

UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA
REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL

Paula de Abreu Fernandes

DESENVOLVIMENTO DE NOVAS PLATAFORMAS CELULARES BASEADAS EM
CELULOSE BACTERIANA CONJUGADAS A PEPTÍDEOS: AVALIAÇÃO DA
BIOATIVIDADE E PROMOÇÃO DA ADESÃO E PROLIFERAÇÃO CELULAR

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Araraquara, SP

2026

PAULA DE ABREU FERNANDES

DESENVOLVIMENTO DE NOVAS PLATAFORMAS CELULARES BASEADAS EM
CELULOSE BACTERIANA CONJUGADAS A PEPTÍDEOS: AVALIAÇÃO DA
BIOATIVIDADE E PROMOÇÃO DA ADESÃO E PROLIFERAÇÃO CELULAR

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Orientador: Prof. Dr. Hernane da Silva Barud

Coorientadores: Prof. Dr. Norival Alves Santos Filho e Dra. Marina de Lima Fontes

Araraquara, SP

2026

FICHA CATALOGRÁFICA

F411d Fernandes, Paula de Abreu.

Desenvolvimento de novas plataformas celulares baseadas em celulose bacteriana conjugadas a peptídeos: avaliação da bioatividade e promoção da adesão e proliferação celular/Paula de Abreu Fernandes.

Araraquara: Universidade de Araraquara, 2026.

127f.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química medicinal - UNIARA

Orientador: Hernane da Silva Barud

1. Celulose bacteriana. 2. Peptídeos. 3. Adesão celular.

4. Plataformas para o cultivo de células. 5. Bioatividade. I. Título.


CDU 60

PAULA DE ABREU FERNANDES


Dissertação apresentada a Universidade de Araraquara - UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Araraquara, 23 de fevereiro de 2026.


BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **HERNANE DA SILVA BARUD**
Data: 10/03/2026 15:37:25-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. HERNANE DA SILVA BARUD (Orientador) Universidade de Araraquara – UNIARA

Documento assinado digitalmente
 **REINALDO MARCHETTO**
Data: 10/03/2026 14:27:39-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. REINALDO MARCHETTO
Instituto de Química de Araraquara – UNESP

Documento assinado digitalmente
 **ERIKA LORENA FONSECA COSTA DE ALVARENGA**
Data: 03/03/2026 20:15:07-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a Dr^a ÉRIKA LORENA FONSECA COSTA DE ALVARENGA
Universidade Federal de São João Del-Rei – UFSJ

PAULA DE ABREU FERNANDES

Formação Acadêmica

2020-2023 Bacharel em Farmácia

Universidade de Araraquara – UNIARA, Araraquara, São Paulo

Título: Biofilmes poliméricos de *Allium cepa* L (cebola), *Citrullus lanatus* Thunb (melancia) e *Cucumis melo* L. (melão): Avaliação in vitro da cicatrização de feridas.

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Aparecida Resende

2024-2026 Mestrado em Biotecnologia

Universidade de Araraquara – UNIARA, Araraquara, São Paulo

Título: Desenvolvimento de Novas Plataformas Celulares Baseadas em Celulose Bacteriana Conjugadas a Peptídeos: Avaliação da Bioatividade e Promoção da Adesão e Proliferação Celular.

Orientador: Prof. Dr. Hernane da Silva Barud

Co-orientadores: Prof. Dr. Norival Alves Santos Filho

Dra. Marina de Lima Fontes

2025 Estágio no Exterior (BEPE) – Universidade Ku Leuven, Bélgica

Título: Janus bacterial nanocellulose/cellulose acetate-based scaffold functionalized with collagen type I-mimetic peptides for tissue regeneration.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Fardim

Artigos Publicados em Periódicos

PARIS JUNIOR, J. A.; NOGUEIRA, L. G.; CERQUEIRA, I. H.; CATIRSE, N. P.; DA SILVA, L. H. D.; **DE ABREU FERNANDES, P.**; COLTURATO, V. M. M.; DOS SANTOS DIAS, D.; RIBEIRO, C. A.; DAMETTO, A. C.; SILVA, J. M.; DA SILVA BARUD, H.; RESENDE NOGUEIRA, F. A. R Biopolymer from the puree of mesocarp of *Citrullus lanatus* (watermelon) containing chlorhexidine digluconate: physical-chemistry characterization and biological aspects. *Waste and Biomass Valorization*, v. 16, p. 1671–1685, 2024. DOI: 10.1007/s12649-024-02765-0.

GALDINO, T. P.; OLIVEIRA, L. C.; LUZ, M. A.; COSTA BARBOSA, R.; TORRES, M. C. M.; SIVIERI, K.; **FERNANDES, P. A.**; SANTOS, M. L.; LIMA, A. G. B.; SILVA, S. M. L.; FOOK, M. V. L. Exploring the frontiers of psychedelics: a new chromatographic method for detection and quantification of psilocybin and psilocin in

Psilocybe cubensis mushrooms. ACS Omega, v. 10, p. 30695–30707, 2025. DOI: 10.1021/acsomega.5c02751.

FERNANDES, P. A.; DE LIMA FONTES, M. L.; OLIVEIRA CATARIN NUNES, L. O. C.; ARAGÃO, A. R.; CERAZI SALVADOR, L.; TOLENTINO ROCHA BRANDÃO, S.; ALVES SANTOS FILHO, N.; DA SILVA BARUD, H. New updates on peptides and peptide-based biopolymeric materials: medical, pharmaceutical and sensors applications. Journal of Molecular Liquids, v. 436, p. 128177, 2025. DOI: 10.1016/j.molliq.2025.128177.

BREIJAERT, T. C.; FONTES, M. L.; **FERNANDES, P. A.**; CERQUEIRA, I. H.; CATIRSE, N. P.; COLTURATO, V. M. M.; DAMETTO, A. C.; DA SILVA BARUD, H.; RESENDE NOGUEIRA, F. A. R. Functionalization of bacterial nanocellulose-based wound dressing for increased drug retention. Carbohydrate Polymer Technologies and Applications, v. 10, p. 100756, 2025. DOI: 10.1016/j.carpta.2025.100756.

CERQUEIRA, I. H.; CATIRSE, N. P.; **FERNANDES, P. A.**; PARIS JUNIOR, J. A.; DA SILVA, L. H. D.; COLTURATO, V. M. M.; DOS SANTOS DIAS, D.; RIBEIRO, C. A.; DAMETTO, A. C.; SILVA, J. M.; DA SILVA BARUD, H.; RESENDE NOGUEIRA, F. A. R.. Biopolymeric films from the white rind of watermelon (*Citrullus lanatus*) for localized 5-fluorouracil application. ACS Omega, v. 10, p. 44573–44584, 2025. DOI: 10.1021/acsomega.5c06925.

DA SILVA, J. G. F.; CERQUEIRA, I. H.; PARIS JUNIOR, J. A.; DA SILVA, L. H. D.; COLTURATO, V. M. M.; **DE ABREU FERNANDES, P.**; OLIVEIRA, T. L.; DAMETTO, A. C.; DIAS, D. D. S.; RIBEIRO, C. A.; DE OLIVEIRA, L. F. C.; DA SILVA BARUD, H.; RESENDE, F. A. Production of biopolymers from watermelon mesocarp: structural characterization, cytogenotoxicological safety, and antioxidant activity. Journal of Food Science and Technology, v. 62, n. 5, p. 885–896, 2025. DOI: 10.1007/s13197-024-06076-z.

PARIS JUNIOR, J. A.; CERQUEIRA, I. H.; CATIRSE, N. P.; DA SILVA, L. H. D.; COLTURATO, V. M. M.; **DE ABREU FERNANDES, P.**; DOS SANTOS DIAS, D.; RIBEIRO, C. A.; DAMETTO, A. C.; SILVA, J. M.; DA SILVA BARUD, H.; RESENDE NOGUEIRA, F. A. R. Sustainable watermelon rind-based bioplastic for controlled lidocaine release in topical wound dressings. Reactive and Functional Polymers, v. 217, p. 106477, 2025. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2025.106477.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Hernane Barud, pela amizade, pelas agradáveis conversas permeadas por reflexões e por me orientar neste trabalho acadêmico.

Ao Prof. Dr. Norival Alves Santos Filho e à Dra. Marina de Lima Fontes, pela coorientação e direcionamento.

À Ariani Aragão, pelo auxílio e ensinamentos com a síntese dos peptídeos em fase sólida.

Aos membros do grupo BioPolMat, que contribuíram direta e indiretamente com este trabalho.

À Universidade de Araraquara e a todos os servidores da instituição.

Ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, pelas análises de AFM.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Cappa da Universidade Federal de Juiz de Fora – pelas análises de RAMAN.

À Profa. Dra. Sandra Cruz da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR) – pelas análises de ângulo de contato.

Ao Prof. Dr. Pedro Fardim pela oportunidade de realizar o estágio em seu laboratório na Ku Leuven, Bélgica.

Ao Instituto de Química Araraquara, em especial o laboratório LACAQUE pelas medidas de microscopia eletrônica de varredura.

À FAPESP, pelas bolsas concedidas (n°2023/17580-1 – 2025/04696-7).

Ao CNPq (Processo: 309614/2021-0), ao MCTIC/CNPq (Processo: 406973/2022-9) através do INCT/Polissacarídeos (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Polissacarídeos), ao INCT/INFO (Instituto Nacional de Fotônica – processo: 465763/2014-6) e ao INCT/Circularidade (processo: 406925/2022-4), ao CEMASU (FAPESP n°2021/11965-3).

Aos meus amados pais Paulo e Débora, além do irmão Caio, por direcionarem e iluminarem meus caminhos.

Sobretudo à Deus, pelo dom da vida e por me amar especialmente.

“Nós somos o que fazemos repetidamente. A excelência, portanto,
não é um ato, mas um hábito”

Aristóteles

RESUMO

Plataformas bidimensionais (2D) e tridimensionais (3D) são fundamentais para pesquisas biomédicas. Enquanto os sistemas 2D utilizam superfícies planas, facilitando a manipulação e observação celular, os modelos 3D empregam uma estrutura mais complexa, incluindo esferoides ou *scaffolds* biomiméticos, proporcionando uma arquitetura tecidual mais próxima das condições *in vivo*. A celulose bacteriana (CB) é um biopolímero versátil amplamente empregado na área biomédica, especialmente em curativos para o tratamento de feridas de diferentes etiologias, e no desenvolvimento de novas formulações para liberação controlada de fármacos, entre outras aplicações. Além disso, a biocelulose tem sido combinada a biomoléculas, como peptídeos, para potencializar suas propriedades bioativas. Sendo assim, o presente estudo explora, pela primeira vez, a bifuncionalização de peptídeos sobre a superfície da CB, utilizando uma sequência peptídica mimética ao colágeno tipo I combinada ao peptídeo antimicrobiano ϵ -poli-L-lisina e uma sequência mimética ao BMP-7, também associada ao mesmo peptídeo antimicrobiano. Após obtenção das plataformas bifuncionais via ligação covalente utilizando os agentes de acoplamento EDC:NHS, os materiais foram caracterizados frente suas propriedades físico-químicas e morfológicas. Em relação a análise termogravimétrica e sua derivada (TGA/DTG), foi constatado três principais eventos de perda de massa para todas as amostras, com variações nos picos de degradação ($T_{m\acute{a}x}$). A funcionalização com os peptídeos não afetou significativamente a estabilidade térmica da biocelulose, entretanto a amostra com BMP-7 contendo histidina foi considerada àquela com maior estabilidade térmica. As massas residuais indicaram variações na formação dos resíduos carbonáceos, especialmente nas amostras CB/BMP7, CB/ ϵ -PPL e CB/CMC. A análise por FTIR-ATR no modo de transmitância permitiu identificar as principais bandas correspondentes aos grupos funcionais da celulose. Destacam-se a banda em 3350 cm^{-1} , atribuída ao alongamento da ligação O-H; em 2890 cm^{-1} , associada ao alongamento do CH em alcanos e ao alongamento assimétrico do CH_2 ; em 1650 cm^{-1} , referente à flexão da água adsorvida; em 1430 cm^{-1} , correspondente à deformação do CH_2 ; e em 843 cm^{-1} , atribuída à vibração característica da ligação β -1,4. No modo absorvância do FTIR-ATR e na espectroscopia Raman, foram observadas bandas bem definidas associadas às amidas I (C=O) e II (flexão do N-H e alongamento do C-N e C-O-C), localizadas nas regiões de $1654\text{ a }1638\text{ cm}^{-1}$ e $1550\text{ a }1542\text{ cm}^{-1}$, respectivamente. Nas amostras funcionalizadas com um ou ambos os peptídeos, foi identificado um recobrimento superficial das fibrilas, resultante da incorporação da carboximetilcelulose (CMC). A CMC foi utilizada para expor grupos carboxila, promovendo a interação com os terminais amina dos peptídeos. Com base nos resultados obtidos, observa-se que os diferentes processos de modificação superficial da CB influenciaram de forma significativa suas propriedades físico-químicas e biológicas, refletindo diretamente no desempenho do material. As análises de AFM e molhabilidade evidenciaram que a incorporação de CMC promoveu maior homogeneidade superficial e manutenção do caráter hidrofílico, enquanto a bifuncionalização com peptídeos resultou em aumento da nanorugosidade e redução da energia superficial, associadas à organização e orientação molecular dos peptídeos imobilizados. Do ponto de vista biológico, todas as amostras apresentaram adequada citocompatibilidade, sem efeitos hemolíticos ou citotóxicos, além de favorecerem a proliferação, migração, e adesão celular. Destacaram-se especialmente as amostras bifuncionalizadas com colágeno tipo I e BMP-7, que proporcionaram um microambiente mais favorável ao crescimento e organização celular. Em conjunto, esses achados reforçam o potencial da funcionalização da CB com peptídeos bioativos visando aplicações biomédicas.

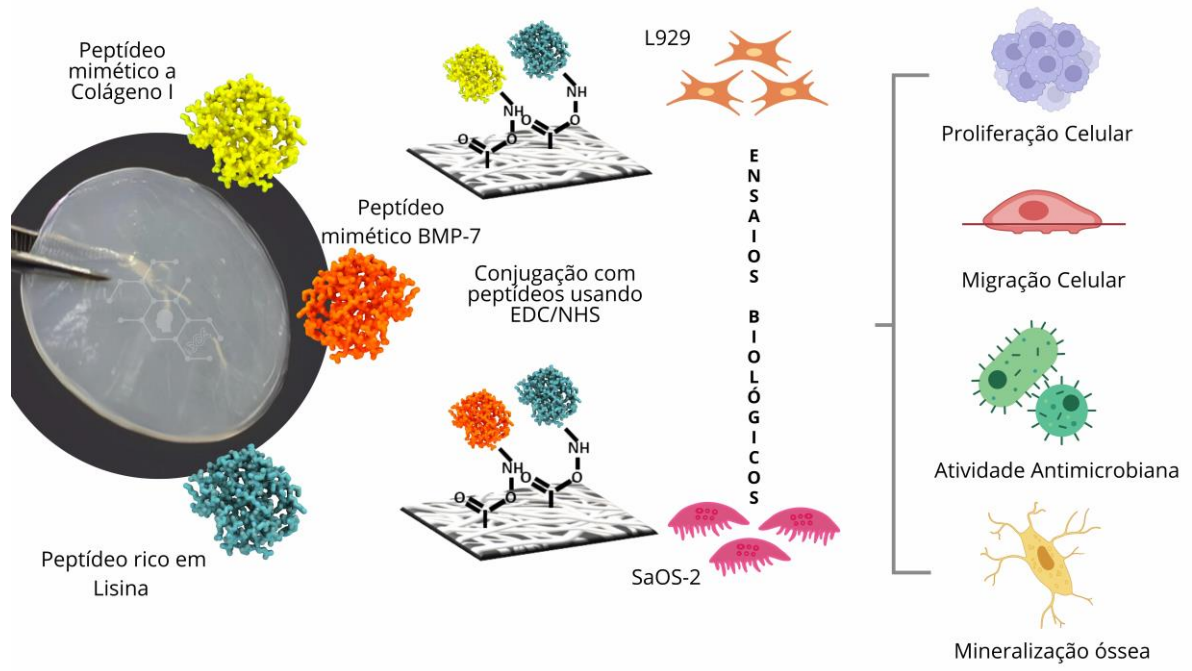
Palavras-chaves: celulose bacteriana, peptídeos, adesão celular, plataformas para cultivo de células, bioatividade.

ABSTRACT

Two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) platforms are fundamental for biomedical research. While 2D systems utilize flat surfaces, facilitating cellular manipulation and observation, 3D models employ a more complex structure, including spheroids or biomimetic scaffolds, providing a tissue architecture closer to in vivo conditions. Bacterial cellulose (BC) is a versatile biopolymer widely used in the biomedical field, especially in dressings for the treatment of wounds of different etiologies, and in the development of new formulations for controlled drug release, among other applications. Furthermore, biocellulose has been combined with biomolecules, such as peptides, to enhance its bioactive properties. Therefore, this study explores, for the first time, the bifunctionalization of peptides on the surface of biocellulose (BC), using a peptide sequence mimetic to type I collagen combined with the antimicrobial peptide ϵ -poly-L-lysine and a sequence mimetic to BMP-7, also associated with the same antimicrobial peptide. After obtaining the bifunctional platforms via covalent bonding using the coupling agents EDC:NHS, the materials were characterized in terms of their physicochemical and morphological properties. Regarding thermogravimetric analysis and its derivative (TGA/DTG), three main mass loss events were observed for all samples, with variations in the degradation peaks (T_{max}). Functionalization with peptides did not significantly affect the thermal stability of the biocellulose; however, the sample with BMP-7 containing histidine was considered to have the highest thermal stability. The residual masses indicated variations in the formation of carbonaceous residues, especially in samples CB/BMP7, CB/ ϵ -PPL, and CB/CMC. FTIR-ATR analysis in transmittance mode allowed the identification of the main bands corresponding to the functional groups of cellulose. The bands at 3350 cm^{-1} , attributed to the elongation of the O-H bond, stand out; at 2890 cm^{-1} , associated with the elongation of CH_2 in alkanes and the asymmetric elongation of CH_2 ; at 1650 cm^{-1} , referring to the bending of adsorbed water; at 1430 cm^{-1} , corresponding to the deformation of CH_2 ; and at 843 cm^{-1} , attributed to the characteristic vibration of the β -1,4 bond. In FTIR-ATR absorbance mode and Raman spectroscopy, well-defined bands associated with amides I (C=O) and II (N-H bending and C-N and C-O-C elongation) were observed, located in the regions of $1654\text{ to }1638\text{ cm}^{-1}$ and $1550\text{ to }1542\text{ cm}^{-1}$, respectively. In samples functionalized with one or both peptides, a surface coating of the fibrils was identified, resulting from the incorporation of carboxymethylcellulose (CMC). CMC was used to expose carboxyl groups, promoting interaction with the amine terminals of the peptides. Based on the results obtained, it is observed that the different surface modification processes of CB significantly influenced its physicochemical and biological properties, directly reflecting on the material's performance. AFM and wettability analyses showed that the incorporation of CMC promoted greater surface homogeneity and maintenance of hydrophilic character, while bifunctionalization with peptides resulted in increased nanoroughness and reduced surface energy, associated with the molecular organization and orientation of the immobilized peptides. From a biological standpoint, all samples showed adequate cytocompatibility, without hemolytic or cytotoxic effects, and promoted cell proliferation, migration, and adhesion. Samples bifunctionalized with type I collagen and BMP-7 stood out, providing a more favorable microenvironment for cell growth and organization. Taken together, these findings reinforce the potential of functionalizing CB with bioactive peptides for biomedical applications.

Keywords: bacterial cellulose, peptides, cell adhesion, platforms for cell cultivation; bioactivity.

RESUMO GRÁFICO



LISTAS DE FIGURAS

- Figura 1.** Diferenças entre o cultivo bidimensional (2D) e tridimensional (3D). Elaborado pela própria autora.....21
- Figura 2.** Ilustração da síntese de Celulose Bacteriana (CB) na interface ar/meio líquido por bactérias gram-negativas do gênero *Komagataeibacter*. A primeira imagem ilustra o processo de formação da CB, enquanto a segunda apresenta uma fotografia da película gelatinosa obtida após 5 dias de cultivo, seguida de purificação em solução de NaOH. A análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) revela a estrutura tridimensional das nanofibras dispostas aleatoriamente, característica da CB. Por fim, a estrutura química da CB é representada, destacando as unidades glicosídicas unidas por ligações do tipo β -1 \rightarrow 4. Elaborado pela própria autora.....25
- Figura 3.** Estrutura química dos aminoácidos glicina (Gly), histidina (His), glutamina (Gln), alanina (Ala), serina (Ser) e leucina (Leu), e as respectivas sequências peptídicas sintetizadas via SPPS e utilizadas no presente estudo. As sequências peptídicas foram projetadas com base na combinação dos aminoácidos mencionados, e empregadas para investigar suas propriedades bioativas, sendo elas: KVSALKEKVSALKEKNSALKWKVSALKE (Peptídeo rico em lisina - LRP), VEHDKEFFHPRYHH (Peptídeo mimético a BMP-7) e GARGQAGVMGFO (Peptídeo mimético a colágeno Tipo I). Elaborado pela própria autora.....27
- Figura 4.** Realização do ensaio de *wound healing*.....44
- Figura 5.** Perfil cromatográfico dos peptídeos antes da purificação (1) e após a etapa de purificação (2) em coluna de fase reversa C18 em 5-95% de solvente B em 30 minutos: (A1 e A2) AA2413- (LRP), (B1 e B2) AA2414 – (mBMP-7 com histidina), (C1 e C2) AA2416 – mBMP-7 e (D1 e D2) AA2415 – (Col I).....49
- Figura 6.** Espectro de massas das sequências peptídicas: (A) AA2415 – Col I; (B) AA2314 - mBMP-7 com histidina; (C) AA2416 – mBMP-7 e (D) AA2313- LRP.....50
- Figura 7.** Espectros de dicroísmo circular para os peptídeos Col I, mBMP-7 e LRP, na concentração de 60 μ M, em solução tampão (PBS), SDS 5 mM e TFE 60%.....52
- Figura 8.** Espectros de FTIR/ATR no modo transmitância adquiridos para as diferentes amostras de CB, incluindo CB nativa, CB/CMC, CB/CMC/EDC:NHS, CB/BSA/EDC:NHS, CB/Col I, CB/mBMP-7 com histidina, CB/mBMP-7, CB/LRP, CB/Col I/LRP, CB/mBMP-7 com histidina/LRP e CB/mBMP-7/LRP. Os espectros foram adquiridos no intervalo de comprimento de onda de 4000 a 600 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} , utilizando 32 varreduras no modo de reflexão total atenuada (ATR).....54
- Figura 9.** Espectros de FTIR/ATR no modo absorbância adquiridos para as diferentes amostras de CB, incluindo CB nativa, CB/CMC, CB/CMC/EDC:NHS, CB/BSA/EDC:NHS, CB/Col I, CB/mBMP-7 com histidina, CB/mBMP-7, CB/LRP, CB/Col I/LRP, CB/mBMP-7 com histidina/LRP e CB/mBMP-7/LRP. Os espectros foram adquiridos no intervalo de comprimento de onda de 4000 a 600 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} , utilizando 32 varreduras no modo de reflexão total atenuada (ATR).....56
- Figura 10.** Espectros de Raman para as diferentes amostras de CB, incluindo CB nativa, CB/CMC, CB/CMC/EDC:NHS, CB/BSA/EDC:NHS, CB/Col I, CB/mBMP-7 com histidina, CB/mBMP-7, CB/LRP, CB/Col I/LRP, CB/mBMP-7 com histidina/LRP e CB/mBMP-7/LRP. Os espectros foram adquiridos num intervalo de 4000 a 50 cm^{-1} , com uma potência de laser de 300 mW e 512 scans.....58

Figura 11. Curvas termogravimétricas (TG) e derivadas (DTG) das amostras: CB nativa, CB/CMC, CB/CMC/EDC:NHS, e CB/BSA/EDC:NHS na faixa de 29 °C a 600 °C, com taxa de fluxo de 100 mL/min ⁻¹ e velocidade de aquecimento de 10°C/min.....	60
Figura 12. Curvas termogravimétricas (TG) e derivadas (DTG) das amostras: CB/Col I, CB/mBMP-7 com histidina, CB/mBMP-7, e CB/LRP na faixa de 29 °C a 600 °C, com taxa de fluxo de 100 mL/min ⁻¹ e velocidade de aquecimento de 10°C/min.	61
Figura 13. Curvas termogravimétricas (TG) e derivadas (DTG) das amostras: CB/Col I/LRP, CB/mBMP-7 com histidina/LRP e CB/mBMP-7/LRP na faixa de 29 °C a 600 °C, com taxa de fluxo de 100 mL/min ⁻¹ e velocidade de aquecimento de 10°C/min.....	62
Figura 14. Microscopia eletrônica de varredura. Amostra A (CB nativa); Amostra B (CB/CMC/NaCl/BSA); Amostra C (CB/CMC/BSA/EDC:NHS); Amostra 3D(CB/BSA/EDC:NHS); Amostra E (CB/Col I); Amostra F (CB/mBMP-7 com Histidina); Amostra G (CB/LRP); Amostra H (CB/mBMP-7); Amostra I (CB/Col I/LRP); Amostra J (CB/mBMP-7 com Histidina/LRP) e Amostra K (CB/mBMP-7/LRP). Barra de escala: 10µm.....	65
Figura 15. Mapeamento químico homogêneo das amostras CB nativa, CB/CMC, CB/CMC/EDC:NHS e CB/EDC:NHS, evidenciando a distribuição dos elementos químicos Carbono (C), Oxigênio (O) e Nitrogênio (N), além da sobreposição (merge) de todos os elementos identificados.....	66
Figura 16. Mapeamento químico das amostras CB/Col I, CB/mBMP-7 com e sem histidina e CB/LRP, evidenciando a distribuição dos elementos químicos Carbono (C), Oxigênio (O) e Nitrogênio (N), além da sobreposição (merge) de todos os elementos identificados.....	67
Figura 17. Mapeamento químico homogêneo das amostras CB/Col I/LRP e CB/mBMP-7 com e sem histidina/LRP, evidenciando a distribuição dos elementos químicos Carbono (C), Oxigênio (O) e Nitrogênio (N), além da sobreposição (merge) de todos os elementos identificados.....	67
Figura 18. Análise de espectroscopia de dispersão de energia (EDS) das amostras CB nativa, CB/CMC, CB/CMC/EDC:NHS, CB/EDC:NHS, CB/Col I, CB/mBMP-7 com e sem histidina, CB/LRP e as bifuncionalizadas CB/Col I/LRP e CB/mBMP-7 com e sem histidina/LRP, identificando a composição elementar e confirmando a presença dos elementos Carbono (C), Oxigênio (O) e Nitrogênio (N).....	68
Figura 19. Imagem representativa da topografia das amostras CB, CB/CMC/EDC/NHS, CB/Col I/LRP e CB/mBMP-7/LRP obtidas por microscopia de Força Atômica utilizando uma sonda Bruker® SCANASYST-AIR com constante de mola nominal de 0,4 N/m e raio da ponta de 2,0 nm para a varredura.....	71
Figura 20. Valores de ângulo de contato para as amostras de CB nativa e CB funcionalizada com as sequências peptídicas.....	73
Figura 21. Tensão superficial das amostras de CB, CB/CMC/EDC/NHS, CB/Col I/LRP e CB/mBMP-7/LRP.....	74
Figura 22. Ensaio de atividade hemolítica dos peptídeos LRP, Col I e mBMP-7, realizados em diluição seriada partindo de 512 µg/mL até 1 µg/mL.....	76
Figura 23. Porcentagem de viabilidade celular da linhagem L929 e SaOS-2, avaliada por método indireto utilizando o reagente colorimétrico resazurina, frente às amostras de CB nativa e CB bifuncionalizadas com peptídeos.....	76

Figura 24. Proliferação celular da linhagem L929 expressa em unidades arbitrárias (u.a.) em função das diferentes amostras de CB nativa e CB bifuncionalizada com peptídeos com análise estatística 2way Anova, sendo $p>0,05$	77
Figura 25. Proliferação celular da linhagem SaOS-2 expressa em unidades arbitrárias (u.a.) em função das diferentes amostras de CB nativa e CB bifuncionalizada com peptídeos, com análise estatística 2way Anova, sendo $p>0,05$	79
Figura 26. Micrografias da porcentagem de fechamento da pseudo-ferida utilizando fibroblastos L929 nos tempos 0, 6, 24 e 48h. Barra de escala 40 μ m.....	82
Figura 27. Efeito na migração de linhagem celulares L929 através da avaliação do fechamento da pseudo-ferida nos tempos 0, 6, 24 e 48h em porcentagem.....	82
Figura 28. As micrografias das células L929 e SaOS-2 por MEV da amostra CB após 72 horas de incubação.....	84
Figura 29. As micrografias das células L929 e SaOS-2 por MEV da amostra CB/CMC/EDC/NHS após 72 horas de incubação.....	85
Figura 30. As micrografias das células L929 e SaOS-2 por MEV da amostra CB/Col I/LRP após 72 horas de incubação.....	85
Figura 31. As micrografias das células L929 e SaOS-2 por MEV da amostra CB/mBMP-7/LRP após 72 horas de incubação.....	86

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1. Membranas biopoliméricas de CB funcionalizadas com diferentes peptídeos via ligações não covalentes e covalentes com ampla aplicação biomédica.....	32
Tabela 2. Valores das componentes polares e dispersivas descrito por Zettlemoyer (1974).	41
Tabela 3: Abreviações utilizadas nos resultados e discussões.....	46
Tabela 4. Valores aproximados das massas moleculares de cada sequência peptídica analisadas a partir dos espectros de massas obtidos por espectrometria de massas, considerando as diferentes razões massa/carga (m/z) e seus respectivos estados de carga.....	51
Tabela 5. Representação das principais bandas atribuídas aos grupos funcionais presentes nas amostras de CB funcionalizadas e não funcionalizadas com as diferentes sequências peptídicas.....	53
Tabela 6. Representação das principais bandas atribuídas a molécula de CB e a presença das amidas I e II nas amostras de CB funcionalizadas com as sequências peptídicas.....	56
Tabela 7. Representação das principais bandas vibracionais atribuídas aos grupos funcionais presentes nas amostras de CB, antes e após a bifuncionalização com peptídeos, conforme identificado nos espectros de Raman.....	58
Tabela 8. Principais eventos de perda de massa em função do aumento da temperatura (29 °C a 600 °C) para as diferentes amostras de CB, funcionalizadas e não funcionalizadas com as sequências peptídicas.....	62
Tabela 9 Representação dos elementos químicos presentes nas diferentes amostras de CB funcionalizadas e não funcionalizadas com as sequências peptídicas.....	69
Tabela 10. Valores de Nanorugosidade média das amostras obtidas por microscopia de força atômica.....	71
Tabela 11. Valores das componentes polares e dispersivas obtidas com as amostras CB nativa e CB funcionalizadas com os peptídeos.....	74
Tabela 12. Valores de ângulo de contato em água e tensão superficial das amostras CB nativa e CB funcionalizada com as sequências peptídicas.....	74
Tabela 13. Análise Estatística 2way ANOVA - Turkey do ensaio de proliferação frente a linhagem L929, sendo $p > 0,05$	78
Tabela 14. Análise Estatística 2way ANOVA - Turkey do ensaio de proliferação frente a linhagem SaOS-2, sendo $p > 0,05$	79

LISTAS DE ABREVIATURAS

Abs: Absorbância

AFM: microscopia de força atômica

AFM: Microscopia de Força Atômica (do inglês Atomic Force Microscopy)

AKT: *Protein Kinase B*

BMP-2: Bone Morphogenetic Protein-2

BMP-7: Bone Morphogenetic Protein-7

BSA: albumina sérica bovina

CAGR: *Compound Annual Growth Rate*

CB: Celulose bacteriana

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

CMC: carboximetilcelulose

Col I: peptídeo mimético a colágeno tipo I

DIC: N,N-diisopropilcarbodiimida

DMEM: meio de Eagle Modificado por Dulbecco (do inglês Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

DMF: 4-metilpiperidina em dimetilformamida

DTG: Termogravimetria Derivada (do inglês Derivative Thermogravimetric)

EDC: [1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida]

FAK: *Focal Adhesion Kinase*

FDA: *Food and Drug Administration*

Fmoc: fluorenilmetiloxycarboxil

FT-IR/ATR: Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho no modo de Reflexão Atenuada

FTIR-ATR: Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier por Reflectância Total

Atenuada (do inglês Fourier Transform Infrared-Attenuated Total Reflectance)

GARGQAGVMGFO: Gly-Ala-Arg-Gly-Gln-Ala-Gly-Val-Met-Gly-Hyp

GTPases: *Guanine Triphosphatases*

HDF: fibroblastos dérmicos humanos

HOBt: N-hidroxibenzotriazol

KVSALKEKVSALKEKNSALKWKVSALKE: Lys-Val-Ser-Ala-Leu-Lys-Glu-Lys-Val-Ser-Ala-Leu-Lys-Glu-Lys-Asn-Ser-Ala-Leu-Lys-Trp-Lys-Val-Ser-Ala-Leu-Lys-Glu

LRP: peptídeo rico em lisina

MAPK/ERK: *Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase*

MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinase*

mBMP-7: Peptídeo mimético a proteína morfogenéticas BMP-7

MEC: célula-matriz extracelular

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

MEV: microscopia eletrônica de varredura

MFA: Microscopia de Força Atômica

NHS: N-hidroxisuccinimida

PBS: tampão fosfato salino (do inglês Phosphate Buffer Saline)

PDMS: poli-dimetilsiloxano

PI3K: *Phosphoinositide 3-Kinase* (PI3K)

PLLA: ácido poli-lático

Rho: *Ras homolog gene family*

SFB: Soro Fetal Bovino

SMAD: *Small Mothers Against Decapentaplegic*

SPPS: Síntese de Peptídeos em fase Sólida

TFA: ácido trifluoracético

TFE: Trifluoroetanol

TGA: Análise Termogravimétrica (do inglês Thermogravimetric Analysis)

TGF- β : *Transforming Growth Factor Beta*

TIS: triisopropilsilano

VEHDKEFFHPRYHH: Val-Glu-His-Asp-Lys-Glu-Phe-Phe-His-Pro-Arg-Tyr-His-His

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	19
1.1.	Modelos Celulares <i>In Vitro</i> : Comparação entre culturas 2D e 3D na pesquisa Biomédica	199
1.2.	Biopolímero e peptídeos funcionais: potencialidades para engenharia de biomateriais	221
2.	OBJETIVOS	35
2.1.	Objetivos Gerais.....	35
2.2.	Objetivos Específicos.....	35
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1.	Obtenção das películas de CB.....	35
3.2.	Síntese das sequências peptídicas	36
3.3.	Funcionalização das películas com as sequências peptídicas.....	37
3.4.	Estudos conformacionais por dicroísmo circular.....	38
3.5.	Caracterizações físico-químicas e morfológicas	39
3.6.	Ensaio biológico <i>in vitro</i>	39
3.7.	Análise Estatística.....	45
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.	CONCLUSÕES	86
	ANEXO I	88
	CAPÍTULO 2	92
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117

1. INTRODUÇÃO

1.1. Modelos Celulares *In Vitro*: Comparação entre Culturas 2D e 3D na Pesquisa Biomédica

O estabelecimento de métodos de cultura celular bidimensional (2D) *in vitro* foi um dos principais avanços alcançados no século XX, especialmente por garantir a implementação de práticas menos onerosas, de fácil interpretação e de menor custo no rastreamento/triagem de medicamentos, bem como o estudo das funções e mecanismos envolvidos nas respostas celulares, seja no contexto normal e de diferentes doenças, com enfoque para a biologia do câncer. Deste modo, a prática de cultivo celular *in vitro* tem possibilitado grandes avanços tanto na área biomédica, engenharia tecidual, medicina regenerativa e até mesmo em práticas industriais, mitigando os testes em animais (KAPALCZYNSKA *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2018; EDMONDSON *et al.*, 2014).

A cultura de células 2D convencional baseia-se na aderência das células a uma superfície plana, geralmente uma placa de Petri de vidro ou poliestireno (PS), que oferece suporte mecânico para o crescimento celular. O cultivo em monocamada 2D garante que as células tenham acesso a quantidades semelhantes de nutrientes e fatores de crescimento presentes no meio, resultando em crescimento e proliferação homogêneos (CALEB & YONG, 2020; DUVAL *et al.*, 2017).

A principal limitação da cultura 2D tradicional é a falha em imitar a arquitetura e os microambientes *in vivo*. Como consequência, existem muitas características diferentes que as células cultivadas em 2D possuem em comparação com as células *in vivo*, como características morfológicas, potenciais de proliferação e diferenciação, interações célula-célula e matriz circundante à célula e transdução de sinais (CHAICHAOENAUDOMRUNG *et al.*, 2019; LV *et al.*, 2017).

O PS tem sido utilizado há mais de 50 anos nas práticas de cultivo de células aderente de animais e humano. Dentre suas vantagens, destacam-se, sua elevada conformabilidade que possibilita a sua confecção em diferentes formatos e tamanhos, baixo custo de fabricação, elevada transparência, facilidade na esterilização, ausência de DNase, RNase e metais pesados, somada a possibilidade de modificação de sua superfície através de diferentes tratamentos físicos e químicos, que possibilitam a otimização da ancoragem, adesão e crescimento celular (LERMAN *et al.*, 2018).

Embora o uso de plataformas de cultivo celular *in vitro* baseada em PS seja de extrema importância para as práticas tradicionais da pesquisa básica e aplicada, o uso deliberado deste plástico é um problema grave tanto para o ambiente terrestre, quanto marinho, uma vez que sua degradação é lenta, favorecendo o seu acúmulo na natureza e o seu consequente impacto no aquecimento global. Adicionalmente, os métodos de cultivo 2D tradicionais fornecem um fraco mimetismo com o sistema fisiológico humano, onde as interações que prevalecem são entre célula-plástico, que representam imprecisamente a organização celular dos tecidos *in vivo*, implicando na redução da produção de proteínas, na expressão de genes importantes e na atividade metabólica celular (CALEB & YONG, 2020).

Nesse sentido, frente a necessidade de modelos *in vitro* mais preditivos, que mimetizassem a interação célula-matriz extracelular (MEC), as culturas tridimensionais (3D) foram originadas, incluindo culturas em suspensão em placas não aderentes, culturas em meio concentrado ou sobre materiais gelatinosos e culturas em *scaffolds*. O cultivo 3D tem como princípio induzir as células a se auto-organizarem em uma estrutura esferoidal, sem aderirem a uma superfície, onde as interações que prevalecem são entre célula-célula e célula-MEC. A arquitetura 3D assumida pelas células, suas matrizes e os bioprodutos secretados por elas, geram um microambiente dinâmico, que melhor se assemelha a biologia dos tecidos (LANGHANS, 2018).

Os sistemas de cultura de células 3D forneceram aos novos ensaios, maior relevância fisiológica, especialmente quando se trata da semelhança comportamental com as células *in vivo*. Na última década, uma variedade de plataformas *in vitro* foram desenvolvidas para viabilizar os sistemas de cultura 3D aplicados à pesquisa oncológica e de células-tronco, incluindo o desenvolvimento de novos medicamentos, a pesquisa molecular e fisiológica envolvida com o desenvolvimento dos diferentes tipos de tumores e engenharia de tecidos para implantação *in vivo*. Entretanto, experimentos envolvendo culturas 3D podem ser mais difíceis de serem replicados, requerem maior tempo de ensaio, maior complexidade para análise dos resultados e custos elevados (CALEB & YONG, 2020; DUVAL *et al.*, 2017; KAPALCZYNSKA *et al.*, 2018).

Na transição entre modelos celulares 2D e 3D, novas técnicas adaptadas para o cultivo em 2D também foram postuladas, com o intuito de adicionar propriedades bioativas a essas superfícies, bem como alterar sua topografia, rigidez e carga mecânica, incluindo as plataformas recobertas por proteínas da MEC (F-actina, fibronectina, vitronectina, dentre outras), substratos microestruturados (micropoços) recobertos ou não com proteínas da MEC,

substratos bidimensionais baseados em arranjos hexagonais de PDMS (poli-dimetilsiloxano) e PLLA (ácido poli-lático) e plataformas celulares tipo sanduíche, onde, neste último caso, as células são semeadas entre duas camadas de colágeno ou poliacrilamida, por exemplo (FU *et al.*, 2010; XU *et al.*, 2014; DUVAL *et al.*, 2017). A Figura 1 ilustra a conformação dimensional das células em modelo 2D e 3D.

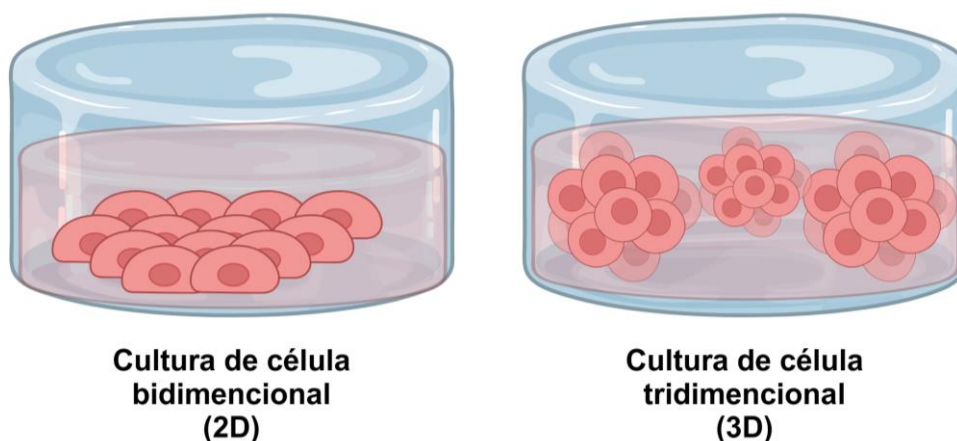


Figura 1. Diferenças na disposição e morfologia celular entre os cultivos 2D e 3D. Elaborado pela própria autora.

1.2. Biopolímeros e Peptídeos Funcionais: Potencialidades para Engenharia de Biomateriais

Biopolímeros são materiais poliméricos formados por monômeros que se repetem ao longo da cadeia, e que têm origem em fontes naturais, incluindo animais, vegetais e microrganismos. Os biopolímeros possuem inúmeras vantagens em relação aos polímeros sintéticos, tais como, baixa toxicidade e imunogenicidade frente a outros organismos vivos, elevada hidrofiliabilidade, e um apelo sustentável por serem passíveis de biodegradação, oferecendo menos danos ao meio ambiente. Entretanto, carecem de propriedades térmicas e mecânicas. Suas aplicações se estendem a diferentes áreas, incluindo a área farmacêutica (SHARIATINIA, 2019), cosmética (JUNCAN *et al.*, 2021), alimentos (BARBOSA *et al.*, 2023), agricultura (BLAGA *et al.*, 2022), e no desenvolvimento de dispositivos médicos (KAMEL & KHATTAB, 2020). Ademais, os biopolímeros podem ser empregados em diferentes formas, tais como os filmes, membranas, fibras, esponjas, aerogéis, hidrogéis e como invólucros para alimentos (INÁCIO, 2022; GHEORGHITA *et al.*, 2021). Diversos

biopolímeros têm sido explorados na engenharia de tecidos, a saber, ácido hialurônico, alginato de sódio, quitosana, colágeno e notadamente, a CB.

A celulose $(C_6H_{10}O_5)_n$ é o biopolímero mais abundante da biosfera, sendo constituída por unidades repetitivas derivadas do monossacarídeo D-glicopiranosose, que, após a formação das ligações glicosídicas do tipo β -1 \rightarrow 4, passam a integrar a cadeia polimérica na forma de resíduos de glucosila. Essas unidades se organizam linearmente, originando longas cadeias de glucano estabilizadas por extensas redes de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares (GOTTSCHALK *et al.*, 2021; NAVYA *et al.*, 2022).

A celulose I é encontrada majoritariamente nas paredes celulares das plantas, algas, fungos, protozoários, bactérias e alguns animais marinhos, incluindo tunicatos (MADHUSHREE *et al.*, 2024). A celulose I é ainda subdividida em dois alomorfos distintos: celulose I α (triclínica) e I β (monoclínica), sendo a primeira secretada por bactérias e algas e a segunda extraída de fibras naturais, como algodão, linho e cânhamo. A forma I α apresenta uma célula unitária triclínica contendo uma única cadeia, na qual resíduos de glucosila alternados diferem sutilmente em conformação e padrão de ligações de hidrogênio. Essa organização, aliada à ausência de outros componentes (pectina, lignina e hemiceluloses), resulta em elevado grau de ordenação cristalina, com valores de cristalinidade que podem atingir até 96%. Em contraste, a celulose I β possui uma célula unitária monoclínica contendo duas cadeias com simetria helicoidal 2 $_1$, nas quais os resíduos de glucosila são estruturalmente equivalentes, mas orientados alternadamente em folhas distintas da rede cristalina (TRACHE *et al.*, 2020).

A celulose pode ser classificada como um biopolímero anfifílico, uma vez que apresenta numerosos grupos hidroxila (-OH) capazes de interagir com as moléculas de água. Entretanto, apesar dessa afinidade, o material permanece insolúvel em meio aquoso. Essa característica está associada à elevada estabilidade estrutural da celulose, resultante não apenas da extensa rede de ligações de hidrogênio, mas também pela presença de interações não covalentes entre as cadeias poliméricas (WOHLERT *et al.*, 2022).

Em relação a sua distinta conformação morfológica, a celulose apresenta microfibrilas que se agrupam formando fibrilas na ordem de 7 a 13 nm. Essas fibrilas se associam, formando agregados com espessura de até 150 nm, os quais assumem uma conformação do tipo fitas (ribbons) com espessura aproximada de até 500 nm e comprimento alcançando vários micrômetros.

Outra característica que torna a celulose amplamente empregada nos diferentes setores, incluindo a área têxtil, alimentícia, biomédica e de moda, trata-se da sua natureza biodegradável que reduz os impactos ambientais e oferece uma alternativa mais ecológica em comparação com materiais sintéticos não biodegradáveis.

