

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE BIOTECNOLOGIA
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA MOLECULAR
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

LUCAS ROVERÉ FRANZ

Produção em Escala Piloto da Proteína Recombinante Jaburetox e
Desenvolvimento de Curativos Bioativos a partir de Matrizes de Poli(ácido
lático) e Jaburetox

Porto Alegre

2018

LUCAS ROVERÉ FRANZ

**PRODUÇÃO EM ESCALA PILOTO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE
JABURETOX E DESENVOLVIMENTO DE CURATIVOS BIOATIVOS A
PARTIR DE MATRIZES DE POLI(ÁCIDO LÁTICO) E JABURETOX**

Trabalho de Conclusão de Curso
submetido à Universidade Federal do Rio
Grande do Sul como parte dos requisitos
necessários para a obtenção do grau de
Bacharel em Biotecnologia, ênfase em
Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Giancarlo Pasquali

Co-orientadora: Dra. Fernanda Cortez Lopes

Porto Alegre

2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe por sempre me apoiar durante todo esse período de formação, não só com palavras, mas com ações.

Agradeço ao meu pai por me proporcionar as melhores condições para realizar a minha formação.

Agradeço ao meu irmão por proporcionar diversos momentos de descontração e estar sempre disposto a ajudar.

Agradeço à Fernanda pela oportunidade de realizar esse projeto sob sua co-orientação. Também quero agradecer pelo conhecimento que ela me proporcionou, pela paciência, pelos diversos conselhos profissionais e pessoais, pelo seu otimismo nos piores momentos, pelo seu profissionalismo e empenho em fazer ciência de qualidade.

Agradeço ao Professor Giancarlo Pasquali pela orientação e pela oportunidade de realizar este trabalho.

Agradeço aos colegas de laboratório que sempre foram prestativos e transformaram o laboratório um ótimo local de trabalho.

Agradeço aos meus queridos amigos Nathan, Betina, Pozzebon, Brunno, Jacó, Tobias, Lucão e Lopes que me ajudaram em todos os momentos difíceis da graduação tornando-os leves e divertidos. Demonstrando que não importa o momento que estamos vivendo nunca estamos sozinhos.

Agradeço a minha namorada, Juliana, pelo carinho e por sempre me motivar a buscar os meus sonhos, não importando as dificuldades.

Agradeço aos professores que tive o privilégio de conhecer e aprender com suas posturas dentro e fora de uma sala de aula.

Agradeço à professora Marilene Vainstein, ao professor Daniel Weibel, ao professor Douglas Gamba e a professora Patrícia Pranke por disponibilizar seus laboratórios para realizar os estudos do projeto.

Agradeço às agências de fomento à pesquisa CAPES, CNPq e FAPERGS pelo apoio financeiro.

RESUMO

O uso de polímeros em aplicações biomédicas, principalmente na preparação de curativos, tem aumentado nos últimos anos e despertado interesse biotecnológico. Dentre os diversos polímeros existentes, o poli(ácido láctico) (PLA) tem apresentado um crescimento significativo em sua utilização na área médica por ser biodegradável, seguro e biocompatível. Um curativo constituído de PLA, além de apresentar tais características, pode ainda ser bioativo, caso seja incorporado a ele alguma biomolécula com propriedades biológicas, como é o caso da proteína recombinante Jaburetox. Este peptídeo recombinante vem sendo estudado por nosso grupo devido às suas atividades antifúngicas, inseticidas e antibacterianas. Desta forma, pela presente monografia teve-se como objetivos: 1) produzir Jaburetox em escala piloto, em biorreator de 5 L; 2) preparar matrizes de PLA e PLA com cetoconazol pela técnica de eletrofiação, com incorporação de Jaburetox de forma adsorvida ou covalente; 3) avaliar as matrizes quanto às suas propriedades antifúngicas utilizando *Candida albicans*; e 4) verificar a potencial aplicação como curativos bioativos pela viabilidade de queratinócitos humanos em contato com as matrizes. A produção em escala piloto de Jaburetox em biorreator apresentou um rendimento promissor, sendo até três vezes superior quando comparado com o obtido em escala laboratorial. Esse rendimento ainda pode ser otimizado, com melhor controle de determinados parâmetros do bioprocessamento. As matrizes de PLA contendo ou não o fármaco cetoconazol foram produzidas por meio da técnica de eletrofiação com sucesso. Contudo, as que possuíam o fármaco na sua composição apresentaram maior fragilidade em comparação com PLA puro. As matrizes de PLA e PLA/cetoconazol funcionalizadas por adsorção com Jaburetox apresentaram maior atividade antifúngica em relação às matrizes sem tratamento. Já as matrizes funcionalizadas por ligação covalente com o peptídeo apresentaram resultados contrastantes. As matrizes contendo apenas PLA foram ativas igualmente ao tratamento de adsorção, porém as contendo o fármaco não apresentaram atividade antifúngica. Provavelmente, o tratamento covalente das matrizes inativou o cetoconazol, sendo que as mesmas não apresentaram atividade contra a levedura. A viabilidade dos queratinócitos não

