

IMOBILIZAÇÃO DE SEQUÊNCIA PEPTÍDICA RGD NA SUPERFÍCIE DE
FILMES DE PHBV POR SÍNTESE ORGÂNICA EM FASE SÓLIDA

Marilúcia Sobrado Pina

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Metalúrgica e de Materiais, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Metalúrgica e de Materiais.

Orientadores: Rossana Mara da Silva Moreira

Thiré

Salvatore Giovanni De Simone

Rio de Janeiro
Setembro de 2011

IMOBILIZAÇÃO DE SEQUÊNCIA PEPTÍDICA RGD NA SUPERFÍCIE DE
FILMES DE PHBV POR SÍNTESE ORGÂNICA EM FASE SÓLIDA

Marilúcia Sobrado Pina

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO
LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA
(COPPE) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA METALÚRGICA E DE MATERIAIS.

Examinada por:

Prof^ª. Rossana Mara da Silva Moreira Thiré, D. Sc.

Prof^ª. Marysilvia Ferreira da Costa, D.Sc.

Prof. Fernando Costa e Silva Filho, D.Sc.

Bruna Oliveira e Carvalho, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

SETEMBRO DE 2011

Pina, Marilúcia Sobrado

Imobilização de sequência peptídica RGD na superfície de filmes de PHBV por Síntese Orgânica em Fase Sólida/ Marilúcia Sobrado Pina. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2011.

XVII, 121 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Salvatore Giovanni De Simone

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, 2011.

Referências Bibliográficas: p. 106-121.

1. Biomateriais. 2. Poli(hidroxibutirato-co-valerato). 3. Peptídeo RGD. 4. *CelluSpot*. I. Thiré, Rossana Mara da Silva Moreira *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais. III. Título.

A Deus

*Luz que ilumina meus caminhos,
Fé que sustenta meus pensamentos,
Força que me permite buscar meus ideais,
Que minhas derrotas sejam novo estímulo,
e que minhas vitórias sejam Tuas...*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Aurélio Pina Marques e Vera Lúcia Sobrado Pina, pelo exemplo de luta; rochas firmes e confiantes de minha força que iluminaram meus caminhos obscuros.

Às minhas irmãs, Milena, Marilena e Marcele pelo exemplo de coragem, de perseverança e dignidade para enfrentarmos as dificuldades que a vida nos impõe.

À professora Rossana Mara da Silva Moreira Thiré, meu sincero agradecimento pela orientação, compreensão e dedicação no decorrer deste trabalho.

Ao professor Salvatore Giovanni De Simone, meu sincero agradecimento pela orientação deste trabalho.

À Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) que possibilitaram a realização deste trabalho.

Aos docentes das disciplinas cursadas do PEMM, pela oportunidade de conviver e dividir conhecimentos e experiências.

A todas as chefias dos laboratórios do PEMM que contribuíram para a execução deste trabalho Prof^a. Renata Antoun Simão, Prof^a. Marysilvia Ferreira da Costa, Prof. Sérgio Álvaro de Souza Camargo, Prof. Luiz Henrique de Almeida.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Biopolímeros do PEMM Taíla, Diego, Bruna, Roberta, Tatiana, Márcio, Diogo e Clara, que me mostraram que eu sou, ou melhor, eu era um pouco espaçosa e a compreender que a nossa união é inevitável.

A todos do Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos - FIOCRUZ (LABIP), pela colaboração inacabável, pelas reflexões científicas, pela amizade (como diria Michele “a máfia”), pelos momentos de descontração, pelas conversas diárias (quando possível), pelo apoio de um grupo de pesquisa extraordinário...Paloma, Bel, Ana, Carol, Tonha, André, Bruna, Adriana e Luiz. E aos, também amados, ex-LABIP Juzinha, Ciça, Luana, Mônica, Lívia, Fatinha e Thatiane. E aos demais, que apesar da pouca convivência foram importantes em vários momentos durante a minha estada no laboratório.

À minha grande amiga Débora (doutoranda do PEMM), que esteve ao meu lado em vários bons momentos, mas principalmente, esteve junto de mim em momentos bastante delicados, me dando conselhos e me apoiando nas minhas decisões.

Àqueles que dividiram comigo (quase diariamente) tudo aquilo que somente um pós-graduando sabe o que é, e que tornaram esses dois anos muito especiais: Priscila e Bruno (mestrandos do PEMM). E, ao recém chegado Everton (doutorando do PEMM).

A todos os amigos e colegas que compartilharam comigo instantes essenciais para execução deste trabalho, independente do laboratório e do vínculo com a instituição UFRJ Alexandre, Heleno, Érico, Ana Paula, Renatinha, Marta e Paula.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Biologia Estrutural, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, chefiado pelo Dr. Mário Sérgio Palma e, em especial, ao Beto (doutorando e ex-LABIP de consideração) por responder tão rápido aos meus e-mails e estar sempre pronto a ajudar uma futura mestre aflita por notícias do andamento das suas análises.

À Unidade de Pesquisas Clínicas (UPC), instalada no Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP-UFF) e a minha querida colega do laboratório de Biopolímeros Taíla por realizar, em conjunto, os Testes Biológicos de Citotoxicidade e de Adesão.

Aos secretários do PEMM Cinthia, Bruno e, em especial, ao Francisco por estarem sempre resolvendo rapidamente todo tipo de problema, para total felicidade dos pós-graduandos.

À PHB Industrial S/A pela doação do PHBV.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

IMOBILIZAÇÃO DE SEQUÊNCIA PEPTÍDICA RGD NA SUPERFÍCIE DE FILMES DE PHBV POR SÍNTESE ORGÂNICA EM FASE SÓLIDA

Marilúcia Sobrado Pina

Setembro/2011

Orientadores: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré
Salvatore Giovanni De Simone

Programa: Engenharia Metalúrgica e de Materiais

Neste trabalho foram avaliadas as técnicas de *Spot Synthesis* e *CelluSpot* como novas metodologias para a imobilização de peptídeos RGD na superfície de filmes de PHBV visando à produção de um biomaterial bioativo. Os filmes de PHBV foram produzidos pela técnica de evaporação por solvente a partir de uma solução de PHBV em clorofórmio a 7% (p/p). A caracterização dos filmes biofuncionalizados com peptídeos RGD foi realizada por FTIR, MEV, AFM, ângulo de contato e Energia de Superfície, além de terem sido submetidos a testes biológicos *in vitro*. Os resultados mostraram que os processos de modificação, aminólise e reticulação, alteraram a natureza química da superfície dos filmes tornando-as mais suscetíveis à imobilização peptídica. O método de *Spot Synthesis* não foi passível de ser aplicado visando a biofuncionalização destes filmes. Os filmes biofuncionalizados com RGD por *CelluSpot* não foram considerados citotóxicos e os testes de adesão celular indicaram uma atividade expressiva frente a células de osteoblastos. Este resultado indica um favorecimento das etapas iniciais que envolvem regeneração tecidual, justificando sua aplicação na Engenharia Tecidual.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

IMMOBILIZATION OF RGD PEPTIDE SEQUENCE ON THE SURFACE OF PHBV
FILMS BY SOLID-PHASE ORGANIC

Marilúcia Sobrado Pina

September/2011

Advisor: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré
Salvatore Giovanni De Simone

Department: Metallurgical and Materials Engineering

In this work, a new methodology for immobilization of RGD peptides on the surface of poly (hydroxybutyrato-co-valerate) - PHBV films was evaluated in order to produce a biologically active biomaterial, Spot Synthesis or CelluSpot. The PHBV films were produced by casting from a solution of PHBV a 7 % (w/w) in chloroform. The characterization of the films biofunctionalized with RGD was performed by FTIR, SEM, AFM, Contact Angle, Surface Energy and Biological Tests. The results showed that modifications treatments by aminolysis and crosslinking altered chemically the films surface, making them more susceptible to immobilization of peptides by CelluSpot. The Spot Synthesis method was not capable of being applied to the biofuncionalização these films. The biofunctionalized films were considered non-citotoxic. Cellular adhesion assay showed that the films immobilized with RGD peptides have a significant activity against osteoblasts. This result suggests a favoring of the early stages of tissue regeneration, justifying its application in Tissue Engineering.

SUMÁRIO

Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
Lista de Figuras.....	xii
Lista de Tabelas.....	xvi
Lista de Símbolos.....	xvii
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO II – OBJETIVOS.....	4
2.1. OBJETIVO GERAL.....	4
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
CAPÍTULO III – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1. ENGENHARIA TECIDUAL.....	5
3.1.1. Biomateriais.....	6
3.1.2. Dinâmica celular.....	9
3.1.3. Poli(hidroxibutirato-co-3-valerato) – PHBV.....	11
3.1.4. Biodegradação.....	16
3.2. MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE.....	19
3.2.1. Métodos Biológicos de Modificação.....	21
3.2.2.1. Peptídeos RGD.....	24
3.3. SÍNTESE PEPTÍDICA EM FASE SÓLIDA (SPFS).....	30
3.3.1. <i>Spot Synthesis</i>	32
3.3.2. <i>CelluSpot</i>	37
CAPÍTULO IV – MATERIAIS e MÉTODOS.....	41
4.1. MATERIAIS.....	41
4.2. MÉTODOS.....	42
4.2.1. Produção dos Filmes de PHBV.....	44
4.2.2. Derivatização dos filmes de PHBV.....	45
4.2.2.1. Modificação por Aminólise.....	45
4.2.2.2. Modificação por Reticulação.....	46
4.2.2.3. Imobilização do ligante Beta-alanina.....	47

4.2.3. Imobilização dos filmes de PHBV com peptídeos contendo RGD por <i>Spot Synthesis</i>	48
4.2.4. Imobilização com peptídeos contendo RGD via <i>CelluSpot</i>	49
4.2.5. Teste de Imunodeteção.....	52
4.2.6. Teste de Ninidrina.....	53
4.2.6.1. Preparo de soluções necessárias ao teste de Ninidrina.....	54
4.2.6.2. Metodologia do teste de Ninidrina.....	55
4.2.6.3. Construção da curva padrão para quantificação da solução de peptídeo RGD.....	56
4.2.7. Espectroscopia de Massas por MALDI-ToF-ToF.....	57
4.2.8. Caracterização dos filmes de PHBV biofuncionalizados com RGD.....	58
4.2.8.1. Espectroscopia de Infravermelho – FTIR.....	58
4.2.8.2. Ângulo de Contato e energia de Superfície.....	59
4.2.8.3. Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV.....	60
4.2.8.4. Microscopia de Força Atômica (AFM).....	61
4.2.9. Testes Biológicos.....	63
4.2.9.1. Análise de Citotoxicidade.....	63
4.2.9.2. Ensaio de Adesão.....	65
CAPÍTULO V – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
5.1. PRODUÇÃO DOS FILMES DE PHBV.....	66
5.2. MÉTODO DE <i>SPOT SYNTHESIS</i>	66
5.3. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE <i>SPOT SYNTHESIS</i>	73
5.4. MÉTODO DE <i>CELLUSPOT</i>	77
5.4.1. Seleção do suporte de PHBV para imobilização.....	77
5.4.2. Avaliação da imobilização por Imunodeteção dos filmes de PHBV.....	79
5.4.3. Análise por MALDI da composição de aminoácidos do peptídeo que contém a sequência RGD.....	79
5.4.4. Imobilização sob diferentes perfis de distribuição e concentração.....	81
5.5. CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DOS FILMES DE PHBV IMOBILIZADOS COM PEPTÍDEO CONTENDO RGD.....	82
5.5.1. Análise da composição dos filmes de PHBV por FTIR.....	82
5.5.2. Grau de hidrofobicidade dos filmes de PHBV modificados.....	84
5.5.3. Energia de superfície dos filmes de PHBV modificados.....	88
5.5.4. Ultraestrutura dos filmes de PHBV por MEV.....	89

5.5.5. Avaliação da rugosidade dos filmes de PHBV modificados.....	93
5.6. TESTES BIOLÓGICOS <i>IN VITRO</i>	97
5.6.1. Análise de Citotoxicidade.....	97
5.6.2. Ensaio de Adesão.....	100
CAPÍTULO VI – CONCLUSÕES	103
6.1. CONCLUSÕES.....	104
CAPÍTULO VII – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	105
CAPÍTULO VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Sequência tripeptídica RGD.....	2
Figura 3.1 - Técnica da engenharia de tecidos (adaptado de BARBANTI <i>et al.</i> , 2005), apresentando as principais etapas da regeneração tecidual. As células são retiradas do paciente, expandidas <i>in vitro</i> , cultivadas sob um suporte polimérico e após este procedimento, o tecido gerado é implantado no paciente.....	5
Figura 3.2 - Eventos moleculares e celulares relacionados à interação célula e superfície do biomaterial (adaptado de ORÉFICE <i>et al.</i> , 2006).....	10
Figura 3.3 - Fórmula geral dos poli-hidroxicanoatos (a), exemplos de monômeros estruturais dos PHAs (b) e a fórmula geral do poli(hidroxibutirato-co-3-valerato) (PHBV) (c).....	13
Figura 3.4 - Proteína fibronectina e seu sítio de reconhecimento RGD (adaptado de ALBERTS, 2002).....	26
Figura 3.5 - Equipamento semi-automático, <i>AutoSpot</i>	33
Figura 3.6 - Epítomos conformacionais e lineares (adaptado de STITES <i>et al.</i> , 2000)....	34
Figura 3.7 - Síntese peptídica linear – <i>Spot Synthesis</i> - efetuada a partir da ligação do primeiro aminoácido da sequência à extremidade reativa do suporte polimérico (ligante). Os aminoácidos estão representados por esferas coloridas.....	35
Figura 3.8 - Princípio da Técnica de <i>Spot Synthesis</i>	36
Figura 3.9 - Arranjo peptídico tridimensional gerado por <i>Celluspot</i>	39
Figura 3.10 - Representação do suporte de <i>CelluSpot</i> aderido a um lâmina de vidro após imobilização e detecção do peptídeo com uma distribuição em 2 campos/ 384 <i>spots</i>	40
Figura 4.1 - Quadro esquemático apresentando as diferentes técnicas utilizadas no desenvolvimento deste trabalho.....	43
Figura 4.2 - Esquema de Aminólise com etilenodiamina em filme de PHBV.....	45
Figura 4.3 - Esquema de reticulação com TPP em filme de PHBV aminolisado.....	46
Figura 4.4 - Esquema de imobilização do ligante beta-alanina.....	47
Figura 4.5 - Esquema geral da sequência peptídica sintetizada: suporte polimérico (círculo) - espaçador (4G) – peptídeo (RGD).....	48
Figura 4.6 - Sintetizador <i>AutoSpot</i> utilizado para a síntese do peptídeo contendo a sequência RGD.....	50
Figura 4.7 - Equipamento <i>SlideSpotter</i> usado na imobilização do peptídeo contendo a sequência RGD.....	51

Figura 4.8 - Filmes de PHBVA90/R60 fixados para imobilização por <i>CelluSpot</i>	51
Figura 4.9 - Representação do ensaio de Imunodeteção sobre os diferentes suportes poliméricos.....	52
Figura 4.10 - Reação de obtenção do cromóforo púrpura de Ruhemann (adaptado de STEWART <i>et al.</i> , 1979).....	54
Figura 4.11 - Curva Padrão de concentração do peptídeo RGD x Absorbância ($\lambda = 570$ nm).....	56
Figura 4.12 - Representação dos modos de operação do AFM: a) modo contato; b) não-contato e c) modo intermitente (adaptado de FERREIRA, 2006).....	62
Figura 5.1 - Filme de PHBV obtido pela técnica de evaporação de solvente: em uma visão lateral (1a) e uma visão frontal (1b).....	66
Figura 5.2 - Imagem sobreposta de espectros de FTIR dos filmes de PHBV sem modificação e aminolisados 90 e 120 minutos.....	67
Figura 5.3 - Imagem sobreposta de espectros de FTIR dos filmes de PHBV aminolisados 90 e 120 minutos com zoom nas regiões relacionadas com aminas primárias e amidas secundárias.....	68
Figura 5.4 - Filmes de PHBV-A120 antes da síntese (esquerda) e após a síntese (direita) dispostos sobre o equipamento de <i>Spot Synthesis</i>	69
Figura 5.5 - Filmes de PHBV aminolisados 90 minutos e reticulados em tempos diferentes (30, 60, 90 e 120 minutos) após <i>Spot Synthesis</i>	70
Figura 5.6 - Filmes de PHBV aminolisados 120 minutos e reticulados em tempos diferentes (30, 60, 90 e 120 minutos) após <i>Spot Synthesis</i>	70
Figura 5.7 - Imagem sobreposta dos espectros de FTIR dos filmes de PHBV-A90 e PHBV-A90/R90.....	71
Figura 5.8 - Imagem sobreposta de espectros de FTIR dos filmes de PHBV-A90/R90 e PHBV-A90/R90 + β -Alanina.....	73
Figura 5.9 - Avaliação das modificações estabelecidas ao método de <i>Spot Synthesis</i> para adequação dos filmes de PHBV modificados.....	76
Figura 5.10 - Imagem sobreposta de espectros de FTIR dos filmes de PHBV-A90/R60 e do suporte de <i>Celluspot</i>	78
Figura 5.11 - Percentual de imobilização dos peptídeos imobilizados sobre os filmes de PHBV-A90/R60 e PHBV-A120/R120 após a detecção por quimioluminescência.....	79
Figura 5.12 - Imagem do site http://immweb.vet.uu.nl/P&P_fac/pepcalc.htm	80
Figura 5.13 - Espectro MALDI – Imaging do peptídeo (RGDGRGDGRGDG).....	81

Figura 5.14 - Filmes de PHBV-A90/R60 imobilizado com peptídeo imunogênico conjugado com RGD, a) imobilização total; b) imobilização parcial.....	82
Figura 5.15 - Imagem sobreposta com zoom dos espectros de FTIR dos filmes de PHBV sem modificação, PHBV-A90/R60 e dos filmes PHBV-A90/R60 + 1 $\mu\text{g}/\text{spot}$ do peptídeo RGD em 384 distribuições.....	83
Figura 5.16 - Imagem sobreposta com zoom dos espectros de FTIR dos filmes de PHBV sem modificação, PHBV-A90/R60 e dos filmes PHBV-A90/R60 + 1 $\mu\text{g}/\text{spot}$ do peptídeo RGD em 192 distribuições.....	83
Figura 5.17 - Medida de hidrofiliçidade dos filmes de PHBV antes e após a biofuncionalização com RGD. As modificações 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 correspondem aos filmes de PHBV-A90/R60, PHBV-A90/R60 com 10ng de RGD/192, 10ng de RGD/384, 100ng de RGD/192, 100ng de RGD/384, 1 μg de RGD/192 e 1 μg de RGD/384, respectivamente.....	85
Figura 5.18 - Representação esquematizada do ângulo de contato sobre uma superfície plana (adaptado de SMITH, 1980).....	85
Figura 5.19 - Imagens, e seus respectivos valores, das gotas obtidas durante a análise de ângulo de contato sobre o filme não funcionalizado (a) e os filmes biofuncionalizados (b), (c), (d) e (e).....	86
Figura 5.20 - Imagens, e seus respectivos valores, das gotas obtidas durante a análise de ângulo de contato sobre os filmes biofuncionalizados (a) e (b).....	87
Figura 5.21 - Energia de Superfície e seus componentes dos filmes de PHBV-A90/R60 biofuncionalizados e não funcionalizado. As modificações 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 correspondem aos filmes de PHBV-A90/R60, PHBV-A90/R60 com 10ng de RGD/192, 10ng de RGD/384, 100ng de RGD/192, 100ng de RGD/384, 1 μg de RGD/192 e 1 μg de RGD/384, respectivamente.....	88
Figura 5.22 - Imagens de MEV da superfície dos filmes de PHBV sem modificação (a)500x e (b) 3000x; filmes de PHBV-A90 (c) 500x; (d) 3000x; PHBV-A90/R60 (e)500x e (f) 3000x e PHBV-A90/R60 + celulose (g)500x e (h)4000x.....	90
Figura 5.23 - Imagens de MEV da superfície dos filmes PHBV-A90/R60 com 10ng de RGD/ <i>spot</i> em 192 distribuições/área (a) 500x e (b) 1000x; com 1 μg de RGD/ <i>spot</i> em 192 distribuições/área (c) 500x e (d) 1000x; com 10ng de RGD/ <i>spot</i> em 384 distribuições/área (e) 500x e (f) 1000x e com 1 μg de RGD/ <i>spot</i> em 384 distribuições/área (g) 500x e (h) 1000x.....	91

Figura 5.24 - Imagens de MEV da superfície dos filmes de PHBV-A90/R60 com 10ng de RGD/ <i>spot</i> em 192 distribuições/área (a) e em 384 distribuições/área (b) 100x.....	93
Figura 5.25 - Rugosidade Média dos filmes de PHBV por AFM. As modificações 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 correspondem aos filmes de PHBV-A90/R60, PHBV-A90/R60 com 10ng de RGD/192, 10ng de RGD/384, 100ng de RGD/192, 100ng de RGD/384, 1µg de RGD/192 e 1µg de RGD/384, respectivamente. A condição 8 corresponde ao filme de PHBV puro.....	93
Figura 5.26 - Imagens de microscopia de força atômica (AFM) de 10µm x 10µm, em formato tridimensional, da superfície dos filmes de PHBV puro (a); PHBV-A90R60 (b); PHBV-A90R60 com 10ng de RGD/192 (c); PHBV-A90R60 com 10ng de RGD/384 (d); PHBV-A90R60 com 1µg de RGD/192 (e); PHBV-A90R60 com 1µg de RGD/384 (f)..	94
Figura 5.27 - Gráfico do ensaio de citotoxicidade baseado na atividade respiratória por XTT em células de osteoblastos.....	98
Figura 5.28 - Gráfico da análise de citotoxicidade baseado na incorporação do corante vermelho neutro pelos lisossomos das células de osteoblastos.....	99
Figura 5.29 - Gráfico da análise de citotoxicidade baseado na de inclusão do corante cristal violeta no material genético das células de osteoblastos.....	100
Figura 5.30 - Teste de adesão inicial de osteoblastos sobre as superfícies de PHBV modificadas com RGD. O gráfico representa à média e erro padrão da contagem de núcleos marcados com DAPI. O asterisco indica diferença significativa para com todos os outros grupos experimentais ($p < 0,05$, ANOVA).....	101
Figura 5.31 - Núcleos celulares marcados com DAPI visualizados no microscópio invertido no aumento de 10x. As imagens correspondem aos filmes de PHBV-A90/R60 com celulose, sem RGD (a), com 10ng de RGD/ <i>spot</i> (b), com 100ng de RGD/ <i>spot</i> (c) e com 1µg de RGD/ <i>spot</i> (d) na distribuição de 384 <i>spots</i> / área total de filme.....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Importantes características dos método de SPFS, <i>Spot Synthesis</i> e <i>CelluSpot</i>	38
Tabela 4.1 - Propriedades e características do PHBV fornecido pela PHB Industrial S/A. Estes dados foram fornecidos pelo fabricante.....	41
Tabela 5.1 - Efeito da modificação com etilenodiamina da superfície sobre o ângulo de contato entre a água e os filmes PHBV-A90 e PHBV-A120.....	68
Tabela 5.2 - Efeito da modificação da superfície sobre o ângulo de contato dos filmes PHBV-A/R.....	72
Tabela 5.3 - Imagens da membrana padrão imobilizada com peptídeos sintetizados em triplicata frente às modificações estabelecidas ao método de <i>Spot Synthesis</i>	75
Tabela 5.4 - Ângulo de contato dos filmes de PHBV-A90/R60 biofuncionalizados com peptídeos RGD e não funcionalizados.....	84

LISTA DE SÍMBOLOS

AFM	<i>Atomic force microscopy</i>
BOC	terc-butiloxicarbonil
DAPI	(4-6-diamidino-2-fenilindol)
DCM	Diclorometano
DIC	Diisopropilcarbodimida
DMF	N,N'-dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
FMOc	9-fluorenilmetiloxicarbonil
FN	Fibronectina
FTIR	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>
HOB	Osteoblastos
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HV	Hidroxivalerato
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - time-of-flight</i>
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MS	<i>Mass spectrometry</i>
NMP	N-metil-pirrolidona
PCL	Policaprolactona
PEG	Polietilenoglicol
PGA	poli(ácido glicólico)
PHB	Polihidroxibutirato
PHBHHX	poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato)
PHBV	poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)
PLA	poli(ácido láctico)
PLGA	poli(ácido láctico-co- ácido glicólico)
PLL	poli(L-lisina)
RGD	Sequência peptídica formada por Arginina - glicina - ácido Aspártico
SPFS	Síntese de peptídeos em fase sólida
SSC	tampão citrate
TFA	ácido trifluoracético
TIPS	Trisopropilsilano
TFMSA	trifluormetanosulfônico

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

Recentemente tem sido dada muita atenção à área de Engenharia Tecidual como alternativa para contornar os problemas associados aos tratamentos tradicionais para regeneração de tecidos danificados por doenças degenerativas, traumas por acidentes ou mesmo a perda de órgãos e de funções. Embora os tratamentos tenham aumentado a qualidade de vida de muitos pacientes, eles apresentam algumas importantes limitações (BREULS *et al.*, 2008; LANGER *et al.*, 2004; ZHAO *et al.*, 2003).

As terapias atuais envolvem algumas estratégias como o uso de auto-enxertos, que pode ser limitado por escassez de tecido do doador. Além disso, esse tratamento requer um segundo procedimento cirúrgico, aumentando o risco de complicações e custo do tratamento. Em contra partida, os transplantes geram risco de rejeição pelo indivíduo receptor, infecções, oferta limitada de órgãos (BREULS *et al.*, 2008) e utilização permanente de medicação imunossupressora (YASUHIKO, 2001).

O objetivo da Engenharia Tecidual é superar as limitações dos tratamentos convencionais baseados em transplantes de órgãos e implantação de biomaterial. Com isso, permite produzir uma quantidade de órgãos e tecidos “artificiais” imunologicamente tolerantes fornecendo uma solução permanente para órgãos ou tecidos danificados sem a necessidade de terapias adicionais. Em razão disso, trata-se de um tratamento com excelente custo-benefício (CZERNUSKA e SACHLOS, 2003).

O desenvolvimento de biomateriais atua como ponto chave na Engenharia Tecidual, pois os suportes devem prover a estrutura e forma para o novo tecido, e são responsáveis pela organização do conjunto celular semeado, proporcionando o desenvolvimento do tecido ou órgão (STOCK e VACANTI, 2001). Uma das estratégias envolve o uso de materiais porosos tridimensionais que servem, normalmente, como suporte físico e também agem direcionando o crescimento e migração de células das vizinhanças do tecido ou das células presentes em sua estrutura de poros. O uso desses materiais porosos visa mimetizar as condições naturais da matriz extracelular em termos de estrutura, composição química e propriedades mecânicas (FILIPCZAK *et al.*, 2005).

Para aplicações na área médica, uma das famílias de polímeros biodegradáveis com grande potencial é a dos polihidroxicanoatos (PHAs). Esta classe de polímeros apresenta características de biocompatibilidade e bioatividade, além de serem facilmente moldados e passíveis de modificação química em suas cadeias poliméricas. O polihidroxibutirato (PHB) é o principal representante dessa família de PHAs e,

juntamente com o seu co-polímero poli(hidroxibutirato-co-valerato) (PHBV), são uns dos poucos representantes desta família produzidos comercialmente, sendo, portanto, os mais estudados. Devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades mecânicas semelhantes aos termoplásticos convencionais, o PHBV pode ser utilizado como sistemas de liberação de drogas, suturas, suporte para crescimento de tecidos, prótese etc (LEMES, 2005).

A modificação da superfície de suportes porosos de biomateriais é desejável para atender às demandas de aplicação sem, no entanto, modificar as demais propriedades do suporte tais como resistência mecânica ou propriedades térmicas. Essas modificações de superfície incluem mudanças de grupos funcionais, da carga superficial, como também molhabilidade (YANG *et al.*, 2002).

Visando realçar o desempenho desses materiais para aplicação médica, algumas propriedades de superfície podem ser seletivamente modificadas. Dentre os métodos de modificação que permitem tais aplicações incluem-se os métodos biológicos. Estes métodos consistem na imobilização de biomoléculas como proteínas, polissacarídeos, proteoglicanas e seus derivados (ZHU *et al.*, 2006). Sequências de peptídeos RGD (arginina – glicina – ácido aspártico) podem também ser imobilizadas covalentemente a partir de superfícies amino funcionalizadas (ZHU *et al.*, 2002).

A sequência de aminoácidos RGD, conforme mostra a Figura 1.1, constitui o sítio de reconhecimento celular da maior parte das proteínas da matriz extracelular como fibronectina, vitronectina, colágeno etc. Sendo assim, peptídeos contendo a sequência RGD podem ser empregados para estimular a adesão celular já que funcionam como sítio específico de ligação com as proteínas transmembranares (ZHU *et al.*, 2002).

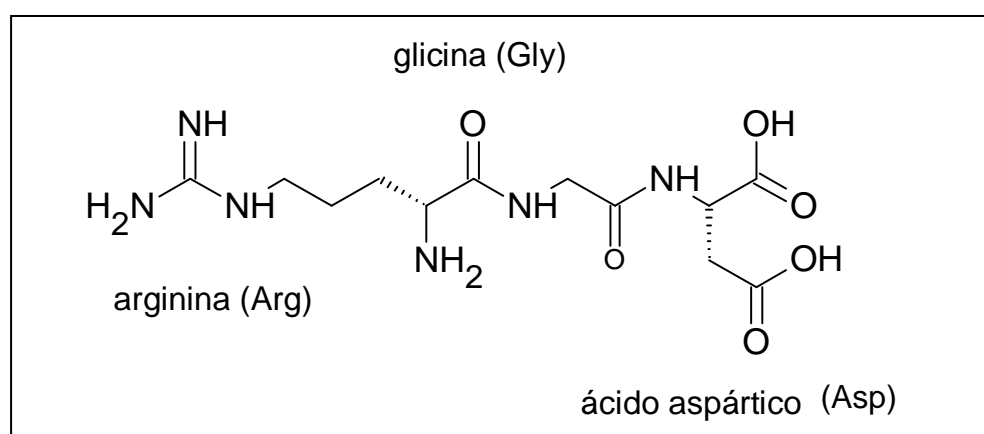


Figura 1.1. Sequência tripeptídica RGD

A imobilização de peptídeos em microarranjo, ou seja, em micro escala é uma das mais promissoras tecnologias que permite miniaturizar projetos de investigação de atividades enzimáticas, interação antígeno-anticorpo, interações receptor-ligante, dentre outros. No entanto, a função destas moléculas com ação biológica depende de uma estrutura secundária específica sob uma determinada orientação espacial. Assim, uma imobilização eficiente se refere à função conservada por parte da sequência peptídica, que requer uma estrutura específica da superfície (LESAICHERRE *et al.*, 2002).

Uma estrutura superficial específica inclui a presença de grupos ligantes unidos a superfície do suporte através de uma cadeia flexível, um espaçador, para aumentar a probabilidade de interação. A seleção destes grupos permite o acoplamento de certo domínio de uma molécula resultando em uma orientação definida e apropriada. (HOLLANDER *et al.*, 2004).

Desta forma, neste trabalho foi realizada a imobilização de peptídeos RGD na superfície de filmes de PHBV. O preparo destes filmes bioativos baseou-se na síntese orgânica em fase sólida, que é um método bastante empregado em áreas como a Química Orgânica e a Bioquímica e representa uma ferramenta inédita de modificação de materiais para aplicação na área de Engenharia Tecidual. Esses peptídeos imobilizados estão inseridos no sítio ativo de ligação celular de uma das principais proteínas da matriz extracelular, a fibronectina (FN), sendo capazes de induzir a adesão celular de forma a conseguir uma interação potencializada entre célula e biomaterial.

CAPÍTULO II – OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi imobilizar peptídeos RGD (arginina - glicina - ácido aspártico) na superfície dos filmes de PHBV potencializando características para favorecimento de adesão celular e, assim, produzir um biomaterial biologicamente ativo. Desse modo, será possível ampliar as aplicações como biomaterial dos filmes de PHBV na Engenharia Tecidual.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para que este objetivo geral fosse concluído com êxito, as metas listadas abaixo foram alcançadas:

- Modificação dos filmes de PHBV, a fim de torná-los passíveis de serem biofuncionalizados com peptídeos RGD por síntese orgânica em fase sólida;
- Síntese e imobilização dos peptídeos contendo RGD via método de *Spot Synthesis*;
- Imobilização dos peptídeos na superfície dos filmes de PHBV por *CelluSpot* - Método de síntese de peptídeos em fase sólida automatizado;
- Caracterização do biomaterial pré e pós-modificações e da sequência peptídica RGD;
- Avaliação *in vitro* de adesão celular e citotoxicidade dos filmes de PHBV ativados biologicamente.

CAPÍTULO III – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. ENGENHARIA TECIDUAL

A Engenharia Tecidual é uma área multidisciplinar que tem o objetivo de desenvolver tecidos e órgãos, buscando restaurar, manter ou melhorar suas funções (LANGER *et al.*, 2004). Essa tecnologia está fundamentada em três técnicas principais: (i) Uso de células isoladas ou substituintes celulares; (ii) Uso de materiais acelulares; (iii) Uso de células ou tecidos combinados com materiais de suporte (arcabouços) associado a fatores de crescimento (BARBANTI *et al.*, 2005). Esta última abordagem está fundamentada no cultivo de células *in vitro* e sua posterior ancoragem sobre o arcabouço. Essas células irão proliferar, migrar e se diferenciar em tecidos específicos enquanto secretam componentes da matriz extracelular necessários para a formação do novo tecido ou órgão (CZERNUSKA e SACHLOS, 2003; IKADA, 2006).

Barbanti *et al.* (2005) relacionam as principais etapas a serem seguidas para a obtenção de produtos na Engenharia Tecidual partindo da técnica que utiliza células associadas a suportes, que são: (1) seleção e processamento do suporte; (2) inoculação da população celular sobre o suporte; (3) crescimento do tecido prematuro e crescimento do tecido maturado em sistema fisiológico; (4) reimplante cirúrgico e (5) período de assimilação do produto, como esquematizado na Figura 3.1.

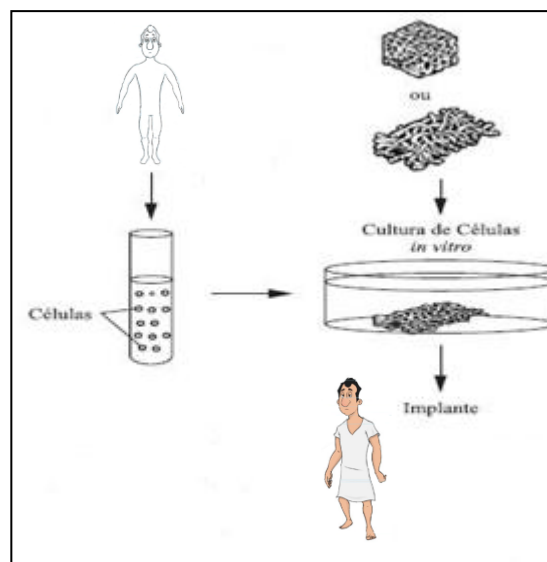


Figura 3.1. Técnica da engenharia de tecidos (adaptado de BARBANTI *et al.*, 2005), apresentando as principais etapas da regeneração tecidual. As células são retiradas do paciente, expandidas *in vitro*, cultivadas sob um suporte polimérico e após este procedimento, o tecido gerado é implantado no paciente.

Em defeitos ósseos, os substituintes têm função de preencher o espaço permitindo uma regeneração adequada da região danificada. As células semeadas podem ser de origem autóloga (células do próprio indivíduo), xenóloga (células de outra espécie) ou alógena (células de outro indivíduo da mesma espécie). O enxerto autógeno é considerado padrão para o tratamento de defeitos ósseos por apresentar excelente atividade biológica sendo osseocondutor (formação óssea na matriz do material) e osteoindutor (indutores de formação óssea), além de não induzir resposta imune. No entanto, estes enxertos apresentam limitações em razão da deformação no local doador, dor, infecção e outros (BOER *et al.*, 2003).

O ponto crucial para o sucesso da Engenharia Tecidual é conseguir o controle dos eventos desencadeados após a interação biomaterial - célula, como crescimento, diferenciação e comportamento celular (YANG *et al.*, 2003). Assim, a definição do biomaterial adequado, bem como a técnica ideal para o sucesso da terapia regenerativa é fundamental. Deve-se entender que o comportamento celular de um cultivo *in vitro* em muitas situações não é semelhante àquele apresentado pela mesma população celular quando *in vivo* (ATALA, 2007).

3.1.1. Biomaterias.

O biomaterial utilizado em implantes deve apresentar dentre outras características a biocompatibilidade, ou seja, deve promover uma boa interação célula-material não sendo rejeitado pelo organismo (CHEN *et al.*, 2005). Na Engenharia Tecidual essa relação íntima entre células e suporte é de grande importância para a aplicabilidade das propriedades biológicas dos implantes. A diversidade de respostas celulares a diferentes materiais evidencia a capacidade das células de discriminar quimicamente um suporte e de se adaptar a ele, e de aderir ou não à sua superfície (ANSELME, 2000). Este evento é importante, pois a adesão das células ao suporte poderá influenciar eventos celulares posteriores à adesão como a proliferação, viabilidade, diferenciação e migração celular. É evidente que a escolha do arcabouço é crucial para que as células se comportem de maneira apropriada para produzir tecido e órgãos com formato, tamanho e função desejados (CZERNUSKA e SACHLOS, 2003; IKADA, 2006).

Segundo a Agência Nacional de Saúde (ANVISA, 2005), uma das definições correntes diz que biomateriais são materiais sintéticos ou naturais, sólidos, ou, líquidos, utilizados em dispositivos médicos. São enquadrados como biomateriais: próteses,

lentes, enxertos, cateteres, tubos de circulação extracorpórea e arcabouços empregados na engenharia de tecidos. No campo da Engenharia Tecidual, os biomateriais são utilizados para melhorar, aumentar ou substituir, parcial ou integralmente, tecidos e órgãos.

Os biomateriais podem ser fabricados a partir de diferentes tipos de materiais, como por exemplo: metais, cerâmicas, polímeros sintéticos ou naturais e outros. Os materiais metálicos destacam-se pelo uso na confecção de implantes, principalmente devido a sua boa resistência mecânica, facilidade de fabricação e baixo custo. Podem ser constituídos de ferro, cromo, cobalto, níquel, titânio e outros. Estes materiais são tolerados pelo corpo em quantidades limitadas, sendo alguns até essenciais para funções celulares ou metabólicas (ORÉFICE *et al.*, 2006). Entretanto, o potencial de corrosão e os produtos de corrosão são os fatores limitantes na sua aplicabilidade como biomaterial.

Os materiais cerâmicos, compostos inorgânicos não metálicos, são amplamente utilizados em medicina na fabricação de lentes de óculos, fibras ópticas para endoscopia, vidros porosos carreadores de anticorpos e enzimas, e mais recentemente como materiais de implantes e regeneração de tecidos. Já os materiais poliméricos são amplamente usados como biomateriais, sendo comumente chamados de biopolímeros. Uma grande variedade deste tipo de material vem sendo usado em aplicações biomédicas graças às suas características físico-químicas e sua versatilidade estrutural. A possibilidade de modificação destes materiais amplia ainda mais suas aplicações específicas (ORÉFICE *et al.*, 2006).

Na Engenharia Tecidual, os biomateriais poliméricos são divididos em duas classes distintas: os de origem natural e aqueles de origem sintética. Como exemplo de material polimérico natural temos o colágeno, a quitosana, o poli(3-hidroxi butirato) - PHB e o seu copolímero poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato) - PHBV. Os materiais poliméricos sintéticos mais conhecidos são os α -hidroxi-ácidos: o poli(ácido láctico) - PLA, policaprolactona - PCL, poli(ácido glicólico-co-láctico) - PGLA (ATALA, 2007).