O primeiro relato sobre a síntese de celulose oriunda de microrganismos foi descrito por Brown em 1886, que observou a formação de uma película gelatinosa na interface ar/meio líquido, resultante do cultivo da bactéria anteriormente denominada *Gluconacetobacter xylinus* (atualmente chamada *Komagataeibacter xylinus*), em um meio à base de vinagre (BROWN, 1886).

A celulose bacteriana (CB) também nomeada como biocelulose ou celulose nanofibrilada, é sintetizada no formato de uma membrana altamente hidratada, onde 99% do seu conteúdo é água e aproximadamente 1% é celulose. Dentre os principais gêneros de bactérias aeróbicas obrigatórias e ou/facultativas, gram-negativas e não patogênicas capazes de sintetizar CB, as mais relatadas são *Komagataeibacter*, *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas* e *Achromobacter*. (BERNARDO *et al.*, 2021; LUPASCU *et al.*, 2022).

Durante a biossíntese, seja sob condições de cultivo dinâmico ou estático, as cadeias de glicose organizam-se em microfibrilas, que se associam entre si, formando as redes de fibras que são extrudadas pelos poros presentes na parede celular microbiana. Essas fibras exibem uma estrutura 3D altamente porosa, caracterizada por uma elevada área superficial (JOZALA *et al.*, 2016). Uma vez sintetizada, a CB pode ser quimicamente purificada por métodos relativamente simples, visando a remoção de bactérias remanescentes e de subprodutos advindos do meio de cultivo (PICHETH *et al.*, 2017; TROVATTI *et al.*, 2016).

Acredita-se que a biossíntese de CB facilite as trocas gasosas dos micro-organismos, além de servir como uma barreira física contra a radiação ultravioleta, aumentando a habilidade destes microrganismos em colonizar substratos (BARUD *et al.*, 2011).

Estruturalmente, a CB apresenta a mesma composição química da celulose de origem vegetal, entretanto, distingue-se por sua elevada pureza química, uma vez que não contém componentes associados às fibras, como hemicelulose, pectina e lignina. Ademais, apresenta maior cristalinidade quando comparada a celulose vegetal, variando entre 70% e 89% (BARUD *et al.*, 2011; LUPASCU *et al.*, 2022; S. GORGIEVA, J. TRCEK, 2019). Somado a isso, a CB pode ser sintetizada em diferentes tamanhos e formatos, além de exibir elevada retenção de água (até 99%), uma moderada taxa de permeabilidade ao vapor de água, elevada

porosidade, aliado à sua intrínseca rede de micro e nanofibrilas semelhante as fibras colágenas.

Nesse sentido, apresenta características notáveis, e a possibilidade de combinação com outros materiais para obtenção de biocompósitos, especialmente pela possibilidade de ser submetida a diferentes tratamentos físicos e químicos, neste último caso, pela disponibilidade de grupos hidroxilas (-OH) reativos na molécula, garantindo-lhe propriedades adicionais (BARUD *et al.*, 2011; COURTENAY *et al.*, 2017; DE OLIVEIRA BARUD *et al.*, 2016).

Em relação a sua natureza biocompatível, a CB tem sido explorada na área médica desde o final do século XX, quando foi utilizada pela primeira vez como substituto temporário de pele, sendo comercializada com o nome BioFill®, atualmente conhecido como Dermafill™. O produto é destinado ao tratamento de lesões cutâneas, como queimaduras, abrasões, lacerações e úlceras. Seu desempenho demonstrou vantagens em relação aos curativos convencionais, proporcionando maior alívio da dor e acelerando o processo de cicatrização. Desde então, diversos produtos oriundos da CB têm sido disponibilizados comercialmente para aplicação tópica na regeneração de tecidos, incluindo Bionext®, Bioprocess® e XCell® (AMORIM *et al.*, 2022; KUCINSKA-LIPKA *et al.*, 2015; NAOMI; IDRUS, FAUZI, 2020). A CB tem sido amplamente explorada em formulações farmacêuticas. No estudo de Ossowicz-Rupniewska *et al.* (2021), a CB foi testada como carreador de ibuprofeno, um fármaco anti-inflamatório não esteroidal, na forma química de sal de éster. Os estudos de caracterização físico-química demonstraram a obtenção de um curativo homogêneo, que permitiu a liberação lenta e controlada do ativo. Esses achados indicam que a CB pode ser empregada no desenvolvimento de curativos para feridas complexas, que exigem controle da inflamação local.

Na engenharia de tecidos, a CB tem sido utilizada no desenvolvimento de novos scaffolds. Em um estudo realizado por Das *et al.* (2022), os antibióticos gentamicina e estreptomicina foram incorporados separadamente em filmes poliméricos compostos por CB e poli- ϵ -caprolactona (PCL). A análise *in vitro* revelou que esses materiais apresentaram citocompatibilidade frente a células renais da linhagem BHK-21, além de atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. O perfil de liberação dos antibióticos revelou uma cinética de liberação sustentada por até 48 horas.

Outro estudo, conduzido por Malmir *et al.* (2020), incorporou nanopartículas de Quantum Dots de carbono conjugadas a dióxido de titânio (CQDs-TiO₂) em películas de CB. Os resultados demonstraram que o material desenvolvido apresentou eficácia antimicrobiana

contra *Staphylococcus aureus*, além de baixa citotoxicidade frente a fibroblastos murinos utilizando a linhagem L929. Além disso, foi observada capacidade regenerativa quando testado nesta mesma linhagem celular, por meio do ensaio de *pseudo-wound healing*, sugerindo seu potencial para aplicações na regeneração tecidual.

A CB também tem sido estudada como plataforma celular. No estudo de Quintana et al. (2021), foram investigadas a viabilidade, proliferação e citotoxicidade de um curativo à base de CB contendo fator de crescimento fibroblástico (FGF), associado à fotobioestimulação (FBE). Os resultados *in vitro* demonstraram que o curativo funcional, quando testado em conjunto com FBE, permitiu a adesão celular e manteve a viabilidade de fibroblastos e macrófagos na matriz do curativo. Além disso, não foram observados efeitos citotóxicos frente as linhagens estudadas.

Outras aplicações da CB incluem seu uso como substituto de vasos sanguíneos (ZANG et al., 2015; WU et al., 2018), e na oftalmologia (RENDA et al., 2015). A Figura 2 ilustra o processo de biossíntese da CB, bem como evidencia sua macroestrutura e microestrutura, representada por uma película gelatinosa altamente hidratada, e formada por uma rede 3D de micro e nanofibrilas que se agrupam de maneira aleatória, respectivamente.

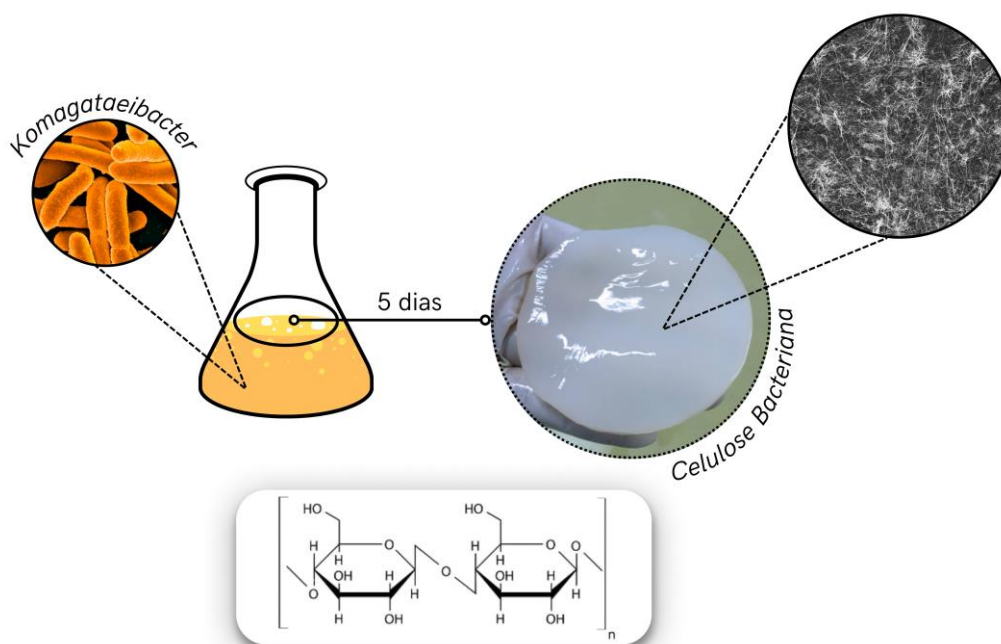


Figura 2. Ilustração da síntese de CB na interface ar/meio líquido por bactérias gram-negativas do gênero *Komagataeibacter*. A imagem ilustra o processo de formação da CB no meio de cultura após 5 dias de cultivo, que culmina com a formação de uma película gelatinosa, que após ser purificada em solução de NaOH, torna-se translúcida. A análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) revela a estrutura 3D das nanofibrilas dispostas aleatoriamente, característico da CB. Por fim, a estrutura química da CB é representada, destacando as unidades glicosídicas unidas por ligações do tipo β -1 \rightarrow 4. Elaborado pela própria autora.

No desenvolvimento de novos biomateriais com propriedades diferenciadas, incluindo aqueles à base de CB, a funcionalização com biomoléculas permite conferir características bioativas ao material final. Diversas proteínas, como enzimas e anticorpos, podem ser utilizadas para criar superfícies funcionais, projetadas para prevenir contaminações e inibição da formação de biofilmes microbianos, promover a adesão celular, detectar moléculas-alvo e catalisar reações químicas específicas. Essas biomoléculas podem ser incorporadas ao material por meio de diferentes técnicas, incluindo adsorção física, funcionalização química, imobilização covalente e métodos de auto-organização (*self-assembly*) (CACICEDO *et al.*, 2016).

Ademais, biopolímeros como a quitosana e o ácido hialurônico também podem ser empregados para modificar superfícies, uma vez que a quitosana possui ação antimicrobiana, auxiliando na inibição do crescimento de microrganismos, enquanto o ácido hialurônico, componente da matriz extracelular, pode conferir maior biocompatibilidade e capacidade de retenção hídrica, úteis em curativos e cosméticos. Devido à disponibilidade de grupos reativos em sua estrutura, ambos os biopolímeros mencionados podem modificar a superfície da celulose, contribuindo para a redução do acúmulo indesejado de proteínas e melhoria da incorporação de sequências de ácidos nucleicos, como aptâmeros de DNA ou RNA. Esses aptâmeros vêm sendo amplamente utilizados no desenvolvimento de plataformas biossensoras altamente seletivas, capazes de reconhecer moléculas-alvo com elevada precisão (PIRES, BIERHALZ e MORAES, 2015; VÁZQUEZ *et al.*, 2021).

Em relação ao uso de peptídeos como camada bioativa em materiais de origem natural ou sintética, estes apresentam inúmeras vantagens para tal aplicação, tendo em vista sua natureza biocompatível, sua elevada especificidade, tamanho reduzido, maior estabilidade, alta pureza, baixa imunogenicidade, custo inferior e ampla diversidade química e biológica (DAYEM *et al.*, 2023), tornando-se essenciais no desenvolvimento de novas terapias celulares, biomateriais destinados a regeneração óssea e tecidual, e também em cuidados pessoais, incluindo a área dermocosmética (MACHADO *et al.*, 2004).

Peptídeos podem ser designados como biomoléculas compostas por dois ou mais aminoácidos, unidos por ligações peptídicas. Essa ligação química específica ocorre entre o grupo carboxila de um aminoácido e o grupo amina de outro, resultando na liberação de uma molécula de água a cada nova ligação (COLLIER e SEGURA, 2011). A sua síntese pode ocorrer por diferentes rotas, sendo elas (i) a síntese em fase sólida, do inglês, *Solid-Phase Peptide Synthesis* (SPPS), amplamente utilizada para produção de moléculas complexas, (ii) a

síntese em fase líquida, eficiente para produção em larga escala, e (iii) a síntese enzimática, alternativa sustentável e seletiva. A escolha pela síntese em fase sólida deve-se ao fato de ser um processo totalmente automatizado, o que torna a produção mais rápida e eficiente. Além disso, essa abordagem permite a síntese de peptídeos longos e complexos, reduz a perda de material e possibilita modificações químicas precisas, garantindo maior controle sobre a estrutura final dos peptídeos (CILLI *et al.*, 2017; MACHADO *et al.*, 2004). A Figura 3 apresenta as principais classes de aminoácidos presentes nas três sequências selecionadas no presente estudo, sintetizadas pelo método SPPS.

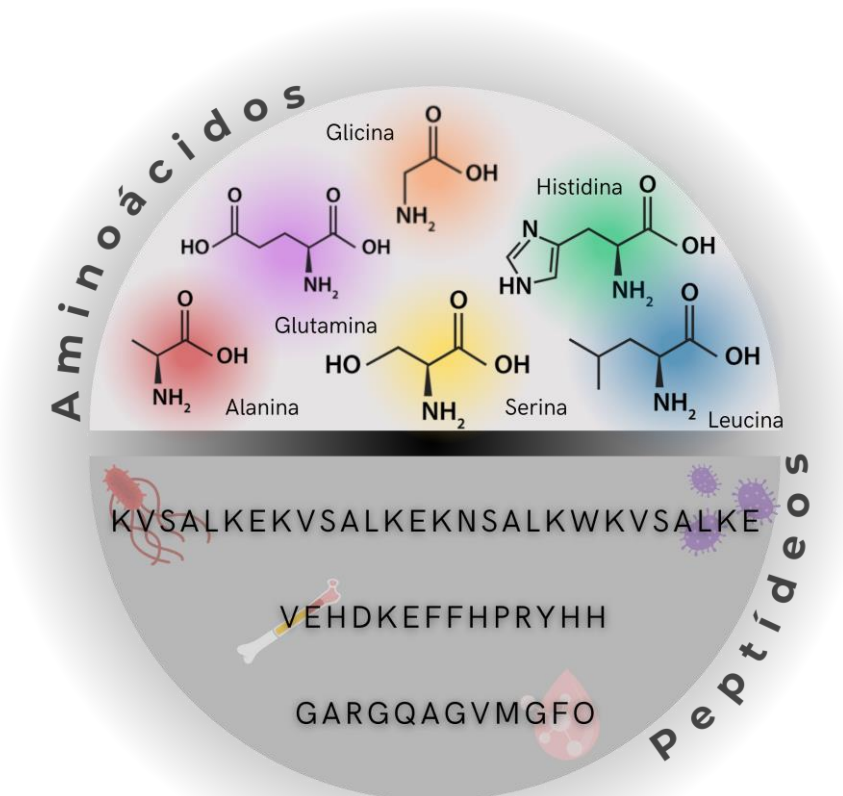


Figura 3. Estrutura química dos aminoácidos glicina (Gly), histidina (His), glutamina (Gln), alanina (Ala), serina (Ser) e leucina (Leu), e as respectivas sequências peptídicas sintetizadas via SPPS e utilizadas no presente estudo. As sequências peptídicas foram projetadas com base na combinação dos aminoácidos mencionados, e empregadas para investigar suas propriedades bioativas, sendo elas: KVSALKEKVSALKEKNSALKWKVSALKE (Peptídeo rico em Lisina - LRP), VEHDKEFFHPRYHH (Peptídeo mimético a BMP-7) e GARGQAGVMGFO (Peptídeo mimético ao Colágeno Tipo I). Elaborado pela própria autora.

O mercado global destas biomoléculas tem crescido significativamente devido ao avanço tecnológico e à crescente demanda em áreas como biotecnologia, indústria

farmacêutica e engenharia tecidual. Em 2024, a venda destas biomoléculas alcançou US\$ 117,26 bilhões e deve crescer a uma Taxa de Crescimento Anual Composta, do inglês, *Compound Annual Growth Rate* (CAGR) de 10,77% entre 2025 a 2030. Estima-se que esse aumento esteja atrelado a via de síntese utilizando o método SPPS, tendo em vista a garantia de escalabilidade e elevada pureza dos peptídeos obtidos (GRAND VIEW RESEARCH, 2025).

Dentro desse mercado global, destacam-se os peptídeos de colágeno, como os da marca Peptan®, amplamente utilizados na indústria alimentícia e de suplementos devido à sua compatibilidade com diversos processos de produção e aos benefícios associados à saúde da pele, cabelo e unhas. A Peptan® é reconhecida como a principal marca de peptídeos de colágeno, sendo empregada na formulação de bebidas lácteas enriquecidas com colágeno, além de produtos como sorvetes e outras bebidas funcionais (ROUSSELOT, 2025).

No setor de skincare, os peptídeos têm sido incorporados em diversas formulações com o objetivo de estimular a produção de colágeno e elastina, auxiliando na redução de rugas e sinais de envelhecimento. Produtos como sérums e cremes contendo peptídeos vêm ganhando destaque no mercado de beleza devido à sua eficácia e crescente demanda por soluções antienvhecimento (L'Officiel Brasil, 2025).

Dentre os peptídeos utilizados na engenharia tecidual, a sequência RGD se destaca por sua capacidade de mediar a adesão celular. Nomeada com base em seus aminoácidos constituintes, sendo estes arginina (R), glicina (G) e ácido aspártico (D), essa sequência desempenha um papel essencial na interação celular com a matriz extracelular. Peptídeos miméticos a proteína morfogenética óssea 7, do inglês *Bone Morphogenetic Protein-7* (BMP-7), também possuem relevante papel e contribuição na regeneração óssea, bem como as sequências peptídicas miméticas ao colágeno tipo I, fundamental para a cicatrização de tecidos e reparo ósseo (CECCHI *et al.*, 2016; CHIMEDTSEREN *et al.*, 2023; LUO *et al.*, 2016).

De maneira detalhada, a sequência peptídica RGD desempenha um papel crucial na engenharia tecidual ao modular a adesão celular por meio da interação com receptores de integrinas. Essa ligação ativa diversas vias de sinalização intracelular, como a via da quinase de adesão focal, do inglês, *Focal Adhesion Kinase* (FAK), que regula a organização do citoesqueleto e a migração celular, e a via fosfatidilinositol 3-quinase, do inglês, *Phosphoinositide 3-Kinase* (PI3K) e à proteína quinase B, do inglês, *Protein Kinase B* (Akt), essencial para a sobrevivência e proliferação celular. Além disso, a cascata *Mitogen-Activated*

Protein Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase (MAPK/ERK) contribui para a diferenciação celular, enquanto as *Guanine Triphosphatases* (GTPases), incluindo membros da *Ras homolog gene family* (Rho), a saber, RhoA, Rac1 e Cdc42, controlam diferentes eventos biológicos que ocorrem no citoesqueleto, influenciando processos como adesão e motilidade celular (LUO *et al.*, 2016; TUGULU *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2013).

A funcionalização de biomateriais com peptídeos RGD tem demonstrado impacto significativo na regeneração tecidual, uma vez que melhora a ancoragem e viabilidade celular, reduzindo a formação de tecido fibroso na interface entre o biomaterial e o tecido biológico (LI *et al.*, 2008). Estudos indicam que a imobilização de RGD em matrizes como hidrogéis de alginato, favorece a organização celular e a formação de tecidos estruturados, como o muscular e o ósseo, ao mimetizar as interações entre células e a matriz extracelular (SONDERMEIJER *et al.*, 2018). Essa funcionalização também potencializa a retenção de células progenitoras, favorecendo sua diferenciação e o processo de reparo tecidual. Assim, o emprego de peptídeos RGD na bioengenharia representa uma abordagem promissora para o desenvolvimento de materiais biomiméticos que possam otimizar a integração celular e promoverem a regeneração tecidual.

Dentre as proteínas de matriz que possuem um papel crucial no processo de regeneração tecidual, têm-se o colágeno tipo I, que é uma das formas mais abundantes de colágeno no corpo humano, presente principalmente na pele, tendões, ossos e ligamentos (CHIMEDT SEREN *et al.*, 2023; SINGH *et al.*, 2023). Peptídeos que mimetizam o colágeno tipo I são projetados para imitar as propriedades estruturais e mecânicas do colágeno, favorecendo processos como a regeneração de tecidos. Esses peptídeos podem ser usados para promover a cicatrização de feridas, melhorar a elasticidade da pele e até mesmo promover a regeneração de cartilagens e tecidos ósseos (XU & KIRCHNER, 2021).

De maneira detalhada, sequências peptídicas que mimetizam o colágeno tipo I, ativam as mesmas vias de sinalização intracelular que a sequência RGD, uma vez que também é uma proteína de matriz extracelular, que interage com diferentes receptores celulares, especialmente as integrinas. Essas vias desempenham um papel fundamental na adesão, proliferação, sobrevivência e diferenciação celular, influenciando diretamente a regeneração tecidual.

Chimedtseren *et al.* (2023) investigaram o potencial osteogênico do peptídeo mRCP, mimético da cadeia α do colágeno tipo I, em um modelo de defeito craniano crítico em ratos *Sprague-Dawley*. O estudo demonstrou formação óssea significativa e progressiva ao longo

de 12 semanas, com desempenho comparável ao enxerto ósseo autólogo e superior ao substituto comercial (Cytrans®). Os resultados histológicos confirmaram a presença de osteoblastos e osteoclastos, evidenciando remodelação óssea.

Por outro lado, a BMP-7 (*Bone Morphogenetic Protein-7*), é uma proteína pertencente à família das BMPs que regulam a diferenciação celular e a formação de ossos e cartilagens. Os peptídeos que mimetizam a BMP-7 têm o potencial de induzir a osteogênese (formação de ossos) e podem ser usados no tratamento de fraturas ósseas ou em doenças como osteoporose (LIU *et al.*, 2023; LOCK & LIU, 2011).

O peptídeo mimético a BMP-7 ativa diversas vias de sinalização intracelular essenciais para a regeneração tecidual e diferenciação celular. Uma das principais vias envolvidas é a via SMAD (*Small Mothers Against Decapentaplegic*), que medeia a sinalização da superfamília do TGF- β (*Transforming Growth Factor Beta*). Quando a BMP-7 se liga aos seus receptores na membrana celular, ocorre a fosforilação das proteínas SMAD1, SMAD5 e SMAD8, que formam um complexo com SMAD4, translocando-se para o núcleo, e regulando a expressão de genes osteogênicos, como *Runx2*, essencial para a diferenciação de osteoblastos.

Além da via SMAD, a BMP-7 ativa a via MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), influenciando a proliferação e diferenciação celular. A p38 MAPK, em particular, desempenha um papel essencial na osteogênese e condrogênese. Outra via relevante é a PI3K/Akt, que regula a sobrevivência celular e o metabolismo energético, aspectos fundamentais na regeneração tecidual.

O peptídeo mimético a BMP-7 também pode modular indiretamente a sinalização Wnt/ β -catenina, promovendo a diferenciação osteogênica e contribuindo para a homeostase do tecido ósseo. A ativação dessas vias de sinalização, torna o BMP-7 um fator essencial para a regeneração óssea e cartilaginosa, com aplicações terapêuticas em tratamentos ortopédicos e outras condições de regeneração tecidual (AYKUL *et al.*, 2021; CECCHI *et al.*, 2016; KHAN *et al.*, 2004; MA *et al.*, 2023).

Estudos sugerem que a funcionalização de biomateriais com peptídeos miméticos a BMP-7 representa uma estratégia promissora para a regeneração óssea. Um exemplo é o BFP-1, um peptídeo derivado do pró-domínio da BMP-7, que demonstrou potencial osteogênico superior ao da BMP-7 recombinante. Esse peptídeo tem sido aplicado em hidrogéis de alginato, nanopartículas de sílica mesoporosa e scaffolds eletrofiados, promovendo a

diferenciação osteoblástica de células-tronco mesenquimais (MSCs) *in vitro* e estimulando a formação óssea em modelos de defeitos ósseos (OLIVER-CERVELLÓ, 2022).

Outra classe de peptídeos que vem se destacando são os peptídeos antimicrobianos que conferem atividade de amplo espectro frente a uma gama de patógenos, além de atuarem na modulação de respostas pró-inflamatórias, estímulo à proliferação celular, e a cicatrização de feridas (HUAN *et al.*, 2020). Um exemplo notável é o Lysine-Rich Peptide (LRP), um peptídeo rico em aminoácido L-lisina, unido por ligações peptídicas ϵ -amino (entre o grupo amino da cadeia lateral e o grupo carboxila da lisina seguinte). Essa biomolécula tem demonstrado eficácia contra patógenos como *Aspergillus parasiticus* e *Penicillium expansum*, sendo, portanto, uma alternativa atraente não só para a preservação de alimentos, mas também para aplicações biomédicas. Além disso, peptídeos aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*), como gramicidina, daptomicina e colistina, têm demonstrado enorme potencial terapêutico (SANTOS *et al.*, 2018; KHAN & OH, 2016). Outro notável peptídeo antimicrobiano que vem sendo explorado em feridas por queimaduras é o PXL150 (BJORN *et al.*, 2015).

Diversas estratégias podem ser utilizadas para a funcionalização de biomoléculas em diferentes arcabouços ou *scaffolds*, sendo as mais comuns a imobilização física e química. A imobilização física baseia-se em interações não covalentes, como a adsorção eletrostática, que ocorre devido à atração entre cargas opostas da biomolécula e da superfície do material. Além disso, a interação hidrofóbica explora afinidades entre regiões apolares, promovendo a ancoragem de biomoléculas em superfícies hidrofóbicas (MENDES *et al.*, 2011).

As forças de *Van der Waals* desempenham um papel crucial na funcionalização, pois envolvem interações intermoleculares fracas, mas cumulativas, que podem estabilizar biomoléculas na superfície do material. Essas forças ocorrem devido a flutuações temporárias na distribuição eletrônica dos átomos, gerando dipolos instantâneos que induzem dipolos em moléculas vizinhas. Dessa forma, estabelecem-se forças atrativas entre a biomolécula e a superfície do material (NOCHEBUENA; RAMÍREZ; IRETA, 2015).

No contexto da adsorção de proteínas e peptídeos, as forças de Van der Waals são particularmente relevantes para superfícies hidrofóbicas e levemente polares, como polímeros e nanomateriais funcionalizados. A proximidade entre a biomolécula e a superfície permite que essas interações se somem, resultando em uma ancoragem estável sem comprometer a estrutura tridimensional e a funcionalidade biológica da biomolécula (NOCHEBUENA; RAMÍREZ; IRETA, 2015).

Já a imobilização química se baseia na formação de ligações covalentes estáveis entre biomoléculas e superfícies, geralmente por meio de grupos funcionais como aminas, carboxilas e tióis. Métodos via silanização são amplamente aplicados para modificar superfícies de vidro e sílica, construindo camadas reativas para posterior acoplamento biomolecular (CLARO *et al.*, 2022).

Na Tabela 1 pode-se visualizar um compilado dos estudos mais recentes que investigaram o uso da CB funcionalizada com diferentes peptídeos, seja de maneira isolada ou utilizando peptídeos quiméricos. Estudos conduzidos em nosso grupo de pesquisa em Biopolímeros e Biomateriais (BioPolMat), também têm focado em explorar estratégias de funcionalização da CB com diferentes organosilanos, modificações físicas e químicas envolvendo o uso de plasma *etching* e plasma *jetting*, e o uso de fatores de crescimento, com aplicações que se concentram especialmente no desenvolvimento de plataformas celulares capazes de promover o espalhamento, adesão e proliferação celular, bem como no desenvolvimento de novos biocurativos antimicrobianos, e notadamente na regeneração óssea guiada (BENEVENUTO *et al.*, 2023; CLARO *et al.*, 2022; QUINTANA *et al.*, 2021).

Ressalta-se ainda que os principais métodos de funcionalização das películas de CB são governados tanto por adsorção, onde as biomoléculas são imobilizadas à superfície por meio de ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e interações hidrofóbicas (GILBERT; KNOX; BORASTON, 2013), bem como por técnicas de imobilização envolvendo os agentes EDC [1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida] e NHS (N-hidroxisuccinimida). O EDC atua como um agente de acoplamento ativando os grupos carboxilas da CB (previamente modificada com carboximetilcelulose, por exemplo), que irão reagir com os grupos amina dos peptídeos. O NHS é frequentemente adicionado por formar um complexo estável com o EDC, aumentando a eficiência da reação de acoplamento e evitando a formação de subprodutos indesejados (MALCOR & MALLEIN-GERIN, 2022).

A ligação química formada por meio do uso dos agentes de acoplamento EDC:NHS é uma amida, caracterizada pela presença de um átomo de nitrogênio (N) ligado a um carbono (C) através de uma ligação dupla (C=O), formando uma estrutura planar. Essa ligação covalente é altamente estável e resistente a condições adversas, proporcionando uma imobilização robusta dos peptídeos na matriz biopolimérica, e notadamente, impede a lixiviação dos peptídeos, além de preservar a sua atividade biológica (VARANKO *et al.*, 2020).

Tabela 1. Membranas biopoliméricas de CB funcionalizadas com diferentes peptídeos via ligações não covalentes e covalentes com ampla aplicação biomédica.

Biomoléculas	Método de imobilização	Aplicações	Referências
Peptídeo de crescimento osteogênico (OGP)	Adsorção	Potencial osteoindutor: regeneração óssea guiada	SASKA <i>et al.</i> (2018)
ϵ -poly-L-Lysine (ϵ -PLL)	EDC:NHS	Biocurativo com ampla atividade antimicrobiana	FURSATZ <i>et al.</i> (2018)
Peptídeo quimérico [peptídeo ligante de carboidratos (CBP)-peptídeo antimicrobiano KR-12 (oriundo da catelicidina humana presente em leucócitos, queratinócitos e células epiteliais de mucosas)]	Adsorção governada pela afinidade da superfície da CB com o peptídeo CBP	Biocurativos com ampla atividade antimicrobiana	ZYL & COBURN (2024)
Peptídeo bifuncional AMP (peptídeo antimicrobiano) -CBP e peptídeo bifuncional RGD (peptídeo de adesão celular)-CBP	Adsorção governada pela afinidade da superfície da CB com o peptídeo CBP	Atividade antimicrobiana comprovada e promoção do espriamento celular de fibroblastos dérmicos humanos	WEISHAUPT <i>et al.</i> (2020)
Peptídeo antimicrobiano Bac-7 (Bactenecina 7), isolado da bactéria <i>Bacillus subtilis</i>	EDC:NHS	Promoção de maior adesão tanto queratinócitos humanos, assim como com a pele suína (ensaio <i>ex vivo</i>)	KIM <i>et al.</i> (2021)
Peptídeo antimicrobiano nisina isolado da bactéria <i>Lactococcus</i>	Adsorção mediada por ligações de hidrogênio e ligações eletrostáticas	Atividade antimicrobiana comprovada e possibilidade de aplicação na área de embalagens de alimentos	DOS SANTOS <i>et al.</i> , (2022)
3-mercaptopropil-trimetoxisilano (MPTS)	Funcionalização da CB com o grupo tiol SH e incubação com MPTS	Promoção da adesão de fibroblastos GM07492	CLARO <i>et al.</i> (2022)
Fator de crescimento de fibroblastos (FGF-2)	Modificação <i>in situ</i>	Constatação do aumento da densidade celular de fibroblastos	QUINTANA <i>et al.</i> (2021)
Modificação com plasma <i>etching</i> de O ₂	Tratamento com plasma de O ₂ por 2.5 e 5 min	Promoção da proliferação, viabilidade, mineralização e atividade de fosfatase alcalina de Osteo-1	BENEVENUTO <i>et al.</i> (2023)

Conforme evidenciado na Tabela 1, Kim et al. (2021) investigaram a modificação das nanofibras de CB com peptídeos Bac-7, pertencente à família de peptídeos de internalização celular, usualmente empregados em sistemas de liberação transdérmica de fármacos e em curativos para cicatrização de feridas (HORN & NEUNDORF, 2018; HONG *et al.*, 2019). O estudo avaliou a atração celular de queratinócitos humanos (HaCaT) e a adesão celular frente a pele suína em ensaios *ex vivo*. Deste modo, foi comprovado que a funcionalização com peptídeos Bac-7 aumentou significativamente a atração entre células HaCaT-nanofibras de CB em até 165% quando comparado as nanofibras não funcionalizadas. Outro achado importante constatou que as nanofibras de CB/Bac-7 promoveram um aumento da adesão frente a pele suína de porco, sendo dependente da concentração de Bac-7.

Fursatz et al. (2018) também investigaram o uso da CB com ϵ -PLL com potencial uso como curativo de feridas. A funcionalização da CB com ϵ -PLL inibiu o crescimento de *S. epidermidis*, mas não afetou a citocompatibilidade frente a fibroblastos humanos. A funcionalização não teve efeitos significativos na estrutura nanofibrosa e nas propriedades mecânicas quando comparado a CB nativa.

Tendo em vista as propriedades supracitadas da CB que a elenca como um excelente arcabouço e plataforma celular, e o crescente uso de biomoléculas para tornar esses sistemas bioativos, incluindo o emprego de peptídeos que mimetizam importantes proteínas de matriz extracelular, o presente estudo focou em investigar pela primeira vez, a possibilidade de bifuncionalização de películas de CB pelo método de ligação covalente, utilizando uma sequência peptídica mimética ao colágeno tipo I, uma sequência peptídica mimética a BPM-7 e o peptídeo rico em lisina (LRP), e a partir disso, investigar as propriedades físico-químicas e morfológicas destas plataformas, bem como aprofundar o entendimento de suas respostas biológicas. Para tal, duas diferentes plataformas celulares foram desenvolvidas, sendo a primeira voltada ao estudo do comportamento de adesão e proliferação de células fibroblásticas de origem murina (L929), e a segunda, voltada à avaliação da adesão celular e da produção de proteínas da MEC, bem como da atividade de mineralização, por células SaOS-2. Ambas as plataformas também serão investigadas quanto sua atividade antimicrobiana, propriedade promovida pela funcionalização com o peptídeo LRP.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Investigar e validar novas plataformas de cultivo celular bifuncionais baseadas em CB/peptídeos miméticos a colágeno tipo I/LRP e CB/peptídeos miméticos a BMP-7/LRP voltadas a otimização dos processos de adesão, proliferação e migração de células fibroblásticas de murino (L929) e osteossarcoma (SaOS-2).

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar a eficácia da síntese em fase sólida das sequências peptídicas GARGQAGVMGFO (peptídeo mimético a colágeno tipo I), VEHDKEFFHPRYHH (peptídeo mimético a BMP-7) e KVSALKEKVSALKEKNSALKWKVSALKE (peptídeo rico em Lisina - LRP) por meio de espectrometria de massas, no modo de ionização por *electrospray* (ESI-MS) e dicróismo circular.
- Avaliar a eficácia da bifuncionalização das películas de CB com as diferentes sequências peptídicas através da imobilização por ligações do tipo amida utilizando os agentes de acoplamento EDC:NHS.
- Caracterizar as plataformas obtidas por técnicas físico-químicas, a saber Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier, Espectroscopia Raman, Análise Termogravimétrica, Microscopia Eletrônica de Varredura, Microscopia de Força Atômica e ensaio de molhabilidade por medição do ângulo de contato.
- Avaliar as propriedades bioativas das películas de CB funcionalizadas com peptídeos através do ensaio de citotoxicidade *in vitro*, ensaio de adesão celular e ensaio de migração e proliferação celular

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção das películas de CB

A produção das películas de CB foi realizada em parceria com a empresa HB Biotec de Araraquara. Foi utilizada a cepa AF1 pertencente ao gênero e espécie *Komagataeibacter rhaeticus*, a partir do cultivo em meio de cultura líquido sob condições estáticas, que apresenta a seguinte composição básica: 2% (m/v) glicose, 0,5% (m/v) peptona, 0,5% extrato

de levedura, 0,27% (m/v) fosfato disódico anidro e 0,115% (m/v) ácido cítrico monohidratado. O cultivo das bactérias foi realizado em placas de 24 poços com tempo de cultivo de 96 horas à 28°C. Para a remoção dos microrganismos, as membranas passaram por tratamento químico utilizando solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M por 30 minutos a 70 °C, sendo posteriormente lavada com água destilada até atingir pH neutro.

3.2. Síntese e purificação das sequências peptídicas

As sequências peptídicas, sendo elas, KVSALKEKVSALKEKNSALKWKVSALKE (peptídeo rico em lisina), massa molar de 3113.69 g/mol, VEHDKEFFHPRYHHH e VEHDKEFFHPRYHH (peptídeos miméticos a BMP-7 com e sem histidina, respectivamente), massas molares de 2014.17 g/mol e 1878.01 g/mol, e GARGQAGVMGFO (peptídeo mimético a colágeno tipo I), massa molar de 1163.31 g/mol, foram sintetizadas através do método de Síntese de Peptídeos em fase Sólida (SPPS) pelo protocolo envolvendo o uso de fluorenilmetiloxicarboxil (Fmoc), e grupos protetores de cadeias laterais (terc-butil, tritil e terc-butiloxicarbonil). Essa etapa foi conduzida em colaboração com o Laboratório de Estudos de Peptídeos Bioativos (LEPepBio), coordenado pelo Prof. Dr. Norival Alves Santos Filho, nas dependências do Instituto de Química de Araraquara, UNESP.

O Fmoc é um grupo protetor utilizado na síntese de peptídeos em fase sólida, utilizando a resina Rink amida, com a função de proteger o grupo α -amino de cada aminoácido. Ele impede que o grupo amina reaja durante as etapas de acoplamento, evitando reações indesejadas. Dessa forma, o Fmoc, juntamente com os agentes de acoplamento N,N-diisopropilcarbodiimida (DIC) e N-hidroxibenzotriazol (HOBt), foi empregado na síntese dos peptídeos. Após cada etapa de acoplamento, foi realizado um teste de ninidrina (Kaiser *et al.*, 1970), reagente que em altas temperaturas reage com grupos amino livres, liberando um composto de cor azul (maioria dos aminoácidos) ou castanho (prolina) para verificar a efetividade da ligação entre os aminoácidos. Para cada ligação peptídica, foi conduzida uma etapa de desproteção, utilizando 20% de 4-metilpiperidina em dimetilformamida (DMF), garantindo a remoção seletiva do Fmoc e permitindo que o grupo amina do aminoácido ficasse disponível para a ligação seguinte, assegurando a obtenção da sequência peptídica desejada.

Após o acoplamento de todos os resíduos de aminoácidos, seguiu-se com a etapa de clivagem, que corresponde ao rompimento da ligação do peptídeo com a resina. Essa etapa utilizou um coquetel de clivagem contendo água ultrapura, triisopropilsilano (TIS) e o ácido

trifluoracético (TFA) (proporção de 2,5%; 2,5%; e 95% respectivamente; v/v), sob agitação branda por 2 horas. O volume utilizado foi calculado na proporção de 1 mL de solução para cada 100 mg de resina. Os sobrenadantes contendo os peptídeos foram liofilizados e identificados como ϵ -PLL (AA2413) bruto; BMP-7 (AA2416) bruto, BMP-7 com histidina (AA2414) bruto, e colágeno tipo I (AA2415) bruto.

A purificação dos peptídeos foi realizada em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa, no modo semi preparativo, utilizando coluna C18 (Phenomenex 2,1 x 25 cm) em gradiente de 5-55% o peptídeo BMP-7 histidina; 5-60% o peptídeo BMP-7 e Colágeno tipo I; 5-65% o peptídeo LRP; de solvente B (0,036 TFA em acetonitrila) por 120 minutos. Após a purificação, as frações de interesse foram acompanhadas em cromatógrafo analítico para a determinação do grau de pureza.

Os espectros de massas dos peptídeos foram obtidos em um espectrômetro de massas LCQ FLEET ThermoScientific, com injeção direta em modo de ESI-MS e detecção em modo positivo. Esses ensaios foram conduzidos no Departamento de Bioquímica e Química Orgânica, Instituto de Química de Araraquara – UNESP.

3.3. Funcionalização das películas de CB com as sequências peptídicas

A incorporação das sequências peptídicas sobre as películas de CB foi inicialmente conduzida através da imobilização covalente utilizando os agentes de acoplamento EDC:NHS. O processo de imobilização das sequências peptídicas na matriz polimérica de CB por meio de ligações covalentes foi realizado pelo mecanismo de *crosslinking*, intermediado pelos agentes de acoplamento EDC:NHS, baseado nos protocolos apresentados por Hermanson (2013) e Chimondes et al. (2013).

O primeiro passo consistiu no preparo de uma solução de carboximetilcelulose (CMC) com concentração de 0,5 mg/mL, adicionando cloreto de sódio a 50 mM. Esta mistura foi incubada sobre as películas de CB úmida por 1,5 horas. Em seguida, preparou-se uma solução contendo albumina sérica bovina (BSA) a 0,4 M, e os agentes de acoplamento: EDC e NHS, ambos na concentração de 0,1 M. Esses agentes foram dissolvidos em uma proporção de 1:1 e mantidos em contato com as películas de CB por 15 minutos, utilizando água destilada como solvente. Após o término da incubação, foi realizado três lavagens consecutivas para a remoção da solução, removendo-se assim os componentes não ligados.

Posteriormente, as amostras foram incubadas com uma solução de 5 mg/mL de BSA em tampão acetato a 10 mM (pH 3,9), assegurando a ligação eficiente com as sequências

peptídicas. Sendo assim, adicionou-se as sequências peptídicas na concentração de 4 ug/mL (SASKA *et al.*, 2012), por um período de 12 horas, a 4 °C. Por fim, as membranas foram cuidadosamente lavadas com água destilada estéril, garantindo a eficácia do preparo (FURSATZ *et al.*, 2018). Esse protocolo foi realizado tanto para as películas de CB funcionalizadas com uma única sequência peptídica quanto para aquelas funcionalizadas com dois peptídeos. No segundo caso, o primeiro peptídeo foi incubado por 12 horas e, após sua remoção, o segundo foi imediatamente adicionado e mantido por mais 12 horas. Após essas etapas as CB foram secas em temperatura ambiente.

3.4. Estudos conformacionais por dicroísmo circular

A espectroscopia de dicroísmo circular (CD) foi empregada para a caracterização estrutural dos peptídeos, permitindo a avaliação de sua conformação secundária e de possíveis mudanças estruturais. Os espectros de CD foram obtidos em um espectropolarímetro Jasco J-815, utilizando cubetas com caminho óptico de 1,0 mm, com cinco varreduras por espectro e tempo de integração de 3 s por ponto. Para todos os experimentos a leitura foi realizada a cada 0,5 nm com controle de temperatura a 25° C. Neste estudo foram preparadas soluções estoques dos peptídeos em tampão fosfato salino (*phosphate buffered saline*, PBS, pH=7,4). As soluções de peptídeos foram tituladas com SDS 5 mM (mimético de membrana) e Trifluoroetanol (TFE) 60% (solução indutora de estruturação). Para cada peptídeo, considerou-se uma solução estoque contendo 1 mg em 1 mL de tampão PBS. A partir do estoque e do cálculo de concentração, a concentração final do peptídeo foi de 60 µM. Os volumes de SDS e TFE utilizados foram de 20 µL e 120 µL, respectivamente, sendo o volume final ajustado para 200 µL com tampão PBS. O cálculo da elipticidade molar $[\theta]$, utilizado para converter os dados experimentais inicialmente expressos em milidegree, foi realizado de acordo com a Equação 1, conforme descrito por Casallanovo et al. (2006).

$$[\theta] = \frac{\text{valor(em milidegree)}}{(10 \cdot \ell \cdot [\text{peptídeo}] \cdot n^{\circ} \text{ de aa})} \text{Equação 1}$$

No numerador é inserido o valor de elipticidade obtido pelo equipamento, expresso em milidegree (mdeg). O termo ℓ corresponde ao caminho óptico da cubeta (0,1 cm), $[\text{peptídeo}]$ representa a concentração do peptídeo utilizada no experimento ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) e o n° de aa refere-se ao número de resíduos de aminoácidos presentes na molécula.

3.5. Caracterizações físico-químicas e morfológicas

Todas as películas de CB bifuncionalizadas com as diferentes sequências peptídicas foram caracterizadas utilizando as seguintes técnicas:

- a) Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho no modo de Reflexão Atenuada (FT-IR/ATR): A técnica foi utilizada a fim de realizar uma análise dos grupamentos químicos presentes nas películas de CB não funcionalizadas e funcionalizadas com as diferentes sequências peptídicas. Os espectros de FT-IR/ATR foram obtidos utilizando o espectrômetro Cary 630 FTIR, na faixa de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} , com um total de 32 varreduras e resolução espectral de 4 cm^{-1} .
- b) Espectroscopia Raman: As análises dos filmes foram realizadas em um espectrômetro FT-Raman Bruker Multiram, utilizando um laser Nd:YAG com comprimento de onda de 1064 nm. Os espectros foram adquiridos com resolução espectral de 4 cm^{-1} , cobrindo a faixa de 4000 a 50 cm^{-1} . A potência do laser foi ajustada para 300 mW, e cada espectro resultou da média de 512 varreduras (scans). As análises foram conduzidas em parceria com professor Luiz Fernando Cappa.
- c) A análise termogravimétrica (TGA) foi realizada para determinar o perfil térmico das películas de CB, tanto não funcionalizadas quanto funcionalizadas com diferentes sequências peptídicas, em função do aumento da temperatura. Para cada amostra, 5 mg foram submetidos a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min , na faixa de temperatura de 29 °C a 600 °C , sob um fluxo de nitrogênio de 100 mL/min . Além disso, a análise derivada termogravimétrica (DTG) foi utilizada para identificar as taxas de decomposição térmica, fornecendo informações detalhadas sobre os eventos de degradação ao longo do aquecimento. O equipamento utilizado para a avaliação da perda de massa em função da temperatura foi o TGA Q600 SDT (TA Instruments).
- d) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) acoplado ao EDS: Investigou-se as características morfológicas dos filmes de CB funcionalizadas com diferentes sequências peptídicas, somado a análise e mapeamento químico por EDS (X-ray energy dispersive spectroscopy -XEDS) utilizando o microscópio marca JEOL, modelo JSM-IT500HR, operando sob uma tensão de 2 kV. As análises foram conduzidas no Instituto de Química de Araraquara.
- e) Microscopia de Força Atômica (MFA): para determinação do aspecto topográfico e de rugosidade das películas de CB funcionalizadas com diferentes sequências peptídicas. As análises foram conduzidas no LNNano/CNPEM. As imagens

topográficas foram obtidas em um microscópio de força atômica Bruker® MultiMode8 no modo Peak Force Tapping®. Foi utilizada uma sonda Bruker® SCANASYST-AIR com constante de mola nominal de 0,4 N/m e raio da ponta de 2,0 nm para a varredura. A plataforma do AFM foi montada em uma câmara ambiental, que permite o controle da umidade relativa e da temperatura (10% e 25 °C).

