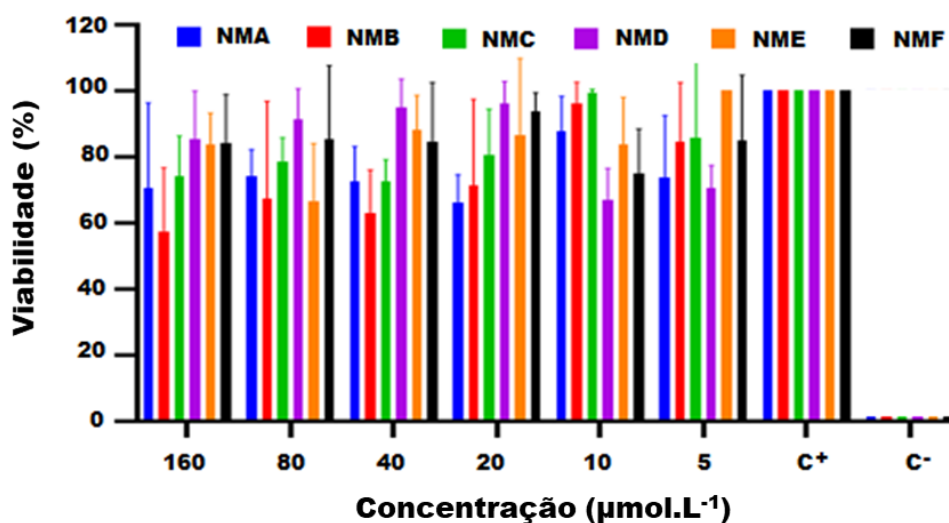
4.3.1. Peptídeos livres

4.3.1.1. Avaliação da viabilidade celular em fibroblastos

Os peptídeos sintetizados tiveram a sua ação testada frente às células da linhagem MRC-5, correspondente a fibroblastos de tecido humano. Os resultados obtidos foram expressos em percentual de viabilidade (considerando C+ como 100%), foram normalizados e estão demonstrados nas Figuras 8, 9 e 10, para os períodos de incubação de 24, 48 e 72 h, respectivamente.

Para o período de 24 h, nenhum dos peptídeos testados apresentou citotoxicidade para o tipo de célula testado, 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.

Figura 8. Ensaio de viabilidade celular para as células MRC-5, na presença dos peptídeos NMA a NMF, expressa em %, com tempo de incubação das amostras de 24 horas.



Elaborado pela autora, 2023.

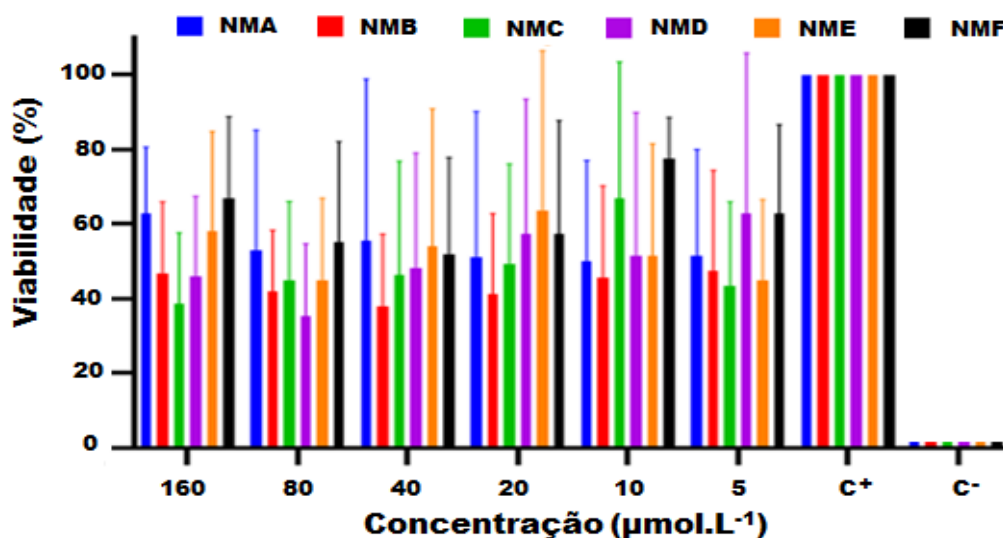
A análise estatística dos dados indicou que não foram atendidos os pressupostos da normalidade e, portanto, os dados foram analisados por teste não paramétrico de Friedman, com pós teste de Dunn's para múltiplas comparações. Os dados representam a média com desvio padrão (SD) e indicam que não há diferença estatística entre os peptídeos e o controle positivo. Desta forma, pode-se afirmar que os peptídeos analisados não apresentam indícios de toxicidade sobre a linhagem celular analisada neste período.

Analogamente, na Figura 9 estão representados os resultados de viabilidade

dos peptídeos em solução, após um período de incubação de 48h.

Após atendido os pressupostos da normalidade, os dados foram analisados por 2way ANOVA com pós teste de Tukey para múltiplas comparações. Os dados representam a média com desvio padrão (SD). As seguintes comparações apresentaram diferenças: 160 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ NMA vs NMC ($p=0,0281$); 80 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ NMC vs NMD ($p=0,0452$); 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ NME vs NMF ($p=0,0267$). Nas demais comparações não houve diferença estatística $p < 0,05$. Portanto, salvo as comparações que apresentam diferenças estatísticas, as demais não apresentam indícios de toxicidade.

Figura 9. Ensaio de viabilidade celular para as células MRC-5, na presença dos peptídeos NMA a NMF, expressa em %, com tempo de incubação das amostras de 48 horas.

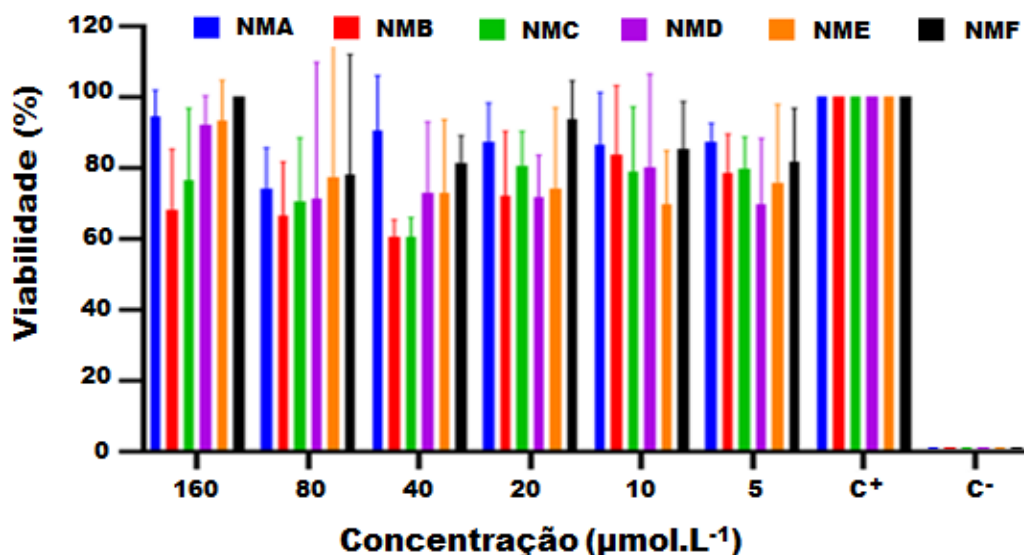


Elaborado pela autora, 2023.

Considerando que a estrutura dos diferentes peptídeos é constituída por uma sequência comum “KTTKS”, pode-se deduzir, em um primeiro momento, que a toxicidade observada após 48h de incubação, foi provocada por esta sequência. Por outro lado, os resultados obtidos, em experimento semelhante, após 72 h de incubação (Figura 10), levam a outra conclusão. Neste período de incubação, os resultados foram semelhantes àqueles obtidos com 24 h, ou seja, os dados obtidos não atendem aos pressupostos da normalidade, sendo assim, foram analisados por teste não paramétrico de Friedman com pós teste de Dunn’s para múltiplas comparações. Os dados representam a média com desvio padrão (SD) e não existe diferença estatística entre os peptídeos e o controle positivo. Portanto, nenhum dos peptídeos testados apresentou indícios de toxicidade segundo a análise estatística da

viabilidade celular para o período de 72h.

Figura 10. Ensaio de viabilidade celular para as células MRC-5, na presença dos peptídeos NMA a NMF, expressa em %, com tempo de incubação das amostras de 72 horas.



Elaborado pela autora, 2023.

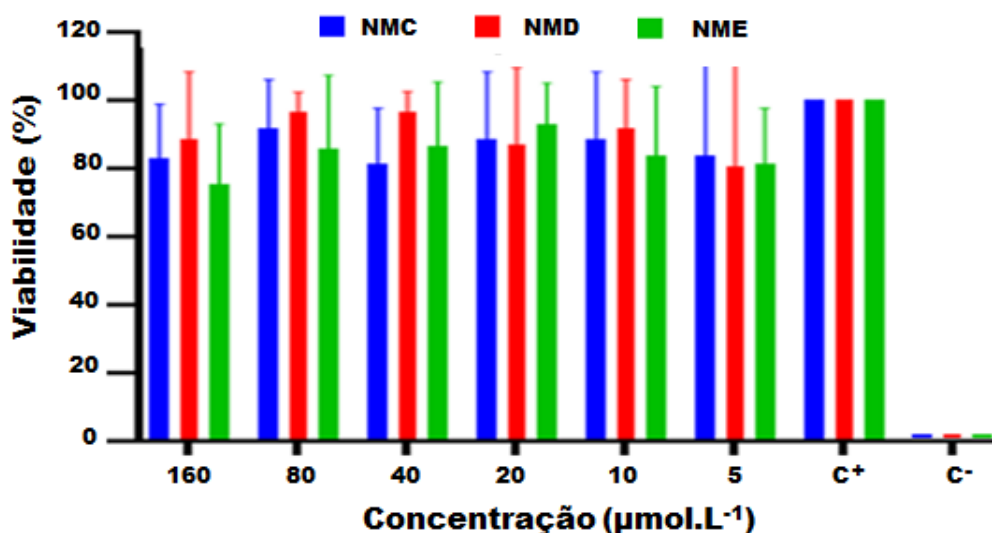
A análise estatística dos três períodos estudados, evidencia que em 48 h de incubação há indícios de toxicidade para alguns peptídeos analisados e que podem ser atribuídos, entre outros, à grande taxa de crescimento celular em que as células aderentes se aproximam rapidamente da confluência e o crescimento torna-se inibido por contato, abrandando o metabolismo fazendo com que a redução do MTT por célula seja menor. Essa situação leva a uma perda de linearidade entre a absorbância e o número de células, caracterizando uma falsa perda de viabilidade (RISS et al., 2016). Além disso, a perda de aderência celular, resultante da alta taxa de crescimento em 48 h, pode ser um dos fatores responsáveis pela falsa impressão de que as culturas morreram, na presença dos peptídeos (ASLANTÜRK, 2018).