Analisando alguns termos descritos na literatura e diretamente relacionados às propriedades físico-químicas dos biomateriais, alguns destes termos são definidos a seguir para proporcionar um maior entendimento sobre a classe (ORÉFICE *et al.*, 2006; HUTMACHER, 2000):

- (1) Biodegradável – termo associado a materiais poliméricos sólidos que se decompõem devido à degradação macromolecular por ação biológica com dispersão local *in vivo*;
- (2) Biorreabsorção – termo associado a materiais sólidos poliméricos que apresentam perda gradual de massa até a sua completa eliminação *in vivo*. Os subprodutos são eliminados através das rotas naturais, pela simples infiltração ou após serem metabolizados. Este conceito reflete a eliminação total de resíduos e, por consequência, ausência de efeitos nocivos;
- (3) Bioerosíveis – conceito associado a materiais poliméricos que apresentam uma degradação superficial e eliminação *in vivo*. Este termo reflete a total eliminação do material estranho e degradação da superfície por geração de componentes de baixo peso molecular;
- (4) Bioabsorção – conceito associado a materiais poliméricos que podem ser dissolvidos em fluidos corpóreos sem qualquer clivagem das cadeias poliméricas ou diminuição de seu peso molecular;
- (5) Biocompatibilidade – refere-se ao comportamento das células quando em contato com o material, especialmente pela adesão celular a sua superfície. A biocompatibilidade é influenciada por diversos fatores como diferentes aplicações biomédicas, pacientes com origens diferentes, faixas etárias, sexo, estado de saúde geral do indivíduo e etc. A biocompatibilidade de polímeros está relacionada também às características intrínsecas do material, por exemplo: cristalinidade, natureza química e outros. Este conceito envolve normalmente quatro fenômenos: (i) adsorção de biomoléculas junto à superfície dos materiais logo após a implantação destes no corpo; (ii) resposta local do tecido à presença do biomaterial, na forma de respostas inflamatórias e imunológicas; (iii) efeito do ambiente corpóreo no material, observado através da degradação do polímero; (iv) sintomas clínicos em razão da presença do biomaterial como aparecimento de tumores, alergias, inflamações etc;
- (6) Bioatividade – termo associado à capacidade dos biomateriais de se ligarem ou aderirem aos tecidos vizinhos permitindo aos implantes exercer funções estruturais.

Assim, algumas características dos biomateriais são importantes quando empregados na área de Engenharia Tecidual, as quais incluem: (1) devem ser bioativos; (2) devem ser biodegradáveis; (3) devem apresentar cinéticas de biodegradação e deterioração de propriedades mecânicas compatíveis com a cinética de estabilização dos tecidos; (4) devem ser facilmente moldados; (5) devem apresentar elevada porosidade

com interconectividade; (6) devem possuir boas propriedades mecânicas em condições fisiológicas; (7) devem ser biocompatíveis (ORÉFICE *et al.*, 2006).

Em aplicações onde se deseja suportes temporários, os arcabouços que permanecem por longos períodos podem agir como impedimento físico na regeneração do tecido. Assim, o material polimérico deve ser escolhido considerando uma taxa de degradabilidade *in vivo* compatível com o tempo que aquele tecido específico leva para ser reconstituído. Por isso, obter uma resistência significativa que determine essa taxa é algo bastante complexo. Essa taxa de degradação controlada envolve a presença de ligações intermoleculares e interatômicas suficientemente altas, mas deve ter ao mesmo tempo uma estrutura física e química que permita a decomposição (HUTMACHER, 2000).

3.1.2. Dinâmica celular.

Todo biomaterial implantado deve permanecer, mesmo que por um período curto de tempo, no organismo receptor visando alcançar o objetivo do tratamento estabelecido. Ao implantar um biomaterial no organismo humano uma série de eventos celulares será desencadeada, inicia-se com a liberação de mediadores solúveis agindo sobre a atividade das células (ORÉFICE *et al.*, 2006). A adsorção destas moléculas é regida pelo microambiente da interface, como por exemplo: pH da região, composição iônica – interações eletrostáticas, temperatura, composição das proteínas presentes no meio e o tipo de material (VROMAN, 1987). Em seguida, o processo de quimotaxia (locomoção orientada de células em função de estímulo químico) dá início à etapa de adesão e, conseqüentemente, espraiamento celular. A adesão e o espraiamento compreendem uma interação prolongada entre células e o biomaterial na região de interface promovida por ligações entre moléculas de adesão que compõem a matriz extracelular (MEC) adsorvidas ao material e integrinas, moléculas presentes na membrana celular (ORÉFICE, 2006; MEYER, 2002). As moléculas da matriz extracelular (fibronectina, laminina, vitronectina, colágeno e etc) são reconhecidas por moléculas transmembranares (integrinas) ligadas ao citoesqueleto celular (GIL *et al.*, 2009). Estas ligam-se a pequenos sítios presentes nestas moléculas como, por exemplo, a sequência RGD (Arginina - Glicina - Ácido Aspártico) presentes nas moléculas de fibronectina, vitronectina, laminina, colágeno (DONG *et al.*, 2010) ou a sequência

TIGSR (Tirosina – Leucina – Glicina – Serina - Arginina) presente na molécula de laminina (SANTOS, 2007).

A qualidade das etapas de adsorção, adesão e espraiamento influenciarão diretamente na proliferação e diferenciação celular. Durante a interação osteoblastos-implante, algumas proteínas envolvidas na adesão destas células à superfície do material, como proteínas da matriz extracelular, integrinas e outras, podem ter sua expressão alterada de acordo com as características da superfície do implante (ANSELME, 2000). Portanto, a osseointegração (adesão estrutural e funcional entre o osso e a superfície de fixação) dos implantes é resultante direta da adesão e espraiamento de células osteogênicas na superfície dos implantes (BOWERS *et al.*, 1992; BOYAN *et al.*, 1996).

A Figura 3.2 mostra os eventos moleculares e celulares relacionados ao reconhecimento de um implante constituído por um biomaterial, destacando as etapas de: adsorção de proteínas, adesão e espraiamento (interação) e proliferação celular.

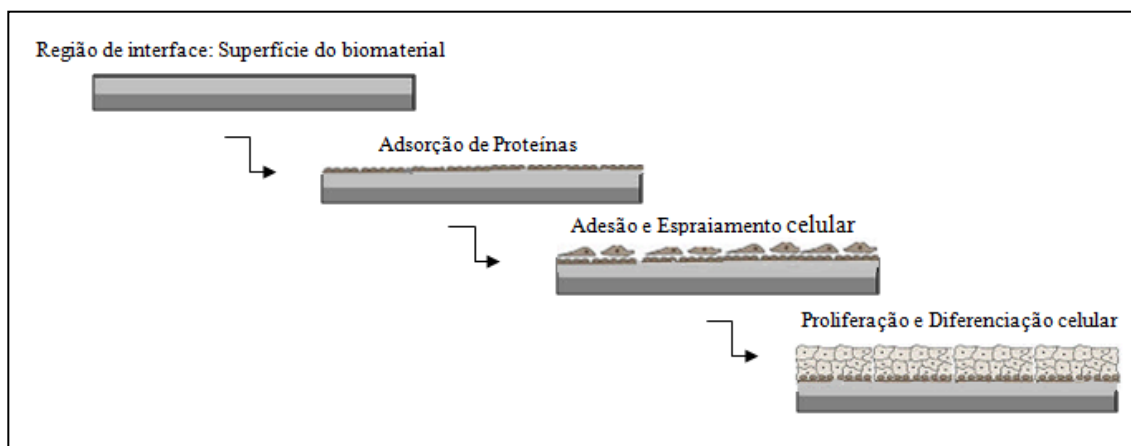


Figura 3.2. Eventos moleculares e celulares relacionados à interação célula e superfície do biomaterial (adaptado de ORÉFICE *et al.*, 2006)

Para que uma boa adesão celular ocorra não é necessariamente obrigatório que o material implantado apresente características semelhantes à MEC. No entanto, uma semelhança físico-química é importante quando o objetivo é promover a diferenciação celular. Assim, é essencial proporcionar características físico-químicas e mecânicas, tais como: o balanço adequado entre hidrofobicidade e hidrofiliabilidade, disposição de cargas superficiais, dureza, elasticidade e resistência mais próximas ao tecido que será

implantado. Existe uma relação entre a hidrofiliicidade e a adesão celular, de modo que, dentro de certos parâmetros, substratos mais hidrofílicos tendem a suportar uma melhor interação com células. Assim, a adesão é de extrema importância para a ciência dos biomateriais. Somente depois de aderidas, as células iniciam seu processo de espraiamento, divisão e produção de matriz extracelular nova. O espraiamento é um processo complexo que envolve modificações na morfologia celular em consequência de alterações no citoesqueleto, criando assim uma melhor interação com o substrato (SANTOS, 2007).

A adesão celular é mediada por diferentes tipos de proteínas receptoras transmembranares conectadas ao citoesqueleto celular (BAXTER *et al.*, 2002). Esse processo envolve a conversão de estímulos por meio de uma cascata de sinalização altamente complexa. Essa comunicação ocorre pela ação de moléculas transmembranares chamadas integrinas presentes nestas células mediante domínios extracelulares que se ligam ao substrato e domínios intracelulares que estão conectados ao citoesqueleto. O agrupamento destas moléculas forma sítios de adesão local gerando forças a partir do complexo de fibras actina-miosina que compõem o citoesqueleto das células. Sobre um suporte rígido as células levam a formação e maturação destes sítios de adesão e um citoesqueleto altamente organizado com fibras abundantes. Por consequência, a organização do citoesqueleto proporciona uma excelente fixação das células sobre este tipo de suporte. Ao contrário, um substrato pouco rígido pode gerar uma fixação frágil das células sobre a superfície do suporte. Desse modo, as células se ajustam de acordo com a rigidez do seu substrato (BREULS *et al.*, 2008).

3.1.3. Poli(hidroxibutirato-co-3-valerato) – PHBV.

Dentre os polímeros pertencentes à família dos polihidroxicanoatos (PHAs) destacam-se o polihidroxibutirato (PHB), o copolímero poli(hidroxibutirato-co-3-valerato) (PHBV), o poli(4-hidroxibutirato) (P4HB) e outros. Os PHAs são poliésteres formados por monômeros de ácidos 3-hidroxicanoicos sintetizados e armazenados intracelularmente como reserva energética, podendo chegar a 90% da massa celular seca do organismo. Sua biossíntese ocorre em condições desfavoráveis de crescimento como, a limitação de um nutriente essencial como nitrogênio, fósforo e/ou oxigênio, e na presença de excesso de fonte de carbono (MADISON e MADISON, 1999; REDDY *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2005).

Os PHAs são polímeros lineares de modo que a polimerização acontece através da ligação entre o grupamento carboxila de um monômero e o grupamento hidroxila de outro monômero, formando um poliéster. Geralmente os polímeros de PHAs possuem de 10^3 a 10^4 monômeros, sendo acumulados na forma de inclusões com diâmetro variando entre 0,2 e 0,5 μm . Estas inclusões não causam nenhum efeito nocivo ao microorganismo (LUENGO *et al.*, 2003).

Atualmente, as pesquisas relacionadas à produção dos PHAs direcionam para obtenção de organismos eficientes no acúmulo de PHAs, produção dos PHAs pelo uso de matérias-primas de baixo custo e renováveis na agricultura, aumento de produtividade, pelo cultivo microbiano de alta densidade celular e busca de reatores alternativos e, adequação das características do produto pela modulação da massa molar (DA SILVA *et al.*, 2007).

A aplicabilidade destes ésteres na área biomédica se dá em razão de características como biodegradabilidade, biocompatibilidade, osteoespecificidade, atividade ótica e termoplaticidade, tornando-os importantes biomateriais para o desenvolvimento de novos arcabouços para Engenharia Tecidual (KOSE *et al.*, 2003). Estes compostos têm sido usados no desenvolvimento de fios de sutura, dispositivos para guiar o reparo tecidual, implantes cardíacos, prótese, pinos ortopédicos, túbulos de regeneração venosa e membranas para regeneração de pele e outros (CHEN *et al.*, 2005). No entanto, uma das principais aplicações dos PHAs e de suas blendas tem sido na fabricação de filmes biodegradáveis aplicáveis na agricultura funcionando como camada protetora para fertilizantes, herbicidas e inseticidas (HOCKING e MARCHESSAUL, 1994) ou na área de embalagens, podendo substituir plásticos derivados de petróleo por plásticos biodegradáveis (SORRENTINO *et al.*, 2007).

A estrutura das unidades monoméricas que compõem os PHAs varia em razão da espécie de bactéria produtora e da fonte de carbono utilizada pelo microorganismo. Contudo, muitos destes precursores utilizados como fonte nutricional podem conter uma variedade de grupamentos químicos que conferem características específicas àquele biopolímero. Os PHAs podem apresentar propriedades diversificadas variando de termoplásticos com propriedades físicas semelhantes ao polipropileno como aos elastômeros, tornando-os uma alternativa aos plásticos convencionais (KOLIBACHUK *et al.*, 1999).

Um importante polímero pertencente a família dos polihidroxialcanoatos que merece destaque é o copolímero PHBV. Este poliéster semicristalino é constituído por

unidades de hidroxibutirato (HB), em maior proporção, e unidades de hidroxivalerato (HV) em menor proporção. Ele apresenta propriedades em comum com o homopolímero PHB, como elevada cristalinidade, boa estabilidade à radiação ultravioleta, resistência à água, elevada massa molar, baixa permeabilidade à gases, biocompatibilidade etc (SUDESH *et al.*, 2000; OJUMU *et al.*, 2004). No entanto, a inserção de unidades de HV pode melhorar a flexibilidade e a resistência ao impacto do material. Assim, as propriedades deste copolímero podem ser alteradas por mudanças na sua composição básica por meio de variações no suprimento fornecido às bactérias. (DA SILVA, 2007). O PHBV tem como característica menor temperatura de fusão cristalina (T_m), menor dureza, menor cristalinidade e menor ponto de fusão que o PHB puro (DU *et al.*, 2001).

A Figura 3.3 mostra a fórmula geral dos poli-hidroxicanoatos (a), exemplos de monômeros estruturais dos PHAs (b) e a fórmula geral PHBV (c).

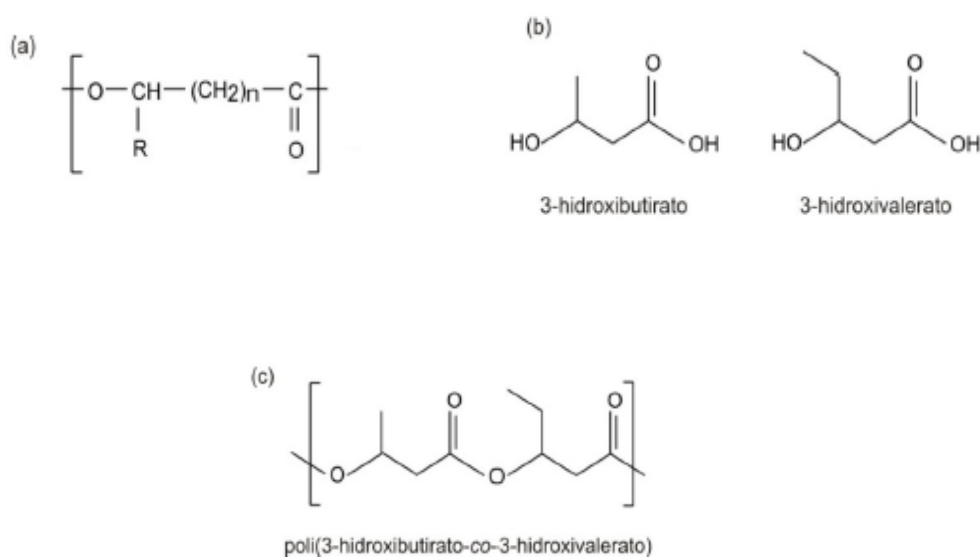


Figura 3.3. Fórmula geral dos poli-hidroxicanoatos (a), exemplos de monômeros estruturais dos PHAs / 3-hidroxibutirato e 3-hidroxivalerato (b) e a fórmula geral do poli(hidroxibutirato-co-3-valerato) (PHBV) (c).

Os organismos produtores de PHAs podem ser divididos em dois grupos baseados nas condições de cultura requeridas para a síntese dos biopolímeros. Os microorganismos que pertencem ao grupo *Cupriavidus necator*, *Protomonas extorquens*, *Pseudomonas oleovorans* e *Chromobacterium violaceum*, entre muitos

outros utilizam a glicose como fonte de carbono e como co-substrato o ácido propiônico ou ácido valérico (excesso de fonte de carbono) e, além disso, somado à limitação de um nutriente essencial como nitrogênio, fósforo, magnésio, enxofre ou oxigênio. Contudo, a elevada toxicidade do propionato resulta em uma baixa incorporação do HV ao copolímero (DU *et al.*, 2001). Já o grupo composto pelos microorganismos *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii* e *Escherichia coli* recombinante acumulam os polímeros durante o seu crescimento, não necessitando de limitação nutricional (LEE, 1996).

A produção latino-americana dos poli(hidroxicarboxilatos) é realizada pela empresa PHB Industrial S/A a partir de fontes renováveis. Estes materiais são comercializados sob o nome de Biocycle® (NASCIMENTO, 2001). Atualmente, a produção ainda está em escala piloto, mas já existe um projeto para ampliar a capacidade de produção da empresa. O custo do processo de fermentação e da tecnologia aplicada à extração tem auxiliado na competitividade da produção de PHB, uma vez que a fonte de carbono é obtida através da produção de açúcar e álcool. Os insumos energéticos (energia e vapor) são obtidos pela queima do bagaço da cana-de-açúcar. O sistema de extração utiliza um solvente fabricado pelo próprio produtor do PHB, gerando um enorme ganho competitivo.

A rota de síntese dos PHAs tem sido amplamente estudada, com particular interesse na enzima poli-hidroxicarboxilato sintase (PHA sintase), a qual catalisa um passo chave desta rota sintética. A via de biossíntese do PHB a partir de acetil-CoA consiste em três reações enzimáticas envolvendo as enzimas β -cetotiolase, NADPH-dependente acetoacetil-CoA redutase e PHA sintase. Sendo que a PHA sintase possui baixa especificidade podendo incorporar diversos precursores como, por exemplo, 3-hidroxi-butiril-CoA, 3-hidroxi-propionil-CoA, 3-hidroxi-valeril-CoA, além do 4-hidroxi-butiril-CoA. Quando o tipo de substrato gera o precursor 3-hidroxi-valeril-CoA tem-se a formação do PHBV (LI *et al.*, 2007).

A síntese do PHBV tem a glicose como substrato carbônico, a qual é metabolizada até acetil-CoA. Na sequência, duas moléculas de acetil-CoA condensam-se, por atividade da enzima β -cetotiolase produzindo acetoacetil-CoA. Este último subproduto é reduzido por atividade de uma redutase dependente de NADPH a 3-hidroxi-butiril-CoA, que é substrato da enzima de polimerização, PHA sintase, produzindo o PHB. Entretanto, na presença dos co-substratos propionato ou valerato (ou outro substrato de 3 ou 5 carbonos) são utilizados como co-intermediários de síntese

propionil-CoA ou valeril-CoA produzidos através da enzima acil-CoA sintase. O propionil-CoA pode ser convertido em cetovaleril-CoA pela enzima β -cetotiolase, que o condensa a uma unidade de acetil-CoA. O cetovaleril-CoA pode ser reduzido a 3-hidroxicetovaleril-CoA e este utilizado pela PHA sintase para produzir o copolímero PHBV (DOI *et al.*, 1990).

Analisando o potencial de aplicação médica deste biopolímero, estudos feitos para avaliar a adesão celular ao substrato de PHBV relataram uma adesão inicial lenta, o que não significa necessariamente que o material não seja promissor na utilização para engenharia de tecidos. Já estudos feitos por Mann *et al.* (1999) mostraram que a produção precoce de componentes da matriz extracelular é favorecida por uma adesão lenta ao material, dessa forma permitindo o crescimento e proliferação celular.

Considerando possíveis alterações na conformação das proteínas quando adsorvidas sobre superfícies hidrofóbicas ou muito hidrofílicas e visando à diminuição deste tipo de influência sobre o processo de adsorção. O ideal é que as superfícies apresentem molhabilidade moderada, a fim de preservar a conformação da proteína, mantendo a sua bioatividade e permitindo a adesão celular (MA *et al.*, 2007). A molhabilidade de um material é determinada pela medida de ângulo de contato entre uma gota de água e a superfície horizontal do material que se deseja caracterizar. Um ângulo de contato superior a 90° corresponde a uma superfície que não molha, ou seja, hidrofóbica; em contrapartida, quando o ângulo for inferior de 90° , a superfície molha, dita hidrofílica.

Apesar da reconhecida biocompatibilidade do copolímero PHBV (VOLOVA *et al.*, 2003), a interação células Vero/polímero não se mostrou imediata *in vitro* (SANTOS JR *et al.*, 2005). Os PHBs são biomateriais de caráter pouco hidrofílico (HASIRCI *et al.*, 2003), apresentando ângulo de contato por volta de 80° , porém a maior parte das células apresentam valor de ângulo de contato para adesão em torno de $40-60^\circ$ (ARIMA E IWATA, 2007), podendo registrar valores mais específicos dependendo do tipo celular e do material trabalhado.

Estudos foram feitos por Santos Jr. *et al.* (2005) para avaliar o uso de blendas de PLLA e PHBV como superfícies para cultivo de células Vero. Foram utilizadas membranas de PLLA, de PHBV e de PLLA/PHBV combinados em diferentes proporções (100/0, 60/40, 50/50, 40/60, 0/100). O trabalho avaliou a morfologia das células nestes diferentes substratos poliméricos após 24 h de cultura por MEV. Adesão celular também foi analisada após 2 h de inoculação. Para avaliação do crescimento

celular, as células foram mantidas em cultura por 48, 120, 240 e 360 h. Os resultados mostraram que a adesão celular foi melhor em 60/40 e 50/50, quando foram utilizadas misturas, embora as células terem se mostrado capazes de crescer e proliferar em todas as misturas testadas. Ao usar PLLA / PHBV (50/50) as células apresentaram-se ligeiramente achatados independente da morfologia da superfície. As misturas de PLLA / PHBV (40/60) apresentaram células achatadas em áreas lisas. PLLA / PHBV (0 / 100) também apresentaram células espalhadas interligadas. Cortes histológicos mostraram que as células cresceram como uma monocamada confluyente em diferentes substratos.

Outros estudos realizados *in vitro* com dispositivos biorreabsorvíveis para avaliar o crescimento e proliferação celular relatam que células de fibroblastos de camundongo NIH/3T3 cultivadas sobre membranas de PHBV apresentaram uma boa adesão e taxa de multiplicação sobre o material. Estas membranas apresentaram alterações de hidrofobicidade após sofrerem modificações físico-químicas aumentando a adesão e a taxa de multiplicação (SANTOS e WADA, 2007).

3.1.4. Biodegradação.

A característica mais atraente dos PHAs é sua biodegradabilidade. Estes materiais são capazes de sofrer degradação tanto *in vitro*, quanto *in vivo* pela ação de fluidos corpóreos (KHANNA e SRIVASTAVA, 2005). O processo de degradação envolve, inicialmente, a deterioração do polímero através da clivagem das cadeias poliméricas até ser dirigido às vias metabólicas produzindo ao final dióxido de carbono (CO₂) e água - produtos de degradação atóxicos (VANIN, 2003).

Para polímeros semicristalinos, a degradação ocorre em duas etapas: inicialmente a água penetra pela superfície do material (inchamento da malha polimérica) atacando preferencialmente as cadeias poliméricas que constituem a fase amorfa. A hidrólise gera fragmentação das longas cadeias em cadeias menores e, finalmente, em fragmentos solúveis. Devido a isso, ocorre a redução da massa molar da fase amorfa sem perda de propriedades físicas. Posteriormente, ocorre a perda das propriedades físicas e a água começa a fragmentar o material por inteiro. A segunda etapa tem início quando a massa molar numérica média atinge um valor crítico de 13.000 g/mol, sendo caracterizada pelo ataque enzimático aos fragmentos gerados e, em seguida, a metabolização (MIDDLETON, 2000; FREIER, 2006).

A etapa de hidrólise de poliésteres microbianos (ex: PHBV) ocorre em 2 etapas. Inicialmente, há uma quebra aleatória das cadeias poliméricas, como dito anteriormente, começando pela região amorfa e, em seguida, pela região cristalina gerando uma diminuição da massa molecular com relativa polidispersão. Há simultaneamente um aumento da cristalinidade do polímero, fato que é atribuído a cristalização dos pequenos fragmentos gerados pela hidrólise da região amorfa (FREIER, 2006).

A hidrólise de grupamentos químicos hidroliticamente instáveis que compõem os biopolímeros biorreabsorvíveis (PHAs) prevalece no processo de degradação. Ocorre, na sequência, a perda da resistência mecânica do material em razão do decréscimo da massa molar com formação de oligômeros e, conseqüentemente, monômeros e outros. Desse modo, as cadeias poliméricas tornam-se solúveis no fluido extracelular quando atingem valores de massa molar em torno de 7.000 g/mol. A partir desse momento, inicia-se o processo de fragmentação do material em razão da baixa resistência mecânica, associado à tensão mecânica local (VANIN, 2003; WAKE *et al.*, 1998). O processo de degradação *in vivo* difere da degradação *in vitro*, principalmente porque *in vivo* o implante está submetido à pressão mecânica (VANIN, 2003; ELST *et al.*, 1996).

Alguns fatores possuem um papel importante na degradação do polímero tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Fatores relacionados ao indivíduo receptor como local de implantação, o estresse mecânico transmitido e idade afetam diretamente a resposta ao implante e configuram um importante fator no processo de degradação. Assim, o processo pode levar meses ou anos até ser concluído (SHISHATSKAYA *et al.*, 2004). No entanto, a velocidade de degradação do polímero depende de uma série de fatores, como a composição química, o tamanho, a forma e a superfície do implante. Além disso, propriedades específicas do material como massa molar inicial, distribuição de massa molar, grau de cristalinidade, taticidade (VANIN, 2003 e ELST *et al.*, 1996) e a fase do material (amorfa ou cristalina) afetam diretamente na degradação. Fatores como presença de microorganismos no ambiente, temperatura, teor de umidade, pH, presença de aditivos e impurezas e do mecanismo de degradação também influenciam. (SHISHATSKAYA *et al.*, 2004 e KHANNA e SRIVASTAVA, 2005).

A degradação do copolímero PHBV com baixo conteúdo de hidroxivalerato (até 20%) tem sido amplamente estudada, sendo possível a comparação com o homopolímero PHB em razão da baixa influência dos grupamentos HV sobre a taxa de hidrólise. Considerando a massa molecular, o PHBV apresenta um aumento da taxa de degradação em razão da diminuição da massa molecular inicial. Por outro lado, um

elevado grau de cristalinidade atua na desaceleração do processo de degradação (FREIER, 2006; YASIN, *et al.*, 1993).

Os estudos de degradação *in vitro* envolvendo fibras de PHBV (14% de hidroxivalerato) têm se mostrado relativamente lentos. De modo que, as amostras apresentaram diminuição da massa molar após um período de indução de aproximadamente 80 dias, sendo alcançada uma queda de 64% de massa após 6 meses. As amostras foram colocadas em contato com tampão fosfato a pH 7,4 e temperatura de 37°C. (FREIER, 2006; DOI *et al.*, 1990).

Estudos realizados em filmes de PHBV em tampão de pH 7 a 60°C mostram que a degradação do material é favorecida por um processo de autocatálise. A contínua diminuição da massa molar foi acompanhada por um aumento da acidez em razão da formação dos ácidos resultantes do processo de hidrólise. Esse efeito foi confirmado por um aumento da taxa de degradação. Além disso, uma cisão direcionada de cadeias poliméricas com maior taxa de degradação foi observada no componente hidroxivalerato (FREIER, 2006; RENSTADT *et al.*, 1999).

A degradação *in vivo* do PHB foi bastante estudada em relação ao seu copolímero PHBV. Foi observado que o PHBV com conteúdos de hidroxivalerato (HV) menores que 10 % apresentou uma menor taxa de degradação *in vivo* quando comparado ao PHB. No entanto, as taxas de hidrólise tornam-se comparáveis quando o conteúdo de HV se aproxima de 20%. Isso pode ser explicado em função da diminuição da cristalinidade do polímero com o aumento da quantidade de HV. No entanto, a cristalinidade do copolímero PHBV é geralmente em torno da mesma ordem de grandeza do PHB correspondendo a taxas de degradação *in vivo* semelhantes aos dois tipos de polímeros (FREIER, 2006).

Estudo com filmes de PHBV foram feitos *in vivo* utilizando materiais com três diferentes proporções de hidrovalerato (7, 14 e 22% HV), estes foram analisados para citotoxicidade *in vitro* e degradação acelerada aquosa, na degradação *in vivo* e as reações dos tecidos. Os materiais PHBV e seus extratos provocaram leves ou nenhuma resposta tóxica, não conduzem à necrose tecidual *in vivo* ou formação de abscesso, mas provocam reações inflamatórias agudas em ligeira diminuição com o tempo. A degradação dos filmes de PHBV apresentou baixas taxas *in vitro* e *in vivo*, sendo que a taxa de perda de peso acompanhou aumento do conteúdo HV no copolímero, na faixa de 0,15%-0,30%/dia (*in vitro*) para 0,25%/dia (*in vivo*). Mudanças de composição e propriedades físico-químicas do PHBV foram rapidamente detectadas durante a

hidrólise acelerada, mas eram bem mais lentas *in vivo*. A integridade estrutural e mecânica do PHBV tenderam a desaparecer *in vitro* e *in vivo*. Após 90 semanas em tecidos musculares de ovelhas adultas, não houve dissolução significativa do polímero PHBV, 50-60% do peso inicial ainda restavam (CHAPUT *et al.*, 1995).

3.2. MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE.

A modificação de superfícies dos biomateriais aplicados a Engenharia Tecidual possibilita uma combinação de propriedades desejadas, como biocompatibilidade, bioatividade, resistência mecânica ou propriedades térmicas. Efetivamente estas modificações de superfície são acompanhadas por mudanças de grupos funcionais, de carga superficial e de molhabilidade (YANG *et al.*, 2002). Esta combinação de propriedades visa aperfeiçoar o desempenho do sistema, minimizando as perdas funcionais decorrentes da substituição do tecido ou órgão lesado pelo biomaterial. Assim, um modelo de superfície define o elemento chave no controle da interação do material no ambiente corpóreo receptor (LIEB *et al.*, 2005).

As propriedades de superfície de quaisquer dispositivos é extremamente importante, uma vez que é a interface que vai interagir diretamente com o hospedeiro. São elas que influenciam os eventos celulares de interface iniciais. Estas vão determinar os tipos de moléculas adsorvidas na superfície dos materiais (LORCAN, *et al.*, 2006). A exposição de qualquer material ao ambiente biológico resulta em rápida adsorção de proteínas em sua superfície e são as propriedades de superfície do material que governam a composição, tipo, quantidade e conformação de proteínas adsorvidas, bem como regulam fenômenos secundários de troca de proteínas e mediação celular de proteínas. Além disso, a composição e a conformação da camada de proteínas adsorvida são consideradas fator determinante da natureza da interação célula material e, conseqüentemente, do desempenho *in vitro* e *in vivo* do biomaterial (LORCAN, *et al.*, 2006).

Os métodos de modificação aplicados com o objetivo de realçar o desempenho dos biomateriais são classificados em três grupos principais: (i) métodos biológicos; (ii) métodos físico-químicos e (iii) métodos de recobrimento (ZHU, *et al.*, 2006).

É sabido que modificações químicas na superfície do material polimérico estão relacionadas à geração ou incorporação de grupos funcionais que poderão agir como sítios de ancoragem para imobilização de biomoléculas ou recobrimento da superfície

com material diferente. Estas ações, em geral, antecedem as modificações biológicas e aperfeiçoam as propriedades de superfície do biomaterial favorecendo interações biológicas específicas e não específicas (MENDONÇA *et al.*, 2009). Estudos foram realizados por Mendonça *et al.* (2009) utilizando a proteína fibronectina (FN) na biofuncionalização de superfícies de arcabouços de PHB a fim de melhorar a adesão de osteoblastos humanos (HOB). Visando criar sítios para a modificação com FN, os arcabouços foram previamente tratados com etilenodiamina, ou seja, foram previamente submetidos a modificação química. O tratamento modificou a morfologia e a composição química dos arcabouços, possibilitando um aumento no teor de FN adsorvido à superfície dos arcabouços de PHB.

A ativação de superfícies poliméricas é normalmente requerida para a imobilização de biomoléculas na superfície destes materiais. Para a funcionalização de superfícies inertes são necessárias reações para ativar e/ ou inserir grupos funcionais específicos. Esses grupos são considerados como agentes acopladores efetivos para a imobilização de biomoléculas como, por exemplo, grupos carboxi, amino e epóxi. Estes grupos estão normalmente unidos a superfície por uma cadeia flexível, um grupo espaçador, para aumentar a possibilidade de reação. A seleção de um grupo funcional específico possibilita um acoplamento definido em certo domínio da molécula, oferecendo uma reação específica e orientada (HOLLÄNDER, *et al.*, 2004).

O método de modificação química de superfícies é a técnica mais abrangente, em razão da sua infinidade de possibilidades, como silanização, alquilação e outros. Esta técnica consiste na imobilização de um ou mais grupamentos químicos na superfície do material. Os grupos químicos são projetados para permitir especificidade e orientação conformacional de proteínas e outras macromoléculas que entram em contato com a superfície do material. Diversos processos de modificação são utilizados, como silanização, alquilação e outros (ORÉFICE *et al.*, 2006).

Exemplos de estudos baseados em tratamento químico de superfícies de poliésteres para aumento de biocompatibilidade têm sido encontrados na literatura. Yang *et al.* (2002) estudaram o efeito do tratamento de superfície sobre a biocompatibilidade de filmes de PHB, PHBHHX e suas blendas utilizando como controle filmes de PLA. Os filmes foram modificados com lípases e hidróxido de sódio e apresentaram um aumento expressivo no número de células aderidas sobre a superfície destes materiais tratados. Estes reagentes promovem a quebra por hidrólise das ligações

éster destes polímeros aumentando a hidrofiliabilidade e a capacidade das células aderirem à superfície do polímero além de fornecer subsídios para a imobilização de proteína.

Wang *et al.* (2008) realizaram estudos visando melhorar a biocompatibilidade celular de filmes de PHBV a partir da imobilização covalente de colágeno. Este estudo foi realizado pela modificação química da superfície do material através da conversão de grupos amida enxertados nos filmes em grupos amina por rearranjo de Hofmann. Os grupos amins são convertidos em grupamentos hidroxilamina, estes se condensam a grupos aminos do colágeno, imobilizando-o sobre a superfície do material. Os filmes modificados proporcionaram melhor aderência, espalhamento e proliferação frente a células de condrócitos. Este e outros trabalhos mostram que a modificação química antecede normalmente a modificação biológica.

Outro método de modificação de superfícies de materiais envolve a deposição de recobrimentos ou filmes finos. A deposição divide-se em dois modos: Deposição Física de Vapor (PVD) e Deposição Química de Vapor (CVD) em razão do seu destaque na indústria e da sua importância científica e tecnológica. No PVD não ocorre reação química durante o processo de deposição. Já durante o processo de CVD ocorrem reações químicas com o material a ser depositado na superfície. Ambas as técnicas requerem investimentos elevados de ordem financeira (ORÉFICE *et al.*, 2006).

3.2.1. Métodos Biológicos de Modificação.

Os métodos biológicos de modificação de superfícies utilizam biomoléculas, geralmente proteínas, peptídeos, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos. As interações na interface do biomaterial são governadas por estas moléculas e outros mediadores atuando em processos celulares, metabólicos, imunológicos e inflamatórios. É importante destacar que esse tipo de imobilização pode ser temporária ou permanente, dependendo do tipo de força envolvida nas interações entre macromoléculas e material (ORÉFICE *et al.*, 2006).

Existem basicamente três métodos de imobilização de biomoléculas nas superfícies dos materiais (ORÉFICE *et al.*, 2006):

(i) Adsorção Física: as moléculas são unidas à superfície do material através de forças intermoleculares fracas, como forças de Van der Waals. Esse método é normalmente utilizado em sistemas de liberação controlada de drogas e em suportes sólidos de colunas de afinidade e purificação;

(ii) Ligação Covalente: as moléculas são imobilizadas à superfície através de ligação covalente, podendo ser obtida por ligação direta da macromolécula ao suporte ou por pré-tratamento físico-químico do suporte gerando grupamentos químicos específicos. Esta imobilização promove um ancoramento permanente e estável de moléculas;

(iii) Imobilização por Aprisionamento: este método é caracterizado pela presença de barreiras físicas dimensionais para as moléculas imobilizadas. Esta imobilização pode ser permanente ou temporária, dependendo de cada sistema.

Os mais importantes avanços no campo dos biomateriais, ao longo dos últimos anos, têm sido em bioatividade. Materiais bioativos podem ser desenvolvidos a partir do recobrimento biológico via incorporação de biomoléculas, pela incorporação e liberação controlada de fatores de crescimento, por meio do reconhecimento biológico mediante interações físico-químicas, entre outros (HUBBELL, 1999).

Esta abordagem visa a biomimetização de interações bioquímicas e envolve a presença de sistemas de reconhecimento biomiméticos em materiais semelhantes a sistemas específicos enzima-substrato e/ou antígeno-anticorpo. Estes sítios geram uma grande afinidade e seletividade e materiais com estas características são designados como materiais biomiméticos (TARLEY *et al.*, 2005).

Vários estudos conduzem o uso do PHB como biomaterial para estudos *in vitro* e *in vivo*. Entretanto, alguns estudos mostram que o PHB e o seu copolímero PHBV têm induzido respostas inflamatórias agudas prolongadas. Esse fenômeno pode ser causado por superfícies poliméricas que não são biocompatíveis com o ambiente *in vivo* (YANG *et al.*, 2002).

Mendonça *et al.* (2009) realizaram estudos utilizando a fibronectina (FN) adsorvida à superfície de arcabouços de polihidroxibutirato (PHB) a fim de melhorar a adesão de osteoblastos humanos (HOB) ao biomaterial. Os arcabouços foram modificados previamente com etilenodiamina a fim de criar sítios para a imobilização de FN. O tratamento permitiu um aumento no teor de FN adsorvida à superfície, entretanto, imagens de microscopia de força atômica mostraram que a proteína adotou diferentes conformações em relação aos arcabouços tratados e não tratados. Os resultados indicaram que a menor adesão de HOB nos arcabouços modificados por aminólise é consequência da conformação adotada pela FN em não expor os grupamentos RGD de maneira satisfatória. No entanto, os arcabouços não modificados e recobertos com fibronectina apresentaram um aumento na adesão de HOB. A partir disso, concluiu-se que a conformação adotada pela proteína na superfície do biomaterial

possui maior relevância para a bioatividade do que a quantidade adsorvida da mesma (MENDONÇA *et al.*, 2009).

Para uma biomimetização eficiente é preciso ter conhecimento da estrutura primária dos oligopeptídeos que compõem o domínio de ligação das proteínas ao receptor, tal como fibronectina e seu sítio de reconhecimento RGD. Estas sequências lineares ou cíclicas podem gerar especificidade similar com o receptor e afinidade de ligação, tão bem quanto sinalização de resposta celular comparada com a proteína inteira. Alguns estudos mostram uma vantagem importante em se trabalhar com pequenos peptídeos, ao invés da proteína inteira, já que estes poderiam ser expostos de maneira a ficarem mais acessíveis e ativos para ligação com receptores de superfície celular. Por essa razão, a incorporação de peptídeos induziria uma maior adesão celular, espraiamento, formação de contato focal, sendo necessário um número maior de proteínas para promover a mesma resposta. Além disso, uma resposta celular ineficiente pode ocorrer devido à adsorção da proteína em uma orientação tal que o domínio de ligação ao receptor não esteja estericamente disponível. Tem sido demonstrado também que a extensão do espraiamento celular depende da quantidade global de ligantes imobilizados (ex: peptídeos) sobre a superfície do material e, também, da sua habilidade em agrupar-se em microdomínios de ligação. (HUBBELL, 1999).

Calisle *et al.* (2000) realizaram estudos com o objetivo de avaliar a influência de sequências peptídicas imobilizadas em materiais sobre a adesão celular. A imobilização foi feita sobre a superfície polimérica do PLA e do PCL utilizando espaçadores não peptídicos como PEG. Os resultados indicaram que as sequências peptídicas RGD promoveram um aumento significativo da adesão celular sobre as superfícies dos materiais modificados em relação ao material não modificado. Entretanto, apesar da densidade de peptídeos RGD sobre o PCL ser superior em relação ao PLLA, houve uma maior adesão sobre a superfície do PLLA. Este resultado foi atribuído à ineficiência do processo de imobilização sobre o PCL.