- f) Análise da molhabilidade: os ângulos de contato foram medidos de acordo com a norma ASTM D-5725-99 (ASTM, 2003) para avaliar a hidrofiliicidade/hidrofobicidade das películas de CB nativa e funcionalizadas com diferentes sequências peptídicas. Foi utilizado o equipamento Ramé-hart 260-F4 Series goniometer, na qual foi realizado em triplicata com 2 gotas por amostra. As análises foram conduzidas na UFSCAR. Para o cálculo da tensão superficial, foram utilizados água deionizada e diiodometano como líquidos sonda. A tensão superficial pode ser definida como a relação de forças que atuam diferentemente na parte mais superficial de um líquido em comparação com as forças que atuam internamente. Quando duas superfícies estão em contato formando duas fases, sólido e líquido, é possível calcular a tensão superficial aparente formada na interface (PAIVA 2020; YUAN; LEE, 2013; ZETTLEMOYER, 1974). Partindo da medida do ângulo de contato (θ), é possível obter a equação conhecida como Equação de *Young-Dupré*, que antecede a tensão superficial (ZETTLEMOYER, 1974), conforme representada abaixo:

$$\gamma_{LV} (1 + \cos \theta) = 2 (\gamma_L^p \gamma_L^d)^{\frac{1}{2}} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde γ_L é a tensão superficial do líquido, sendo composta pelas contribuições dispersiva γ_L^p e γ_L^d , enquanto γ_s^d e γ_s^p correspondem, respectivamente, às componentes dispersiva e polar da energia superficial do sólido, conforme evidenciado na Equação 5 (ANNAMALAI *et al.*, 2016):

$$\gamma_L (1 + \cos \theta) = 2 (\gamma_s^d \gamma_L^d)^{\frac{1}{2}} + (\gamma_s^p \gamma_L^p)^{\frac{1}{2}} \quad (\text{Equação 3})$$

Para calcular a tensão superficial e as componentes polares e dispersivas dos materiais obtidos, recorreu-se à equação aproximada de Wu (1978) de superfícies poliméricas, baseando-se em média harmônica (equação 4):

$$\gamma_L (1 + \cos \theta) = \frac{4\gamma_s^d \gamma_L^d}{\gamma_s^d + \gamma_L^d} + \frac{4\gamma_s^p \gamma_L^p}{\gamma_s^p + \gamma_L^p} \quad (\text{Equação 4})$$

Os valores das componentes polares e dispersivas dos líquidos sondas, assim como sua energia de interface, conforme descrito por Zettlemoyer (1974), foram computados na Tabela 2.

Tabela 2. Valores das componentes polares e dispersivas descrito por Zettlemoyer (1974).

	ÁGUA	DIODOMETANO
Coef. Liq/vap	72,8	50,8
Componente polar liq/vap	51	0
Componente dispersiva	21,8	50,8

3.6. Ensaios Biológicos *in vitro*

a) Ensaio Hemolítico: foi realizado o preparo da solução estoque dos peptídeos contendo 1 mg ressuspenso em 0,5 mL de tampão PBS (pH 7,4). Além disso, foi realizado o preparo da solução de eritrócitos a partir da diluição em tampão PBS (1/25). Para análise do perfil hemolítico, foram realizadas diluições seriadas dos peptídeos, partindo da concentração de 512 µg/mL até 1 µg/mL, todas em duplicatas. Como controles, utilizou-se tampão PBS (não ocasiona hemólise) e Triton 1% (ocasiona 100% de hemólise). Foram adicionados 100 µL da solução de eritrócitos nos tubos contendo as diluições dos peptídeos, sendo mantidos em estufa a 37° C por 1 hora. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 500 g por 5 minutos e os sobrenadantes foram transferidos para microplacas e lidos em leitor de placas a 540 nm. Para o cálculo da % de hemólise foi considerado:

$$\% \text{ de hemólise: } \frac{(\text{absorbância da amostra} - \text{absorbância do controle negativo})}{(\text{absorbância do controle positivo} - \text{absorbância do controle negativo})} \times 100$$

b) Ensaio de citotoxicidade: Para o ensaio, utilizou-se fibroblastos murino derivados de tecido conjuntivo (L929). Inicialmente, as células foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e antibióticos (penicilina 100 U/mL; estreptomicina 0,1 mg/mL), com posterior incubação em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após 2 repiques consecutivos, iniciou-se o ensaio de citotoxicidade, empregando uma concentração de 1x10⁴ células/poço, que foram incubadas em placa de 96 poços. A placa foi mantida por 24 h

em incubadora, respeitando os mesmos parâmetros de temperatura e porcentagem de CO₂ descritos anteriormente. Paralelamente ao plaqueio das células, os tratamentos foram preparados de acordo com a ISO 10993-12. Para tal, 1 cm² de cada material foi disposto em tubo cônico com posterior esterilização em radiação UV por 30 minutos. Em seguida, foi feita a adição de 3 mL de meio de cultura (DMEM + 10% de soro fetal bovino). Os filmes em contato com o meio foram deixados sob agitação por 24 horas a 37°C. Com o término das 24 h de plaqueamento das células, avaliou-se o estabelecimento da monocamada com o auxílio de microscópio, e em seguida, o meio de cultura foi retirado e os eluatos oriundos de cada amostra foram adicionados sobre a monocamada celular, respeitando o volume de 200 uL/poço, seguido da incubação em estufa de CO₂ por mais 24 h. Decorrido as 24 h de tratamento, os eluatos foram removidos, seguido da lavagem com PBS por duas vezes consecutivas. Finalizado essa etapa, 100 µL de resazurina foram adicionados em cada poço. A placa foi novamente incubada a 37°C, ao abrigo da luz, por 4h. Finalizado o período de incubação, a resazurina foi retirado dos poços. Os valores de absorbância (Abs) foram obtidos em espectrofotômetro de microplacas (Synergy-HTX) com leitura em 570nm (reduzido) e 600nm (oxidado). Como controle de sobrevivência (controle negativo), as células foram tratadas com DMEM + 10% SFB. Os experimentos foram conduzidos em triplicata, em três ensaios independentes, incluindo os controles (MOSMANN *et al.*, 1983). Com os valores de Abs, calculou-se a média da porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle de sobrevivência (100%), conforme apresentado pela equação 5 abaixo (norma ISO 10993-5):

$$\frac{(Abs\ da\ amostra - Abs\ branco)}{(Abs\ do\ controle\ de\ sobrevivência - Abs\ branco)} \times 100$$

- c) Ensaio de Proliferação Celular: Inicialmente, as células L929 foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e antibióticos (penicilina 100 U/mL; estreptomicina 0,1 mg/mL), com posterior incubação em estufa a 37°C e 5% de CO₂. A proliferação celular foi avaliada pelo ensaio de resazurina, com as células cultivadas diretamente sobre as superfícies dos materiais. Antes do ensaio, as amostras foram cortadas em seções de 1 cm², esterilizadas por exposição à radiação UV por 30 min em cada lado e colocadas em placas de cultura de 24 poços (ISO 10993-12). As células foram semeadas diretamente sobre os materiais na concentração de 0,5 x 10⁴ células/poço em meio de cultura

completo e incubadas a 37 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. Como controle, as células foram cultivadas em poços sem material. O meio de cultura foi trocado a cada 24 h durante todo o experimento. A atividade metabólica celular, utilizada como indicador indireto de proliferação, foi avaliada após 24, 48, 72 e 168 horas de cultura. Em cada ponto de tempo experimental, o meio foi removido e substituído por uma solução de resazurina preparada em meio de cultura (10% v/v). As amostras foram incubadas por 3 a 4 horas a 37 °C, protegidas da luz. Após a incubação, alíquotas do sobrenadante foram transferidas para uma placa de 96 poços e a absorbância foi medida a 570 nm (Synergy-HTX). Os experimentos foram conduzidos em triplicata, em três ensaios independentes, incluindo os controles (DORM *et al.*, 2022). Utilizando os valores de absorbância, a taxa de proliferação celular foi calculada, conforme mostrado pela equação 6 abaixo (ISO 10993-5):

$$\frac{(\text{Abs da amostra} - \text{Abs branco})}{(\text{Abs do controle de sobrevivência})} \times 100$$

d) Ensaio de Migração Celular: O ensaio de *wound healing* é muito utilizado para o estudo das características da migração celular, assim como para a validação de substâncias que podem interferir no processo migratório. A migração celular é um processo essencial em muitos eventos fisiológicos e patológicos, incluindo a cicatrização de feridas, desenvolvimento embrionário e metástases. O procedimento básico para estudar a migração *em vitro* envolve: (i) estabelecimento de uma monocamada de células, (ii) a produção de uma pseudo-ferida na camada confluenta de células, (iii) captura de imagens em intervalos de tempo diferentes até a confirmação do fechamento da pseudo-ferida e (iv) a análise da sequência de imagem de forma a quantificar a velocidade de migração das células (YARROW *et al.*, 2004). Células de fibroblastos (L929) foram cultivadas na densidade de 1x10⁵ células/poço em placa de 24 poços, respeitando as mesmas condições de temperatura e percentual de CO₂. Os meios de extração foram preparados de acordo com a ISO 10993-12. Para tal, 1 cm² de cada material foi disposto em tubo cônico com posterior esterilização em radiação UV por 30 min. Em seguida, foi feita a adição de 3 mL de meio de cultura (DMEM + 5% de soro fetal bovino). Assim, 24 h depois do plaqueio, os poços foram lavados duas vezes com PBS e a raspagem “pseudo-ferida” da monocamada celular foi realizada usando

uma ponta de pipeta de 200 μ L. Para obter riscos retos foi utilizada uma régua como guia, conforme elucidado na Figura 4 abaixo.

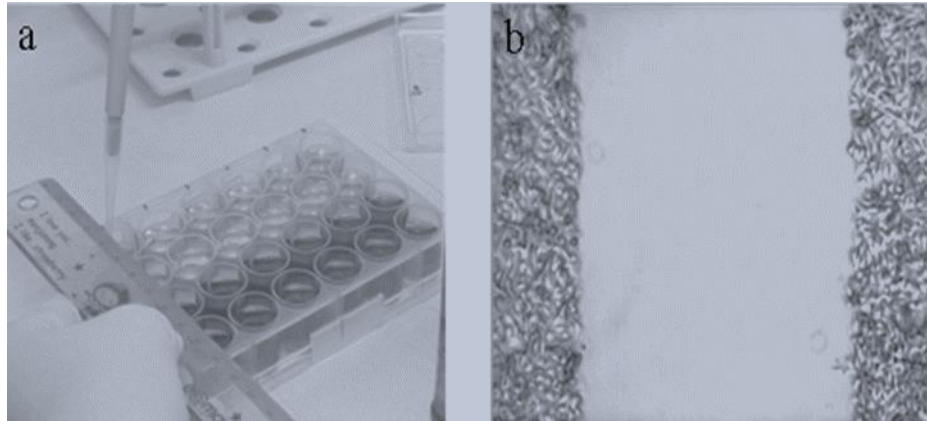


Figura 4. Realização do ensaio de *wound healing*.

As áreas livres de células foram visualizadas em um microscópio óptico invertido (Nikon®) com objetiva de 10x. Para garantir que as micrografias fossem sempre capturadas na mesma posição, foi feita uma linha preta na parte externa inferior dos poços com uma caneta. As micrografias foram realizadas acima da linha preta nos tempos 0, 6, 24 e 48 horas até o fechamento completo das pseudo-feridas. A área das pseudo-feridas foi medida usando o software ImageJ ([//imagej.nih.gov/ij/](http://imagej.nih.gov/ij/), versão 2.0.0-rc-43/1.50e). Todas as amostras foram realizadas em triplicata. O fechamento (%) das pseudo-feridas foi calculado conforme equação 7:

$$\text{Fechamento da pseudo-ferida (\%)} = (A_{\text{inicial}} - A_{\text{final}}) / (A_{\text{inicial}}) \times 100$$

Sendo A, a medida da área entre as bordas para cada tempo analisado (Yue *et al.*, 2010).

e) Ensaio de adesão celular

Para os estudos de adesão celular foram utilizadas a mesma linhagem celular (L929) descrita anteriormente. Primeiro, as células (5×10^4 células/poço) foram semeadas nos filmes (1 cm^2) inseridos na placa de 24 poços e cultivadas durante 72 horas a 37°C com 5% de CO_2 . No final da incubação, o meio foi removido e as células foram lavadas com PBS 0,01 M filtrado estéril a pH 7,4. Em seguida, as células foram fixadas com glutaraldeído a 3% em PBS 0,01 M durante 0,5 h à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS 0,01 M, as amostras foram desidratadas através de uma série

ascendente de etanol (30%, 50%, 70% e 95%, 3 min cada) com uma incubação final em etanol 100% por 3 min (repetido 2 vezes). As amostras secas foram revestidas por pulverização catódica para gerar uma camada de carbono de 10 nm. As amostras foram examinadas com um microscópio eletrônico de varredura (JSM-IT500HR, JEOL) usando uma distância de trabalho de 8 mm e uma tensão de aceleração de 5 kV (PASCHOALLIN *et al.*, 2017).

3.7. Análises Estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio do software *GraphPad Prism 8.0*[®]. Análises envolvendo dois grupos não pareados foram realizadas por meio de testes *t* de Student. Múltiplos grupos foram submetidos a análise de variância (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Tukey. A diferença estatística foi considerada em $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Síntese dos peptídeos: determinação do rendimento e pureza

As sequências peptídicas de escolha foram selecionadas baseadas em diferentes estudos já publicados na literatura. A sequência peptídica mimética ao colágeno tipo I, a saber, GARGQAGVMGFO, também foi explorada tanto no artigo de Malcory & Mallein-Gerin (2022), como no estudo de Xu & Kirchner (2021).

A escolha dessa sequência se deve às suas propriedades únicas de reconhecimento por múltiplas proteínas ligantes de colágeno, incluindo os receptores Discoidina (DDR1 e DDR2), que desempenham um papel fundamental na regulação da adesão e diferenciação celular, o Fator de von Willebrand (vWF), essencial para a hemostasia e interação com componentes da matriz extracelular, e a proteína SPARC (*Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine*), também conhecida como osteonectina, envolvida na remodelação tecidual e na modulação da adesão celular.

Além disso, a presença de hidroxiprolina (O) na sequência é essencial para a estabilidade da tripla hélice do colágeno e para a alta afinidade de ligação aos receptores, características fundamentais para mimetizar o microambiente extracelular nativo e otimizar a resposta celular (MALCON *et al.*, 2022).

Em relação a sequência peptídica mimética a BMP-7, Lock & Liu (2011) demonstraram que peptídeos curtos derivados de BMPs podem induzir a diferenciação osteogênica de MSCs com eficácia comparável à proteína BMP-7 em sua forma nativa. A sequência VEHDKEFFHPRYHH se destaca por sua composição única de aminoácidos, que pode conter domínios essenciais para a interação com receptores celulares e a ativação de vias osteogênicas.

Além disso, peptídeos curtos como esse apresentam vantagens significativas, como menor imunogenicidade, maior estabilidade em condições fisiológicas e facilidade de modificação química. Essas propriedades permitem sua funcionalização em nanocompósitos, como os de hidroxiapatita-PLGA, que já demonstraram eficácia na liberação controlada do peptídeo, além de favorecer a adesão e diferenciação celular.

Ademais, Fursatz et al. (2018) relataram que a funcionalização de películas de CB com o peptídeo ϵ -polil-lisina (ϵ -PLL), bem como com a combinação CB-CMC- ϵ -PLL, conferiu significativa atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus epidermidis*. Observou-se uma redução expressiva no crescimento bacteriano após 24 horas, efeito que se manteve por aproximadamente 30 dias. A funcionalização com ϵ -PLL não induziu modificações na morfologia da matriz de CB, e se mostrou citocompatível frente a fibroblastos dérmicos humanos (HDF).

Para fins de padronização e clareza na apresentação dos resultados, as abreviações utilizadas ao longo deste estudo encontram-se resumidas na Tabela 3. Essas abreviações foram adotadas com base na composição dos peptídeos, evitando ambiguidades terminológicas e garantindo precisão na descrição dos materiais experimentais.

Tabela 3. Abreviações utilizadas nos resultados e discussões.

Amostras	Abreviações
Peptídeo mimético a Colágeno tipo I	Col I
Peptídeo mimético a BMP-7	mBMP-7
Peptídeo mimético a BMP-7 com histidina	mBMP-7 histidina
Peptídeo rico em Lisina	LRP

Sendo assim, no presente estudo, após a síntese das sequências peptídicas mencionadas anteriormente, realizou-se a purificação por CLAE, com os perfis cromatográficos representados na Figura 5. É importante enfatizar que essa técnica é

amplamente utilizada para a purificação de peptídeos, sendo baseada na interação hidrofóbica entre a amostra e a fase estacionária. A fase estacionária consiste em uma resina C18, cujas cadeias longas de carbono interagem com os resíduos hidrofóbicos do peptídeo, influenciando seu tempo de retenção. O tempo de retenção é um parâmetro crucial na cromatografia, pois indica o tempo que um composto leva para ser eluído da coluna, refletindo sua afinidade com a fase estacionária (SANTOS-FILHO *et al.*, 2015).

Antes da purificação, as amostras contendo os peptídeos brutos apresentam não apenas o peptídeo de interesse, mas também impurezas como fragmentos truncados, peptídeos modificados e subprodutos da síntese. Isso resulta em um cromatograma com múltiplos picos, onde cada composto apresenta um tempo de retenção distinto, tornando a separação complexa. À medida que a purificação avança, o peptídeo desejado é isolado, e seu pico cromatográfico se torna mais definido, simétrico e livre de interferências. Isso ocorre porque a remoção de impurezas permite que o peptídeo puro interaja de maneira mais previsível com a fase estacionária, resultando em um tempo de retenção mais estável. A hidrofobicidade do peptídeo desempenha um papel essencial nesse processo, uma vez que peptídeos mais hidrofóbicos tendem a apresentar tempos de retenção mais longos devido a interações mais fortes com a fase estacionária (SANTOS-FILHO *et al.*, 2015).

Para o peptídeo LRP não purificado (Fig 5A1), detectou-se um pico mais definido em 11,4 minutos, embora outros picos também foram registrados, e após a purificação, a presença de um pico bem definido em 11,2 minutos (Fig 5A2). Já para o mBMP-7 com histidina, um pico mais definido foi registrado em 10,3 minutos (Fig 5B1), enquanto após a purificação, registrou-se apenas um pico bem definido em 10 minutos (Fig 5B2). Em relação mBMP-7 (Figura 5C1) antes da purificação, e após (5C2), foi observado os picos em 10,5 minutos e 10,3 minutos, respectivamente. Para a sequência Col I, os picos encontrados antes e após a purificação foram registrados em 11,5 minutos (Fig 5D1) e 11,6 minutos (Fig 5D2). Analisando o tempo de retenção dos picos majoritários das diferentes sequências peptídicas, foi possível confirmar a eficiência da purificação. Em relação à hidrofobicidade, a sequência peptídica Col I demonstrou ser a mais hidrofóbica entre os peptídeos analisados, enquanto o mBMP-7 com histidina apresentou a menor hidrofobicidade.

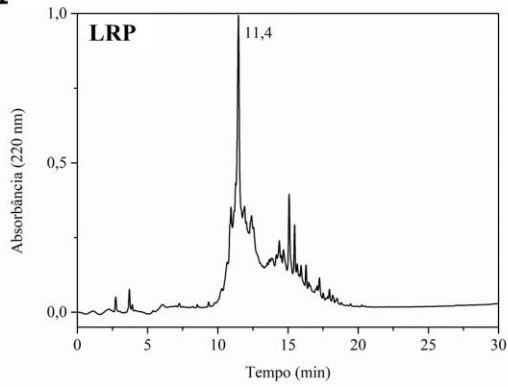
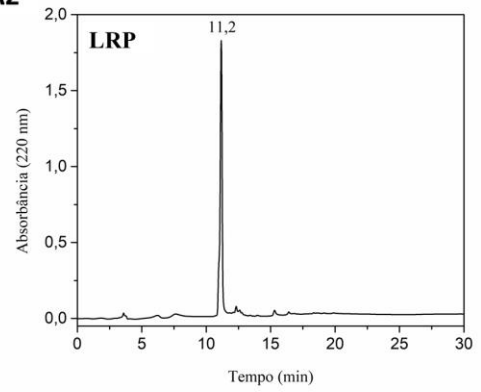
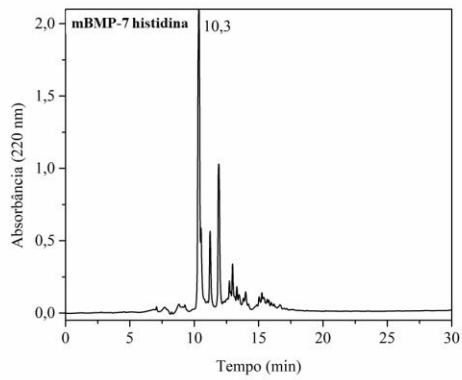
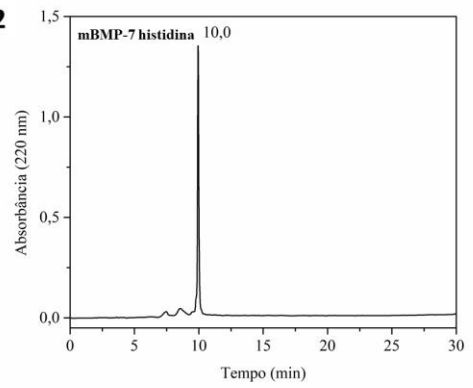
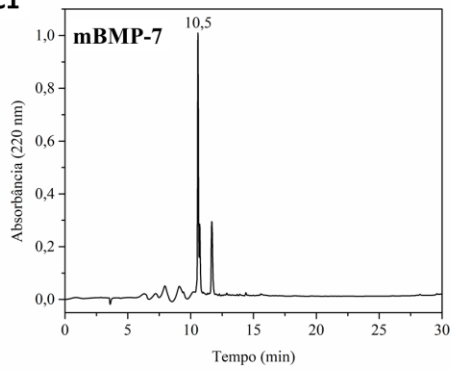
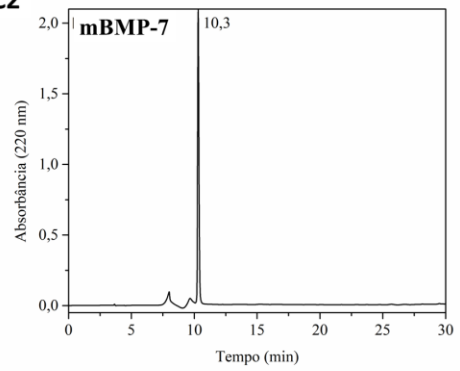
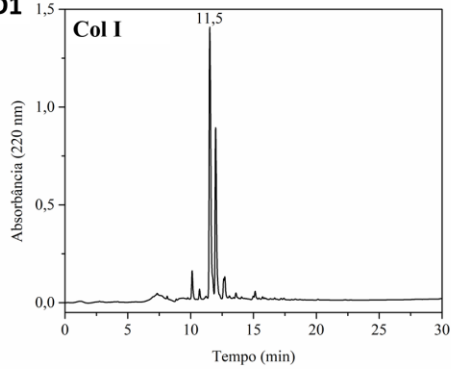
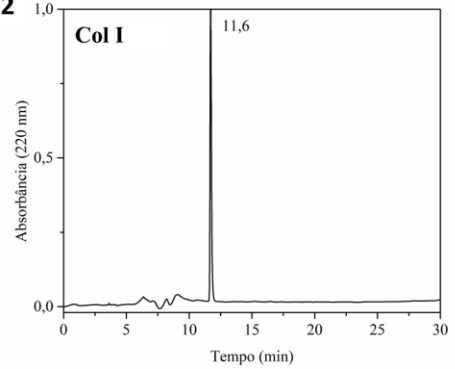
A1**A2****B1****B2****C1****C2****D1****D2**

Figura 5. Perfil cromatográfico dos peptídeos antes da purificação (1) e após a etapa de purificação (2) em coluna de fase reversa C18 em 5-95% de solvente B em 30 minutos: (A1 e A2) AA2413- (LRP), (B1 e B2) AA2414 – (mBMP-7 com histidina), (C1 e C2) AA2416 – mBMP-7 e (D1 e D2) AA2415 – (Col I).

Em relação a determinação das respectivas massas molares das quatro diferentes sequências peptídicas por ESI-MS, os resultados obtidos foram computados na Figura 6. Os picos indicados como +1, +2, +3 e assim por diante, referem-se ao estado de carga do íon detectado. Esses valores correspondem ao número de cargas positivas adquiridas por cada peptídeo durante a sua ionização no espectrômetro de massas.

Para o peptídeo Col I, foram identificados dois picos majoritários, com razão massa/carga de 1162,68 Da e 582,18 Da, correspondendo aos picos +1 e +2, respectivamente. Já para a sequência peptídica mBMP-7 contendo histidina, foram observados quatro picos majoritários, com razão massa/carga de 1007,91 Da, 672,63 Da, 504,73 Da e 404,01 Da, correspondendo aos picos +2, +3, +4 e +5, respectivamente. No caso do peptídeo mBMP-7, foram observados três picos majoritários, com razão massa/carga de 939,09 Da, 626,43 Da e 470,27 Da, correspondentes aos picos +2, +3 e +4, respectivamente. Por fim, o espectro de massas do peptídeo LRP revelou quatro picos majoritários com razão massa/carga de 1038,46 Da, 779,60 Da, 623,95 Da e 520,15 Da, respectivamente.

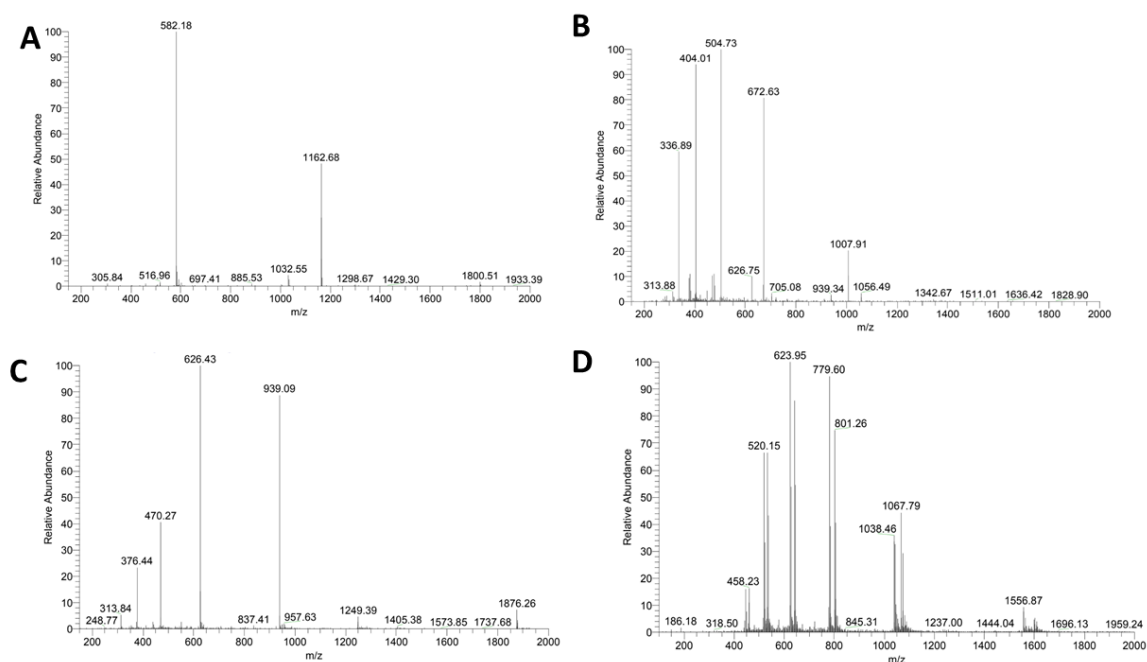


Figura 6. Espectro de massas das sequências peptídicas: (A) AA2415 – Col I; (B) AA2314 - mBMP-7 com histidina; (C) AA2416 – mBMP-7 e (D) AA2313- LRP.

Deste modo, para determinar a massa molecular média de cada sequência peptídica a partir dos picos de espectrometria de massas, empregou-se a seguinte fórmula geral (HOFFMANN & STROOBANT, 2007):

$$M = \left(\frac{m}{z} \times z\right) - (z \times m_H)$$

Onde:

- M = massa molecular do peptídeo
- m/z = razão massa/carga observada no espectro
- z = número de cargas do pico correspondente
- m_H = massa do próton (aproximadamente 1,00784 Da)

A Tabela 4 traz os valores médios de massa molecular média para cada peptídeo.

Tabela 4 Valores aproximados das massas moleculares de cada sequência peptídica analisadas a partir dos espectros de massas obtidos por espectrometria de massas, considerando as diferentes razões massa/carga (m/z) e seus respectivos estados de carga.

Sequência peptídica	Massa Molecular média (Da)
Peptídeo Col I	1162,34
Peptídeo mBMP-7 com histidina	2013,80
Peptídeo mBMP-7	1876,49
Peptídeo LRP	3114,07

4.2. Dicroísmo Circular (CD)

Dicroísmo significa a capacidade de uma substância absorver diferentes quantidades de luz polarizada dependendo da direção de rotação da luz. Quando a luz passa por uma substância, pode ocorrer uma absorção seletiva para um dos sentidos de rotação (WANG *et al.*, 2022).

Os espectros de dicroísmo circular indicam que em tampão PBS (pH 7,4), todos os peptídeos avaliados apresentaram predominantemente conformação desordenada (*random coil*), evidenciando a ausência de estrutura secundária em meio aquoso fisiológico. Esse comportamento sugere que, nessas condições, os peptídeos não adotam espontaneamente conformações estáveis. Na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS), um surfactante aniônico amplamente empregado como modelo simplificado de ambiente mimético de membrana celular, em função da formação de micelas com regiões hidrofóbicas, e de

trifluoroetanol (TFE), um co-solvente orgânico capaz de reduzir a competição da água por ligações de hidrogênio, favorecendo a estabilização de estruturas secundárias, apenas o peptídeo LRP apresentou transição conformacional do tipo α -hélice, caracterizada pela presença de bandas negativas em aproximadamente 208 e 222 nm e uma banda positiva próxima a 190 nm, em concordância com dados previamente descritos na literatura (CÉSPEDES *et al.*, 2012). Os demais peptídeos apresentaram conformação randômica, como pode ser observado na Figura 7.

A formação de α -hélice observada para o peptídeo LRP é particularmente relevante, pois peptídeos bioativos, especialmente com ação antimicrobiana, frequentemente assumem conformação helicoidal ao interagir com membranas biológicas. Essa estrutura permite a orientação de regiões hidrofóbicas e hidrofílicas, facilitando o reconhecimento e a interação com a bicamada lipídica bacteriana, podendo promover penetração, ruptura ou permeabilização da membrana. O fato de o LRP adotar a conformação helicoidal apenas na presença de ambientes miméticos de membrana (como SDS ou TFE) indica um comportamento dependente de contato com lipídios, típico de peptídeos antimicrobianos que permanecem desordenados em solução, mas se estruturam quando encontram a superfície celular (CESPEDES *et al.*, 2012).

Embora apenas o LRP tenha apresentado transição para conformação helicoidal em ambiente mimético de membrana, os peptídeos Col I e mBMP-7 podem manter sua atividade biológica mesmo em estado desordenado. Esses peptídeos não dependem de estrutura helicoidal para sua função, pois atuam como motivos bioativos que promovem adesão, sinalização e diferenciação celular. Assim, quando immobilizados na CB, eles servem como sítios de reconhecimento para células, estimulando respostas específicas relacionadas à regeneração tecidual (HERSEL *et al.*, 2003).

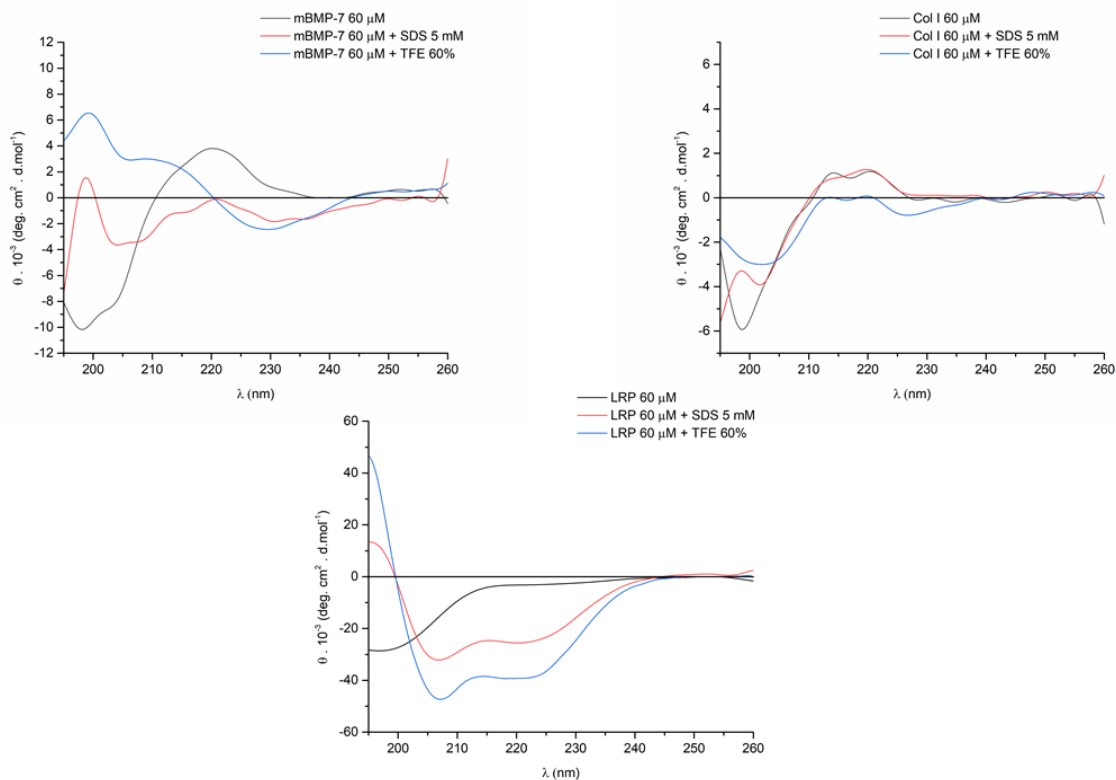


Figura 7. Espectros de dicroísmo circular para os peptídeos Col I, mBMP-7 e LRP, na concentração de 60 μM , em solução tampão (PBS), SDS 5 mM e TFE 60%.

4.3. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) no modo de reflectância total atenuada (ATR)

A FTIR baseia-se na absorção de radiação infravermelha pelas ligações químicas do material, promovendo transições vibracionais detectadas no espectro. É particularmente sensível a grupos funcionais polares e permite a identificação de ligações químicas e interações moleculares. Na Figura 8 são evidenciados os espectros das diferentes amostras de CB não funcionalizadas e funcionalizadas com as sequências peptídicas. Pode-se observar a presença das principais bandas características da molécula de CB, sendo elas, a banda em 3350 cm^{-1} , caracterizada como uma banda de alongamento (stretching) e associada à vibração da ligação O-H; a banda em 2890 cm^{-1} , referente ao alongamento de CH em alcanos e ao alongamento assimétrico de CH_2 ; a banda em 1650 cm^{-1} , atribuída a banda de flexão (bending) da água adsorvida (H-O-H); a banda em 1430 cm^{-1} referente a deformação de CH_2 , e a banda em 843 cm^{-1} , atribuída à vibração associada à ligação β -1,4 da celulose nativa.

Esses dados também corroboram com os estudos publicados por Claro et al. (2022); Monteiro et al. (2021) e Barud et al. (2011).

Em relação as amostras de CB/CMC, CB/CMC/EDC:NHS, CB/EDC:NHS, os espectros revelaram bandas similares às da CB, destacando-se pela presença de uma banda mais larga e intensa em 3350 cm^{-1} , atribuída às vibrações de alongamento das ligações de hidrogênio intramoleculares. Além disso, foi observada um pico em 1530 cm^{-1} , associado à vibração de alongamento do grupo carboxilato, característica da CMC (HABIBI, 2014). Entretanto, as amostras funcionalizadas com os diferentes peptídeos, tanto aquelas contendo um único peptídeo quanto as bifuncionalizadas, não apresentaram bandas adicionais e aparentes que pudessem ser atribuídas às amidas.

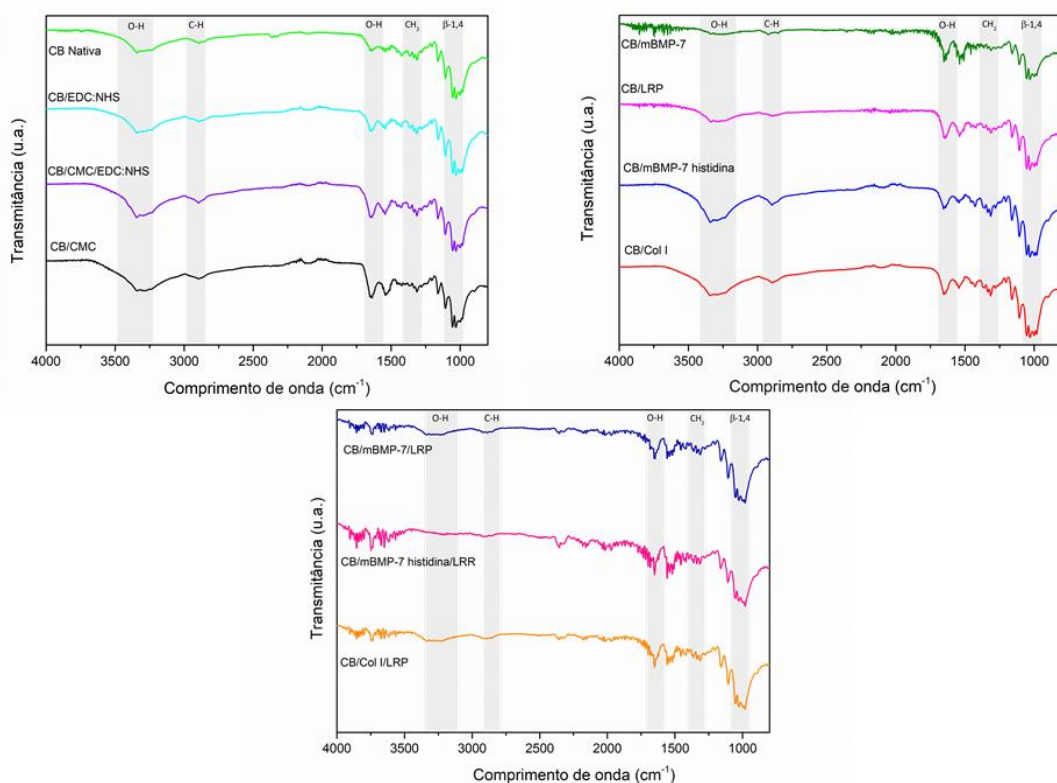


Figura 8. Espectros de FTIR/ATR no modo transmitância adquiridos para as diferentes amostras de CB, incluindo CB nativa, CB/CMC, CB/CMC/EDC:NHS, CB/BSA/EDC:NHS, CB/Col I, CB/mBMP-7 com histidina, CB/mBMP-7, CB/LRP, CB/Col I/LRP, CB/mBMP-7 com histidina/LRP e CB/mBMP-7/LRP. Os espectros foram adquiridos no intervalo de comprimento de onda de 4000 a 600 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} , utilizando 32 varreduras no modo de reflexão total atenuada (ATR).

A Tabela 5 traz os principais grupos funcionais observados em todos os espectros de transmitância adquiridos das amostras de CB não funcionalizadas e funcionalizadas com as sequências peptídicas.

Tabela 5. Representação das principais bandas atribuídas aos grupos funcionais presentes nas amostras de CB funcionalizadas e não funcionalizadas com as diferentes sequências peptídicas.

Comprimento de onda (cm ⁻¹)	Grupo Funcional
3350 cm ⁻¹	-OH
2890 cm ⁻¹	-CH e CH ₂
1650 cm ⁻¹	Flexão H-O-H
1430 cm ⁻¹	Deformação CH ₂
843 cm ⁻¹	Ligação β-1,4

Optou-se por plotar os espectros no modo de absorbância, a fim de detectar as bandas referente as amidas, indicativas da imobilização dos peptídeos na superfície da CB. Sendo assim, os espectros dos peptídeos isolados (Figura 9B) e das amostras de CB funcionalizadas com os peptídeos (Figuras 9C-D), demonstraram a presença de bandas nas regiões de 1654 e 1638 cm⁻¹ atribuídas ao estiramento da ligação C=O (carbonila) das amidas, predominantemente de ligações peptídicas, bem como a banda em 1550 - 1542 cm⁻¹, atribuída à vibração de deformação N-H acoplada ao estiramento C-N, caracterizando a amida II. Nos estudos conduzidos por Fursatz et. al. (2018) e Riaz et al. (2018), os autores também identificaram a presença das mesmas bandas correspondentes a amida I e II nos materiais contendo os peptídeos ε-PPL e colágeno tipo I, respectivamente.

Constatou-se também a mudança na intensidade das bandas em 1000 cm⁻¹ e 982 cm⁻¹, referentes a vibrações de estiramento de C-O-C e vibrações de deformação de C-H. Um deslocamento da banda em 1053 cm⁻¹, referente a vibrações de estiramento de C-O-C também foi observado. Observou-se nas regiões em 1730 - 1725 cm⁻¹ e 1250 -1240 cm⁻¹, bandas vibracionais relacionadas à formação de ligações éster (R1-COO-R2), referente a CMC, polímero utilizado para a exposição dos grupos carboxilas, beneficiando a incorporação das moléculas bioativas. Resultados semelhantes foram relatados por Mansur et al. (2023). A Tabela 6 traz os principais grupos funcionais observados em todos os espectros de absorbância adquiridos das amostras de CB funcionalizadas com as sequências peptídicas.

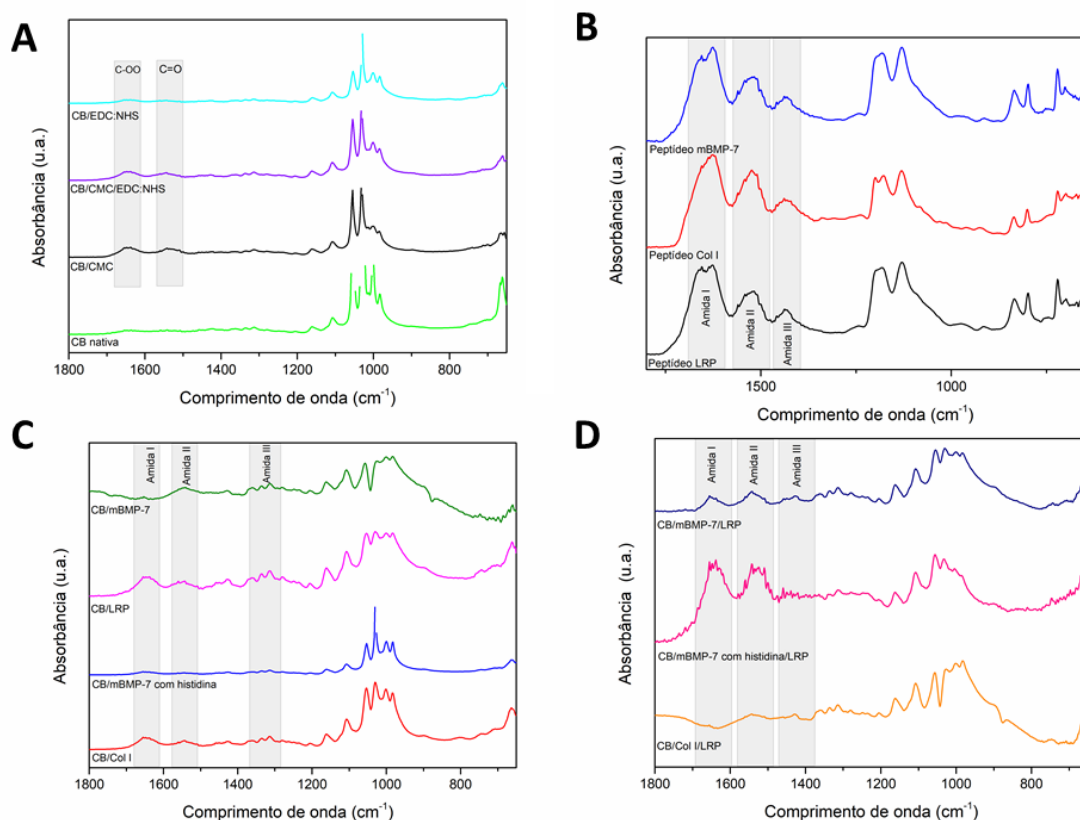


Figura 9. Espectros de FTIR/ATR no modo absorvância adquiridos para as diferentes amostras de CB, incluindo CB nativa, CB/CMC, CB/CMC/EDC:NHS, CB/BSA/EDC:NHS, CB/Col I, CB/mBMP-7 com histidina, CB/mBMP-7, CB/LRP, CB/Col I/LRP, CB/mBMP-7 com histidina/LRP e CB/mBMP-7/LRP. Os espectros foram adquiridos no intervalo de comprimento de onda de 4000 a 600 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} , utilizando 32 varreduras no modo de reflexão total atenuada (ATR).

Tabela 6. Representação das principais bandas atribuídas a molécula de CB e a presença das amidas I e II nas amostras de CB funcionalizadas com as seqüências peptídicas.

Comprimento de onda (cm^{-1})	Grupo Funcional
1730 - 1725 cm^{-1}	-COO
1654 - 1638 cm^{-1}	Estiramento C=O (Amida I)
1550 - 1542 cm^{-1}	Dobramento N-H e estiramento C-N e C-O-C (Amida II)
1250 - 1240 cm^{-1}	-COO
1053 - 1000 cm^{-1}	Estiramento C-O-C
982 cm^{-1}	Deformação C-H

4.4. Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman baseia-se na dispersão inelástica da luz e é altamente sensível a grupos funcionais menos polares. No caso de biomateriais contendo peptídeos, essa técnica permite a detecção precisa de modos vibracionais relacionados às ligações C-H, C=C e N-H, sendo capaz de identificar interações entre a biocelulose e as biomoléculas incorporadas. Além disso, o Raman é menos suscetível à interferência da água, tornando-se uma ferramenta valiosa para análise de amostras biológicas hidratadas. A combinação das técnicas FTIR e Raman fornecem uma caracterização espectroscópica abrangente, permitindo a elucidação estrutural detalhada de sistemas baseados em biocelulose, uma vez que vibrações fracas em uma técnica podem ser fortes na outra.