Considerando os melhores resultados de viabilidade obtidos, especialmente em concentrações abaixo de 20 μmol.L⁻¹, bem como as dimensões da sequência, que estão diretamente relacionadas ao custo e dificuldades de síntese, permitiu a seleção de 3 sequências peptídicas para prosseguir com a avaliação da viabilidade, utilizando culturas de queratinócitos, sendo eles as sequências NMC a 10 μmol L⁻¹, NMD a 20 μmol L⁻¹ e NME a 5 μmol L⁻¹.

4.3.1.2. Avaliação da viabilidade celular em queratinócitos

Tão importante quanto a presença de fibroblastos no processo de cicatrização, os queratinócitos desempenham papel crucial na remodelação dos tecidos. Desta forma, a eventual toxicidade dos peptídeos selecionados foi avaliada frente HaCaT, uma linhagem de células de queratinócitos de pele humana adulta, aplicando a mesma metodologia utilizada para os fibroblastos, pelos períodos de incubação de 24, 48 e 72 h e os resultados representados nas Figuras 11, 12 e 13, respectivamente, como valores médios de ensaios realizados em triplicata.

Figura 11. Ensaio de viabilidade celular para as células HaCaT, na presença dos peptídeos NMC, NMD e NME, expressa em %, com tempo de incubação das amostras de 24 horas

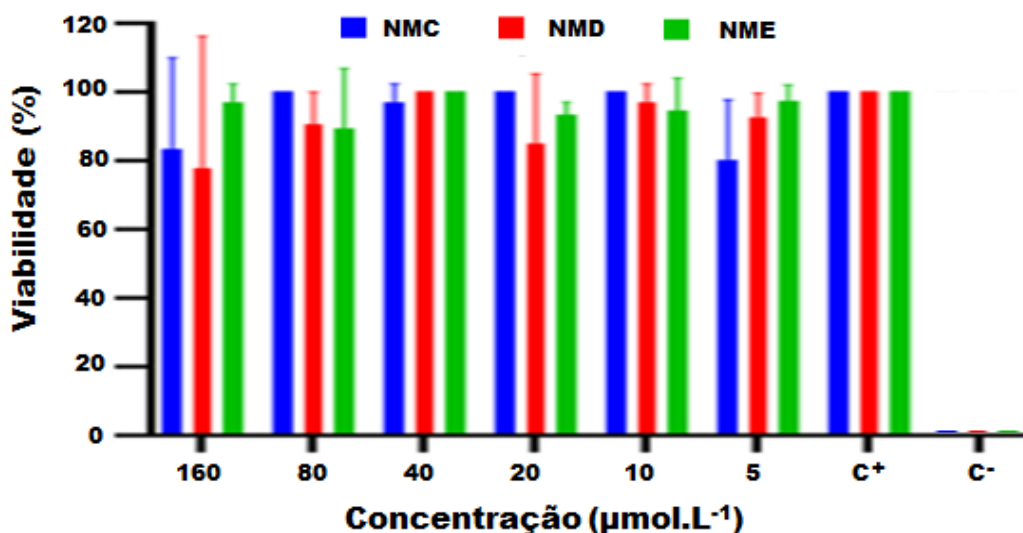


Elaborado pela autora, 2023.

Os resultados obtidos para o período de 24 h foram submetidos ao tratamento estatístico em que não foi atendido os pressupostos da normalidade, sendo então analisados por teste não paramétrico de Friedman com pós teste de Dunn's para múltiplas comparações que não apontou diferença estatística entre os peptídeos e o controle positivo.

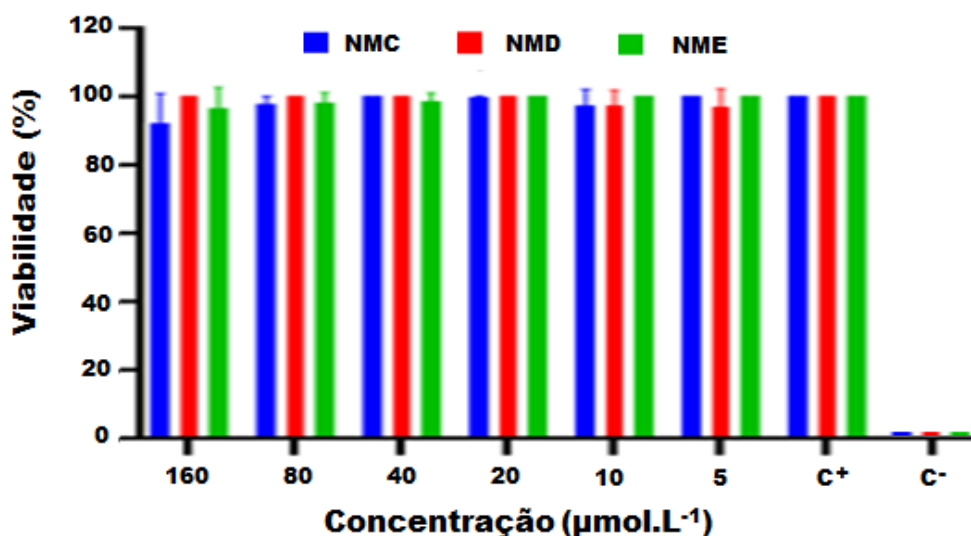
De modo semelhante, para os períodos de 48 h e 72 h, os dados apresentam o mesmo perfil observado para o período de 24 h, que não atendem aos pressupostos da normalidade, sendo então analisados por teste não paramétrico de Friedman com pós teste de Dunn's para múltiplas comparações que não apontou diferenças estatísticas entre os peptídeos e o controle positivo em ambos os períodos (Figuras 12 e 13).

Figura 12. Ensaio de viabilidade celular para as células HaCaT, na presença dos peptídeos NMC, NMD e NME, expressa em %, com tempo de incubação das amostras de 48 horas



Elaborado pela autora, 2023.

Figura 13. Ensaio de viabilidade celular para as células HaCaT, na presença dos peptídeos NMC, NMD e NME, expressa em %, com tempo de incubação das amostras de 72 horas



Elaborado pela autora, 2023.

A avaliação da viabilidade celular realizada em queratinócitos de linhagem celular HaCaT e posterior tratamento estatístico dos dados apontam para a ausência de indícios de toxicidade dos peptídeos em relação ao controle positivo, segundo o que preconiza a normativa descrita pela ISO 10993-5:2009. Portanto, pode-se afirmar que os peptídeos também não apresentam indícios de toxicidade para esta linhagem celular em nenhum dos períodos observados.

4.3.1.3. Avaliação da biossíntese de colágeno

O favorecimento à biossíntese de colágeno tipo I foi realizado inicialmente utilizando apenas os peptídeos livres em solução, afim de comparar o desempenho deste tipo de ensaio com o realizado posteriormente para os filmes modificados pela adição do peptídeo. Os resultados deste ensaio estão representados nas Tabelas 6, 7 e 8 para os períodos de 24, 48 e 72 h, respectivamente.

Tabela 6. Quantidade de colágeno tipo I produzido após 24 h de tratamento com os diferentes peptídeos. C+: Células em meio de cultivo na ausência de peptídeo.

Peptídeo ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Colágeno produzido ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)					
	NMA	NMB	NMC	NMD	NME	NMF
160	28,07	27,77	29,02	30,45	32,30	32,83
80	26,40	27,18	26,23	27,77	28,90	30,87
40	26,23	25,87	25,75	27,18	28,79	30,93
20	27,00	27,36	26,46	26,76	28,13	31,29
10	25,99	26,82	26,40	25,57	27,65	30,51
5	26,40	26,17	25,93	26,05	28,19	28,85
C+	36,68					

Elaborado pela autora, 2023.

Tabela 7. Quantidade de colágeno tipo I produzido após 48 h de tratamento com os diferentes peptídeos. C+: Células em meio de cultivo na ausência de peptídeo

Peptídeo ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Colágeno produzido ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)					
	NMA	NMB	NMC	NMD	NME	NMF
160	47,60	46,70	43,85	40,57	45,04	41,88
80	46,40	44,56	41,82	44,44	44,26	44,74
40	42,60	43,55	42,24	41,58	42,54	42,42
20	44,20	44,02	43,01	40,81	41,46	42,18
10	43,31	44,32	42,83	41,35	45,51	42,89
5	43,67	42,48	43,49	38,96	41,46	46,52
C+	55,96					

Elaborado pela autora, 2023.

Tabela 8. Quantidade de colágeno tipo I produzido após 72 h de tratamento com os diferentes peptídeos. C+: Células em meio de cultivo na ausência de tratamentos.

Peptídeo ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Colágeno produzido ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)					
	NMA	NMB	NMC	NMD	NME	NMF
160	70,45	61,35	65,45	56,35	57,06	67,60
80	60,10	49,74	54,80	46,70	48,31	52,60
40	59,08	52,00	55,39	47,95	42,48	50,57
20	56,40	53,01	56,29	47,36	48,31	51,35
10	56,94	48,67	51,52	44,14	46,29	51,35
5	60,93	51,46	46,58	42,36	48,01	54,20
C+	72,48					

Elaborado pela autora, 2023.

Como pode ser observado, a presença dos diferentes peptídeos, não resultou em aumento na quantidade de colágeno obtida, independentemente da concentração de peptídeo utilizada e do tempo de incubação adotado. Na realidade, as quantidades obtidas sempre foram inferiores às aquelas obtidas na ausência de peptídeo (C+). Ademais, as maiores quantidades obtidas, sempre foram obtidas com a máxima concentração de peptídeo utilizada ($160 \mu\text{mol.L}^{-1}$), com uma média de 18,0% abaixo do observado para as células do grupo controle.

