

IMOBILIZAÇÃO DE COLÁGENO HUMANO TIPO I EM MEMBRANAS DE NANOCELULOSE BACTERIANA

A. C. J. MEYER¹, E. M. REIS¹ e L. M. PORTO¹

¹ Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Alimentos
E-mail para contato: {ana_meyer, emily_reis, luismar}@intelab.ufsc.br

RESUMO – O uso de biomateriais na cicatrização de feridas têm crescido extensivamente na tentativa de suprir as necessidades não atendidas por curativos convencionais. A utilização de plataformas de nanocelulose bacteriana (BNC) torna-se interessante devido às propriedades desse hidrogel. O objetivo desse estudo foi a imobilização de colágeno, uma proteína que participa diretamente da cicatrização de feridas, em membranas de BNC visando produzir biomateriais capazes de acelerar o processo de cicatrização. A imobilização foi feita através da conversão dos grupos hidroxila da BNC a grupos carboxílicos e sua posterior ativação para que se ligassem ao grupamento amina do colágeno. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) permitiram a visualização das fibras de colágeno na membrana produzida e a análise por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier confirmou a presença dos grupos funcionais previstos. Quando testado quanto à citotoxicidade, o material se provou não citotóxico e consequentemente com potencial para ser testado na reparação tecidual.

1. INTRODUÇÃO

A cicatrização de feridas envolve uma série de interações entre mediadores de citocinas, diferentes tipos de células e os componentes da matriz extracelular (MEC) no decorrer das fases da cicatrização (Brett, 2008). Para auxiliar o processo, tratamentos adequados são fundamentais. Os métodos mais comuns utilizam materiais que visam não deixar as feridas expostas e manter o meio úmido, para evitar traumas, reduzir a dor, aumentar a vascularização e promover a cicatrização (Field, Kerstein, 1994).

Biopolímeros são amplamente utilizados em medicina regenerativa como curativos alternativos para feridas e queimaduras, devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixo custo e semelhança com a MEC (Balakrishnan, Jayakrishnan, 2005). A nanocelulose bacteriana (BNC) é um biopolímero que possui nanoestrutura fibrilar semelhante à MEC (Rambo et al., 2008). Sua estrutura porosa tridimensional confere-lhe propriedades únicas, como a alta capacidade de retenção de água, resistência mecânica, alta porosidade e biocompatibilidade (Klemm et al., 2011; Trovatti et al., 2011). Devido a estas propriedades, existe um crescente interesse de pesquisa no desenvolvimento de materiais com aplicação em cicatrização de feridas e queimaduras (Muangman et al., 2011; Kwak et al., 2015). No entanto, a BNC tem baixa bioatividade e atividade química se comparado à MEC. Assim, a

introdução de grupos ativos na superfície das nanofibras da BNC é necessária para melhorar o desempenho deste material na reparação tecidual.

O colágeno, principal componente da MEC, tem sido indicado como acelerador do processo de cicatrização (Lee *et al.*, 2001), auxiliando na migração e estratificação das camadas de células como fibroblastos e queratinócitos (Brett, 2008). Por esse motivo, muitos autores já trabalharam com algum tipo de material polimérico e colágeno (Lu *et al.*, 2014, Souza, 2015), entretanto, as ligações físicas que foram realizadas para a produção desses materiais não são tão eficientes quanto as ligações químicas – sendo estas mais eficazes quando se visa um processo de cicatrização prolongado. Assim, o objetivo deste trabalho foi a funcionalização de membranas de BNC com colágeno humano tipo I (COL) para o desenvolvimento de um material com propriedades aplicáveis a cicatrização de feridas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

Todos os reagentes foram comprados de Sigma-Aldrich Brasil Ltd. e utilizados conforme recebidos, exceto quando mencionado.