Estudos foram realizados por Tesema *et al.* (2004) para avaliar a viabilidade de células ósseas sobre membranas de PHBV imobilizadas com colágeno. O efeito da superfície sobre a proliferação e morfologia das células ósseas cultivadas em superfície de PHBV modificada e não tratadas foram avaliadas por AFM e ângulo de contato. A proliferação celular em superfícies PHBV com colágeno química e fisicamente imobilizado foi comparado com o PHBV não tratado por meio do ensaio com MTT. A atividade das células ósseas sobre as superfícies quimicamente e fisicamente

imobilizadas com colágeno foram determinadas em 246 e 107% para células osteosarcoma (UMR-106) e 68 e 9% para células de osteoblastos (MC 3T3-E1), respectivamente. Estes resultados mostram que o colágeno quimicamente enxertado na superfície PHBV proporcionou uma favorável matriz para a proliferação celular.

Kim *et al.* (2010) realizaram estudos em cultura de células e reparação tecidual utilizando nanofibras poliméricas biodegradáveis produzidas por eletrofiação. Sabe-se que a hidrofobicidade e adesão celular inicial pobre de polímeros sintéticos têm limitado a sua utilização na regeneração de tecidos. Neste trabalho a superfície da nanofibra de poli(ácido lático-co-caprolactona) (PLA-co-PCL) foi modificada com a sequência peptídica que compõem o domínio central de ligação à célula da proteína fibronectina onde a sequência RGD está inserida (FN10). As nanofibras foram primeiramente tratadas com uma solução alcalina para gerar grupos carboxílicos na superfície, proporcionando, assim, o acoplamento da FN10 com em conjunto com um agente de carbodiimida. As nanofibras com peptídeos acoplados mostraram melhorias significativas na adesão celular inicial e espalhamento comparado com o material não tratado. Esta metodologia permitiu adequar o uso de nanofibras poliméricas com biomoléculas alvo envolvidas em respostas teciduais específicas.

3.2.2.1. Peptídeos RGD.

Os peptídeos são formados por aminoácidos ligados entre si via ligação peptídica entre o grupo amino de um aminoácido e o grupo carboxila de outro. Os aminoácidos variam muito quimicamente, mas todos apresentam um grupamento ácido – carboxila e outro básico - amino ambos ligados a um átomo de carbono (carbono α). No carbono α estão ligadas as cadeias laterais dos aminoácidos, que diferem em estrutura, tamanho e carga elétrica, portanto, lhes conferem características distintas influenciando em sua solubilidade e reatividade química. Essas características conferem propriedades próprias à molécula peptídica a qual eles compõem (NELSON e COX, 2006). Os peptídeos são extremamente diversificados em termos funcionais, atuando como hormônios ou fatores liberadores destes, enquanto outros são neuropeptídeos, neurotransmissores, toxinas, antibióticos naturais, adoçantes ou substratos de proteases (MACHADO *et al.*, 2004).

Um número incontável de peptídeos biologicamente ativos foi sintetizado nos últimos anos, sendo a parcela majoritária referente a peptídeos obtidos pelo método de

síntese química, seja em fase sólida ou solução. Estes peptídeos sintéticos permitem mimetizar a ação de proteínas e, além disso, são facilmente sintetizados e manipulados, possuem alta estabilidade e são baratos. Entretanto, estas biomoléculas requerem condições específicas para fornecer alta afinidade e especificidade contra proteínas alvo. Em razão do pequeno peso molecular, os peptídeos não são facilmente acessíveis quando adsorvidos não especificamente sobre suportes sólidos. Além disso, devido à falta de uma estrutura tridimensional bem definida, uma orientação correta destes peptídeos é essencial para promover uma interação mais efetiva. Outra importante questão é a uniformidade da densidade de peptídeos sintéticos, que é essencial para permitir a correlação entre a atividade biológica dos peptídeos e o seu arranjo espacial, favorecendo interações desejáveis e indesejáveis (CRETICH *et.al.*, 2006).

Os biomateriais para Engenharia Tecidual devem possuir uma habilidade bioativa capaz de induzir interações celulares desejáveis, estimulando processos físico-químicos inerentes a sistemas biológicos, integrando o biomaterial com o ambiente fisiológico (ORÉFICE *et al.*, 2006). Estas interações são bastante conhecidas e envolvem processos de reconhecimento biológico mediados por receptores de superfície celular (integrinas) e seus ligantes correspondentes. As integrinas reconhecem as proteínas de adesão da matriz extracelular (MEC) embora estruturalmente diferentes, requerem seqüências de reconhecimento aproximadamente semelhantes para se ligarem (GAO *et al.*, 2007; TANZER, 2006).

Os principais mediadores dos efeitos da MEC sobre as células são as proteínas transmembranares do tipo integrinas. As integrinas são moléculas heterodiméricas transmembranares compostas por duas subunidades de glicoproteínas denominadas α e β , associadas não covalentemente que, quando ativadas, iniciam diversas sinalizações intracelulares, resultando na regulação de propriedades celulares como adesão, migração, proliferação, expressão gênica, morfologia, sobrevivência e diferenciação. A combinação destas duas subunidades determina a especificidade de ligação das integrinas. As seqüências RGD podem ser reconhecidas por diferentes membros da família das integrinas como $\alpha3\beta1$, $\alpha5\beta1$, $\alpha v\beta1$, $\alpha v\beta3$ e $\alpha v\beta5$. Desse modo, diferentes famílias de integrinas são capazes de reconhecer diferentes proteínas da MEC (HERSEL *et al.*, 2003). Entretanto, cada integrina é capaz de reconhecer seu grupo específico de moléculas da MEC indicando que ligações fortes requerem mais do que apenas a seqüência RGD (ALBERTS, 2002).

A fibronectina (FN) é uma glicoproteína multifuncional encontrada na MEC, composta por duas subunidades unidas por pontes dissulfeto, próximas às extremidades C-terminais. Apresenta domínios específicos para ligação com outras proteínas da MEC e mais de doze tipos de sítios de ligação com integrinas (DARRIBERE *et al.*, 2000; ZAGRIS, 2001). No sítio de ligação à célula está presente a seqüência RGD, que possui papel crucial no processo de adesão celular, conforme mostra a Figura 3.4 (HERSEL *et al.*, 2003; MILNER, 2007). A molécula de FN possui ainda em seu domínio C-terminal, duas regiões de ligação à heparina responsáveis pela interação celular através da formação de estruturas de adesão estáveis, incluindo contatos focais (WOODS *et al.*, 2000).

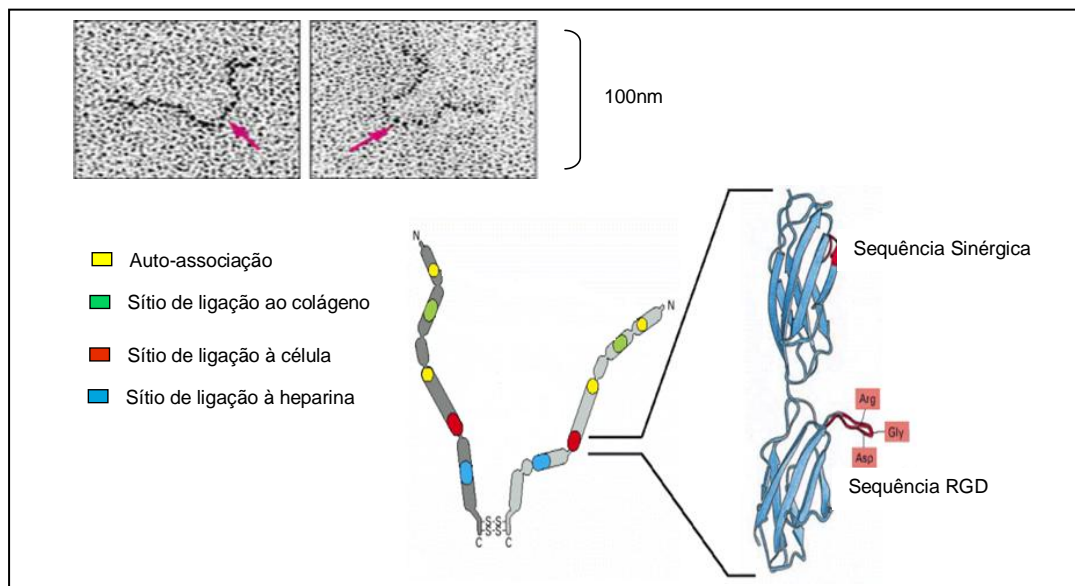


Figura 3.4. Proteína fibronectina e seu sítio de reconhecimento RGD (adaptado de ALBERTS, 2002).

A seqüência RGD foi descoberta por Pierschbacher e Ruoslahti em 1987 e é de longe a mais eficiente das seqüências peptídicas capazes de estimular a adesão celular sobre superfícies sintéticas através de mediadores como as integrinas (HERSEL *et al.*, 2003). Esta seqüência é também conhecida como “sítio universal de reconhecimento celular”. A seletividade das proteínas adesivas em relação às integrinas é bastante diversificada. Este fato pode ser explicado pela existência de múltiplos sítios de ligação e, também, pelas diferentes conformações que a seqüência RGD pode apresentar em razão das diferentes conformações das estruturas protéicas onde está inserida (SILVA *et*

al., 2007). Mesmo sendo uma pequena sequência peptídica, experimentos utilizando RGD sintético demonstram que este peptídeo é capaz de afetar a ligação entre integrina e fibronectina (TAKANO *et al.*, 2002).

Deve-se destacar a constatação descrita por Hersel *et al.* (2003) a respeito do efeito oposto que ligantes, como a sequência RGD, podem ter sobre as células. Os peptídeos podem atuar de forma antagônica promovendo efetivamente a adesão celular e, por conseguinte, a sobrevivência da célula quando imobilizados. No entanto, quando solubilizados, estes ligantes, ao ocuparem os sítios de adesão na membrana celular, impedem que esta se conecte a uma superfície. Desta maneira, sem um contato fixo, as células assumem um formato esférico e entram em apoptose. Por esta razão, justifica-se a importância de se incorporarem peptídeos aos polímeros, de modo que as células os encontrem imobilizados na trama da matriz polimérica por meio de ligações covalentes.

Com relação ao uso de proteínas para biomimetização de materiais, esta estratégia apresenta algumas desvantagens do ponto de vista de aplicações médicas (HERSEL *et al.*, 2003). Esse fato está diretamente relacionado às etapas de isolamento e purificação das proteínas, podendo induzir a resposta imune indesejável aumentando o risco de infecção. Além disso, as proteínas estão sujeitas à degradação proteolítica, que pode ser acelerada por processos inflamatórios. Outro ponto importante está relacionado com a conformação das proteínas, que devem estar orientadas de maneira adequada para favorecer a adesão celular. Dependendo do grupamento presente e acessível na superfície do material, a proteína poderá ou não apresentar afinidade. A textura da superfície do biomaterial determinada pela carga, molhabilidade e topografia pode influenciar na conformação da proteína. Por exemplo, ao serem adsorvidas sobre superfícies hidrofóbicas ocorre uma maximização das interações com os aminoácidos hidrofóbicos das proteínas expondo sítios ativos, que podem gerar um favorecimento da adesão celular ou, até mesmo, a sua desnaturação com conseqüente perda de atividade (ELBERT, 1996). Estes problemas podem ser contornados pela imobilização de pequenos segmentos de reconhecimento celular assim como peptídeos, os quais exibem maior estabilidade frente às condições de esterilização e à degradação enzimática, caracterização mais simples e de menor custo quando comparado com as proteínas adesivas. Devido ao tamanho menor, os peptídeos podem ser empacotados com maior densidade nas superfícies dos biomateriais (HERSEL *et al.*, 2003).

Dentre os vários biomateriais poliméricos mais citados na literatura quanto à funcionalização via imobilização de peptídeos RGD e outras sequências que os contém

encontram-se os poli(α -hidróxi ácidos), representantes de uma classe de poliésteres alifáticos sintéticos, os quais fazem parte o PGA, PLA, PLGA, PCL e seus copolímeros (HERSEL *et al.*, 2003; MARLETTA *et al.*, 2005).

Quirk *et al.* (2001) e Yang *et al.* (2001) realizaram estudos para avaliar a adesão celular gerada através da imobilização do sítio de reconhecimento celular da fibronectina (sequência peptídica RGD) sobre a superfície do PLL fisicamente adsorvido ao PLA (blenda PLA/PLL-RGD) e ao PLGA (PLGA/PLL-RGD). Estes foram avaliados frente à imobilização por adsorção da proteína fibronectina sobre a superfície do PLA e PLGA. Em ambos os trabalhos foi demonstrado que a adsorção física de fibronectina sobre o PLA promoveu uma maior adesão e espriamento celular em relação ao PLA não modificado, sendo proporcional a quantidade de fibronectina imobilizada. Em relação ao peptídeo RGD, os resultados ficaram abaixo do esperado em razão da conformação gerada por pequenas sequências peptídicas e do efeito inibitório do PLL. Entretanto, ficou demonstrado que controlando a razão PLL: RGD houve um efeito positivo e significativo sobre a ligação e espriamento celular. Foi observada uma significativa adesão e espriamento em concentrações abaixo de 2nmol/L e 30nmol/L para o PLA-FN e PLA-PLL-RGD, respectivamente (YANG *et al.*, 2001). Com relação ao PLGA-FN e PLGA-PLL-RGD resultados similares foram obtidos quanto à adesão e espriamento celular. Estes trabalhos não apresentaram resultados conclusivos em razão do conhecido efeito inibitório do PLL sobre a resposta celular.

Ochsenhirt *et al.* (2006) realizaram estudos sobre o efeito da estrutura secundária RGD e da sequência sinérgica PHSRN sobre a adesão celular, espriamento e ligação com integrinas específicas utilizando um espaçador polietilenoglicol (PEG), que age inibindo adesão celular não específica. Foram utilizados como suportes filmes de Langmuir-Blodgett (método de deposição), compostos por longas cadeias carbônicas (C₁₆ e C₁₈), ácido glutâmico e espaçadores (-CH₂-)₂. Este estudo demonstrou que a sequência RGD apresenta enorme influência sobre a adesão e espriamento de células endoteliais de veia umbilical humana. Foi observado claramente que a adesão e o espriamento são dependentes da concentração do peptídeo RGD imobilizado sobre membranas de mica. Esta influência foi comprovada considerando diferentes modos de imobilização do peptídeo RGD, expondo-o de maneira linear e na forma de *loops*. Com a imobilização apenas da sequência sinérgica, não houve aumento considerável sobre a adesão e espriamento celular.

Estudos foram realizados por Karakecili *et al.* (2007) a partir de membranas de quitosana modificadas com sequências de Arginina – Glicina - Ácido aspártico - Serina (RGDS) da proteína fibronectina utilizando o método de imobilização via modificação fotoquímica. Resultados obtidos por FTIR e raios-x mostraram que a imobilização foi realizada com sucesso. A concentração do peptídeo imobilizado foi determinada por teste de ninidrina em torno de 10^{-7} mol /cm². Estudos *in vitro* com células de fibroblastos (L929) foram feitos em meio sem soro e meio com 10% de soro a fim de avaliar o comportamento celular frente à biofuncionalização do material. O comportamento de adesão, espraiamento e proliferação foi mais acentuado na presença do peptídeo RGD em ambiente com soro. Os resultados apontaram uma interação específica entre os peptídeos RGDS e as células de fibroblastos a partir de integrinas específicas.

Dong *et al.* (2010) realizaram estudos sobre a melhoria no crescimento de fibroblastos sobre poliésteres hidrofóbicos PHBV, PHBHHx e PLA. Estes materiais poliméricos foram recobertos com grânulos de polihidroxialcanoatos ligados à proteína PhaP unida ao RGD. A proteína PhaP, que é um proteína anfifílica presente na superfície de grânulos de PHAs *in vivo*, foi conjugada ao peptídeo RGD. O conjugado PhaP-RGD foi obtido por cultivo em *Escherichia coli* DH5α a partir da expressão de seus genes. Foi observado um aumento da hidrofiliabilidade nos filmes recobertos com PhaP conjugada ao RGD em comparação aos filmes sem modificação. Estudos *in vitro* mostraram uma melhor adesão e mais rápida proliferação sobre os três filmes recobertos com PhaP conjugada ao RGD em comparação aos recobertos apenas com a proteína PhaP e aos não modificados. Desse modo, os resultados indicam que o recobrimento por PhaP-RGD promove um maior proliferação celular sobre poliésteres hidrofóbicos para uso em Engenharia Tecidual.

Estudos foram realizados por Wang *et al.* (2011) a partir de filmes PHBV imobilizados com sequências peptídicas RGD através do espacador PEG a fim de melhorar a biocompatibilidade do material. Os filmes foram ativados por tratamento de plasma com amônia para produzir grupamentos amino na superfície do material seguida por reações seqüenciais com PEG e com peptídeos RGD. Os peptídeos RGD foram covalentemente enxertados em filmes de PHBV. O resultado do ensaio de viabilidade celular indica que os filmes RGD-modificado PHBV exibem uma biocompatibilidade celular melhorada em relação aos demais filmes modificados. Esta melhora não foi expressiva em razão da presença do PEG que age dificultando a

adsorção não específica de proteínas e, por consequência, a adesão celular.

3.3. SÍNTESE PEPTÍDICA EM FASE SÓLIDA (SPFS).

A síntese orgânica de peptídeos em fase sólida (SPFS) foi apresentada à sociedade científica por Merrifield (1963) e revolucionou a maneira como era feita a síntese, abandonando a tradicional rotina própria da síntese em solução, e introduziu o uso de polímeros insolúveis como suporte para substratos. O método é atualmente um dos mais utilizados para reproduzir e criar peptídeos e proteínas em laboratórios de uma maneira sintética. A SPFS permite a obtenção de peptídeos naturais pouco abundantes e que são difíceis de serem sintetizados em sistemas biológicos (células, bactérias etc). Além disso, propicia a incorporação de aminoácidos não naturais e *D*-aminoácidos, modificações da cadeia principal e de suas extremidades amino e carboxi-terminais (AMBLARD *et al.*, 2006).

A SPFS apresenta grandes vantagens na construção de cadeias peptídicas sobre suportes sólidos insolúveis, que incluem: o uso de uma série de solventes com diferentes graus de polaridade, os quais exercem um efeito de compactação /descompactação do polímero, favorecendo a expulsão de impurezas do interior da estrutura polimérica, lavagem em menor tempo e a capacidade de suportar condições mais agressivas do que as utilizadas na síntese em solução. Muitas destas operações tornam possível o emprego de excesso de reagente a fim de garantir rendimentos altos e minimizar perdas físicas do peptídeo, uma vez que este se encontra preso ao suporte sólido durante o processo (CHAN, 2000). Mais recentemente, foi introduzida a automação da “rotina” de reação/lavagem pelo uso de robôs e sintetizadores tornando o processo mais econômico e com melhor desempenho (FRANK, 2002).

Neste tipo de síntese linear a preocupação é alcançar rendimentos extremamente altos em cada ciclo de acoplamento, ou seja, na adição de cada aminoácido constituinte da sequência peptídica. Considerando que o rendimento a cada ciclo for de 99%, um peptídeo de 26 resíduos seria sintetizado com 77% de rendimento final (considerando 100% de rendimento em cada desproteção). Contudo, se a cada ciclo o rendimento for de 95%, o mesmo peptídeo seria sintetizado com 25% de rendimento final. Por isso, a fim de alcançar altos rendimentos deve-se empregar um excesso de aminoácido em cada etapa de síntese e, também, escolher métodos muito eficientes de ativação da carboxila e de formação da ligação peptídica, assim como uma escolha apropriada de

grupamentos protetores (MONTALBETTI, 2005; ISIDRO-LLOBET *et al.*, 2009). Atualmente, há duas estratégias mais comumente empregadas para SPFS: a estratégia Boc e a Fmoc. Na estratégia Boc o grupo protetor do grupamento amino é o *t*-butiloxicarbonila (grupamento Boc) e sua remoção é feita em meio ácido, empregando-se normalmente solução de ácido trifluoracético (TFA) em diclorometano (DCM) ou em *N,N*-dimetilformamida (DMF). A outra metodologia envolve o uso de 9-fluorenilmetiloxicarbonila (Fmoc) como protetor do grupo amino, o qual é removido facilmente em meio básico (AMBLARD, 2006; MERRIFIELD, 1963).

Os polímeros utilizados na SPFS possuem ligações cruzadas formando uma rede polimérica, o que lhes confere comportamentos específicos como uma estabilidade química relativamente alta. Essa estrutura complexa é formada por feixes interligados (ligações cruzadas ou do inglês, *cross-linking*) transversalmente através de um monômero bi-funcional. A utilização destes suportes está diretamente relacionada às suas características físicas e químicas. As características físicas como o grau de resistência frente à agitação mecânica, temperatura, pressão e comportamento quando em contato com solventes estão relacionadas à proporção de ligações cruzadas existentes no polímero. Já as características químicas como tipo de grupo funcional aceitável pelo polímero, condições de clivagem, grupo funcional formado após clivagem e outras são determinadas pelo ligante (EIFLER-LIMA, 2001). Características químicas como as condições específicas de clivagem do peptídeo são ditadas por espaçadores incorporados entre a resina e o primeiro aminoácido da sequência peptídica. A presença do espaçador bifuncional confere maior flexibilidade química à síntese, de tal forma que permita modificar a força e a natureza da ligação entre o primeiro aminoácido e a resina, tornando-a mais ou menos susceptível a determinados reagentes. Dessa forma, a resina tem que ser estável a tratamentos repetitivos de desacoplamentos/acoplamentos. Por outro lado, ao final da síntese peptídica, caso seja requerido, a ligação deverá ser passível de clivagem sem danificar o produto de síntese (LLOYD-WILLIAMS *et al.*, 1997).

Os suportes sólidos utilizados na Síntese Peptídica em Fase Sólida devem preencher determinados requisitos essenciais para que a síntese possa ser realizada com sucesso (FIELDS, 1997; LLOYD-WILLIAMS *et.al.*, 1997). Entre essas características salientam-se:

- i. Devem ser insolúveis nos solventes utilizados na síntese;

- ii. Devem possuir regiões definidas, com alta reatividade química denominada de “sítio ativo” ou mais comumente denominadas de “ligantes”;
- iii. Quimicamente inertes a todos os solventes e reagentes usados durante todo o processo de síntese;
- iv. Ausência de interações com a cadeia peptídica;
- v. Facilidade de modificação química, de tal forma que o primeiro aminoácido da sequência a ser sintetizada possa ligar-se eficientemente ao suporte através de ligação covalente;
- vi. Capacidade de “inchar”, adquirindo espaços reticulares adequados para tornar acessíveis os pontos de reação a solventes e reagentes.

Outros suportes poliméricos podem ser utilizados na SPFS e correspondem a membranas celulósicas amino funcionalizadas que fornecem um ligante especialmente suscetível ao ataque de grupos carboxílicos. Estas membranas de celulose estão disponíveis comercialmente para síntese peptídica automatizada ou semi-automatizada (*Spot Synthesis* e *CelluSpot*). A primeira diferença entre estes suportes aplicados a estas duas metodologias é que, alguns deles, são conjugados ao espaçador polietilenoglicol amino funcionalizado e, outros são conjugados a aminoácidos protegidos em seu grupamento amino. Assim, para os suportes ditos “protegidos” uma etapa de desproteção é necessária antes do procedimento de SPFS. O PEG confere ao suporte um caráter mais hidrofílico o que resulta em menores sinais inespecíficos e de fundo causados por interações hidrofóbicas. Além disso, a segunda diferença dos suportes utilizados na síntese peptídica por *Spot Synthesis* e *CelluSpot* é a utilização de membranas de celulose estáveis em condições ácidas e instáveis nas mesmas condições, respectivamente.

3.3.1. *Spot Synthesis*

Em 1990, Ronald Frank, desenvolveu a metodologia de Síntese Peptídica em Fase Sólida (SPFS), também conhecida como *Spot Synthesis* (FRANK, 1992) a partir da metodologia desenvolvida por Merrifield em 1963. Esta técnica envolve a síntese de peptídeos em membranas de celulose permitindo a triagem de uma grande quantidade de peptídeos sintéticos em suportes poliméricos de forma paralela e simultânea

utilizando um equipamento automatizado ou semi-automático denominado *AutoSpot* como mostra a Figura 3.5.



Figura 3.5. Equipamento semi-automático, *AutoSpot*.

(http://www.intavis.com/en/Automated_Peptide_Synthesis/Autospot/index.php)

O princípio básico da técnica envolve a geração de spots que se formam quando uma gota é dispensada sobre o suporte polimérico plano. Estes *spots* correspondem a pontos delimitados de reação peptídica a partir da distribuição automatizada de reagentes específicos, obtendo múltiplos *spots* perfeitamente organizados. O tamanho dos *spots* é definido principalmente pelo volume do solvente dispensado, pela capacidade de absorção do suporte e pela tensão superficial de tanto da membrana quanto do solvente (KATZ *et al.*, 2011). Estes parâmetros também definem o número de *spots* possíveis por área (GAUSEPOHL, 2002; FRANK, 2002; FRANK *et al.*, 1996; MERRIFIELD, 1963). O diâmetro típico do *spot* corresponde de 2-3 mm aproximadamente (KATZ *et al.*, 2011).

Há vários estudos questionando a pureza da síntese peptídica via *Spot Synthesis*, variando de 50-92%. A razão, ainda não conclusiva, seria dependente da sequência peptídica sintetizada, hidrofobicidade, comprimento e conformação do peptídeo. Portanto, o nível de pureza não pode ser previsto. A regra aplicada nesta metodologia é o uso de peptídeos relativamente curtos, com até 15 resíduos de aminoácidos (KATZ *et al.*, 2011).

Esta metodologia atualmente apresenta uma gama de aplicações envolvendo interações moleculares que vão desde pequenos componentes orgânicos como DNA, proteínas e peptídeos (REINEKE *et al.*, 2001; MRKSICH, 2004; KATZ *et al.*, 2011) e principalmente a identificação de epítopos lineares e conformacionais. Além de detectar

e caracterizar interações biológicas do tipo ligação enzima-substrato, interações proteína-proteína, interações de receptor-ligante, e outros (KATZ *et al.*, 2011).

Também conhecidos como determinantes antigênicos, os epítomos são porções do antígeno que reúnem aspectos físicos e químicos que favorecem o reconhecimento por regiões específicas dos anticorpos. Epítomos lineares são aqueles formados por resíduos dispostos sequencialmente de maneira linear num antígeno protéico. Não são afetados por nenhum tratamento que altere a estrutura tridimensional da substância. Já os epítomos conformacionais são aqueles formados pelas estruturas secundária, terciária ou quaternária de uma proteína. Eles perdem suas funções de epítomos quando se desnaturam. Estes epítomos, tanto conformacionais quanto lineares são mostrados na Figura 3.6 (STITES *et al.*, 2000).

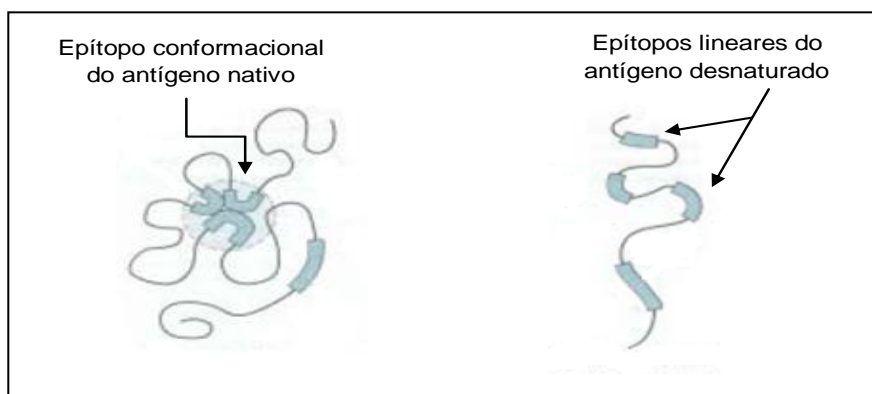


Figura 3.6. Epítomos conformacionais e lineares (adaptado de STITES *et al.*, 2000).

A técnica de *Spot Synthesis* é o método de síntese de peptídeos realizado sequencialmente e diretamente sobre um suporte sólido. Este método é mais adequado para a investigação de múltiplas sequências peptídicas e por isso é atualmente o mais aplicado para este fim (KATZ *et al.*, 2011). Esta técnica apresenta diversas vantagens e desvantagens. As vantagens são numerosas: é rápida, permite uma simplicidade na purificação dos seus produtos, fácil execução, flexível em relação às condições reacionais empregadas, alto rendimento, alta pureza, entre outros. Entretanto, as desvantagens também existem devido ao número limitado de resíduos de aminoácidos para que a síntese peptídica transcorra com o máximo de rendimento, exige um alto investimento inicial em razão da automatização. Assim, sugere-se para uma maior eficiência que até 15 resíduos de aminoácido sejam utilizados no procedimento de síntese (FRANK, 2002; KATZ *et al.*, 2011).

A síntese de peptídeos automatizada ou semi-automatizada, *Spot Synthesis*, é efetuada sobre uma fase sólida por meio de uma estratégia linear. O crescimento da cadeia é iniciado com a fixação de um grupamento químico do primeiro resíduo de aminoácido dito derivatizado, protegido em seu grupamento amino e em sua cadeia lateral, na extremidade reativa do suporte polimérico (chamada de “ligante”, *linker*). Este aminoácido ligado expõe sua porção amino terminal e, por passos repetitivos de desproteção do grupo α -amino e acoplamento do aminoácido derivatizado seguinte α -protegido, tem-se a formação da ligação peptídica. A Figura 3.7 mostra um esquema simplificado da metodologia de *Spot Synthesis* (LLOYD-WILLIANS *et al.*, 1997; KATZ *et al.*, 2011).

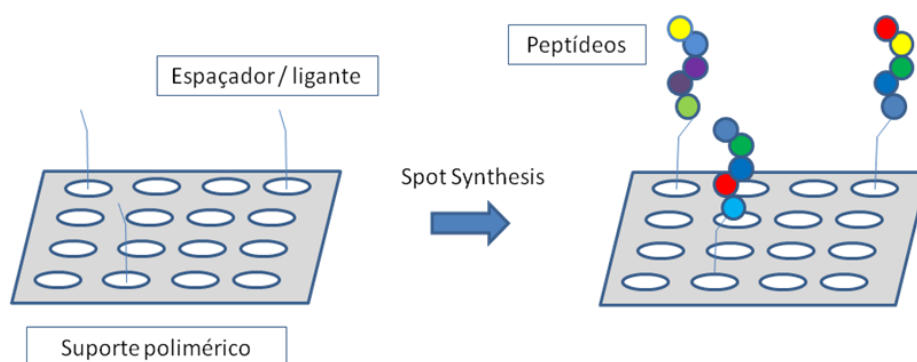


Figura 3.7. Síntese peptídica linear – *Spot Synthesis* - efetuada a partir da ligação do primeiro aminoácido da sequência à extremidade reativa do suporte polimérico (ligante). Os aminoácidos estão representados por esferas coloridas.

O método de *Spot Synthesis* consiste em aplicar pequenas gotas de um aminoácido ativado a partir de reagentes de acoplamento formando derivados de éster em um arranjo pré-definido automaticamente sobre uma superfície celulósica planar. A técnica emprega a estratégia Fmoc, ou seja, a síntese é realizada a partir do grupo de proteção Fmoc em seus aminoácidos amino protegidos. Outros grupos de proteção também estão presentes nos resíduos de aminoácidos trifuncionais e agem na proteção das cadeias laterais passíveis de sofrer reações indesejadas. Os grupos de proteção garantem a eficiência da síntese peptídica assegurando que a cada etapa somente um aminoácido é adicionado a sequência peptídica crescente (GAUSEPOHL, 2002; FRANK, 2002; FRANK *et al.*, 1996; MERRIFIELD, 1963).

Resumidamente, a técnica baseia-se em: (i) ligação do primeiro aminoácido que compõe a sequência peptídica ao suporte polimérico; (ii) desproteção deste aminoácido

protegido pelo grupo Fmoc para dar sequência a síntese peptídica; (iii) ativação do segundo aminoácido definido pela sequência em seu grupamento carboxila gerando um derivado de éster; (iv) reação de acoplamento entre a cadeia peptídica crescente e o aminoácido seguinte. O grupo Fmoc é um grupamento de proteção temporário que protege o aminoácido em seu amino terminal evitando a síntese de sequência indesejadas. Já os diferentes grupos de proteção da cadeia lateral dos aminoácidos são permanentes, só sendo removido ao final da síntese completada do peptídeo de interesse. Assim, a síntese transcorre do último C-terminal (grupo carboxila) para o primeiro N-terminal (grupo amino) da sequência, reagindo o grupo amino livre do último aminoácido já incorporado à cadeia com o grupo carboxila do aminoácido que vai ser incorporado formando uma ligação peptídica. A Figura 3.8 mostra em detalhes o princípio da técnica de *Spot Synthesis*. (GAUSEPOHL, 2002; FRANK, 2002; FRANK *et al.*, 1996; MERRIFIELD, 1963).

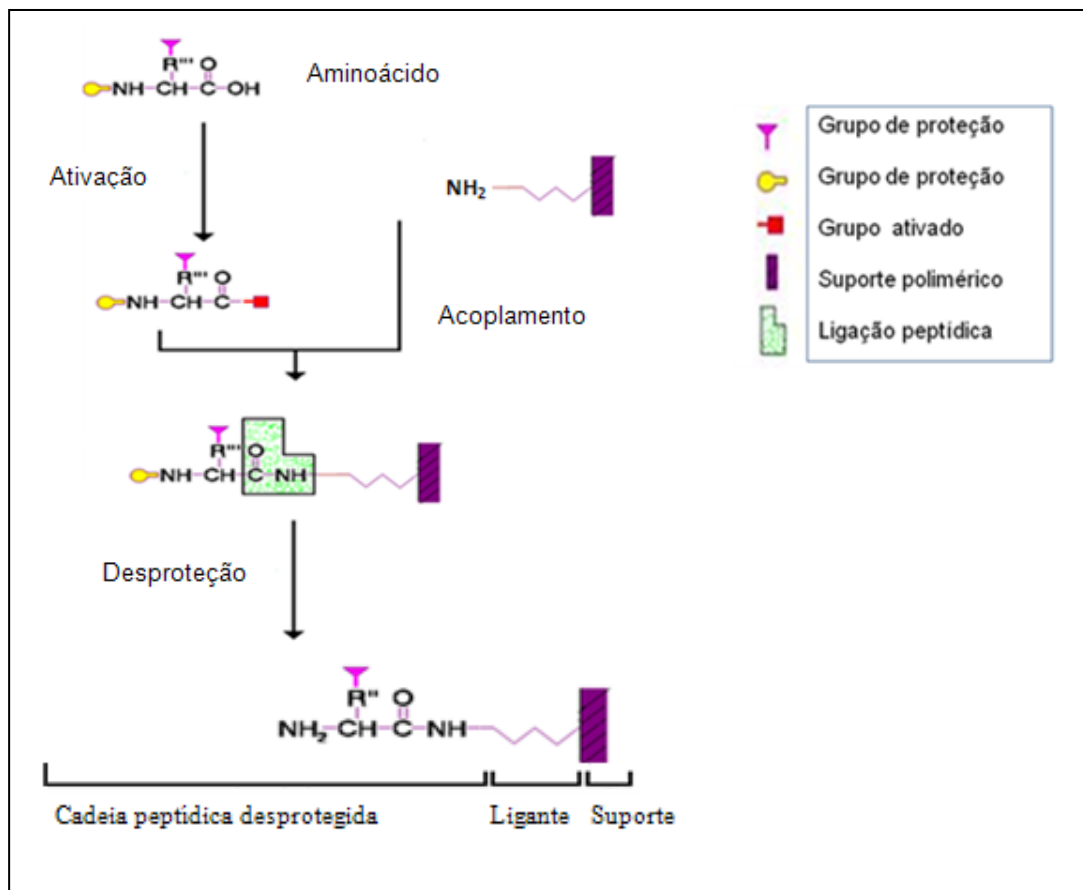


Figura 3.8. Princípio da Técnica de *Spot Synthesis* (adaptado de <http://www.biotech.uiuc.edu/centers/Proteomics/Proteinscience/spps.htm>)

As ligações amida não se formam por simples contato dos grupos carboxila e amino à temperatura ambiente. Por outro lado, o uso de condições drásticas para promover a reação, como altas temperaturas ou pHs extremos, é em regra incompatível com a integridade dos peptídeos. No sentido de promover a reação entre o próximo aminoácido da sequência à cadeia peptídica crescente, é necessário ativar previamente o grupo carboxila livre, através de agentes de condensação. Estes agentes aumentam a velocidade de reação e levam à supressão ou minimização de reações laterais (LLOYD-WILLIAMS *et al.*, 1997).

3.3.2. *CelluSpot*

A técnica de *CelluSpot* corresponde a um ferramenta bastante eficiente de investigação baseada na síntese de peptídeos em fase sólida automatizada e semi-automatizada. Esta metodologia corresponde a um micro-arranjo em razão do uso de uma menor área de apoio somado a um maior número de *spots*/área em contrapartida, o *Spot Synthesis* utiliza suportes maiores com um menor número de *spots*/área. Esta síntese peptídica é realizada usando a química de proteção Fmoc, a mesma aplicada ao método de *Spot Synthesis*. Este micro-arranjo possibilita usar uma área menor de suporte com um maior número de *spots*, diferentemente do macro-arranjo (*Spot Synthesis*) que suporta uma área maior e um menor número de *spots*. Portanto, esta metodologia possibilita a miniaturização do método de *Spot* utilizando na imobilização do peptídeo, previamente sintetizado, e lâminas de microscopia recobertas com finas membranas não celulósicas. A grande vantagem desta metodologia está na sua capacidade de realizar rápidos experimentos de triagem em paralelo, que incluem: identificação de epítopos imunodominantes, identificação de domínios de ligação de proteínas, interações de receptor-ligante, ensaios de enzima-substrato a partir de pequenos volumes de material como soros, lisados celulares e outros (KATZ *et al.*, 2011).

Alguns aspectos importantes relacionados ao uso de micro-arranjos em relação a macro-arranjos: a miniaturização possibilita reduzir o volume de proteínas e anticorpos, que são caros e às vezes difíceis de produzir, proporciona uma maior densidade de sequência peptídicas imobilizadas variando de 20 *spots/cm*² para 200 *spots/cm*². Uma síntese típica em macro-arranjo (*Spot Synthesis*) gera peptídeos na faixa de 10⁻¹² mol/*spot* (pmol/*spot*) já em micro-arranjo espera-se em torno de 10⁻⁹ mol (nmol). Esta

densidade de peptídeos por *spot* é vantajosa para a identificação de interações com relativa baixa afinidade de ligação (BLACKWELL, 2006; KATZ *et al.*, 2011). As principais características que envolvem as metodologias de *Spot Synthesis* e *CelluSpot* são mostradas na Tabela 3.1 abaixo.

Tabela 3.1. Importantes características dos métodos de SPFS, *Spot Synthesis* e *CelluSpot*.

SPOT SYNTHESIS	CELLUSPOT
Síntese de peptídeos	Síntese e Imobilização de peptídeos
Síntese sobre membrana celulósica insolúvel	Síntese sobre membrana celulósica solúvel e imobilização sobre membrana não-celulósica
Imobilização via ligação covalente	Imobilização via interação eletrostática
Picomol / <i>spot</i>	Nanomol / <i>spot</i>
Mapeamento de epítopos lineares e conformacionais; detectar interações biológicas do tipo proteína-proteína; enzima - substratos etc.	Identificação de epítopo imunodominante; Identificação de domínios de ligação de proteínas; ensaios com enzimas e substratos etc.

O método de *Spot Synthesis* assemelha-se bastante ao método de *CelluSpot* em razão da síntese peptídica ocorrer utilizando o mesmo sintetizador sobre uma membrana de celulose, neste caso não solúvel, acrescida do espaçador Polietilenoglicol (PEG) (Amino-PEG₅₀₀ – UC540). Nesse método, ocorre apenas a imobilização covalente dos peptídeos sintetizados sobre o suporte polimérico seguido pela desproteção da cadeia lateral dos aminoácidos, etapas comuns aos dois métodos.