Aparentemente, a sequência KTTKS, um subfragmento de colágeno tipo I, que possui efeito estimulante na produção de colágeno e presente nas sequências peptídicas sintéticas, não foi capaz de estimular uma maior produção de colágeno tipo I, pelo menos no tipo celular utilizado nos ensaios. Tem sido relatado que esta mesma sequência também estimula a produção de colágeno tipo III (ABU SAMAH e HEARD, 2011), o que nos leva a vislumbrar a execução futura de estudos, de mesma natureza, para quantificar a biosíntese deste tipo de colágeno pelos peptídeos sintetizados.

Foi realizado tratamento estatístico, sendo considerada a quantificação de colágeno produzido por cada peptídeo, em porcentagem, em função das concentrações dos peptídeos, separados em três conjuntos de dados (24, 48 e 72 horas). Nenhum dos grupos ou conjuntos de dados apresentou outliers. As análises foram realizadas por 2-way ANOVA com pós-teste de Tuckey. Os dados obtidos podem ser observados nas Tabelas 9, 10 e 11, respectivamente para 24, 48 h e 72 h.

Tabela 9. Conjunto de dados tratados estatisticamente, em porcentagem de colágeno tipo I produzido após 24 h de tratamento com os diferentes peptídeos.

Peptídeo ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	NMA	NMB	NMC	NMD	NME	NMF	Média
160	74 $\pm$ 4	73 $\pm$ 3	77 $\pm$ 1	81 $\pm$ 6	87 $\pm$ 6	88 $\pm$ 2	80 $\pm$ 6 ^A
80	69 $\pm$ 3	72 $\pm$ 3	69 $\pm$ 5	73 $\pm$ 2	77 $\pm$ 3	83 $\pm$ 4	74 $\pm$ 5 ^B
40	69 $\pm$ 2	68 $\pm$ 6	67 $\pm$ 3	72 $\pm$ 2	76 $\pm$ 4	83 $\pm$ 2	72 $\pm$ 6 ^B
20	71 $\pm$ 4	72 $\pm$ 7	69 $\pm$ 5	71 $\pm$ 0	74 $\pm$ 4	84 $\pm$ 3	73 $\pm$ 5 ^B
10	68 $\pm$ 3	71 $\pm$ 4	69 $\pm$ 5	67 $\pm$ 2	73 $\pm$ 2	82 $\pm$ 2	72 $\pm$ 5 ^B
5	70 $\pm$ 2	69 $\pm$ 5	68 $\pm$ 3	68 $\pm$ 6	75 $\pm$ 2	77 $\pm$ 6	71 $\pm$ 4 ^B
Média	70 $\pm$ 2 ^c	71 $\pm$ 2 ^c	70 $\pm$ 4 ^c	72 $\pm$ 5 ^c	77 $\pm$ 5 ^b	83 $\pm$ 4 ^a	-

Letras maiúsculas indicam as diferenças observadas para as concentrações (entre as linhas); letras minúsculas indicam diferenças entre os peptídeos (entre as colunas). Letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as médias.

Elaborado pela autora, 2023.

Neste período foi possível observar que efeitos individuais dos peptídeos e da concentração foram significativos ($p < 0.0001$), embora o efeito da interação peptídeo/concentração não foi estatisticamente significativo ($p = 0,721$). A análise individual de cada variável, peptídeo e concentração indicou que, para a variável peptídeo, o pós-teste de Tukey mostrou que não há diferença estatisticamente significativa na produção de colágeno entre os peptídeos NMA, NMB, NMC e NMD. Há diferença significativa na produção de colágeno pelos peptídeos NME e NMF quando comparado com os demais peptídeos.

Para a variável “concentração”, o pós-teste de Tukey mostrou que não há diferença estatisticamente significativa na produção de colágeno nas concentrações de 80, 20, 40, 10 e 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e, portanto, a utilização de menores concentrações dos peptídeos pode ser mais adequada considerando o custo-benefício final do tratamento proposto. Além disso, há diferença significativa na produção de colágeno na concentração de 160 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ quando comparado com todas as outras concentrações,

embora uma concentração elevada seja menos interessante para a utilização como tratamento.

Estatisticamente, independentemente da concentração, o peptídeo NMF foi o que induziu a maior produção de colágeno tipo I, seguido pelo peptídeo NME. E independentemente do peptídeo, a concentração de 160 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ foi a que induziu a maior produção de colágeno.

Tabela 10. Conjunto de dados tratados estatisticamente, em percentagem de colágeno tipo I, produzido após 48h de tratamento com os diferentes peptídeos.

Peptídeo ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	NMA	NMB	NMC	NMD	NME	NMF	Média
160	84 $\pm$ 8	83 $\pm$ 6	77 $\pm$ 6	71 $\pm$ 4	79 $\pm$ 2	74 $\pm$ 12	78 $\pm$ 5 ^A
80	82 $\pm$ 14	79 $\pm$ 7	74 $\pm$ 9	78 $\pm$ 8	78 $\pm$ 13	79 $\pm$ 9	78 $\pm$ 3 ^A
40	75 $\pm$ 12	77 $\pm$ 14	74 $\pm$ 15	73 $\pm$ 3	75 $\pm$ 3	75 $\pm$ 8	75 $\pm$ 1 ^A
20	78 $\pm$ 15	78 $\pm$ 11	76 $\pm$ 11	71 $\pm$ 3	73 $\pm$ 9	74 $\pm$ 5	75 $\pm$ 3 ^A
10	76 $\pm$ 13	78 $\pm$ 15	75 $\pm$ 5	73 $\pm$ 9	80 $\pm$ 4	76 $\pm$ 8	76 $\pm$ 3 ^A
5	77 $\pm$ 10	75 $\pm$ 11	76 $\pm$ 2	68 $\pm$ 12	73 $\pm$ 6	82 $\pm$ 15	75 $\pm$ 5 ^A
Média	79 $\pm$ 4 ^a	78 $\pm$ 3 ^a	75 $\pm$ 1 ^a	72 $\pm$ 3 ^a	76 $\pm$ 3 ^a	77 $\pm$ 3 ^a	-

Letras maiúsculas indicam as diferenças observadas para as concentrações (entre as linhas), letras minúsculas indicam diferenças entre os peptídeos (entre as colunas). Letras iguais indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre as médias.

Elaborado pela autora, 2023.

A análise realizada para o período de 48 horas indicou que os efeitos individuais das variáveis (peptídeo e concentração) e a interação entre elas não foi significativa ($p > 0,05$) e, portanto, não foi realizado o pós-teste de Tukey para este conjunto de dados.

Desta forma, pode-se concluir que, em 48 h, todos os peptídeos têm o mesmo efeito sobre a produção de colágeno, independente da concentração utilizada e, portanto, para estas condições, pode-se considerar a utilização das menores

concentrações para a composição filme-peptídeo.

Tabela 11. Conjunto de dados tratados estatisticamente, em porcentagem de colágeno tipo I, produzido após 72 h de tratamento com os diferentes peptídeos.

Peptídeo ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	NMA	NMB	NMC	NMD	NME	NMF	Média
160	98 $\pm$ 18	85 $\pm$ 15	91 $\pm$ 17	77 $\pm$ 1	78 $\pm$ 9	93 $\pm$ 5	87 $\pm$ 8 ^A
80	83 $\pm$ 13	68 $\pm$ 10	75 $\pm$ 7	63 $\pm$ 8	66 $\pm$ 8	72 $\pm$ 10	71 $\pm$ 7 ^B
40	81 $\pm$ 10	71 $\pm$ 10	76 $\pm$ 16	65 $\pm$ 9	57 $\pm$ 7	69 $\pm$ 9	70 $\pm$ 8 ^B
20	77 $\pm$ 12	72 $\pm$ 3	77 $\pm$ 5	64 $\pm$ 9	65 $\pm$ 4	70 $\pm$ 11	71 $\pm$ 6 ^B
10	78 $\pm$ 15	66 $\pm$ 13	70 $\pm$ 13	59 $\pm$ 6	63 $\pm$ 8	70 $\pm$ 14	68 $\pm$ 7 ^B
5	84 $\pm$ 18	70 $\pm$ 10	63 $\pm$ 10	57 $\pm$ 4	65 $\pm$ 7	74 $\pm$ 13	69 $\pm$ 9 ^B
Média	84 $\pm$ 7 ^a	72 $\pm$ 7 ^{b, c}	75 $\pm$ 9 ^{a, b}	64 $\pm$ 7 ^c	66 $\pm$ 7 ^{b, c}	75 $\pm$ 9 ^{a, b, c}	-

Letras maiúsculas indicam as diferenças observadas para as concentrações (entre as linhas), letras minúsculas indicam diferenças entre os peptídeos (entre as colunas). Letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as médias.

Elaborado pela autora, 2023.

A análise dos dados para o período de 72 h indicou que os efeitos individuais da variável “peptídeo” e da variável “concentração” foram significativos ($p < 0.0001$) e o efeito da interação peptídeo/concentração não foi estatisticamente significativo ($p = 0,99$), e dessa forma, a análise da influência de cada variável teve que ser realizada individualmente.

Assim como observado para o período de 24 h, para a variável “peptídeo”, o pós-teste de Tukey mostrou que não há diferença estatisticamente significativa na produção de colágeno entre os peptídeos NMA, NMC e NMF, assim como não há diferença significativa na produção de colágeno entre os peptídeos NMB, NMC, NME e NMF. Não há ainda, diferença significativa na produção de colágeno entre os peptídeos NMD, NMB, NME e NMF.

De modo semelhante, para a variável “concentração”, o pós-teste de Tukey

mostrou que não há diferença estatisticamente significativa na produção de colágeno nas concentrações de 80, 20, 40, 10 e 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Há diferença significativa na produção de colágeno apenas na concentração de 160 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ quando comparado com todas as outras concentrações.

Desta forma, pode-se concluir que independentemente da concentração, os peptídeos NMA, NMC e NMF foram os que induziram a maior produção de colágeno I após o período de 72 h. E independentemente do peptídeo, a concentração de 160 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ foi a que induziu a maior produção de colágeno.