2.2. Produção da BNC

As membranas de BNC foram produzidas pelo cultivo da bactéria *Gluconacetobacter hansenii*, ATCC 23769. Primeiramente, 100 μL de inóculo foram plaqueados em meio manitol ágar. Após 7 dias de cultivo a 26 °C, 30 colônias isoladas foram selecionadas e inoculadas em 5 mL de meio manitol (25 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), extrato de levedura (5,0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e peptona (3,0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), esterilizado (pH 6,5). Subsequentemente, 5 mL do inóculo foram adicionados à 45 mL de meio manitol e a solução foi transferida para placas de 24 poços (1 mL/poço) e mantida em cultura estática à 26 °C durante 4 dias. No fim, as membranas formadas foram removidas e purificadas em NaOH (0,1 M) à 50°C por 24 h e finalmente lavadas com água destilada até atingirem pH 6,5.

2.3. Produção da BNC–COL

As membranas de BNC produzidas na etapa anterior foram oxidadas com $\text{HNO}_3/\text{H}_3\text{PO}_4\text{-NaNO}_2$ como descrito por Kumar e Yang (2002), para converter os grupos hidroxilas livres da BNC em grupos carboxilas. As membranas foram imersas em uma solução de ácido nítrico e ácido fosfórico 2:1 (v/v) e após foi acrescentado nitrito de sódio (p/v). A mistura permaneceu com leve agitação, em ambiente sem a presença de luz, por 24 h. Posteriormente, as membranas oxidadas (BNC–OX) foram transferidas para uma solução 0,2% (p/p) de glicerol durante 15 minutos para remover o oxidante. Por fim, foram lavadas com acetona e deixadas secar por 30 minutos a 25 °C.

A imobilização de colágeno foi realizada conforme retratado por Liu e colaboradores (2005) e Li e colaboradores (2008). Resumidamente, as membranas BNC–OX foram imersas em tampão 0,02M de MES (ácido 2-morfolinoetanossulfônico monohidratado), pH 4,5, contendo EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida)/NHS (N-hidroxissuccinimida)

0,01M (1:1) durante 24 h a 4 °C com agitação, para a ativação dos grupos carboxílicos de BNC–OX. Após, as membranas foram imersas em uma solução de 0,1-mg·mL⁻¹ de colágeno humano tipo I por 24 h à 4 °C. As membranas resultantes (BNC–COL) foram lavadas com PBS três vezes e posteriormente foi realizada uma última lavagem com água deionizada.

2.4. Caracterização da BNC–COL

A técnica de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi utilizada para confirmar a presença de alterações específicas dos grupos funcionais em BNC–COL. Os espectros de infravermelho foram registrados em um espectrofotômetro Agilent (modelo Carry 600), com resolução de 4 cm⁻¹, no intervalo de 4000 – 600 cm⁻¹. Além disso, foi realizada a análise morfológica da superfície das membranas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) através do aparelho JEOL JSM-6390LV operando a 10kV.

2.5. Citotoxicidade

A citotoxicidade das membranas BNC–COL foi avaliada por contato direto, de acordo com a ISO 10993-05. Membranas de BNC foram utilizadas como controle. Fibroblastos de camundongo imortalizados (L929) foram cultivados em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina. As células foram cultivadas com uma densidade de 9×10^3 células·cm⁻² em placas de 24 poços por 24 h em ambiente contendo 5% CO₂ à 37 °C. Posteriormente, membranas de BNC e BNC–COL foram adicionadas aos poços. Após 1, 3 e 7 dias de cultura a atividade metabólica das células foi avaliada pelo ensaio de MTS [3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sufofenil)-2H-tetrazólio] de acordo com as instruções (Promega Biotecnologia do Brasil, Ltda. (São Paulo, SP)). As placas de cultura foram mantidas em uma atmosfera umidificada a 5% de CO₂ à 37 °C durante 2 h. A absorbância das soluções sobrenadantes foi medida por leitor Micro ELISA a 490 nm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização da BNC–COL

A Figura 1 apresenta os espectros de FTIR das membrana de BNC e BNC-COL. O espectro da BNC apresenta bandas características desse material, onde a banda de absorção atribuída ao grupo hidroxila e a ligação de hidrogênio é observada em 3343 cm⁻¹ (Choi et al., 2004), presente também em BNC-COL. A confirmação da imobilização de colágeno nas membranas BNC–COL é feita através da identificação do grupamento amida I a 1652 cm⁻¹, além das bandas para amida II e III em 1523 cm⁻¹ e 1236 cm⁻¹ (Payne; Veis, 1988), respectivamente.