Os resultados apresentados na Figura 10 evidenciam a presença das principais bandas vibracionais características da biocelulose, bem como sinais atribuídos à incorporação dos peptídeos.

Na região entre 3000 e 2800 cm^{-1} , observam-se bandas de estiramento C-H, atribuídas às cadeias poliméricas de celulose e às cadeias laterais dos aminoácidos referentes aos peptídeos incorporados. A banda localizada entre 1750 e 1550 cm^{-1} é compatível com a vibração C=O da Amida I, indicando a presença de ligações peptídicas. Adicionalmente, a região de 1480 a 1200 cm^{-1} apresenta bandas características associadas à vibração de deformação N-H e ao estiramento C-N da Amida II, reforçando a presença dos peptídeos na matriz biocelulósica.

Por fim, na região de 1230 a 940 cm^{-1} , observa-se a presença de bandas associadas às vibrações do anel glicosídico da celulose, notadamente a vibração do modo C-O-C do esqueleto da glicose. Essa assinatura espectral confirma a estrutura celulósica do material e a integridade das ligações $\beta(1\rightarrow4)$ glicosídicas, características da biocelulose. Os resultados obtidos demonstram, portanto, que a funcionalização das membranas com peptídeos não altera significativamente a estrutura da biocelulose, mas introduz bandas vibracionais características das biomoléculas incorporadas, evidenciando sua interação com a matriz polimérica (BERGER *et al.*, 2024; OLIVER-CERVELLÓ, 2022).

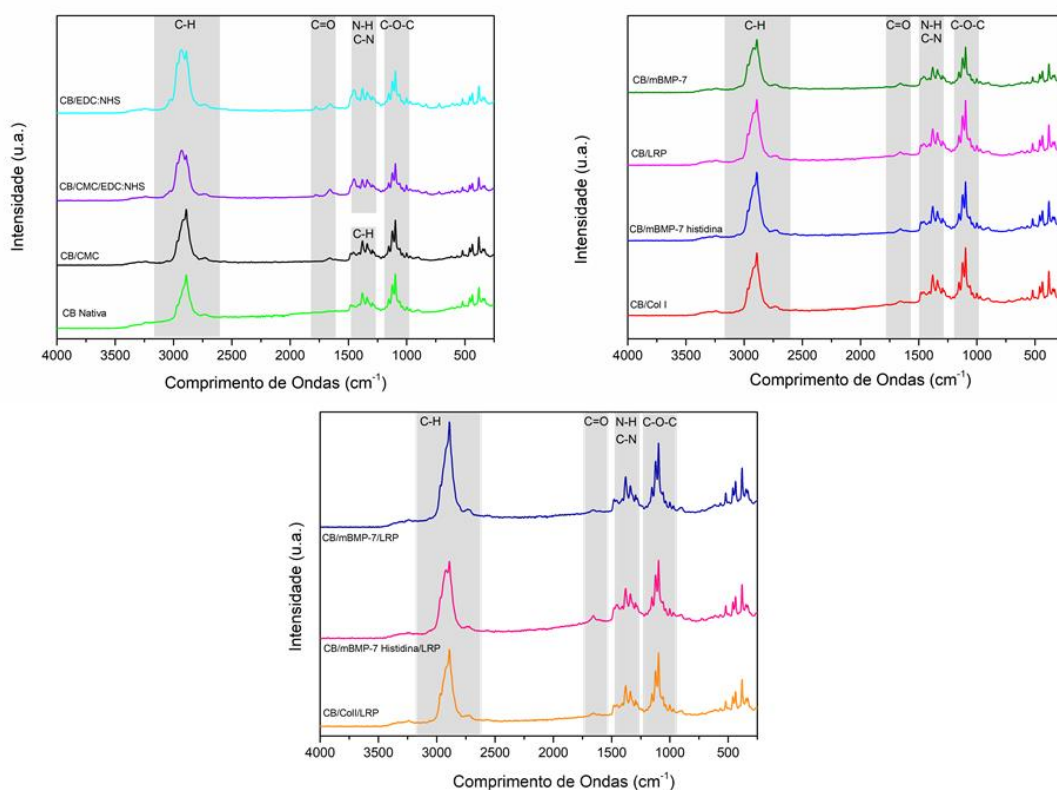


Figura 10. Espectros de Raman para as diferentes amostras de CB, incluindo CB nativa, CB/CMC, CB/CMC/EDC:NHS, CB/BSA/EDC:NHS, CB/Col I, CB/mBMP-7 com histidina, CB/mBMP-7, CB/LRP, CB/Col I/LRP, CB/mBMP-7 com histidina/LRP e CB/mBMP-7/LRP. Os espectros foram adquiridos num intervalo de 4000 a 50 cm^{-1} , com uma potência de laser de 300 mW e 512 scans.

Tabela 7. Representação das principais bandas vibracionais atribuídas aos grupos funcionais presentes nas amostras de CB, antes e após a bifuncionalização com peptídeos, conforme identificado nos espectros de Raman.

Comprimento de onda (cm^{-1})	Grupo Funcional
3000- 2800 cm^{-1}	C-H
1750 - 1550 cm^{-1}	Estiramento C=O (Amida I)
1480 - 1200 cm^{-1}	Dobramento N-H, estiramento C-N (Amida II) e C-H
1230 – 940 cm^{-1}	C-O-C

4.5. TGA/DTG

Tratando-se do comportamento de perda de massa em função do aumento da temperatura, a Figura 11 traz os resultados obtidos para as amostras de CB nativa, CB/CMC, CB/CMC/EDC:NHS e CMC/EDC:NHS, enquanto a Figura 12 evidencia os termogramas das amostras funcionalizadas com os diferentes peptídeos, incluindo CB/Col I, CB/mBMP-7 com histidina, CB/mBMP-7 e CB/LRP e para as amostras bifuncionalizadas, incluindo CB Col I/LRP, e CB/mBMP-7 com e sem histidina/LRP.

O termograma da CB nativa revelou três eventos distintos de perda de massa (Figura 11). O primeiro ocorreu entre 30 e 100 °C, com uma redução de aproximadamente 10%, atribuída à eliminação da água adsorvida. O segundo, entre 250 e 400 °C, correspondeu à despolimerização e degradação das cadeias poliméricas. Já o terceiro evento, registrado entre 400 e 600 °C, pode ser associado à degradação final do material e à formação de resíduos carbonáceos. A massa residual foi de aproximadamente 19%, corroborando com os achados de Claro et al. (2022).

Tratando-se das amostras de CB/CMC e CB/CMC/EDC:NHS, os três principais eventos também foram constatados, com picos máximos de degradação entre 348 °C e 306 °C, e massas residuais de 25% e 22%, respectivamente. Para a amostra CB/EDC:NHS, dois picos relacionados a degradação do material foram observados, um em 305 °C e outro em 354 °C, com uma massa residual de 20%. A presença destes dois picos pode estar relacionada a alterações estruturais induzidas pelo tratamento com EDC/NHS. Possíveis explicações incluem: (i) interações não covalentes desses reagentes com os grupos hidroxilas da CB, modificando sua estabilidade térmica; e (ii) mudanças na organização cristalina da CB, gerando regiões com diferentes temperaturas de degradação.

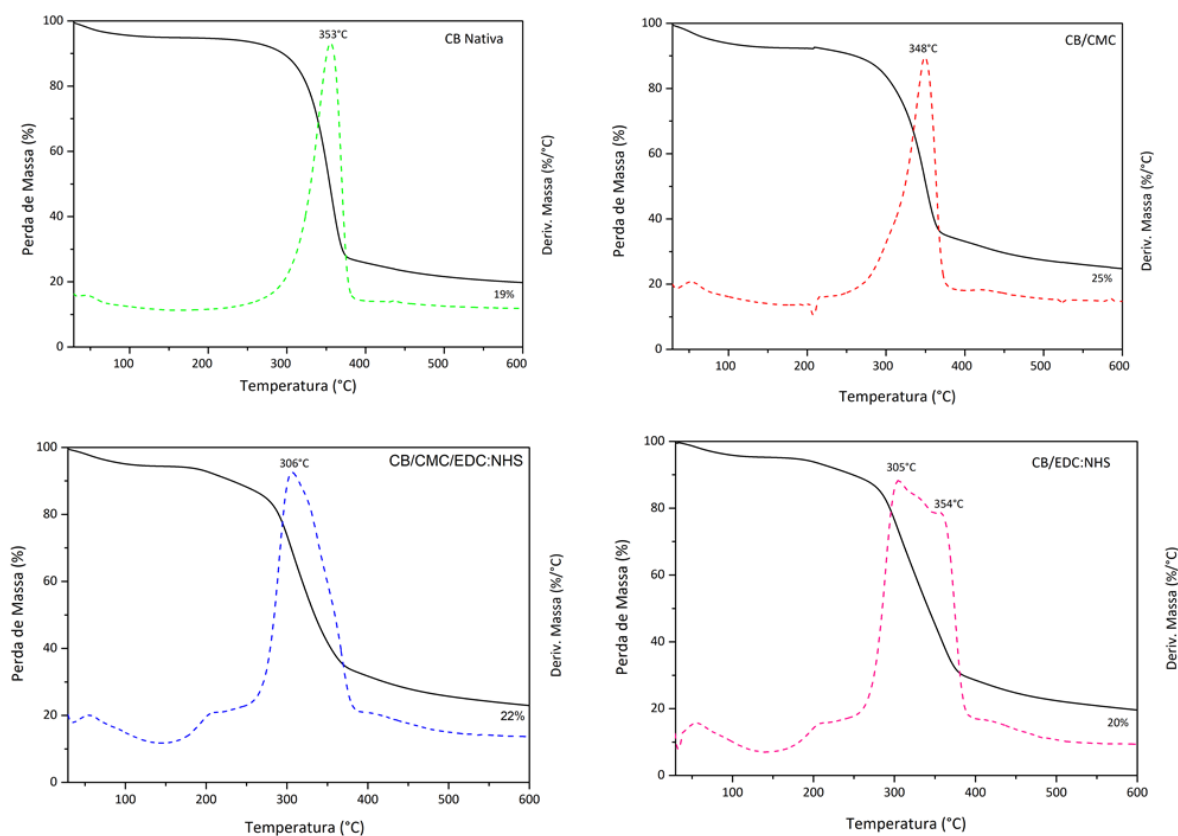


Figura 11. Curvas termogravimétricas (TG) e derivadas (DTG) das amostras: CB nativa, CB/CMC, CB/CMC/EDC:NHS, e CB/BSA/EDC:NHS na faixa de 29 °C a 600 °C, com taxa de fluxo de 100 mL/min⁻¹ e velocidade de aquecimento de 10°C/min.

Já as amostras de CB/Col I, CB/mBMP-7 com e sem histidina e CB/LRP (Figura 12), os três principais eventos também foram constatados, com picos máximos de degradação em 350 °C, 356 °C, 292 °C e 289 °C, respectivamente. Os resultados indicam que a funcionalização com os diferentes tipos de peptídeos afetou a estabilidade térmica da CB. A amostra CB/mBMP-7 com histidina apresentou o maior pico de degradação em 356 °C, sugerindo uma maior estabilidade térmica em comparação às demais. Esse efeito pode estar relacionado à interação do peptídeo com a matriz polimérica da CB, promovendo uma alteração na organização fibrilar. Por outro lado, a amostra CB/mBMP-7 sem histidina exibiu um pico máximo em 292 °C.

Em relação as massas residuais constatadas na temperatura de 600 °C, a amostra CB/mBMP-7 sem histidina (27%) e a CB/LRP (26%) apresentaram os maiores valores, sugerindo que esses materiais geraram maior quantidade de resíduos carbonáceos após a degradação térmica, possivelmente devido a rearranjos estruturais durante a decomposição. Já a CB/Col I apresentou a menor massa residual (18%), indicando maior degradação.

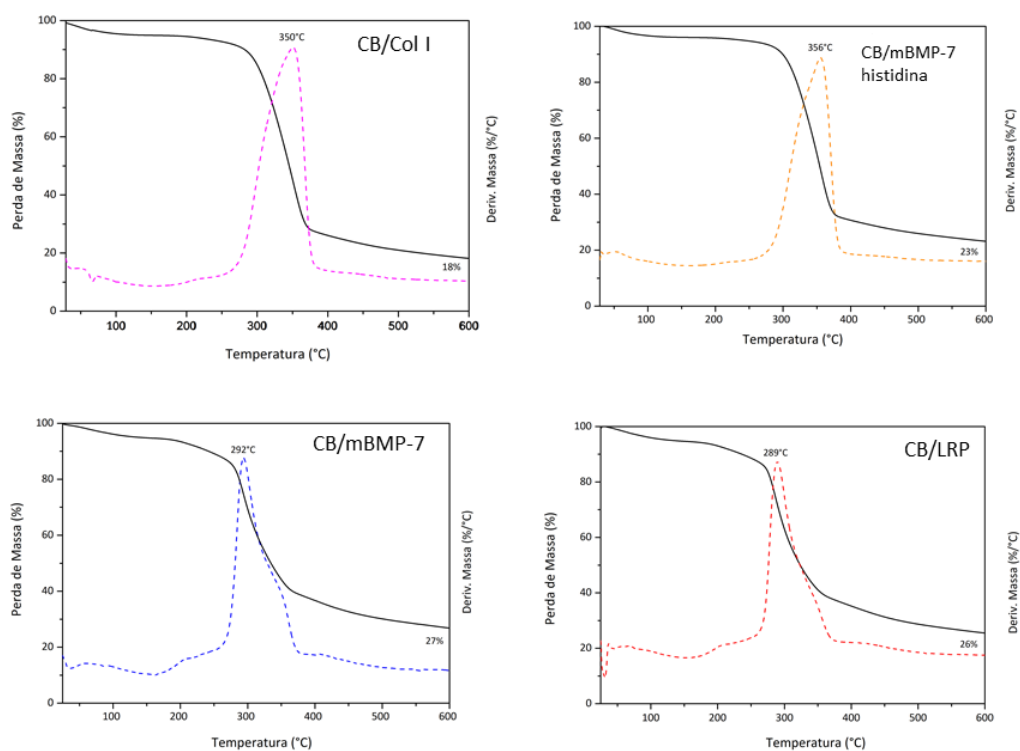


Figura 12. Curvas termogravimétricas (TG) e derivadas (DTG) das amostras: CB/Col I, CB/mBMP-7 com histidina, CB/mBMP-7, e CB/LRP na faixa de 29 °C a 600 °C, com taxa de fluxo de 100 mL/ min⁻¹ e velocidade de aquecimento de 10 °C/min.

Tratando-se das amostras bifuncionalizadas (Figura 13), incluindo CB/Col I/LRP, e CB/mBMP-7 com e sem histidina/LRP, verificou-se que os picos máximos de degradação ocorreram na faixa de 334 °C, 328 °C, e 347 °C, com uma perda de massa de variando de 73-82%. Em relação as massas residuais em 600 °C, observou-se um aumento, com valores de massa residual de 21%, 21% e 19%. Os resultados indicam que a incorporação de dois peptídeos não compromete significativamente a estabilidade térmica da CB. A bifuncionalização com o peptídeo mBMP-7 e o LRP, por exemplo, resultou em um pico máximo de degradação a 347 °C, apenas ligeiramente inferior ao da CB nativa (353 °C).

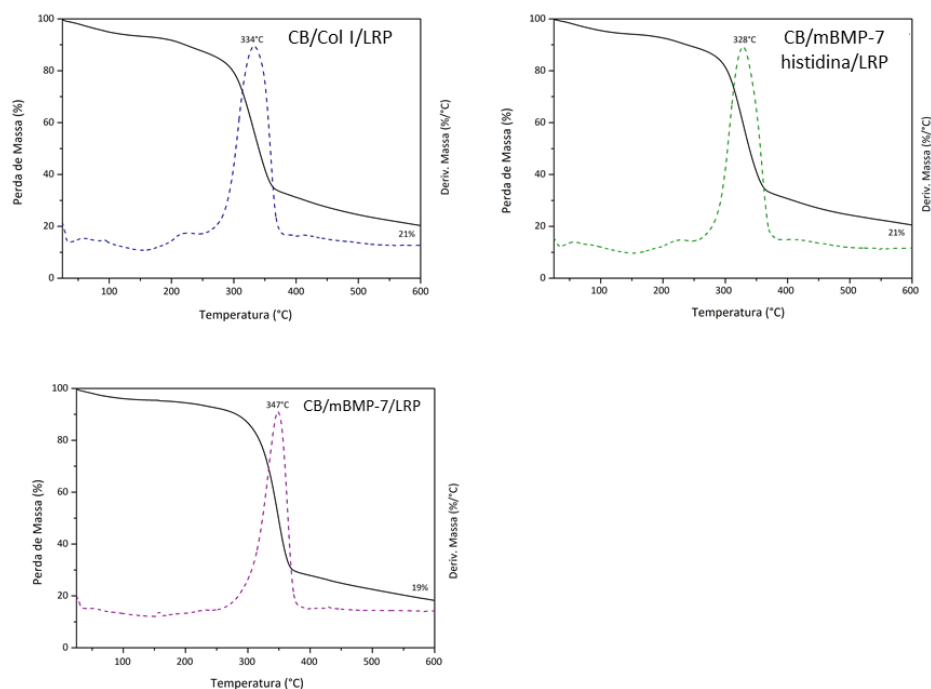


Figura 13. Curvas termogravimétricas (TG) e derivadas (DTG) das amostras: CB/Col I/LRP, CB/mBMP-7 com histidina/LRP e CB/mBMP-7/LRP na faixa de 29 °C a 600 °C, com taxa de fluxo de 100 mL/ min⁻¹ e velocidade de aquecimento de 10°C/min.

A Tabela 8 evidencia os principais eventos registrados para cada amostra, incluindo temperatura máxima de degradação ($T_{m\acute{a}x}$), perda de massa referente ao pico máximo de degradação e massa residual em 600 °C. E no anexo I consta as deconvoluções dos termogramas obtidos de cada amostra.

Tabela 8. Principais eventos de perda de massa em função do aumento da temperatura (29 °C a 600 °C) para as diferentes amostras de CB, funcionalizadas e não funcionalizadas com as sequências peptídicas.

Amostras	$T_{m\acute{a}x}$ (°C)	Perda de massa (%)	Massa residual em 600°C (%)
CB Nativa	353 °C	81%	19%
CB/CMC	348 °C	75%	25%
CB/CMC/EDC:NHS	306 °C	78%	22%
CB/EDC:NHS	305 °C	80%	20%
CB/peptídeo Col I	350 °C	82%	18%
CB/peptídeo mBMP-7 com histidina	356 °C	77%	23%

CB/peptídeo LRP	289 °C	74%	26%
CB/peptídeo mBMP-7	292 °C	73%	27%
CB/peptídeo Col I/LRP	334 °C	79%	21%
CB/peptídeo mBMP-7 com histidina/LRP	328 °C	79%	21%
CB/peptídeo mBMP-7/LRP	347 °C	81%	19%

Conforme demonstrado no estudo de Rute (2015), a análise de TG das amostras de CB funcionalizadas com o peptídeo RGD revelou distintos eventos térmicos de degradação. O primeiro evento em aproximadamente 100°C, correspondeu à perda de massa associada à eliminação de água adsorvida fisicamente e retida por interações de hidrogênio. Na faixa de 260°C a 320°C, registrou-se um segundo evento, relacionado ao início da decomposição térmica dos materiais, indicando possíveis modificações estruturais na CB após a funcionalização. O terceiro evento, caracterizado por uma perda de massa significativa (60%–66%), ocorreu entre 358°C e 363°C para todas as amostras analisadas e foi atribuído à degradação da CB, envolvendo a clivagem das ligações glicosídicas, despolimerização, desidratação e decomposição térmica das unidades de glicose.

Sendo assim, os resultados obtidos no presente estudo estão em concordância com os achados de Rute (2015), que também observaram múltiplos eventos de degradação térmica em amostras de CB funcionalizadas, e que a similaridade nos perfis térmicos reforça que a incorporação de biomoléculas pode influenciar a estabilidade térmica da CB, sem comprometer sua integridade estrutural.

4.6. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a avaliação dos aspectos morfológicos das diferentes amostras de CB, a análise de MEV foi conduzida e as diferentes micrografias podem ser evidenciadas na Figura 14. A micrografia obtida por MEV da CB nativa (Fig. 14A) revela a presença de uma rede de fibrilas dispostas de forma aleatória, com aspecto mais rugoso. Entretanto, o recobrimento da CB utilizando solução de CMC (Fig. 14B), conduziu a formação de um filme homogêneo sobreposto as fibrilas, reduzindo a visualização das fibras. Esses dados demonstram a eficácia do recobrimento da superfície da CB com CMC, evidenciando a modificação bem-sucedida do material. A interação entre a biocelulose e a CMC pode ser atribuída predominantemente a

processos de adsorção, nos quais forças intermoleculares, como interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio, desempenham um papel fundamental na ancoragem da CMC à matriz polimérica da CB. Esse mecanismo de adsorção é favorecido pela afinidade química entre os grupos hidroxila presentes na biocelulose e os grupos carboxila da CMC, permitindo uma interação estável sem comprometer as propriedades estruturais da CB (ARUMUGHAN *et al.*, 2023). A presença da CMC conferiu à superfície das fibras um aspecto mais liso e uniforme. O mesmo aspecto foi observado para as amostras recobertas em seguida com os agentes de acoplamento EDC:NHS (Fig 14C-D).

Após a incorporação das moléculas bioativas, foram observadas alterações significativas na morfologia da superfície do material (Fig. 14G-J). As micrografias dessas amostras evidenciam a presença da rede de fibrilas, porém de maneira heterogênea, com regiões onde as fibrilas ainda são visíveis e outras completamente recobertas por CMC. Essa distribuição não uniforme pode ser atribuída às etapas de lavagem ao longo do processo de funcionalização, que podem ter removido o excesso de CMC de forma diferencial. Além disso, observa-se que a morfologia das fibrilas foi alterada, com modificações tanto na espessura quanto na disposição das fibras, quando comparadas à CB nativa.

O estudo de Sommer *et al.* (2021) demonstrou que as amostras de CB funcionalizadas com colágeno de peixe, preparadas por imersão das membranas úmidas de biocelulose na solução de colágeno sob agitação por 120 minutos, apresentaram uma superfície mais lisa, com redução no diâmetro dos poros. Além disso, verificou-se uma alteração significativa no diâmetro das fibras individuais. Essas modificações estruturais indicam que a incorporação do colágeno promoveu uma reorganização da rede fibrilar, resultando em uma superfície mais homogênea e compacta. Já o estudo de Saska *et al.* (2012), revelou que a superfície da CB modificada com CMC garantiu a formação de uma estrutura de fibras bem interconectada, com uma camada polimérica recobrimo a rede de fibrilas.

Por outro lado, Fursatz *et al.* (2018), em seu estudo, constatou que a incorporação de CMC (grau de substituição 0,7) sobre a CB por um período de incubação de 1,5h, não alterou a disposição 3D das fibras, indicando apenas a presença de uma camada fina ao redor das fibras.

Deste modo, constatou-se que as diferentes estratégias de modificação da superfície da CB, incluindo o recobrimento com CMC, a ativação com os agentes de acoplamento EDC:NHS e a incorporação de sequências peptídicas, influenciaram tanto a organização das

fibrilas quanto a heterogeneidade superficial, evidenciada, em algumas amostras, pela formação de um filme recobrendo a superfície.

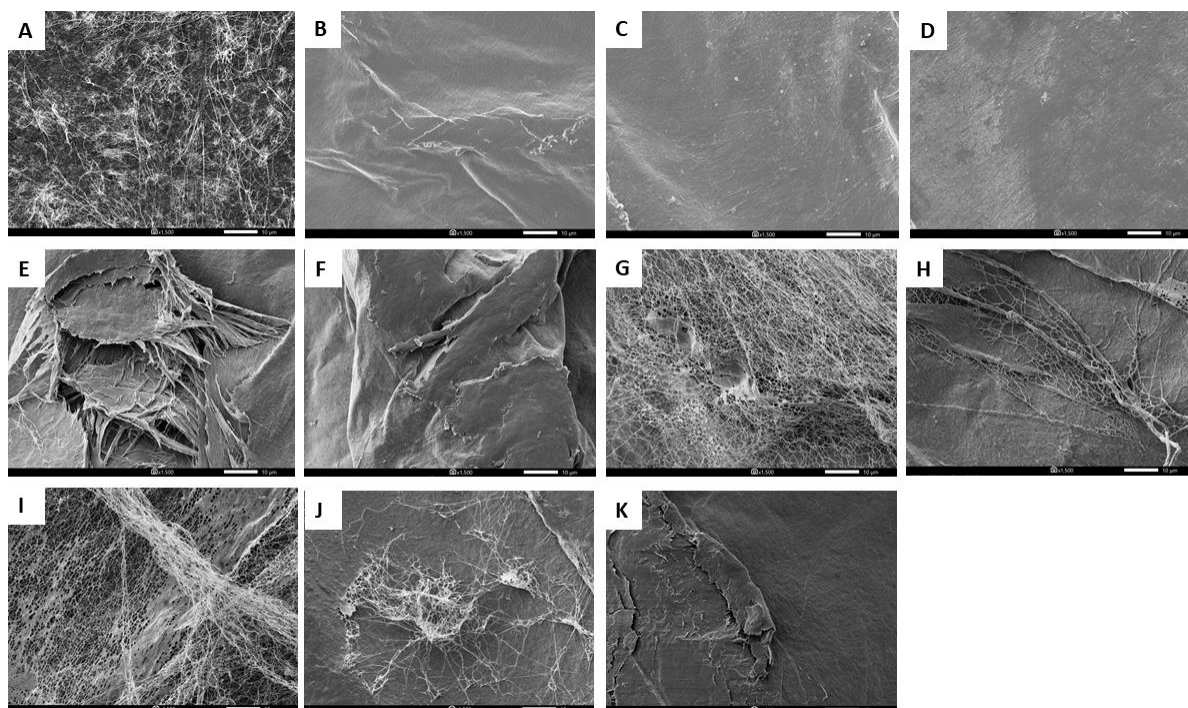


Figura 14. Microscopia eletrônica de varredura. Amostra A (CB nativa); Amostra B (CB/CMC/NaCl/BSA); Amostra C (CB/CMC/BSA/EDC:NHS); Amostra D (CB/BSA/EDC:NHS); Amostra E (CB/Col I); Amostra F (CB/mBMP-7 com Histidina); Amostra G (CB/LRP); Amostra H (CB/mBMP-7); Amostra I (CB/Col I/LRP); Amostra J (CB/mBMP-7 com Histidina/LRP) e Amostra K (CB/mBMP-7/LRP). Barra de escala: 10 μ m.

4.6.1 Espectroscopia de Dispersão de Energia de Raios X (EDS) e Mapeamento Químico

A análise de mapeamento químico demonstrada nas Figuras 15-17, combinada aos dados obtidos por EDS (Figura 18), forneceu informações valiosas sobre a distribuição espacial e a composição elementar das amostras analisadas, o equipamento utilizado possui uma limitação na qual apenas identifica o elemento químico presente e não a região exata em que está. A caracterização por EDS revelou a presença predominante dos elementos carbono (C) e oxigênio (O) nas amostras de biocelulose nativa, que são parte de sua estrutura molecular (MOHITE & PATIL,2014).

Após a funcionalização com os agentes de acoplamento EDC:NHS e subsequente incorporação das sequências peptídicas, foi detectada a presença adicional de nitrogênio (N) na matriz da CB. Esse elemento é indicativo da presença dos agentes de acoplamento, cujas estruturas químicas — $C_6H_{11}NO_3$ (EDC) e $C_4H_5NO_3$ (NHS) — contêm nitrogênio em sua

composição, e, possivelmente, também dos próprios peptídeos imobilizados, que apresentam grupos amina (-NH₂) em sua cadeia estrutural.

A detecção do elemento N após a funcionalização também é indicativo da formação de ligações do tipo amida (-CONH-) entre grupos carboxila livres da CB e grupos amina das sequências peptídicas, cuja presença é um indicativo da imobilização bem-sucedida dos peptídeos na superfície da biocelulose. Esses resultados demonstram, portanto, uma modificação química efetiva da superfície da CB, confirmando a funcionalização por meio dos sinais elementares detectados via EDS.

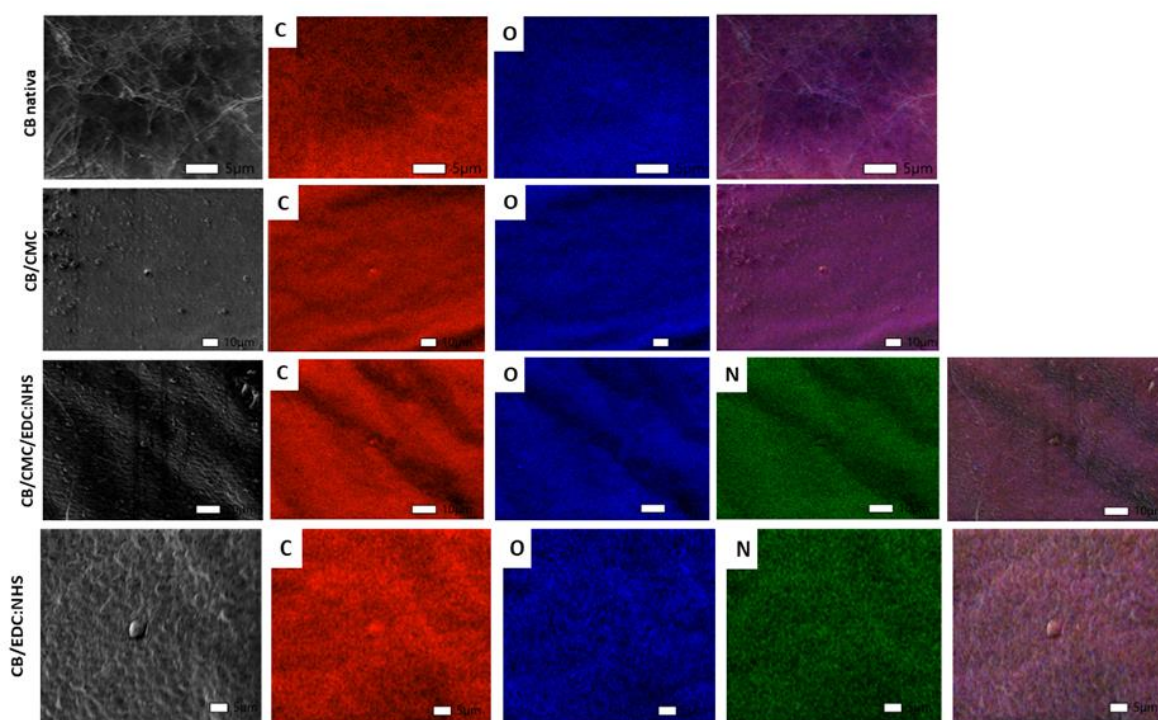


Figura 15. Mapeamento químico das amostras CB nativa, CB/CMC, CB/CMC/EDC:NHS e CB/EDC:NHS, evidenciando a distribuição dos elementos químicos Carbono (C), Oxigênio (O) e Nitrogênio (N), além da sobreposição (merge) de todos os elementos identificados.

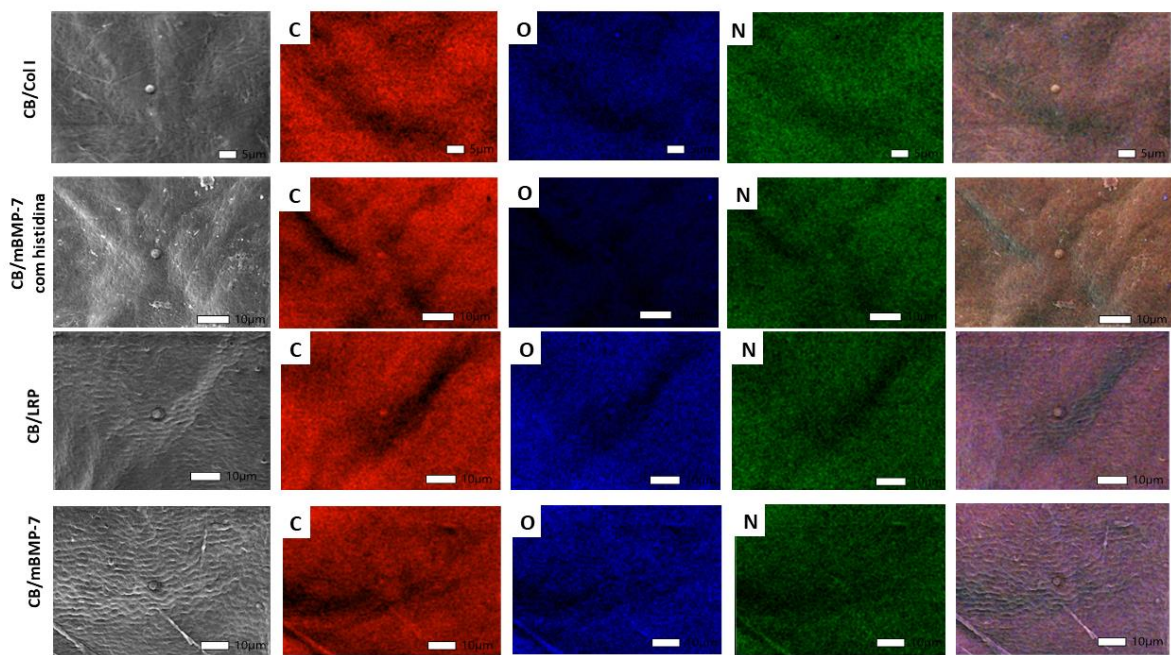


Figura 16. Mapeamento químico das amostras CB/Col I, CB/mBMP-7 com e sem histidina e CB/LRP, evidenciando a distribuição dos elementos químicos Carbono (C), Oxigênio (O) e Nitrogênio (N), além da sobreposição (merge) de todos os elementos identificados.

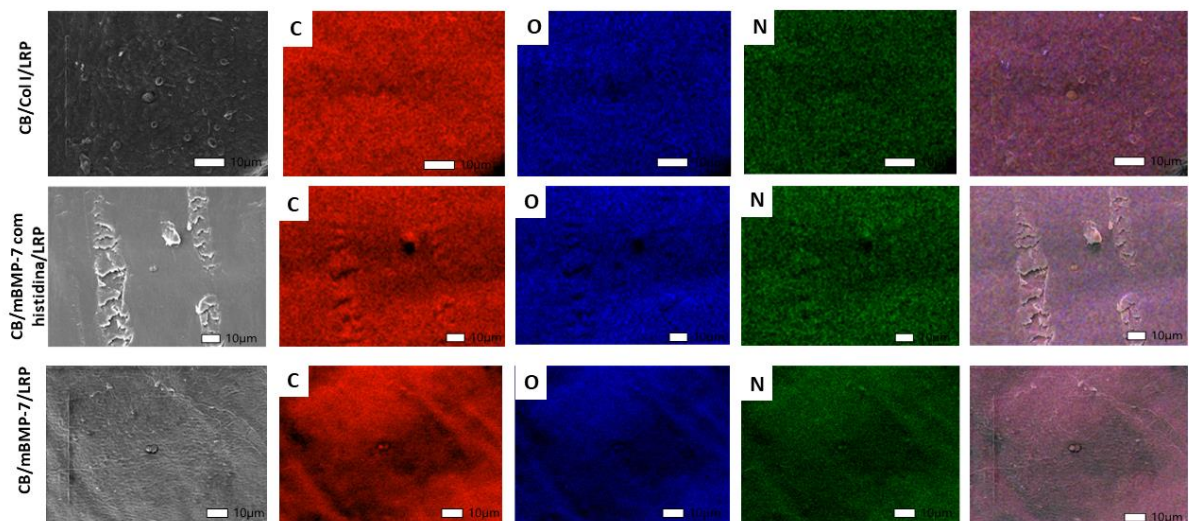


Figura 17. Mapeamento químico das amostras CB/Col I/LRP e CB/mBMP-7 com e sem histidina/LRP, evidenciando a distribuição dos elementos químicos Carbono (C), Oxigênio (O) e Nitrogênio (N), além da sobreposição (merge) de todos os elementos identificados.

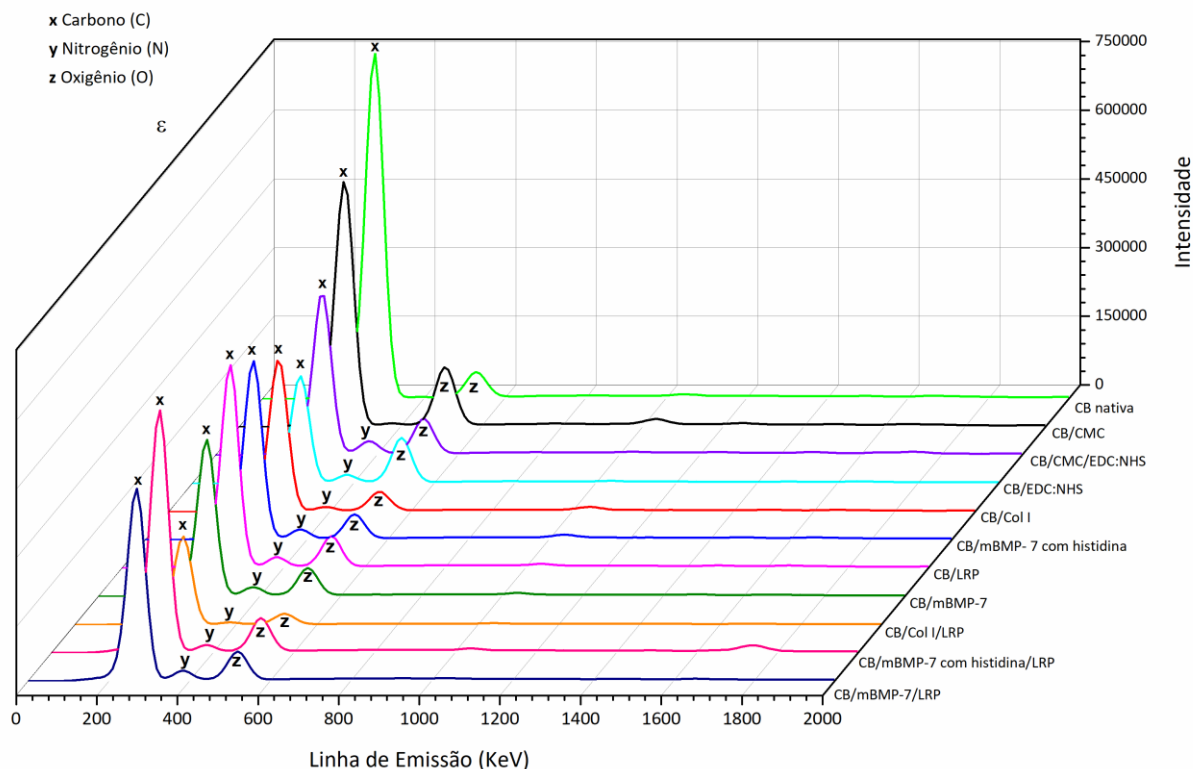


Figura 18. Análise de espectroscopia de dispersão de energia (EDS) das amostras CB nativa, CB/CMC, CB/CMC/EDC:NHS, CB/EDC:NHS, CB/Col I, CB/mBMP-7 com e sem histidina, CB/LRP e as bifuncionalizadas CB/Col I/LRP e CB/mBMP-7 com e sem histidina/LRP, identificando a composição elementar e confirmando a presença dos elementos Carbono (C), Oxigênio (O) e Nitrogênio (N).

Somado a esses achados, a semi-quantificação dos picos de carbono e oxigênio, computados na Tabela 9 indicaram uma leve alteração na relação desses elementos, o que pode ser atribuído à interação da CB com as biomoléculas.

Ainda com base na Tabela 9, pode-se observar que as películas de CB bifuncionalizadas com dois peptídeos tendem a apresentar um maior conteúdo de N quando comparado com as amostras funcionalizadas com apenas um peptídeo.

No estudo de Mohite et al. (2014), a análise de EDS da CB nativa indicou a presença de carbono e oxigênio nas porcentagens de 54,06% e 45,94%. Fursatz et al. (2018), também relataram através da análise utilizando XPS (*X-ray Photoelectron Spectroscopy*), que as películas de CB funcionalizadas com ϵ -PLL apresentaram um aumento significativo no conteúdo de nitrogênio, que foi ainda maior quando previamente modificadas com CMC, indicando que a exposição dos grupamentos carboxilas permitem uma maior eficiência na

imobilização dos peptídeos sobre a superfície do biopolímero via ligações covalentes do tipo amida.

Tabela 9. Representação dos elementos químicos presentes nas diferentes amostras de CB funcionalizadas e não funcionalizadas com as sequências peptídicas.

Elementos Químicos (%)				
Amostras	Carbono (C)	Nitrogênio (N)	Oxigênio (O)	Outros elementos
CB Nativa	87,78±0,04	-	8,65 ±0,02	±3,57
CB/CMC	76,91±0,04	-	20,7±0,03	±2,39
CB/CMC/EDC:NHS	60,71±0,04	18,38±0,05	18,02±0,03	±2,89
CB/EDC:NHS	57,82±0,04	14,83±0,05	23,53±0,05	±3,82
CB/Col I	75,1±0,03	12,07±0,04	9,82±0,02	±3,01
CB/mBMP-7 com histidina	68,51±0,04	17,41±0,05	11,19±0,03	±2,89
CB/LRP	68,57±0,03	16,45±0,04	12,47±0,02	±2,51
CB/mBMP-7	63,85±0,03	14,93±0,04	14,52±0,03	±1,7
CB/Col I/LRP	73,74±0,04	11,87±0,04	12,72±0,03	±1,67
CB/mBMP-7 com histidina/LRP	72,61±0,04	12,77±0,03	12,18±0,02	±2,44
CB/mBMP-7/LRP	67,57±0,03	17,81±0,05	13,16±0,02	±1,47

4.7. Microscopia de Força Atômica (AFM)

A microscopia de força atômica (AFM) é uma técnica de caracterização baseada na interação entre a sonda e a superfície da amostra. Durante a varredura, a sonda percorre a amostra linha por linha, e um laser detecta os desvios da haste (cantilever) causados pelas forças de interação com a superfície. Esses desvios são convertidos em imagens tridimensionais de alta resolução, permitindo obter informações topográficas, rugosidade, e até propriedades mecânicas ou adesivas dos materiais analisados. Diferentemente de técnicas

ópticas, o AFM não depende de luz para formar a imagem, o que possibilita a análise de superfícies nanométricas em diferentes ambientes com mínima preparação da amostra (ITURRI *et al.*, 2017).

As imagens obtidas por MFA revelaram uma superfície com morfologia homogênea entre as amostras analisadas, representado na Figura 19. A análise de nanorugosidade superficial média (Ra), conforme computado na Tabela 10, foi de $29,13 \pm 0,38$ nm para a CB nativa, $23,15 \pm 0,76$ nm para CB/CMC/EDC/NHS, $57,19 \pm 2,88$ nm para a plataforma bifuncionalizada CB/Col I/LRPe $32,23 \pm 3,20$ nm para CB/mBMP-7/LRP. A redução da nanorugosidade observada na amostra contendo CMC pode ser atribuída à formação de um filme uniforme sobre as fibras de CB, o que reduz a nanorugosidade aparente da superfície. Em contraste, as amostras bifuncionalizadas apresentaram aumento da nanorugosidade, especialmente na plataforma contendo o peptídeo mimético ao colágeno tipo I, o que indica que o processo de funcionalização altera a topografia ao adicionar biomoléculas à superfície do material.

Más *et al.* (2014) investigaram a modificação superficial de membranas de PLDLA (poli(L-co-D,L ácido láctico)), um copolímero biodegradável e biocompatível amplamente utilizado em engenharia de tecidos ósseos. As membranas de PLDLA não modificadas apresentavam uma superfície lisa, homogênea, não porosa, com baixa rugosidade e caráter hidrofóbico. A modificação superficial foi realizada por meio de enxertia (grafting) induzida por descarga a plasma, utilizando ácido acrílico como monômero, processo que promoveu a introdução de grupos carboxílicos reativos na superfície do polímero. Essa funcionalização resultou na transformação da superfície inicialmente lisa em uma estrutura porosa com poros distribuídos de forma homogênea. Posteriormente, foi realizada a imobilização covalente de colágeno tipo I, principal componente da matriz extracelular do tecido ósseo, levando à formação de uma rede fibrilar contínua sobre a superfície do material. Como consequência, observou-se um aumento significativo da rugosidade média, que passou de 6,3 nm no PLDLA não modificado para 30,7 nm no PLDLA funcionalizado com colágeno. O estudo utilizou o colágeno tipo I íntegro, uma proteína de elevada massa molecular, não sendo aplicável a definição de tamanho de sequência ou similaridade com peptídeos curtos, o que contribuiu para a melhora da interação com células osteoblásticas. Esses resultados indicam que o processo de imobilização não apenas promove a ligação do colágeno ao polímero, mas também modifica a topografia, tornando a superfície mais rugosa.