Diante de tais evidências conclui-se que os peptídeos sintéticos livres, contendo a sequência KTTKS, não proporcionam grande contribuição para o aumento da biossíntese de colágeno tipo I dos fibroblastos a baixas concentrações, e que não devem atuar efetivamente no processo de regeneração tecidual, pelo menos no que tange a este tipo de colágeno.

4.3.2. Filmes e Filmes combinados com peptídeos

4.3.2.1. Avaliação da viabilidade celular em fibroblastos

Os filmes desenvolvidos também foram testados frente às células da linhagem MRC-5, correspondente a fibroblastos de tecido humano. Após o preparo das placas com as células, discos dos diferentes filmes foram depositados sobre a superfície de cada poço. A título de comparação sobre o desempenho dos filmes, foram utilizados discos obtidos a partir de embalagens de soro fisiológico (identificados por FIG), como descrito em Materiais e Métodos. Ao final de cada período de incubação (24, 48 e 72 h), os discos foram retirados (com exceção dos filmes C, D e E que foram desfeitos quando em contato com o meio de cultura e se depositaram ao fundo da placa). Os resultados obtidos inicialmente foram expressos em percentual de viabilidade (considerando C+ como 100%) e estão demonstrados na Figura 14.

Neste estudo inicial, os filmes C e D foram desconsiderados, pois ao final de cada intervalo de tempo analisado, ambos ficaram totalmente aderidos ao fundo do poço da placa correspondente, permanecendo sem brilho e com coloração esbranquiçada, resultando em valores de absorbância elevados e que não correspondem à viabilidade celular almejada (Figura 15).

Figura 14. Ensaio de viabilidade celular para as células MRC-5, na presença dos filmes A, B, V3005 e VetOH, expressa em %, com tempo de incubação das amostras de 24, 48 e 72 horas.

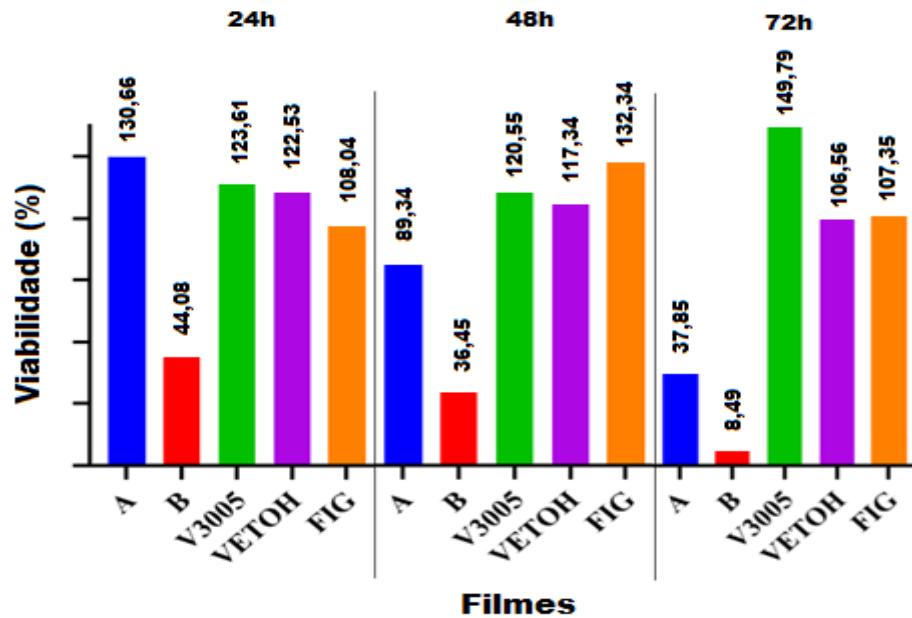


FIG = discos obtidos a partir de embalagem de soro fisiológico para fins comparativos

Elaborado pela autora, 2023.

Figura 15. Imagem comparativa de placa, após tratamento com MTT, na ausência de filme (A), na presença do filme C (B) e na presença do filme D (C).



Elaborado pela autora, 2023.

Para o filme de formulação E, o resultado observado foi semelhante aos filmes C e D, embora neste caso, o filme tornava-se corado, como esperado para células viáveis. Entretanto, para descartar eventuais resultados falso-positivos, foi realizado um novo ensaio, onde todas as condições do experimento inicial foram mantidas, porém sem a adição de células. Mesmo na ausência de células, os filmes continuaram

apresentando coloração de viabilidade celular, confirmando o falso-positivo, como pode ser observado na Figura 16A. Deste modo, assim como para os filmes C e D, os valores obtidos para o filme E não foram considerados nos estudos de viabilidade.

Figura 16. Imagem comparativa de placa após tratamento com MTT contendo o filme E sem células (A) e poços vazios que receberam o mesmo tratamento (B).



Elaborado pela autora, 2023.

Os valores expressos em porcentagem de viabilidade constantes na Figura 14, indicam que os filmes V3005 e VetOH não apresentaram citotoxicidade, 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 o material seja considerado não citotóxico. Estes dois filmes apresentaram valores superiores ao mínimo esperado para o ensaio, além de apresentarem valores acima do obtido para o controle positivo, em todos os períodos, o que pode indicar o favorecimento da proliferação celular ao longo do tempo. O filme B foi o mais citotóxico, com uma viabilidade celular sempre abaixo dos 50% e chegando a 8,49% após 72 h, portanto não atendendo ao mínimo necessário em nenhum dos períodos analisados. Por outro lado, o filme A mostrou um declínio na viabilidade com o tempo, tornando-se tóxico após 72 h, o que evidencia prejuízo à proliferação e sobrevivência celular ao longo do tempo. Os recortes identificados por FIG, apresentaram desempenho superior ao grupo controle positivo como esperado, por se tratar de protocolo de referência.

Os dados referentes ao tratamento estatístico, em que há a normalização dos valores obtidos para o experimento, pode ser observado na Figura 17.

Figura 17. Resultados do tratamento estatístico para o ensaio de viabilidade celular para as células MRC-5, na presença dos filmes A, B, V3005 e VetOH, expressa em %, com tempo de incubação das amostras de 24, 48 e 72 horas.

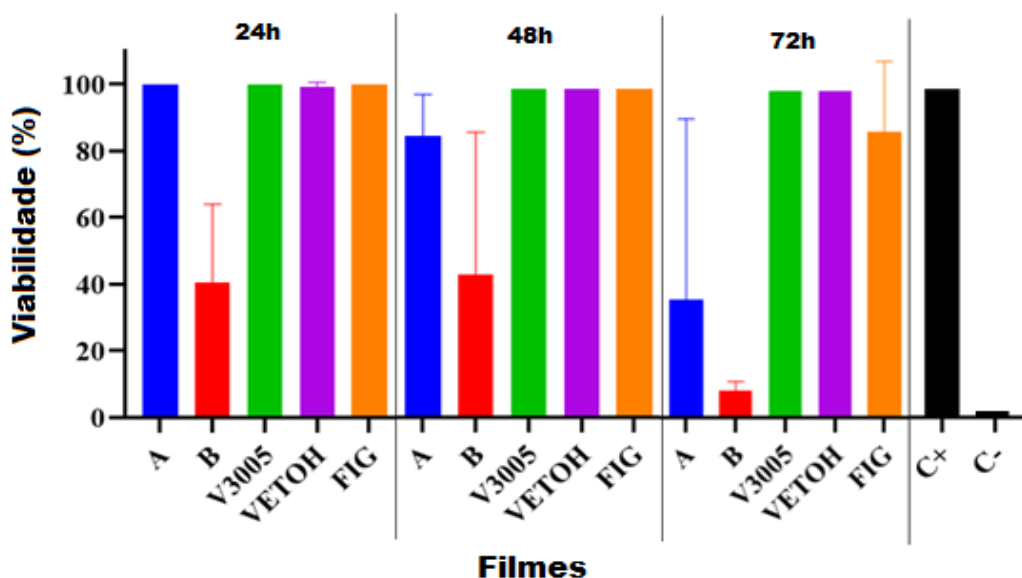


FIG = discos obtidos a partir de embalagens de soro fisiológico para fins comparativos

Elaborado pela autora, 2023.

A análise estatística dos dados revelou a não conformidade com os requisitos de normalidade, levando à aplicação do teste não paramétrico de Friedman, seguido pelo pós-teste de Dunn's para comparações múltiplas. Os dados, expressos como média com desvio padrão (SD), demonstram a inexistência de diferença estatística entre os peptídeos e o controle positivo. Assim, é possível concluir que os filmes analisados não demonstraram sinais de toxicidade para a linhagem celular durante este período 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 o material seja considerado não citotóxico.

Considerando os resultados de viabilidade celular, aliada às propriedades elásticas, de flexibilidade e de resistência do filme V3005, fez com que este fosse o selecionado para prosseguir com os estudos envolvendo associação com peptídeos, para aplicação como camada de proteção e via de administração de peptídeos para o tecido cutâneo.

4.3.2.2. Avaliação da viabilidade celular em queratinócitos

Selecionado o melhor filme, V3005 e os melhores peptídeos NMC, NMD e NME, foram então preparados filmes modificados, pela adição de solução de

peptídeo, nas respectivas concentrações de interesse (Etapa 4 – Figura 1), os quais foram denominados F-NMC, F-NMD e F-NME. Estes foram então, utilizados na análise da potencial atividade citotóxica sobre a linhagem de queratinócitos HaCaT, uma vez que a sinalização celular realizada por esse tipo celular, *in vivo*, é fator importante durante o processo de cicatrização de um ferimento e danos a esse tipo celular podem influenciar negativamente durante a resolução do problema.

Os ensaios de viabilidade celular utilizando queratinócitos da linhagem HaCaT foram realizados de modo semelhante ao descrito anteriormente para os fibroblastos. Após o preparo, tratamento e incubação por 24 h, 48 h e 72 h, as placas foram submetidas a tratamento colorimétrico com MTT a $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ por 4 horas em atmosfera controlada. Então, foi realizada a leitura das absorbâncias e os resultados obtidos para os três períodos podem ser observados na Tabela 12.

Tabela 12. Valores de absorbância médios para o ensaio de viabilidade celular em linhagem celular HaCaT com filmes modificados ou não pela adição de peptídeos. C+: Células em meio de cultivo na ausência de tratamentos; C-: Meio de cultivo adicionado de filmes, sem células.