A síntese peptídica via *CelluSpot* é realizada em membranas celulósicas solúveis em meio ácido, obtendo como produto final um conjugado de celulose-peptídeos. Este concentrado de celulose-peptídeos é ressuspenso em solventes adequados e distribuído sobre a superfície de membranas específicas para fins de imobilização através do equipamento de *Slide Spotting Robot*. Por fim, tem-se a evaporação do solvente e, com isso, uma camada tridimensional de peptídeos insolúveis é disposta na

superfície da membrana. Esta membrana de *CelluSpot* (não-celulósica) está fixada sobre uma lâmina de vidro de microscópio conferindo perfeita sustentação. Este conjugado sintetizado e imobilizado via método de *CelluSpot* confere um arranjo tridimensional com alta acessibilidade peptídica, conforme mostrado na Figura 3.9. A distância entre os *spots* é de aproximadamente 1,2mm e um diâmetro aproximado de 0,7 -1 mm (KATZ *et al.*, 2011).

Conjugados peptídeo-celulose

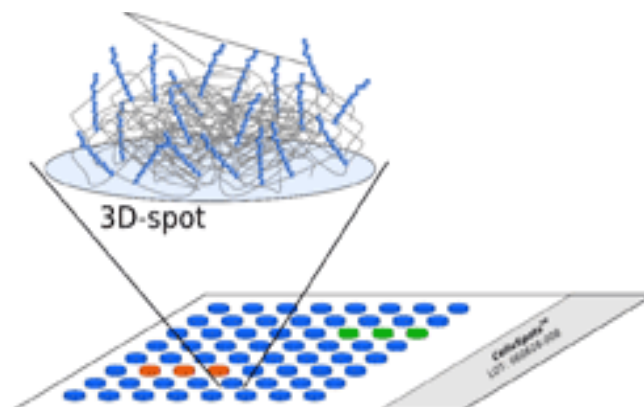


Figura 3.9. Arranjo peptídico tridimensional gerado por *Celluspot*.

(Adaptado de www.intavispeptides.com)

Neste arranjo de imobilização em lâminas os campos são delimitados por um corante vermelho. A Figura 3.10 mostra claramente essa disposição depois de submetido à detecção. Este método, assim como o método de *Spot Synthesis*, é passível de diferentes modos de detecção como: autorradiografia, quimioluminescência, substratos cromogênicos e fluorescentes. Sendo os dois tipos mais comuns de enzimas conjugadas a anticorpos utilizadas para a detecção a fosfatase alcalina (AP) e a peroxidase (HRP). Estas enzimas se aplicam também ao método de *Spot Synthesis*. O método de detecção mais comum de avaliar a intensidade de sinal é por quimioluminescência, pois é mais barato, rápido e altamente sensível. A desvantagem na detecção com anticorpos está relacionada ao procedimento que envolve inúmeros passos de lavagens, ligações inespecíficas, reações cruzadas e outros (HURST *et al.*, 2009; KATZ *et al.*, 2011).



Incubação com anticorpo primário



Adição do anticorpo secundário conjugado com enzima



Detecção do sinal de quimioluminescência

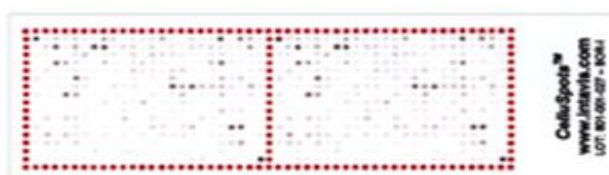


Figura 3.10. Representação do suporte de *CelluSpot* aderido a um lâmina de vidro após imobilização e detecção do peptídeo com uma distribuição em 2 campos/384 spots (Adaptado de www.intavispeptides.com).

Estas membranas celulósicas utilizadas como suporte para síntese em macro-escala são geralmente funcionalizadas com grupamentos amino, na forma de aminas ou aminoácidos. O padrão de modificação é realizado com o aminoácido glicina ou beta-alanina. A ligação deste grupo à celulose ocorre através de uma ligação éster ou éter, sendo a ligação éster bastante aplicada na geração de peptídeos para fins de ensaio em solução. Diferentemente da ligação éter, por ser uma ligação de maior estabilidade química. A síntese de peptídeos em fase sólida em macro-arranjo, bem como em micro-arranjo, proporciona um rendimento significativo de síntese em termos de qualidade e quantidade peptídica. Além disso, a síntese química de peptídeos também oferece a introdução de aminoácidos não naturais e outros blocos de construção (KATZ *et al.*, 2011).

CAPÍTULO IV – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.MATERIAIS

Foi utilizado na produção dos filmes de poli (hidroxibutirato-co-valerato) – PHBV o poliéster de origem microbiana, PHBV, em pó - lote 109 - Biocycle 2000TM fornecido pela PHB Industrial S/A, sendo que algumas de suas propriedades e características encontram-se na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Propriedades e características do PHBV fornecido pela PHB Industrial S/A. Estes dados foram fornecidos pelo fabricante.

PROPRIEDADES / CARACTERÍSTICAS	VALORES
Massa molar ponderal média	394.980 g/ mol
Pureza	99,90%
Teor nominal de valerato	4%
Temperatura de fusão cristalina T _m	173,5°C
Grau de cristalinidade	53,8%
Cor	Âmbar-branco

O solvente clorofórmio utilizado na produção dos filmes de PHBV foi comprado da Vetec Química Fina Ltda, com grau de pureza P.A. Para modificação dos filmes de PHBV foram necessários os reagentes Etilenodiamina - VETEC, com grau de pureza P.A, Tripolifosfato de sódio – Sigma Aldrich (grau de pureza $\geq 98\%$) e o ácido acético – VETEC.

Para realizar a etapa de síntese do peptídeo RGD via método de *CelluSpot* foram utilizados os seguintes reagentes, com seus respectivos fabricantes: os resíduos de aminoácidos que compõem o peptídeo RGD (Arginina – glicina – Ácido Aspártico) - Sigma Aldrich, os reagentes de ativação dos aminoácidos 1-Hidroxibenzotriazol (HOBt) - Novabiochem e Diisopropilcarbodiimida (DIC) - Fluka (98,0%), solvente de lavagem Dimetilformamida (DMF) - Quimex, membrana de Spot Synthesis solúvel - Intavis Bioanalytical Instruments, solvente de solubilização dos aminoácidos N-metil-pirrolidona (NMP) - Merck, Anidrido acético - Merck, 3-metil-piperidina - Acros Organics (99,0%) e Etanol Absoluto - Quimex. Para a etapa de desproteção da cadeia lateral das sequência peptídicas e solubilização da membrana de CelluSpot foram utilizados os seguintes reagentes: Ácido trifluoracético (TFA) - Fluka, Triisopropilsilano (TIPS) - Fluka, Diclorometano (DCM) - Merck, Ácido

trifluormetanosulfônico (TFMSA) - Fluka, Tert-butil-metiléter - Sigma e Dimetilsulfóxido (DMSO) - Fluka.

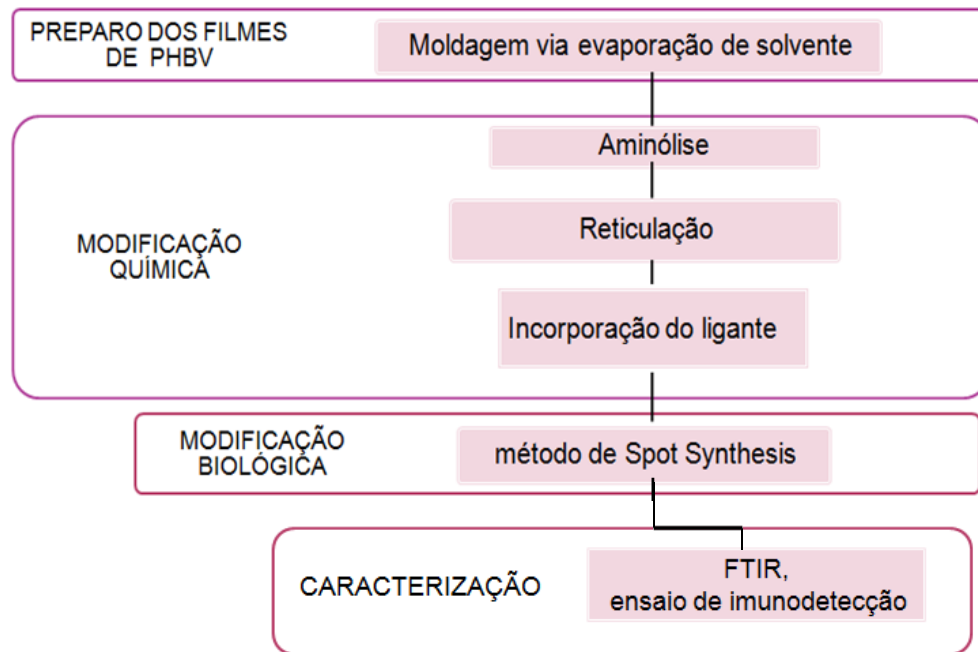
No ensaio com ninidrina para quantificação dos peptídeos RGD sintetizados via *CelluSpot* foram utilizados os seguintes reagentes: Fenol - Sigma (99%) , resina Amberlite (IR-400: IR 120), Piridina - Sigma Aldrich (99,9%), Cianeto de potássio - Merck e Ninidrina - Baker Analyzed. Além disso, foram utilizados para o preparo das soluções padrão de peptídeo RGD os peptídeos previamente sintetizados via método de síntese em fase sólida, estratégia Fmoc utilizando um sintetizador automático modelo PSSM-8 (Shimadzu). Na síntese do peptídeo padrão foram utilizados os reagentes: Fmoc-Arg (PMC) - Resina Wang, Fmoc-arginina-OH - Sigma Aldrich, Fmoc-glicina-OH - Sigma Aldrich, Fmoc-ácido aspártico-OH - Sigma Aldrich, N-metil-morfolina - Sigma, PyBOP - Novabiochem, Etanoditiol - Aldrich, Água ultra purificada, Éter dietílico - Merck e outros reagentes já citados. O solução padrão do peptídeo foi solubilizada na proporção de 1:1 em DMSO : tampão SSC (cloreto de sódio - Sigma 3M, Citrato de sódio hidratado - Sigma 0,3 M em pH 7,0).

No ensaio de Imunodeteção foram preparadas várias soluções, como: tampão Tris-salina (TBS) - pH 7,5 (Tris base 0,05 M - Sigma 99,9%, cloreto de sódio 0,15 M - Sigma) , tampão T-TBS (TBS + 0,05% de detergente Tween 20 - Sigma), tampão CBS em pH 7,0 (cloreto de sódio 0,15 M - Sigma, cloreto de potássio 3 mM - Baker analyzed, ácido cítrico monohidratado 0,05 M - Sigma) e a solução de bloqueio MBS (tampão T-TBS + 3% de caseína - leite desnatado da Molicco). Além disso, foram utilizados anticorpos anti-imunoglobulina humana conjugados a enzima fosfatase alcalina - Pierce e o substrato quimioluminescente para fosfatase alcalina (CPD-Star ® Substrate - 0.25 mM com Nitroblock - IITM).

4.2.MÉTODOS

A Figura 4.1 mostra toda a metodologia aplicada no desenvolvimento deste trabalho. Inicialmente, foi empregado o método de *Spot Synthesis* para fins de biofuncionalização e, em uma segunda etapa, foi realizada a imobilização peptídica por método de *CelluSpot*.

► PARTE I: Imobilização de Peptídeos RGD via método de *Spot Synthesis*.



► PARTE II: Imobilização de Peptídeos RGD via método de *CelluSpot*.

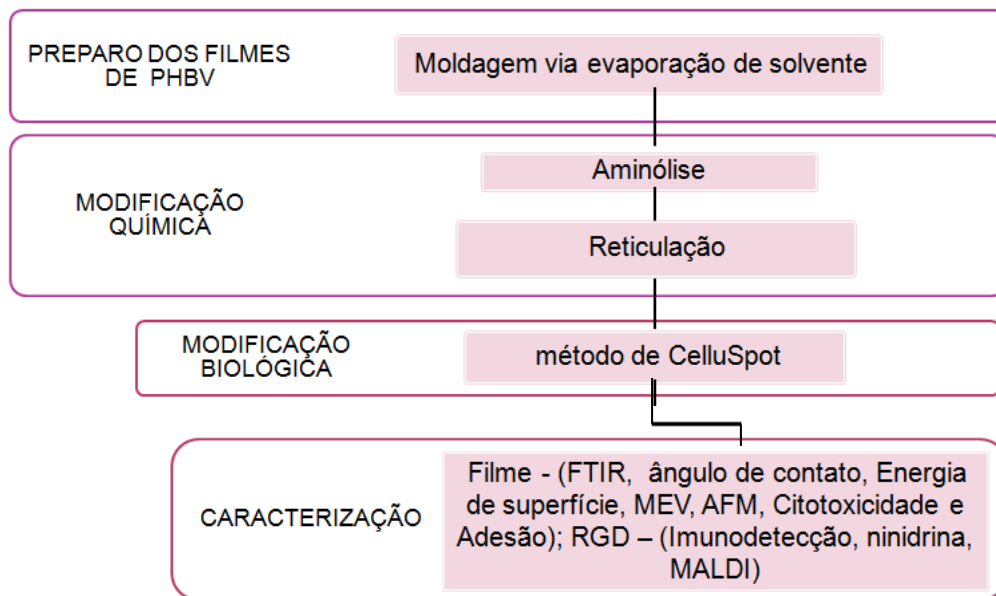


Figura 4.1. Quadro esquemático apresentando as diferentes técnicas utilizadas no desenvolvimento deste trabalho.

4.2.1. Produção dos Filmes de PHBV

Para o preparo da solução de PHBV 7% (p/v) foi utilizado um balão de vidro onde ocorreu a solubilização do poli(hidroxibutirato-co-valerato) em clorofórmio acoplado um sistema de refluxo, segundo procedimento já descrito pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Biopolímeros do PEMM/COPPE. Durante o preparo da solução há inicialmente o inchamento polimérico alcançado pela agitação magnética constante da solução a temperatura ambiente por 2 horas. Em seguida, ocorre a solubilização em razão do aquecimento do sistema a 65°C, sob agitação constante por 2 horas. Ao final, a solução resultante de PHBV em clorofórmio foi submetida à filtração a vácuo.

Para a confecção dos filmes a solução do polímero foi adicionada a moldes de vidro com 13,5 cm de diâmetro (placas de petri grandes). Os moldes contendo a solução de PHBV perfeitamente homogênea foi deixado na capela por 2 dias para a completa evaporação do solvente clorofórmio, sendo colocados sobre suportes de apoio perfeitamente nivelados.

A determinação da concentração da solução de PHBV foi realizada a partir da análise de peso seco. Neste procedimento foram utilizados três recipientes metálicos secos, previamente pesados. A cada um dos recipientes foram adicionados 1 mL da solução de PHBV em clorofórmio filtrada de concentração desconhecida. Após a evaporação por 24 horas a temperatura ambiente, os recipientes foram deixados evaporando na estufa a 105°C e as mudanças de peso do conjunto (recipiente + solução de PHBV) foram registradas a cada 2 horas, até que não houvesse variações de peso. Por fim, a concentração da solução foi determinada em g/mL, seguida pela conversão para % (p/v) utilizando a Equação 1.

Equação 1:

$$C_{(\%p/v)} = \frac{(M_f - M_0) \times 100}{V}$$

Onde, C(% p/v) é a concentração final da solução; M_f é a massa do conjunto (recipiente + solução de PHBV); M_0 é a massa do recipiente vazio e V é o volume da solução de PHBV.

4.2.2. Derivatização dos filmes de PHBV

Para criar grupos ativos na superfície dos filmes de PHBV que permitam a imobilização de peptídeos contendo a sequência RGD, os materiais foram amino-funcionalizados por aminólise segundo o procedimento já utilizado pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Biopolímeros do PEMM/COPPE (MENDONÇA *et al.*, 2009), seguido pela reticulação com tripolifosfato de sódio, técnica descrita por Oliveira e Fatibello-Filho, 2009. Sabe-se que estas moléculas irão influenciar as propriedades de superfície do biomaterial, influenciando diretamente a adesão celular (YANG, 2002).

4.2.2.1. Modificação por aminólise com Etilenodiamina

Os ésteres sofrem reação de adição-eliminação nucleofílica nos átomos de carbono acílico quando são tratados com amônia ou com aminas primárias ou secundárias (SOLOMONS e FRYHLE, 2002). Visando a modificação dos filmes de PHBV, por meio da geração de grupamentos amino e hidroxilas favoráveis a imobilização, foi realizada a aminólise. A Figura 4.2 mostra o esquema de modificação por aminólise dos filmes de PHBV 7% (p/v).

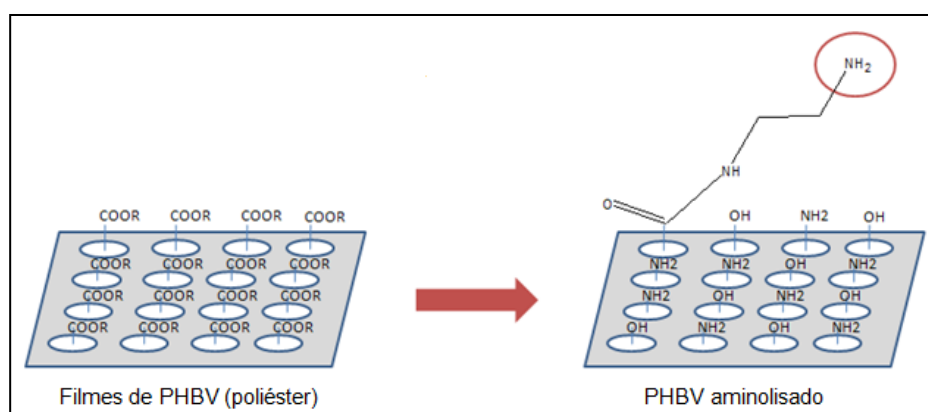


Figura 4.2. Esquema de Aminólise com etilenodiamina em filme de PHBV.

Primeiramente, os filmes de PHBV foram imersos em solução aquosa de etilenodiamina 0,1 N por 90 e 120 minutos a 50°C. Após o tratamento, os filmes foram lavados com água destilada a temperatura ambiente e, em seguida, foram imersos em água destilada gelada, por 24 horas, para remover o excesso de etilenodiamina (MENDONÇA *et al.*, 2009). Ao final, os filmes foram secos e acondicionados em

dessecador. Os filmes modificados foram denominados de PHBV-A90 e PHBV-A120, em função do tempo de aminólise.

4.2.2.2. Modificação por reticulação com Tripolifosfato de sódio

Os filmes de PHBV aminolisados apresentam grupos aminos e grupamentos hidroxilas livres que podem ser modificados com agentes reticulantes, como o tripolifosfato de sódio. O TPP induz a uma reticulação iônica entre os íons tripolifosfato (TFP) e os grupamentos aminos protonados do PHBV (OLIVEIRA e FATIBELLO-FILHO, 2009). A Figura 4.3 mostra o esquema proposto para o filme de PHBV aminolisado e reticulado com base no esquema descrito por Oliveira e Fatibello-Filho (2009).

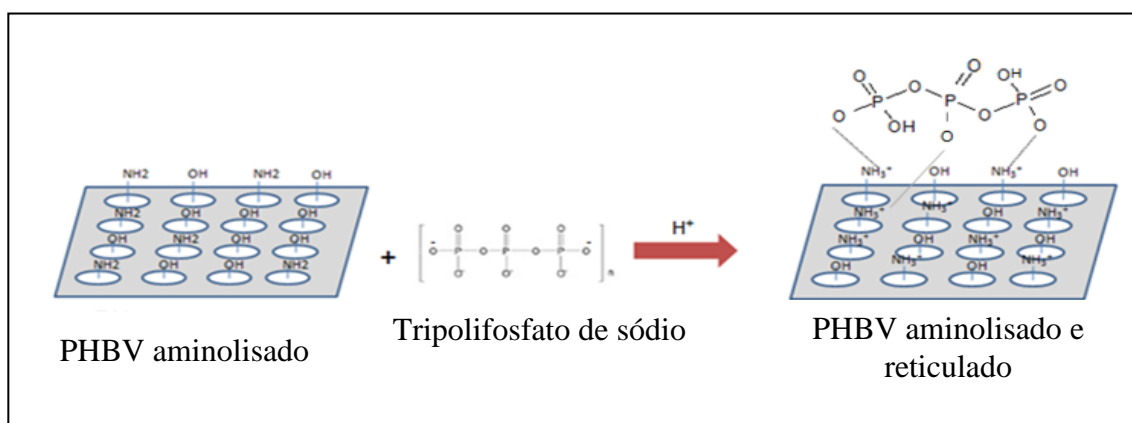


Figura 4.3. Esquema de reticulação com TPP em filme de PHBV aminolisado.

Primeiramente, os filmes de PHBV foram imersos em solução aquosa de ácido acético a 5% (v/v) contendo tripolifosfato de sódio a 2% (m/v) por 30, 60, 90 e 120 minutos sob agitação. Após o tratamento, os filmes foram lavados com água destilada a temperatura ambiente para remover o excesso de tripolifosfato residual. Posteriormente, os filmes foram secos e acondicionados em dessecador (OLIVEIRA e FATIBELLO-FILHO, 2009). Os filmes reticulados foram denominados por PHBV-R30, PHBV-R60, PHBV-R90 e PHBV-R120, em função do tempo de reticulação.

4.2.2.3. Imobilização do ligante Beta-alanina

Esta metodologia de derivatização de suportes foi realizada de acordo com a técnica previamente descrita por Frank e Overwin (1996). A metodologia de derivatização é baseada na modificação química de grupos funcionais de polímeros já existentes comprovando que métodos alternativos de obtenção de suportes amina-funcionalizados podem ser associados ao método de *Spot Synthesis*.

A modificação dos filmes aminolisados e reticulados ocorreram nos grupamentos hidroxila do suporte (terminais de cadeia e grupamentos hidroxilas introduzidos pela reação de aminólise) que irá promover o acoplamento com o primeiro aminoácido que compõe a sequência peptídica por meio de uma ligação éster. Este aminoácido oferecerá seu grupamento amina como sítio de reação para a síntese peptídica. Assim, novos sítios específicos estarão disponíveis para uma maior imobilização de peptídeos sobre a superfície dos filmes de PHBV (FRANK e OVERWIN, 1996). A Figura 4.4 mostra o esquema proposto para o filme de PHBV aminolisado e reticulado após a adição do ligante beta-alanina.

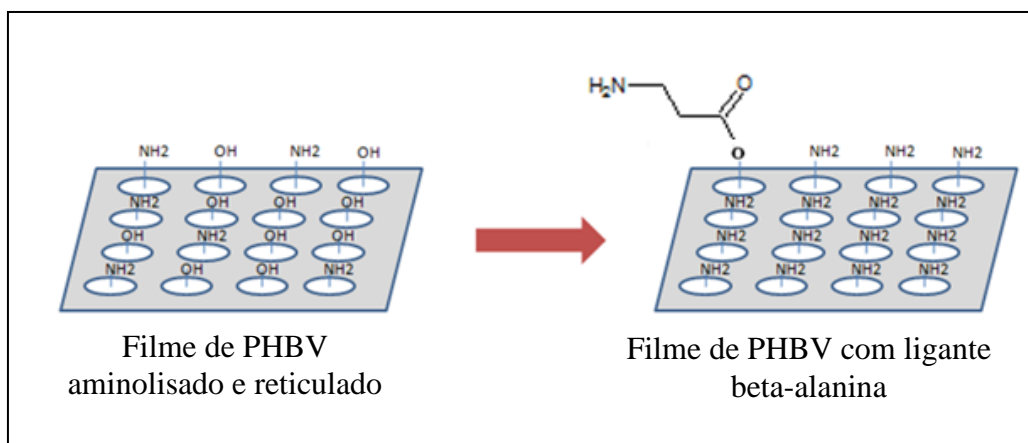


Figura 4.4. Esquema de imobilização do ligante beta-alanina.

Primeiramente, os filmes de PHBV aminolisados e reticulados foram mantidos em um dessecador por 16 horas. Em seguida, os filmes foram imersos por 3 horas em uma solução contendo 0,24 M de diisopropilcarboimida, 0,2 M de Fmoc-beta-alanina e 0,3M de N-metil-imidazol em NMP seco. Após o tratamento, os filmes foram submetidos a lavagens com solvente DMF, solução de piperidina 20% em DMF e etanol absoluto.

Posteriormente, os filmes foram secos e acondicionados em dessecador por 16 horas e mantidos a 10°C.

4.2.3. Imobilização dos filmes de PHBV com peptídeos contendo RGD por *Spot Synthesis*

Os filmes de PHBV foram recortados para sua utilização como suporte para a síntese múltipla dos peptídeos em substituição às membranas de celulose de alta estabilidade da *Intavis*. A síntese peptídica transcorreu sobre o material mediante a técnica Fmoc utilizando um sintetizador semi-automático *Auto Spot*, modelo ASP222 (*Intavis AG – Bioanalytical Instruments*, Koeln, Alemanha) conforme descrito por Frank (2002). O plano de distribuição dos aminoácidos foi definido utilizando o *software Multipeps*. Os peptídeos foram sintetizados sobre toda área do filme de PHBV delimitada pelos 384 spots (pontos específicos de imobilização). A reação de acoplamento dos aminoácidos com a superfície foi realizada por duas vezes a cada ciclo de síntese, sendo utilizados HOBt e DIC como agentes de acoplamento e de ativação dos aminoácidos. Este procedimento se repetiu até que todos os aminoácidos tenham sido adicionados a sequência peptídica crescente.

Ao realizar uma imobilização peptídica por *Spot Synthesis* devem-se considerar algumas características dos peptídeos sintéticos, como a falta frequente de uma estrutura tridimensional bem definida aos peptídeos. Assim, é essencial promover uma orientação correta a fim de proporcionar uma interação deles com a molécula alvo (CRETICH *et al.*, 2006). Por essa razão, a síntese do peptídeo R-G-D (Arginina – Glicina – Ácido Aspártico) foi acrescida de um espaçador peptídico formado por quatro resíduos de glicina (G) visando expor este sítio ativo de modo a favorecer o reconhecimento celular. O resíduo de glicina (G) foi escolhido por apresentar maior mobilidade espacial em razão da presença de hidrogênios ligados ao carbono α , que corresponde à cadeia lateral do aminoácido. Assim, foi definida a síntese do peptídeo GGGGRGD via *Spot Synthesis* favorecido estericamente conforme mostrado na Figura 4.5.



Figura 4.5. Esquema geral da sequência peptídica sintetizada: suporte polimérico (círculo) - espaçador (4G) – peptídeo (RGD).

4.2.4. Imobilização dos filmes PHBV com peptídeos contendo RGD via *CelluSpot*

Para fins de modificação biológica da superfície dos filmes de PHBV aminolisados e reticulados foi definida uma metodologia inovadora que possibilita a imobilização de peptídeos sob uma distribuição determinada – método de *CelluSpot*. Este método utiliza peptídeos conjugados covalentemente a fibras de celulose espotados sobre um material polimérico disposto sobre a superfície de uma lâmina de vidro. Os peptídeos foram previamente sintetizados no sintetizador semi-automático *AutoSpot*, modelo ASP222 conforme descrito por Frank (2002) sobre uma membrana de celulose solúvel de modo sequencial adicionando um a um seus resíduos de aminoácidos a partir de uma sequência peptídica pré-definida (KATZ *et al.*, 2011).

Para a síntese dos peptídeos via *CelluSpot* foi definida uma sequência com 3 repetições do tripeptídeo RGD espaçados por um resíduo de Glicina (G). Assim, a sequência sintetizada corresponde a RGD-G-RGD-G-RGD-G segundo o código de 1 letra de nomenclatura para aminoácidos. Esta configuração de aminoácidos foi definida com base na distribuição espacial dos peptídeos sob o arranjo tridimensional gerado pelas fibras de celulose covalentemente ligadas a eles.

Inicialmente, foi realizada a síntese da sequência peptídica RGD-G-RGD-G-RGD-G sobre a membrana de celulose solúvel utilizada para *CelluSpot*. A síntese é semi-automatizada e utilizou o equipamento de *AutoSpot* mostrado na Figura 4.6. A membrana foi primeiramente desprotegida com uma solução de piperidina 20% em dimetilformamida (DMF) por 10 minutos. A piperidina promove a clivagem do grupamento Fmoc (protege a porção amino terminal dos aminoácidos) e, conseqüentemente, desprotege a porção N-terminal do aminoácido âncora imobilizado na membrana. Desta forma, o suporte estava pronto para o acoplamento com o primeiro aminoácido que deve ter seu grupo carboxila ativado. Para promover a ativação foi necessária uma solução de diisopropilcarbodiimida (DIC) 17% (v/v) em DMF e uma solução de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) 1,1 M em DMF previamente adicionadas a uma solução do aminoácido amino protegido em solvente N-metil-pirrolidona (NMP) 0,5 M. Esta reação conduz à formação de um éster que reage rapidamente com o grupo amino livre da âncora propiciando o alongamento da cadeia peptídica. Segundo a

programação computacional determinada, cada aminoácido protegido com sua porção carboxila ativada foi dispensado sobre o *spot* correspondente da membrana a cada ciclo. Cada ciclo correspondeu a adição de um aminoácido imobilizado ao suporte polimérico. Após o acoplamento, a membrana é retirada do equipamento (LLOYD WLLIAMS *et al.*, 1997; FRANK, 2002).



Figura 4.6. Sintetizador *AutoSpot* utilizado para a síntese do peptídeo contendo a sequência RGD.

Após a etapa automatizada, inicia-se a etapa manual sobre a membrana de celulose acrescida do primeiro aminoácido que compõe a sequência peptídica. Os grupos amino livres, ou que não reagiram, são acetilados lavando-se o suporte com anidrido acético 10% (v/v) em DMF por 30 segundos e por 4 minutos, respectivamente. A acetilação previne também a clivagem prematura dos grupos Fmoc pelas impurezas presentes na solução de DMF. O excesso de anidrido acético é retirado após 3 lavagens da membrana com DMF por 30 segundos e 2 minutos (2 vezes) nessa ordem. Em seguida, ocorre a desproteção do primeiro aminoácido com a retirada do grupo protetor Fmoc utilizando uma solução de piperidina 20% (v/v) em DMF, posteriormente, uma nova lavagem com DMF por 30 segundos e 2 minutos (3 vezes) e, por fim, lavagem com etanol. Na sequência, a membrana retorna ao sintetizador para acoplamento do próximo aminoácido ativado após secagem da membrana à temperatura ambiente com ventilação. Essa sequência de procedimentos se repete até que a síntese completa do peptídeo contendo RGD. Este peptídeo corresponde a sequência RGD-G-RGD-G-RGD-D (FRANK, 2002; LLOYD WLLIAMS *et al.*, 1997).

Ao final da síntese iniciou-se a etapa de recorte da membrana para a individualização dos *spots*, com furador cilíndrico acoplado a uma estrutura “tipo sanduíche” para fixar a membrana. Sobre cada um dos *spots* foi realizada a desproteção

dos aminoácidos, inicialmente protegidos em suas cadeias laterais, que compõem o peptídeo RGD. Assim, os *spots* foram imersos durante 2 h em 150 μL de uma solução de TFA 80,0%, TIPS 3,0%, água 5% e diclorometano 12,0%. Em seguida, foi adicionado 250 μL de uma solução de TFA 88,5%, TFMSA 4,0%, TIPS 3,0% e água 5,0% e deixada reagindo por 12 horas. Ao final, foi feita a precipitação e purificação dos peptídeos com tert-butil-metil-éter gelado a 1500 rpm por 1 minuto (2 vezes). Após ser sintetizado, o peptídeo contendo RGD foi ressuspensionado em 300 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) e foi então espotado sobre os filmes de PHBV modificados utilizando o equipamento *SlideSpotter* mostrado na Figura 4.7 (CELLUSPOT PEPTIDE ARRAYS – SYNTHESIS AND WORK-UP – A SHORT MANUAL – *Intavis AG – Bioanalytical Instruments*, 2009).



Figura 4.7. Equipamento *SlideSpotter* usado na imobilização do peptídeo contendo a sequência RGD.

Os filmes de PHBV-A90/R60 foram fixados sobre lâminas de vidro utilizando uma fita dupla face na região de contorno da lâmina para fornecer uma superfície sem ondulações e firme. A Figura 4.8 mostra os filmes fixados sobre a superfície da lâmina e dispostos na parte superior do equipamento de *SlideSpotter*.

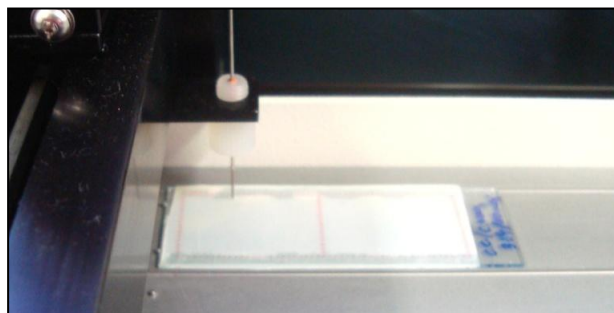


Figura 4.8. Filmes de PHBVA90/R60 fixados para imobilização peptídica por *CelluSpot*.

O Equipamento *SlideSpotter* permite realizar diferentes distribuições de imobilização sobre a superfície do suporte. Nesse estudo foram avaliados diferentes perfis de distribuição de imobilização peptídica. As distribuições corresponderam a 384 *spots* (pontos) equidistantes (16 *spots* por coluna e 24 *spots* por linha) em uma área de 6 cm² e 192 *spots* sobre esta mesma área, onde realizou-se a alternância dos *spots* ao longo de cada linha. Esta distribuição com 192 *spots* corresponde a uma superfície com aproximadamente 70% de área biofuncionalizada por peptídeos. Além disso, foram avaliadas também 3 concentrações diferentes de peptídeos imobilizados: 10 ng/*spot*, 100 ng/*spot* e 1 µg/*spot*.

4.2.5. Teste de Imunodeteção

A imunodeteção é uma técnica que possibilita reconhecimento antigênico baseado na especificidade da interação antígeno-anticorpo. A grande vantagem desta técnica é que, se tratando de uma reação enzimática, torna possível a detecção de quantidades muito reduzidas de antígenos (peptídeos). Uma vez o peptídeo ligado à superfície, o mesmo é reconhecido pelo anticorpo primário. Este complexo pode ser reconhecido por outro anticorpo, este conjugado a uma enzima que possa produzir um composto facilmente detectável. Este ensaio foi realizado para detecção da sequência RGD conjugada a peptídeos imunogênicos (PI) de dengue conforme mostra a Figura 4.9 (FRANK e DUBEL, 2005; FRANK, 1992).

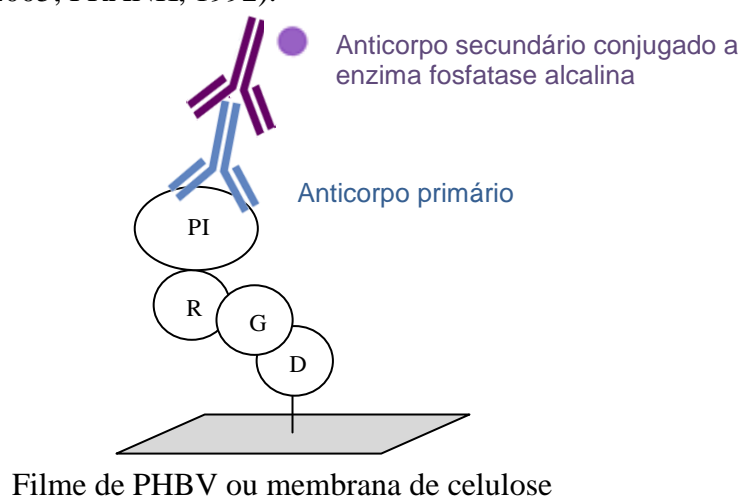


Figura 4.9. Representação do ensaio de Imunodeteção sobre os diferentes suportes poliméricos.

Visando a detecção dos peptídeos RGD imobilizados sobre a superfície foi utilizado um *pool* de soros de pacientes (sabidamente infectados por dengue), os quais representam o anticorpo primário no esquema. O suporte polimérico foi previamente lavado com etanol por 2 minutos, depois, lavado 3 vezes com tampão TBS por 10 minutos e bloqueada por 12 horas em solução de MBS a 4°C. Após 2 lavagens com T-TBS por 10 minutos, o suporte foi incubado por 2 horas com anticorpo primário (IgG humana) diluído 1: 250 em solução T-TBS. Em seguida, foi lavado 3 vezes com solução T-TBS por 10 minutos e incubado por 1 hora com anticorpos secundários conjugados à fosfatase alcalina (IgG de coelho anti-IgG humano) diluído 1:5000 em solução T-TBS. Após 2 lavagens sucessivas com T-TBS por 10 minutos e 2 com CBS por 10 minutos, a membrana foi incubada com substrato quimioluminescente para ser revelada (FRANK e DUBEL, 2005; FRANK, 1992).

Com o intuito de avaliar a imobilização utilizando peptídeos sabidamente imunogênicos, o suporte foi escaneado em um Fotodocumentador (MF ChemBis 3.2 – DNR, Bio-imaging Systems, Israel) capaz de obter imagens digitais de reações de quimioluminescência sucedidas sobre os *spots*, que compreende a área onde o peptídeo foi sintetizado. O software TotalLab TL 100 foi utilizado para a análise em percentual da reatividade, sendo que o *spot* com reatividade mais intensa na membrana foi assinalado como tendo 100% de intensidade, e todos os outros *spots* tiveram os seus valores de intensidade expressos em porcentagem relativa.

4.2.6. Teste de Ninidrina

Também conhecido como teste de Kaiser, o teste de ninidrina é um método simples e rápido para a determinação dos grupos amino livres de aminoácidos, peptídeos e proteínas. No presente trabalho, ele foi empregado para fins de quantificação dos peptídeos RGD ressuspensos em DMSO obtidos pelo método de *CelluSpot*. O teste se baseia na reação das aminas primárias dos aminoácidos com a ninidrina originando cromóforos de cor azulada conhecidos como púrpura de Ruhemann. A ninidrina (hidrato de tricetohidrendeno) ocasiona a reação de desaminação oxidativa dos aminoácidos, produzindo amônia (NH₃) e a redução da ninidrina a hidrindantina. Esta reage com a amônia liberada formando o complexo azul (púrpura de Ruhemann) (Figura 4.10), com absorção máxima no comprimento de onda de 570 nm. Assim, sua concentração em solução pode ser determinada colorimetricamente neste

comprimento de onda. Já a amina secundária da prolina reage com a ninidrina formando um cromóforo amarelo e a sua concentração pode ser determinada a 440 nm. Para a faixa de utilização do teste entre 0,005 – 1 μmol a precisão dos resultados é de $\pm 3\%$. O limite inferior de sensibilidade é abaixo de 0,001 μmol de amina. O teste pode ser quantitativo se utilizada uma curva-padrão construída a partir de aminoácidos de concentrações conhecidas (YOKOYAMA e HIRAMATSU, 2003; SARIN *et al.*, 1981; KAISER *et al.*, 1970).

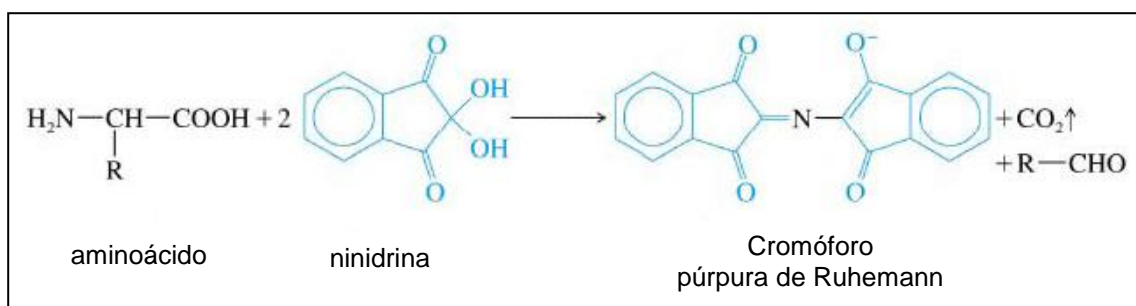


Figura 4.10. Reação de obtenção do cromóforo púrpura de Ruhemann (adaptado de STEWART *et al.*, 1979).

4.2.6.1. Preparo de soluções necessárias ao teste de Ninidrina

Para realizar o ensaio de ninidrina visando à quantificação dos peptídeos sintetizados por *CelluSpot* foi necessário sintetizar peptídeos contendo a sequência RGD (em massa) isentos de celulose para o preparo das soluções padrão.