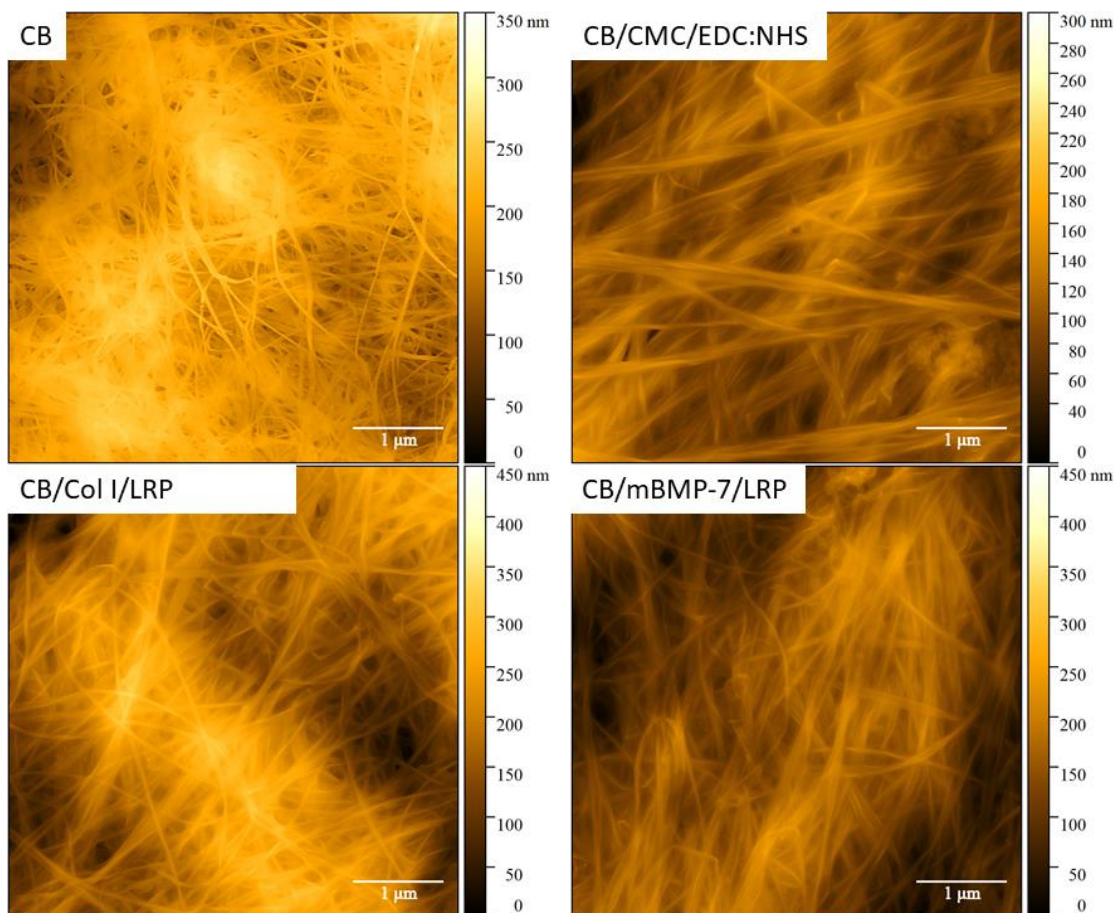


Figura 19. Imagem representativa da topografia das amostras CB, CB/CMC/EDC/NHS, CB/Col I/LRP e CB/mBMP-7/LRP obtidas por microscopia de Força Atômica utilizando uma sonda Bruker® SCANASYST-AIR com constante de mola nominal de 0,4 N/m e raio da ponta de 2,0 nm para a varredura.

Tabela 10. Valores de nanorugosidade média (Ra) das amostras obtidas por microscopia de força atômica.

AMOSTRAS	Ra (nm) ± SD
CB	29,13 ± 0,38
CB/CMC/EDC/NHS	23,15 ± 0,76
CB/Col I/LRP	57,19 ± 2,88
CB/mBMP-7/LRP	32,23 ± 3,20

4.8. Ângulo de contato

A molhabilidade da superfície é uma característica físico-química crítica que regula as interações célula-material, incluindo a adesão celular inicial e a proliferação subsequente (CAI *et al.*, 2020). A molhabilidade foi avaliada por medições do ângulo de contato em

regime estático, utilizando água deionizada como líquido de prova. A Figura 20 evidencia os valores de ângulo de contato obtidos para cada amostra analisada.

A CB pura apresentou um ângulo de contato inicial com água de $45^\circ \pm 7,25^\circ$. Essa resposta é consistente com a natureza hidrofílica da nanocelulose, atribuída à elevada densidade de grupos hidroxila presentes em sua superfície (HUBBLE *et al.*, 2015). Superfícies com ângulo de contato inferior a 90° são classificadas como hidrofílicas (ROL *et al.*, 2019), condição que, segundo Cai *et al.* (2020), favorece a adesão celular. Entretanto, valores extremamente baixos de ângulo de contato, característicos de superfícies super-hidrofílicas ($< 5^\circ$), podem ser desfavoráveis à adesão celular.

A incorporação de CMC promoveu um leve aumento no ângulo de contato ($50^\circ \pm 3,8$), indicando uma modificação superficial sem comprometimento significativo da hidrofiliidade (DMITRENKO *et al.*, 2025). A imobilização dos peptídeos por ligação covalente, resultou em um aumento mais pronunciado do ângulo de contato, atingindo $69^\circ \pm 6,2$ e $70^\circ \pm 6,8$ para as amostras contendo, o peptídeo Col I e a mBMP-7, respectivamente.

O peptídeo Col I, representado pela sequência GARGQAGVMGFO, apresenta número limitado de grupos polares capazes de interagir com a água, resultando em menor contribuição para o aumento da hidrofiliidade superficial. Por outro lado, a sequência mBMP-7 (VEHDKEFFHPRYHH), possui maior quantidade de grupos polares e ionizáveis em pH 3,9, incluindo resíduos de tirosina, ácido aspártico e ácido glutâmico protonados, além da extremidade C-terminal, o que potencialmente aumenta a capacidade de formação de ligações de hidrogênio com a água.

Já o peptídeo LRP (KVSALKEKVSALKEKNSALKWKVSALKE) apresenta elevada densidade de grupos polares, decorrente da presença de resíduos de serina, lisina e ácido glutâmico, além do grupo C-terminal. Apesar dessa maior disponibilidade de grupos polares, as plataformas CB/Col I/LRP e CB/mBMP-7/LRP exibiram ângulos de contato mais elevados de $69 \pm 6,2$ e $70 \pm 6,8$ respectivamente. Esse comportamento indica que a molhabilidade da superfície não depende exclusivamente da quantidade absoluta de grupos hidrofílicos, mas também da distribuição de cargas, da conformação molecular e da orientação dos peptídeos imobilizados, fatores que podem reduzir a exposição efetiva desses grupos na interface sólido-líquido.

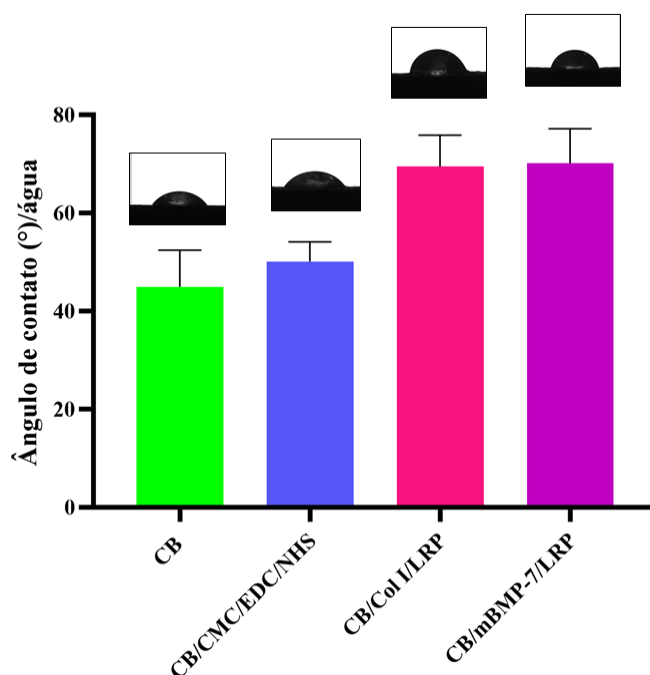


Figura 20. Valores de ângulo de contato para as amostras de CB nativa e CB funcionalizada com as sequências peptídicas.

Wen et al. (2015) também relataram um aumento significativo no ângulo de contato da CB nativa, que passou de $25,1^\circ \pm 2,6^\circ$ para $93,5^\circ \pm 6,2^\circ$ após a funcionalização com um peptídeo derivado do colágeno, para possibilitar a imobilização estável do peptídeo, a CB foi previamente oxidada para obtenção de CB dialdeído, introduzindo grupos aldeído reativos ao longo das nanofibras. O peptídeo de colágeno foi então covalentemente imobilizado por meio de reações de base de Schiff entre os grupos aldeído da CB oxidada e os grupos amina livres do peptídeo, resultando em uma ligação química estável. Esse método de imobilização covalente garantiu a retenção do peptídeo na superfície das nanofibras, alterando significativamente as propriedades de molhabilidade do material e contribuindo para a modulação das interações célula–biomaterial, aspecto essencial para aplicações em engenharia e regeneração de tecidos. Saska et al. (2018) relataram que essa mudança na molhabilidade pode ser atribuída a alterações na distribuição de carga da molécula de colágeno após a imobilização na superfície, o que pode aumentar transitoriamente a hidrofobicidade aparente da superfície.

Com base na equação de Wu, foi possível calcular a componente polar e dispersivas das amostras CB nativa e CB funcionalizadas com as sequências peptídicas, representado na tabela 11.

Tabela 11. Valores das componentes polares e dispersivas obtidas com as amostras CB nativa e CB funcionalizadas com os peptídeos.

AMOSTRAS	COMPONENTE POLAR	COMPONENTE DISPERSIVA
CB	24,95 ± 4,4	42,24 ± 3,4
CB/CMC/EDC/NHS	21,55 ± 1,1	41,74 ± 0,9
CB/Col I/LRP	13,70 ± 1,0	40,47 ± 0,7
CB/mBMP-7/LRP	13,66 ± 2,7	41,74 ± 0,9

Com base nas medidas do ângulo de contato e nas componentes listadas na tabela 11, foi possível determinar a tensão superficial da CB nativa e CB funcionalizada com os peptídeos, como evidenciado na figura 21 e computadas na Tabela 12.

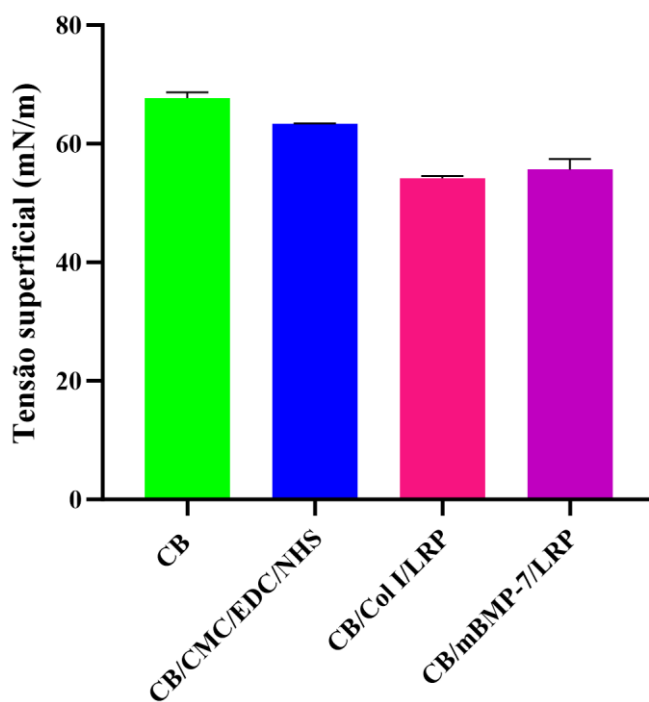


Figura 21. Tensão superficial das amostras de CB, CB/CMC/EDC/NHS, CB/Col I/LRP e CB/mBMP-7/LRP.

Tabela 12. Valores de ângulo de contato em água e tensão superficial das amostras CB nativa e CB bifuncionalizada com as sequências peptídicas.

AMOSTRAS	ÂNGULO DE CONTATO (°)	TENSÃO SUPERFICIAL (mN/m)
CB	45 ± 7,2	67,71 ± 0,9
CB/CMC/EDC/NHS	50 ± 3,8	63,33 ± 0,1

CB/Col I/LRP	$69 \pm 6,2$	$54,21 \pm 0,3$
CB/mBMP-7/LRP	$70 \pm 6,8$	$55,66 \pm 1,7$

Os valores obtidos para tensão superficial corroboram com os resultados obtidos para os ângulos de contato das diferentes superfícies analisadas. Verificou-se que os valores de tensão superficial diminuíram após a incorporação dos peptídeos, passando de 67,71 mN/m para a CB nativa para 54,21 mN/m e 55,66 mN/m nas amostras CB/Col I/LRP e CB/mBMP-7/LRP, respectivamente. A análise das componentes da energia superficial indica que essa redução está associada principalmente à diminuição da componente polar, enquanto a componente dispersiva permaneceu praticamente constante (CARRIER; BONN, 2015).

4.9. Ensaios biológicos

4.9.1. Análise Hemolítica

A análise hemolítica foi realizada dos peptídeos isolados com o objetivo de avaliar a biocompatibilidade das amostras em contato direto com eritrócitos humanos, obtidos do hemonúcleo, uma vez que materiais destinados a aplicações biomédicas não devem causar lise ou danos às células sanguíneas. Os resultados da Figura 22 demonstraram que todas as amostras tanto na maior concentração (512 $\mu\text{g/mL}$) e na menor (1 $\mu\text{g/mL}$) apresentaram valores de hemólise inferiores a 5%, limite estipulado pelas normas ISO 10993-4 e ASTM F756. Assim, pode-se inferir que os peptídeos sintetizados não induzem ruptura significativa de eritrócitos, demonstrando adequada compatibilidade com o sangue e reforçando o potencial uso destas biomoléculas em aplicações biomédicas.

Yu et al. (2023) avaliaram a hemocompatibilidade do peptídeo antimicrobiano conjugado com eritromicina em ensaios de hemólise e observaram que, após incubação de glóbulos vermelhos de coelho com concentrações de 5, 10, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ do conjugado, a porcentagem de hemólise permaneceu muito baixa e não estatisticamente diferente do controle negativo (PBS), indicando que nem mesmo na concentração mais alta testada (50 $\mu\text{g/mL}$) houve hemólise significativa, o que demonstra uma boa hemocompatibilidade do material. Esse resultado confirma que a conjugação do composto eritromicina com ϵ -poly-L-lisina manteve a excelente biocompatibilidade do material, característica essencial para aplicações biomédicas.

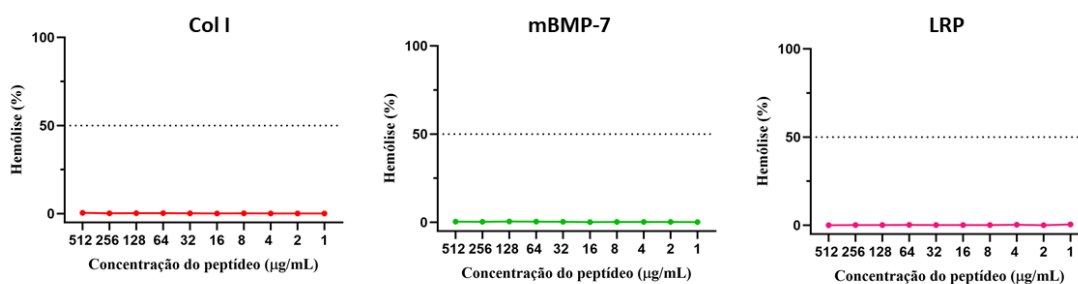


Figura 22. Ensaio de atividade hemolítica dos peptídeos LRP, Col I e mBMP-7, realizados em diluição seriada partindo de 512 µg/mL até 1 µg/mL.

4.9.2. Ensaio de Citotoxicidade

De acordo com a figura 23, nota-se que todas as amostras avaliadas no presente estudo, incluindo CB, CB/CMC/EDC/NHS, CB/Col I/LRP e CB/mBMP-7/LRP frente a linhagem L929 e SaOS-2, não foram citotóxicas, mantendo a viabilidade celular acima de 70%.

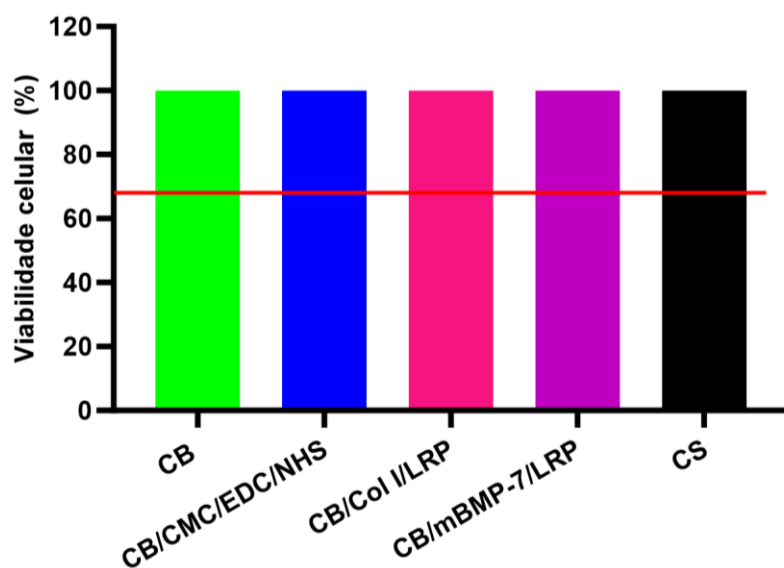


Figura 23. Porcentagem de viabilidade celular da linhagem L929 e SaOS-2, avaliada por método indireto utilizando o reagente colorimétrico resazurina, frente às amostras de CB nativa e CB bifuncionalizadas com peptídeos.

4.9.3. Ensaio de Proliferação Celular

Pelo método direto, os resultados de proliferação celular (Figura 24 e Figura 25) evidenciaram que as amostras de CB nativa e CB bifuncionalizadas com os peptídeos

exibiram um comportamento semelhante ao do controle de sobrevivência, com diferenças estatisticamente significativas, representado nas tabelas 13 e 14. Isso pode decorrer da concentração dos peptídeos que foi estabelecida. Esses resultados estão em concordância com o estudo de Fursatz et al. (2018), no qual foi avaliada a resposta proliferativa de fibroblastos humanos dérmicos (HDFa) cultivados sobre amostras de CB nativa e CB funcionalizada com o peptídeo antimicrobiano ϵ -poly-L-lysine (ϵ -PLL), um polipeptídeo catiônico de baixo peso molecular conhecido por sua ampla atividade antimicrobiana. No trabalho, a funcionalização da CB foi realizada por química de carbodiimida, em que ϵ -PLL foi covalentemente ligado às membranas de CB (incluindo CB funcionalizada com carboximetilcelulose) por meio da formação de ligações amida entre grupos carboxílicos da CB e grupos amina do ϵ -PLL. Essa modificação não alterou significativamente a estrutura nanofibrilar ou as propriedades mecânicas da CB e foi testada em diferentes preparações, mas os autores não relataram diferenças marcantes entre diferentes concentrações de ϵ -PLL depositadas com relação à citocompatibilidade. Os ensaios com fibroblastos humanos mostraram que a funcionalização com ϵ -PLL não promoveu diferenças estatisticamente significativas na taxa de proliferação celular quando comparada à CB não modificada, indicando que a adição do peptídeo antimicrobiano preserva a biocompatibilidade do material sem comprometer a viabilidade e o crescimento celular.

Considerando os resultados dos ensaios de hemocompatibilidade e citotoxicidade, abre-se a possibilidade de otimizar as respostas celulares por meio do aumento das concentrações de peptídeos imobilizados na superfície da CB.

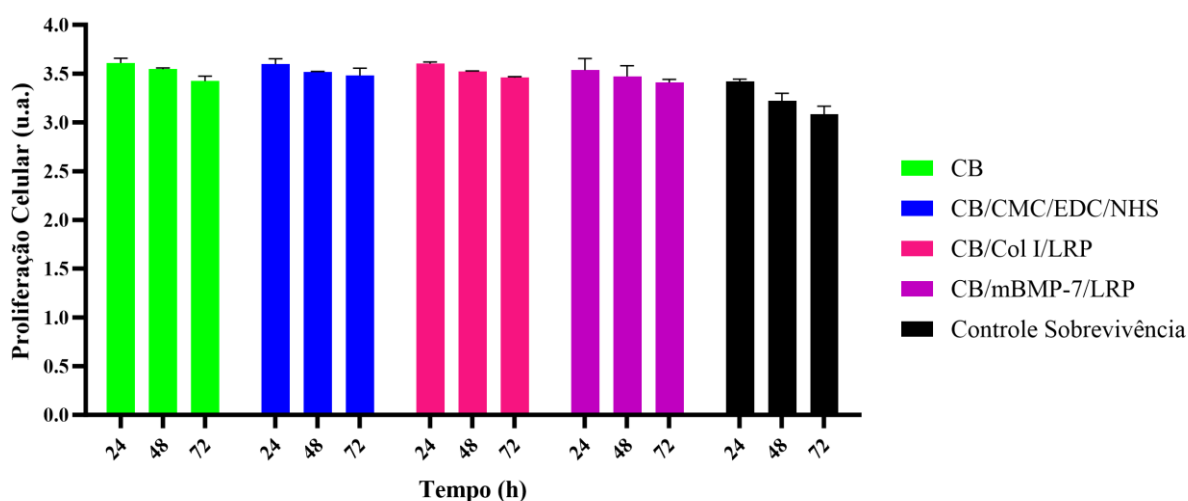


Figura 24. Proliferação celular da linhagem L929 expressa em unidades arbitrárias (u.a.) em função das diferentes amostras de CB nativa e CB bifuncionalizada com peptídeos com análise estatística 2away anova, sendo $p > 0,05$.

Tabela 13. Análise Estatística 2way ANOVA - Turkey do ensaio de proliferação frente a linhagem L929, sendo $p > 0,05$.

AMOSTRAS	Valor de P ($p > 0,05$)
24:CB vs. 48:Controle Sobrevivência	0,0007
24:CB vs. 72:Controle Sobrevivência	<0,0001
24:CB/CMC/EDC/NHS vs. 48:Controle Sobrevivência	0,001
24:CB/CMC/EDC/NHS vs. 72:Controle Sobrevivência	<0,0001
24:CB/Col I/LRP vs. 48:Controle Sobrevivência	0,0009
24:CB/Col I/LRP vs. 72:Controle Sobrevivência	<0,0001
24:CB/mBMP-7/LRP vs. 48:Controle Sobrevivência	0,006
24:CB/mBMP-7/LRP vs. 72:Controle Sobrevivência	0,0001
24:Controle Sobrevivência vs. 72:Controle Sobrevivência	0,0032
48:CB vs. 48:Controle Sobrevivência	0,0044
48:CB vs. 72:Controle Sobrevivência	<0,0001
48:CB/CMC/EDC/NHS vs. 48:Controle Sobrevivência	0,0103
48:CB/CMC/EDC/NHS vs. 72:Controle Sobrevivência	0,0002
48:CB/Col I/LRP vs. 48:Controle Sobrevivência	0,0094
48:CB/Col I/LRP vs. 72:Controle Sobrevivência	0,0002
48:CB/mBMP-7/LRP vs. 48:Controle Sobrevivência	0,039
48:CB/mBMP-7/LRP vs. 72:Controle Sobrevivência	0,0007
72:CB vs. 72:Controle Sobrevivência	0,0028
72:CB/CMC/EDC/NHS vs. 72:Controle Sobrevivência	0,0006
72:CB/Col I/LRP vs. 72:Controle Sobrevivência	0,001
72:CB/mBMP-7/LRP vs. 72:Controle Sobrevivência	0,0043

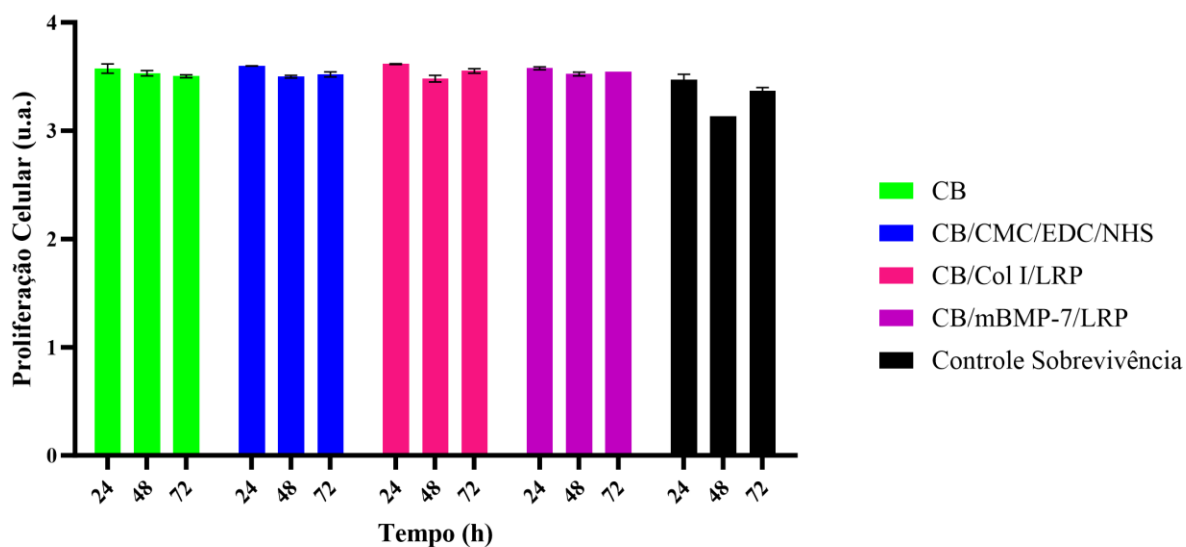


Figura 25. Proliferação celular da linhagem SaOS-2 expressa em unidades arbitrárias (u.a.) em função das diferentes amostras de CB nativa e CB bifuncionalizada com peptídeos, com análise estatística 2way Anova, sendo $p > 0,05$.

Tabela 14. Análise Estatística 2way ANOVA Turkey do ensaio de proliferação frente a linhagem SaOS-2, sendo $p > 0,05$.

AMOSTRAS	Valor de P ($p > 0,05$)
24:CB vs. 48:Controle Sobrevivência	<0,0001
24:CB vs. 72:Controle Sobrevivência	0,0001
24:CB/CMC/EDC/NHS vs. 24:Controle Sobrevivência	0,0122
24:CB/CMC/EDC/NHS vs. 48:CB/Col I/LRP	0,0222
24:CB/CMC/EDC/NHS vs. 48:Controle Sobrevivência	<0,0001
24:CB/CMC/EDC/NHS vs. 72:Controle Sobrevivência	<0,0001
24:CB/Col I/LRP vs. 24:Controle Sobrevivência	0,0041
24:CB/Col I/LRP vs. 48:CB/CMC/EDC/NHS	0,0236
24:CB/Col I/LRP vs. 48:CB/Col I/LRP	0,0074
24:CB/Col I/LRP vs. 48:Controle Sobrevivência	<0,0001
24:CB/Col I/LRP vs. 72:CB	0,0335
24:CB/Col I/LRP vs. 72:Controle Sobrevivência	<0,0001
24:CB/mBMP-7/LRP vs. 24:Controle Sobrevivência	0,0475
24:CB/mBMP-7/LRP vs. 48:Controle Sobrevivência	<0,0001
24:CB/mBMP-7/LRP vs. 72:Controle Sobrevivência	0,0001

24:Controle Sobrevivência vs. 48:Controle Sobrevivência	<0,0001
48:CB vs. 48:Controle Sobrevivência	<0,0001
48:CB vs. 72:Controle Sobrevivência	0,0015
48:CB/CMC/EDC/NHS vs. 48:Controle Sobrevivência	<0,0001
48:CB/CMC/EDC/NHS vs. 72:Controle Sobrevivência	0,0104
48:CB/Col I/LRP vs. 48:Controle Sobrevivência	<0,0001
48:CB/Col I/LRP vs. 72:Controle Sobrevivência	0,0335
48:CB/mBMP-7/LRP vs. 48:Controle Sobrevivência	<0,0001
48:CB/mBMP-7/LRP vs. 72:Controle Sobrevivência	0,0022
48:Controle Sobrevivência vs. 72:CB	<0,0001
48:Controle Sobrevivência vs. 72:CB/CMC/EDC/NHS	<0,0001
48:Controle Sobrevivência vs. 72:CB/Col I/LRP	<0,0001
48:Controle Sobrevivência vs. 72:CB/mBMP-7/LRP	<0,0001
48:Controle Sobrevivência vs. 72:Controle Sobrevivência	0,0003
72:CB vs. 72:Controle Sobrevivência	0,0074
72:CB/CMC/EDC/NHS vs. 72:Controle Sobrevivência	0,0026
72:CB/Col I/LRP vs. 72:Controle Sobrevivência	0,0004
72:CB/mBMP-7/LRP vs. 72:Controle Sobrevivência	0,0047

4.9.4. Ensaio de Migração Celular

A migração celular é um evento limitante da taxa durante o processo de cicatrização de feridas para restabelecer a integridade e a função normal das camadas de tecido após a lesão. O princípio do método é baseado na criação de uma lacuna de 500 μm (pseudo-ferida) em uma monocamada de células confluentes. As células na borda do campo artificial "ferido" começarão a migrar para a área livre de células, formando novos contatos célula-célula.

Os resultados apresentados nas micrografias da Figura 26, juntamente com os valores quantitativos apresentados na Figura 27, indicaram percentuais elevados de fechamento da pseudo-ferida após 48 h para todas as condições avaliadas. As células tratadas com os eluatos da CB nativa apresentaram aproximadamente 95% de fechamento, enquanto aquelas expostas aos eluatos das amostras CB/CMC/EDC/NHS, CB/Col I/LRP e CB/mBMP-7/LRP exibiram

valores de 87%, 81% e 80%, respectivamente. Já o controle de sobrevivência, apresentou 86% de fechamento, com $p > 0,05$.

É importante ressaltar que o ensaio de *pseudo wound healing* foi conduzido pelo método indireto, utilizando meio condicionado preparado conforme a norma ISO 10993-12. Nessa abordagem, apenas os eluatos provenientes dos materiais testados entram em contato com as células, o que limita a avaliação de interações diretas célula-material. Dessa forma, os peptídeos imobilizados na superfície da CB não participam ativamente do processo de migração celular avaliado, permanecendo ancorados à rede nanofibrilar da CB.

Considerando que a funcionalização da CB promove alterações relevantes na topografia superficial, na nanorrugosidade e na tensão superficial do material, é plausível supor que essas modificações exerçam maior influência sobre o comportamento celular em ensaios de contato direto. Assim, as respostas de migração observadas neste modelo pode estar associada às limitações intrínsecas do método indireto, que não permite avaliar o efeito combinado da biofuncionalização, da arquitetura nanofibrilar e das propriedades de superfície do material.

Nesse contexto, estudos futuros, empregando modelos *in vivo* de migração celular/cicatrização, tornam-se relevantes para investigar de forma mais adequada a interação entre tecidos e sistemas bifuncionalizados baseados em CB. Além disso, a avaliação de concentrações mais elevadas de peptídeos imobilizados pode potencializar a resposta biológica, promovendo efeitos mais pronunciados na migração, adesão e proliferação celular.

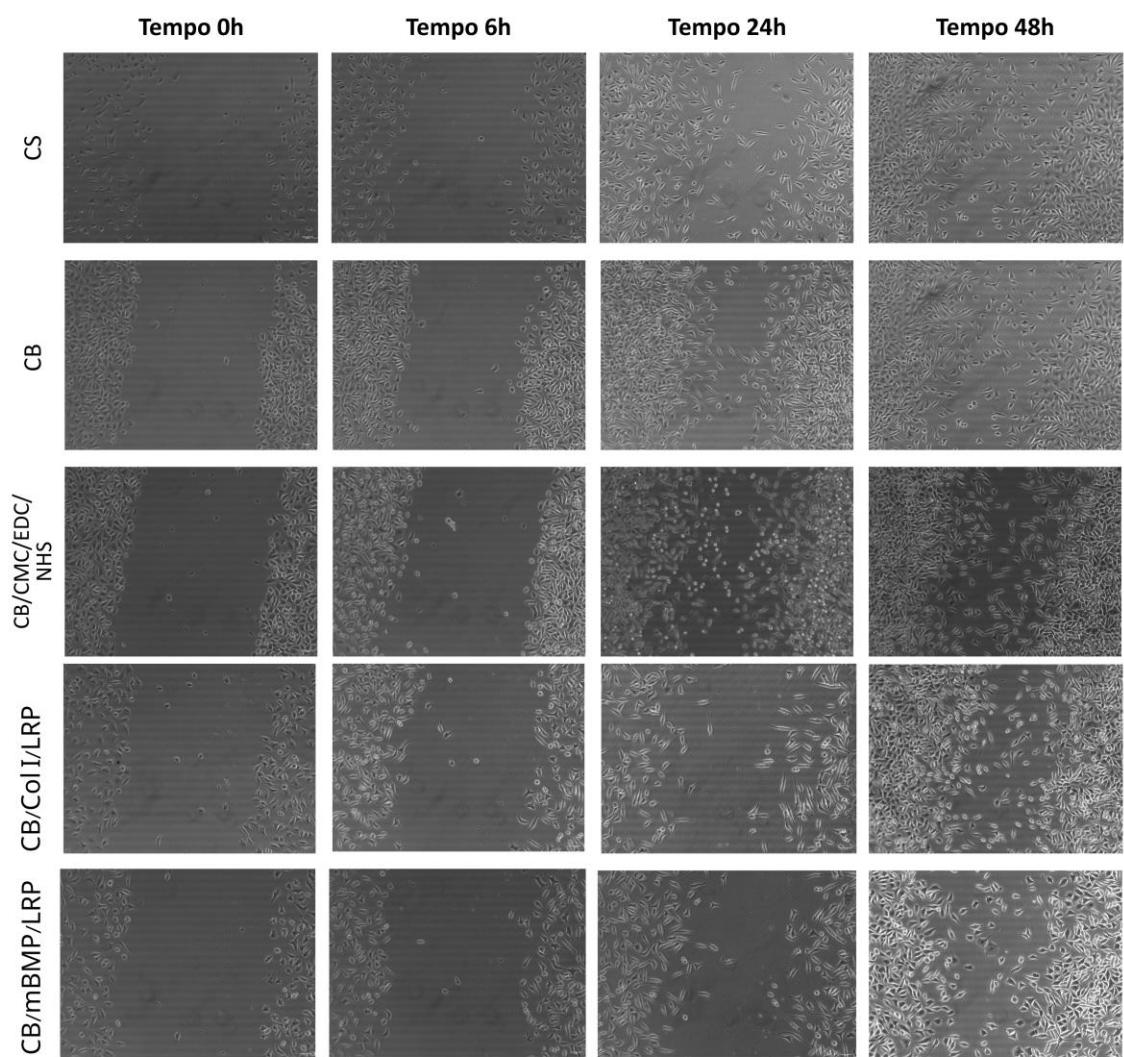


Figura 26. Micrografias da porcentagem de fechamento da pseudo-ferida utilizando fibroblastos L929 nos tempos 0, 6, 24 e 48h. Barra de escala 40 μm.

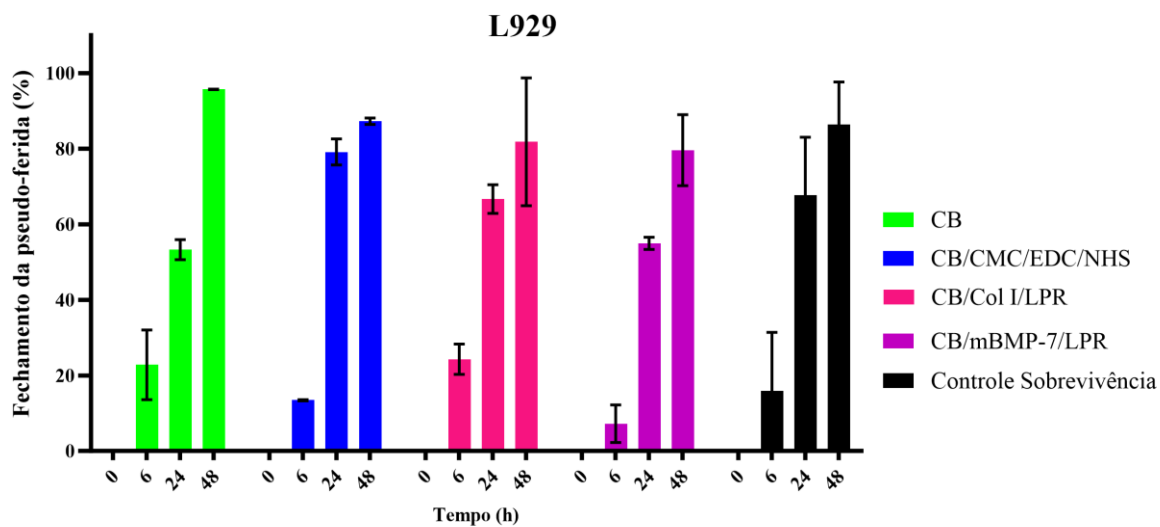


Figura 27. Porcentagem de fechamento da pseudo-ferida frente a migração de fibroblastos nos tempos 0, 6, 24 e 48h.

4.9.5. Ensaio de adesão celular

No curso do processo de adesão celular, as células inicialmente “sedimentam” na superfície com seus corpos esféricos. Então, as células “achatam” principalmente por interações não específicas. Se a superfície for adequada, as células “se espalham completamente” com maturação de adesão focal e criam contatos estáveis por meio da reorganização do esqueleto de actina para atingir sua área máxima de espalhamento.

As micrografias observadas nas Figuras 28-31 indicam que as superfícies de CB nativa e CB bifuncionalizadas garantiram a adesão e espraiamento celular, com exceção da amostra CB/CMC/EDC:NHS, em que foi observado poucas áreas com células em estágio inicial de adesão. Observou-se uma maior população de células sobre a superfície da amostra CB/Col I/LRP, presumindo melhorias no contato célula-célula. Ademais, na plataforma CB/mBMP-7/LRP, foi possível visualizar a presença de pseudópodes citoplasmáticos, sugerindo maior interação com a superfície de CB. A formação de pseudópodes sugere que os peptídeos proporcionam sinais físicos e bioquímicos favoráveis, promovendo adesões focais, extensão do citoplasma e uma resposta celular que favorece eventos biológicos tais como a remodelação tecidual.

Resultados semelhantes foram relatados por Malandain et al., (2023) que demonstraram que a incorporação de nanofibras de CB em matrizes de colágeno promove um microambiente favorável à adesão e ao espalhamento celular, atribuído à combinação entre a nanoarquitetura da CB e os sítios bioativos do colágeno. No estudo, os autores prepararam hidrogéis 3D híbridos em que fibra de CB obtida a partir de pelúculos biossintetizados por *Komagataeibacter xylinus* foi misturada de forma homogênea com colágeno tipo I concentrado extraído de tendões de rato-rabo, resultando em hidrogéis compostos por cerca de 74 % de colágeno (0,70 % w/w) e 26 % de BCf (0,25 % w/w) após ajuste de pH e gelificação térmica a 37 °C, sem uso de agentes reticulantes ou modificadores adicionais. Esses materiais foram preparados por meio da mistura das nanofibras de BC com o pré-gel de colágeno em pH fisiológico, seguida de incubação para gelificação, formando um scaffold 3D estruturalmente reforçado. Como modelo de estudo celular, foram utilizadas células estromais mesenquimais derivadas da medula óssea humana (hBM-MSCs) e fibroblastos humanos, que foram suspensos diretamente no pré-gel antes da gelificação, permitindo uma cultura 3D viável por pelo menos 7 dias. Apesar da presença das nanofibras e da alteração nas propriedades mecânicas, os autores não observaram efeitos adversos no comportamento ou na

viabilidade celular, reforçando que a combinação entre a nanoarquitetura da CB e os sítios bioativos do colágeno cria um ambiente propício para interações célula–matriz em cultivos tridimensionais.

No trabalho de Shi et al. (2012), os autores demonstraram que a incorporação de Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) às matrizes de CB favoreceu significativamente a interação célula–material e a osteogênese in vitro e in vivo. Nesse estudo, a CB foi utilizada como um sistema de liberação localizado para o BMP-2, tendo o fator de crescimento simplesmente sido adsorvido/coated (recoberto) nos scaffolds, sem o uso de processos complexos de conjugação química descritos no artigo, e carregado nas concentrações de 0 a aproximadamente 3 µg de BMP-2 por scaffold, observando-se que a atividade osteogênica, medida por ensaios de atividade de fosfatase alcalina (ALP), aumentou positivamente com a concentração de BMP-2 dentro dessa faixa. As células utilizadas como modelo in vitro foram fibroblastos murinos do tipo C2C12, que, na presença de BMP-2 liberado pelo scaffold de BC, diferenciaram-se em osteoblastos, refletido pelo aumento da expressão de marcadores osteogênicos e da atividade de ALP. Além disso, em estudos de implantação subcutânea em modelo animal, os scaffolds de BC carregados com BMP-2 apresentaram formação óssea significativamente maior e maior concentração de cálcio do que os scaffolds de CB sem BMP-2, evidenciando que a nanoarquitetura tridimensional da BC, em conjunto com a bioatividade do BMP-2, criou um microambiente favorável à âncora e à diferenciação celular osteogênica. Esses resultados sustentam que a funcionalização de scaffolds de CB com proteínas da família BMP pode potencializar a resposta celular osteogênica, reforçando sua aplicabilidade em estratégias de engenharia de tecidos e regeneração óssea.

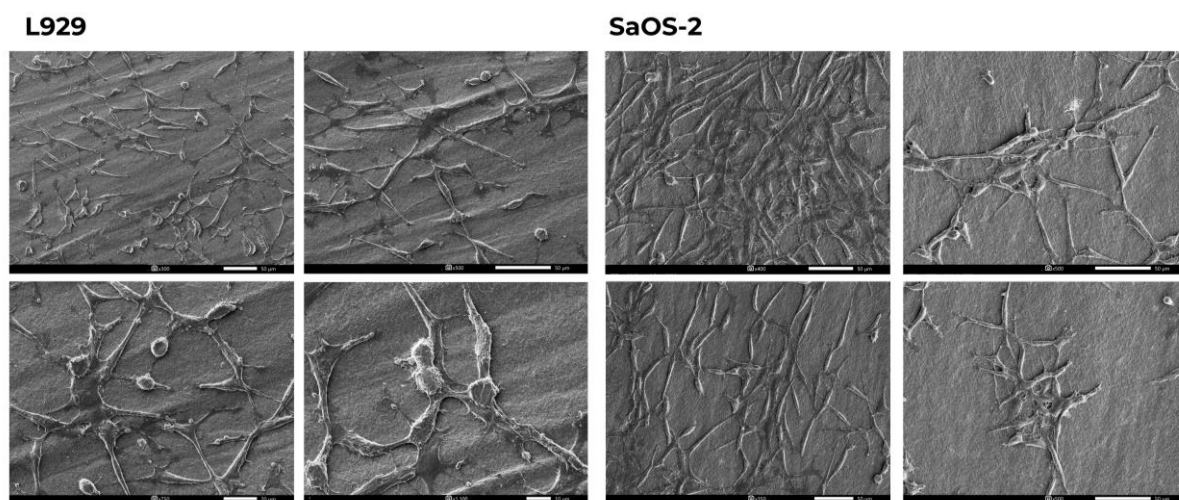


Figura 28. As micrografias das células L929 e SaOS-2 por MEV da amostra CB após 72 horas de incubação.

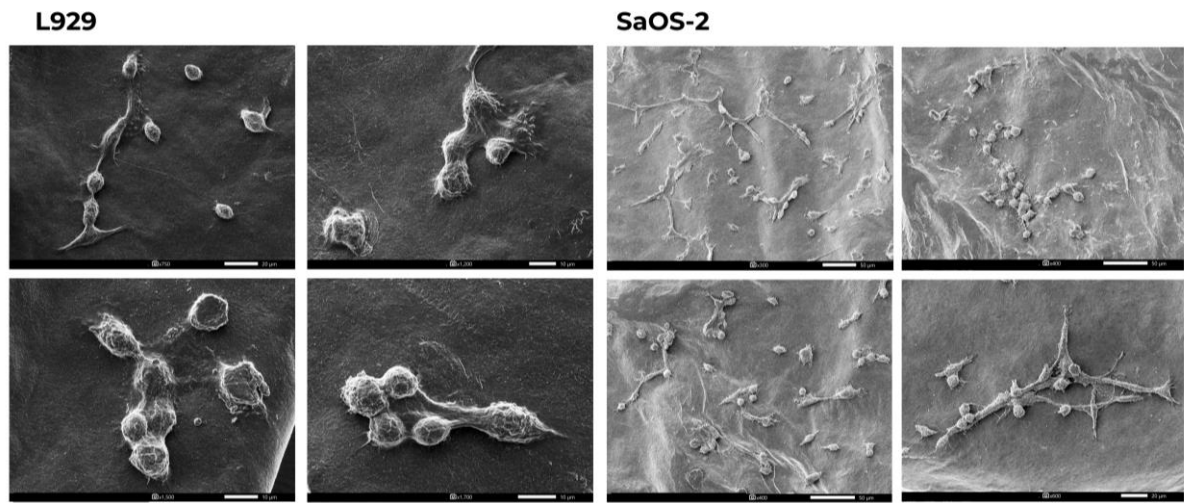


Figura 29. As micrografias das células L929 e SaOS-2 por MEV da amostra CB/CMC/EDC/NHS após 72 horas de incubação.

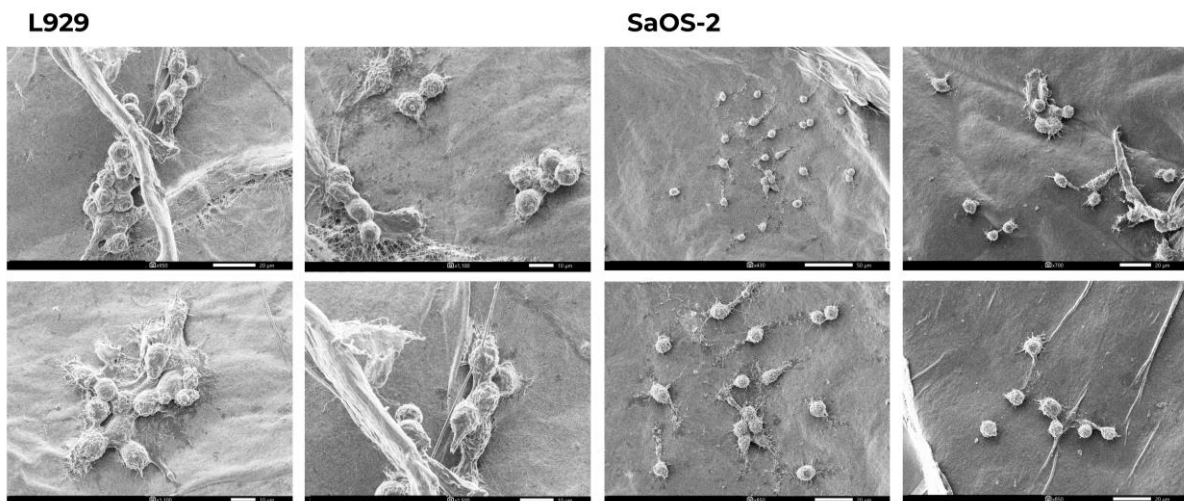


Figura 30. As micrografias das células L929 e SaOS-2 por MEV da amostra CB/Col I/LRP após 72 horas de incubação.