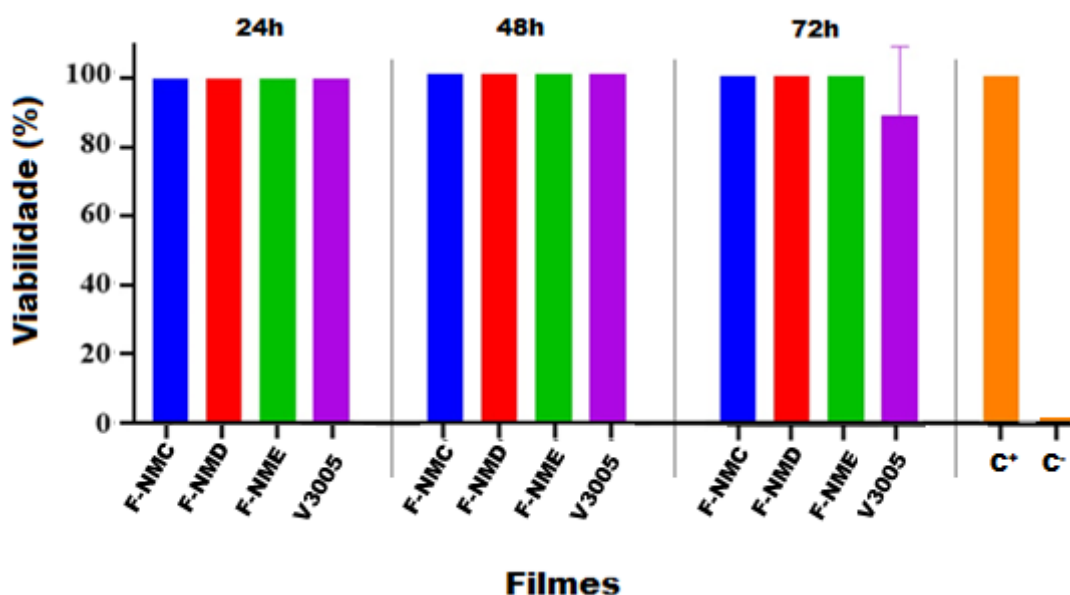
Período	Identificação amostra	Absorbância Média	Viabilidade Celular (%)
24h	F-NMC	0,086	1316,7
	F-NMD	0,080	1124,1
	F-NME	0,084	1246,3
	V3005	0,083	1209,3
	C+	0,050	100,0
	C-	0,047	0,0
48h	F-NMC	0,084	262,0
	F-NMD	0,103	380,2
	F-NME	0,100	360,4
	V3005	0,093	315,7
	C+	0,059	100,0
	C-	0,044	0,0
72h	F-NMC	0,114	253,9
	F-NMD	0,106	225,3
	F-NME	0,122	282,6
	V3005	0,082	138,4
	C+	0,072	100,0
	C-	0,044	0,0

Os valores de viabilidade celular calculados em porcentagem, segundo a equação 1, estão acima do observado para o controle positivo e podem indicar o favorecimento à proliferação celular de todos os filmes utilizados em todos os períodos de observação.

Observa-se ainda, um declínio nos valores obtidos em relação ao tempo de tratamento, com os valores de viabilidade celular máximos para o período inicial, de 24 h, que diminui consideravelmente em relação ao observado para 48 h e 72 h, em que o mínimo – ainda acima do controle positivo – é observado. Tal observação pode indicar a perda da linearidade no crescimento celular ao longo do tempo, em relação ao controle positivo, como observado anteriormente para os peptídeos onde o excesso da proliferação celular pode provocar a inibição do crescimento e da atividade metabólica devido ao contato célula-célula (RISS et al., 2016; ASLANTÜRK, 2018).

Os dados de viabilidade celular então foram normalizados e submetidos a análise estatística, em que não foram atendidos os pressupostos da normalidade e, sendo assim, os dados foram analisados por teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn's para múltiplas comparações. Os dados representam a média com desvio padrão (SD) e podem ser observados na Figura 18, para todos os períodos e em nenhum houve diferença estatística em relação ao controle positivo.

Figura 18. Análise da viabilidade celular de filmes modificados pela adição de peptídeos em linhagem de queratinócitos, para os períodos de 24, 48 e 72 horas.



Elaborado pela autora, 2023.

De posse dessas informações, é possível inferir que a presença do filme V3005 e suas versões modificadas contendo peptídeos não apresentaram indícios de toxicidade para a linhagem celular testada, além de indicar o possível favorecimento à proliferação celular – o que deve ser confirmado com estudos adicionais no futuro.

4.3.2.3. Avaliação da biossíntese de colágeno

A biossíntese de colágeno tipo I por células de fibroblastos também foi avaliada na presença de filmes modificados ou não pela presença de peptídeos. Deste modo, os valores médios obtidos em $\mu\text{g.mL}^{-1}$, comparados aos controles positivos e negativos estão representados na Tabela 13 para os períodos de 24, 48 e 72 h, respectivamente.

Tabela 13. Quantidade de colágeno tipo I, em $\mu\text{g.mL}^{-1}$, produzido após 24 h, 48 h e 72 h de incubação com os diferentes filmes modificados, após o tratamento estatístico. C+: Células em meio de cultivo.

Filme	Período		
	24h	48h	72h
F-NMC	21,0±2,0 ^A	16,0±4,0 ^A	20,0±2,0 ^A
F-NMD	15,1±0,9 ^A	15,2±0,1 ^A	19,7±0,7 ^A
F-NME	17,0±3,0 ^A	16,6±0,8 ^A	19,0±1,0 ^{A, B}
V3005	21,0±7,0 ^A	17,0±3,0 ^A	20,0±2,0 ^A
C+	12,5±0,3 ^A	12,7±0,2 ^A	15,6±0,3 ^B

Letras maiúsculas indicam as diferenças observadas para as concentrações (entre as linhas), letras minúsculas indicam diferenças entre os peptídeos (entre as colunas). Letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as médias.

Elaborado pela autora, 2023.

Os valores médios obtidos para a biossíntese de colágeno tipo I após o tratamento com os filmes modificados e sem a modificação apontam para o favorecimento da expressão dessa proteína quando comparado com os valores médios dos controles positivos.

Para confirmar essa observação, os dados de produção de colágeno em função do tratamento com os filmes foram separados em três conjuntos de dados (24, 48 e 72 horas), que não apresentaram outliers. As análises foram realizadas por 1-way

ANOVA com pós-teste de Tuckey, dada a normalidade do conjunto e a diferença significativa entre os grupos tratados e o controle positivo.

Não foram observadas influências significativas na expressão de colágeno pelos tratamentos a que foram submetidas as células quando comparados os períodos de 24 h e 48 h, períodos nos quais, estatisticamente a biossíntese de colágeno ocorreu de forma semelhante para os grupos tratados e os grupos controle positivo. Para o período de 72 h, não houve diferença significativa entre as amostras, porém as amostras F-NMC, F-NMD e V3005 apresentaram uma maior produção de colágeno do que aquela observada para o grupo controle.

Desta forma, diferente do observado para os peptídeos isoladamente, a utilização dos biomateriais descritos como F-NMC, F-NMD e V3005 contribuíram de forma significativa para o aumento da biossíntese de colágeno tipo I nos fibroblastos, principalmente após 72 h do tratamento.

Esta observação é de elevada importância, considerando-se que na fase de remodelação do ferimento, descrita como a mais duradoura e a que implica na aparência final do tecido cicatrizado, é de extrema importância que haja maior síntese desses compostos do que sua lise, uma vez que nela, o tecido de granulação involui e há a substituição do colágeno tipo III por colágeno tipo I, em substituição da MEC provisória para o aumento da resistência à tração no ferimento de modo que não haja excesso de fibrose, que levaria a uma cicatriz hipertrófica ou ainda a formação de quelóides (GANTWERKER, HOM; 2011).

4.4. Avaliação da atividade antimicrobiana

Na avaliação da atividade antimicrobiana dos peptídeos livres e dos filmes contendo ou não peptídeos, foi utilizado o método de microdiluição em placa com modificações, utilizando cepas padrão de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de duas cepas de leveduras patogênicas, como descrito em Materiais e Métodos.

4.4.1. Peptídeos livres

4.4.1.1. Avaliação da concentração inibitória mínima para bactérias (CBM)

Os resultados obtidos para a avaliação da potencial atividade inibitória dos

peptídeos livres, em solução, frente a *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, estão representados nas Tabelas 14 e 15, respectivamente.

Tabela 14. Determinação de Concentração Inibitória Mínima dos diferentes peptídeos em solução, sobre a *Escherichia coli*. C+: Microrganismos em meio de cultivo. C-: Meio de cultivo.

Peptídeo ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	CBM (%)					
	NMA	NMB	NMC	NMD	NME	NMF
160	56,24	55,58	57,29	59,65	58,48	58,15
80	53,86	54,64	55,89	56,18	57,43	56,54
40	41,36	41,00	43,04	54,97	55,62	56,83
20	41,85	54,22	53,87	54,72	54,65	55,51
10	49,98	51,94	52,61	53,52	53,67	55,08
5	48,75	50,03	48,16	50,23	49,97	55,87
Desvio Padrão	$\pm 5,09$	$\pm 6,93$	$\pm 4,99$	$\pm 3,91$	$\pm 3,82$	$\pm 4,12$
C+	100					
C-	0					

Elaborado pela autora, 2023.

Tabela 15. Determinação de Concentração Inibitória Mínima dos diferentes peptídeos em solução, sobre a *Staphylococcus aureus*. C+: Microrganismos em meio de cultivo. C-: Meio de cultivo.

Peptídeo ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	CBM (%)					
	NMA	NMB	NMC	NMD	NME	NMF
160	27,25	60,82	58,80	49,21	52,98	40,62
80	32,03	58,38	61,19	58,42	54,00	33,17
40	23,96	53,23	55,07	58,42	50,80	35,73
20	23,17	57,32	57,44	53,47	57,18	34,05
10	29,13	50,63	51,43	50,37	57,62	28,11
5	36,65	41,68	47,69	52,86	61,42	36,29
Desvio Padrão	$\pm 6,10$	$\pm 5,41$	$\pm 5,33$	$\pm 3,10$	$\pm 3,02$	$\pm 1,10$
C+	100					
C-	0					

Elaborado pela autora, 2023.

