



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

THAMYRES FREIRE DA SILVA

**CURATIVO BIOATIVO DE BIOCELULOSE ASSOCIADO À LECTINA
FRUTALINA DA *Artocarpus incisa* L.**

FORTALEZA

2022

THAMYRES FREIRE DA SILVA

CURATIVO BIOATIVO DE BIOCELULOSE ASSOCIADO À LECTINA
FRUTALINA DA *Artocarpus incisa* L.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós - Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientadora: Prof^a. Dra. Fábiana Karine Andrade.

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Silveira Vieira

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S584c Silva, Thamyres Freire da.
CURATIVO BIOATIVO DE BIOCELULOSE ASSOCIADO À LECTINA FRUTALINA DA
Artocarpus incisa L. / Thamyres Freire da Silva. – 2022.
72 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia,
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2022.

Orientação: Profa. Dra. Fábila Karine Andrade.

Coorientação: Prof. Dr. Rodrigo Silveira Vieira.

1. Celulose bacteriana. 2. Lectina. 3. Artocarpus Incisa L.. 4. Curativo. I. Título.

CDD 660

THAMYRES FREIRE DA SILVA

CURATIVO BIOATIVO DE BIOCELULOSE ASSOCIADO À LECTINA
FRUTALINA DA *Artocarpus incisa* L.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós - Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Fábيا Karine Andrade (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Rodrigo Silveira Vieira (Coorientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Niédja Fittipaldi Vasconcelos
Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste - CETENE

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus familiares e amigos que são minha estrutura e me ajudaram a encerrar mais um ciclo.

Agradeço à minha orientadora e coorientador por todos os ensinamentos e troca de experiência profissional. Obrigada por terem me proposto um tema de pesquisa que me ajudou a superar meus limites e amadurecer um pouco mais.

Agradeço a todos professores, alunos e ex-alunos da UFC que colaboraram de alguma forma com as partes que compuseram esse trabalho. Muito obrigada por terem repassado o que puderam de conhecimento e experiência, sempre que possível farei o mesmo. Sozinha eu não teria conseguido.

Agradeço ao CNPq pelo fomento com a bolsa de mestrado para realização desse trabalho.

“Se você vai ser espectador de você
mesmo até o fim, é melhor que se
encante com o que faz”

(Clóvis de Barros Filho)

RESUMO

Curativos constituem um segmento importante do mercado médico e farmacêutico para o tratamento de feridas em todo o mundo e tem evoluído desde matrizes passivas, que simplesmente cobrem e protegem a ferida, até as que promovem a entrega de bioativos. A celulose produzida por fermentação bacteriana, conhecida como biocelulose (CB), é um material de alta pureza e que tem sido utilizado para a produção de curativos passivos. A matriz de CB ao ser associada com uma molécula, que atua no processo de cicatrização, passa a ser um curativo bioativo. A CB foi oxidada, objetivando modular sua biodegradabilidade e taxa de liberação do composto bioativo, com periodato de sódio para produzir 2,3 dialdeído celulose (CBOXI). A oxidação proporciona grupamentos aldeídos disponíveis para interagir com os bioativos. O objetivo deste trabalho foi criar um modelo de incorporação da lectina frutalina (FTL) da *Artocarpus incisa L* (molécula bioativa) em CB e CBOXI. As proteínas do gênero *Artocarpus* tem mostrado ação cicatrizante, como ArtinM (anteriormente chamada Artocarpin ou KM+) que já foi usada em formulações para tratamento de feridas. O desempenho de curativos FTL-CBOXI e da FTL-CB foi avaliado com variáveis independentes: temperatura (5, 15, e 25 °C), tempo de imobilização (6, 15, e 24 h) e concentração de frutalina (20, 60, e 100 µg/mL). A amostra de CBOXI obteve maior rendimento (4,00 µg frutalina/mg de CBOXI seca) quando comparada a CB (0,54 µg frutalina/ mg de CB seca). Foi realizado teste de Microscopia de Fluorescência Confocal em duas partes: confirmando primeiro a imobilização da FTL pela visualização do complexo fluorescente FTL-FITC no curativo e a segunda sua atividade ligante a IgA de um curativo pronto com FTL em contato com IgA-FITC. Nos testes de viabilidade celular a FTL se mostrou não citotóxica para culturas de fibroblastos <50 µg/mL após 24 h de contato, apresentando toxicidade após 48 h. A FTL liberada pelo curativo também mostrou tendência a acelerar o fechamento da ferida *in vitro* observado através do teste de migração de fibroblastos. Cerca de 97% e 80% da lectina dos curativos OXI 6 e CB 6, respectivamente, foi liberada para tampão PBS, pH 7,4, em célula e Franz em cerca de 24 h. Esses são resultados promissores, que mostram que o curativo apresenta potencial para o tratamento de feridas.