O método de síntese em fase sólida fundamenta-se na estratégia Fmoc utilizando um sintetizador automático modelo PSSM-8 da Shimadzu. Este procedimento foi realizado pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos, da FIOCRUZ. Os peptídeos RGD - padrão foram sintetizados utilizando-se 15 mg de resina Fmoc-Arg(PMC)-Wang com 0.54 mmol/g de grau de substituição. Essa resina foi utilizada com a finalidade de se deixar todos os peptídeos carregados positivamente tornando-os solúveis. A cada ciclo da síntese, automaticamente foi adicionado um resíduo de Fmoc-aminoácido-OH, contendo HOBt e N-metil-morfolina (NMM) como agentes ativadores dos aminoácidos e PyBOP como agente acoplador. Para as lavagens da resina e desproteção foi utilizado DMF e piperidina, respectivamente. Ao término da síntese, os frascos contendo os peptídeos foram liofilizados por 4 horas. Após a secagem, foi realizada a clivagem entre o peptídeo e a

resina utilizando-se uma solução de TFA 94.0% (v/v), triisopropilsilano 1% (v/v), etanoditiol 2,5% (v/v) e água ultra purificada 2,5% (v/v). Os peptídeos contendo essa solução foram incubados a 4°C por 8 h. Esta solução de clivagem contendo os peptídeos foi filtrada para retirada da resina e adicionado éter dietílico para a precipitação dos peptídeos, procedimento realizado em banho de gelo. Em seguida foi realizada uma centrifugação a 2°C por 20 minutos a 630 g. Após a centrifugação, o éter dietílico foi descartado e os peptídeos ressuspensos em 1 mL de água ultra purificada e liofilizados.

Posteriormente foram preparadas as seguintes soluções:

Solução (a): Solução 1 - Foram misturados 4g de fenol com 1 mL de etanol absoluto, e aquecido até a completa dissolução. A solução foi agitada com 0,4g de Amberlite por 45 minutos. Solução 2 - Dissolver 6,5mg de cianeto de potássio (KCN) em 10 mL de água. Diluir 0,2 mL da solução de KCN para 10mL com piridina. Agitar a solução com 0,4g de Amberlite. Filtrar a solução. Misturar as soluções 1 e 2.

Solução (b): Dissolver 0,25g de ninidrina em 5 mL de etanol absoluto.

Solução padrão de RGD: Foram preparadas as soluções padrão do peptídeo RGD em DMSO nas concentrações: 10µg/µL, 1µg/µL, 0,1µg/µL.

4.2.6.2. Metodologia do teste de Ninidrina

Foram adicionados em um tubo eppendorf 100 µL da solução de RGD em DMSO e 100 µL da solução tampão SSC. Em seguida, foram adicionados 100 µL da solução “a” e 25 µL da solução “b”. A solução resultante foi misturada e aquecida em banho-maria a 100°C por 10 minutos na capela. Após o tempo de reação, os tubos foram colocados em banho de gelo por 30 segundos. Por fim, as amostras foram transferidas para uma placa de 96 poços e medidas as absorbâncias a 570 nm no *FlexStation 3 – Molecular Devices* conjugado ao *software SoftMax Pro*. As análises foram realizadas em triplicata (SARIN *et al.*, 1981; KAISER *et al.*, 1970).

4.2.6.3. Construção da curva padrão para quantificação da solução de peptídeo RGD

Para obter *spots* com concentrações definidas do peptídeo contendo a sequência RGD foi necessário determinar a concentração do peptídeo RGD na solução mãe obtida

por método de *CelluSpot*. Esta solução contém os conjugados celulose-peptídeos ressuspendidos no solvente DMSO (KAISER *et al.*, 1970; SARIN *et al.*, 1981; YOKOYAMA e HIRAMATS, 2003).

As leituras de absorvância foram realizadas a 570 nm, que corresponde ao λ_{Max} do cromóforo Ruhemann de coloração azul-violácia (FRIEDMAN, 2004). A partir desses dados foi construída uma curva padrão de concentração em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ x absorvância, conforme mostra a Figura 4.11.

Este dado é essencial para avaliar o efeito da concentração destes peptídeos sobre a adesão e a proliferação celular. Foram consideradas para teste três quantidades diferentes de massa do peptídeo RGD por spot: 1 $\mu\text{g}/\text{spot}$, 100 ng/spot e 10 ng/spot . Essas concentrações foram definidas com base em dados da literatura citados por Yang *et al.*, (2001) e Carlisle *et al.*, (2000).

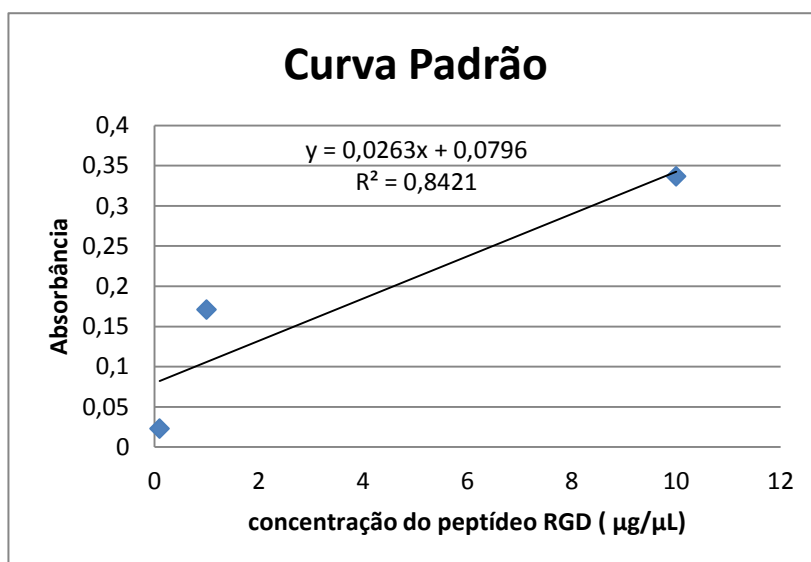


Figura 4.11. Curva Padrão de concentração do peptídeo RGD x Absorvância ($\lambda = 570 \text{ nm}$).

O coeficiente de correlação (R^2) não foi satisfatório, por estar não muito próximo de 1, isto sugere que o ajuste da equação não ficou muito bom. Assim, pode-se considerar o ensaio apenas como uma estimativa da concentração dos peptídeos contendo RGD. Com base nesta curva, a concentração do peptídeo foi estimada em 3,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ em DMSO. A partir dessa concentração estimada pôde-se imobilizar massas diferentes do peptídeo/spot (1 $\mu\text{g}/\text{spot}$, 100 ng/spot e 10 ng/spot). Para isso, foi necessário fazer uma correlação do volume de peptídeo RGD (em μL) a ser dispensado

sobre o filme de PHBV. Logo, para obter as massas/spot citadas acima foi necessário dispensar sobre o filme os volumes de 0,3 μL ; 0,03 μL e 0,003 μL , respectivamente.

Analisando dados da literatura citados por Katz *et al.* (2011) em termos de rendimento da síntese peptídica em macro-arranjo e fazendo a conversão de massa do peptídeo para número de moles, foi constatado uma conformidade entre os valores obtidos. Ele cita que a síntese em micro-arranjo (*CelluSpot*) oferece um rendimento na faixa de nmol/spot (10^{-9} mol), dado que confere com os valores obtidos após a conversão para número de moles.

4.2.7. Espectrometria de massas MALDI-ToF-ToF

A espectroscopia de massa (EM) baseia-se na determinação precisa da relação m/z (razão massa/carga) de íons em fase gasosa. Esta técnica tornou-se aplicável na análise de moléculas polares como proteínas e peptídeos no início dos anos 80 com a introdução de técnicas suaves de ionização. Com o avanço desta técnica, foram possíveis várias aplicações da EM na determinação precisa da massa molecular, determinação da sequência de aminoácidos e outros (LARSEN e ROEPSTORFF, 2000).

Um espectrômetro de massa possui três constituintes básicos: (1) a fonte de ionização responsável pela vaporização da amostra; (2) o analisador que determina os valores de m/z do analito e (3) o detector que detecta a presença do analito. Uma importante fonte de ionização amplamente usada na análise de proteínas e peptídeos é a fonte por dessorção a laser auxiliada por matriz (MALDI). A fonte pode ser combinada formando equipamentos de alto desempenho como o MALDI-TOF. Neste equipamento, a ionização e a dessorção da amostra ocorrem pela diluição desta em uma matriz orgânica que contém um grupamento cromóforo que absorve luz na faixa do ultravioleta e infravermelho. À medida que os solventes da matriz e da amostra evaporam ocorre a cristalização de ambos em uma placa de aço inoxidável contendo microfissuras. Estes cristais são alvejados por laser na faixa de absorção do cromóforo causando a fotoionização dos analitos pela transferência de carga dos íons da matriz e posterior dessorção, entrando na fase gasosa. Os analitos em fase gasosa são conduzidos ao analisador do tipo TOF, onde são acelerados por uma diferença de potencial (ddp) aplicada entre a fonte e o detector sob vácuo. Os íons com m/z diferentes apresentam tempos de chegada diferentes proporcionais à raiz quadrada da relação m/z. Assim, os

componentes são separados de acordo com sua m/z permitindo a determinação da massa da proteína ou do peptídeo, submetido à análise, através da geração de espectros de massa característicos (MAEDA *et al.*, 2003).

As análises de espectrometria do tipo MALDI-imaging foram realizadas pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Biologia Estrutural, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP. O MALDI-Imaging é uma técnica acoplada ao MALDI-ToF-ToF que utiliza um equipamento (CHIP-1000) para o preparo da amostra antes da análise por MALDI-ToF-ToF. A membrana de celulose não solubilizada contendo os peptídeos RGD foi fixada em placa MALDI adaptada para “espotagem” com impressora química CHIP-1000 - Shimadzu Biotech. Foi depositado sobre a membrana 0,5 μL de matriz α -ciano-4-hidroxicinamico na concentração de 10 mg/mL em solução acetonitrila 50% (v/v) contendo TFA 0,1% (v/v). Esta análise permite analisar as moléculas (peptídeos e proteínas) diretamente sobre o tecido um histológico ou então, diretamente sobre a membrana sem a necessidade de isolar a molécula ou fazer uma complexa preparação de amostra. Sendo possível determinar a composição de aminoácidos que compõem o peptídeo RGD através da determinação da massa total do peptídeo. Os espectros de foram obtidos no modo *reflectron* positivo por um MALDI ToF-ToF (modelo AXIMA Performance, Shimadzu), equipado com um laser SmartBeam controlado pelo *software* Launchpad v2.8 (Shimadzu).

4.2.8. Caracterização dos filmes de PHBV biofuncionalizados com RGD

4.2.8.1. Espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier é um método diferenciado de espectroscopia no Infravermelho. Essa técnica baseia-se na passagem da radiação de infravermelho através de uma amostra, onde parte da radiação é absorvida e parte é transmitida. A FTIR emprega um dispositivo óptico chamado de interferômetro que é capaz de medir todas as frequências de infravermelho simultaneamente produzindo um único sinal (interferograma). Assim, o sinal pode ser medido rapidamente, geralmente na ordem de um segundo. O sinal interferograma medido não pode ser interpretado diretamente, nesse caso aplica-se a técnica matemática chamada de transformação de Fourier para decodificar o sinal em frequências individuais permitindo uma análise espectral. O espectro de infravermelho representa uma

impressão digital de uma amostra com picos de absorção que correspondem às frequências de vibrações das ligações atômicas que compõem o material. Como cada material representa uma combinação única de átomos, não existe dois compostos capazes de produzir um mesmo espectro de infravermelho. Portanto, a espectroscopia de infravermelho permite uma análise qualitativa do material. Além disso, o tamanho dos picos dos espectros possibilita uma análise quantitativa do material (THERMO NICOLET, 2001).

A FTIR é preferida frente à espectroscopia de infravermelho convencional por várias razões: é uma técnica não destrutiva; fornece um método de medição preciso, que não requer calibração externa; permite variar a velocidade de varredura (número de varreduras por segundo); permite aumentar a sensibilidade; tem maior rendimento óptico e possui uma mecânica bastante simples (THERMO NICOLET, 2001).

Para investigar todas as modificações submetidas aos filmes de PHBV neste estudo foi realizada análise por FTIR. Foi utilizado espectrômetro com transformada de Fourier na região do infravermelho, Perkin-Elmer 1720X. As análises envolveram as seguintes condições experimentais:

- (a) Resolução do equipamento: 4 cm^{-1}
- (b) Número de varreduras: 32
- (c) Faixa de número de onda: $4000\text{-}650 \text{ cm}^{-1}$

A interpretação dos espectros foi baseada nas tabelas e nos itens relacionados aos dados apresentados por Silverstein *et al.* (2006), onde estão registradas as frequências de absorção no infravermelho características de vários grupamentos orgânicos.

4.2.8.2. Ângulo de contato e energia de superfície

O ângulo de contato (θ) é determinado a partir de um equilíbrio termodinâmico de um sistema de três fases: sólido, líquido e vapor. Sendo dependente das interações que acontecem nas três interfaces: sólido-líquido, líquido-vapor e sólido-vapor. A energia de superfície e o ângulo de contato estão relacionados de forma inversamente proporcional, ou seja, quanto maior a energia de superfície do suporte, menor o ângulo de contato.

As medidas de ângulo de contato (θ) foram realizadas no Laboratório de Superfícies Poliméricas e Asfálticas, utilizando o Goniômetro (Ramé-Hart *Advanced* acoplado ao *software Drop Image Advanced*). O equipamento é composto por um sistema de análise de imagens, câmera CCD acoplada a um computador que captura a

imagem da gota depositada sobre o substrato. As medidas de ângulo contato das superfícies dos filmes de PHBV modificados ou não foram feitas pelo método da gota sésil. Para as medidas de ângulo de contato foi utilizada água deionizada como líquido polar. Já para análise da energia de superfície foi utilizado, além da água, o etileno glicol (HOCH₂CH₂OH) como líquido apolar. Para cada superfície foram depositadas em média 5 gotas de 0,2 mL, sendo realizadas 10 medidas a cada 0,5 segundos em cada gota. Com auxílio do *software* acoplado ao goniômetro foram obtidos os valores de energia de superfície relacionados aos dois líquidos citados.

4.2.8.3. Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV

O princípio da microscopia eletrônica de varredura (MEV) consiste na emissão de um feixe de elétrons focalizado sobre a superfície de uma amostra. O feixe interage com a região de incidência da amostra até uma profundidade que pode variar dependendo da natureza da amostra. Esta região é conhecida por volume de interação, o qual gera os sinais que são detectados e utilizados para a formação da imagem e para microanálise. A versatilidade desta técnica se dá em razão da captação e medição das diversas radiações provenientes das interações elétron-amostra. Estas interações podem revelar informações da natureza da amostra incluindo composição, topografia, potencial eletrostático, campo magnético local e outras propriedades da amostra (SOARES e SARON, 2010).

A formação da imagem consiste na localização dos pontos de varredura no plano x, y com o conjunto de intensidades de sinais correspondentes, originadas pelo detector de elétrons retroespalhados ou pelo detector de elétrons secundários. Estes sinais apresentam maior interesse por serem mais sensíveis às variações na superfície da amostra (GOLDSTEIN, *et al.*, 2002). Os sinais gerados pelos elétrons secundários apontam o relevo da superfície por efeito de contraste, sendo os picos brilhantes e os vales escuros (ORÉFICE *et al.*, 2006). Já os sinais gerados pelos elétrons retroespalhados configuram uma heterogeneidade da composição da amostra em função das diferenças de número atômico dos elementos que compõem a amostra. Unindo essas características de contraste à grande profundidade de foco alcançada pela microscopia eletrônica de varredura, obtêm-se imagens com aparência tridimensional.

A análise da morfologia de superfície dos filmes de PHV foi realizada por microscopia eletrônica de Varredura (MEV) após a fase de produção e ao longo de toda

a sua modificação. Por se tratar de uma espécie não condutora os filmes de PHBV foram recobertos por uma fina camada de ouro - material condutor. Neste trabalho foi utilizado o microscópio JEOL JSM, modelo 6460 LV, pertencente ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do PEMM/COPPE, operado com potência de laser de 15KV. Foram obtidas imagens nos aumentos de 100x, 500x, 1000x, 3000x e 4000x o que permitiu avaliar a reprodutibilidade morfológica da superfície dos filmes.

4.2.8.4. Microscopia de Força Atômica - AFM

O princípio de funcionamento do AFM é baseado na varredura da superfície da amostra utilizando como sonda uma haste flexível (cantiléver) de aproximadamente 100-200 μm de comprimento, com uma ponta de prova (agulha) na sua extremidade livre, podendo apresentar formato piramidal (50 nm) ou cônico (10 nm). O cantiléver sofre efeito de deflexão por forças de repulsão produzidas a partir da interação entre a agulha e a superfície da amostra. Os valores da deflexão são medidos por um sensor óptico e refletem a topografia da região da amostra que está sendo varrida. As diferenças de deflexão captadas são armazenadas e processadas por um computador, que as transformam em imagens topográficas da superfície bi e tridimensionais (HUMPHRIS, *et al.*, 2005).

A técnica de AFM pode ser operada em três modos diferentes: contato, não-contato e contato intermitente, conforme mostrado na Figura 4.12. No modo contato, o cantiléver é mantido a poucos angstroms (Å) da superfície da amostra e a força interatômica entre a agulha e a amostra é repulsiva. Neste modo de operação, a ponta faz um leve "contato físico" com a amostra produzindo imagens com alta resolução. No modo de não-contato, o cantiléver é mantido a alguns angstroms de distância da superfície da amostra e a força interatômica entre a ponta e a amostra é atrativa. Neste caso a ponta oscila em alta frequência (100 kHz a 1 MHz), a poucos nanômetros acima da superfície, e a força total entre a agulha e a amostra é muito baixa, geralmente em torno de 10-12 nN. O modo contato intermitente é similar ao não-contato, exceto pelo fato de que o cantiléver fica mais próximo da amostra, de forma que tenha um contato intermitente e é utilizado para contornar as limitações impostas pelo modo contato. A comparação das imagens nos modos contato e intermitente mostra que as superfícies são menos modificadas no modo intermitente (HUMPHRIS, *et al.*, 2005).

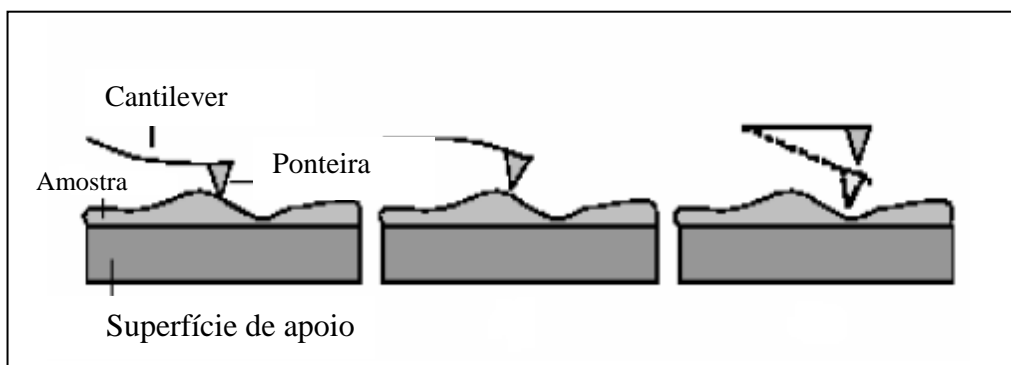


Figura 4.12. Representação dos modos de operação do AFM: a) modo contato; b) não-contato e c) modo intermitente (adaptado de FERREIRA, 2006).

Esta técnica apresenta algumas vantagens em relação às microscopias eletrônicas para estudo de polímeros como, por exemplo, o MEV, que são: (i) dispensa o uso de vácuo ou de recobrimento da amostra, (ii) possibilita a realização de medidas diretas de altura (FILHO, 2003).

A imagem obtida por AFM é resultado de uma série de fatores: tipo de amostra a ser analisado, tipo de haste e o tipo de varredura. O tipo de varredura é definido com base nas características da amostra, por exemplo, se a amostra é rígida ou não. Normalmente para polímeros, as imagens são obtidas por varredura em modo de contato intermitente já que as interações entre a agulha e a amostra são menos agressivas, diminuindo a possibilidade de danificar o material (FILHO, 2003).

Para avaliar a influência da topografia e da rugosidade sobre a interação mediada pela sequência peptídica RGD, potencializando-a ou não, as amostras foram caracterizadas por microscopia de força atômica (AFM). A Análise foi conduzida em modo de contato intermitente utilizando o microscópio Alpha 300AR Microscope _ WITec pertencente ao Laboratório de Caracterização de Superfícies. Foi necessária a utilização de agulhas de nitreto de silício montadas em uma haste com constante de mola igual a 42 N/m e frequência de ressonância de 285 kHz. As imagens resultantes foram analisadas através do *software* analisador de imagens acoplado ao equipamento de AFM. A determinação da rugosidade média quadrática (RMS) foi realizada com base em imagens de topografia de 50 μm x 50 μm . Para realizar esta análise os filmes de PHBV foram fixados sobre lâminas de vidro de microscópio utilizando fita dupla face.

4.2.9. Testes biológicos

Os testes biológicos foram realizados na Unidade de Pesquisas Clínicas (UPC), instalada no hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP-UFF). Os filmes foram previamente esterilizados utilizando óxido de etileno. Foram avaliados filmes de PHBV-A90/R60 com celulose, sem peptídeos e filmes de PHBV-A90/R60 imobilizados com peptídeos contendo a sequência RGD conjugados covalentemente a celulose nas concentrações 1 $\mu\text{g/spot}$, 100 ng/spot e 10 ng/spot em distribuições de 384 *spots*/ área total de material. A esterilização destes materiais foi realizada utilizando o gás óxido de etileno. O Mecanismo de ação do gás é a alquilação das cadeias protéicas microbianas, impedindo a multiplicação celular.

4.2.9.1. Análise de Citotoxicidade

De acordo com o Órgão Internacional de Padronização (International Standard Organization), ISO 10993, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos. Vários métodos *in vitro*, para avaliar a toxicidade de biomateriais, foram padronizados utilizando-se culturas celulares. Estes testes de citotoxicidade consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando-se as alterações celulares por diferentes mecanismos, entre os quais a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares (ROGERO *et al.*, 2003).

O parâmetro mais utilizado para avaliar a toxicidade é a viabilidade celular, que pode ser evidenciada com auxílio de corantes vitais como o vermelho neutro, solúvel em água e que passa através da membrana, concentrando-se nos lisossomos, fixando-se por ligações eletrostáticas em sítios aniônicos na matriz lisossomal. Muitas substâncias danificam as membranas resultando no decréscimo de captura e ligação do vermelho neutro. Portanto, é possível distinguir entre células vivas e mortas, pela medida de intensidade de cor obtida ao final da lise celular (ROGERO *et al.*, 2003). Já o teste com cristal violeta pode avaliar a densidade celular por coloração do DNA (DE-DEUS *et al.*, 2009). A citotoxicidade também pode ser medida por ensaio com XTT. Este método quantifica a atividade mitocondrial, medindo-se a formação de cristais de formazana (cor laranja), produto formado pela redução do sal tetrazólio hidrossolúvel XTT (cor

amarela). A redução de XTT ocorre principalmente na mitocôndria através da ação da succinato desidrogenase fornecendo, então, uma medida de atividade mitocondrial (DE-DEUS *et. al.*, 2009).

Neste trabalho foi realizada a análise de citotoxicidade a partir de um teste multiparamétrico de viabilidade celular por kit *In Cytotox* (Xenometrix), que permite avaliar três diferentes parâmetros: atividade mitocondrial (XTT), integridade membranar (vermelho neutro - VN) e quantificação do material genético (crisal violeta - CV) (DE-DEUS *et. al.*, 2009). Para avaliação da viabilidade celular *in vitro* foram utilizadas células de osteoblastos de camundongo imortalizados. Osteoblastos são células responsáveis pela síntese, deposição e mineralização da matriz extracelular óssea (ORÉFICE *et al.*, 2006), ou seja, células formadoras de osso.

Para a produção dos extratos a partir dos filmes de PHBV, os diferentes materiais foram incubados em meio de cultura sem soro por 24 horas, em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Os extratos foram então recolhidos e incubados em cultura de MC3T3 - osteoblastos de camundongo imortalizados, em placa de 96 poços por mais 24 horas, em estufa a 37°C (5% CO₂). Após esse período, o sobrenadante foi descartado e a primeira análise realizada foi pelo método XTT, sendo medida a absorbância em 480 nm. O segundo teste avaliou a sobrevivência/viabilidade celular pela capacidade das células de incorporarem o corante vermelho neutro em seus lisossomos. No final deste teste as células foram fixadas, o corante presente no seu citoplasma foi liberado por ação da solução de solubilização para o sobrenadante e a absorbância foi lida em 540 nm. O ensaio com cristal violeta avaliou a densidade celular por coloração do DNA; após eliminação do excesso do corante, a absorbância a 540 nm é proporcional à quantidade de células presentes no poço da placa de 96 pocos. Todas as leituras de absorbância foram realizadas em Leitor de Microplacas Synergy 2 - BioTek. Foi utilizado o látex como controle positivo por ser sabidamente citotóxico e o poliestireno como controle negativo por ser um material não citotóxico. Todas as análises foram realizadas em triplicata a partir dos diferentes extratos.

4.2.9.2. Ensaio de Adesão Celular

O método de adesão celular consiste na determinação da quantidade de células que aderiram ao filme após o período de incubação definido. Para quantificar a adesão celular às superfícies dos filmes de PHBV – A90/R60 imobilizados com peptídeos RGD foram utilizadas células MC3T3 imortalizadas - osteoblastos de camundongo. Estas células foram previamente incubadas em meio de cultura ALFAMEM enriquecido com 10% de Soro Fetal Bovino, contendo com antibióticos (penicilina e estreptomicina) e mantidas em estufa com 5% de CO₂.

O ensaio de adesão foi feito com $1,0 \times 10^4$ células por amostra (triplicata), a densidade celular da suspensão foi estimada por contagem em câmara de Neubauer. O procedimento foi feito com uma pequena gota de meio de cultura com células sobre o material, sendo deixadas aderindo por 2 horas. Ao final do tempo de adesão foi feita a coloração do núcleo celular com o fluorocromo DAPI (4-6-diamidino-2- fenilindol) diluído 1:5000 e a imagem foi obtida utilizando um microscópio de fluorescência invertido no aumento de 10x. O DAPI corresponde a um marcador fluorescente de núcleo celular que emite coloração azul. Posteriormente foi realizada a contagem, utilizando o software Image Pro, dos núcleos celulares marcados com DAPI, a partir de 4 campos distintos adjacentes no campo de maior concentração celular, sendo escolhidas 3 regiões de 4 campos adjacente, o que corresponde a um total de 12 campos de maior concentração celular na superfície dos diferentes filmes.

CAPÍTULO V – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. PRODUÇÃO DOS FILMES DE PHBV

Os filmes de PHBV foram produzidos pela técnica de evaporação de solvente. A Figura 5.1 mostra a fotografia de uma amostra deste filme, com $(11,7 \pm 0,2)$ cm de diâmetro e $(0,10 \pm 0,01)$ mm de espessura (Figura 5.1 (a) e (b)). Os filmes apresentaram-se translúcidos, conforme pode ser evidenciado pela Figura 5.1b.

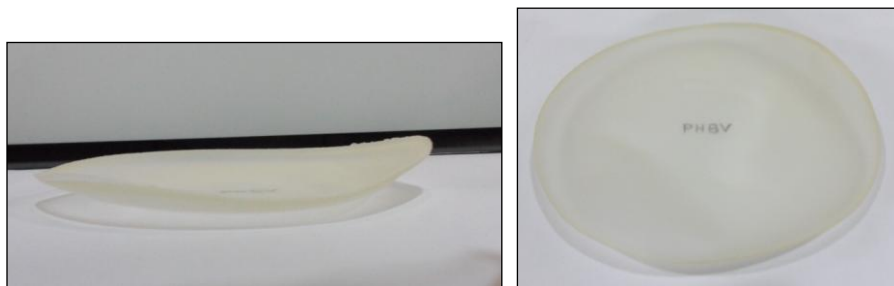


Figura 5.1. Filme de PHBV obtido pela técnica de evaporação de solvente: em uma visão lateral (1a) e uma visão frontal (1b).

5.2. MÉTODO DE *SPOT SYNTHESIS*

Inicialmente, foi realizada a adequação dos filmes do copolímero PHBV ao método de *Spot Synthesis*. Estes filmes foram empregados como suporte alternativo ao método, proporcionando uma metodologia inédita para fins de modificação biológica aplicável à área de biomateriais. O suporte padrão da metodologia Amino-PEG₅₀₀ – UC540 é uma membrana de celulose acrescida do espaçador polietilenoglicol (PEG). Estudo realizado por Wang *et al.* (2011) mostrou que o uso do espaçador PEG oferece resistência à adsorção inespecífica de proteínas, o que justifica o uso deste tipo de membrana em diversos ensaios biológicos como, por exemplo, mapeamento de epitopo.

Para tornar os filmes de PHBV suscetíveis à síntese peptídica foi necessário introduzir sítios específicos na superfície do material. Por essa razão, os filmes foram modificados via aminólise por 90 e 120 minutos. Esta modificação química possibilita introduzir grupos aminos e hidroxilas na superfície do material (KEEN *et al.*, 2006). Nesta reação, um dos grupamentos amino da diamina reage com o grupo éster do PHBV para formar uma ligação covalente (-CONH- e/ou -CONH₂-). Grupamentos

hidroxílicos podem ser incorporados ao polímero em razão da reação de hidrólise que ocorre paralelamente (HOLLANDER *et al.*, 2004).

A Figura 5.2 mostra os espectros de FTIR dos filmes de PHBV sem modificação e modificados via aminólise por 90 e 120 minutos. Em ambas as modificações observam-se uma banda em 2854 cm^{-1} referente à deformação axial simétrica da ligação C-H de grupos metileno (CH_2) de hidrocarbonetos saturados (alcanos) (SILVERSTEIN *et al.*, 2006). Essa banda evidencia a modificação com etilenodiamina em razão da sua estrutura química - $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$ - apresentar estes grupos característicos.

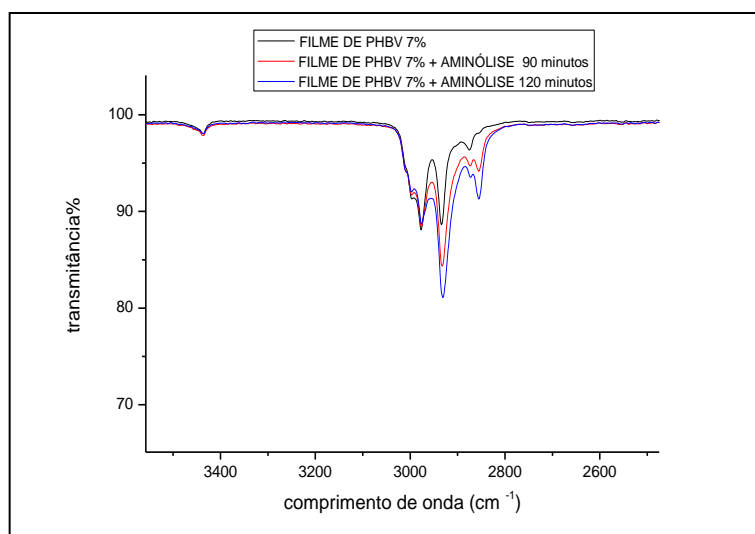


Figura 5.2. Imagem sobreposta de espectros de FTIR dos filmes de PHBV sem modificação e aminolisados 90 e 120 minutos.

Entretanto, em relação às bandas de intensidade média, passíveis de serem evidenciadas, de amins primárias que estariam na faixa de $1650\text{-}1580\text{ cm}^{-1}$ referente a vibrações de deformação angular da ligação N-H e entre $1250\text{-}1020\text{ cm}^{-1}$ referente a vibrações de deformação axial da ligação C-N em amins primárias alifáticas não foram observadas na análise por FTIR. Considerando as bandas referentes a amidas secundárias que estariam na faixa de $3350\text{-}3180\text{ cm}^{-1}$ e em $1570\text{-}1515\text{ cm}^{-1}$ referente às vibrações de deformação axial de ligação N-H e vibrações de deformação angular de ligação N-H, respectivamente, não foram observadas (SILVERSTEIN *et al.*, 2006). Provavelmente, a ausência dessas bandas se deve à sobreposição com outras bandas características do material PHBV somado à limitação do próprio método em detectar estes grupos gerados pela reação de aminólise. As Figuras 5.2 e 5.3 mostram os gráficos de FTIR com zoom nas regiões relacionadas com bandas de amins primárias e amidas secundárias, que não foram encontradas.

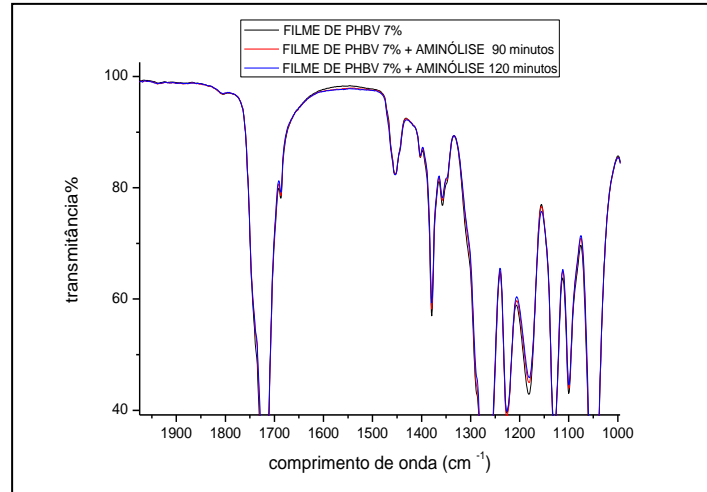


Figura 5.3. Imagem sobreposta de espectros de FTIR dos filmes de PHBV aminolisados 90 e 120 minutos com zoom nas regiões relacionadas com bandas de aminas primárias e amidas secundárias.

Os filmes de PHBV foram caracterizados quanto à hidrofobicidade antes e após a modificação por aminólise de 90 e 120 minutos. A Tabela 5.1 demonstra que os filmes de PHBV-A90 e PHBV-A120 apresentaram um aumento de hidrofobicidade, pela diminuição do ângulo de contato de 84,6° para 73,1°, respectivamente, em relação ao ângulo de contato determinado para o filme de PHBV sem modificação. Esses dados confirmam que grupamentos polares foram incorporados na superfície do material durante o processo de modificação com etilenodiamina. Sabe-se que a reação de aminólise pode ser acompanhada por reação de hidrólise dos grupamentos éster, o que proporcionaria essa diminuição do ângulo de contato do material em razão do aumento do tempo de reação (THIRÉ *et al.*, 2007).

Tabela 5.1. Efeito da modificação com etilenodiamina da superfície sobre o ângulo de contato entre a água e os filmes PHBV-A90 e PHBV-A120. DP = desvio padrão.

MATERIAL	ÂNGULO DE CONTATO ± DP (°)	TEMPO DE AMINÓLISE (min)
PHBV	88,5 ± 3,1	-
PHBV-A90	84,6 ± 4,5	90
PHBV-A120	73,1 ± 2,2	120

Os filmes de PHBV modificados 120 minutos foram selecionados para a síntese por apresentar a banda de absorção mais forte e menor ângulo de contato. Por consequência, pode-se supor que os filmes PHBV-A120 apresentaram maior número de sítios ativos na superfície do material. É sabido que os grupamentos amino correspondem aos sítios efetivos de promoção da síntese peptídica (BLACKWELL, 2006).

No decorrer da síntese peptídica, no entanto, foi observado que os filmes PHBV-A120 não apresentavam resistência física aos solventes utilizados. Foram observadas trincas significativas do material já na imobilização do quarto aminoácido que compunha a sequência peptídica. Estas alterações podem ser observadas na Figura 5.4.

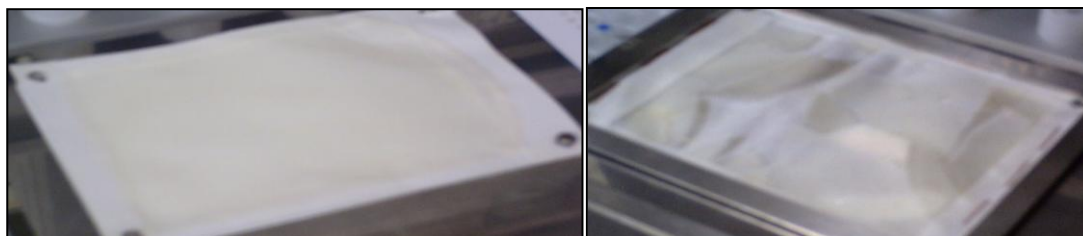


Figura 5.4. Filmes de PHBV-A120 antes da síntese (esquerda) e após a síntese (direita) dispostos sobre o equipamento de *Spot Synthesis*.

Visando aumentar a resistência dos filmes de PHBV frente às condições de síntese, foram realizadas modificações no polímero com um agente reticulador, o tripolifosfato de sódio (TPP). Os filmes foram submetidos a uma etapa de reticulação em diferentes intervalos de tempo: 30, 60, 90 e 120 minutos. Os filmes reticulados foram denominados por PHBV-R30, PHBV-R60, PHBV-R90 e PHBV-R120, em função do tempo crescente de reticulação. Este agente induz uma reticulação através da formação da ligação iônica entre os íons tripolifosfato (TPF) e os grupos amino protonados do PHBV aminolisado. A reticulação previne que o polímero seja dissolvido em meio ácido (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Com o objetivo de avaliar a eficiência das modificações submetidas ao material, foi realizada a síntese via *Spot Synthesis* da sequência de interesse sobre os filmes aminolisados e posteriormente reticulados (PHBV-A/R). Ao final da síntese, foi observada perda significativa da integridade física de alguns filmes de PHBV modificados (Figura 5.5). Os filmes de PHBV aminolisados por 90 minutos e reticulados por 30, 60 e 120 minutos (PHBV-A90/R30, PHBV-A90/R60 e PHBV-A90/R120, respectivamente) apresentaram várias trincas que culminaram na perda de

integridade. Já o filme PHBV-A90/R90 não apresentou trincas visíveis ao final da síntese.

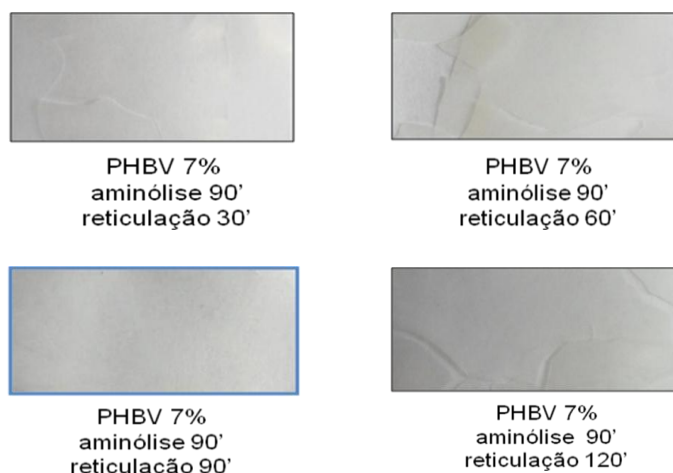


Figura 5.5. Filmes de PHBV aminolisados 90 min e reticulados em tempos diferentes (30, 60, 90 e 120 min) após *Spot Synthesis*.

A Figura 5.6 ilustra a perda de integridade dos filmes de PHBV aminolisados por 120 minutos segundo suas modificações em diferentes tempos de reticulação. São eles, PHBV-A120/R30, PHBV-A120/R60, PHBV-A120/R90 e PHBV-A120/R120.

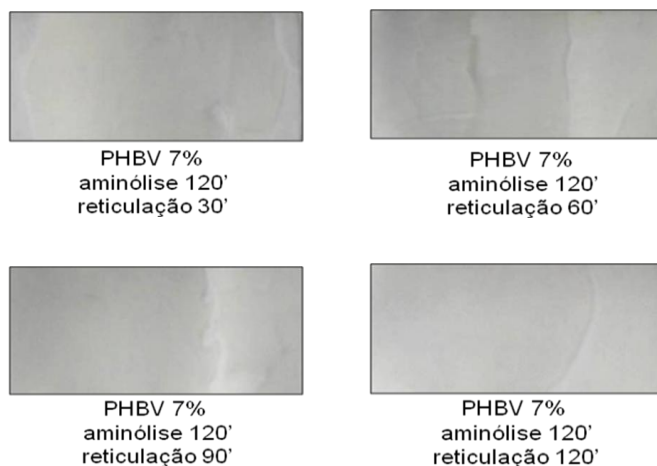


Figura 5.6. Filmes de PHBV aminolisados 120 minutos e reticulados em tempos diferentes (30, 60, 90 e 120 minutos) após *Spot Synthesis*.