O conjunto de resultados descritos nas Tabelas 14 e 15, sugerem uma inibição parcial do crescimento bacteriano. Para *E. coli*, os peptídeos apresentam em comum, atividade inibitória superior a 50%, inclusive nas menores concentrações utilizadas.

Para *S. aureus*, com exceção de NMA e NMF, que apresentaram inibição da ordem de 30%, a inibição foi levemente superior. Destaque para NMB e NMC, que apresentaram inibição próximas a 60%, em concentrações superiores a 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Estes resultados podem indicar que os peptídeos sejam capazes de perturbar ou danificar a estrutura protetora do microrganismo e desta forma, possa auxiliar no controle da atividade bacteriana. Não há referências na literatura que apontem para o potencial antimicrobiano dos peptídeos sintetizados descritos neste trabalho. Deste modo, os valores referentes às porcentagens de inibição da atividade microbiológica, especialmente para as bactérias Gram-positivas, devem ser estudadas mais atentamente no futuro pois podem auxiliar no desenvolvimento de peptídeos com maior atividade antimicrobiana associada a capacidade de favorecimento proliferativo celular para a cicatrização de tecidos.

4.4.1.2. Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima do crescimento fúngico foi avaliada como descrito para os ensaios de CBM, segundo a equação 2. Os dados obtidos para as duas cepas de leveduras, ATCC 90028 e ATCC 10231 estão representados nas Tabelas 16 e 17, respectivamente.

Os resultados observados para o ensaio com a cepa padrão de *Candida albicans* (ATCC 90028) apresentam baixos valores de inibição do crescimento do microrganismo mesmo nas maiores concentrações utilizadas, com valores abaixo de 12%.

Para a segunda linhagem testada (ATCC 10231) - que apresenta resistência a terapia de referência pela utilização de azóis, como o Fluconazol, e é o microrganismo de maior virulência dada a sua capacidade de produzir biofilmes – os valores obtidos apontam para a ineficiência na inibição do crescimento do microrganismo para a maioria dos peptídeos testados, mesmo para o peptídeo NMA, que sob a maior concentração apresentou cerca de 6% de inibição. Com isso, pode-se concluir que os peptídeos sintéticos estudados, não apresentam atividade antifúngica.

Tabela 16. Determinação de Concentração Inibitória Mínima dos diferentes peptídeos em solução sobre a *Candida albicans* (ATCC 90028). C+: Microrganismos em meio de cultivo; C-: Meio de cultivo.

Peptídeo ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	CIM (%)					
	NMA	NMB	NMC	NMD	NME	NMF
160	11,34%	10,01%	6,83%	7,59%	11,43%	11,53%
80	3,75%	4,13%	3,70%	2,61%	5,41%	3,23%
40	1,61%	4,41%	3,32%	2,75%	3,94%	7,50%
20	1,00%	-1,09%	-1,38%	1,28%	1,38%	3,23%
10	-2,47%	-3,32%	2,56%	-6,83%	-2,85%	-12,33%
5	-0,19%	1,57%	5,55%	8,54%	2,56%	5,69%
Desvio Padrão	$\pm 4,79$	$\pm 4,70$	$\pm 2,83$	$\pm 5,49$	$\pm 4,74$	$\pm 8,19$
C+	100					
C-	0					

Elaborado pela autora, 2023.

Tabela 17. Determinação de Concentração Inibitória Mínima dos diferentes peptídeos em solução sobre a *Candida albicans* (ATCC 10231). C+: Microrganismos em meio de cultivo; C-: Meio de cultivo.

Peptídeo ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	CIM (%)					
	NMA	NMB	NMC	NMD	NME	NMF
160	6,83%	-8,97%	-8,02%	-9,72%	-8,25%	-10,01%
80	0,46%	-14,33%	-15,04%	-13,47%	-9,20%	-17,03%
40	4,87%	-21,73%	-13,80%	-15,99%	-15,84%	-35,15%
20	-12,07%	-16,75%	-14,85%	-17,03%	-10,53%	-13,52%
10	-3,00%	-12,86%	-18,36%	-18,26%	-17,27%	-10,67%
5	1,54%	-18,50%	-18,50%	-16,65%	-15,70%	-13,99%
Desvio Padrão	$\pm 6,74$	$\pm 4,48$	$\pm 3,83$	$\pm 3,11$	$\pm 3,91$	$\pm 9,37$
C+	100					
C-	0					

Elaborado pela autora, 2023.

Considerando-se a inexistência de atividade antifúngica para os peptídeos, estes ensaios foram desconsiderados para a sequência deste trabalho, tal como determinação de CIM para os filmes modificados ou não com peptídeos.

4.4.2. Filmes

4.4.2.1. Avaliação da concentração inibitória mínima para bactérias (CBM)

Os resultados de viabilidade (itens 4.3.1.1, 4.3.1.2 e 4.3.2.1) foram importantes na seleção do filme V3005 e dos peptídeos NMC, NMD e NME, para a preparação de um biomaterial com potencial para tornar o processo de cicatrização mais rápido e eficaz. Desta forma, os filmes preparados com os mesmos, foram também testados quando a potencial atividade inibitória frente a *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, e os resultados obtidos representados nas Tabelas 18 e 19, respectivamente.

Tabela 18. Avaliação Concentração Inibitória Mínima dos diferentes filmes sobre *Escherichia coli*.

Filme	CBM (%)
F-NMC	19,07 ± 1,02
F-NMD	15,21 ± 6,17
F-NME	40,84 ± 14,93
V3005	29,82 ± 21,42

Elaborado pela autora, 2023.

Os valores de CBM obtidos para os filmes sobre *E. Coli*, mostram uma redução na atividade inibitória, comparativamente aos peptídeos livres em solução (Tabela 14), nas respectivas concentrações 10, 20 e 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, para NMC, NMD e NME, respectivamente.

Estes resultados indicam que a imobilização do peptídeo no filme tem sua atividade minimizada, possivelmente devido a menor disponibilidade do peptídeo, que deve estar sendo liberado lentamente e resultando em concentrações inferiores, comparado quando os mesmos estão em solução. Desta forma, sugere-se a realização de novos estudos, incluindo aqueles de liberação prolongada, para avaliar a melhor concentração inicial de peptídeo a ser utilizada na preparação do filme para resultar em pelo menos, uma ação inibitória próxima àquela obtida pelo peptídeo em solução.

Por outro lado, os resultados observados para *S. aureus* sugerem efeito

inverso. Um aumento no controle bacteriano comparado ao peptídeo em solução, com valores de CBM superiores a 70% e um máximo filme F-NME (Tabela 19). Todos os filmes apresentaram desempenho superior ao observado para os peptídeos em solução (Tabela 15), em cerca de 30%.

Uma avaliação dos resultados levam a crer que a imobilização e a consequente liberação prolongada pode favorecer a atividade inibitória dos peptídeos, para este tipo de bactéria. Porém, há de se considerar que o próprio filme, sem peptídeo, também resultou em uma elevada CBM.

Neste caso, a hipótese seria que, para as bactérias Gram-positivas, a atividade antimicrobiana estaria relacionada ao impedimento ou redução da absorção de nutrientes pelas células bacterianas, provocadas pela interação e envolvimento das células pelo filme.

Tabela 19. Avaliação Concentração Inibitória Mínima dos diferentes filmes sobre *Staphylococcus aureus*.

Filme	CBM (%)
F-NMC	79,18 ± 6,95
F-NMD	84,88 ± 3,47
F-NME	90,25 ± 0,92
V3005	87,95 ± 4,96

Elaborado pela autora, 2023.

Tais achados são importantes pois, embora não existam referências na literatura que apontem para o potencial antimicrobiano dos peptídeos sintetizados descritos neste trabalho, o controle de atividade microbiana em um ferimento pode auxiliar a resolução deste, que é um dos fatores complicadores em feridas crônicas (TRØSTRUP et al., 2013), e tornar o processo de cicatrização mais veloz e eficiente.

4.5. Caracterização dos filmes

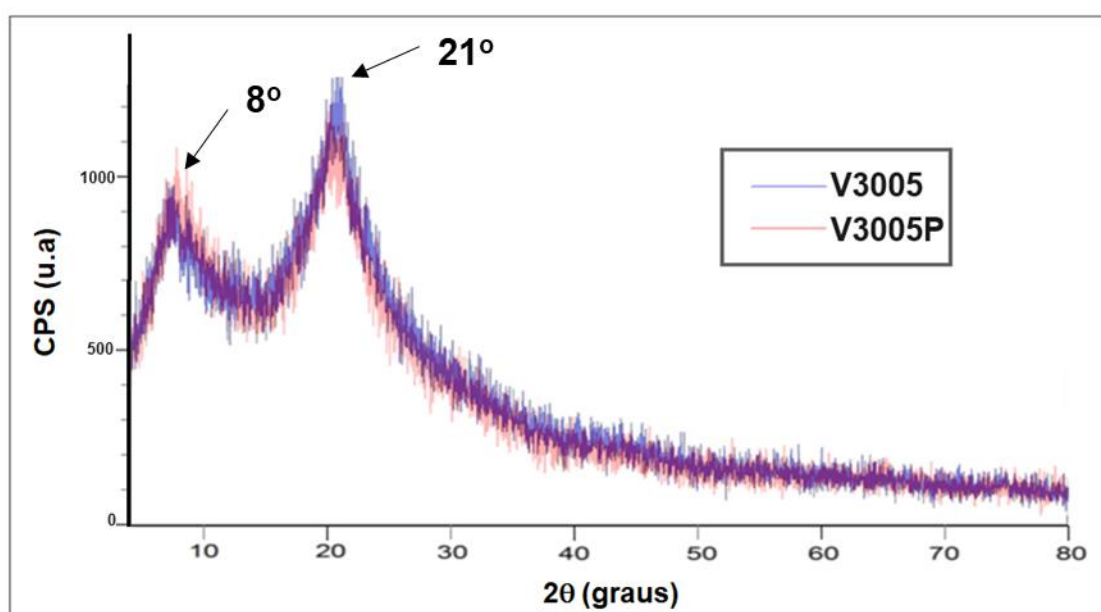
Amostras de filme sem adição de peptídeo e filmes modificados pela adição de peptídeos foram submetidas a realização dos ensaios de caracterização para que fosse possível observar a influência desta modificação sobre a estrutura polimérica utilizada. Ensaios de difratometria de raios-X (DRX), espectroscopia no infravermelho

com transformada de Fourier (FT-IR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram portanto realizados.