A morfologia da superfície das membranas foi analisada por MEV. A Figura 2a apresenta uma típica imagem de BNC, onde observa-se uma estrutura tridimensional bem organizada com poros interconectados, formada por uma rede entrelaçada de nanofibras. Essas características foram preservadas após a imobilização do colágeno, como pode ser visto na Figura 2b. Sendo assim, as propriedades e a aplicabilidade da BNC, que se devem às características citadas (Klemm *et al.*, 2011; Trovatti *et al.*, 2011), continuam presentes em BNC-COL. Nessa membrana, as fibras de colágeno aparentam estar dispostas de maneira

irregular, estando tanto na superfície como preenchendo a estrutura da nanocelulose. Os cristais que estão presentes na Figura 2b correspondem à presença de NaCl, como observado por Souza (2015).

Figura 1 – FTIR das membranas BNC e BNC-COL.

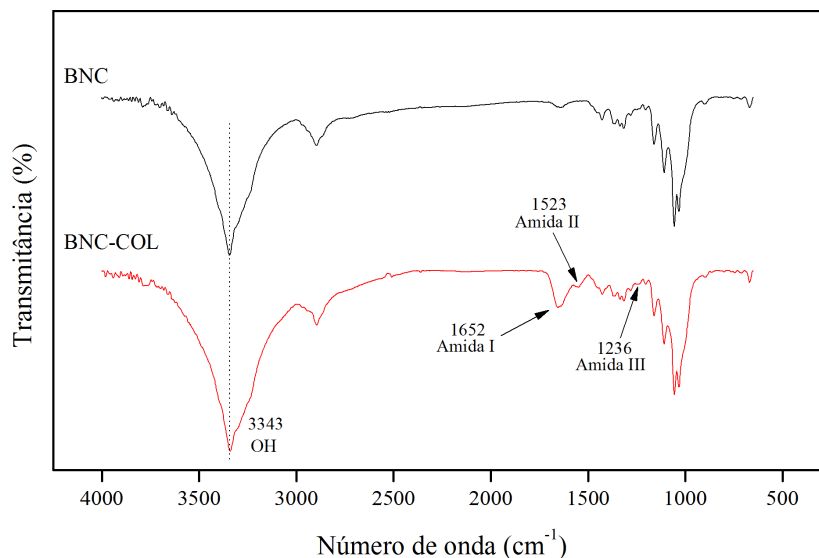
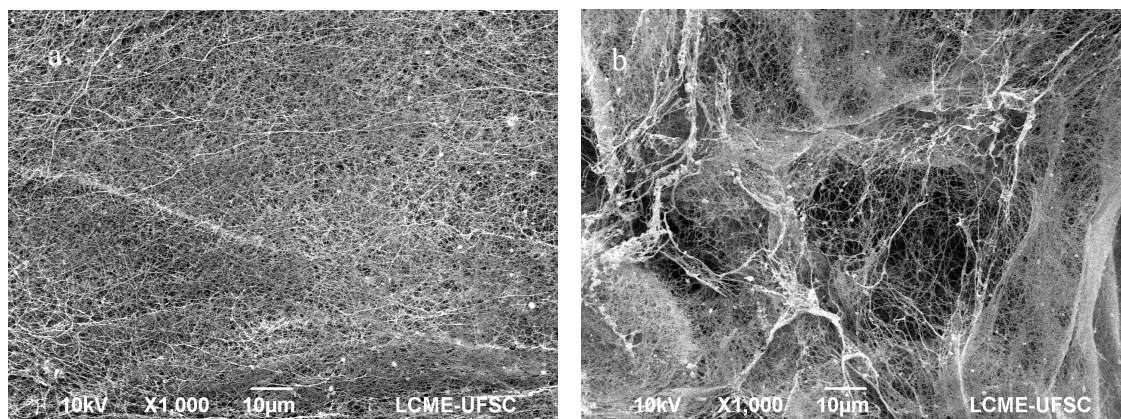