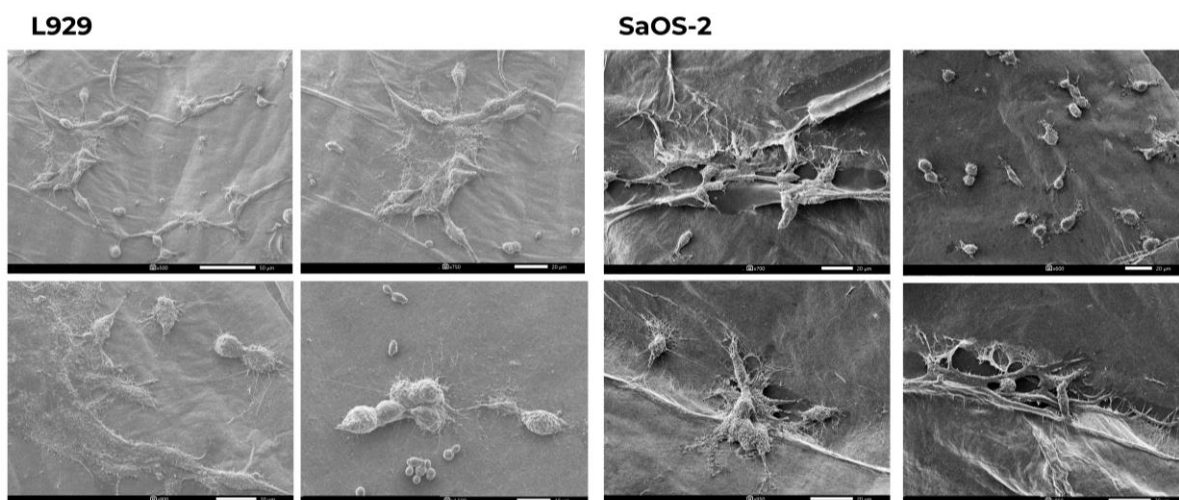


Figura 31. As micrografias das células L929 e SaOS-2 por MEV da amostra CB/mBMP-7/LRP após 72 horas de incubação.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, foi possível concluir que as análises por espectrometria de massas e HPLC confirmaram a correta síntese e purificação dos peptídeos empregados. As análises térmicas evidenciaram uma redução na estabilidade térmica das amostras bifuncionalizadas, atribuída ao aumento do conteúdo orgânico incorporado à matriz da CB. O FT-IR permitiu a identificação dos grupos funcionais característicos da CB, e confirmadas por Raman, corroborando a imobilização dos peptídeos na superfície do material.

As análises de EDS, associadas ao mapeamento químico possibilitaram a identificação dos elementos químicos constituintes. As análises por MEV e AFM mostram que a incorporação de CMC promoveu a formação de um filme homogêneo, resultando em redução da nanorugosidade. Em contraste, a bifuncionalização com peptídeos levou ao aumento da nanorugosidade, indicando alterações topográficas associadas à imobilização molecular na superfície. As medidas de ângulo de contato revelaram aumento nas amostras de CB bifuncionalizadas; entretanto, todas permaneceram hidrofílicas, com valores inferiores a 90° . Paralelamente, observou-se uma redução da tensão/energia superficial, indicando diminuição da contribuição da componente polar da superfície da CB após a funcionalização.

No que se refere às propriedades biológicas, os ensaios demonstraram que todas as sequências peptídicas avaliadas, na faixa de $1 \mu\text{g/mL}$ a $512 \mu\text{g/mL}$, apresentaram hemocompatibilidade. As amostras de CB bifuncionalizadas exibiram adequada citocompatibilidade e um comportamento proliferativo semelhante ao CS, assim como no

ensaio de migração celular. No ensaio de adesão celular as superfícies bifuncionalizadas proporcionaram um microambiente favorável à adesão, com melhora no contato célula-célula e promoção do espriamento celular. De modo geral, os resultados indicam que a funcionalização da CB com sequências peptídicas não compromete a interação célula-material, preservando suas propriedades estruturais, físico-químicas e biológicas. No entanto, embora as plataformas desenvolvidas se mostrem adequadas como suportes para cultivo celular *in vitro*, ainda não foram evidenciadas vantagens biológicas mensuráveis em relação à CB não funcionalizada. Dessa forma, tornam-se necessárias investigações adicionais voltadas à avaliação de respostas celulares mais específicas, como a expressão de colágeno, integrinas e proteínas do citoesqueleto, bem como a quantificação da atividade antimicrobiana, a fim de elucidar de forma mais aprofundada os efeitos funcionais decorrentes da imobilização das sequências peptídicas na superfície da CB.

ANEXO I:

Informações Complementares: deconvolução do pico de decomposição da análise térmica (TG/DTG).

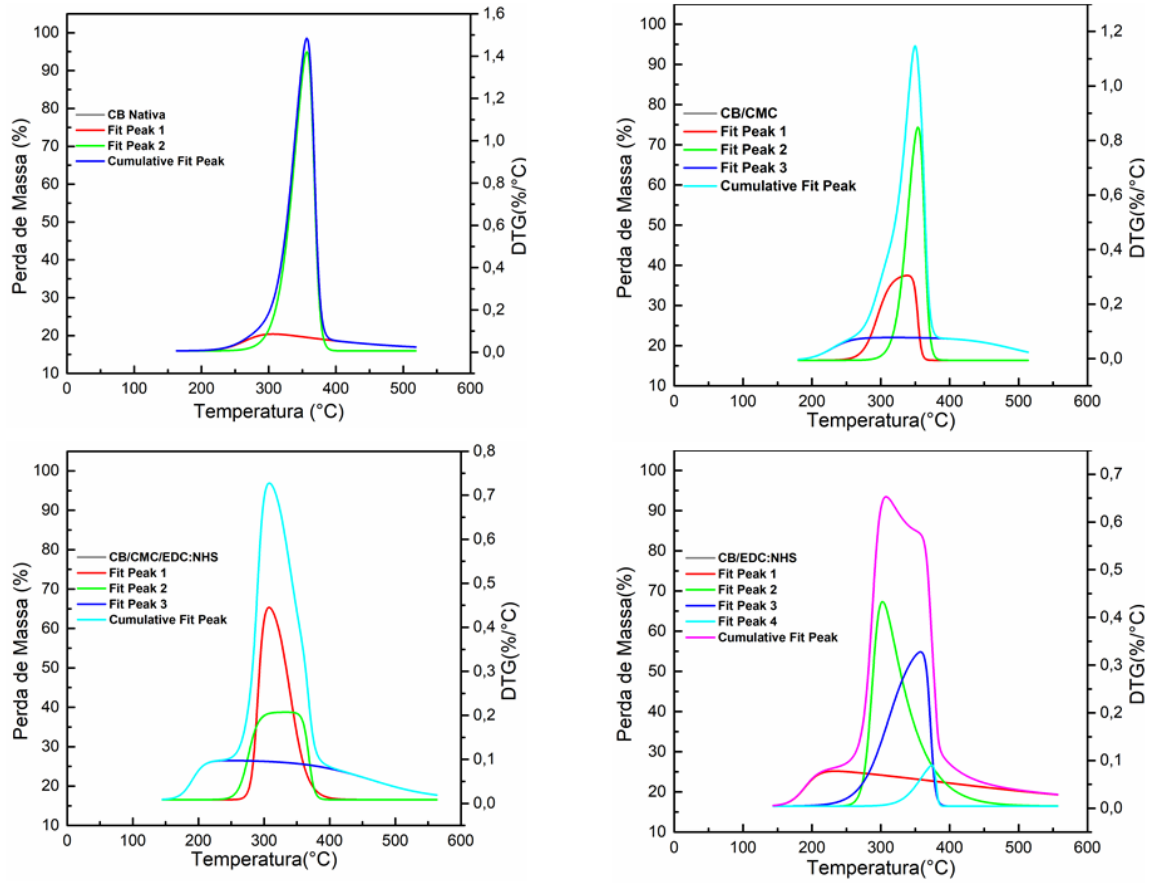


Figura a. Deconvolução dos picos de decomposição da análise térmica das amostras CB nativa, CB/CMC, CB/CMC/EDC:NHS e CB/EDC:NHS.

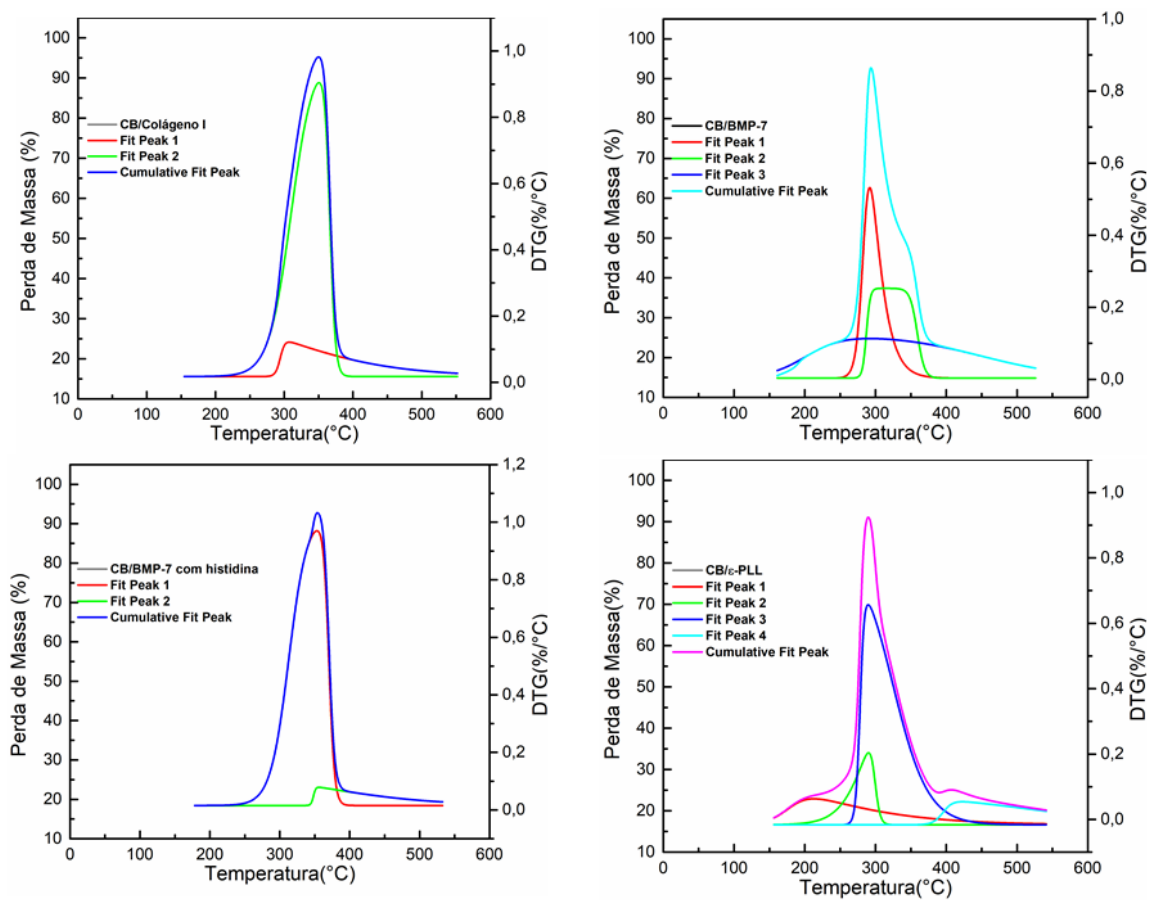


Figura b. Deconvolução dos picos de decomposição da análise térmica das amostras CB nativa, CB/Colágeno I, CB/BMP-7 com e sem histidina e CB/ε-PPL.

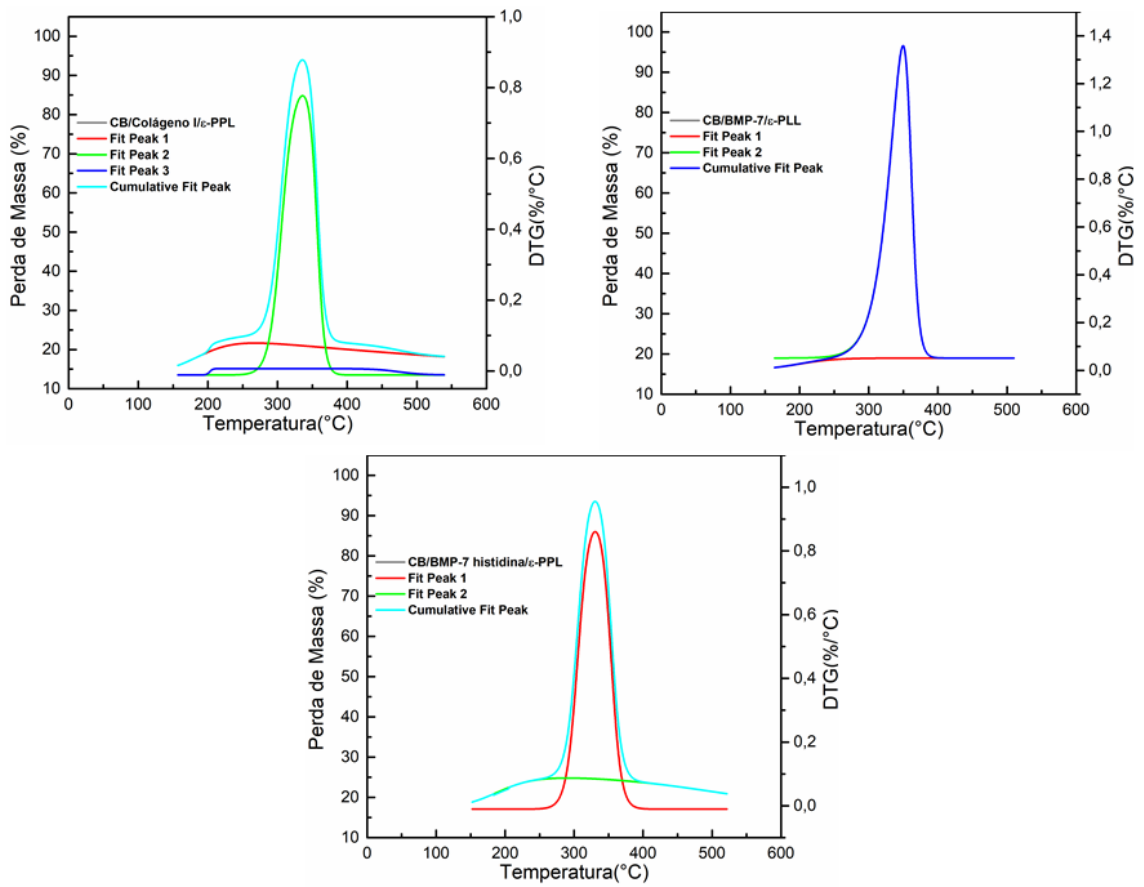


Figura c. Deconvolução dos picos de decomposição da análise térmica das amostras CB nativa, CB/Colágeno I/ CB/ε-PPL, CB/BMP-7 com e sem histidina/ CB/ε-PPL.

Tabela a. Representação da temperatura e perda de massa respectivamente no pico de decomposição.

AMOSTRAS	PICO 1		PICO 2		PICO 3		PICO 4	
CB Nativa	306,7°C	6,99%	356,7°C	66,75%	-	-	-	-
CB/CMC	338,1°C	13,61%	353,9°C	48,25%	320,2°C	3,62%	-	-
CB/CMC/EDC:NHS	306,9°C	44,19%	326,5°C	18,15%	247°C	8,24%	-	-
CB/EDC:NHS	223,2°C	4,24%	302,2°C	50,30%	357,5°C	15,10%	373,9°C	4,94%
CB/COLÁGENO I	306,4°C	14,32%	350,3°C	61,23%	-	-	-	-
CB/BMP-7 HISTIDINA	353,1°C	63,64%	355,3°C	7,37%	-	-	-	-
CB/ε-PPL	212,4°C	8,90%	290°C	19,59%	289,2°C	34,94%	418,6°C	4,03%
CB/BMP-7	291,9°C	53,8%	318,2°C	7,87%	289,7°C	3,87%	-	-
CB/COLÁGENO I/ ε-PPL	269,6°C	14,47%	366°C	54,86%	328°C	1,20%	-	-
CB/BMP-7 HISTIDINA/ε-PPL	330,9°C	63,34%	290,8°C	7,23%	-	-	-	-
CB/BMP-7/ε-PPL	-	2,90%	349,7°C	70,18%	-	-	-	-

CAPÍTULO 2:

ESTÁGIO DE PESQUISA NO EXTERIOR (BEPE)

Desenvolvimento de uma plataforma *Janus* baseada em celulose bacteriana/acetato de celulose funcionalizada com peptídeos miméticos de colágeno tipo I para regeneração tecidual

Orientador Exterior: Prof. Pedro Fardim (Ku Leuven-Bélgica)

Araraquara, SP

2026

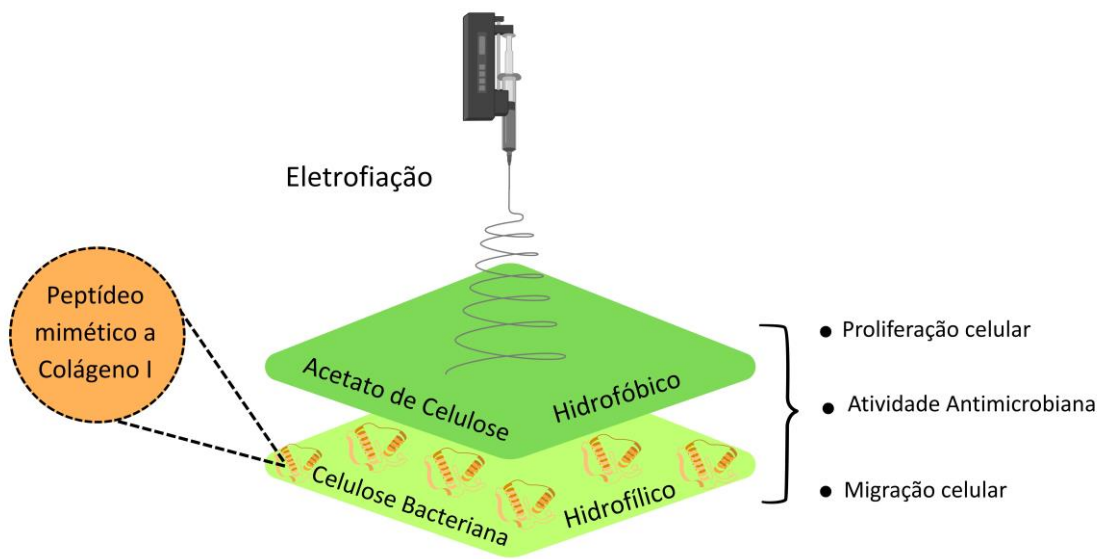
RESUMO: As membranas tradicionais de estrutura única frequentemente carecem da versatilidade funcional necessária para atender às complexas demandas das aplicações clínicas. Inspiradas na molhabilidade única da folha de lótus, as membranas *Janus*, caracterizadas por uma arquitetura de dupla face com propriedades opostas, estão ganhando crescente interesse devido às suas funcionalidades de superfície assimétricas. Embora amplamente exploradas em aplicações químicas, como autolimpeza, separação seletiva e transporte de fluidos, seu potencial biomédico permanece em grande parte inexplorado. Neste estudo, propõe-se um novo arcabouço *Janus* composto por nanocelulose bacteriana (CB) e uma camada de acetato de celulose (AC) obtida por eletrofiação, exibindo propriedades físico-químicas distintas voltadas para a regeneração tecidual. A fase CB proporciona uma estrutura altamente porosa, biocompatível e mecanicamente robusta, enquanto a camada de AC confere permeabilidade controlada e integridade estrutural aprimorada. Além disso, a funcionalização da superfície da CB com peptídeos miméticos de colágeno tipo I favorece a adesão celular, a regularidade e a deposição da matriz extracelular, criando um microambiente biomimético propício ao reparo tecidual. Essa arquitetura de dupla função permite a migração celular direcional, a difusão controlada de nutrientes e o transporte molecular seletivo, superando as especificações associadas à formação de andaimes. Com base nos resultados parciais obtidos nesse projeto, a síntese e a purificação do peptídeo mimético de colágeno tipo I foram realizadas com sucesso, conforme confirmado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e espectrometria de massa com ionização por electrospray (ESI-MS). Os perfis de HPLC mostraram picos bem definidos e simétricos com um tempo de retenção estável (11,6 min), indicando a remoção eficiente de subprodutos da síntese e alta pureza do peptídeo, enquanto a análise por ESI-MS confirmou a massa molar e os estados de carga esperados (+1 e +2), validando a integridade química da sequência sintetizada. O processo de eletrofiação ocorreu de forma satisfatória, resultando na formação de fibras 3D, conforme observado por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A análise FT-IR permitiu a identificação de grupos funcionais do CB por meio de bandas de absorção, bem como amidas I (C=O) e II, associadas ao dobramento N-H e ao estiramento C-N e C-O-C. O espectro ATR-FTIR da face superior (camada fibrosa do AC) exibe bandas de absorção características do AC; estas incluem o estiramento assimétrico C-O-C em aproximadamente 1050 cm⁻¹, o estiramento glicosídico C-O-C em 1159 cm⁻¹, a vibração de estiramento C=O do éster acetato em torno de 1750 cm⁻¹ e a vibração de estiramento C-O da ligação éster em aproximadamente 1230 cm⁻¹. A análise do ângulo de contato revelou diferenças claras na molhabilidade da superfície entre as amostras. A CB exibiu um ângulo de contato de superfície hidrofílico (46° ± 17,5°), confirmando sua superfície intrinsecamente hidrofílica, que aumenta a adesão celular. Após a imobilização do peptídeo de colágeno tipo I, o aumento no ângulo de contato (84° ± 5,97° no tempo 0) demonstra uma alteração nas propriedades da superfície. Por outro lado, as camadas de fibras de AC eletrofiadas em 3D exibiram uma superfície hidrofóbica (126° ± 4,26°) com 15% de AC, enquanto o aumento da concentração de AC para 20% resultou em uma superfície hidrofílica, com um ângulo de contato de 67° ± 16,6°. Esses resultados indicam que o grau de substituição (DS), associado à concentração do polímero, governa a formação, o diâmetro e o arranjo espacial das fibras, afetando, em última análise, as propriedades da superfície. Essas diferenças são atribuídas a variações na morfologia e porosidade das fibras, associadas à concentração do polímero durante a eletrofiação, que influenciam significativamente a rugosidade da superfície e, conseqüentemente, a molhabilidade. Ensaios biológicos in vitro, incluindo testes de citotoxicidade e adesão celular, demonstraram que o *Janus* CB-Col I-AC não apresentou efeito citotóxico contra a linhagem celular de fibroblastos L929, exibiu resposta de proliferação celular sem diferença significativa em comparação ao controle e alta capacidade de adesão celular. A amostra CB-Col I promoveu melhor adesão, contato célula-célula e espalhamento celular. No entanto, os ensaios de adesão microbiana indicaram a presença de *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, o que pode ser atribuído ao fato de as superfícies eletrofiadas não possuírem as características de superfícies super-hidrofóbicas. Portanto, como perspectiva para trabalhos futuros, propõe-se o uso de diferentes concentrações e graus de acetilação do AC, proporcionando uma superfície super-hidrofóbica, potencialmente capaz de reduzir a adesão microbiana e expandir a aplicabilidade da plataforma *Janus* na regeneração tecidual guiada, cicatrização de feridas e propriedades antimicrobianas.

Palavras chaves: celulose bacteriana, peptídeo mimético de colágeno tipo I, filme *janus*, eletrofiação, acetato de celulose.

ABSTRACT: Traditional single-structure membranes often lack the functional versatility required to address the complex demands of clinical applications. Inspired by the unique wettability of the lotus leaf, Janus membranes, characterized by a double-sided architecture with opposing properties, are gaining increasing appeal due to their asymmetrical surface functionalities. Although widely explored in chemical applications such as self-cleaning, selective separation, and fluid transport, their biomedical potential remains largely untapped. In this study, a novel Janus scaffold composed of bacterial nanocellulose (BNC) and a cellulose acetate (CA) layer obtained by electrospinning was proposed, exhibiting distinct physicochemical properties aimed at tissue regeneration. The BNC phase provides a highly porous, biocompatible, and mechanically robust structure, while the CA layer confers controlled permeability and enhanced structural integrity. Furthermore, the functionalization of the BNC surface with type I collagen mimetic peptides favors cell adhesion, regularity, and extracellular matrix deposition, creating a biomimetic microenvironment conducive to tissue repair. This dual-function architecture enables directional cell migration, controlled nutrient diffusion, and selective molecular transport, overcoming specifications associated with scaffolding specifically. Based on the partial results obtained, the synthesis and purification of the type I collagen mimetic peptide were successfully achieved, as confirmed by high-performance liquid chromatography (HPLC) and electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). HPLC profiles showed well-defined and symmetrical peaks with a stable retention time (11.6 min), indicating efficient removal of synthesis byproducts and high peptide purity, while ESI-MS analysis confirmed the expected molar mass and charge states (+1 and +2), validating the chemical integrity of the synthesized sequence. The electrospinning process occurred satisfactorily, resulting in 3D fiber formation, as observed by scanning electron microscopy (SEM). FT-IR analysis allowed the identification of BNC functional groups through absorption bands, as well as amides I (C=O) and II, associated with N-H folding and C-N and C-O-C stretching. The ATR-FTIR spectrum of the upper face (fibrous layer of CA) exhibits absorption bands characteristic of CA; these include the asymmetric C-O-C stretching at approximately 1050 cm^{-1} , the C-O-C glycosidic stretching at 1159 cm^{-1} , the C=O stretching vibration of the acetate ester around 1750 cm^{-1} , and the C-O stretching vibration of the ester linkage at approximately 1230 cm^{-1} . Contact angle analysis revealed clear differences in surface wettability between the sample. The cell membrane (BNC) exhibited a hydrophilic surface contact angle ($46^\circ \pm 17.5^\circ$), confirming its intrinsically hydrophilic surface, that enhance cell adhesion. After immobilization of type I collagen peptide, the increase in the contact angle ($84^\circ \pm 5.97^\circ$ at time 0) demonstrates a change in surface properties. On the other hand, the 3D electrospun CA fiber layers exhibited a hydrophobic surface ($126^\circ \pm 4.26^\circ$) at 15% CA, whereas increasing the CA concentration to 20% resulted in a hydrophilic surface, with a contact angle of $67^\circ \pm 16.6^\circ$. These findings indicate that the degree of substitution (DS), associated with polymer concentration, governs fiber formation, diameter, and spatial arrangement, ultimately affecting the surface properties. These differences are attributed to variations in fiber morphology and porosity, associated with polymer concentration during electrospinning, which significantly influence surface roughness and, consequently, wettability. In vitro biological assays, including cytotoxicity, and cell adhesion tests, demonstrated that Janus BNC-Col I- CA showed no cytotoxic effect against the L929 fibroblast cell line, exhibited cell proliferation response with no significant difference compared to the control and high cell adhesion capacity, the sample BNC-Col I promoted better adhesion, cell-to-cell contact, and cell spreading. However, microbial adhesion assays indicated presence of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*, which may be attributed to the fact that electrospun surfaces do not possess the characteristics of superhydrophobic surfaces. Therefore, as a perspective for future work, the use of different concentrations and degree of acetylation of CA is proposed providing a superhydrophobic surface, potentially capable of reducing microbial adhesion and expanding the applicability of the Janus platform in guided tissue regeneration, wound healing, and antimicrobial properties.

Keywords: bacterial cellulose, collagen type I mimetic peptide, Janus film, electrospinning, cellulose acetate.

RESUMO GRÁFICO



LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Os espectros FTIR/ATR no modo de absorvância foram adquiridos para as diferentes amostras de CB, incluindo CB nativa, AC, CB/Col I, CB/Col I/15% AC e CB/Col I/20% AC em ambas as fases.....103
- Figura 2.** Microscopia eletrônica de varredura. (A) AC eletrofiada a 15%; (B) seção transversal e (C) CB/Col I.....104
- Figura 3.** Microscopia eletrônica de varredura. (A) AC eletrofiada a 20%; (B) seção transversal e (C) CB/Col I.....104
- Figura 4.** Distribuição do diâmetro das fibras das amostras de AC eletrofiadas a 15% e 20% (m/v), determinada a partir da medição de 20 fibras para cada amostra.....104
- Figura 5.** Medições do ângulo de contato com água de: CB nativa, CB/Col I e CB/Col I revestido com AC eletrofiado (15% e 20% p/v). As medições foram registradas durante um período de 0 a 60 segundos para avaliar a molhabilidade da superfície e as alterações temporais na hidrofobicidade/hidrofobicidade.....106
- Figura 6.** Índice de intumescimento (%) das amostras CB, CB/Col I, CB/Col I/15% AC e CB/Col I/20% AC em função do tempo. De 1 hora a 48 horas em PBS a pH 7,4 e 37 °C.....108
- Figura 7.** Ensaio de viabilidade celular com o reagente colorimétrico resazurina. Porcentagem de viabilidade celular de células L929.....109
- Figura 8.** Ensaio de proliferação celular com o reagente colorimétrico resazurina.....110
- Figura 9.** Ensaio de adesão celular em (A) CB; (B) CB/CMC/EDC/NHS; (C) CB/Col I; (D) 15% AC e (E) 20% AC.....111
- Figura 10.** Ensaio de adesão avaliando a fixação de *C. albicans* a: (A) CB; (B) CB/CMC/EDC/NHS; (C) CB/Col I; (D) 15% AC e (E) 20% AC.....112
- Figura 11.** Ensaio de adesão avaliando a fixação de *S. aureus* a: (A) CB; (B) CB/CMC/EDC/NHS; (C) CB/Col I; (D) 15% AC e (E) 20% AC.....112

1. INTRODUÇÃO

A cicatrização de feridas é um processo fisiológico natural que envolve a reparação, restauração e regeneração de tecidos ou células da pele danificados por lesões ou traumas externos. A crescente incidência de feridas crônicas ou de difícil cicatrização tem impulsionado o desenvolvimento de materiais avançados para curativos, projetados para aplicações em engenharia de tecidos. A demanda por produtos terapêuticos com características multifuncionais na engenharia de tecidos tem sido amplamente destacada na pesquisa de biomateriais (XU & KIRCHNER, 2021). Esses curativos atuam como análogos estruturais da matriz extracelular (ECM), oferecendo um substrato de suporte que promove a migração e proliferação celular ao longo do processo de cicatrização. Diversos métodos de fabricação, como moldagem, eletrofiação e liofilização para criação de esponjas, podem ser utilizados na produção desses materiais.

1.1. Técnica de Eletrofiação na engenharia de tecidos utilizando biopolímero

A eletrofiação (*electrospinning*) tem se destacado como uma técnica fundamental na engenharia de tecidos devido à sua capacidade de fabricar fibras ultrafinas com alta razão superfície-volume, utilizando equipamentos relativamente simples e de baixo custo (FORMHALS, 1934; RENEKER *et al.*, 1996). Além disso, a técnica é amplamente aplicável a uma variedade de polímeros, tanto naturais quanto sintéticos, e permite o controle preciso de parâmetros como diâmetro das fibras, organização (aleatória ou alinhada), porosidade e topografia, por meio de ajustes sistemáticos das condições de processamento e das propriedades da solução polimérica (DEITZEL *et al.*, 2001; RAMAKRISHNA *et al.*, 2005).

O processo de eletrofiação consiste na produção de nanofibras a partir de um polímero fundido ou de uma solução polimérica eletricamente carregada. Conforme destacado por Haas *et al.* (2010), essa técnica é capaz de gerar fibras com diâmetros variando de 10 μm a 10 nm. O sistema de deposição é composto por três componentes principais: (i) uma fonte de corrente contínua (CC) de alta voltagem, que aplica um campo elétrico ao fluido polimérico; (ii) um sistema de infusão, geralmente uma bomba de seringa, que extrusa a solução polimérica através de uma agulha com ponta cortada perpendicularmente; e (iii) um coletor condutor, comumente de cobre ou alumínio, que serve como substrato para a deposição das fibras. Uma das principais vantagens da eletrofiação é a capacidade de gerar nanofibras diretamente a partir de soluções poliméricas, sendo aplicável a uma ampla variedade de materiais, incluindo polímeros sintéticos e naturais, como proteínas estruturais e polissacarídeos. Além disso, a

técnica permite copolimerização e formação de blendas poliméricas pela incorporação de outros componentes solúveis, como óleos essenciais, agentes farmacêuticos, fatores de crescimento celular e resinas. Essa versatilidade possibilita o desenvolvimento de arquiteturas fibrilares com propriedades ajustáveis, como controle de diâmetro, morfologia, topografia de superfície (PAPENBURG *et al.*, 2011) e porosidade (RAMAKRISHNA *et al.*, 2005).

O acetato de celulose (AC) é um derivado da celulose obtido por meio da acetilação parcial ou total dos grupos hidroxila da cadeia de glicose. Essa modificação química confere propriedades físico-químicas distintas da celulose nativa, incluindo maior solubilidade em solventes orgânicos, transparência, biodegradabilidade e resistência mecânica (HEINZE *et al.*; FISCHER *et al.*, 2008). Devido à sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, o CA é amplamente utilizado na área biomédica, particularmente no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos (KHOSHNEVISAN *et al.*, 2018), aplicações em engenharia de tecidos (XIA *et al.*, 2013) e curativos para cicatrização aprimorada (BALAKRISHNAN *et al.*, 2005). Além disso, sua solubilidade em solventes orgânicos facilita o processamento por eletrofiação, permitindo a fabricação de nanofibras com diâmetros precisamente controlados e diversas morfologias (RAMANATHAN *et al.*, 2020).

1.2. Plataformas *Janus*: conceito e aplicação em biomateriais

A denominação *Janus* deriva do deus romano de duas faces, que observa simultaneamente duas direções opostas. Inspirado nesse conceito, materiais *Janus* são sistemas compostos por duas superfícies distintas e funcionalmente independentes dentro de uma mesma estrutura. Em biomateriais, essa configuração permite integrar duas funcionalidades que atuam de maneira complementar, criando um material híbrido capaz de responder a diferentes demandas biológicas ou ambientais sem comprometer a eficácia de cada componente.

No contexto de curativos e engenharia de tecidos, uma plataforma *Janus* geralmente apresenta uma face hidrofílica e outra hidrofóbica, cada uma desempenhando funções específicas no processo de cicatrização. A face hidrofílica favorece a interação direta com o tecido, promovendo absorção de exsudato, adesão celular e troca gasosa. Já a face hidrofóbica funciona como barreira protetora, evitando contaminação externa e reduzindo o risco de infecção (LUPASCU *et al.*, 2022). Essa separação de funções dentro de um único dispositivo torna os materiais *Janus* altamente eficientes em situações clínicas complexo, como feridas exsudativas ou com risco de contaminação. Outra característica fundamental das plataformas

Janus é sua versatilidade de fabricação. Técnicas como eletrofição, laminação e deposição de filmes permitem a combinação de diferentes materiais, como neste trabalho, um peptídeo mimético de colágeno tipo I foi incorporado à CB e eletrofiado com AC para formar um filme do tipo *Janus*, que pode ser utilizado como material para curativos de feridas (RAMAKRISHNA *et al.*, 2006). A matriz bioativa (CB/Peptídeo Colágeno tipo I) é projetada para melhorar a absorção do exsudado da ferida, promover adesão celular e oferecer proteção às células, enquanto a porção eletrofiada de AC atua como agente antimicrobiano (DAYEM *et al.*, 2023). Essa flexibilidade possibilita que cada face seja otimizada para desempenhar funções distintas, como suporte estrutural, liberação controlada de fármacos, adesão celular e proteção contra o ambiente externo.

Nesse contexto, o presente projeto teve como objetivo desenvolver uma plataforma *Janus* composta por duas matrizes distintas: um lado hidrofóbico constituído por AC eletrofiado e um lado hidrofílico composto por um filme de CB funcionalizado com peptídeos miméticos de colágeno tipo I. Essa plataforma foi avaliada quanto às suas propriedades físico-químicas e biológicas para investigar seu potencial de aplicação na engenharia de tecidos.

2. OBJETIVO GERAL

Este estágio de pesquisa no exterior teve como objetivo desenvolver uma estrutura *Janus* combinando de CB bioativa funcionalizada com um peptídeo mimético de colágeno tipo I e uma camada de acetato de celulose eletrofiada. O sistema integrou bioatividade, permeabilidade seletiva e estabilidade estrutural, promovendo a adesão celular, a deposição da matriz extracelular e a permeabilidade controlada para aplicações em regeneração tecidual.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Funcionalização do filme de CB com a sequência peptídica

Os filmes de CB foram produzidos no laboratório BioPolMat em Araraquara. A cepa AF1 (*Komagataeibacter rhaeticus*) foi cultivada em meio de cultura estático em placas de 24 poços por 96 horas a 28°C, seguindo a seguinte composição nutricional: 2% (m/v) de glicose, 0,5% (m/v) de peptona, 0,5% (m/v) de extrato de levedura, 0,27% (m/v) de fosfato dissódico anidro e 0,115% (m/v) de ácido cítrico monohidratado. Posteriormente, as membranas de CB foram submetidas a tratamento químico com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M por 30 minutos a 70°C e, em seguida, lavadas extensivamente com água destilada até atingir pH neutro. A incorporação de sequências peptídicas na membrana de CB foi investigada por

imobilização covalente utilizando EDC:NHS, com base nos protocolos apresentados por HERMANSON (2013) e CHIMONIDES et al. (2013).

3.2. Eletrofição de AC sobre matriz de CB com peptídeos

O acetato de celulose (AC; DS \approx 2,4-2,5) foi obtido da Sigma-Aldrich (nº de catálogo 180955). Diferentes concentrações de soluções poliméricas de AC foram preparadas dissolvendo-se 1,5 e 2 g de AC em 10 mL de acetona e dimetilacetamida (DMAc) na proporção de 2:1, respectivamente, sob agitação constante por 12 h até que a mistura se tornasse límpida e viscosa. Essas soluções uniformes de AC (15 e 20% (m/v)) foram eletrofiadas sobre um substrato bioativo de CB, posicionado a uma distância de 15 cm perpendicularmente à agulha 21G conectada ao terminal positivo de uma fonte de alimentação CC de alta tensão (aparelho de eletrofição E-Fiber EF300, SKE Research Equipment). O procedimento experimental seguiu o protocolo previamente relatado por Ramanathan et al. (2020), com pequenas modificações. As nanofibras eletrofiadas foram produzidas na KU Leuven (Leuven, Bélgica), utilizando um aparelho de eletrofição ESPIN-NANO equipado com uma agulha 24G.

3.3. Análises de FTIR, MEV e ângulo de contato.

A matriz de dupla camada foi caracterizada por FTIR para identificar qualquer formação ou alteração nos grupos funcionais. As medições espectrais foram realizadas com resolução de 4 cm^{-1} na faixa de frequência de 4000 a 400 cm^{-1} utilizando um espectrômetro FTIR Bruker, Alpha 2. A morfologia superior, inferior e transversal das matrizes bicamadas fabricadas foi analisada por MEV (microscópio eletrônico de varredura, modelo JEOL Z-Axis). As amostras foram revestidas com uma fina camada de Pt/Au por 30 segundos a 30 mA para torná-las condutoras. Medições estáticas do ângulo de contato com a água foram realizadas para investigar a hidrofobicidade das matrizes nanofibrosas eletrofiadas. Água deionizada ultrapura ($10\text{ }\mu\text{L}$) foi gotejada usando uma microsseringa na superfície das matrizes secas, e o ângulo de contato foi medido pelo método da gota séssil à temperatura ambiente usando um medidor de ângulo de contato Attension Theta Flex (Biolin Scientific). O processo foi repetido em três pontos por amostra e as imagens capturadas foram analisadas usando um software com interface para computador.

3.4. Análise de intumescimento

A capacidade de intumescimento da plataforma *Janus* foi determinada imergindo a amostra em solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,4) a 37 °C. Em intervalos de tempo predeterminados, a amostra inchada foi retirada, suavemente seca com papel de filtro para remover o excesso de líquido superficial e pesada usando uma microbalança analítica. A porcentagem de inchaço (Sw%) da plataforma *Janus* foi então calculada usando a seguinte equação: (RAMANATHAN *et al.*, 2020).

$$Sw(\%) = \frac{W_s - W_o}{W_o} \times 100$$

Onde W_s representa o peso da plataforma *Janus* no equilíbrio de inchaço para cada intervalo de tempo, e W_o representa seu peso seco inicial.

3.5. Ensaio de Citotoxicidade

Para o ensaio de citotoxicidade, utilizou-se fibroblastos murino derivados de tecido conjuntivo (L929) adquiridos da ATCC (*American Type Culture Collection*). Inicialmente, as células foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e antibióticos (penicilina 100 U/mL; estreptomicina 0,1 mg/mL), com posterior incubação em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após 2 repiques consecutivos, iniciou-se o ensaio de citotoxicidade, empregando uma concentração de 1x10⁴ células/poço, que foram incubadas em placa de 96 poços. A placa foi mantida por 24 h em incubadora, respeitando os mesmos parâmetros de temperatura e porcentagem de CO₂ descritos anteriormente. Paralelamente ao plaqueio das células, os tratamentos foram preparados de acordo com a ISO 10993-12. Para tal, 1 cm² de cada material foi disposto em tubo cônico com posterior esterilização em radiação UV por 30 minutos. Em seguida, foi feita a adição de 3 mL de meio de cultura (DMEM + 10% de soro fetal bovino). Os filmes em contato com o meio foram deixados sob agitação por 24 horas a 37°C. Com o término das 24 h de plaqueamento das células, avaliou-se o estabelecimento da monocamada com o auxílio de microscópio, e em seguida, o meio de cultura foi retirado e os eluatos oriundos de cada amostra foram adicionados sobre a monocamada celular, respeitando o volume de 200 uL/poço, seguido da incubação em estufa de CO₂ por mais 24 h. Decorrido as 24 h de tratamento, os eluatos foram removidos, seguido da lavagem com

Phosphate Buffer Saline (PBS) por duas vezes consecutivas. Finalizado essa etapa, 100 µL de resazurina foram adicionados em cada poço. A placa foi novamente incubada a 37°C, ao abrigo da luz, por 4h. Finalizado o período de incubação, a resazurina foi retirado dos poços. Os valores de absorvância (Abs) foram obtidos em espectrofotômetro de microplacas (SoftMax® Pro 5), com leitura em comprimento de onda a 560 nm. Como controle de sobrevivência (controle negativo), as células foram tratadas com DMEM + 10% SFB. Os experimentos foram conduzidos em triplicata, em três ensaios independentes, incluindo os controles (MOSMANN *et al.*, 1983). Com os valores de Abs, calculou-se a média da porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle de sobrevivência (100%), conforme apresentado pela equação abaixo (norma ISO 10993-5):

$$\frac{(Abs\ da\ amostra - Abs\ branco)}{(Abs\ do\ controle\ de\ sobrevivência - Abs\ branco)} \times 100$$

3.6. Ensaio de Proliferação celular

Inicialmente, as células L929 foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e antibióticos (penicilina 100 U/mL; estreptomicina 0,1 mg/mL), com posterior incubação em estufa a 37°C e 5% de CO₂. A proliferação celular foi avaliada pelo ensaio de resazurina, com as células cultivadas diretamente sobre as superfícies dos materiais. Antes do ensaio, as amostras foram cortadas em seções de 1 cm², esterilizadas por exposição à radiação UV por 30 min em cada lado e colocadas em placas de cultura de 24 poços (ISO 10993-12). As células foram semeadas diretamente sobre os materiais na concentração de 0,5 x 10⁴ células/poço em meio de cultura completo e incubadas a 37 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. Como controle, as células foram cultivadas em poços sem material. O meio de cultura foi trocado a cada 24 h durante todo o experimento. A atividade metabólica celular, utilizada como indicador indireto de proliferação, foi avaliada após 24, 48, 72 e 168 horas de cultura. Em cada ponto de tempo experimental, o meio foi removido e substituído por uma solução de resazurina preparada em meio de cultura (10% v/v). As amostras foram incubadas por 3 a 4 horas a 37 °C, protegidas da luz. Após a incubação, alíquotas do sobrenadante foram transferidas para uma placa de 96 poços e a absorvância foi medida a 570 nm. Os experimentos foram conduzidos em triplicata, em três ensaios independentes,

incluindo os controles (DORM *et al.*, 2022). Utilizando os valores de absorvância, a taxa de proliferação celular foi calculada, conforme mostrado pela equação abaixo (ISO 10993-5):

$$\frac{(Abs\ da\ amostra - Abs\ branco)}{(Abs\ do\ controle\ de\ sobrevivência)} \times 100$$

3.7. Ensaio de Adesão Celular

Para os estudos de adesão celular foram utilizadas a mesma linhagem celular (L929) descrita anteriormente. Primeiro, as células (5×10^4 células/poço) foram semeadas nos filmes (1cm^2) inseridos na placa de 24 poços e cultivadas durante 72 horas a 37°C com 5% de CO_2 . No final da incubação, o meio foi removido e as células foram lavadas com PBS 0,01 M filtrado estéril a pH 7,4. Em seguida, as células foram fixadas com glutaraldeído a 3% em PBS 0,01 M durante 0,5 h à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS 0,01 M, as amostras foram desidratadas através de uma série ascendente de etanol (30%, 50%, 70% e 95%, 3 min cada) com uma incubação final em etanol 100% por 3 min (repetido 2 vezes). As amostras secas foram revestidas por pulverização catódica para gerar uma camada de carbono de 10 nm. As amostras foram examinadas com um microscópio eletrônico de varredura (JSM-IT500HR, JEOL) usando uma distância de trabalho de 8 mm e uma tensão de aceleração de 5 kV (PASCHOALLIN *et al.*, 2017).