4.5.1. DRX

Amostras de filmes V3005 sem e com peptídeo NMB (V3005P) foram fixadas sobre suporte de vidro, e submetidas a análise por difração de raios-X, conforme exposto anteriormente. Os difratogramas obtidos estão representados na Figura 19.

Figura 19. Padrões de difração de DRX dos filmes V3005 (azul) e V3005P (vermelho) com os respectivos picos assinalados



Elaborado pela autora, 2023.

O filme V3005 apresentou amplos picos de difração em torno de 8° e 21° atribuíveis às fases 1α e 1β da celulose (planos 1001α , 1101β e 0101β a 15° e 1101α e 2001β a $22,5^\circ$) (BARUD et al. 2008) e indicam uma natureza polimérica semicristalina.

O pico principal localizado em aproximadamente 8° é citado como a principal característica da introdução de grupos substituintes mais volumosos na celulose, tal como metila e hidroxipropila, e está associado ao aumento da distância interplanar e à quebra das estruturas microfibrilares (BARUD et al., 2008).

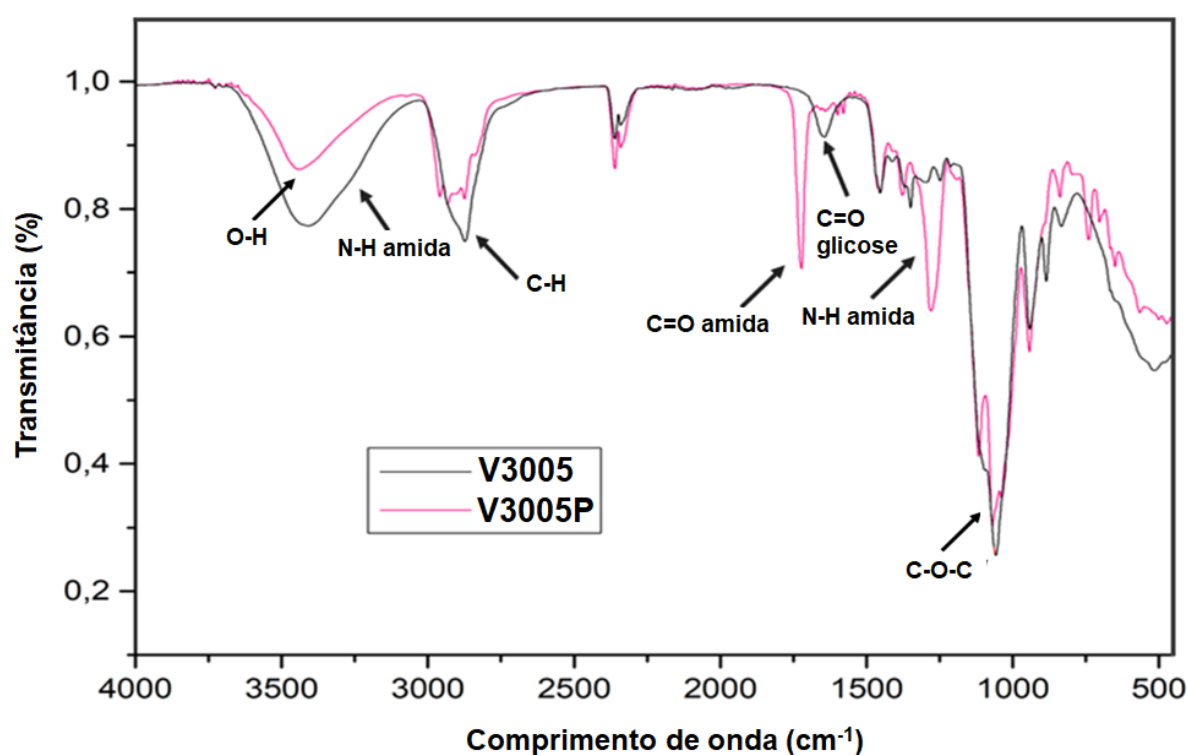
Nenhuma variação significativa foi observada no difratograma após a incorporação do peptídeo NMB (linha V3005P), o que permite inferir que a modificação do filme pela inserção do peptídeo, não implica em alterações na sua estrutura

cristalina, mantendo assim as características originais do filme.

4.5.2. FT-IR

As amostras do filme V3005 e V3005 com o peptídeo NMB (V3005P) foram recortadas e analisadas sem a necessidade de tratamento prévio, e os espectros obtidos, representados na Figura 20.

Figura 20. Espectro vibracional na região do infravermelho obtido para os filmes V3005 (cinza) e V3005P (magenta)



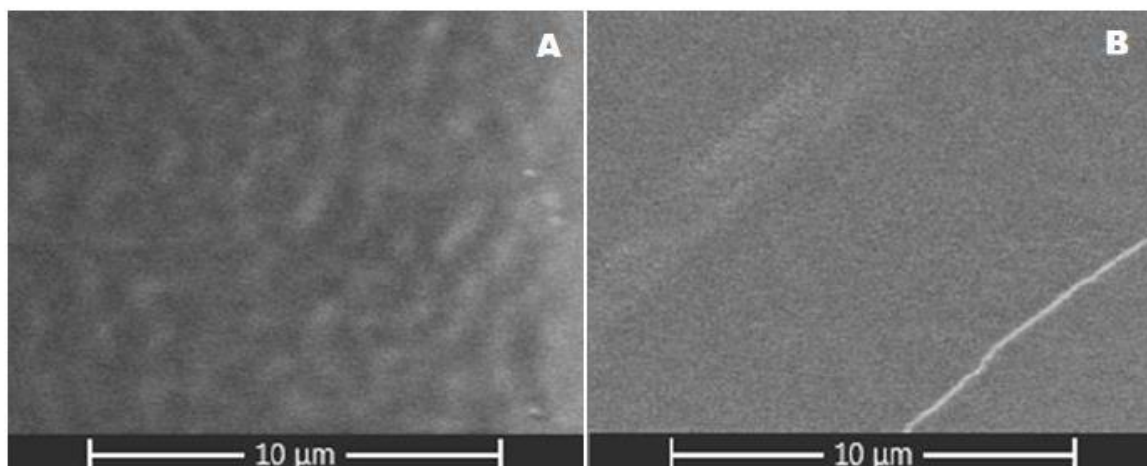
Elaborado pela autora, 2023.

As bandas observados para V3005, foram aquelas de frequências vibracionais características atribuídas a HPMC e PEG 200, tais como 3500 – 3200 cm⁻¹ (estiramento OH), 2910 cm⁻¹ (estiramento CH dos grupos CH₂ e CH₃), 1645 cm⁻¹ (C=O da glicose da celulose), 1425 cm⁻¹ (CH₂ flexão simétrica), 1370 cm⁻¹ (flexão CH), 1160 cm⁻¹ (ligação antisimétrica de alongamento C-O-C). A análise de V3005P mostrou bandas atribuídas a amida I (3300 cm⁻¹ a 3180 cm⁻¹), C=O amida (1700 cm⁻¹) e amida II (1300 cm⁻¹), o que confirma a incorporação do peptídeo NMB no filme (bandas indicados por setas).

4.5.3. MEV

As micrografias das amostras de filmes com e sem peptídeo (Figura 21) foram realizadas para uma análise morfológica de superfície e verificação de eventuais alterações da estrutura do material pela adição do peptídeo.

Figura 21. Micrografia de MEV do filme V3005 (A) e V3005 contendo o peptídeo NMB (B)



Elaborado pela autora, 2023.

As imagens MEV mostram que os filmes exibiram morfologia lisa e homogênea, sem sinais de separação de fases, o que indica a completa miscibilidade entre HPMC e PEG200. Além disso, o filme misturado com o peptídeo apresentou uma topografia mais suave e homogênea comparado ao filme V3005.

5. CONCLUSÕES

Embora careçam os registros, feridas complexas e crônicas constituem um importante desafio para os sistemas de saúde globalmente, impactando milhões de indivíduos e acarretando considerável impacto negativo na qualidade de vida dos pacientes. Além de representarem um transtorno para as pessoas afetadas, também exercem pressão nos recursos de saúde, requerendo tratamentos especializados, terapias prolongadas e abordagens multidisciplinares. Nesse sentido, o presente trabalho visou a obtenção de filmes incorporados a peptídeos, cujo favorecimento à proliferação celular e a não-toxicidade os tornam potenciais tratamentos para uso em casos de feridas crônicas.

A metodologia de síntese dos peptídeos em fase sólida mostrou-se eficiente para a obtenção dos seis diferentes peptídeos propostos, assim como o método de clivagem, extração e purificação que, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência, propiciou a obtenção de todos os peptídeos com pureza acima de 95% e, por meio de espectrometria de massas, foi caracterizada e confirmada. Além disso, análises *in vitro* permitiram observar a não-toxicidade dos compostos em solução, bem como sua potencial atividade proliferativa e de favorecimento à biossíntese de colágeno quando imobilizados no filme V3005.

A obtenção dos filmes levou ao desenvolvimento da melhor composição observada, V3005, que apresentou características como transparência, elasticidade e flexibilidade que eram almejadas no início deste trabalho. Outrossim, suas modificações pela adição dos peptídeos foram caracterizadas de forma satisfatória, garantindo a não-toxicidade dos compostos desenvolvidos quando avaliadas frente às linhagens celulares fibroblástica e queratinocítica, além de confirmar suas características essenciais de estrutura e composição pelos métodos de DRX, FT-IR e MEV.