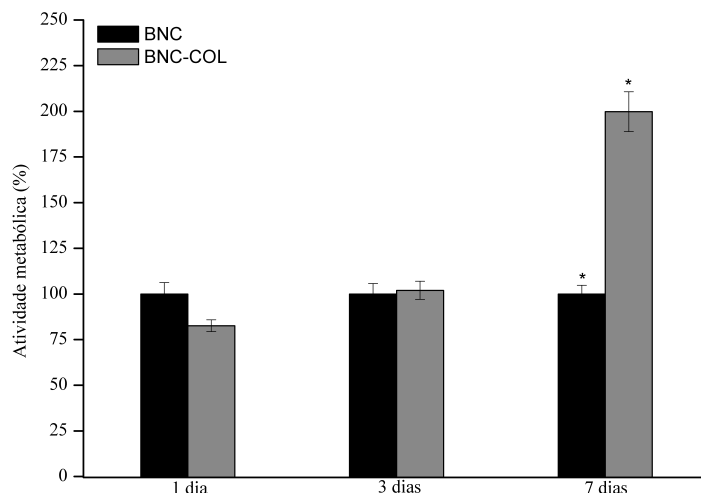
Figura 2 – MEV da superfície das membranas (a) BNC e (b) BNC-COL.



3.2. Citotoxicidade da BNC-COL

As membranas de BNC são consideradas materiais não citotóxicos, como constatado por Czaja e colaboradores (2007). Para analisar se a imobilização do colágeno interfere no potencial citotóxico das membranas de BNC foi realizado um ensaio de citotoxicidade. Os resultados obtidos através do teste de MTS mostraram que as membranas de BNC e BNC-COL não induziram uma resposta citotóxica após 7 dias em contato com as células, de acordo com a norma ISO-10993-5: 2009. Após 1 e 3 dias de cultura, a atividade metabólica das membranas em contato com BNC e BNC-COL foram semelhantes. Entretanto, depois de 7 dias de cultura, houve um aumento significativo de 99,8% da atividade metabólica das células em contato com BNC-COL, se comparado à BNC (Figura 3).

Figura 3 – Atividade metabólica de células L929 após contato direto com as membranas de BNC e BNC-COL por 7 dias. * Diferença significativa, $P < 0.05$.



4. CONCLUSÃO

As membranas BNC-COL foram obtidas através de ligações covalentes entre os grupamentos amina do colágeno e carboxílicos da BNC. Os resultados do FTIR confirmaram a imobilização química do colágeno nas membranas produzidas e as imagens de MEV mostraram que essa imobilização não alterou a microestrutura do material. A análise de citotoxicidade confirmou que o material não afetou a atividade metabólica das células L929. Sendo assim, as membranas BNC-COL poderão ser vantajosas quando utilizadas para aceleração do processo de cicatrização de feridas.

5. REFERÊNCIAS

- BALAKRISHNAN, B.; JAYAKRISHNAN, A. Self-cross-linking biopolymers as injectable in situ forming biodegradable scaffolds. *Biomaterials*, v. 26, n. 18, p. 3941-3951, 2005.
- BRETT, D. A review of Collagen and Collagen-based Wound Dressings. *Wounds*, v.20, n. 12, p. 347-356, 2008.
- CHOI, Y.; AHN, Y.; KANG, M. S.; JUN, H. K.; KIM, I. S.; MOON, S. H.. Preparation and characterization of acrylic acid-treated bacterial cellulose cation-exchange membrane. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, v. 79, p. 79-84, 2004.
- CZAJA, W. K.; YOUNG, D. J.; KAWECKI, M.; BROWN, R. M. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. *Biomacromolecules*, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2007.
- FIELD, F.K.; KERSTEIN, M.D. Overview of wound healing in a moist environment. **The American Journal of Surgery**, v. 167, n. 1^A, p. 2S-6S, 1994.
- International Organization for Standardization, “Biological Evaluation of Medical Devices Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity,” *Iso 10993-5*, vol. 5, pp. 1 – 52, 2009.