Palavras-chave: Celulose bacteriana. Lectina. *Artocarpus Incisa L*. Curativo.

ABSTRACT

Dressings are an important segment of the medical and pharmaceutical market for wound care worldwide and have evolved from passive matrices that simply cover and protect the wound to those that promote the delivery of bioactives. Cellulose produced by bacterial fermentation, known as bacterial cellulose (BC), is a high purity material that has been used for the production of passive dressings. The BC matrix when associated with a molecule, which acts in the healing process, becomes a bioactive dressing. The BC was oxidized, aiming to modulate its biodegradability and release rate of the bioactive compound, with sodium periodate to produce 2,3 dialdehyde cellulose (BCOXI). Oxidation provides aldehyde groups available to interact with the bioactives. The objective of this work was to create a model for incorporation of frutalin lectin (FTL) from *Artocarpus incisa* L (bioactive molecule) into BC and BCOXI. Proteins from the genus *Artocarpus* have shown healing action, such as ArtinM (formerly called Artocarpin or KM+) which has been used in wound care formulations. The performance of FTL-BCOXI dressings and of FTL-BC was evaluated with independent variables: temperature (5, 15, and 25 °C), immobilization time (6, 15, and 24 h), and frutalin concentration (20, 60, and 100 µg/mL). The BCOXI sample obtained higher yield (4.00 µg frutalin/mg dry BCOXI) when compared to BC (0.54 µg frutalin/ mg dry BC). Confocal Fluorescence Microscopy testing was performed in two parts: first confirming the immobilization of FTL by visualization of the FTL-FITC fluorescent complex on the dressing and second its IgA-binding activity of a ready-made dressing with FTL in contact with IgA-FITC. In cell viability tests FTL was shown to be non-cytotoxic to fibroblast cultures <50 µg/mL after 24 h of contact, showing toxicity after 48 h. FTL released from the dressing also showed a tendency to accelerate wound closure in vitro observed through the fibroblast migration test. About 97% and 80% of the lectin from OXI 6 and CB 6 dressings, respectively, was released into PBS buffer, pH 7.4, in cell and Franz in about 24 h. These are promising results, which show that the dressing has potential for wound treatment.

Keywords: Bacterial cellulose. Lectin. *Artocarpus Incisa* L. Dressing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Camadas da pele humana.	16
Figura 2: Mecanismo de reação de oxidação da celulose com metaperiodato de sódio.....	21
Figura 3: MEV de membranas de (A) celulose bacteriana purificada por solução alcalina e oxidada por metaperiodato de sódio (CBoxi) e (B) celulose bacteriana (CB) somente purificada.....	22
Figura 4: (A) Estrutura tridimensional representativa da frutalina. (B) Fruta-pão.	23
Figura 5: Estrutura da frutalina tetramérica ligada a D-galactose (vermelho). .	24
Figura 6: Sítio de reconhecimento a carboidrato da frutalina em verde; ligante D-galactose em vermelho, pontes de hidrogênio em amarelo e moléculas de água “X” vermelho.....	25
Figura 7: Etapas da estratégia experimental.....	27
Figura 8: Purificação da lectina de <i>Artocarpus incisa L.</i> e análise de pureza...	29
Figura 9: Processo de produção e oxidação da membrana de biocelulose.	31
Figura 10: Processo de adsorção de frutalina nas membranas de biocelulose (CB) e biocelulose oxidada (CBOXI).	32
Figura 11: Esquema da montagem da célula de difusão de Franz.	36
Figura 12: Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR-ATR). Das amostras de com controle sem frutalina, OXIC e CBC, e das amostras com a lectina, OXI 6, OXI 1, CB 6, CB 1.....	45
Figura 13: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) para os curativos OXI 1 (A) e CB 1 ambas com frutalina (B).....	46
Figura 14: Células de eritrócitos: (A) hemaglutinadas com frutalina-FITC e (B) hemaglutinadas com frutalina e adicionado posteriormente IgA-FITC mostrando ação de recobrimento as células devido a ligação IgA-frutalina.....	47
Figura 15: Imagens digitais do ensaio de microscopia de fluorescência confocal. Neste ensaio a frutalina foi previamente ligada ao FITC, um fluoróforo, e então incorporada as membranas de biocelulose. A Figura mostra OXIC (A) e CBC (B) que são biocelulose sem FTL e OXI 1 (C) e CB 1 (D) com FTL, respectivamente.	48
Figura 16: IgA- FITC adicionado em membranas (A) OXI 1 e (B) CB 1 com lectina adsorvida.....	49