3.8. Ensaio de adesão microbiana

Para avaliar a adesão bacteriana, a plataforma *Janus* desenvolvida foi avaliada utilizando um ensaio de adesão microbiana, seguindo a metodologia relatada por Hu *et al.* (2024). As superfícies de AC eletrofiadas (15% e 20%, p/v) da plataforma *Janus* (1 cm^2) foram expostas a suspensões microbianas de *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (10^8 UFC mL^{-1}). Aliquotas de 500 μL foram adicionadas a cada amostra, seguidas de incubação a 37°C por 4 h. Posteriormente, a fixação da amostra, a desidratação, a metalização por pulverização catódica e a análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas de acordo com o protocolo descrito na Seção 3.3.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Espectros de FTIR

As análises ATR-FTIR foram realizadas em ambas as interfaces da plataforma *Janus* desenvolvida, com o lado superior correspondendo à camada fibrosa de AC eletrofiada e o lado inferior correspondendo ao CB funcionalizado com peptídeo de colágeno tipo I.

Para a interface do lado inferior (CB/peptídeo Col I), os espectros de absorvância exibiram bandas em 1654 e 1638 cm^{-1} , atribuídas às vibrações de estiramento C=O (carbonila) de grupos amida, predominantemente associadas a ligações peptídicas (amida I). Além disso, bandas na região de 1550–1542 cm^{-1} foram observadas e atribuídas à flexão N–H acoplada às vibrações de estiramento C–N, características da amida II. Essas descobertas são consistentes com as relatadas por Riaz et al. (2018), que identificaram bandas semelhantes de amida I e II em materiais contendo peptídeo de colágeno tipo I.

Alterações na intensidade da banda em 1000 e 982 cm^{-1} , relacionadas às vibrações de estiramento C–O–C e deformação C–H, respectivamente, também foram observadas, juntamente com um deslocamento da banda em 1053 cm^{-1} associada às vibrações de estiramento C–O–C. Além disso, bandas vibracionais correspondentes à formação da ligação éster ($\text{R}_1\text{–COO–R}_2$) foram detectadas nas regiões de 1730–1725 cm^{-1} e 1250–1240 cm^{-1} . Essas bandas são atribuídas à carboximetilcelulose (CMC), usada para introduzir grupos carboxila na superfície do CB, facilitando assim a incorporação de moléculas bioativas. Características espectrais semelhantes foram relatadas por Mansur et al. (2023).

Para a camada superior (camada fibrosa de AC), o espectro ATR-FTIR exibiu bandas de absorção características, incluindo o estiramento assimétrico C–O–C em aproximadamente 1050 cm^{-1} , o estiramento glicosídico C–O–C em 1159 cm^{-1} , a vibração de estiramento C=O do grupo éster acetato em torno de 1750 cm^{-1} e a vibração de estiramento C–O da ligação éster em aproximadamente 1230 cm^{-1} . Esses resultados foram consistentes com os relatados por Ramanathan et al. (2017).

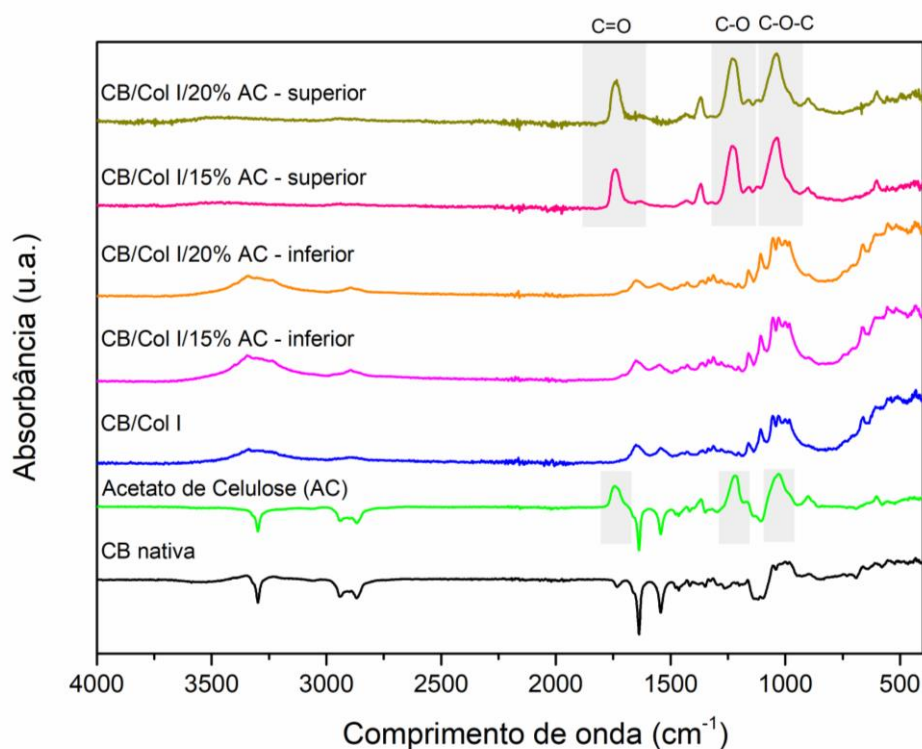


Figura 1. Os espectros FTIR/ATR no modo de absorvância foram adquiridos para as diferentes amostras de CB, incluindo CB nativa, AC, CB/Col I, CB/Col I/15% AC e CB/Col I/20% AC em ambas os lados.

4.2. Análises por Microscopia Eletrônica de Varredura

Micrografias mostraram a formação de fibras contínuas de AC, confirmando o sucesso do processo de eletrofiação nas condições aplicadas (15% p/v e 20% p/v em um sistema acetona/DMAc 2:1, voltagem de 9,5 kV, distância agulha-coletor de 15 cm e vazão de 1 mL h⁻¹) (Liu & Tang, 2007). As fibras de AC (Figura 2A) exibiram uma morfologia predominantemente cilíndrica com superfícies lisas, formando uma manta fibrosa homogênea. A ausência de defeitos esféricos ("grânulos") e irregularidades pronunciadas ao longo das fibras indicou um equilíbrio adequado entre a viscosidade da solução, a condutividade elétrica e a taxa de evaporação do solvente.

CB com superfície modificada com CMC e Colágeno I imobilizado (Fig. 2C e 3C) exibiu um filme superficial homogêneo, reduzindo sua visibilidade e destacando o sucesso da modificação da superfície. Essa interação é atribuída principalmente a processos de adsorção, favorecidos pela afinidade química entre os grupos hidroxila do CB e os grupos carboxila do CMC, mediados por ligações de hidrogênio e interações intermoleculares, sem comprometer a integridade estrutural do CB (ARUMUGHAN *et al.*, 2023).

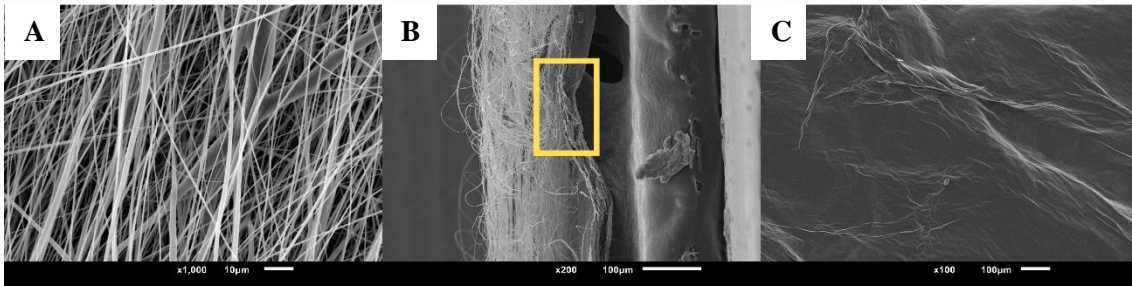


Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura. (A) AC eletrofiada a 15%; (B) seção transversal e (C) CB/Col I.

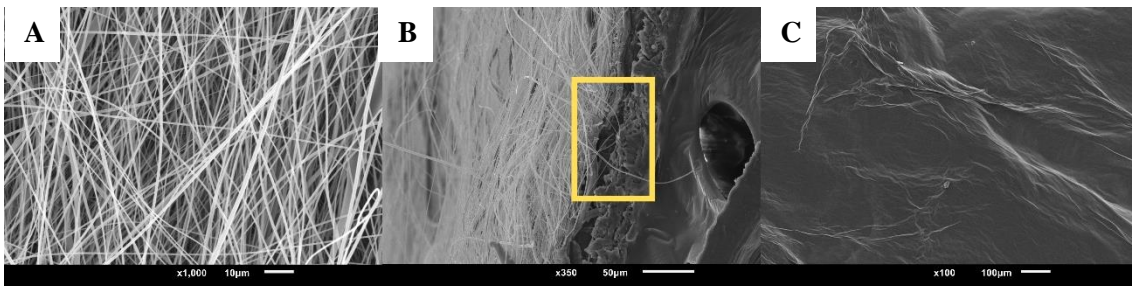


Figura 3. Microscopia eletrônica de varredura. (A) Fibras de acetato de celulose (AC) eletrofiada a 20%; (B) seção transversal e (C) CB/Col I.

De acordo com as micrografias obtidas e a análise do diâmetro das fibras, observou-se que a amostra contendo 15% de AC apresentou diâmetro médio de 0,249 μm , enquanto a formulação com 20% de AC exibiu diâmetro médio de 0,274 μm . Esses resultados indicam que o aumento da concentração de AC na solução de eletrospiação tende a favorecer a formação de fibras com diâmetro maior, efeito associado ao aumento da viscosidade da solução polimérica. Esses resultados corroboram os obtidos por Naragund et al. (2020).

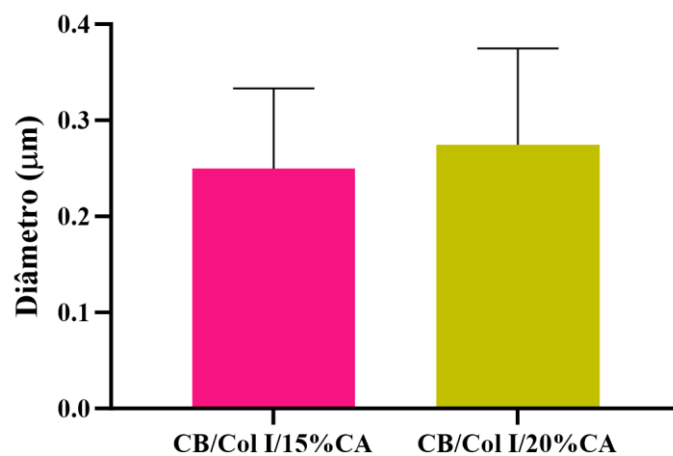


Figura 4. Distribuição do diâmetro das fibras das amostras de AC eletrofiadas a 15% e 20% (m/v), determinada a partir da medição de 20 fibras para cada amostra.

4.3. Ângulo de Contato com Água e Comportamento de Intumescimento *In Vitro*

4.3.1. Ângulo de Contato com Água

A molhabilidade da superfície é uma característica físico-química crítica que regula as interações célula-material, incluindo a adesão celular inicial e a proliferação subsequente (CAI *et al.*, 2020). Medições do ângulo de contato estático com água foram realizadas no ponto inicial e ao longo de 60 s.

A CB pura apresentou um ângulo de contato inicial com água de $46^\circ \pm 17,5^\circ$, que diminuiu ligeiramente para $31^\circ \pm 13,3^\circ$ após 60 s. Esses valores são consistentes com a natureza hidrofílica da nanocelulose (HUBBE *et al.*, 2015). Superfícies com ângulos de contato abaixo de 90° são classificadas como hidrofílicas (ROL *et al.*, 2019). Cai *et al.* (2020) relataram que as células preferem aderir a superfícies hidrofílicas. No entanto, uma superfície super-hidrofílica com um ângulo de contato inferior a 5° é prejudicial à adesão celular.

No entanto, quando o Colágeno I foi incorporado à superfície do CB, o ângulo de contato aumentou para $84^\circ \pm 5,97^\circ$ no tempo 0 e diminuiu para $76^\circ \pm 6,6^\circ$ após 60 s. Essa mudança pode ser atribuída a alterações na distribuição de carga da molécula de colágeno, que afetaram a molhabilidade da superfície, embora em nosso estudo a superfície tenha permanecido hidrofílica. Wen *et al.* (2015) também relataram um aumento no ângulo de contato do CB nativa de $25,1^\circ \pm 2,6^\circ$ para $93,5^\circ \pm 6,2^\circ$ após a funcionalização com peptídeo de colágeno. Saska *et al.* (2018) relataram que essa mudança na molhabilidade pode ser atribuída a alterações na distribuição de carga da molécula de colágeno após a imobilização na superfície, o que pode aumentar transitoriamente a hidrofobicidade aparente da superfície.

A seleção do grau de substituição (DS) do AC antes da eletrofiliação afeta significativamente a molhabilidade dos tapetes de fibra resultantes. Sridhar *et al.* (2023) destacaram que em DS = 0,3, os ângulos de contato exibidos foram de aproximadamente 67° (MASHKOUR *et al.*, 2015), enquanto em DS = 0,7, os ângulos de contato aumentaram para cerca de 80° (RODIONOVA *et al.*, 2010). Em contraste, filmes produzidos a partir de nanofibras de Kenaf acetiladas com DS = 1,07 atingiram ângulos de contato de 115° (JONOOBI *et al.*, 2010), demonstrando claramente que graus mais elevados de acetilação induzem uma superfície hidrofóbica mais pronunciada.

No presente estudo, as camadas de fibras de AC eletrofiadas (DS \approx 2,4-2,5) variaram com a concentração do polímero, com diferenças distintas observadas entre 15% e 20%. A superfície fibrosa de AC 15% exibiu um ângulo de contato inicial de aproximadamente $126^\circ \pm 4,26^\circ$, que permaneceu estável durante o período analisado, indicando uma superfície

predominantemente hidrofóbica. Em contraste, a camada de AC 20% apresentou um ângulo de contato inicial menor, de aproximadamente $67^\circ \pm 16,6^\circ$, que diminuiu em mais de 50% após 60 s. Essas diferenças provavelmente estão relacionadas a efeitos morfológicos induzidos pela variação na concentração do polímero durante a eletrofição. Concentrações mais altas da solução geralmente resultam em maior viscosidade e diâmetros de fibra maiores, o que influencia a rugosidade e a porosidade da superfície, afetando assim a molhabilidade da superfície (ANGEL *et al.*, 2020).

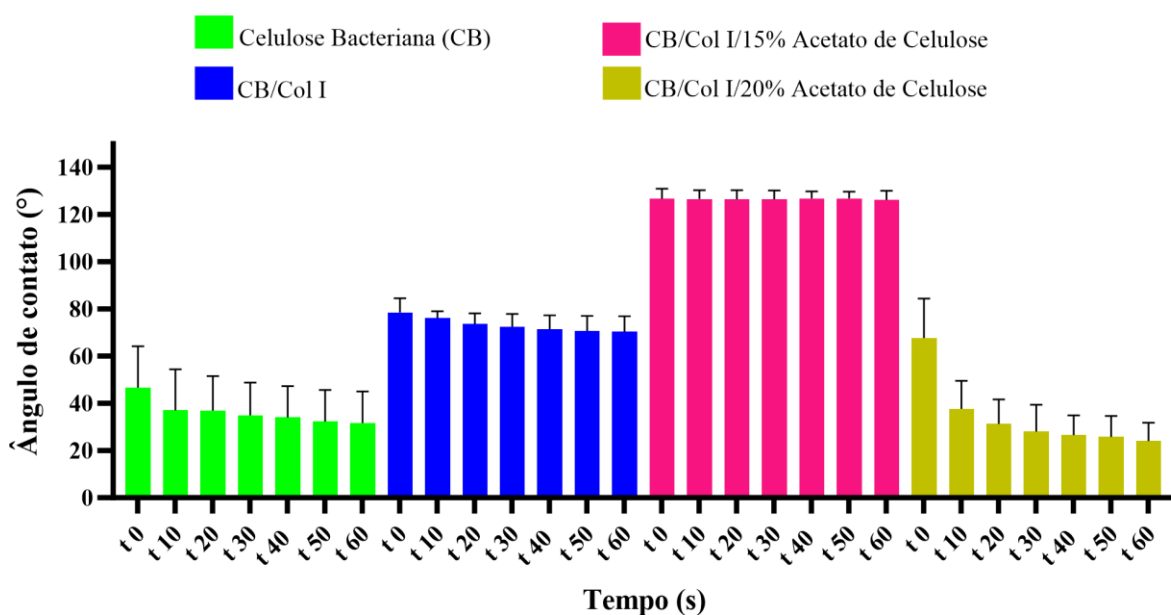


Figura 5. Medições do ângulo de contato com água de: CB nativa, CB/Col I e CB/Col I revestido com AC eletrofiado (15% e 20% p/v). As medições foram registradas durante um período de 0 a 60 segundos para avaliar a molhabilidade da superfície e as alterações temporais na hidrofiliidade/hidrofobicidade.

4.3.2. Comportamento de Intumescimento *In Vitro*

A capacidade de intumescimento é uma propriedade essencial para um material de curativo, uma vez que governa a absorção de exsudato, a retenção de fluidos e a manutenção de um ambiente úmido ideal, que são cruciais para uma cicatrização eficaz de feridas (RAMANATHAN *et al.* 2017).

O CB puro exibiu um alto comportamento de intumescimento em PBS, com valores de 433% após 1 h de imersão, 544% em 4 h, 739% em 24 h e 750% em 48 h. Um aumento acentuado no intumescimento foi observado nas primeiras horas, seguido por uma tendência à estabilização após 24 h, indicando a aproximação do equilíbrio de absorção. Esse comportamento é característico de materiais hidrofílicos e porosos, nos quais a difusão rápida ocorre inicialmente através dos espaços interfibrilares, sendo posteriormente limitada pela

saturação da rede tridimensional de nanocelulose. Esses resultados são consistentes com a natureza hidrofílica do CB, associada à alta densidade de grupos hidroxila disponíveis para interação com moléculas de água, conforme descrito por Hubbe et al. (2015). A amostra funcionalizada com o peptídeo Col I apresentou um perfil de intumescimento distinto, com valores de 293% após 1 h, 522% em 4 h, 749% em 24 h e atingindo 963% em 48 h. Observou-se que, embora o intumescimento inicial em 1 h seja menor do que o do CB puro, há um aumento progressivo e mais pronunciado ao longo do tempo, resultando em um valor final significativamente maior após 48 h. Esse comportamento pode ser atribuído à presença do peptídeo de colágeno tipo I, que possui grupos hidrofílicos, como amidas, aminas e cadeias laterais polares, capazes de estabelecer interações de ligação de hidrogênio com moléculas de água.

As camadas fibrosas de AC eletrofiadas exibiram comportamento de intumescimento dependente da concentração do polímero. Para a amostra com 15% de AC, os valores de intumescimento foram de 439% em 1 h, 539% em 4 h, 667% em 24 h e 791% em 48 h, enquanto a amostra com 20% de AC apresentou valores mais baixos de 326%, 537%, 567% e 707% nos respectivos tempos. Estudos anteriores demonstraram que a concentração do polímero influencia fortemente a morfologia e as características da superfície das nanofibras de AC eletrofiadas, afetando, assim, seu desempenho de intumescimento. Naragund e Panda (2020) relataram que membranas de AC eletrofiadas preparadas com concentrações de até 19% exibiram mudanças notáveis na formação de fibras e na molhabilidade da superfície, o que impactou diretamente a absorção de água e a capacidade de intumescimento. Além disso, hidrogéis à base de AC demonstraram atingir alta absorção de água, superior a 600%, destacando a hidrofiliabilidade intrínseca dos sistemas de AC e o papel da estrutura polimérica na regulação do comportamento de intumescimento (Jiang *et al.*, 2023). Apesar das diferenças observadas entre as amostras, a análise estatística não indicou diferença significativa no comportamento de intumescimento entre as camadas fibrosas de AC a 15% e 20% ($p < 0,05$). Esse resultado sugere uma limitação do método de medição do intumescimento e indica que a variabilidade experimental pode ter influenciado os valores quantitativos obtidos. Portanto, embora as tendências observadas sejam consistentes com diferenças morfológicas e estruturais, esses resultados devem ser interpretados com cautela.

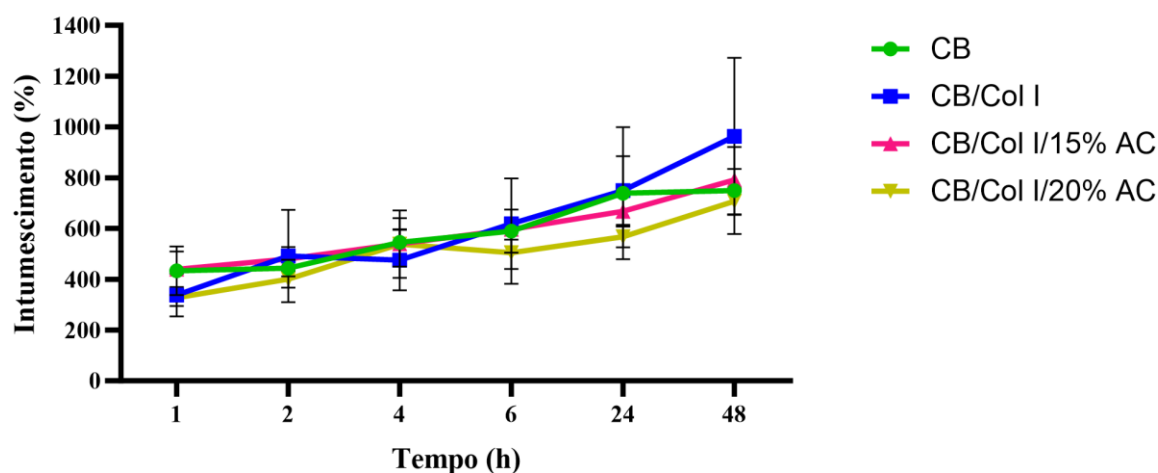


Figura 6. Índice de intumescimento (%) das amostras CB, CB/Col I, CB/Col I/15% AC e CB/Col I/20% AC em função do tempo. De 1 hora a 48 horas em PBS a pH 7,4 e 37 °C.

4.4. Ensaios Biológicos

4.4.1. Ensaio de Citotoxicidade

De acordo com a figura 7, nenhuma das amostras CB, CB/CMC/EDC/NHS, CB/ Col I, 15% AC e 20% AC exibiu efeitos citotóxicos na linhagem celular L929. A viabilidade celular permaneceu acima de 70%. Ramanathan et al. (2020) também demonstraram resultados de citotoxicidade para as amostras de CA-colágeno (CA-CSPG) e CA-látex-colágeno (CA:L-CSPG) em linhagens celulares de fibroblastos NIH 3T3 e HaCat, com valores de viabilidade de até 70%.

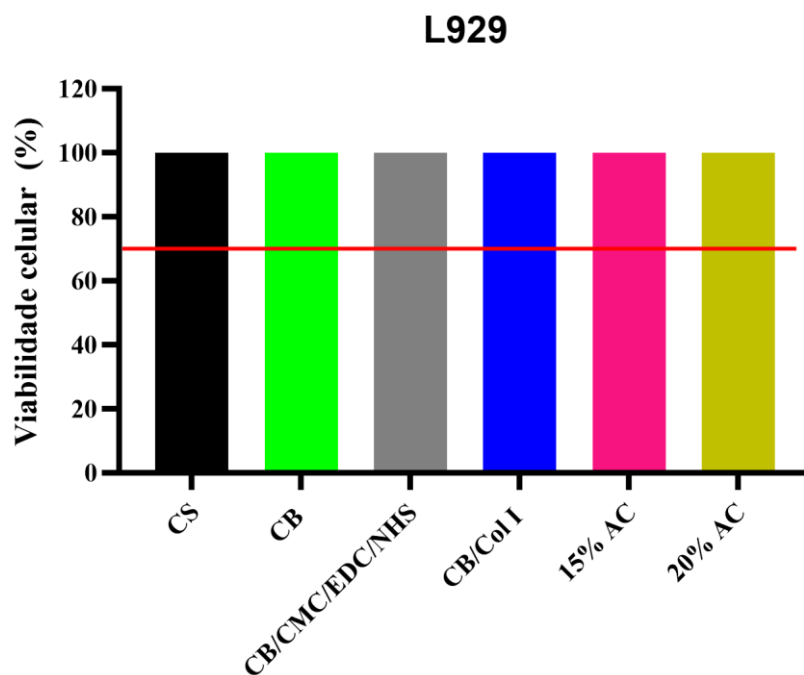


Figura 7. Ensaio de viabilidade celular com o reagente colorimétrico resazurina. Porcentagem de viabilidade celular de células L929.

4.4.2. Ensaio de Proliferação Celular

O CB/Col I que passou pelas etapas iniciais de modificação com CMC e agentes de acoplamento, seguidas de imobilização com a sequência peptídica de Col I, demonstrou um aumento na resposta de proliferação em 72 h que foi estatisticamente significativo quando comparado ao CB/CMC/EDC/NHS (sem imobilização do peptídeo). Além disso, o mesmo grupo CB/Col I também apresentou maior proliferação quando comparado ao controle de sobrevivência, neste caso, em 24, 48 e 72 h, com $p < 0,05$. Isso mostra que a sequência peptídica contribuiu para uma resposta de proliferação celular otimizada.

De acordo com a eletrofiação de AC em concentrações de 15% e 20%, foi possível analisar que apresentaram taxas de proliferação mais altas quando comparadas ao controle em 24, 48 e 72 h, com $p < 0,05$. Isso significa que o AC é capaz de contribuir para uma resposta de proliferação celular otimizada. Ramanathan et al. (2020) também demonstraram resultados de proliferação para as amostras CA-CSPG e CA:L-CSPG em linhagens de fibroblastos NIH 3T3 e células HaCat, com valores mais altos em comparação com CS.

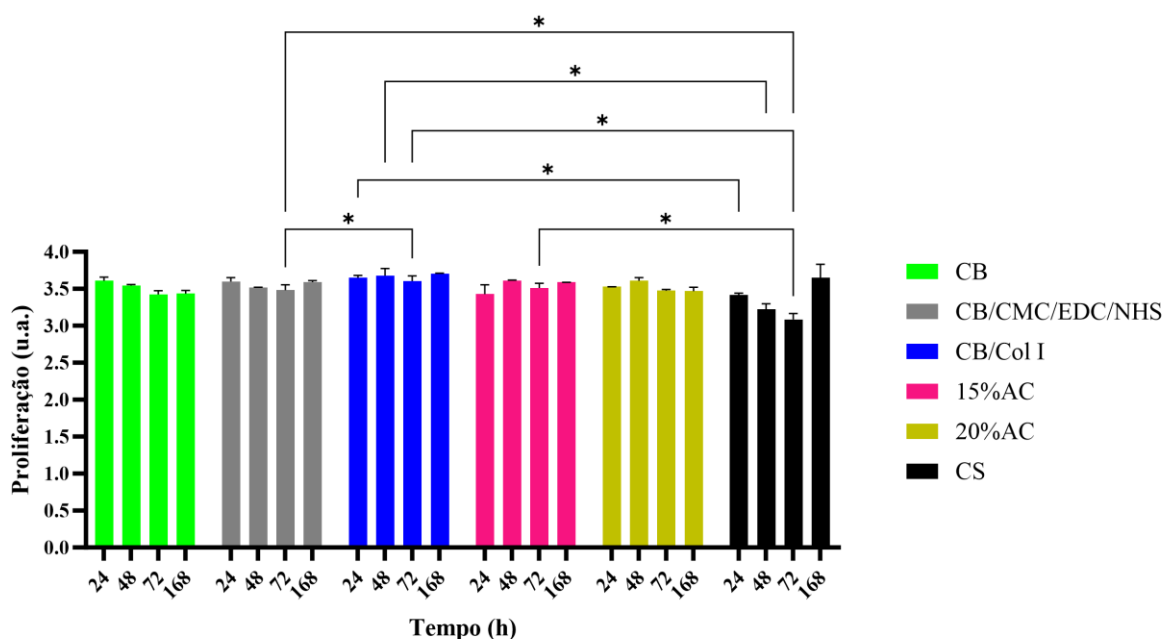


Figura 8. Ensaio de proliferação celular com o reagente colorimétrico resazurina.

4.4.3. Ensaio de adesão

Durante o processo de adesão celular, as células inicialmente se "assentam" na superfície com seus corpos esféricos. Em seguida, as células se "achatam", principalmente por meio de interações não específicas. Se a superfície for adequada, as células se "espalham completamente" com a maturação da adesão focal e criam contatos estáveis por meio da reorganização da estrutura de actina para atingir sua área máxima de espalhamento (TROY *et al.*, 2025).

Os resultados indicaram que as amostras analisadas de CB, CB/CMC/EDC/NHS/, CB/Col I e 15% AC suportaram a fixação, adesão e proliferação celular. Além disso, alta disseminação celular e um citoesqueleto totalmente desenvolvido foram visíveis nas amostras. Por outro lado, a amostra de 20% AC suportou apenas o estágio inicial de fixação celular, com as células permanecendo em uma morfologia arredondada e sem mostrar sinais de espalhamento.

Considerando a aplicação pretendida, a superfície CB/Col I suportou um número maior de células aderentes, interações célula-célula aprimoradas com a formação de aglomerados e espalhamento celular evidente.

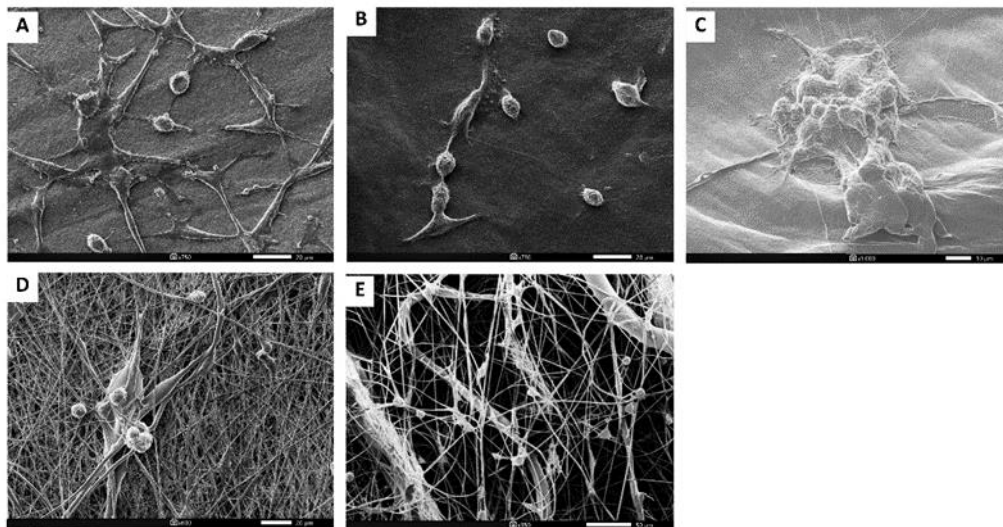


Figura 9. Ensaio de adesão celular em (A) CB; (B) CB/CMC/EDC/NHS; (C) CB/Col I; (D) 15% AC e (E) 20% AC.

4.4.4. Ensaio de adesão microbiana

A adesão microbiana a superfícies sólidas é influenciada pelas propriedades físico-químicas da interface, incluindo a hidrofobicidade ou hidrofiliabilidade do material. Wang et al. (2022) destacaram que revestimentos super-hidrofóbicos e antimicrobianos podem influenciar substancialmente as interações microrganismo-substrato, modificando propriedades da superfície, como energia, carga e rugosidade. Tais modificações podem reduzir a adesão bacteriana por meio de efeitos antiadesivos diretos ou mecanismos bactericidas. Em particular, superfícies com ângulos de contato com a água superiores a 150° são consideradas super-hidrofóbicas e demonstram propriedades anti-incrustantes pronunciadas, limitando acentuadamente a fixação microbiana.

Os ensaios de adesão microbiana mostrados nas figuras 10 e 11, utilizando *C. albicans* e *S. aureus*, revelaram a presença de microrganismos nas superfícies dos materiais testados, indicando que é necessária uma otimização adicional da interface AC eletrofiada para obter superfícies super-hidrofóbicas capazes de repelir ou prevenir a adesão microbiana patogênica. Ajustes no DS do AC ou otimização da solução e das condições de processamento podem fornecer uma estratégia para melhorar a hidrofobicidade da superfície da fibra (MIKAEILI *et al.*, 2018).

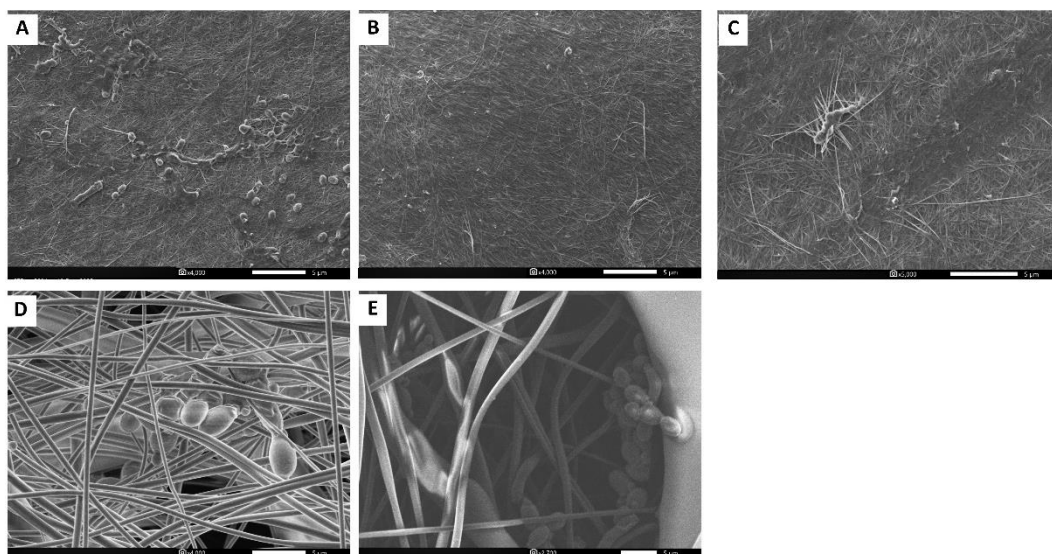


Figura 10. Ensaio de adesão avaliando a fixação de *C. albicans* a: (A) CB; (B) CB/CMC/EDC/NHS; (C) CB/Col I; (D) 15% AC e (E) 20% AC.

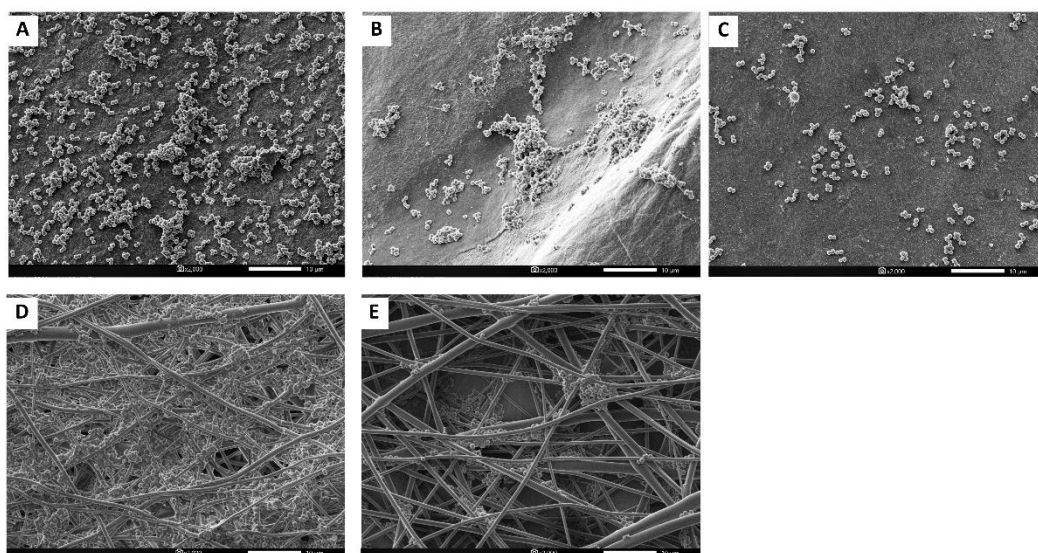


Figura 11. Ensaio de adesão avaliando a fixação de *S. aureus* a: (A) CB; (B) CB/CMC/EDC/NHS; (C) CB/Col I; (D) 15% AC e (E) 20% AC.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados parciais deste estudo, a síntese e purificação do peptídeo mimético de colágeno tipo I foram bem-sucedidas, conforme confirmado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e espectrometria de massa com ionização por electrospray (ESI-MS). A análise por HPLC demonstrou picos cromatográficos eficientes, simétricos e bem definidos após a purificação, com um tempo de retenção estável (11,6 min), reduzindo a remoção de subprodutos e resultando em um peptídeo rico e de alta pureza. O resultado da ESI-MS confirmou ainda a massa molar esperada do peptídeo, com estados de carga

correspondentes aos íons +1 e +2, validando a integridade química da sequência sintetizada. Esses resultados garantem a adequação do peptídeo para imobilização subsequente e avaliação biológica. Paralelamente, é possível inferir que o processo de eletrofiação ocorreu satisfatoriamente, resultando na formação de fibras, conforme observado por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A análise FT-IR permitiu a identificação dos grupos funcionais CB por meio de bandas de absorção, bem como das amidas I (C=O) e II, associadas ao dobramento N-H e ao estiramento C-N e C-O-C. O espectro ATR-FTIR da face superior (camada fibrosa de AC) exibe bandas de absorção características do acetato de celulose; estas incluem o estiramento assimétrico C-O-C em aproximadamente 1050 cm^{-1} , o estiramento glicosídico C-O-C em 1159 cm^{-1} , a vibração de estiramento C=O do éster acetato em torno de 1750 cm^{-1} e a vibração de estiramento C-O da ligação éster em aproximadamente 1230 cm^{-1} . A análise do ângulo de contato revelou diferenças claras na molhabilidade da superfície entre os materiais tratados. O baixo ângulo de contato inicial ($46^\circ \pm 17,5^\circ$), que se altera ao longo do tempo, confirma sua superfície intrinsecamente hidrofílica, geralmente favorável à adesão celular. Após a imobilização do peptídeo de colágeno tipo I, o aumento do ângulo de contato ($84^\circ \pm 5,97^\circ$ no tempo 0) demonstra uma alteração na molhabilidade da superfície e na distribuição de cargas causada pelo peptídeo. Em contraste, as camadas de AC obtidas por eletrofiação apresentaram molhabilidade fortemente dependente das características do polímero e das condições de processamento; a superfície com 15% de AC apresentou um ângulo de contato elevado ($126^\circ \pm 4,26^\circ$), indicativo de um comportamento predominantemente hidrofóbico, enquanto a camada com 20% de AC apresentou um ângulo de contato de $67^\circ \pm 16,6^\circ$. Essas diferenças são atribuídas a variações na morfologia e porosidade das fibras, associadas à concentração do polímero durante a eletrofiação, que influenciam significativamente a rugosidade da superfície e, conseqüentemente, a molhabilidade. Os ensaios de citotoxicidade biológica e adesão celular confirmaram que ambas as faces do material não apresentaram efeitos citotóxicos contra a linhagem celular L929, não mostraram diferença significativa na resposta proliferativa em comparação com o controle e exibiram alta capacidade de adesão celular. O ensaio de adesão indicou a ocorrência de adesão dos microrganismos avaliados, o que pode ser atribuído ao fato de as superfícies não serem super-hidrofóbicas, uma condição associada à redução da adesão microbiana.

Portanto, melhorias no processo de eletrofiação, incluindo a seleção de AC com DS alternativo e o uso de diferentes sistemas de solventes, podem ser benéficas para a geração de

fibras com superfícies super-hidrofóbicas capazes de reduzir a colonização microbiana. Essas modificações, combinadas com a otimização contínua da interface *Janus*, podem aprimorar ainda mais o potencial bioativo e protetor da plataforma.

6. REFERÊNCIAS

- AHMAD K., A.; AHMAD, M. R. A review of cell adhesion studies for biomedical and biological applications. *International journal of molecular sciences*, v. 16, n. 8, p. 18149-18184, 2015. Doi: 10.3390/ijms160818149.
- ANNAMALAI, Meenakshi et al. Surface energy and wettability of van der Waals structures. *Nanoscale*, v. 8, n. 10, p. 5764-5770, 2016. DOI: 10.1039/C5NR06705G.
- ARUMUGHAN V, ÖZEREN HD, HEDENQVIST M, SKEPÖ M, NYPELÖ T, HASANI M, LARSSON A. Anion-Specific Adsorption of Carboxymethyl Cellulose on Cellulose. *Langmuir*, v.39, n.42, p.15014-15021, 2023. DOI: 10.1021/acs.langmuir.3c01924.
- ASHOK, D.; CHEESEMAN, S.; WANG, Y.; FUNNELL, B.; LEUNG, S. F.; TRICOLI, A.; NISBET, D. Superhydrophobic surfaces to combat bacterial surface colonization. *Advanced Materials Interfaces*, v. 10, n. 24, p. 2300324, 2023. DOI: 10.1002/admi.202300324.
- ASTM INTERNATIONAL. ASTM F756-17 – Standard practice for assessment of hemolytic properties of materials. West Conshohocken, PA, 2017.
- AYKUL S, MAUST J, THAMILSELVAN V, FLOER M, MARTINEZ-HACKERT E. A ativação de Smad2/3 regula a sinalização Smad1/5/8 por meio de um loop de feedback negativo para inibir a adipogênese 3T3-L1. *Int J Mol Sci*, v.22, n.16, p.8472, 2021. Doi: 10.3390/ijms22168472.
- BACHMANN, M., KUKKURAINEN, S., HYTÖNEN, V. P., WEHRLE-HALLER, B. Cell Adhesion by Integrins. *Physiol Ver*, Oct 1, v.99, n.9, p.1655-1699, 2019. Doi: 10.1152/physrev.00036.2018.
- BALAKRISHNAN, B.; MOHANTY, M.; UMASHANKAR, P. R.; JAYAKRISHNAN, A. Evaluation of an in situ forming hydrogel wound dressing based on oxidized alginate and gelatin. *Biomaterials*, v. 26, n. 32, p. 6335–6342, 2005. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.04.012.
- BARBOSA, M. L., OLIVEIRA, L. M., PAIVA, R., DAMETTO, A. C., DIAS, D. S., RIBEIRO, C. A., WRONA, M., NERIN, C., BARUD, H. S., CRUZ, S. A. Evaluation the Potential of Onion/Laponite Composites Films for Sustainable Food Packaging with Enhanced UV Protection and Antioxidant Capacity. *Molecules*, v. 28, p. 6829, 2023. Doi: 10.3390/molecules28196829.
- BARUD, H.S.; REGIANI, T.; MARQUES, R.F.C.; LUSTRI, W.R.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S.J.L. Antimicrobial bacterial cellulose-silver nanoparticles composite membranes. *Journal of Nanomaterials*, v. 2011, 2011. Doi: 10.1155/2011/721631.
- BAUER, A. W., KIRBY, W. M. M., SHERRIES, J. C., TRUCK, M.. Antibiotic susceptibility testing by standard single disc diffusion method. *American Journal Clinical Pathology*, v.45, p.426-493, 1966. Doi: 10.4236/cm.2010.12006.
- BENEVENUTO, L. G. D., BARUD, H. S., CRUZ, S. A., CAILLIER, B., PAIVA, R., ACHCAR, J. A., MONTREZOR, L. H. Bacterial cellulose-based cell culture platform modified by oxygen plasma for tissue engineering applications. *Cellulose* 30, v. 13, 2023. Doi: 10.1007/s10570-023-05478-0.
- BERGER, E., NIEMELÄ, J., LAMPELA, O., JUFFER, A. H., & KOMSA, H. P. Raman spectra of amino acids and peptides from machine learning polarizabilities. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v.64, n.12, p.4601-4612, 2024. Doi: 10.1021/acs.jcim.4c00077.
- BERNARDO, M. P., PASCHOALIN, R. T., SANTOS, D. M. D., BILATTO, S., FARINAS, C. S., CORREA, D. S., & MATTOSO, L. H. C. (2021). Processamento e aplicação de biomateriais poliméricos: avanços recentes e perspectivas. *Química Nova*, v. 44, p. 1311-1327, 2021. Doi: 10.21577/0100-4042.20170781.
- BJÖRN, C., NOPPA, L., NÄSLUND SALOMONSSON, E., JOHANSSON, A. L., NILSSON, E., MAHLAPUU, M., HÅKANSSON, J. Efficacy and safety profile of the novel antimicrobial peptide PXL150 in a mouse model of infected burn wounds. *Int J Antimicrob Agents*, v.5, p.519-24, 2015. Doi: 10.1016/j.ijantimicag.2014.12.015.
- BLAGA, A-C., TANASĂ, A. M., CIMPOESU, R., TARATU-FARMUS, R-E., SUTEU, D. Biosorbents Based on Biopolymers from Natural Sources and Food Waste to Retain the Methylene Blue Dye from the Aqueous Medium. *Polymers*, v.14, p. 2728, 2022. Doi: 10.3390/polym14132728.
- BROWN, A. J. On na acetic fermente which forms cellulose. *Journal of the Chemical Society Transactions*, v. 49, p. 432-439, 1886. Doi: 10.1039/CT8864900432.

CACICEDO, M. L., CASTRO, M. C., SERVETAS, I., BOSNEA, L., BOURA, K., TSAFRAKIDOU, P., & CASTRO, G. R. Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications. *Bioresource Technology*, v.211, p.316-323, 2016. Doi: 10.1016/j.biortech.2016.03.096.

CAI, S.; WU, C.; YANG, W.; LIANG, W.; YU, H.; LIU, L. Recent advance in surface modification for regulating cell adhesion and behaviors. *Nanotechnology Reviews*, v. 9, n. 1, p. 971–989, 2020. DOI: 10.1515/ntrev-2020-0076.