Em razão da maior resistência dos filmes de PHBV-A90/R90, estes foram definidos como os mais adequados para o método de *Spot Synthesis*. Apesar da manutenção da integridade física do material, a caracterização por FTIR não apresentou bandas características referentes às vibrações de deformação axial da ligação P=O e ligação P-O do grupo fosfato em aproximadamente 1150 cm^{-1} e $1040\text{-}910\text{ cm}^{-1}$, respectivamente (SILVERSTEIN *et al.*, 2006). A Figura 5.7 mostra as regiões citadas acima com zoom.

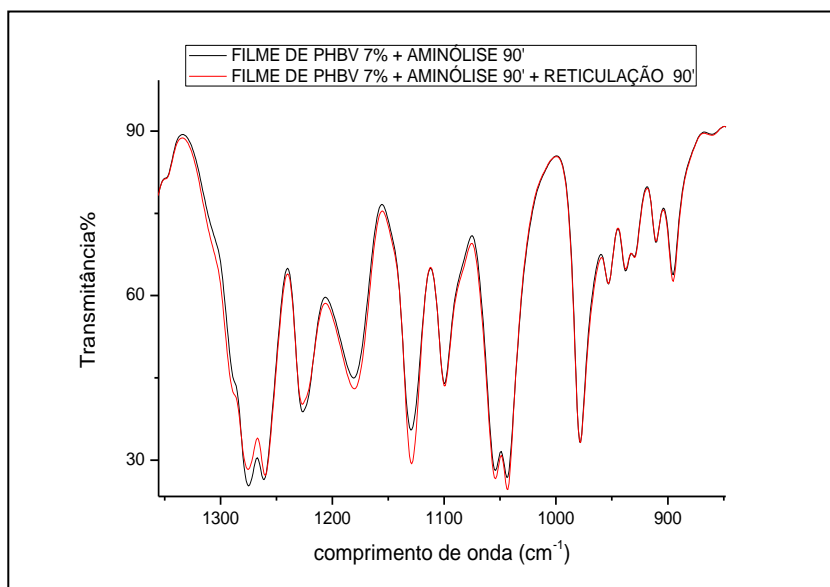


Figura 5.7. Imagem sobreposta dos espectros de FTIR dos filmes de PHBV-A90 e PHBV-A90/R90.

Os filmes foram caracterizados quanto à hidrofiliabilidade antes e após as modificações. A Tabela 5.2 mostra a correlação entre os ângulos de contato obtidos utilizando os filmes de PHBV 7% modificados por aminólise e/ou reticulação. De uma forma geral os resultados mostram um ganho de hidrofiliabilidade dos filmes em função do tempo crescente de modificação. Este ganho era esperado na aminólise em função da geração de grupamentos aminos e hidroxilas nos terminais de cadeia influenciando diretamente nas propriedades de superfície do biomaterial. Já o tripolifosfato de sódio induz a reticulação iônica entre os íons tripolifosfato e os grupos amino protonados do PHBV. A reticulação também confere características hidrofílicas ao material modificado em razão da introdução destes grupamentos polares.

Tabela 5.2. Efeito da modificação da superfície sobre o ângulo de contato dos filmes PHBV-A/R. DP = desvio padrão.

MATERIAL	ÂNGULO DE CONTATO \pm DP ($^{\circ}$)	TEMPO DE AMINÓLISE/RETICULAÇÃO (minutos)
PHBV-A90	84,64 \pm 4,45	90/-
PHBV-A120	73,09 \pm 2,16	120/-
PHBV-A90/R30	60,83 \pm 2,06	90/30
PHBV-A90/R60	65,30 \pm 1,23	90/60
PHBV-A90/R90	61,98 \pm 3,8	90/90
PHBV-A90/R120	58,10 \pm 4,32	90/120
PHBV-A120/R30	64,57 \pm 1,17	120/30
PHBV-A120/R60	56,73 \pm 4,98	120/60
PHBV-A120/R90	54,46 \pm 2,18	120/90
PHBV-A120/R120	67,03 \pm 1,20	120/120

Por consequência da reticulação do material, os grupamentos aminos de promoção da síntese peptídica localizados na superfície do material foram perdidos. Logo, foi realizada uma etapa de modificação por introdução do ligante beta-alanina na superfície do material conforme a metodologia descrita por Frank e Overwin (1996). A modificação ocorre nos grupamentos hidroxilas incorporados pela aminólise e, também, nos terminais de cadeia do polímero.

A Figura 5.8 mostra os espectros de FTIR dos filmes de PHBV-A90/R90 e destes mais a incorporação do ligante beta-alanina (PHBV-A90/R90 + β -Ala). A modificação é evidente em razão da banda em 1674 cm^{-1} que corresponde à deformação angular simétrica da ligação N-H de amins primárias, normalmente de intensidade de média a forte (SILVERSTEIN *et al.*, 2006). Os filmes de PHBV-A90/R90 + β -Ala foram considerados ideais para a síntese em razão das suas características químicas.

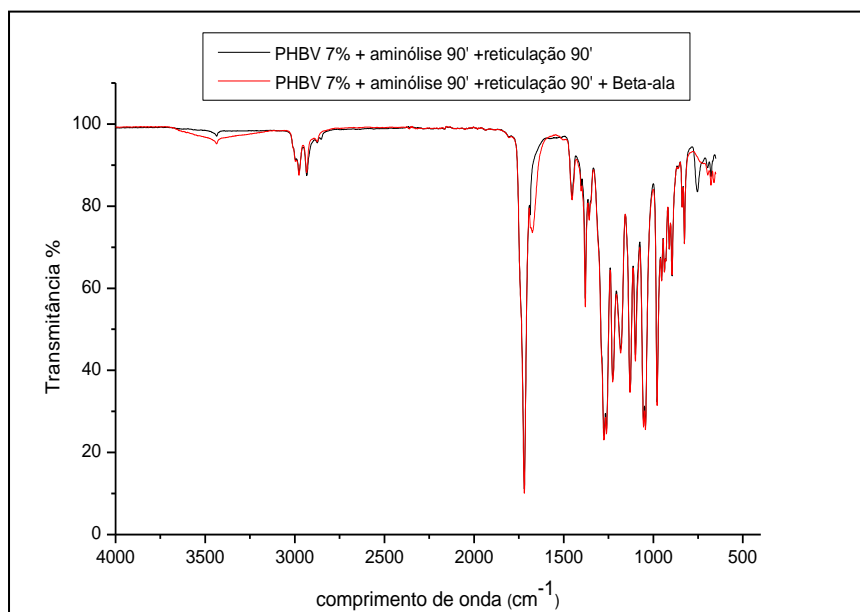


Figura 5.8. Imagem sobreposta de espectros de FTIR dos filmes de PHBV-A90/R90 e PHBV-A90/R90 + β -Alanina.

5.3. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE *SPOT SYNTHESIS*

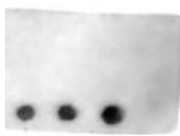
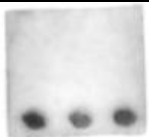
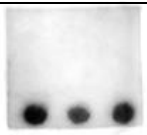
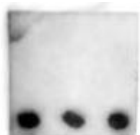



Além de modificar quimicamente o suporte de PHBV para adequá-lo ao método, foi necessário realizar paralelamente alterações no procedimento de *Spot Synthesis*. Vale ressaltar que este procedimento de padronização se deu no decorrer da síntese de peptídeos imunogênicos conjugados a peptídeos RGD sobre a membrana de celulose utilizada como suporte padrão na metodologia. Inicialmente, as modificações submetidas ao método envolveram a redução no número de lavagens com solvente dimetilformamida (DMF) em 2 vezes por 2 minutos a cada ciclo de síntese, ou seja, a cada adição de um resíduo de aminoácido. Esta modificação visa garantir a integridade do material em razão da natureza polar do solvente. Além disso, uma mistura ácida de ácido acético e ácido clorídrico em diferentes proporções foi avaliada em substituição ao ácido trifluoroacético (TFA) empregado na etapa de desproteção da cadeia lateral do peptídeo. Ao final da síntese, o solvente diclorometano (DCM) foi substituído pelo solvente dimetilformamida (DMF) já que os filmes de PHBV são sabidamente solúveis em solventes halogenados.

Discriminando cada uma das modificações estabelecidas anteriormente, têm-se: a primeira modificação refere-se ao método de *Spot Synthesis* padronizado pelo laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos (LABIP) da FIOCRUZ. A segunda

modificação refere-se à alteração no número de lavagens do solvente DMF por ciclo de síntese peptídica, de 4 vezes por ciclo para 2 vezes por ciclo. A terceira modificação está relacionada à substituição do solvente DCM por DMF após concluída a síntese peptídica somada à modificação anterior. As demais alterações estão relacionadas à mudança do reagente ácido trifluoracético (TFA) pela mistura de ácido acético (HOAc) e ácido clorídrico (HCl) somada às modificações anteriores. As modificações 4, 5, 6 e 7 envolvem o uso desta mistura de ácidos nas proporções 2:8, 4:6, 6:4 e 8:2 respectivamente. Esta mistura de ácidos corresponde à solução de desproteção da cadeia lateral dos peptídeos, sendo esta uma etapa crítica deste procedimento em razão do filme de PHBV ser suscetível a hidrólise ácida. A membrana de celulose foi deixada nesta solução com 95% de ácido por 3 horas. As modificações estabelecidas no método estão relacionadas com o rendimento de síntese alcançado, sendo passíveis de serem visualizados em razão da revelação por quimioluminescência. Estes dados são mostrados na tabela 5.3.

Todas estas modificações aplicadas ao método de *Spot Synthesis* foram relacionadas frente ao rendimento alcançado quando estabelecidas as condições ideais instituídas pelo fabricante. Desse modo, foi realizado um ensaio de imunodeteção para detecção dos peptídeos imunogênicos conjugados a sequência RGD. Na sequência, a membrana de celulose imobilizada com os peptídeos introduzida no Fotodocumentador, equipamento capaz de obter imagens digitais de reações de quimioluminescência sucedidas sobre os *spots*, pontos onde ocorre efetivamente a imobilização dos peptídeos sobre a membrana. A partir destas imagens é possível observar como as diversas modificações submetidas ao método de *Spot Synthesis* afetaram o rendimento final da síntese peptídica. A tabela 5.3 mostra as imagens das membranas de celulose recortadas após o ensaio de detecção realizado em triplicata segundo cada modificação estabelecida neste trabalho.

Tabela 5.3. Imagens da membrana padrão imobilizada com peptídeos sintetizados em triplicata frente às modificações estabelecidas ao método de *Spot Synthesis*.

Tipo de Modificação		Imagem das membranas após revelação por Quimioluminescência
1	Procedimento padrão	
2	Lavagem com DMF 2x	
3	Lavagem com DMF 2x + uso de DMF	
4	Lavagem com DMF 2x + uso de DMF + HOAc:HCl (2:8)	
5	Lavagem com DMF 2x + uso de DMF + HOAc:HCl (4:6)	
6	Lavagem com DMF 2x + uso de DMF + HOAc:HCl (6:4)	
7	Lavagem com DMF 2x + uso de DMF + HOAc:HCl (8:2)	

O *software* TotalLab TL 100 foi utilizado para a análise em percentual da reatividade, sendo que o *spot* com reatividade mais intensa na membrana foi assinalado como tendo 100% de intensidade, e todos os outros *spots* tiveram os seus valores de intensidade expressos em porcentagem relativa. Assim, foi possível avaliar o rendimento total da metodologia de *Spot Synthesis* frente às modificações submetidas ao método como mostra a Figura 5.9.

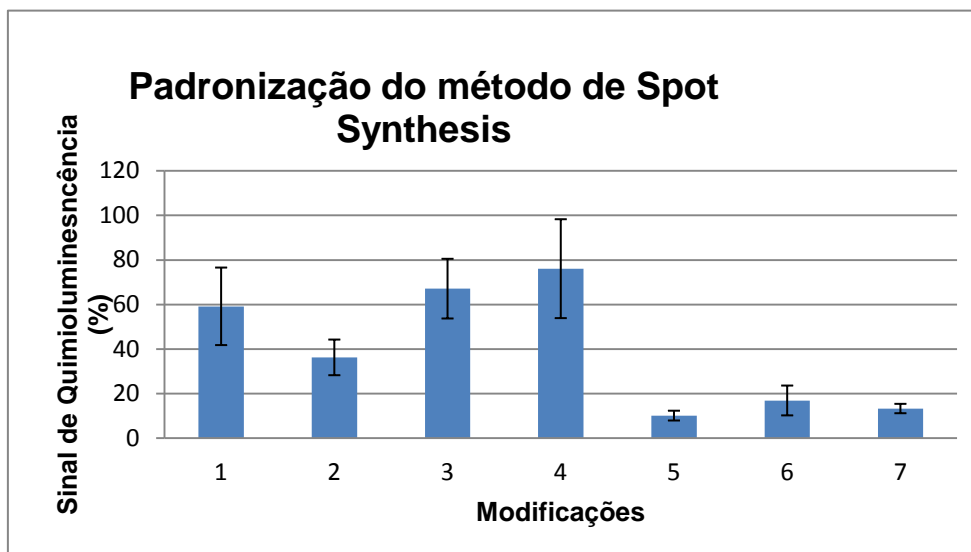


Figura 5.9. Avaliação das modificações estabelecidas ao método de *Spot Synthesis* (Tabela 5.3) para adequação dos filmes de PHBV modificados.

Considerando os procedimentos de padronização estabelecidos em 1,2 e 3, os filmes de PHBV não são passíveis de adequação sob estas condições em razão do ácido forte – Trifluoracético – ser utilizado na etapa de desproteção de cadeia lateral. Em relação a condição 4, apesar da excelente eficiência alcançada no somatório das modificações, o filme de PHBV não resistiu a alta concentração da mistura de ácidos em razão da alta proporção do ácido forte, ácido clorídrico. Em relação às modificações 5, 6 e 7, observou-se uma baixa eficiência de síntese considerando todas as modificações aplicadas ao método de *Spot Synthesis*. Apesar disso, o filme de PHBV manteve a sua integridade frente às modificações estabelecidas em 6 e 7.

Em função destes resultados e apesar das modificações avaliadas, foi verificada a impossibilidade de utilização de filmes de PHBV como suporte para a técnica de *Spot Synthesis*. Desta forma, foi definido que o peptídeo RGD seria sintetizado separadamente e posteriormente imobilizado sobre a superfície do material tratado. Como alternativa foi empregada uma nova tecnologia de imobilização de peptídeos conhecida como *Celluspot*.

5.4. MÉTODO DE *CELLUSPOT*

A técnica de *Celluspot* envolve duas etapas distintas: a primeira etapa compreende a síntese do peptídeo sobre uma membrana de celulose solúvel, segundo os mesmos princípios estabelecidos na metodologia de *Spot Synthesis*. A segunda etapa envolve a recuperação deste peptídeo, seguido por sua distribuição automatizada e, conseqüentemente, sua imobilização sobre a superfície do material. Basicamente, estas duas metodologias diferem quanto ao mecanismo de imobilização do peptídeo sobre o suporte polimérico. Por *Spot Synthesis*, a síntese é realizada com adição de um resíduo de aminoácido por vez diretamente sobre o suporte de interesse através de ligação covalente. Já a técnica de *Celluspot*, a imobilização é feita com o peptídeo completo via adsorção física por meio de interações como Van der Waals, dipolo-dipolo e ligação hidrogênio (FALSEY *et al.*, 2001). Além disso, esta técnica oferece condições de imobilização menos agressivas ao material (KATZ *et al.*, 2011).

5.4.1. Seleção do suporte de PHBV para imobilização

Foram realizadas análises por FTIR do suporte padrão empregado no método de *Celluspot* e do filme de PHBVA90/R60 a fim de avaliar a composição química de ambos. A Figura 5.10 mostra os espectros de FTIR sobrepostos dos materiais analisados e observa-se uma semelhança no perfil de bandas de absorção. Esta semelhança sugere uma composição química semelhante, principalmente ao avaliarmos as bandas próximas a região de 1.750 cm^{-1} . Considerando estas bandas no espectro, podemos associá-las à deformação axial da ligação C=O de ésteres (SILVERSTEIN *et al.*, 2006). Sendo que, a posição desta banda pode ser alterada por efeitos de conjugação. Por essa razão, foi constatado que ambos os materiais possuem a mesma natureza química.

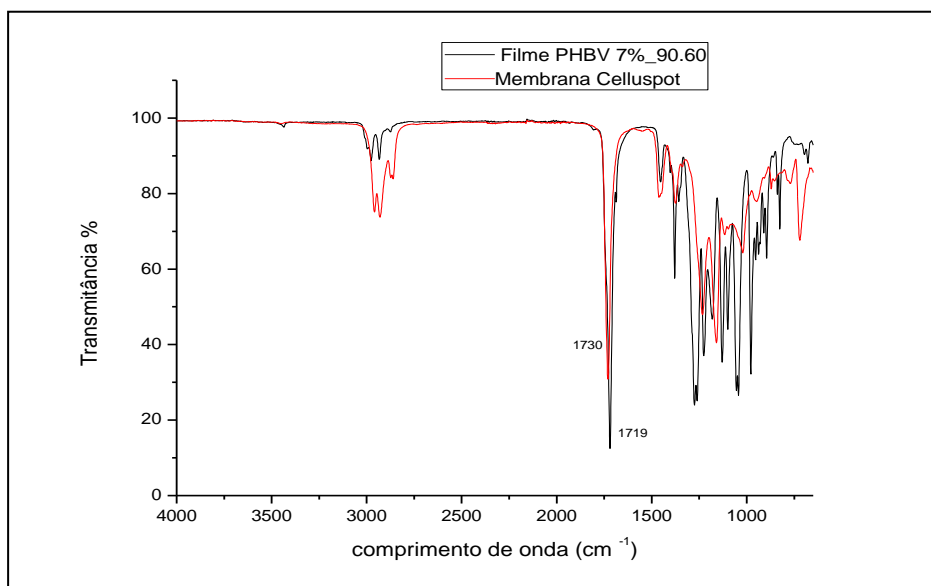


Figura 5.10. Imagem sobreposta de espectros de FTIR dos filmes de PHBV-A90/R60 e do suporte de *Celluspot*.

Visando garantir a imobilização do peptídeo RGD ao filme de PHBV, modificações foram submetidas ao material a fim de adequar suas propriedades de superfície. A variação do grau de hidrofiliicidade dos filmes em função das modificações via aminólise e/ou reticulação foram avaliadas por meio de medidas de ângulo de contato. Estes dados foram avaliados frente às características de superfície do suporte padronizado à técnica de *Celluspot*.

Com base nos dados obtidos de ângulo de contato para os filmes de PHBV aminolisados/reticulados, foram selecionados aqueles com características de superfície semelhantes ao suporte padrão de imobilização da técnica de *Celluspot*. Avaliando os filmes de PHBV-A90/R60 e PHBV-A120/R120 (vide tabela 5.2) houve um ganho de hidrofiliicidade de ambos os suportes em razão da diminuição do ângulo de contato. Correlacionando estes dados frente àquele valor de ângulo de contato obtido para o suporte padrão da metodologia de *Celluspot* (ângulo de contato \pm desvio padrão: $73,34^\circ \pm 3,31$) evidencia-se uma semelhança quanto ao grau de hidrofiliicidade das superfícies. Esta característica hidrofílica é essencial para adequação destes suportes ao método de *Celluspot*.

Depois de avaliado o grau de hidrofiliicidade dos filmes de PHBV modificados e, conseqüentemente, selecionados aqueles potencialmente suscetíveis à imobilização peptídica (PHBV-A90/R60 e PHBV-A120/R120), os filmes foram submetidos à

imobilização com peptídeos RGD conjugados com peptídeos imunogênicos para avaliar sua suscetibilidade quanto à biofuncionalização.

5.4.2. Avaliação da imobilização por Imunodeteção dos filmes de PHBV

Aos filmes de PHBV-A90/R60 e PHBV-A120/R120 foram imobilizadas sequências peptídicas RGD conjugadas a peptídeos imunogênicos permitindo assim a realização do ensaio de imunodeteção. Desse modo, foi possível avaliar a eficiência da imobilização de peptídeos sobre os diferentes filmes.

A Figura 5.11 mostra que os filmes PHBV-A90/R60 e PHBV-A120/R120 não apresentaram diferença significativa em percentual de imobilização do peptídeo. Porém, sabe-se que os filmes de PHBV-A90/R60 apresentam maior resistência física frente ao PHBV-A120/R120 em razão do maior tempo de aminólise, conforme mostram as Figuras 5.5 e 5.6, respectivamente. Além disso, Thiré *et al.* (2007) observaram por imagens de AFM que filmes de PHB aminolisados por 120 minutos apresentaram desgaste na superfície em função do longo período de tratamento. Desta forma, o filme de PHBV A90/R60 foi selecionado para fins de biofuncionalização com peptídeos RGD.

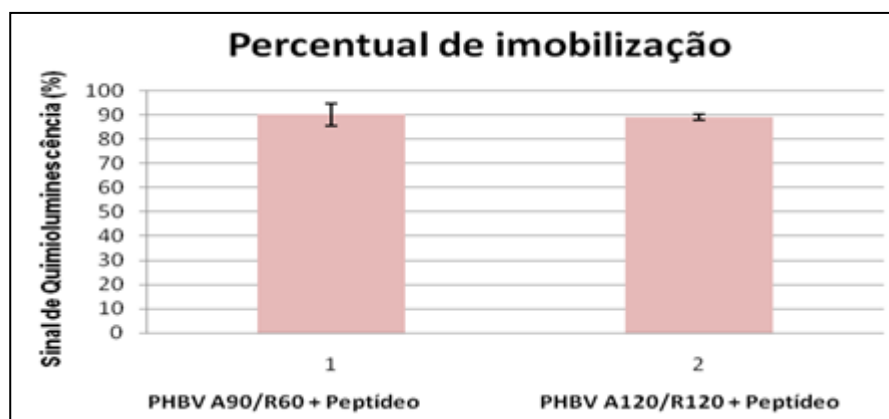


Figura 5.11. Percentual de imobilização dos peptídeos imobilizados sobre os filmes de PHBV-A90/R60 e PHBV-A120/R120 após a detecção por quimioluminescência.

5.4.3. Análise por MALDI da composição de aminoácidos do peptídeo que contém a sequência RGD

Foi realizada Espectroscopia de Massas por MALDI-imaging dos peptídeos imobilizados sobre as membranas de celulose com o objetivo de confirmar a sequência de aminoácidos através do peso molecular. Cada aminoácido que compõe a sequência foi inserido no site http://immweb.vet.uu.nl/P&P_fac/pepcalc.htm, conforme mostrado na Figura 5.12, respeitando a nomenclatura baseada no código de 1 letra para aminoácidos.

Peptide Mass Calculator v3.2

Sequence (C-terminal -> N-terminal):

N-terminal group: free amine

C-terminal group: acid

User defined residues:

1: 5:

2: 6:

3: 7:

4: 8:

Calculate: molecular mass using average masses

GO CLEAR FORM RESIDUE LIST

Note: Use one-character symbols for amino acids (V = valine, ...) or enter a user-defined residue (numbers 1-8). For N- and C-terminal groups: see predefined list, or select [other] and enter a mass.

Peptide Mass Calculator v3.2

average mass calculation for peptide:

ARGDGRGDGRGDG

N-terminal group : free amine

C-terminal group : acid

Molecular mass : 1245.2346

Close

Figura 5.12. Imagem do site http://immweb.vet.uu.nl/P&P_fac/pepcalc.htm.

Assim, o peso molecular do peptídeo total foi calculado com base na sua sequência de aminoácidos, para isso foi considerado que o grupo C-terminal dos peptídeos na forma acida. Já em relação ao grupamento N-terminal, considera-se o grupo amino livre. É importante lembrar que a análise por MALDI foi realizada em amostras da membrana de celulose com peptídeos imobilizados e desprotegidos em sua cadeia lateral. Não foram utilizados filmes de PHBV imobilizados com peptídeos RGD em razão da presença das fibras de celulose na superfície do material. Estas fibras geradas pela solubilização da membrana de celulose estão ligadas covalentemente aos peptídeos e são responsáveis pela imobilização destes aos filmes de PHBV por interação de Van der Waals.

O peptídeo foi detectado por Espectroscopia de Massas do tipo MALDI na forma monoprotonada com 1245,83 m/z (relação massa/carga) com abundância de praticamente 100% conforme destacado na Figura 5.13. Esta massa corresponde ao peso

do peptídeo imobilizado (RGD-G-RGD-G-RGD-G) somado a um resíduo do aminoácido alanina (A). Este resíduo funciona como sítio de imobilização dos peptídeos sobre a membrana de celulose solúvel e corresponde a uma modificação do material estabelecida pelo fabricante, sendo confirmada pela análise por MALDI-TOF-TOF. O pequeno desvio no valor de massa experimental e calculada são inferiores a 1 u.m.a, sendo que essas pequenas diferenças decimais são referentes ao erro experimental e resolução do equipamento, os quais se encontram dentro das condições analíticas permitidas. Um segundo pico de 1234,2 m/z também foi detectado pelo MALDI, e corresponde possivelmente a massa do peptídeo (RGD-G-RGD-G-RGD) com seu grupamento amino protegido por acetilação. Os demais picos estão relacionados à sequências peptídicas incompletas e, também, a fragmentos de sequências peptídicas.

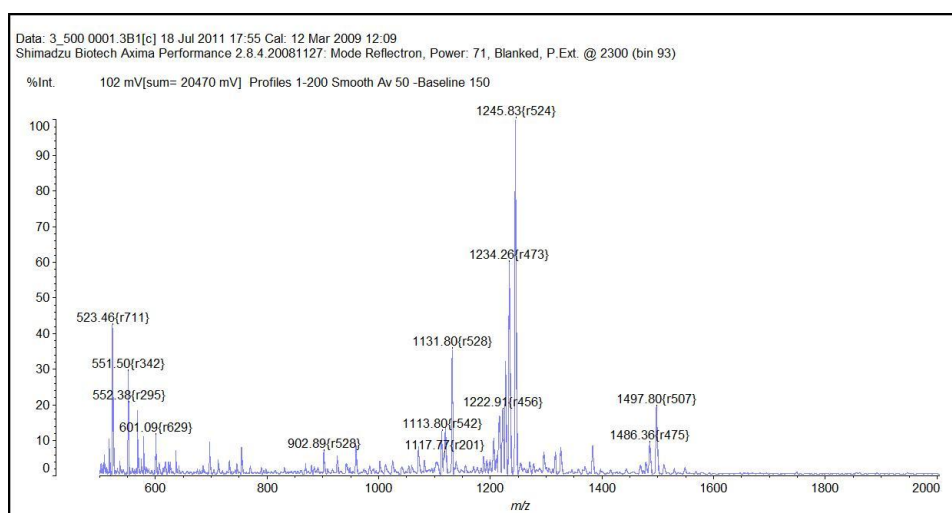


Figura 5.13. Espectro MALDI-Imaging do peptídeo (RGDGRGDGRGDG) imobilizado sobre as membranas de celulose.

5.4.4. Imobilização sob diferentes perfis de distribuição e concentração

Buscando avaliar a promoção da interação celular pelos peptídeos RGD proporcionada pelas etapas de adesão e espraiamento, foram estabelecidas diferentes distribuições de imobilização com os peptídeos sobre a superfície do filme PHBV-A90/R60. A visualização destas diferentes distribuições dos peptídeos RGD sobre os filmes de PHBV foi possível devido à utilização de sequências peptídicas imunogênicas conjugadas com peptídeos RGD.

A Figura 5.14 mostra os filmes de PHBV-A90/R60 após a imobilização das sequências peptídicas imunogênicas conjugadas ao RGD sob diferentes perfis de

distribuições confirmados por imunodeteção. A distribuição total (a) dos peptídeos sobre a superfície do material gerou 384 pontos de imobilização (*spots*) em uma área de 6 cm². Já a distribuição parcial (b) dos peptídeos sobre a superfície do material gerou 192 pontos de imobilização (*spots*) em uma mesma área.

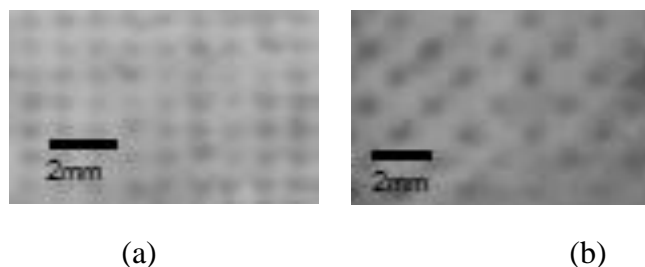


Figura 5.14. Filmes de PHBV-A90/R60 imobilizado com peptídeo imunogênico conjugado com RGD, a) imobilização total; b) imobilização parcial.

A partir destas diferentes distribuições de imobilização (192 e 384 spots) dos peptídeos sobre os filmes de PHBV foram definidas para teste três quantidades diferentes de massa do peptídeo RGD: 1 µg/*spot*, 100 ng/*spot* e 10 ng/*spot*. Quirk *et al.* (2001) fazem referência a estudos sobre a concentração mínima necessária deste motivador de adesão e espraiamento, sendo necessárias concentrações da ordem de 1-10 fmol (10⁻¹⁴ mol)/cm² de RGD para promover estágios iniciais de regeneração celular. Neste trabalho, a quantidade de peptídeos imobilizados supera esta limitação, visto que este valor de número de moles corresponde à massa de aproximadamente 3,5 pg (10⁻¹² g) de RGD/cm².

5.5. CARACTERIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DOS FILMES DE PHBV IMOBILIZADO COM PEPTÍDEOS CONTENDO RGD

5.5.1. Análise da composição dos filmes de PHBV por FTIR

Foram realizadas análises por FTIR dos filmes de PHBV-A90/R60 imobilizados com o peptídeo contendo RGD visando avaliar a presença de bandas de absorções características referentes a moléculas peptídicas. Dentre estas absorções destacam-se bandas referentes a ligações aminas e amidas. As Figuras 5.15 e 5.16 mostram os espectros de FTIR com zoom sobrepostos dos materiais analisados e observa-se uma banda bastante pronunciada em 1.541 cm⁻¹. Esta banda está presente em ambos os espectros referentes à imobilização de 1 µg/*spot* do peptídeo RGD, seja na distribuição

com 384 *spots*, quanto com 192 *spots*. A banda está associada à deformação angular de NH_2 ou de NH de amidas e envolve o acoplamento da deformação com outras vibrações fundamentais (SILVERSTEIN *et al.*, 2006). Logo, esta banda de amida confirma a imobilização do peptídeo RGD sobre o filme de PHBV, visto que a ligação peptídica entre os resíduos de aminoácidos corresponde a ligação amida.

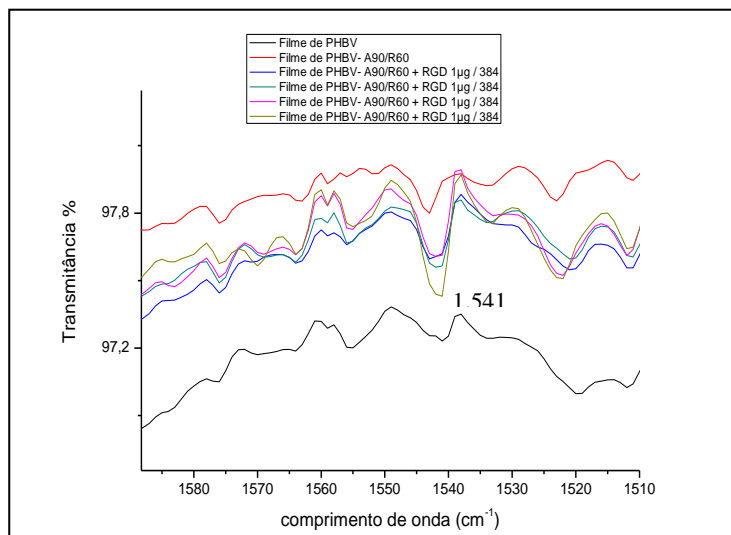


Figura 5.15. Imagem sobreposta com zoom dos espectros de FTIR dos filmes de PHBV sem modificação, PHBV-A90/R60 e dos filmes PHBV-A90/R60 + 1 µg/*spot* do peptídeo RGD em 384 distribuições.

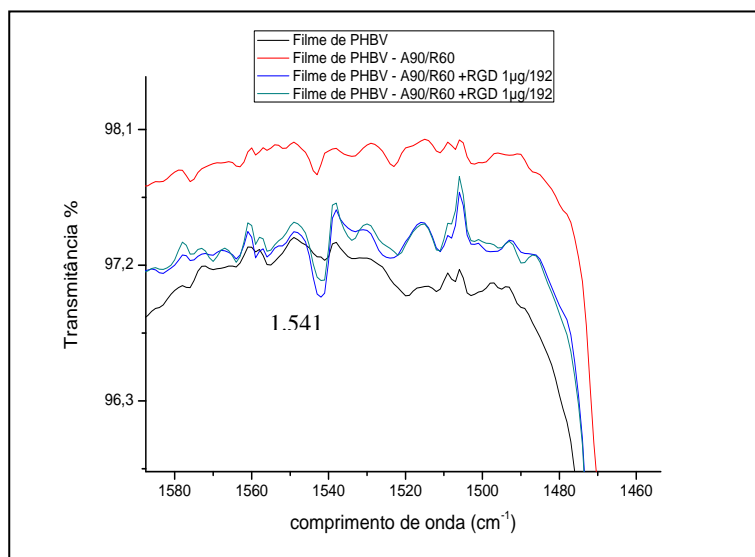


Figura 5.16. Imagem sobreposta com zoom dos espectros de FTIR dos filmes de PHBV sem modificação, PHBV-A90/R60 e dos filmes PHBV-A90/R60 + 1 µg/*spot* do peptídeo RGD em 192 distribuições.

Nas demais análises realizadas nos filmes de PHBV imobilizados com 100ng/spot e 10 ng/spot, não foram possíveis de visualizar a presença destas bandas ou de qualquer outra banda característica provavelmente devido à limitação quanto à sensibilidade do equipamento de FTIR.

5.5.2. Grau de hidrofiliidade dos filmes de PHBV modificados

Esta análise mostra a variação da molhabilidade dos filmes de PHBV-A90/R60 antes e após a imobilização dos peptídeos RGD. A Tabela 5.4 apresenta os valores de ângulo de contato obtidos para os filmes de PHBV-A90/R60 e PHBV-A90/R60 biofuncionalizados com peptídeos RGD nas duas distribuições (192 e 384 spots) e nas três concentrações estabelecidas (1µg/spot, 100 ng/spot e 10 ng/spot) em relação aos filmes PHBV-A90/R60.

Tabela 5.4. Ângulo de contato dos filmes de PHBV-A90/R60 biofuncionalizados com peptídeos RGD e não funcionalizados.

MODIFICAÇÃO	MATERIAL	ÂNGULO DE CONTATO ± DP (°)
1	PHBV-A90/R60	72,8 ± 1,9
2	PHBV-A90/R60 + 10ng de RGD/192	66,0 ± 2,8
3	PHBV-A90/R60 + 10ng de RGD/384	69,9 ± 1,7
4	PHBV-A90/R60 + 100ng de RGD/192	39,1 ± 9,1
5	PHBV-A90/R60 + 100ng de RGD/384	25,8 ± 5,2
6	PHBV-A90/R60 + 1µg de RGD/192	31,8 ± 4,0
7	PHBV-A90/R60 + 1µg de RGD/384	20,2 ± 1,9

Os valores de ângulo de contato encontrados para os filmes de PHBV-A90/R60 imobilizados com o peptídeo RGD mostraram uma relação de decréscimo em relação a crescente concentração do peptídeo e, também, em relação ao número crescente de spots sobre a superfície do material. Esta relação pode ser melhor visualizada na Figura 5.17.

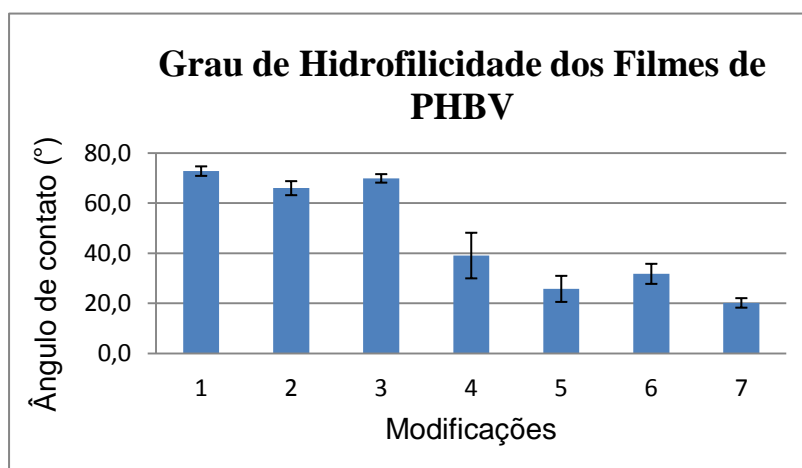


Figura 5.17. Medida de hidrofilicidade dos filmes de PHBV antes e após a biofuncionalização com RGD. As modificações 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 correspondem aos filmes de PHBV-A90/R60, PHBV-A90/R60 com 10ng de RGD/192, 10ng de RGD/384, 100ng de RGD/192, 100ng de RGD/384, 1 μ g de RGD/192 e 1 μ g de RGD/384, respectivamente.

Assim, este aumento significativo da hidrofilicidade dos filmes de PHBV-A90/R60 biofuncionalizados com RGD está atrelado à maior concentração dos peptídeos imobilizados na superfície do suporte e, também, ao maior número de spots ou pontos de imobilização dos peptídeos dispostos sobre a superfície dos filmes.

Considerando que a molhabilidade pode ser descrita como uma avaliação da afinidade do líquido com a superfície sólida e é possível relacioná-la com a energia de superfície e o ângulo de contato (θ). Quando uma gota líquida é colocada sobre uma superfície sólida, esta irá se espalhar sobre a superfície ou permanecerá em forma de gota. O ângulo θ , formado entre o líquido e o sólido, é conhecido como ângulo de contato. A Figura 5.18 mostra como θ está diretamente relacionado com as três tensões superficiais das interfaces: sólido-vapor (γ_{SV}), líquido-vapor (γ_{LV}) e sólido-líquido (γ_{SL}) (SMITH, 1980).



Figura 5.18. Representação esquematizada do ângulo de contato sobre uma superfície plana (adaptado de SMITH, 1980).

Superfícies sólidas com $\theta < 90^\circ$, possuem maior molhabilidade e conseqüentemente maior energia de superfície. Sólidos com $\theta > 90^\circ$ possuem menor molhabilidade, menor energia de superfície (SMITH, 1980). Assim, a partir dos dados citados acima se observa que as amostras modificadas com peptídeos RGD (10ng de RGD/192 e 10ng de RGD/384) e modificadas apenas por aminólise e reticulação apresentaram considerável molhabilidade. Entretanto, os filmes com 100ng/spot de RGD e 1 μ g/spot de RGD em ambas as distribuições apresentaram molhabilidade superior em relação às demais.