As composições propostas, F-NMC, F-NMD e FNME e o filme não modificado, V3005, apresentaram resultados importantes nas análises de biossíntese de colágeno tipo I, especialmente F-NMC, F-NMD e V3005 para o período de 72h de observação, o que pode favorecer o processo de cicatrização de uma ferida crônica ou complexa, diminuindo a possibilidade de intercorrências como quelóides e cicatrizes hipertróficas. A análise em queratinócitos apontou para o potencial favorecimento na proliferação celular, e, embora o ensaio tenha sido realizado com o propósito de

avaliar a toxicidade das combinações, os dados tornam ainda mais propícios o interesse nesses compostos e, portanto, estudos de proliferação celular devem ser mais aprofundados no futuro, uma vez que este tipo celular é de extrema importância na sinalização e fechamento de feridas nas fases intermediárias e finais da cicatrização.

Ademais, a atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* apresentou valores de inibição mínimos de cerca de 80%, tendo o valor máximo observado para a composição F-NME, com cerca de 90%, o que torna os compostos ainda mais promissores para o tratamento de feridas complexas, considerando que contaminação bacteriana compõe um dos fatores complicadores na cicatrização de feridas. Vale destacar ainda que, a esse respeito, a composição F-NME apresentou os melhores resultados de inibição também para *Escherichia coli*.

A composição F-NMC apresentou resultados interessantes quando observada sua influência frente aos queratinócitos, além de apresentar bons resultados para os ensaios de inibição, tornando-se uma composição promissora para estudos futuros. Embora não tenha apresentado os resultados mais significativos para a biosíntese de colágeno tipo I, a composição F-NME apresenta grande potencialidade para utilização in-vivo, uma vez que o potencial favorecimento do controle bacteriano usado localmente pode oferecer condições para que o organismo possa restabelecer sua homeostase e propiciar a cicatrização adequada de um ferimento.

Deste modo, pode-se concluir que, este projeto foi capaz de auxiliar no início do desenvolvimento de um biomaterial com potencialidade para oferecer a administração direta de peptídeos ao tecido danificado e que apresenta potencial para tornar o processo de cicatrização mais rápido e eficaz. Novos estudos ainda devem ser realizados para complementar as informações observadas e permitir avaliar outros aspectos importantes no processo de cicatrização de ferimentos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABU SAMAH, N. H.; HEARD, C.M. Topically Applied KTTKS: A review. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 33, n. 6, p. 483-90, 2011.
- AITECHESON, S. M.; FRENTIU, F.D.; HURN, S.E.; EDWARDS, K.; MURRAY, R.Z. Skin Wound Healing: Normal Macrophage Function and Macrophage Dysfunction in Diabetic Wounds. **Molecules**, vol. 26, n 16, p. 4917, 2021.
- ALKILANI, A.Z.; Mc CRUDDEN, M.T.C.; DONELLY, R.F. Transdermal Drug Delivery: Innovative Pharmaceutical Developments Based on Disruption of the Barrier Properties of the Stratum Corneum. **Pharmaceutics**, v. 7, n. 4, p. 438-70, 2015.
- AMBLARD, M. J.; FEHRENTZ, J. A.; MARTINEZ, J.; SUBRA, G. Fundamentals of modern peptide synthesis. **Methods Mol. Biol.**, v. 298, p. 3-24, 2006.
- ASLANTÜRK, O.S. *In vitro* cytotoxicity and cell viability: principles, advantages and disadvantages. **Genotoxicity-A predictable risk to our actual world**, v.2., p. 64-80, 2018.
- BALBINO, C.A; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos Envolvidos Na Cicatrização: Uma Revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, 2005.
- BARUD, H.S., ARAÚJO JUNIOR, A. M.; SANTOS, D.B.; ASSUNÇÃO, R.M.N.; MEIRELES, C.S.; CERQUEIRA, D.A.; RODRIGUES FILHO, G.; RIBEIRO C.A.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S.J.L. Thermal behavior of cellulose acetate produced from homogeneous acetylation of bacterial cellulose. **Thermochimica Acta**, vol.471, 1-2, p. 61-69, 2008.
- BEHRENDT, R., WHITEB, P., OFFER, J. Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis. **J. Pept. Sci.** v. 22, p. 4–27, 2016.
- BELLIS, S. L. Advantages of RGD Peptides for Directing Cell Association with Biomaterials. **Biomaterials**, v. 32, n. 18, p. 4205–10, 2011.
- FERREIRA, M.C.; TUMA Jr, P.; CARVALHO V.F.; KAMAMOTO, F. Complex Wounds. **Clinics**, v. 61, n. 6, p. 571-8, 2006.
- FIGUEIREDO, L.A. RIBEIRO, R.S. MELO A.L.B., Lima, A.L., TERRA B.B., VENTIM F.C. Uso da prótese de polipropileno para o tratamento das lesões em ponta de dedo. Descrição de técnica cirúrgica e resultados. **Rev Bras Ortop**.v. 52(6), p.685-92, 2017.
- FREDERIKSEN, K.; GUY, R.H; PETERSSON, K. Formulation Considerations in the Design of Topical, Polymeric Film-Forming Systems for Sustained Drug Delivery to the Skin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 91, p. 9-15, 2015.
- GANTWERKER, E. A.; HOM, D. B. "Skin: Histology and Physiology of Wound Healing". **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, vol. 19, nº 3, p. 441–53, 2011.
- GUO, S.; DIPIETRO, L. A. Factors Affecting Wound Healing. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 3, p. 219–229, 2010.
- HERSEL, U.; DAHMEN, C.; KESSLER, H. RGD Modified Polymers: Biomaterials for Stimulated Cell Adhesion and Beyond. **Biomaterials**, v. 24, n. 24, p. 4385–415, 2003.

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

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.

JARADAT, D. S. M. M. Thirteen decades of peptide synthesis: key developments in solid phase peptide synthesis and amide bond formation utilized in peptide ligation. **Amino Acids**, 50, n. 1, p. 39-68, 2018.

KAISER, E.; COLESCOT, R. L.; BOSSINGE, C. D.; COOK, P. I. Color Test for Detection of Free Terminal Amino Groups in the Solid-Phase Synthesis of Peptides. **Analytical Biochemistry**, v. 34, n. 2, p. 595-598, 1970.

KATHE, K.; HATHPALIA, H. Film Forming Systems for Topical and Transdermal Drug Delivery. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 6, p. 487–97, 2017.

KHAN, S.; BOATENG, J.S.; MITCHELL, J.; TRIVEDI, V. Formulation, Characterization and Stabilization of Buccal Films for Pediatric Drug Delivery of Omeprazole. **AAPS PharmSciTech**, v. 16, n. 4, p. 800–10, 2015.

LAUREANO, A.; RODRIGUES, A. M. Wound Healing. **Journal of the Portuguese Society of Dermatology and Venereology**, v. 69, n. 3, p. 355, 2011.

LOPES, R. Funcionalização de celulose bacteriana com peptídeo RGD para reparação tecidual de pele. 2015. 109 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química, 2015.

MURTHY, S.N.; HIREMATH, S.R.R. Physical and Chemical Permeation Enhancers in Transdermal Delivery of Terbutaline Sulphate. **AAPS PharmSciTech**, v. 2, n.1, 2001.

PATEL, D.P.; SETTY, C.M.; MISTRY, G.N.; PATEL, S.L.; PATEL, T.J.; MISTRY P.C.; RANA, A.K.; PATEL, P.K.; MISHRA, R.S. Development and Evaluation of Ethyl Cellulose-Based Transdermal Films of Furosemide for Improved *In Vitro* Skin Permeation. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 2, p. 437–42, 2009.

PIERSCHBACHER, M. D.; RUOSLAHTI, E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. **Nature**, v. 309, n. 5963, p. 30-33, 1984.

PRATS, R.G. The Role of MSC in Wound Healing, Scarring and Regeneration. **Cells**, v. 10, n.7, p. 1729, 2021.

PRZEKORA, A. A Concise Review on Tissue Engineered Artificial Skin Grafts for Chronic Wound Treatment: Can We Reconstruct Functional Skin Tissue In Vitro?. **Cells**, v. 9, n. 7, p. 1622, 2020.

RAZIYEVA, K.; KIM, Y.; ZHARKINBEKOV, Z.; KASSYMBEK, K.; JIMI, S.; SARAPOV, A. Immunology of Acute and Chronic Wound Healing. **Biomolecules**, v. 11, n. 5, p. 700, 2021.

RISS, T. L., MORAVEC, R. A., NILES, A. L., DUELLMAN, S., BENINK, H. A., WORZELLA, T. J.; MINOR, L. Cell viability assays. **Assay Guidance Manual**, 2016. Encontrado em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>. Último acesso em: 21 de dezembro de 2023.

RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L.; CUENCA-ESTRELLA, M.; DÍAZ-GUERRA, T. M.;

MELLADO, E. Standardization of Antifungal Susceptibility Variables for a Semiautomated Methodology. **Journal of Clinical Microbiology**, 39, n. 7, p. 2513, 2001.

SILVA, A.R. P.; GUIMARÃES, M.S.; RABELO, J.; BELÉN, L.H.; PERECIN, C.J.; FARÍAS, J.G.; SANTOS, J.H.P.M.; RANGEL-YAGUI, C.O. Recent Advances in the Design of Antimicrobial Peptide Conjugates. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 10, n 19, p. 3587–600, 2022.

TAZIMA M.F.G.S.; VICENTE Y.A.M.V.A.; MORIYA T. Biologia da ferida e cicatrização. **Medicina** (Ribeirão Preto), v. 41, n. 3, p. 259-264. 2008.

TRØSTRUP, H.; BJARNSHOLT, T.; KIRKETERP-MØLLER, K.; HØIBY, N.; MOSER, C. What Is New in the Understanding of Non-Healing Wounds Epidemiology, Pathophysiology, and Therapies.” In: *Ulcers 2013*, pp. 1–8, 2013.

ULLIVARRI, M.F.; ARBULU, S.; GARCIA-GUTIERREZ, E.; COTTER, P.D. Antifungal Peptides as Therapeutic Agents. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 105, 2020.

VIEIRA, C.P.B.; ARAÚJO, T.M.E. Prevalence and factors associated with chronic wounds in older adults in primary care. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 52, p. e03415, 2018.

VIJAYA, R.; PRATHEEBA, C.; ANUZVI, A.; SANOJ, V.; KUMAR, J. Study of the Hydroxy Propyl Methyl Cellulose (HPMC) Combinations in the Development of Transdermal Film for Amitriptyline HCl and their *In Vitro* Characterization. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 5, n. 3, p. 548–56, 2015.