Figura 17: Perfil de liberação da frutalina nos curativos CB 6 e OXI 6.....	50
Figura 18: Análise de atividade hemaglutinante de alíquotas de PBS em contato com as amostras por 24 h e 48 h em duplicata.....	52
Figura 19: Citotoxicidade da frutalina purificada em fibroblastos (L929).....	53
Figura 20: Citotoxicidade amostras em queratinócitos (HaCat).....	54
Figura 21: Citotoxicidade amostras em fibroblastos (L929).....	54
Figura 22: Imagens capturadas do ensaio de migração de fibroblastos sob efeito dos curativos para os tempos de 0, 6, 12, 18 e 24 h de contato da amostra. ..	56
Figura 23: Teste microbiano de disco difusão para CBOXI e CB com frutalina adsorvida na concentração de 100 µg/mL.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Níveis das variáveis independentes estudadas do planejamento experimental.....	33
Tabela 2: Matriz do planejamento experimental comum entre CB e CBOXI....	34
Tabela 3: Matriz do planejamento 2 ³ para celulose bacteriana oxidada (CBOXI).	41
Tabela 4: Matriz do planejamento 2 ³ para celulose bacteriana (CB).....	42
Tabela 5: Amostras dos curativos CBOXI e CB com melhores desempenhos no ensaio de citotoxicidade.....	44
Tabela 6: Taxa de redução do Scratch (%)......	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BOD	<i>Biochemical Oxygen Demand</i>
CB	Celulose Bacteriana
CBOXI	Celulose Bacteriana Oxidada
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FBS	Soro Fetal Bovino
FITC	isocianato de fluoresceína
FTIR	Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho
IgA	Imunoglobulina A
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
PBS	Tampão Fosfato-Salino
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com dodecil-sulfato de sódio (SDS).
ATR	Reflectância Total Atenuada
FTL	Frutalina

LISTA DE SÍMBOLOS

µg	Microgramas
µL	Microlitros
h	Horas
KDa	Quilodalton
m	Metro
M	Molaridade
mg	Miligrama
mL	Mililitros
nm	Nanômetro
°C	Grau Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivos gerais	15
2.2 Objetivos específicos	15
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
3.1 Pele.....	16
3.2 Cicatrização da pele e tratamento de feridas.....	17
3.3 Curativos bioativos	19
3.4 Matriz de celulose bacteriana	20
3.5 Frutalina: uma lectina da semente de <i>Artocarpus incisa</i> L.....	22
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1 Materiais	27
4.1.1 Sementes para obtenção da frutalina.....	27
4.1.2 Reagentes.....	28
4.2 Métodos	28
4.2.1 Purificação da lectina, teste de pureza e atividade hemaglutinante. 28	
4.2.2 Produção e purificação de biocelulose	30
4.2.3 Oxidação da biocelulose	30
4.2.4 Adsorção da lectina nas membranas	31
4.2.4.1 Planejamento experimental da adsorção da lectina nas membranas CB e CBOXI	33
4.2.5 Técnicas de caracterização dos curativos FTL-CB e FTL-CBOXI.	34
4.2.5.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR). 34	
4.2.5.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	34
4.2.5.3 Microscopia de Fluorescência Confocal.....	35
4.2.5.4 Ensaio de liberação em célula de difusão tipo Franz	36

4.2.5.5 Hemaglutinação dos extratos de membranas em tampão PBS pH 7,4	38
4.2.5.6 Avaliação da citotoxicidade da frutalina e dos curativos	38
4.2.5.7 Migração de fibroblastos	39
4.2.5.8 Ensaio microbiológico qualitativo	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	41
5.1 Análise experimental.....	41
5.2 Análises Físico-químicas	44
5.3 Testes <i>in vitro</i>	52
5.4 Ensaio de atividade antimicrobiana	57
6 CONCLUSÃO.....	60
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	61
8 REFERÊNCIAS.....	62