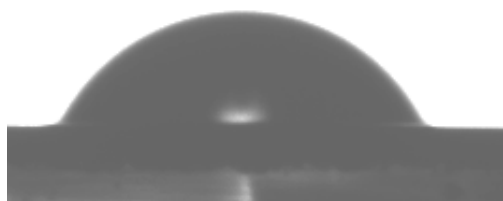
As Figuras 5.19 e 5.20 mostram as imagens das gotas (0,2 mL cada) sobre os filmes de PHBV-A90/R60 imobilizados com o peptídeo RGD e não biofuncionalizados, obtidas pelo goniômetro, com seus respectivos valores de ângulo de contato

(a) PHBV-A90/R60: $\theta = 72,8^\circ \pm 1,9$

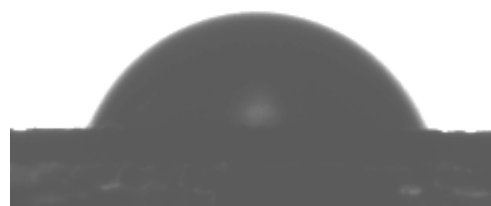


(b) PHBV-A90/R60 + 10ng RGD/192

$$\theta = 66,0^\circ \pm 2,8$$



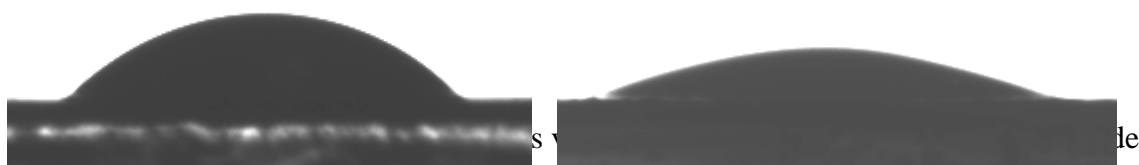
(c) PHBV-A90/R60 + 10ng RGD/384



(d) PHBV-A90/R60 + 100ng RGD/192

(e) PHBV-A90/R60 + 100ng RGD/384

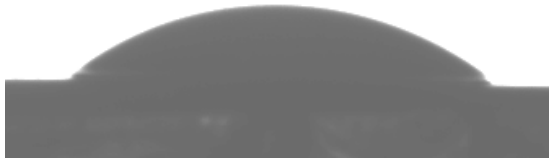
$$\theta = 25,8^\circ \pm 5,2$$



ângulo de contato sobre o filme não funcionalizado (a) e os filmes biofuncionalizados (b), (c), (d) e (e).

(c) PHBV-A90/R60 + 1 μ g RGD/192

$$\theta = 31.8^\circ \pm 4.0$$



(d) PHBV-A90/R60 + 1 μ g RGD/384

$$\theta = 20.2^\circ \pm 1.9$$



Figura 5.20. Imagens, e seus respectivos valores, das gotas obtidas durante a análise de ângulo de contato sobre os filmes biofuncionalizados (a) e (b).

A partir das imagens das gotas obtidas durante a análise de ângulo de contato, foi observado um aumento significativo da hidrofiliabilidade do filme de PHBV-A90/R60 frente às modificações impostas. Sendo que, esse ganho de hidrofiliabilidade foi mais expressivo nas modificações envolvendo a distribuições com 384 *spots* em imobilização com 100 ng e 1 μ g de RGD/*spot* sobre a superfície do material. Esses dados confirmam que os peptídeos foram incorporados à superfície do material.

Com base nas imagens obtidas evidencia-se que não houve molhabilidade total da superfície do filme, fenômeno conhecido como superhidrofiliabilidade que está relacionado tanto ao aumento da concentração de grupamentos oxigenados (-COOH e -OH) no material (ARIMA *et al.*, 2007; WEI *et al.*, 2009), quanto ao aumento da rugosidade da superfície. Dessa forma, conforme dados citados na literatura por Ma *et al.* (2007), estes dados contribuem para a importância da moderada hidrofiliabilidade, que tem sido requerida no desenvolvimento e aplicação de novos materiais, devido a capacidade de promoverem uma apropriada de adsorção de proteínas preservando a conformação natural das mesmas e assim, desencadeando a resposta inicial da interação célula/biomaterial. Superfícies que apresentam alta hidrofiliabilidade podem repelir as moléculas de proteína e inibir o processo de adsorção. As superfícies hidrofóbicas favorecem a adsorção de proteínas sob condições aquosas, porém as mesmas podem induzir fortemente a adsorção irreversível e desnaturar a conformação nativa das proteínas, prejudicando sua bioatividade (MA *et al.*, 2007).

5.5.3. Energia de superfície dos filmes de PHBV modificados

Visando o estudo das forças atrativas na superfície dos filmes de PHBV-A90/R60 biofuncionalizados, foi avaliada a energia de superfície antes e após a imobilização com peptídeos RGD. A Figura 5.21 mostra a variação da energia de superfície e de suas componentes polar e dispersiva em função do tipo de imobilização imposta aos filmes de PHBV.

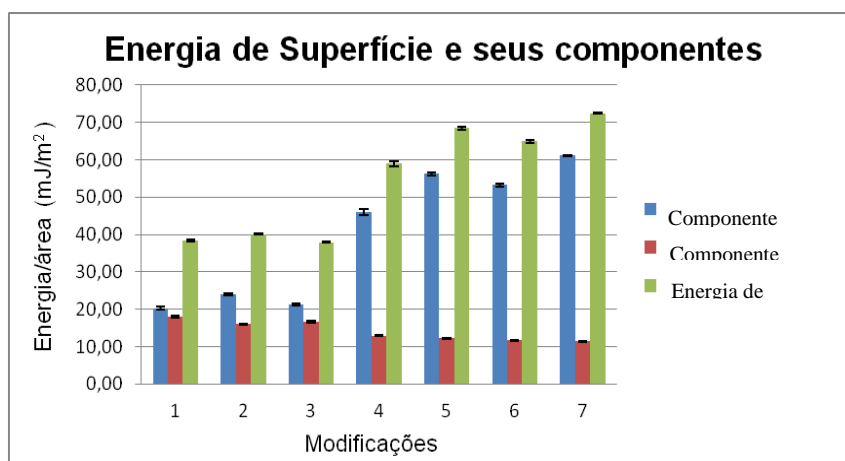


Figura 5.21. Energia de Superfície e seus componentes dos filmes de PHBV-A90/R60 biofuncionalizados e não funcionalizado. As modificações 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 correspondem aos filmes de PHBV-A90/R60, PHBV-A90/R60 com 10ng de RGD/192, 10ng de RGD/384, 100ng de RGD/192, 100ng de RGD/384, 1µg de RGD/192 e 1µg de RGD/384, respectivamente.

O estudo das forças atrativas nas interfaces entre o líquido e o sólido sugere que a energia livre total numa superfície seja a soma de contribuições de diferentes forças intermoleculares. Assim, a energia de superfície pode ser dada pela equação ($\gamma = \gamma_P + \gamma_D$). Onde P e D referem-se, respectivamente, à componente polar e dispersiva (não polar) da energia de superfície. A componente polar inclui todas as interações entre o sólido e o líquido, tais como dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido, ligações de hidrogênio, etc, enquanto que a componente dispersiva é resultante de interações de dipolo Momentâneo (HSIEH *et al.*, 2004).

Com base nos dados mostrados na Figura 5.21, observa-se que a energia de superfície é função da componente polar. Sendo que essa relação entre a energia de superfície total e o componente polar foi evidenciada para valores de concentrações do peptídeo RGD a partir de 100 ng/spot. Este dado se justifica em razão da expressiva concentração de peptídeos carregados na superfície dos filmes, o que reflete na sua

componente polar e, por consequência, na energia de superfície total. Em relação as mesmas concentrações de 100 ng/spot e 1 µg/spot para as diferentes distribuições (192 e 384 spots/área) foi observado um aumento considerável na componente polar e, por consequência, na energia de superfície.

É sempre importante ressaltar a importância das propriedades de superfície dos biomateriais, as quais atuam como papel fundamental no processo de adesão das células adjacentes. A adesão celular e seu espreadimento no biomaterial são, entre outros fatores, dependente da molhabilidade da superfície do material. Medidas de molhabilidade do material, expressas pelo ângulo de contato na presença de diferentes líquidos, correspondem a um índice de citocompatibilidade. Estudos realizados com materiais poliméricos como o politetrafluoretileno (PTFE), borracha de silicone (SR) e polietileno de alta densidade (HDPE) por Hallab *et al.* (2001) mostram que a energia de superfície representa um fator determinante, e pode ser mais útil do que rugosidade da superfície para dirigir a adesão e colonização de células de fibroblastos sobre estes materiais para aplicação no campo da Engenharia Tecidual.

Estudo realizado por Kubies *et al.* (2011) avaliaram o efeito das propriedades de superfície de materiais para implante ósseo como rugosidade e energia de superfície sobre a interação com células de osteoblastos humanos. A baixa proliferação celular foi associada ao material polimérico testado (polietileno) em razão da componente polar da energia de superfície estar próxima a zero. Neste trabalho os autores concluem que a adesão celular está diretamente relacionada a componente polar da energia de superfície. Além disso, é destacado neste trabalho que a molhabilidade da superfície corresponde a um fator significativo sobre a atividade de osteoblastos em superfícies muito pouco rugosas.

5.5.4. Ultraestrutura dos filmes de PHBV por MEV

Foram realizadas análises por MEV dos filmes de PHBV imobilizados com o peptídeo RGD com 10 ng/spot e 1µg/spot em ambas as distribuições, com 192 e 384 spots na superfície. Além disso, foram avaliados os filmes de PHBV sem modificação; apenas aminolisado por 90 minutos; aminolisado por 90 minutos e reticulado por 60 minutos e imobilizado apenas com celulose.

A Figura 5.22 mostra as micrografias eletrônicas de varredura da superfície dos filmes de PHBV sem modificação, dos filmes modificados por aminólise (PHBV-A90),

dos filmes modificados por aminólise e reticulação (PHBV-A90/R60) e dos filmes de PHBV-A90/R60 com celulose. A Figura 5.23 mostra as imagens da superfície dos filmes de PHBV-A90/R60 após a imobilização de diferentes concentrações de peptídeo e em diferentes distribuições.

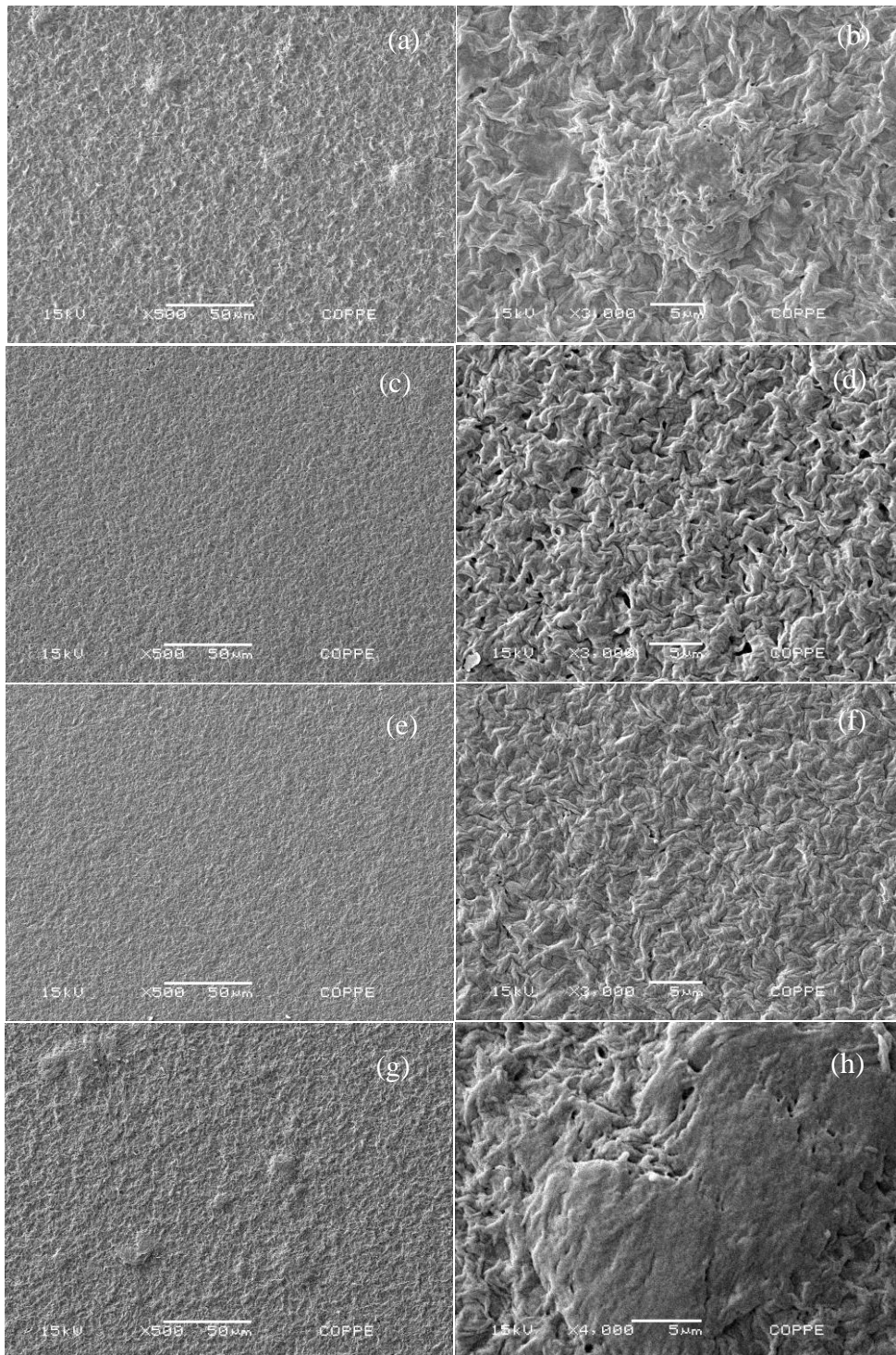


Figura 5.22. Imagens de MEV da superfície dos filmes de PHBV sem modificação (a)500x e (b) 3000x; filmes de PHBV-A90 (c) 500x e (d) 3000x; PHBV-A90/R60 (e)500x e (f) 3000x e PHBV-A90/R60 + celulose (g)500x e (h)4000x.

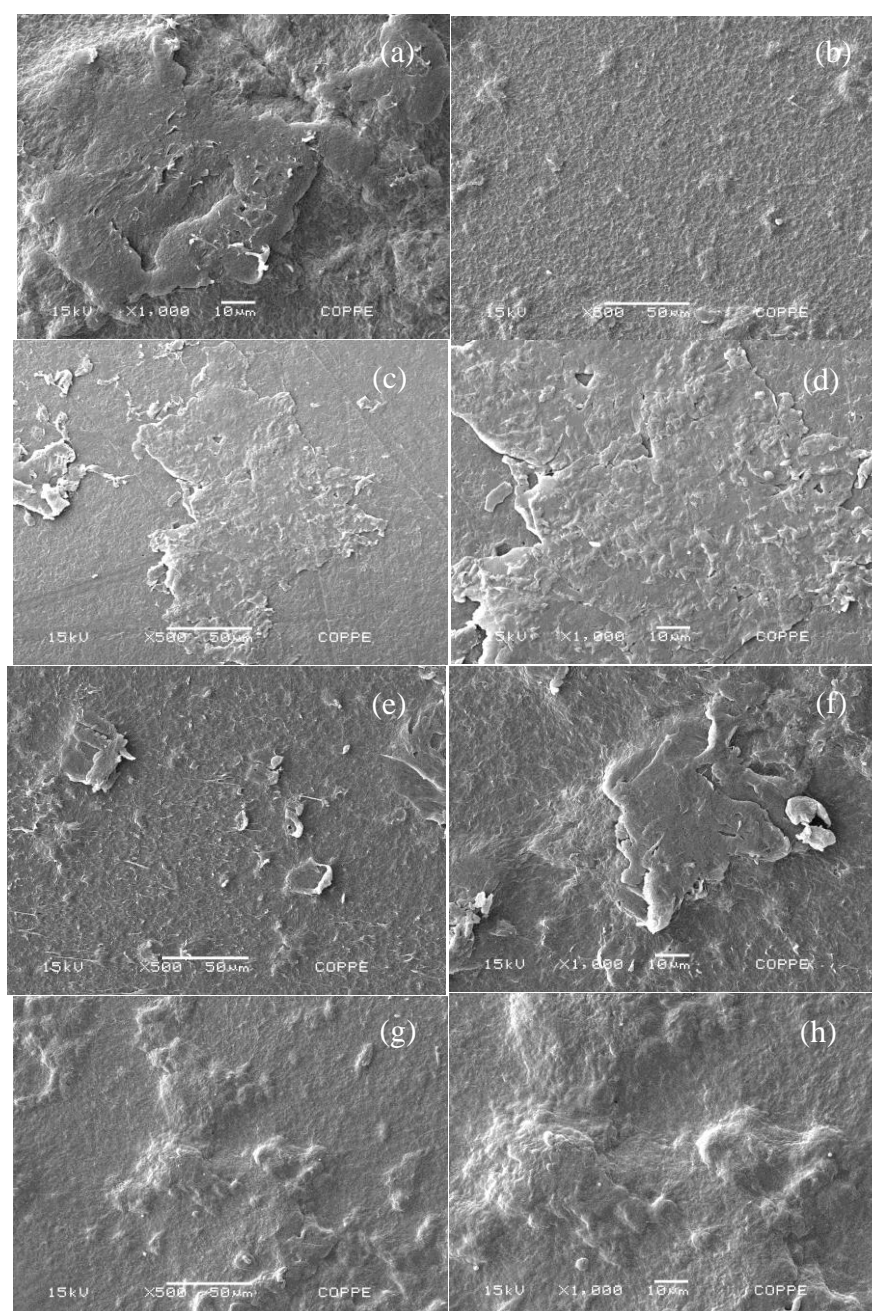


Figura 5.23. Imagens de MEV da superfície dos filmes de PHBV-A90/R60 com 10ng de RGD/spot em 192 distribuições/área (a) 500x e (b) 1000x; com 1µg de RGD/spot em 192 distribuições/área (c) 500x e (d) 1000x; com 10ng de RGD/spot em 384 distribuições/área (e) 500x e (f) 1000x e com 1µg de RGD/spot em 384 distribuições/área (g) 500x e (h) 1000x.

Analisando a Figura 5.22, as imagens (a) e (b) correspondem aos filmes de PHBV sem modificação e apresentam pequenas alterações na malha polimérica do material,

provavelmente originadas em razão da solubilização insuficiente durante o preparo da solução de PHBV, e pequenos poros, possivelmente formados pela evaporação do solvente clorofórmio. Analisando as imagens (c) e (d) que correspondem ao filme de PHBV-A90, é evidente que a reação de aminólise proporcionou uma maior uniformidade na superfície do material. Além disso, pode ser observado que a modificação proporcionou a formação de poros na superfície, possivelmente devido à reação de hidrólise que ocorre simultaneamente aminólise, causando a quebra das cadeias poliméricas. Já em relação ao filme de PHBV-A90/R60, evidenciados nas imagens (e) e (f) da Figura 5.21, a malha polimérica apresentou um aspecto ainda uniforme, emaranhado e sem a presença de poros, o que configura que o processo de reticulação foi realizado de maneira eficiente. Em todas estas imagens foi possível visualizar uma rede distorcida com grande quantidade de reentrâncias. Essas reentrâncias observadas podem ser atribuídas às cadeias de PHBV.

As imagens (g) e (h) da Figura 5.22 correspondentes ao filme de PHBV-A90/R60 + celulose apresentaram grandes aglomerados em toda superfície do material, é provável que esta alteração corresponda às fibras de celulose, oriundas do processo de imobilização dos peptídeos contendo RGD, já que a celulose está ligada covalentemente aos peptídeos, neste material não há peptídeos imobilizados.

A Figura 5.23 mostra que os filmes de PHBV-A90/R60 com peptídeo RGD em ambas as distribuições (192 e 384 *spots*/área) apresentaram alterações significativas na superfície do material em relação ao filme de PHBV-A90/R60, sendo que o filmes na distribuição de 192 *spots*/área apresentou mais regiões sem material depositado em comparação a imagens obtidas na distribuição de 384 *spots*/área, estas imagens são mostradas na Figura 5.24. Estas variações de regiões adesivas e não adesivas configuram um importante aspecto a ser considerado no ensaio de adesão. Vale ressaltar também, que as alterações observadas na superfície dos filmes de PHBV sem modificação e aquelas apresentadas nos filmes correspondentes às imagens (g) e (h) da Figura 5.22 são bastante diferentes e correspondem a alterações de natureza distinta. As alterações visualizadas na superfície dos materiais, imagens (a)-(h) na Figura 5.23, mostram que a imobilização utilizando como agente de interação – a celulose - foi alcançada.

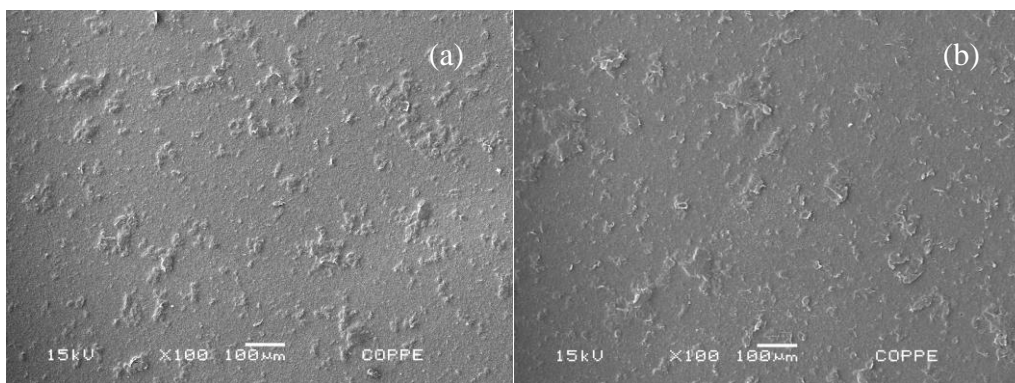


Figura 5.24. Imagens de MEV da superfície dos filmes de PHBV-A90/R60 com 10ng de RGD /spot em 192 distribuições/área 100x (a) e em 384 distribuições/área 100x (b).

5.5.5. Avaliação da rugosidade dos filmes de PHBV modificados

A análise de rugosidade média quadrática (RMS) das superfícies dos filmes de PHBV nas diferentes condições estabelecidas no presente trabalho foi realizada com base em imagens de topografia de 50 µm x 50 µm obtidas por AFM. A Figura 5.25 mostra o gráfico com os valores de rugosidade média obtidos para os filmes de PHBV modificados com peptídeos RGD, modificados por aminólise e reticulação e não-modificados.

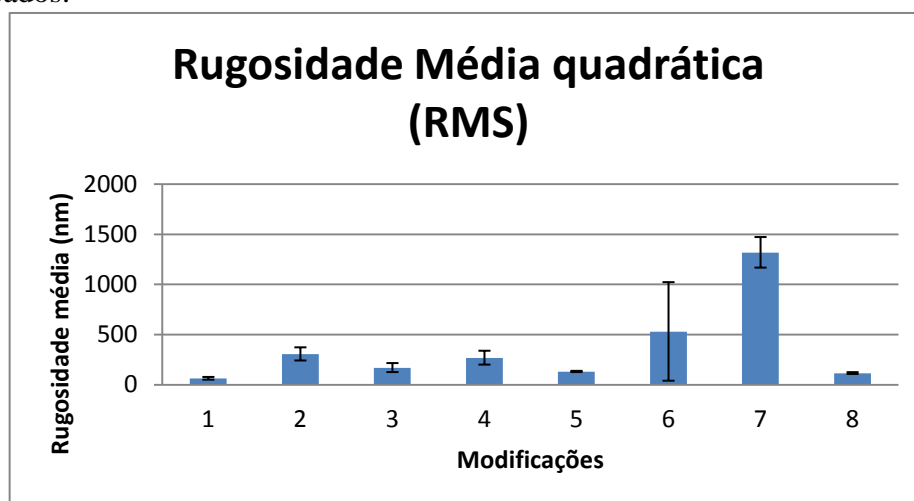


Figura 5.25. Rugosidade Média dos filmes de PHBV por AFM. As modificações 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 correspondem aos filmes de PHBV-A90/R60, PHBV-A90/R60 com 10ng de RGD/192, 10ng de RGD/384, 100ng de RGD/192, 100ng de RGD/384, 1µg de RGD/192 e 1µg de RGD/384, respectivamente. A condição 8 corresponde ao filme de PHBV puro.

A Microscopia de Força atômica também possibilita a visualização das superfícies dos materiais no formato 3D. A Figura 5.26 mostra imagens de microscopia de força atômica (AFM), em formato tridimensional, da superfície dos filmes de PHBV puro em de $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$ e os PHBV-A90R60 e após a imobilização dos peptídeos RGD nas diferentes condições impostas de $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$, vide Tabela 5.4, estabelecidas no presente trabalho.

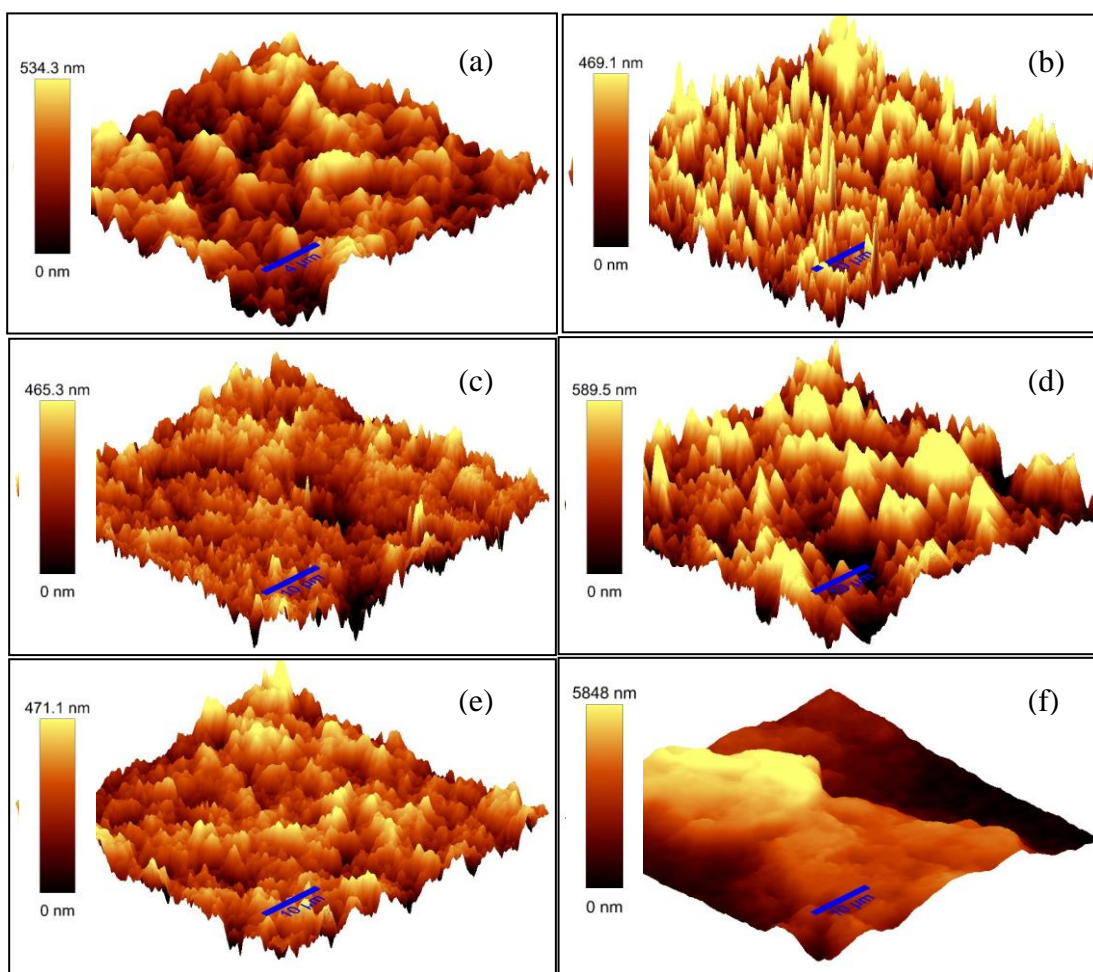


Figura 5.26. Imagens de microscopia de força atômica (AFM), em formato tridimensional, da superfície dos filmes de PHBV puro de $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$ (a); PHBV-A90/R60 (b); PHBV-A90/R60 com 10ng de RGD/192 (c); PHBV-A90/R60 com 10ng de RGD/384 (d); PHBV-A90/R60 com $1\mu\text{g}$ de RGD/192 (e); PHBV-A90/R60 com $1\mu\text{g}$ de RGD/384 (f) de $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$.

Analisando os dados do gráfico da Figura 5.25 é possível avaliar as diferenças nos valores de RMS para os diferentes tratamentos. O filme de PHBV puro apresentou uma ligeira elevação da rugosidade em relação ao filme de PHBV-A90/R60, este dado pode

ser contatado analisando as imagens 3D (a) devido a maior presença de vales na superfície. Os filmes de PHBV-A90R60 (condição 1) apresentaram em relação aos filmes de PHBV-A90/R60 + 100ng de RGD/384 (condição 5) uma ligeira diminuição no valor de RMS. Estes filmes biofuncionalizados apresentaram o menor valor de RMS em relação aos demais modificados com peptídeo RGD. Podemos considerar neste caso um rearranjo molecular, em razão das reações de aminólise e reticulação submetidas ao material assim, por consequência, “preenchendo” os possíveis vales contidos na superfície do material. Já analisando as condições de modificações 3 e 4 (para 10 ng/*spot*) e, 5 e 6 (para 100 ng/*spot*) foi observado, em ambos os casos, uma diminuição no valor de rugosidade média nas distribuições de 384 *spots*/superfície em relação a distribuição de 192 *spots*. Essa diminuição de rugosidade considerando a superfície de 384 *spots*/área é esperada já que essa distribuição possibilita uma maior homogeneidade na superfície, pois os pontos de imobilização dos peptídeos sobre o material estão mais próximos uns dos outros. Considerando as amostras 6 e 7, podemos atribuir essa alta rugosidade promovida e o desvio padrão mais acentuado em razão da elevada concentração de peptídeos imobilizados por área total de filme, principalmente no filme com 192 *spots*/área. Portanto, a partir destes dados de rugosidade, observamos que os métodos de preparação de superfície podem afetar significativamente as propriedades da superfície e subseqüentemente as respostas biológicas que ocorrem nessa superfície. Do ponto de vista *in vitro*, a resposta de células e tecidos em superfícies de implantes pode ser afetada macroscopicamente pela topografia ou geometria da superfície, bem como pela rugosidade da superfície.

A influência da rugosidade da superfície sobre a força de adesão é mostrada em estudos realizados por Hallab *et al.* (2001). No estudo há claramente um efeito da rugosidade da superfície, independente do tipo de material, na força de adesão celular. Outro aspecto a ser considerado em relação ao efeito da microestrutura superficial sobre a adesão celular é o tipo de célula. Existem células com características como afinidade por rugosidade de superfície, cujas superfícies rugosas são preferidas, como osteoblastos, macrófagos, células epiteliais e leucócitos e, células que são mais atraídas por superfícies lisas, como células gengivais (fibroblastos) (ELIAS *et al.*, 2004).

De acordo com Elias e Lima (2005), levando-se em consideração que a interação das células com o implante é afetada pela topografia do material em nível macroscópico e à rugosidade em nível microscópico, espera-se que o aumento da área superficial do implante, aumente o número de sítios possíveis para as células se ligarem, facilite o

crescimento dos tecidos e aumente a estabilidade mecânica. Porém, isto não é uma regra geral. Para os autores, a rugosidade da superfície deve ser controlada porque as células necessitam de pontos de ancoragem na superfície do implante para iniciar a proliferação e garantir a biofixação. Se a superfície possui rugosidade muito menor que o tamanho das células, poderá ocorrer ausência dos sítios de fixação. Por outro lado, se o implante possuir grandes números de picos ou vales, mas estes possuem superfícies lisas, as células, igualmente, não poderão se fixar.

Em estudo realizado por Kubies *et al.* (2011) foi possível observar que não há uma relação direta entre rugosidade de superfície e a adesão celular promovida por células de osteoblastos e fibroblastos, contrariando a tendência de favorecimento da rugosidade para células de osteoblastos citada por outros autores (ELIAS *et al.* 2004). Inclusive, eles concluem que a rugosidade maiores em termos de dimensões celulares não correspondem a um favorecimento da resposta celular.

Com base nas imagens de topografia referente à Figura 5.26 dos filmes dispostos em 3D [a – f], é claramente observado que as modificações alteraram de maneira significativa a superfície do material. Analisando as imagens (a) e (b) fica claro que as etapas de modificação por aminólise e reticulação alteraram a rugosidade da superfície tornando menos rugosa em relação ao filme de PHBV puro. Em relação às demais imagens de topografia observamos o efeito da concentração do peptídeo sobre a rugosidade da superfície dos filmes. As imagens (c) e (e) referentes aos filmes com 10ng de RGD/192 e com 1µg de RGD/192, respectivamente, apresentaram diferenças de rugosidade significativas por toda a superfície do material. Esta diferença está diretamente relacionada com a diferença de concentração do peptídeo imobilizado e representa um dado muito interessante a ser avaliado frente a sua acessibilidade celular. A topografia dos filmes imobilizados com 10ng de RGD/384 e com 1µg de RGD/384, respectivamente, apresentou-se completamente distinta. É mostrada na imagem (f) uma região da superfície com maior elevação e outra com menor elevação resultado da distribuição com 384 *spots*/área com elevada concentração de peptídeo. Na imagem (d) se observa uma distribuição homogênea de picos na superfície do material e na imagem (c) se observa poucos picos na superfície do material, em ambos os casos a topografia corresponde a superfícies de baixa rugosidade. Analisando as imagens (e) e (f) verificam-se irregularidades na distribuição de picos sobre a superfície do material o que corresponde a alta rugosidade. Esse elevado desnível observado na imagem (f)

corresponde a elevada concentração de peptídeos imobilizados na superfície do material gerado possivelmente pela união dos pontos de imobilização (*spots*).

5.6. TESTES BIOLÓGICOS *IN VITRO*

5.6.1. Análise de Citotoxicidade

A exposição das células de osteoblastos aos extratos provenientes dos diferentes filmes de PHBV modificados utilizados no teste não provocou morte celular. Os materiais avaliados foram: filme de PHBV com celulose (sem RGD); filme de PHBV com 10ng, 100ng e 1 µg de RGD em 384 *spots* distribuídos sobre a superfície do material. Além disso, como controle não-tóxico (negativo) foi utilizado o poliestireno por não causar nenhuma perturbação ao crescimento celular. Como controle tóxico (positivo) foi utilizado látex por se tratar de um material extremamente tóxico para as células. A análise estatística foi realizada pelo teste de normalidade de D'Agostino e Pearsons. Em seguida, foi aplicada uma Análise de Variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey, comparando todos os grupos experimentais.

Inicialmente, foi realizada a análise de Viabilidade Celular utilizando o ensaio de XTT. Este teste possibilita avaliar a atividade respiratória das células a partir da conversão mitocondrial do sal tetrazólio hidrossolúvel (XTT) de coloração amarela à formazana, um composto de coloração laranja. Enfim, este ensaio possibilita detectar células vivas. Os resultados obtidos estão expostos na Figura 5.27.

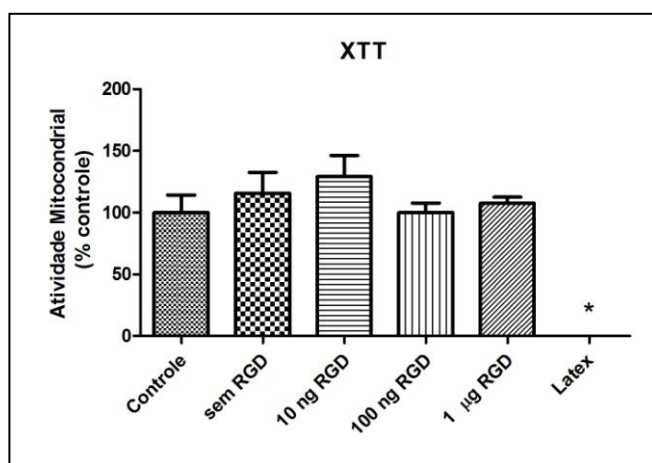


Figura 5.27. - Gráfico da análise de citotoxicidade baseado na atividade respiratória por XTT em células de osteoblastos. O asterístico (*) corresponde à diferença significativa em relação aos demais grupos determinado por análise estatística.

A partir dos dados obtidos neste ensaio utilizando XTT foi possível observar que a atividade respiratória das células de osteoblastos não foi afetada de maneira negativa pela exposição aos extratos obtidos a partir dos diferentes filmes de PHBV, pois nenhum dos dados está abaixo do valor encontrado para o controle negativo (poliestireno). Foram encontradas diferenças consideradas significativas com um erro alfa = 0,05, onde o asterisco indica diferença significativa para com todos os outros grupos experimentais ($p < 0,05$, ANOVA). Isso mostra que nenhum dos filmes de PHBV modificados apresentam efeito tóxico sobre as células e que as condições estabelecidas para teste confirmam que as células estavam perfeitamente viáveis, visto que não houve atividade respiratória das células submetidas ao extrato obtido a partir do látex (controle positivo).

A segunda análise foi baseada na capacidade de incorporação do corante vermelho neutro (VN) pelas células de osteoblastos presentes nos poços da placa expostas aos extratos obtidos a partir dos diferentes filmes de PHBV modificados e dos controles (os mesmos utilizados no ensaio com XTT). Este ensaio permitiu avaliar a sobrevivência/viabilidade celular, uma vez que o corante é englobado e acumulado nos lisossomos. Ao final da análise, as células foram digeridas para a eluição do corante e leitura da intensidade da coloração das soluções foi realizada no espectrofotômetro. A Figura 5.28 mostra os resultados obtidos no ensaio com vermelho neutro.

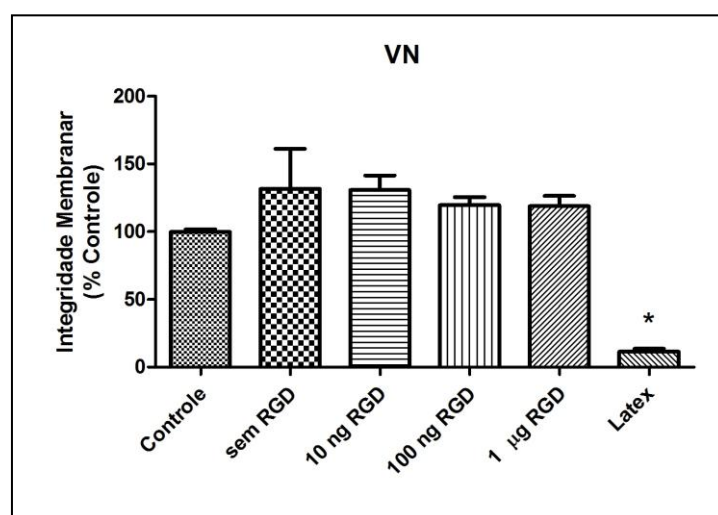


Figura 5.28. Gráfico do ensaio de citotoxicidade baseado na incorporação do corante vermelho neutro pelos lisossomos das células de osteoblastos. O asterístico (*) corresponde à diferença significativa em relação aos demais grupos determinado por análise estatística.

Considerando os dados apresentados na Figura 5.28, é possível dizer que os filmes de PHBV modificados não apresentaram caráter tóxico para as células de osteoblastos, uma vez que os valores de integridade celular associados aos extratos obtidos a partir dos diferentes filmes ficaram acima daqueles encontrados para o controle negativo, citado apenas como controle. Já em relação ao controle positivo – látex, este apresentou um percentual de integridade celular bem inferior em relação aos demais por se tratar de um material sabidamente tóxico para células. A diferença de integridade celular entre o controle positivo e os demais grupos foi considerada significativa com um erro alfa = 0,05, onde o asterisco indica essa diferença significativa para com todos os outros grupos experimentais ($p < 0,05$, ANOVA).

O último teste realizado para avaliar a viabilidade das células também foi conduzido a partir dos extratos obtidos pela exposição dos diferentes filmes de PHBV ao meio de cultura. Estes filmes foram avaliados frente à capacidade de inclusão do corante cristal violeta (CV) no material genético das células posteriormente mortas e fixadas nos poços da placa. A partir desta análise foi possível avaliar a densidade celular por poço. Os resultados estão expostos na Figura 5.29.

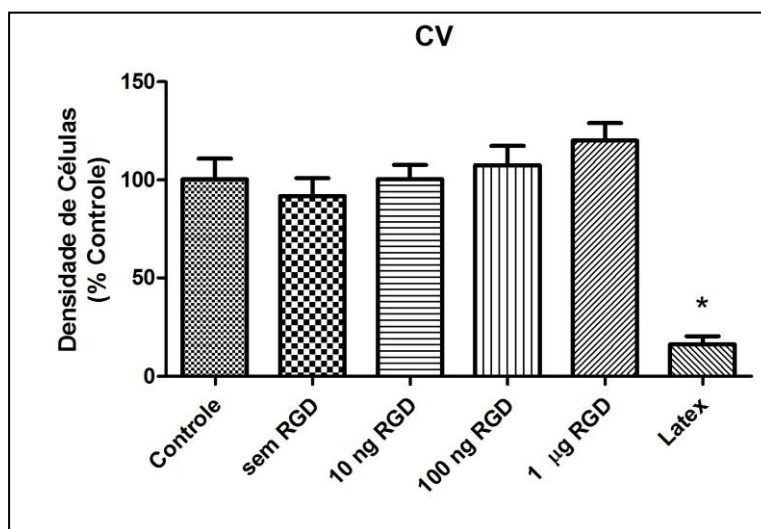


Figura 5.29. Gráfico da análise de citotoxicidade baseado na de inclusão do corante cristal violeta no material genético das células de osteoblastos. O asterístico (*) corresponde à diferença significativa em relação aos demais grupos determinado por análise estatística.