CAI, S.; WU, C.; YANG, W.; LIANG, W.; YU, H.; LIU, L. Recent advance in surface modification for regulating cell adhesion and behaviors. *Nanotechnology Reviews*, v. 9, n. 1, p. 971–989, 2020. DOI: 10.1515/ntrev-2020-0076.

CALEB, J., YONG, T. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Front. Mol. Biosci*, v.7, 2020. Doi: 10.3389/fmolb.2020.00033.

CARRIER, O.; BONN, D. Contact angles and the surface free energy of solids. In: *Droplet Wetting and Evaporation*. Academic Press, p. 15-23, 2015. Doi: 10.1016/B978-0-12-800722-8.00002-3.

CECCHI, S.; BENNET, S. J.; ARORA, M. Bone morphogenetic protein-7: Review of signalling and efficacy in fracture healing. *Journal of orthopaedic translation*, v. 4, p. 28-34, 2016. Doi: 10.1016/j.jot.2015.08.001.

CESPEDES, G. F., LORENZON, E. N., VICENTE, E. F., MENDES-GIANNINI, M. J. S., FONTES, W., CASTRO, M. DE S., & CILLI, E. M. Mechanism of Action and Relationship Between Structure and Biological Activity of Ctx-Ha: A New Ceratotoxin-like Peptide from *Hypsiboas albopunctatus*. *Protein & Peptide Letters*, v. 19, n.6, p. 596–603, 2012. Doi: 10.2174/092986612800494011.

CHAICHAROENAUDOMRUNG, N., KUNHORM, P., NOISA, P. Sistemas de cultura de células tridimensionais como uma plataforma in vitro para modelagem de câncer e células-tronco. *Células-tronco J do mundo*, v.11, n.12, p.1065-1083, 2019. Doi: 10.4252/wjsc.v11. i12.1065.

CHIMEDTSEREN, I., YAMAHARA, S., AKIYAMA, Y., ITO, M., ARAI, Y., GANTUGS, A. E., NASTUME, N., WAKITA, T., HIRATSUKA, T., HONDA, M., MONTENEGRO RAUDALES, J. L. Collagen type I-based recombinant peptide promotes bone regeneration in rat critical-size calvarial defects by enhancing osteoclast activity at late stages of healing. *Regen Ther*, v.64, p.515-527, 2023. Doi: 10.1016/j.reth.2023.09.013.

CHIMONIDES, G. F. et al. Facile synthesis of polymer-peptide conjugates via direct amino acid coupling chemistry. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, v. 51, p. 4853–4859, 2013. Doi: 10.1002/pola.26913.

CILLI, Eduardo Maffud; PICCOLI, Júlia Pinto; ERNANDES, José Roberto; NAKAIE, Clovis Ryuichi; JUBILUT, Guita Nicolaewsky; "Reações de clivagem ácida de aminoácidos e peptídeos ligados a polímeros: relevância para a metodologia de síntese de peptídeo", p. 175-196. *Biociência Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4*. São Paulo: Blucher, 2017. ISBN: 5566, Doi: 10.5151/5566-05.

CLARO, A.M., AMARAL, N. C., COLTURATO, V. M. M., ALEIXO, N. A., PAIVA, R., CRUZ, S. A., MONTEIRO, G. C., CARVALHO, G. S. G., NOGUEIRA, F. A., DEFFUNE, E., IEMMA, M. R., BARUD, H. S. Siloxane-modified bacterial cellulose as a promising platform for cell culture. *Cellulose*, v.9, p. 9597–9608, 2022. Doi: 10.1007/s10570-022-04872-4.

COLLIER, J. H., SEGURA, T. Evolving the use of peptides as components of biomaterials. *Elsevier*, v.32, p.4198-4204, 2011. Doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.02.030.

COURTENAY, J.C.; JOHNS, M.A.; GALEMBECK, F.; DENEKE, C.; LANZONI, E.M.; COSTA, C.A.; SCOTT, J.L.; SHARMA, R.I. Surface modified cellulose scaffolds for tissue engineering. *Cellulose*, v. 24, n. 1, p. 253–267, 2017. Doi: 10.1007/s10570-016-1111-y.

DAS, M., ZANDRAA, O., MUDENUR, C., SAHA, N., SÁHA, P., MANDAL, B., KATIIYAR, V. Composite Scaffolds Based on Bacterial Cellulose for Wound Dressing Application. *ACS Appl Bio Mater*, v.5, n.8, p.3722-3733, 2022. Doi: 10.1021/acsabm.2c00226.

DAYEM, A. A., LEE, S. B., LIM, K. M., KIM, A., SHIM, H. J., VELLINGIRI, B., KIM, Y. B., CHO, S-G. Bioactive peptides for boosting stem cell culture platform: Methods and applications. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 160, p.114376, 2023.

DAYEM, A. A., LEE, S. B., LIM, K. M., KIM, A., SHIM, H. J., VELLINGIRI, B., KIM, Y. B., CHO, S-G. Bioactive peptides for boosting stem cell culture platform: Methods and applications. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 160, p.114376, 2023. Doi: 10.1016/j.biopha.2023.114376.

DE AMORIM, J. D. P., DA SILVA JUNIOR, C. J. G., DE MEDEIROS, A. D. M., DO NASCIMENTO, H. A., SARUBBO, M., DE MEDEIROS, T. P. M., COSTA, A. F. D. S., & SARUBBO, L. A. Bacterial Cellulose as a Versatile Biomaterial for Wound Dressing Application. *Molecules*, v.27, n.17, p. 5580, 2022. Doi: 10.3390/molecules27175580.

DE OLIVEIRA BARUD, H.G.; DA SILVA, R.R.; DA SILVA BARUD, H.; TERCJAK, A.; GUTIERREZ, J.; LUSTRI, W.R.; DE OLIVEIRA, O.B.; RIBEIRO, S.J. L. A multipurpose natural and renewable polymer in medical applications: Bacterial cellulose. *Carbohydrate Polymers*, [S. l.], v. 153, p. 406–420, 2016. Doi: 10.1016/j.carbpol.2016.07.059.

DEITZEL, J. M.; KLEINMEYER, J.; HARRIS, D.; TAN, N. C. B. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer*, v. 42, p. 261–272, 2001. DOI: 10.1016/S0032-3861(00)00250-0.

DMITRENKO M, MIKHAILOVSKAYA O, KUZMINOVA A, MAZUR A, SU R, PENKOVA A. Membranes from Carboxymethyl Cellulose/Carboxylated Graphene Oxide for Sustainable Water Treatment by Pervaporation and Nanofiltration. *Molecules*, v.30, n.18, 2025. Doi: 10.3390/molecules30183751

DORM, B.C.; IEMMA, M.R.C.; NETO, B.D.; FRANCISCO, R.C.L.; DINIĆ, I.; IGNJATOVIĆ, N.; MARKOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, M.; ŠKAPIN, S.; TROVATTI, E.; Synthesis and Biological Properties of Alanine-Grafted Hydroxyapatite Nanoparticles. *Life*, v.13, p.116, 2023. DOI: 10.3390/life13010116.

DOS SANTOS, G. R., SOEIRO, V. S., TALARICO, C. F., ATAIDE, J. A., LOPES, A. M., MAZZOLA, P. G., OLIVEIRA, T. J., OLIVEIRA JUNIOR, J. M., GROTO, D., JOZALA, A. F. Bacterial Cellulose Membranes as Carriers for Nisin: Incorporation, Antimicrobial Activity, Cytotoxicity and Morphology. *Polymers (Basel)*, v.14, n.17, p.3497, 2022. DOI: 10.3390/polym14173497. Doi: 10.3390/polym14173497.

DUBEY, S., MISHRA, R., ROY, P., & SINGH, R. P. 3-D macro/microporous-nanofibrous bacterial cellulose scaffolds seeded with BMP-2 preconditioned mesenchymal stem cells exhibit remarkable potential for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 167, 934-946, 2021. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.11.049.

DUGAN, J.M.; GOUGH, J.E.; EICHHORN, S.J. Bacterial cellulose scaffolds and cellulose nanowhiskers for tissue engineering. *Nanomedicine* 2013, 8, 287–298. Doi: 10.2217/nnm.12.211.

DUVAL, K., GROVER, H., HAN, L-H., MOU, Y., PEGORARO, A. F., FREDBERG, J., CHEN, Z. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology (Bethesda)*. v. 32, p. 266–277, 2017. Doi: DOI: 10.1152/physiol.00036.2016.

EDMONDSON, R., BROGLIE, J. J., ADCOCK, A. F., YANG, L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay and drug development technologies*, v.12, p.207-218, 2014. Doi: 10.4252/wjsc.v11.i12.1065.

FAUTH, E. V., CILLI, E. M., LIGABUE-BRAUN, R., & VERLI, H. (2014). Differential Effect of Solution Conditions on the Conformation of the Actinoporins Sticholysin II and Equinatoxin II. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 86, n.4, p. 1949-1962. Doi: 10.1590/0001-3765201420140270.

FELGUEIRAS, C., AZOIA, N. G., GONÇALVES, C., GAMA, M., DOURADO, F. Trends on the cellulose-based textiles: raw materials and technologies. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 9, p. 608826, 2021. Doi: 10.3389/fbioe.2021.608826

FIGUEREIDO, I., ALICE, P., DAL MAGRO, R. TINELLI, F., CORTI, R., RE, F., CASSINA, V., CANEVA, E., NICOTRA, F. AND RUSSO, L. 2019. A New Approach for Glyco-Functionalization of Collagen-Based Biomaterials, *International Journal of Molecular Sciences* 20, no. 7, p. 1747. Doi: 10.3390/ijms20071747.

FISCHER, S.; THÜMLER, K.; VOLKERT, B.; HETTRICH, K.; SCHMIDT, I.; FISCHER, K. Properties and applications of cellulose acetate. *Macromolecular Symposia*, v. 262, n. 1, p. 89–96, 2008. DOI: 10.1002/masy.200850210.

FORMHALS, A. Process and apparatus for preparing artificial threads. United States Patent, n. 1,975,504, 1934.

FU, J., WANG, Y-K., YANG, M. T., DESAI, R. A., YU, X., LIU, Z., CHEN, C. S. Mechanical regulation of cell function with geometrically modulated elastomeric substrates. *Nat Methods*. v.7, p. 733–736, 2010. Doi: 10.1038/nmeth.1487.

FURSATZ, M., SKOG, M., SIVLÉR, P., PALM, E., ARONSSON, C., SKALLBERG, A., AILI, D. Functionalization of bacterial cellulose wound dressings with the antimicrobial peptide ϵ -poly-L-Lysine. *Biomedical Materials*, v.13, n.2, p.025014, 2018. Doi:10.1088/1748-605x/aa9486.

GARRIDO-ROMERO, M., AGUADO, R., MORAL, A., BRINDLEY, C., & BALLESTEROS, M. From traditional paper to nanocomposite films: Analysis of global research into cellulose for food packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, v. 31, p. 100788, 2022. Doi: 10.1016/j.fpsl.2021.100788.

GHEORGHITA, R., ANCHIDIN-NOROCEL, L., FILIP, R., DIMIAN, M., COVASA, M. Applications of Biopolymers for Drugs and Probiotics Delivery. *Polymers (Basel)*. v.13, p. 2729, 2021. Doi: 10.3390/polym13162729.

GOTTSCHALK, L. M. F., PIRES, M. C. S., OLIVEIRA, A. H., FREITAS-SILVA, O. Produção de Celulose Bacteriana e suas aplicações. Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, 2021. Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/224312/1/DOC-141-celulose_bacteriana-pronto.pdf. Acesso realizado em 24 de janeiro de 2025.

GRAND VIEW RESEARCH. Peptide Therapeutics Market Size, Share & Trends Analysis Report. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/peptide-therapeutics-market>. Acesso em: 01 de março de 2025.

HABIBI, N. Preparation of biocompatible magnetite-carboxymethyl cellulose nanocomposite: characterization of nanocomposite by FTIR, XRD, FESEM and TEM. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, v.131, p.55-8, 2014. DOI: 10.1016/j.saa.2014.04.039.

HEINZE, T.; LIEBERT, T. Chemical characteristics of cellulose acetate. *Macromolecular Symposia*, v. 208, n. 1, p. 167–238, 2004. DOI: 10.1002/masy.200450408.

HERMANSON, G. T. Zero-length crosslinkers. In: *Bioconjugate Techniques*. 3. ed. London: Academic Press, 2013. p. 259–273.

HERSEL U, DAHMEN C, KESSLER H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials*, v.24, n.24, p.438-415, 2003. Doi: 10.1016/s0142-9612(03)00343-0.

HOFFMANN, E., STROOBANT, V. *Mass spectrometry: principles and applications*. 3rd ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2007. 512 p. ISBN 978-0-470-03310-4.

HONG, S., PARK, J., KIM, J. E., PARK, D., KIM, S., KANG, J. Y., LEE, Y. L., HONG, W. J., JEON, H., LEE, H., KIM, J. W. Fabrication of cell membrane-adhesive soft polymeric nanovehicles for noninvasive visualization of epidermal-dermal junction-targeted drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* v. 565, p. 233-241, 2019. Doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.05.014.

HORN, M., NEUNDORF, I. Design of novel cell-permeable chimeric peptide to promote wound healing. *Sci Rep*, v. 8, p.1-12, 2018. Doi: 10.3390/molecules27196656.

HORUE, M., LADETTO, M.F., FERNÁNDEZ, M.A. et al. Bacterial cellulose is a smart scaffold for propolis-loaded polymeric nanoparticles with antimicrobial and antifungal properties. *Cellulose* v. 32, p. 4961–4985, 2025. Doi: 10.1007/s10570-025-06564-1

HU, Z.; HONG, G.; CHEN, M.; WU, H.; LU, W.; CHEN, Y.; XIE, Z.; SHAO, C.; SHI, J. An asymmetric Janus membrane with anti-bacteria adhesion and rapid hemostasis properties for wound healing. *Journal of Materials Science & Technology*, v. 192, p. 201–214, 2024. DOI: 10.1016/j.jmst.2023.11.048.

HUAN Y, KONG Q, MOU H, YI H. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Front Microbiol*, v.11, 2020. Doi: 10.3389/fmicb.2020.582779.

HUBBE, M. A.; GARDNER, D. J.; SHEN, W. Cellulose nanocomposites: a review. *BioResources*, v. 10, n. 4, p. 7393–7421, 2015. DOI: 10.15376/biores.10.4.Hubbe_Gardner_Shen.

INÁCIO, I. F. Nanopartículas à base de excipientes naturais aplicadas como sanitizantes. Repositorio.ufu.br, 2022. Disponível <<https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/36153>>. Acesso em: 27 nov. 2025.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, “Biological evaluation of medical devices”. Part 12: Sample preparation and reference materials”, 4ed, ISO 10993-12, 2012.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, “Biological evaluation of medical devices”. Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods”, 3st ed, ISO 10993-5, 2009.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 10993-4: Biological evaluation of medical devices — Part 4: Selection of tests for interactions with blood. Geneva: ISO, 2017.

ITURRI J, TOCA-HERRERA JL. Characterization of Cell Scaffolds by Atomic Force Microscopy. *Polymers (Basel)*, v.9, n.8, p.383, 2017. Doi: 10.3390/polym9080383.

JIANG, L.; HUANG, X.; TIAN, C.; ZHONG, Y.; YAN, M.; MIAO, C.; WU, T.; ZHOU, X. Preparation and Characterization of Porous Cellulose Acetate Nanofiber Hydrogels. *Gel*, 2023. DOI: 10.3390/gels9060484.

JOÃO, C. F., TINUCCI-COSTAI, M., CARDILLI, D. J., FARIA, J. L. M., MAGALHÃES, G. M., ALESSI, A. C. Expressão da E-caderina em carcinoma de células escamosas e no tumor de células basais de cães. *Ciência Rural*, Santa Maria, Set, v.41, n.9, p.1611-1616, 2011. Doi: 10.1590/s0103-84782011000900020.

JONOBI, M.; HARUN, J.; MATHEW, A. P.; HUSSEIN, M. Z. B.; OKSMAN, K. Preparation of cellulose nanofibers with hydrophobic surface characteristics. *Cellulose*, v. 17, p. 299–307, 2010. DOI: 10.1007/s10570-009-9379-9.

JOZALA, A. F., DE LENCASTRE-NOVAES, L. C., LOPES, A. M., DE CARVALHO SANTOS-EBINUMA, V., MAZZOLA, P. G., PESSOA, A. J. R., GROTTTO, D., GERENUTTI, M., CHAUD, M. V. Bacterial nanocellulose production and application: a 10-year overview. *Appl Microbiol Biotechnol*, v.5, p.2063-72, 2016. Doi: 10.1007/s00253-015-7243-4.

JUNCAN, A. M., MOISÃ, D. G., SANTINI, A., MORGovan, C., RUS, L-L., VONICA-TINCU, A. L., LOGHIN. F. Advantages of Hyaluronic Acid and Its Combination with Other Bioactive Ingredients in Cosmeceuticals. *Molecules*. v. 26, p.4429, 2021. Doi: 10.3390/molecules26154429.

KAISER, E., COLESCOTT, R. L., BOSSINGER, C. D., COOK, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal Biochem*, v.34, n.2, p.595-8, 1970. Doi: 10.1016/0003-2697(70)90146-6.

KAMALY, N., YAMEEN, B., WU, J., FAROKHZAD, O. C. Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release. *Chem Rev*. v. 116, p. 2602–2663, 2016. Doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00346.

KAPALCZYNSZA, M., KOLENDA, T., PRZBYLA, W., ZAJACZKOWSKA, M., TERESIAK, A., FILAS, V., IBBS, M., BLINIAK, R., LUCZEWSKI, L., LAMPERSKA, K. 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci*. v.14, p. 910–919, 2018. Doi: 10.5114/aoms.2016.63743.

KHAN, I.; OH, DEOG-HWAN. Integration of nisin into nanoparticles for application in foods. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 34, p. 376-384, 2016. Doi: 10.1016/j.ifset.2015.12.013.

KHAN, T. A., BIANCHI, C., RUEL, M., VOISINE, P., & SELLKE, F. W. Mitogen-activated protein kinase pathways and cardiac surgery. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, v.127, n.3, p.806–811, 2004. Doi:10.1016/j.jtcvs.2003.04.001.

KHOSHNEVISAN, K.; MALEKI, H.; SAMADIAN, H.; SHAHSAVARI, S.; SARRAFZADEH, M. H.; LARIJANI, B.; KHORRAMIZADEH, M. R. Cellulose acetate electrospun nanofibers for drug delivery systems: applications and recent advances. *Carbohydrate Polymers*, v. 198, p. 131–141, 2018. DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.06.034.

KIM, S., KANG, J. Y., BALANCE, W. C., SUTTON, B. P., SHIN, D. H., JANG, K H., SHIN, M., KONG, H., KIM, J. W. Fabrication of cell penetrating peptide-conjugated bacterial cellulose nanofibrils with remarkable skin adhesion and water retention performance. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 600, p. 120476, 2021. Doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120476.

KUCIŃSKA-LIPKA, J., GUBANSKA, I. & JANIK, H. Bacterial cellulose in the field of wound healing and regenerative medicine of skin: recent trends and future perspectives. *Polym. Bull.*, v.72, p.2399–2419, 2015. Doi: 10.1007/s00289-015-1407-3.

LANGHANS, S. A. Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. *Front. Pharmacol.*, v. 23, 2018. Doi: 10.3389/fphar.2018.00006.

LANTIGUA, D., KELLY, Y. N., UNAL, B., CAMCI-UNAL, G. Engineered Paper-Based Cell Culture Platforms. *Adv Healthc Mater*, Nov 6, v.6, n.22, 2017. Epub 2017 Oct 27. Doi: 10.1002/adhm.201700619.

LERMAN, M. J., LEMBONG, J., MURAMOTO, S., GILLEN, G., FISHER, J. P. The Evolution of Polystyrene as a Cell Culture Material. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, v. 24, 2018. Doi: 10.1089/ten.TEB.2018.0056.

LESAICHERRE, M. L., UTTAMCHANDANI, M., CHEN, G. Y., YAO, S. Q. Developing site-Specific immobilization strategies of peptides in a microarray. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.12, n.16, p. 2079–2083, 2002. Doi: 10.1016/s0960-894x(02)00379-7.

LI, J., DING, M., FU, Q., TAN, H., XIE, X., ZHONG, Y. A novel strategy to graft RGD peptide on biomaterials surfaces for endothelialization of small-diameter vascular grafts and tissue engineering blood vessel. *J Mater Sci Mater Med*, v.7, p.2595-603, 2008. Doi: 10.1007/s10856-007-3354-5.

LIMA, L. R., SANTOS, D. B., SANTOS, M. V., BARUD, H. S., HENRIQUE, M. A., PASQUINI, D., PECORARO, E., RIBEIRO, S. J. L. Cellulose nanocrystals from bacterial cellulose. *Química Nova*, v.38, n.9, p.1140-1147, 2015. Doi:10.5935/0100-4042.20150131.

LIU, H.; TANG, C. Electrospinning of cellulose acetate in solvent mixture N,N-dimethylacetamide/acetone. *Polymer Journal*, v. 39, n. 1, p. 65–72, 2007. DOI: 10.1295/polymj.PJ2006117.

LIU, Q., PENG, X., LIU, X., MOU, X., GUO, Y., YANG, L., CHEN, Y., ZHOU, Y., SHI, Z., YANG, Z., CHEN, Z. Advances in the application of bone morphogenetic proteins and their derived peptides in bone defect repair. *Composites Part B: Engineering* v.262, p. 110805, 2023. Doi: 10.1016/j.compositesb.2023.110805.

LOCK, J., LIU, H. Nanomaterials enhance osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells similar to a short peptide of BMP-7. *International Journal of Nanomedicine*, v. 6, p. 2769-2777, 2011. Doi: 10.2147/IJN.S24493.

L'Officiel Brasil. (n.d.). Skincare proteico: peptídeos são a nova promessa da beleza. *Revista L'Officiel*. Disponível em: <https://www.revistalofficiel.com.br/beleza/skincare-proteico-peptideos-sao-nova-promessa-da-beleza>. Acessado em 23 de março de 2025.

LUO, K., MEI, T., LI, Z., DENG, M., ZHANG, Z., HOU, T., DONG, S., XIE, Z., XU, J., LUO, F. A High-Adhesive Lysine-Cyclic RGD Peptide Designed for Selective Cell Retention Technology. *Tissue Eng Part C Methods*, v.6, p.585-95, 2016. Doi: 10.1089/ten.TEC.2015.0517.

LUPASCU, R. E., GHICA, M. V., DINU-PIRVU, C-E., POPA, L., VELESCU, B. S., ARSENE, A. L. An Overview Regarding Microbial Aspects of Production and Applications of Bacterial Cellulose. *Materials*, v. 15, 676, 2022. Doi: 10.3390/ma15020676.

LV, D., HU, Z., LU, L., LU, H., XU, X. Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery. *Oncol Lett*, v.14, n.6, p.6999-7010, 2017. Doi: 10.3892/ol.2017.7134.

MA, Q., YU, J., ZHANG, X., WU, X., & DENG, G. Wnt/ β -catenin signaling pathway-a versatile player in apoptosis and autophagy. *Biochimie*, v. 211, p.57-67, 2023. Doi: 10.1016/j.biochi.2023.03.001.

MACHADO, A., LIRIA, C. W., PROTI, P. B., REMUZGO, C., MIRANDA, M. T. M. Sínteses química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. *Química Nova*, v.27, n.5, p.781–789, 2004. Doi:10.1590/s0100-40422004000500018.

MADHUSHREE, M., VAIRAVEL, P., MAHESHA, G., & BHAT, K. S. A Comprehensive Review of Cellulose and Cellulose-Based Materials: Extraction, Modification, and Sustainable Applications. *Journal of Natural Fibers*, v. 21, n.1, 2024. Doi: 10.1080/15440478.2024.2418357.7

MALANDAIN N, SANZ-FRAILE H, FARRÉ R, OTERO J, ROIG A, LAROMAINE A. Cell-Laden 3D Hydrogels of Type I Collagen Incorporating Bacterial Nanocellulose Fibers. *ACS Appl Bio Mater*, v.6, n.9, p.3638-3647, 2023. Doi: 10.1021/acsabm.3c00126.

MALCOR, J. D., & MALLEIN-GERIN, F. Biomaterial functionalization with triple-helical peptides for tissue engineering. *Acta biomaterialia*, v.148, p.1-21, 2022. Doi: 10.1016/j.actbio.2022.06.003.

MALMIR, S., KARBALAEI, A., POURMADADI, M., HAMED, J., YAZDIAN, F., NAVAEI, M. Antibacterial properties of a bacterial cellulose CQD-TiO₂ nanocomposite. *Carbohydr Polym*, v.234, 2020. Doi: 10.1016/j.carbpol.2020.115835.

MANSUR, A. A. P., RODRIGUES, M. A., CAPANEMA, N. S. V., CARVALHO, S. M., GOMES, D. A., & MANSUR, H. S. Functionalized bioadhesion-enhanced carboxymethyl cellulose/polyvinyl alcohol hybrid hydrogels for chronic wound dressing applications. *RSC advances*, v. 13, n.19, p. 13156-13168, 2023. Doi: 10.1039/d3ra01519j.

MARCOTTE, L.; TABRIZIAN, M. Sensing surfaces: Challenges in studying the cell adhesion process and the cell adhesion forces on biomaterials. *Irbm*, v. 29, n. 2-3, p. 77-88, 2008. Doi: 10.1016/j.rbmret.2007.11.019.

MÁS, BRUNA ANTUNES ET AL. Surface characterization and osteoblast-like Cells culture on collagen modified PLDLA scaffolds. *Materials Research*, v. 17, p. 1523-1534, 2014. Doi: 10.1590/1516-1439.269414.

MENDES, A. A., OLIVEIRA, P. C. D., CASTRO, H. F. D., & GIORDANO, R. D. L. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. *Química Nova*, v. 34, p. 831-840, 2011. Doi: 10.1590/S0100-40422011000500019.

METWALLY, S.; STACHEWICZ, U. Surface potential and charges impact on cell responses on biomaterials interfaces for medical applications. *Materials Science and Engineering: C*, v. 104, p. 109883, 2019. Doi: 10.1016/j.msec.2019.109883.

MIKAEILI, F.; GOUMA, P. I. Super water-repellent cellulose acetate mats. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 12472, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-30693-2.

MOHITE, B. V.; PATIL, S. V. Physical, structural, mechanical and thermal characterization of bacterial cellulose by *G. hansenii* NCIM 2529. *Carbohydrate Polymers*, v. 106, p. 132-141, 2014. Doi: 10.1016/j.carbpol.2014.02.012.

MONTEIRO, A. S., DE OLIVEIRA JR, M., SANTAGNELI, S., CARCEL, C., GUTMANN, T., BUNTKOWSKY, G., & RIBEIRO, S. J. Modification of Bacterial Cellulose Membrane with 1, 4-Bis (triethoxysilyl) benzene: A Thorough Physical–Chemical Characterization Study. *The Journal of Physical Chemistry C*, v.125, n.8, p. 4498-4508, 2021. Doi:10.1021/acs.jpcc.0c09837.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 16, p. 55–63, 1983. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, v. 16, p. 55-63, 1983. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4

MU, M., LIU, S., DEFLORIO, W., HAO, L., WANG, X., SALAZAR, K. S., & AKBULUT, M. Influence of surface roughness, nanostructure, and wetting on bacterial adhesion. *Langmuir*, v. 39, n.15, p. 5426-5439, 2023. Doi: 10.1021/acs.langmuir.3c00091.

NAOMI, R., B. T. H. J. IDRUS R., FAUZI, M. B. Celulose derivada de plantas vs. bactérias para cicatrização de feridas: uma revisão. *Int J Environ Res Saúde Pública*, v.17, n.18, p.6803, 2020. Doi: 10.3390/ijerph17186803.

NARAGUND, V. S.; PANDA, P. K. Electrospinning of cellulose acetate nanofiber membrane using methyl ethyl ketone and N,N-dimethylacetamide as solvents. *Materials Chemistry and Physics*, v. 240, 122147, 2020. DOI: 10.1016/j.matchemphys.2019.122147.

NAVYA, P. V., GAYATHRI, V., SAMANTA, D., SAMPATH, S.. Bacterial cellulose: A promising biopolymer with interesting properties and applications. *Int J Biol Macromol*, Nov 1, v.220, p.435-461, 2022. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.08.056.

NG, K., GAO, B., YONG, K. W., LI, Y., SHI, M., ZHAO, X., LI, Z., ZHANG, X., PINGGUAN-MURPHY, B., QYANG, H., XU, F.. Paper- based cell culture platform and its emerging biomedical applications. Elsevier, v.20, n.1, 2017. Doi: 10.1016/j.mattod.2016.07.001.

NOCHEBUENA, J.; RAMIREZ, A.; IRETA, J. On the van der Waals interactions and the stability of polypeptide chains in helical conformations. *International Journal of Quantum Chemistry*, v. 115, n. 22, p. 1613-1620, 2015. Doi: 10.1002/qua.24993.

O'LEARY, T. R., CRITCHER, M., STEPHENSON, T. N., YANG, X., HASSAN, A. A., BARTFIELD, N. M., HAWKINS, R., HUANG, M. L. Chemical editing of proteoglycan architecture. *Nat Chem Biol*, Jun, v.18, n.6, p.634-642, 2022. Doi: 10.1038/s41589-022-01023-5.

OLIVER-CERVELLÓ, LLUÍS. Novel multifunctional biomimetic peptides for bone tissue engineering. Tese de doutorado, Universitat Politècnica de Catalunya, 2022.

OSSOWICZ-RUPNIEWSKA, P., RAKOCZY, R., NOWAK, A., KONOPACKI, M., KLEBEKO, J., ŚWIĄTEK, E., JANUS, E., DUCHNIK, W., WENELSKA, K., KUCHARSKI, Ł., KLIMOWICZ, A. Transdermal Delivery Systems for Ibuprofen and Ibuprofen Modified with Amino Acids Alkyl Esters Based on Bacterial Cellulose. *Int J Mol Sci*, v.22, n.12, p.6252, 2021. Doi: 10.3390/ijms22126252.

PAIVA, R.S. Polipropileno reciclado para contato com alimento: etching e deposição de filmes de carbono amorfo hidrogenado por plasma. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, 2020.

PAPENBURG, B. J. et al. Designing porosity and topography of poly(1,3-trimethylene carbonate) scaffolds. *Acta Biomaterialia*, 2011. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.05.022.

PASCHOALIN, R. T., TRALDI, B., AYDIN, G., OLIVEIRA, J. E., RUTTEN, S., MATTOSO, L. H. C., ZENKE, M., SECHI, A. Solution blow spinning fibres: new immunologically inert substrates for the analysis of cell adhesion and motility. *Acta Biomaterials*, v. 51, p. 161-174, 2017. Doi: 10.1016/j.actbio.2017.01.020.

PASCHOALLIN, R. T. et al. Solution blow spinning fibres: new immunologically inert substrates for the analysis of cell adhesion and motility. *Acta Biomaterialia*, v. 51, p. 161-174, 2017. DOI: 10.1016/j.actbio.2017.01.020.

PICETH, G.F.; PIRICH, C.L.; SIERAKOWSKI, M.R.; WOHL, M.A.; SAKAKIBARA, C.N.; DE SOUZA, C.F.; MARTIN, A. A.; DA SILVA, R.; DE FREITAS, R.A. Bacterial cellulose in biomedical applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 104, p. 97-106, 2017. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.05.171.

PIRES, A. L. R., BIERHALZ, A. C. K., MORAES, Â. M.. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. *Química Nova*, v.38, n.7, p.957-971, 2015. Doi:10.5935/0100-4042.20150094.

QIN SHI, YANG LI, JIE SUN, HUA ZHANG, LEI CHEN, BING CHEN, HUILIN YANG, ZHAOXU WANG. The osteogenesis of bacterial cellulose scaffold loaded with bone morphogenetic protein-2. *Biomaterials*, v.33, p. 6644-6649, 2012. Doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.05.071.

QUINTANA, H., PAULO, J., PRADO, S., FRANÇA, A., GABBAI-ARMELIN, P. R., SOUZA, D. V., RIBEIRO, D. A., PARIZOTTO, N. A., BARUD, H. S., MUNIZ, A. C. Bacterial cellulose membrane enriched with fibroblast growth factor associated with photobiomodulation: In vitro evaluation. *World Journal of Advanced Research and Reviews*, v. 9, p. 76-89, 2021. Doi: 10.30574/wjarr.2021.9.2.0043.

RAMAKRISHNA, S. A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. *Nanotechnology*, v. 17, p. 89-106, 2006. DOI: 10.1088/0957-4484/17/17/R01.

RAMANATHAN, G. et al. Fabrication of biohybrid cellulose acetate-collagen bilayer matrices as nanofibrous spongy dressing material for wound healing application. *Biomacromolecules*, 2020. DOI: 10.1021/acs.biomac.0c00516.

RENDA, R.; OLIVEIRA, M.-D.; WILLIAMS, R. Biomateriais para reconstrução ocular. *J. Mater. Sci.* 2015, 50, 1523-1534. Doi: 10.1590/S1983-51752011000200025.

RENEKER, D. H.; CHUN, I. Nanometer diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. *Nanotechnology*, v. 7, p. 216-223, 1996. DOI: 10.1088/0957-4484/7/3/009.

RIAZ, T., ZEESHAN, R., ZARIF, F., ILYAS, K., MUHAMMAD, N., SAFI, S. Z., & REHMAN, I. U. FTIR analysis of natural and synthetic collagen. *Applied Spectroscopy Reviews*, v. 53, n.9, p. 703-746, 2018. Doi: 10.1080/05704928.2018.1426595.

ROL, F.; BELGACEM, M. N.; GANDINI, A.; BRAS, J. Recent advances in surface-modified cellulose nanofibrils. *Progress in Polymer Science*, v. 88, p. 241–264, 2019. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2018.09.002.

ROUSSELOT. O que é Peptan? Peptan. Disponível em: <https://peptan.com/pt-br/o-que-e-peptan/>. Acessado em 23 de março de 2025.

RUTE LOPES. Funcionalização De Celulose Bacteriana Com Peptídeo RGD Para Reparação Tecidual De Pele. Dissertação de mestrado, Instituto de Química, 2015.

S. GORGIEVA, J. TRČEK, *Bacterial Cellulose: Production, Modification and Perspectives in Biomedical Applications*, *Nanomaterials*, v. 9, nº 10, p. 1352, 2019. Doi: 10.3390/nano9101352.

SANTOS, J. C., SOUSA, R. C., OTONI, C. G., MORAES, A. R., SOUZA, V. G., MEDEIROS, E. A., & SOARES, N. F. Nisin and other antimicrobial peptides: Production, mechanisms of action, and application in active food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v.48, p.179-194, 2018 Doi: 10.1016/j.ifset.2018.06.008.

SANTOS-FILHO, N. A. et al. Synthesis and characterization of an antibacterial and non-toxic dimeric peptide derived from the C-terminal region of Bothropstoxin-I. *Toxicon*, v. 103, p. 160–168, 2015. DOI: 10.1016/j.toxicon.2015.07.004.

SANTOS-FILHO, N. A., LORENZON, E. N., RAMOS, M. A., SANTOS, C. T., PICCOLI, J. P., BAUAB, T. M., FUSCO-ALMEIDA, A. M., CILLI, E. M. Synthesis and characterization of an antibacterial and non-toxic dimeric peptide derived from the C-terminal region of Bothropstoxin-I. *Toxicon*, v.103, p.160-168, 2015. Doi: 10.1016/j.toxicon.2015.07.004.

SASKA, S., TEIXEIRA, L. N., DE OLIVEIRA, P. T., GASPAR, A. M. M., RIBEIRO, S. J. L., MESSADDEQ, Y., & MARCHETTO, R. Bacterial cellulose-collagen nanocomposite for bone tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry*, v. 22, n. 41, p. 22102-22112, 2012. Doi: 10.1039/c2jm33762b.

SHARIATINIA, Z. Pharmaceutical applications of chitosan. *Adv Colloid Interface Sci.* v. 263, p.131-194, 2019. Doi: 10.1016/j.cis.2018.11.008.

SINGH D, RAI V, AGRAWAL DK. Regulation of Collagen I and Collagen III in Tissue Injury and Regeneration. *Cardiol Cardiovasc Med*, v.7, n.1, p.5-46, 2023. Doi: 10.26502/fccm.92920302.

SOMMER, A., PAULINA, D., HANNA, S., SŁAWOMIR, S. AND MAREK, M. "Enzymatic and Chemical Cross-Linking of Bacterial Cellulose/Fish Collagen Composites—A Comparative Study" *International Journal of Molecular Sciences* 22, no. 7: 3346, 2021. Doi:10.3390/ijms22073346.

SONDERMEIJER, H. P., WITKOWSKI, P., SEKI, T., VAN DER LAARSE, A., ITESCU, S., HARDY, M. A. RGDfK-Peptide Modified Alginate Scaffold for Cell Transplantation and Cardiac Neovascularization. *Tissue Eng Part A*, v.9-10, p.740-751, 2018. Doi: 10.1089/ten.TEA.2017.0221.

SULTANA, N., ZAINAL, A. Electrospun cellulose acetate nanofibrous membrane: fabrication, characterization, drug loading and antibacterial properties. *Bull Mater Sci* v. 39, p. 337–343, 2016. Doi: 10.1007/s12034-016-1162-6

TRACHE, D., TARCHOUN, A. F., DERRADJI, M., HAMIDON, T. S., MASRUCHIN, N., BROSSE, N., HUSSIN, M. H. Nanocellulose: From Fundamentals to Advanced Applications. *Front Chem*, v.8, p.392, 2020. Doi: 10.3389/fchem.2020.00392.

TROVATTI, E.; DOS SANTOS, A.M.; AMARAL, A.C.; MENEGUIN, A.B.; MATOS, B.D.M.; PACHECO, G.; DE CARVALO, R.A.; LAZARINI, S.C. CARDOSO, V.M.O.; LUSTRI, W.R.; BARUD, H.S. Biopolymers: pharmaceutical and biomedical applications. *Eclética Química Journal*, v. 41, p. 32, 2016. Doi: 10.26850/1678-4618eqj.v41.1.

TROY C. BREIJAERT, MARINA FONTES, PAULA DE ABREU FERNANDES, HERNANE DA SILVA BARUD, SIDNEY J.L. RIBEIRO, GULAIM A. SEISENBAEVA. Functionalization of bacterial nanocellulose-based wound dressing for increased drug retention, *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, v.10, 2025. DOI: 10.1016/j.carpta.2025.100756.

TUDUREANU, R., HANDREA-DRAGAN, I. M., BOCA, S., BOTIZ, I. Insight and Recent Advances into the Role of Topography on the Cell Differentiation and Proliferation on Biopolymeric Surfaces. *Int J Mol Sci*, v. 23, n.14, p. 7731, 2022. Doi: 10.3390/ijms23147731.

TUGULU, S., SILACCI, P., STERGIOPULOS, N., KLOK, H. A. RGD-Functionalized polymer brushes as substrates for the integrin specific adhesion of human umbilical vein endothelial cells. *Biomaterials*, v.16, p.2536-46, 2007. Doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.02.006.

VALOTTEAU, C., BACCILE, N., HUMBLLOT, V., ROELANTS, S., SOETAERT, W., STEVENS, C. V., & DUFRÊNE, Y. F. Nanoscale antiadhesion properties of sophorolipid-coated surfaces against pathogenic bacteria. *Nanoscale Horizons*, v. 4, n. 4, p. 975-982, 2019. Doi: 10.1039/C9NH00006B.

VAN, Z. Y. L. E. M., COBURN, J. M. Functionalization of Bacterial Cellulose with the Antimicrobial Peptide KR-12 via Chimerical Cellulose-Binding Peptides. *Int J Mol Sci*, v. 25, n.3, p.1462, 2024. Doi: 10.3390/ijms25031462.

VÁZQUEZ, M., VELAZQUEZ, G., & CAZÓN, P. UV-Shielding films of bacterial cellulose with glycerol and chitosan. Part 2: Structure, water vapor permeability, spectral and thermal properties. *CyTA - Journal of Food*, v.19, n.1, p.115-126, 2021. Doi: 10.1080/19476337.2020.1870565.

VENTURATO, A., MACFARLANE, G., GENG, J., BRADLEY, M. Understanding Polymer-Cell Attachment. *Macromol Biosci*, Dec, v.16, n.12, p.1864-1872, 2016. Doi: 10.1002/mabi.201600253.

WANG C, LI Z, ZHANG K, ZHANG C. Self-assembling peptides with hBMP7 biological activity promote the differentiation of ADSCs into nucleus pulposus-like cells. *J Orthop Surg Res*, v.17, n.1, p.197, 2022. Doi: 10.1186/s13018-022-03102-8.

WANG, F., LI, Y., SHEN, Y., WANG, A., WANG, S., XIE, T. The functions and applications of RGD in tumor therapy and tissue engineering. *Int J Mol Sci*, v.7, p.13447-62, 2013. Doi: 10.3390/ijms140713447.

WANG, L. et al. Recent advances in superhydrophobic and antibacterial coatings for biomedical materials. *Coatings*, v. 12, n. 10, p. 1469, 2022. DOI: 10.3390/coatings12101469.

WEISHAUPT, R., ZÜND, J. N., HEUBERGER, L., ZUBER, F., FACCIO, G., ROBOTTI, F., FERRARI, A., FORTUNATO, G., REN, Q., MANIURA-WEBER, K., GUEX, A. G. Antibacterial, Cytocompatible, Sustainably Sourced: Cellulose Membranes with Bifunctional Peptides for Advanced Wound Dressings. *Adv Healthc Mater*, v.9, n.7, p. 1901850, 2020. Doi: 10.1002/adhm.201901850.

WEN, X. et al. Immobilization of collagen peptide on dialdehyde bacterial cellulose nanofibers via covalent bonds for tissue engineering and regeneration. *International Journal of Nanomedicine*, v. 10, p. 4623-4637, 2015. DOI: 10.2147/IJN.S84452.

WEN, X., ZHENG, Y., WU, J., WANG, L. N., YUAN, Z., PENG, J., & MENG, H. Imobilização de peptídeo de colágeno em nanofibras de celulose bacteriana dialdeído via ligações covalentes para engenharia e regeneração de tecidos. *Jornal Internacional de Nanomedicina*, v. 10, p. 4623-4637, 2015 Doi:10.2147/IJN.S84452.

WOHL, ALEXANDER P. et al. Extracellular regulation of bone morphogenetic protein activity by the microfibril component fibrillin-1. *Journal of Biological Chemistry*, v. 291, n. 24, p. 12732-12746, 2016. Doi: 10.1074/jbc.M115.704734

WOHLERT, M., BENSELFELT, T., WÅGBERG, L. Cellulose and the role of hydrogen bonds: not in charge of everything. *Cellulose*, v.29, p. 1-23, 2022. Doi: 10.1007/s10570-021-04325-4.

WOJCIECH, K.C.; DAVID, J.Y.; MAREK, K.; BROWN, R.M., JR. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. *Biomacromolecules* 2007, 8, 1-12. Doi: 10.1021/bm060620d.

WU, W., CHENG, R., DAS NEVES, J., TANG, J., XIAO, J., NI, Q., LIU, X., PAN, G., LI, D., CUI, W., SARMENTO, B. Advances in biomaterials for preventing tissue adhesion. *J Control Release*, v. 261, p. 318-336, 2017. Doi: 10.1016/j.jconrel.2017.06.020.

WU, X., SUVARNAPATHAKI, S., WALSH, K., CAMCI-UNAL, G.. Paper as a scaffold for cell cultures: teaching an old material News tricks. *Mrs Communications*, v.8, p.1-14, 2018. DOI: 10.15557/mrc.2018.8.

WU, Z.; KONG, B.; LIU, R.; SOL, W.; MI, S. Engineering of corneal tissue through an aligned pva/collagen composite nanofibrous electrospun scaffold. *Nanomaterials* 2018, 8, 124. Doi: 10.3390/nano8020124.

XIA, Z. et al. Fabrication and characterization of biomimetic collagen–apatite scaffolds with tunable structures for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, v. 9, n. 7, p. 7308–7319, 2013. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.04.021.

XU, X., WANG, W., KRATZ, K., FANG, L., LI, Z., KURTZ, A., MA, N., LENDLEIN, A. Controlling Major Cellular Processes of Human Mesenchymal Stem Cells using Microwell Structures. *Adv. Healthcare Mater.*, v. 3, p. 1991–2003, 2014. Doi: 10.1002/adhm.201400415.

XU, Y., & KIRCHNER, M. Collagen mimetic peptides. *Bioengineering*, v.8, n.1, p.5, 2021. Doi: 10.3390/bioengineering8010005

YARROW, J. C. *et al.* A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. *BMC Biotechnol*, v.4, n.21, 2004.

YOSHINO, A., TABUCHI, M., UO, M., TATSUMI, H., HIDESHIMA, K., KONDO, S., SEKINE, J. Applicability of bacterial cellulose as an alternative to paper points in endodontic treatment. *Acta Biomaterialia*, v. 9, p. 6116-6122, 2013. Doi: 10.1016/j.actbio.2012.12.022.

YU, JIE et al. Epsilon-poly-l-lysine conjugated erythromycin for enhanced antibiotic therapy. *RSC advances*, v. 13, n. 27, p. 18651-18657, 2023. Doi: 10.1039/D3RA03168C.

YUAN, Y; LEE, T. R. Contact angle and wetting properties. In: *Surface science techniques*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 3-34, 2013. DOI: 10.1007/978-3-642-34243-1_1.

YUE, P. Y. *et al.* A simplified method for quantifying cell migration/wound healing in 96-well plates. *J Biomol Screen*, v.15, n.4, p.427-433, 2010.

ZANG, S.; ZHANG, R.; CHEN, H.; LU, Y.; ZHOU, J.; CHANG, X.; QIU, G.; WU, Z.; YANG, G. Investigation on artificial blood vessels prepared from bacterial cellulose. *Mater. Sci. Eng. C*. 2015, 46, 111–117. Doi: 10.1016/j.msec.2014.10.023.

ZETTLEMOYER, A. C. The surface tension of pure liquid compounds. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 46, p. 182, 1974. DOI: 10.1016/0021-9797(74)90042-3.