- KLEMM, D.; KRAMER, F.; MORITZ, S.; LINDSTRÖM, T.; ANKERFORS, M.; GRAY, D.; DORRIS, A. Nanocelluloses: A new family of nature-based materials. *Angew. Chem. Int. Ed.*, v. 50, n. 24, p. 5438-66, 2011.
- KUMAR, V.; YANG, T. HNO₃/H₃PO₄-NANO₂ mediated oxidation of cellulose - Preparation and characterization of bioabsorbable oxidized celluloses in high yields and with different levels of oxidation. *Carbohydr. Polym.*, v. 48, n. 4, p. 403–412, 2002.
- KWAK, M. H.; KIM, J. E.; GO, J.; KOH, E. K.; SONG, S. H.; SON, H. J.; KIM, H. S.; YUN, Y. H.; JUNG, Y. J.; HWANG, D. Y. Bacterial cellulose membrane produced by *Acetobacter* sp. A10 for burn wound dressing applications. *Carbohydr. Polym.*, v. 122, p. 387-398, mai. 2005.
- LEE, C. H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. *Int. J. Pharm.* v. 221, n. 1, p. 1-22, 2001.
- LI, W.; GUO, Y.; WANG, H.; SHI, D.; LIANG, C.; YE, Z.; QING, F.; GONG, J. Electrospun nano fibers immobilized with collagen for neutral stem cells culture. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, v. 19, p. 847-854, 2008.
- LIU, T. Y.; LIN, W. C.; HUANG, L. Y.; CHEN, S. Y.; YANG, M. C. Hemocompatibility and anaphylatoxin formation of protein-immobilizing polyacrylonitrile hemodialysis membrane. *Biomaterials*, v. 26, n. 12, p. 1437–1444, 2005.
- LU, T.; LI, Q.; CHEN, W.; YU, H. Composite aerogels based on dialdehyde nanocellulose and collagen for potential applications as wound dressing and tissue engineering scaffold. *Compos. Sci. Technol.*, v. 94, p. 132-138, 2014.
- MUANGMAN, P.; OPASANON, S.; SUWANCHOT, S.; THANGTHED, O. Efficiency of microbial cellulose dressing in partial-thickness burn wounds. *J. Am. Col. Certif. Wound Spec.*, v. 3, p. 16–9, 2011.
- PAYNE, K. J.; VEIS, A. Fourier Transform IR Spectroscopy of Collagen and Gelatin Solution: Deconvolution of the Amide I Band for Conformational Studies. *Biopolymers*, v. 27, p. 1749-1760, 1988.
- RAMBO, C. R.; RECOUVREUX, D.O.S.; CARMINATTI, C.A.; PITLVANCIV, A.K.; ANTÔNIO, R. V.; PORTO, L. M. Template assisted synthesis of porous nanofibrous cellulose membranes for tissue engineering. *Mater Sci Eng C*, v. 28, n. 4, p. 549-554, 2008.
- SOUZA, D. J. de. **Incorporação de colágeno de rã-touro em membranas de nanocelulose visando aplicação em medicina regenerativa.** 2015. 115 f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina.
- TROVATTI, E.; SERAFIM, L. S.; FREIRE, C. S. R.; SILVESTRE, A. J. D.; NETO, C. P. *Gluconacetobacter sacchari*: An efficient bacterial cellulose cell-factory. *Carbohydr. Polym.*, v. 86, n. 3, p. 1417-1420, 2011.