Com base nos dados fornecidos pela Figura 5.29, foi possível observar que os filmes de PHBV sem RGD, com RGD e o controle negativo, apresentaram valores de densidade celular bastante significativos em relação ao controle positivo. Já em relação ao controle positivo – látex, este apresentou um percentual desprezível de densidade celular por se tratar de um material sabidamente tóxico. Essa diferença de densidade celular entre o controle positivo e os demais grupos foi considerada significativa com um erro alfa = 0,05, onde o asterisco indica essa diferença significativa para com todos os outros grupos experimentais ($p < 0,05$, ANOVA).

5.6.2. Ensaio de Adesão

A partir dos resultados preliminares obtidos no ensaio de Adesão, foi possível constatar um pronunciado efeito de adesão das células de osteoblastos sobre os filmes de PHBV-A90R60 com 100ng de RGD/*spot* em relação aos filmes com 10 ng e 1µg de RGD/*spot* na distribuição de 384 *spots*/área total. Os filmes de PHBV-A90R60 biofuncionalizado com 1µg de RGD/*spot* apresentou um efeito de adesão ligeiramente inferior em relação ao filme com 10 ng de RGD/*spot*. Já em relação ao filme com celulose, sem peptídeos RGD, apresentou uma quantidade de células muito pouco expressiva em relação aos demais filmes submetidos ao ensaio. Este dado sugere que os aglomerados de celulose, ligados covalentemente aos peptídeos RGD, não interferem na adesão celular *in vitro* de osteoblastos. É importante destacar que a quantidade de celulose imobilizada neste filme (sem RGD) corresponde ao mesmo volume utilizado da solução de celulose-peptídeo ressuspendido em DMSO para a imobilização de 100ng de RGD/*spot*. Desse modo, a quantidade de celulose imobilizada no filme sem peptídeos RGD é equivalente a celulose presente no filme com 100ng de RGD/*spot*.

As contagens médias dos 12 campos aleatórios e não sobrepostos obtidos foram analisadas pelo teste de normalidade de D'Agostino e Pearsons. Em seguida, foi aplicada uma Análise de Variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey, comparando todos os grupos experimentais. Diferenças foram consideradas significativas com um erro alfa = 0,05. A Figura 5.30 mostra o gráfico que representa à média e erro padrão da contagem de núcleos marcados com DAPI em 12 campos 2 horas após semeadas as células de osteoblastos MC3T3-E1 (10^4 células/poço) sobre as diferentes superfícies, e observadas em microscópio de fluorescência com objetiva de 10X.

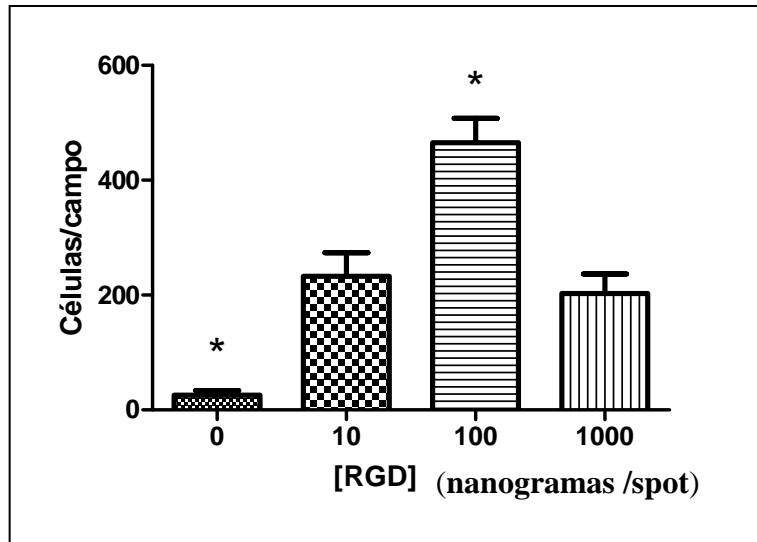


Figura 5.30. Teste de adesão inicial de osteoblastos sobre as superfícies de PHBV modificadas com RGD. O gráfico representa à média e erro padrão da contagem de núcleos marcados com DAPI. O asterisco indica diferença significativa para com todos os outros grupos experimentais ($p < 0,05$, ANOVA).

Estudo realizado por Kubies *et al.* (2011) avaliaram o efeito das propriedades de superfície de materiais para implante ósseo como rugosidade e energia de superfície sobre a interação com células de osteoblastos humanos. Neste trabalho os autores concluem que a baixa proliferação de osteoblastos está associada a baixa componente polar da energia de superfície. Entretanto, não foi possível estabelecer uma relação direta entre rugosidade e superfície a partir dos materiais analisados. Porém, neste trabalho é citado que uma elevada rugosidade, maior que as dimensões celulares, não oferece melhora na resposta celular. Estes dados colaboram com os resultados alcançados para os filmes de PHBV imobilizados com 100 ng/spot de peptídeo RGD que apresentou uma elevada adesão celular. Este material coincidentemente apresenta características como elevada componente polar da energia de superfície e baixa rugosidade.

Perlin *et al.* (2008) explicam como a adesão celular pode ser prejudicada pela alta concentração de peptídeos RGD imobilizados na superfície. Eles justificam este fato pelo empacotamento gerado pelo excesso de peptídeos imobilizados na superfície de um dado material tornando-os inacessíveis aos receptores celulares que os reconhecem, as integrinas. Além disso, outros autores também atribuem este prejuízo da adesão celular provocado pela desorção de peptídeos da superfície do material em função da alta

concentração. Estes peptídeos desorvidos acabam se ligando as integrinas das células impedindo a sua adesão ao material. Este efeito de desorção pode ser atribuído ao nosso material com alta concentração de peptídeos RGD em razão da imobilização mediada pela celulose à superfície do material não ser de natureza covalente e sim por adsorção, via interações de Van der Waals.

A Figura 5.31 mostra as imagens dos núcleos das células de osteoblastos marcados com DAPI visualizados no microscópio invertido no aumento de 10x. As imagens correspondem aos filmes de PHBV-A90/R60 com celulose, sem RGD (a), PHBV-A90/R60 com 10ng de RGD/*spot* (b), filmes com 100 ng de RGD/*spot* (c) e com 1µg de RGD/*spot* (d) na distribuição de 384 *spots*/ área total de filme.

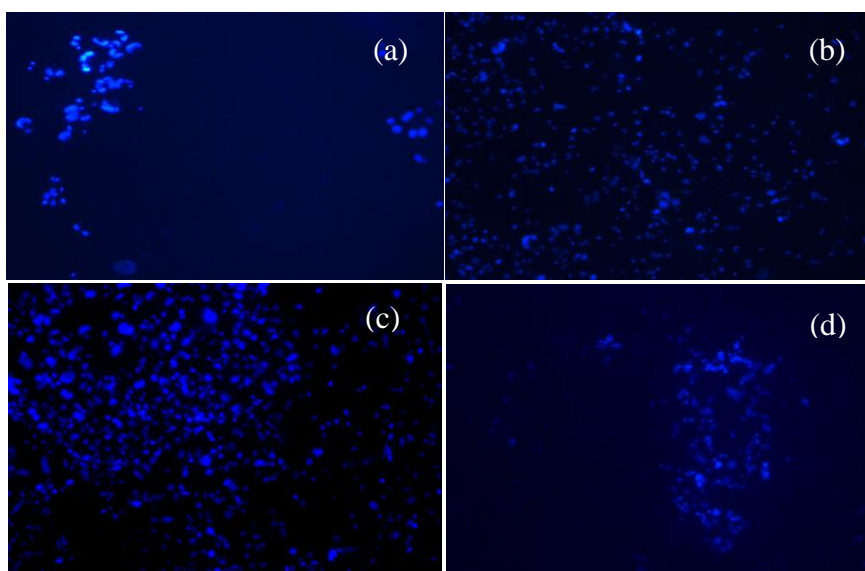


Figura 5.31. Núcleos celulares marcados com DAPI visualizados no microscópio invertido no aumento de 10x. As imagens correspondem aos filmes de PHBV-A90/R60 com celulose, sem RGD (a), com 10ng de RGD/*spot* (b), com 100ng de RGD/*spot* (c) e com 1µg de RGD/*spot* (d) na distribuição de 384 *spots*/ área total de filme.

CAPÍTULO VI – CONCLUSÕES

6.1. CONCLUSÕES

- A Produção dos filmes de PHBV pela técnica de evaporação de solvente foi bastante eficiente, visto que possibilitou a formação de filmes finos com pouquíssima ondulação. Esta característica foi essencial para adequação ao método de CelluSpot.
- A técnica de Spot Synthesis não foi passível de ser utilizada para síntese de peptídeos sobre filmes de PHBV;
- A modificação por aminólise e reticulação aumentou a molhabilidade dos filmes de PHBV;
- Os filmes de PHBV-A90R60 foram definidos como os mais adequados para imobilização por CelluSpot devido a molhabilidade semelhante ao suporte aplicado à técnica de CelluSpot, percentual de imobilização e menor tempo de tratamento;
- Foi possível modificar as propriedades dos filmes de PHBV de forma a ser utilizado como substrato para método de CelluSpot;
- A imobilização dos filmes de PHBV-A90/R60 na concentração de 1 $\mu\text{g}/\text{spot}$ de peptídeos RGD foi confirmada por FTIR, sendo aqueles imobilizados com 10 ng e 100 ng não foram passíveis de confirmação possivelmente em razão da baixa concentração do peptídeo imobilizado correspondente a nanograma;
- As análises de AFM mostraram diferença na morfologia da superfície dos filmes imobilizados com diferentes concentrações do peptídeo RGD (10 ng, 100 ng e 1 $\mu\text{g}/\text{spot}$) confirmada pela rugosidade (RMS);
- A análise por MEV mostrou diferenças na morfologia dos filmes de PHBV puro, PHBV-A90, PHBV-A90R60 e dos filmes biofuncionalizados com peptídeos RGD;
- A análise por FTIR das membranas utilizadas para fins de imobilização no método de CelluSpot mostraram ser constituídas por poliésteres;
- A análise utilizando o sistema de MALDI-Imaging permitiu determinar a massa do peptídeo sintetizado confirmando assim a síntese da sequência de interesse (RGD-G-RGD-G-RGD-G) por método de CelluSpot;

- As análises por ângulo de Contato e energia de Superfície mostraram mudanças significativas nos filmes de PHBV-A90R60 com 10 ng/spot, 100 ng/spot, 1µg/spot de RGD (em 192 e 384 spots/área);
- A análise da energia de Superfície mostrou que as variações da energia total dos filmes são dependentes da componente polar em razão da concentração crescente de peptídeos imobilizados 10 ng/spot, 100 ng/spot, 1 µg/spot de RGD nos dois modos de distribuição;
- O teste multiparamétrico de viabilidade celular considerou os materiais não citotóxicos;
- O ensaio de adesão celular *in vitro* mostrou que os filmes imobilizados com 100ng de RGD/spot na distribuição de 384 spots/área apresentaram um aumento significativo da adesão de osteoblastos em relação aos demais;
- O método de celluspot pode ser utilizado com sucesso para a imobilização de sequências de peptídeos na superfície de filmes de PHBV modificados, sendo uma técnica em potencial para a produção de biomateriais bioativos aplicáveis à engenharia tecidual.

CAPÍTULO VII – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar ensaio de Citotoxicidade e Adesão para os demais filmes imobilizados com peptídeos RGD na distribuição com 192 *spots*/área;
- Avaliar a sensibilidade de imobilização de peptídeos sobre os filmes de PHBV para outras aplicações;
- Realizar ensaios biológicos *in vitro* com os filmes de PHBV biofuncionalizados com peptídeos RGD utilizando tempos mais longos para avaliar sua influência sobre a proliferação celular;
- Utilizar o método de Celluspot para imobilizar na superfície de PHBV outras sequências de peptídeos também importantes para as respostas celulares;
- Avaliar a imobilização de peptídeos na superfície de arcabouços tridimensionais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J. *et al.*, 2002. *Molecular biology of the cell*, 4 ed, New York, Garland Science Publishing.

AMBLARD, M., FEHRENTZ, J. A., MARTINEZ, J. *et al.*, 2006, "Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis". *Journal of Molecular Biotechnology*, v.33, n.3, pp.239-254.

ANSELME, K. 2000, "Osteoblast adhesion on biomaterials". *Journal of Biomaterials*, V.21, n.7, pp.667-681.

ARIMA, Y., IWATA, H., 2007, "Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers" *Journal of Biomaterials*, v. 28, pp. 3074–3082.

ATALA, A, 2007, "Engineering tissue, organs and cells" *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v.1, pp. 83-96.

BAXTER, L. C., FRAUCHIGER, V., TEXTOR, M. *et al.*, 2002, "Fibroblast and osteoblast adhesion and morphology on calcium phosphate surfaces" *European Cells & Materials Journal*, v.4, pp.1-17.

BLACKWELL, H. E., 2006, "Hitting the SPOT: Small molecule macroarrays advance combinatorial synthesis", *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 10, pp. 203-212.

BOWERS, K.T., KELLER, J.C., RANDOLPH, B. A. *et al.* 1992, "Optimization surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro" *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* , v.7, n.3, pp. 302-310.

BOYAN, B. D., HUMMERT, T. W., DEAN, D. D., 1996, "Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response" *Journal of Biomaterials*, v. 17, n.2, pp. 137-146.

BARBANTI, S. H., ZAVAGLIA, C. A. C., DUEK, E. A. R., 2005, “Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos” *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 15, n.1, pp.13-21.

BOER, F. C., WIPPERMANN, B. W., BLOKHUIS, F. J., *et al.*, 2003, “Healing of segmental bone defects with granular porous hydroxyapatite augmented with recombinant human osteogenic protein-1 or autologous bone marrow” *Journal of Orthopaedic Research*, v.21, pp.521-528.

BREULS, R. G. M., JIYA, T.U., SMIT, T.H., 2008, “Scaffold Stiffness Influences Cell Behavior: Opportunities for Skeletal Tissue Engineering” *The Open Orthopaedics*, v. 2, pp. 103-109.

CARLISLE, E. S., MARIAPPAN, M. R., NELSON, K. D. *et al.*, 2000. “Enhancing Hepatocyte Adhesion by Pulsed Plasma Deposition and Polyethylene Glycol Coupling” *Journal of Tissue Engineering*, v. 6, n.1, pp. 45-52.

CARVALHO, P.S.P., BASSIA, A.P.F., VIOLIN, L.A., 2004, “Revisao e proposta de nomenclatura para os biomateriais”, *Implant news*, v.1, n. 3, pp. 255-259.

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

CHAPUT, C., YAHIA, L. H., SELMANI, A., *et al.*, 1995, *Natural poly (hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) polymers as degradable biomaterials*, Polymers in Medicine and Pharmacy, pp. 111-116, San Francisco, USA.

CHEN, GUO-QIANG, WU, Q., 2005, “The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials” *Journal of Biomaterials*, v. 26, pp. 6565–6578.

CHEN, C., DONG, L., YU, P. H. F., 2006. “Characterization and properties of biodegradable poly(hydroxyalkanoates) and 4,4-dihydroxydiphenylpropane blends. Intermolecular hydrogen bonds, miscibility and crystallization” *European Polymer Journal*, v.42, n. 10, pp. 2838-2848.

CZERNUSKA, J.T., SACHLOS, E., 2003. “Making Tissue engineering scaffolds work review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffold”, *European cells and materials*, v.5, pp. 29-40.

DARRIBERE, T., SKALSKI, M., COUSIN, H. L., *et al.*, 2000, “Integrins: regulators of embryogenesis” *Biology of the Cell*, v. 92, n. 1, pp. 5-25.

DA SILVA, L. F., GOMEZ, J. G. C., ROCHA, R. C. S. *et al.*, 2007, “Biotechnological production of polyhydroxyalkanoates in Brazil for biodegradable polymers” *Química Nova*, v.30, n. 7, pp. 1732-1743.

DE-DEUS, G., CANABARRO, A., ALVES, G., *et. al.*, 2009, “Optimal Cytocompatibility of a Bioceramic Nanoparticulate Cement in Primary Human Mesenchymal Cells”, *Journal of Endodontics*, v.35, n. 10, pp. 1387-1390.

DOI, Y., KANESAWA, Y., KUNIOKA, M. *et al.*, 1990, “Biodegradation of Microbial copolyesters – Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) and Poly(3-Hydroxybutyrate-co-4-Hydroxybutyrate)”, *Journal of Macromolecules*, v. 23, n.1, pp. 26-31.

DONG, Y., LI, P., CHEN, C. *et al.*, 2010, “The improvement of fibroblasts growth on hydrophobic Biopolyesters by coating with polyhydroxyalkanoates granule bonding protein PhaP fused with cell adhesion motif RGD”, *journal of Biomaterials*, v. 31, pp. 8921-8930.

DU, G. C., CHEN, J., YU, J. *et al.*, 2001, “Feeding strategy of propionic acid for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with *Ralstonia eutropha*”, *Biochemical Engineering Journal*, v.8, n.2, pp.103-110.

EIFLER-LIMA, V. L., MARQUARDT, M., 2001, “A Síntese orgânica em fase sólida e seus suportes poliméricos mais empregados” *Química. Nova*, v. 24, n. 6, pp. 846-855.

ELBERT, D. L., HUBBELL, J. A., 1996, “Surface treatments of polymers for biocompatibility”, *Annual Review of Materials Science*, v. 26, pp. 365–94.

ELIAS, C. N. *et al.*, 2004, “Diferentes superfícies dos implantes dentários”. In: *III Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais*, Campinas-SP, julho.

ELIAS, C. N. *et al.*, 2005, “Interações de células com diferentes superfícies de implantes dentários”, *Revista Brasileira de Odontologia*, v. 62, n.12, pp.119-124.

ELST, M. V., KUIPER, I., KLEIN, C. P., *et al.* 1996 “The burst phenomenon an animal model simulating the long-term tissue response on PLLA interlocking nails”, *Journal of Biomedical Materials Research*, v.30, n.2, pp.139-143.

FALSEY, J. R., RENIL, M., PARK, S., *et al.*, 2001, “Peptide and Small Molecule Microarray for High Throughput Cell Adhesion and Functional Assays”, *Bioconjugate chemistry journal*, v. 12. n.3, pp. 346-353.

FERREIRA, A. A. P., 2006, “Microscopia de força atômica aplicada em imunoenaios”, *Química Nova*, v. 29, pp. 137-142.

FIELDS, G. B., SIMON, M. I., ABELSON, J. N., 1997, *Solid-Phase Peptide Synthesis, - Methods in Enzymology*, v. 289, pp. 313-336.

FILHO, R. B., MATOSO, L. H. C., 2003, “Estudo de Polímeros por Microscopia de Força Atômica” *Comunicado Técnico 53*, São Carlos, SP, Setembro.

FILIPCZAK, K., JANIK, I., KOZICKI, M., *et al.*, 2005. “Porous polymeric scaffolds for bone regeneration” *E-Polymers*, v.20, art.11.

FRANK, R., 1992, “Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on membrane support”, *Tetrahedron*, v. 48, n. 42, pp. 9217-9232.

FRANK, R., 2002. “The SPOT-synthesis technique Synthetic peptide arrays on membrane supports—principles and applications” *Journal of Immunological Methods*, v. 267, n.1, pp.13– 26.

FRANK, R., DUBEL, S., 2005, *Analysis of Protein Interactions with Immobilized Peptide Arrays Synthesized on Membrane Supports*. 2ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

FRANK, R., OVERWIN, H., 1996, “Spot synthesis. Epitope analysis with arrays of synthetic peptides prepared on cellulose membranes” *Methods in Molecular Biology*, v.66, pp. 149-169.

FREIER, T., 2006, **Polymers for Regenerative Medicine - Advances in Polymer Science Biopolyesters in Tissue Engineering Applications, Volume 203, pp. 1-61, Springer-Verlag, Berlin.**

FRIEDMAN, M., 2004, “Applications of the Ninhydrin Reaction for Analysis of Amino Acids, Peptides, and Proteins to Agricultural and Biomedical Sciences”, *Journal of Agricultural and food Chemistry*, v. 52, pp. 385-406.

GAO, C., MAO, Z., MA, Z., *et al.*, 2007. “Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 60, pp. 137–157.

GAUSEPOHL, H., BEHN, C., 2002. *Automated Synthesis of Solid-phase bound peptides INTAVIS A.G.*, Springer Lab Manual, chapter 4, pp.55-68.

GIL, L. M., LADEIRA, T. C., MENEZES, G. C., *et al.*, 2009, “A interface célula-matriz extracelular-biomaterial e a biocompatibilidade de implantes de titânio”, *Innovations Implant Journal: Biomaterials and Esthetics*, v. 4, n. 3, pp. 58-64.

GOLDSTEIN, J., NEWBURY, D. E., ECHLIN, P., *et al.*, 2002, *Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis*. 3 ed., Nova York, Editora Kluwer Academy/Plenum Publishers.

GOTOH, Y.; TAMADA, Y., 2005, "In vitro study of initial cell attachment to the surfaces coated with conjugates consisting of silk fibroin and chitooligosaccharides", *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, v.74, n.2, p.39-45.

HALLAB, N. J., BUNDY, K. J., O'CONNOR, K., *et al.*, 2001, "Evaluation of Metallic and Polymeric Biomaterial Surface Energy and Surface Roughness Characteristics for Directed Cell Adhesion", *Journal of Tissue Engineering*, v. 7, n.1, pp. 55-71.

HASIRCI, V., LEWANDROWSKI, K., GRESSER, J. D., *et al.*, 2003, "Versatility of biodegradable biopolymers: degradability and an in vivo application" *Journal of Biotechnology*, v. 86, pp. 135-150.

HERSEL, U., DAHMEN, C., KESSLER, H., 2003, "RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond", *Journal of Biomaterials*, v. 24, pp. 4385–4415.

HOCKING, J., MARCHESSAULT, R.H., 1994, *Chemistry and Technology of Biodegradable Polymers - Biopolyester*, Springer, London.

HOLLANDER, A., THOME, J., KEUSGEN, M., 2004, "Polymer surface chemistry for biologically active materials" *Applied Surface Science*, v. 235, pp.145–150.

HSIEH, C. T., CHEN, C. M., KUO, R. R., *et al.*, 2004, "Influence of surface roughness on water and oil repellent surfaces coated with nanoparticles", *Applied Surface Science journal*, v. 240, pp. 318-326.

HUBBELL, J.A., 1999, "Bioactive biomaterials", *Biochemical engineering*, v.10, pp. 123-129.

HUMPHRIS, A.D.L., MILLES, M.J., HOBBS, J.K., 2005, "A mechanical microscope: High –speed atomic force microscopy", *Applied Physics Letters*, v. 86, n.3, pp. 34106-34109.

HURST, R., HOOK, B., SLATER, M. R., *et al.*, 2009, "Protein-protein interaction studies on protein arrays: Effect of detection strategies on signal-to-background ratios", *Analytical Biochemistry*, v. 392, n. 1, pp. 45-53.

HUTMACHER, D. W., 2000, "Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage" *Journal of Biomaterials*, v.21, n.24, pp. 2529-2543.

IKADA, Y., 2006, "Challenges in tissue engineering", *Journal of the Royal Society Interface*, v.3, n.10, pp.589-601.

ISIDRO-LLOBET, A., ALVAREZ, M., ALBERICIO, F., 2009, "Amino Acid-Protecting Groups", *American Chemical Society*, v.109, n.6, p.2455-2504.

KAISER, E., COLESCOTT, R. L., BOSSINGER, C. D., *et al.*, 1970, "Color Test for Detection of free Terminal Amino Groups in the Solid-Phase Synthesis of Peptides", *Analytical Biochemistry*, v. 34, pp. 595-598.

KARAKECILI, A. G., DEMIRTAS, T. T., SATRIANO, C., *et al.*, 2007, "Evaluation of L929 fibroblast Attachment and proliferation on Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS)-Imobilized Chitosan in Serum-Containing/Serum-free Cultures", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 104, n.1, pp.69-77.

KATZ, B. Z., ZAMIR, E., BERSHADSKY, A., *et al.*, 2000, "Physical state of the extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesions", *Molecular Biology of the Cell*, v.11, pp.1047-1060.

KATZ, C., BELADEV, L. L., BAMBERGER, S. R., *et al.*, 2011, " Studying protein-protein interactions using peptide arrays", *Chemistry Society Review*.

KEEN, I., BROOTA, P., RINTOUL, L., *et al.*, 2006, "Introducing Amine Functionalities on a Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Surface: Comparing the Use of Ammonia Plasma Treatment and Ethylenediamine Aminolysis", *Biomacromolecules*, v.7, pp.427-434.

KESSLER, H., HERSEL, U., DAHMEN, C., 2003. "RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond" *Biomaterials*, v.24, pp. 4385–4415.

KHANNA, S., SRIVASTAVA, A. K., "Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha*", *Process Biochemistry*, v. 40, n.6, pp. 2173-2182.

KIM, J. E., NOH, K. T., YU, H. S. *et al.*, 2010, "A fibronectina peptide-coupled biopolymer nanofibrous matrix to speed up initial cellular events", *advanced Biomaterials*, v. 12, n.4, pp. B94-B100.

KOLIBACHUK, D., MILLER, A., DENNIS, D., 1999, "Cloning, molecular analysis, and expression of the polyhydroxyalkanoic acid synthase (phaC) gene from *Chromobacterium violaceum*", *Applied Environmental and Microbiology*, v.65, p. 3561-3565.

KOSE, G. T., KENAR, H., HASIRCI, N., *et al.*, 2003, "Macroporous poly(3-hydroxybutirate-co-3-hydroxyvalerate) matrices for bone tissue engineering", *Biomaterials*, v. 24, n.11, pp. 1949-1958.

LANGER, R., TIRREL, D. A., 2004, "Designing materials for biology and medicine", *Nature*, v. 428, pp. 487-492.

LARSEN, M. R., ROEPSTORFF, P., 2000. "Mass spectrometric identification of proteins and characterization of their post-translational modifications in proteome analysis" *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, v. 366, pp. 677-690.

LEE, S. Y., 1996, "Bacterial Polyhydroxyalkanoates", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 49, pp. 1-14.

LEMES, A. P., 2005, *Desenvolvimento de novos compósitos biodegradáveis baseado em poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) e lignosulfonatos*, Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

LESAICHERRE, M. L., UTTAMCHANDANI, M., CHEN, G. Y. J. *et al.*, 2002, “Developing Site-Specific Immobilization Strategies of Peptides in a Microarray” *Bioorganic, Medicinal Chemistry Letters*, v. 12, pp. 2079–2083.

LI, R., ZHANG, H., QI, Q., 2007, “The production polyhydroxyalkanoates in recombinant *Escherichia coli*”, *Bioresource Technology*, v. 98, n. 12, pp. 2313-2320.

LLOYD-WILLIAMS, P., ALBERICIO, F., GIRALT, E., 1997, “Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins”, *CRC Press*, Boca Raton, USA.

LIED, E., HACKER, M., TESSMAR, J, *et al.*, 2005, “Mediating specific cell adhesion to low-adhesive diblock copolymers by instant modification with cyclic RGD peptides”, *Biomaterials*, v. 26, pp. 2333–2341.

LORCAN T. A., TOSETTO M., MILLER I. S., *et al.* 2006. “Surface-induced changes in protein adsorption and implications for cellular phenotypic responses to surface interactions”, *Biomaterials*, v. 27, pp.3096–3108.

LORENZI, T. F., 2006, *Atlas de Hematologia/ Clínica Hematológica Ilustrada*, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

LUENGO, J. M., GARCIA, B., SANDOVAL, A., *et al.*, 2003, “Bioplastics from microorganisms”, *Current Opinion in Microbiology*, v.6, n.3, pp.251-260.

MA, Z., GAO, C., GONG, Y., SHEN, J., 2005, “Cartilage tissue engineering PLLA scaffold with surface immobilized collagen and basic fibroblast growth factor” *Biomaterials*, v. 26, pp. 1253–1259.

MA, Z., MAO, Z., GAO, C., 2007, “Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 60, pp. 137–157.

MACHADO, A., LIRIA, W. C., MIRANDA, M. T., *et al.*, 2004, “Síntese química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações” *Química Nova*, v.27, n.5, pp.781-789.

MADISON, L. L., MADISON, G. W., 1999, “Metabolic engineering of poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymer) from DNA to plastic”, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.63, pp.21-53.

MAEDA, M., MORI, H., WADA, C., 2003, “Proteome analysis using MALDI-TOF MS”, *Seikagaku Journal*, v.75, n. 5, pp. 401-406.

MANN, B.K., TSAI, A.T., SCOTT-BURDEN, T., *et al.*, 1999, “Modification of surfaces with cell adhesion peptides alters extracellular matrix deposition” *Biomaterials*, v.20, pp. 2281-2286.

MARLETTA, G., CIAPETTI, G., SATRIANO, C., *et al.*, 2005, “The effect of irradiation modification and RGD sequence adsorption on the response of human osteoblasts to Polycaprolactone”, *Biomaterials*, v. 26, pp. 4793–4804.

MENDONÇA, R. H., THIRÉ, R. M. S. M., COSTA, M. F., 2009, “Adsorção de Fibronectina a Arcabouços de Polihidroxibutirato Aplicáveis à Engenharia Óssea” *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 19, n. 2, pp. 143-148.

MERRIFIELD, R. B., 1963, “Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide”, *Journal of the American Chemical Society*, v. 85, pp. 2149-2154

MEYER, U., BUCHTER, A., WIESMANN, U., *et al.*, 2005, “Basic reactions of osteoblasts on structured material surfaces.”, *European Cells and Materials*, v.9, pp. 39-49.

MIDDLETON, T.C., TIPTON, A. J., 2000, “Synthetic biodegradable polymers as orthopaedic devices”, *Biomaterials*, v.21, p.2335-2346.

MILNER, R., 2007, "A novel three-dimensional system to study interactions between endothelial cells and neural cells of the developing central nervous system" *BMC Neuroscience*, v.8, n.3, pp.1-11.

MRKSICH, M., MIN, D., 2004, "Peptide arrays: towards routine implementation" *Journal of Chemistry Biology*, v. 8, pp. 554–558.

MONTALBETTI, C., FALQUE, V., 2005, "Amide bond formation and peptide coupling", *Tetrahedron*, v.61, n.46, pp. 10827-10852.

NASCIMENTO, J. F., 2001, *Estudo da processabilidade e da caracterização do poli(ácido 3-hidroxibutírico) - PHB obtido a partir da cana-de-açúcar*, Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

NELSON, D. L., COX, M. M., 2006, *Lehninger: Princípios de Bioquímica*, 4ed, Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda, São Paulo.

OCHESENHIST, S. E., KOKKOLI, E., McCARHY, J. B., *et al.*, 2006, "Effect of RGD secondary structure and the synergy site PHSRN on cell adhesion, spreading and specific integrin engagement", *Biomaterials*, v.27, pp.3864-3874.

OJUMU, T. V., YU, J., SOLOMON, B. O., 2004, "Production Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer", *African Journal of Biotechnology*, v.3, n.1, pp.18-24.

OLIVEIRA, I. R. W. Z., FATIBELLO-FILHO, O., 2009, "Imobilização da lactase em micropartículas de quitosana obtidas por spray drying e usadas na construção de biossensores", *Química Nova*, v. 32, n. 5, pp. 1195-1201.

ORÉFICE, R. L., PEREIRA, M., MANSUR, H. S., 2006, *Biomateriais – Fundamentos e Aplicações*, 2ed, Editora Cultura Médica, Rio de Janeiro.

PERLIN, L., MACNEIL, S., RIMMER, S., 2008, "Production and performance of biomaterials containing RGD peptides", *Royal Society of Chemistry*, v.4, pp. 2331-2349.

QUIRK, R. A., CHAN, W. C., DAVIES, M. C., *et al.*, 2001, "Poly(L-lysine) GRGDS as a biomimetic surface modifier for poly(lactic acid)" *Biomaterials*, v.22, pp. 865-872.

REDDY, C.S.K., GHAI, R., RASHMI, KALIA, V. C., 2003, "Polyhydroxyalkanoates: an overview", *Bioresource Technology*, v.87, pp. 137-146.

REINEKE, U., VOLKMER-ENGERT, R., SCHNEIDER-MERGENER, J., 2001, "Applications of peptide arrays prepared by the SPOT-technology" *Biotechnology*, v. 12, pp. 59-64.

RENSTADT, R., KARLSSON, S., ALBERTSSON, A. C., 1999, "The influence of processing induced differences in molecular structure on the biological and nonbiological degradation of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate, P(3-HB-co03-HV))", *Polymer Degradation and Stability*, v.63, pp. 201-211.

ROGERO, O. S., LUGÃO, A. B., IKEDA, T. I., *et al.*, 2003, "Teste *in vitro* de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias", *Materials Research*, v. 6, n. 3, pp.317-320.

SANTOS, A. R., WADA, M. L., 2007, "Polímeros Biorreabsorvíveis como substrato para cultura de células e Engenharia Tecidual", *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v.17, n. 4, pp.308-317.

SANTOS JR, A. R., FERREIRA, B. M. P., DUEK, E. A. R., *et al.*, 2004, "Use of blends bioabsorbable poly(L-lactic acid)/poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) as surfaces for Vero cell culture", *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.38, pp. 1623-1632.

SARIN, V. K., KENT, S. B. H., TAM, J. P., *et al.*, 1981, “Quantitative Monitoring of Solid-Phase Synthesis by the Ninhydrin Reaction”, *Analytical Biochemistry*, v. 117, pp. 147-157.

SHISHATSKAYA, E.I., VOLOVA, T. G., PUZYR, A. P., *et al.*, 2004, “Tissue response to the implantation of biodegradable polyhydroxyalkalonate sutures”, *Journal of Materials Science: Materials in medicine*, v.15, pp. 719-728.

SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X., KIEMLE, M. J., 2006, *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*, 7ed. , Livros Técnicos e Científicos Editora S. A.

SMITH, A.L, 1980, *Introduction to Colloid and Surface Chemistry*, 1ed, Butterwerth.

SOARES, B. M. C., SARON, E. S., 2010, “Microanálise elementar de materiais: Aplicações do sistema MEV-EDX” Instituto de Tecnologia de Alimentos – *boletim de tecnologia e desenvolvimento de embalagens*, v.22, n.1.

SOLOMONS, G., FRYHLE, C., 2002, *Química Orgânica*, 7ed, v.2, Rio de Janeiro, Livros Técnicos e Científicos Editora S. A.

SORRENTINO, A., GORRASI, G, VITTORIA, V., 2007, “Potential perspectives of bionanocomposites for food packaging applications”, *Trends in Food Science and Technology*, v.18, n.2, pp.84-95.

STEWART, J. M., YOUNG, J. D., 1979, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2ed, Pierce, USA, pp. 105-107.

STITES, D. P., TERR, A. I., PARSLON, T. G., 2000, *Imunologia Médica*, 9ed, editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

STOCK, U. A.; VACANTI, J. P., 2001, “Tissue engineering: Current state and prospects”, *Annual Review of Medicine* , v.52, p.443-451. 2001.

SUDESH, K., ABE, H., DOI, Y., 2000, “Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters”, *Progress in Polymer Science*, v. 25, pp. 1503-1555.

TAKANO, N., KAWAKAMI, T., KAWA, Y., *et al.*, 2002. “Fibronectin combined with stem cell factor plays an important role in melanocyte proliferation, differentiation and migration in cultured mouse neural crest cells” *Pigment Cell Res*, v. 15, n. 3, pp. 192-200.

TANZER, M. L., 2006, “Current concepts of extracellular matrix”, *Journal of Orthopaedic Science*, v. 11, n. 3, pp. 326-331.

TARLEY, C. R. T., SOTOMAYOR, M. D. P. T., KUBOTA, L. T., 2005, “Polímeros Biomiméticos em Química Analítica, Parte 2: Aplicações Mip (“Molecularly imprinted polymers”) no desenvolvimento de sensores químicos”, *Química Nova*, v.28, n.6, pp. 1087-1101.

TESEMA, Y., RAGHAVAN, D., STUBBS III, J., 2004, “Bone cell viability on Collagen immobilized poly(3-hydroxybutirate-co-3-hydroxyvalerate) membrane: Effect of surface chemistry”, *Journal of Applied Polymer Science*, v.93, pp.2445-2453.

THIRÉ, R. M. S. M., MEIGA, T. O., DICK, S. *et al.*, 2007, “Functionalization of Biodegradable Polyester for Tissue Engineering Applications”, *Macromolecular Symposia.*, v.258, pp. 38–44.

VANIN, M., 2003, *Obtenção, caracterização e estudo da adsorção de proteínas na blenda biorreabsorvível poli(β -hidrobutirato) (PHB) / poli(l-ácido láctico) (PLLA)*, Tese (Doutorado em engenharia química) – Universidade Estadual de Campinas – Campinas.

VOLOVA, T., SHISHATSKAYA, E., SEVASTIANOV, V., *et al.*, 2003, “Results of biomedical investigations of PHB and PHA/PHV fibers”, *Biochemical Engineering Journal*, v.16, pp. 125-133.

WAKE, M.C., GERECHT, P.D, LU, L., *et al.*, 1998, “Effects of biodegradable polymer particles on rat marrow-derived stromal osteoblasts in vitro”, *Biomaterials*, v.19. n.14, pp.1255-1268.

WANG, Y. Y., LU, L . X., SHI J. C., *et al.*, 2011, “Introducing RGD peptides on PHBV films through PEG-containing cross-linkers to improve the biocompatibility”, *Biomaterials*, v.12, pp. 551-559.

WEI, J., IGARASHI, T., OKUMORI, N., *et al.*, 2009, “Influence of surface wettability on competitive protein adsorption and initial attachment of osteoblasts” *Biomedical Materials*, v. 4, pp. 45002-45009.

WOODS, A., LONGLEY, R. L.,TUMOVA, S., *et al.*, 2000, “Syndecan-4 binding to the high affinity heparin-binding domain of fibronectin drives focal adhesion formation in fibroblasts” *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 374, n. 1, pp. 66-72.

YANG, X.B., ROACH, H.I., CLARKE, N.M.P., *et al.*, 2001, “Human Osteoprogenitor Growth and Differentiation on Synthetic Biodegradable Structures after Surface Modification”, *Journal of Bone*, v. 29, n. 6, pp. 523–531.

YANG, J., BEI, J., WANG, S., 2002, “Enhanced cell affinity of poly (d,l-lactide) by combining plasma treatment with collagen anchorage” *Biomaterials*, v. 23, pp. 2607-2614.

YANG, Y., PORTÉ, M., MARMEY, P., *et al.*, 2003, “Covalent bonding of collagen on poly(L-lactic acid) by gamma irradiation” *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, v. 207, pp. 165–174.

YASIN, M., TIGHE, B. J., 1993, “Plastics and Rubber Processing and Applications”, *Genamics Journal*, v.19, n.15, pp.177.

YASUHIKO, T., 2001, “Recent progress in tissue engineering”, *Reviews DDT*, v. 6, n.1, pp. 483-487.

YOKOYAMA, S., HIRAMATSU, J., 2003, “A Modified Ninhydrin Reagent Using Ascorbic Acid Instead of Potassium Cyanide”, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.95, n.2, pp. 204-205.

ZAGRIS, N., 2001, “Extracellular matrix in development of the early embryo”, *Micron journal*, v.32, n. 4, pp. 427-38.

ZHAO, K., DENG, Y., CHEN, J. C., *et al.*, 2003, “Polyhydroxyalkanoate (PHA) scaffolds with good mechanical properties and biocompatibility”, *Biomaterials*, v.24, pp.1041-1045.

ZHU, Y., GAO, C., LIU, X., SHEN, J., 2002, “Surface Modification of Polycaprolactone Membrane via aminolysis and biomacromolecule immobilization for promoting cytocompatibility of human endothelial cells”, *Biomacromolecule*, v. 3, pp. 1312-1319.

ZHU, A., CHEN, T., 2006, “Blood compatibility of surface-engineered poly(ethylene terephthalate) via o-carboxymethylchitosan”, *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, v.50, pp. 120-125.