foi afetada pelas matrizes de PLA. Contudo, as matrizes de PLA/cetoconazol com Jaburetox adsorvido apresentaram leve toxicidade aos queratinócitos. Mais estudos deverão ser conduzidos com outros tipos celulares presentes na derme e epiderme a fim de confirmar a toxicidade das matrizes. Os dados obtidos neste trabalho permitiram demonstrar os possíveis potenciais biotecnológicos do biopolímero PLA e de Jaburetox para o desenvolvimento de curativos bioativos.

Palavras-chaves: poli(ácido láctico), *eletrospinning*, Jaburetox, curativos bioativos, biorreator.

ABSTRACT

The use of polymers in biomedical applications has increased in the past years and has aroused biotechnological interest mainly in the preparation of wound dressings. Among several existing polymers, polylactic acid presented a significant increase in medical utilization due to its biodegradability, safety and biocompatibility. PLA wound dressings, besides presenting such features, may still be bioactive if any biomolecule with biological properties is incorporated in its structure such as the recombinant protein Jaburetox. This recombinant peptide has been studied by our group due to its antifungal, insecticide and antibacterial activities. Thus, by this monograph we aimed: 1) to produce Jaburetox at pilot scale in a 5 L bioreactor; 2) to prepare scaffolds of PLA and PLA with ketoconazole, using the electrospinning technique, with the incorporation of Jaburetox in an adsorbed or covalent form; 3) to evaluate antifungal properties of the produced scaffolds using *Candida albicans*; and 4) to verify the potential application as bioactive dressings by the viability of human keratinocytes in contact with scaffolds. The production at pilot scale of Jaburetox in 5 L-bioreactor showed a promising yield, obtaining up to three times more Jaburetox when compared with laboratory scale. The better control of certain parameters of the bioprocess may optimize the final yield. PLA scaffolds containing or not ketoconazole were successfully produced by the electrospinning technique. However, PLA/ketoconazole scaffolds seem to be fragile in comparison with pure PLA. PLA and PLA/ketoconazole scaffolds functionalized with Jaburetox through adsorption presented greater antifungal activity compared to untreated scaffolds. Nevertheless, the scaffolds functionalized with the peptide through covalent treatment presented contrasting results. Scaffolds containing only PLA were equally active to the adsorption treatment. However, scaffolds containing ketoconazole did not show antifungal activity. Probably, the covalent treatment of scaffolds inactivated the drug and, consequently, the scaffolds were not active against the yeast. Keratinocytes viability was not affected by PLA scaffolds. On the other hand, PLA/ketoconazole scaffolds with adsorbed Jaburetox presented a slight toxicity towards keratinocytes. More studies should be conducted with other cell types

found in dermis and epidermis to confirm the toxicity of these scaffolds. The data obtained in this work allowed us to demonstrate the biotechnological potential of PLA biopolymer and Jaburetox to the development of wound dressings.

Key words: polylactic acid, electrospinning, Jaburetox, wound dressings, bioreactor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Visão geral bioquímica do ambiente de ferida aguda e crônica	18
Figura 2. Esquema representativo da técnica de <i>Electrospinning</i>	20
Figura 3. Representação estrutural da unidade repetitiva do PLA	23
Figura 4. Foto do fermentador <i>Infors Minifors</i> do fabricante INFORS HT.....	34
Figura 5. Equipamento de <i>Eletrospinning</i> com seringa contendo solução polimérica.....	38
Figura 6. <i>Western Blot</i> com as amostras (0 a 5 h) coletadas do bioprocesso para a produção de Jaburetox realizado por 10 h.....	42
Figura 7. <i>Western Blot</i> com as amostras (6 a 10 h) coletadas do bioprocesso para a produção de Jaburetox realizado por 10 h.....	42
Figura 8. Acompanhamento da biomassa, da densidade óptica e do pH durante o bioprocesso para a produção de Jaburetox	43
Figura 9. Acompanhamento das unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL) de <i>Escherichia coli</i> BL21 RIL durante o bioprocesso para a produção de Jaburetox.....	45
Figura 10. <i>Western Blot</i> das amostras coletadas durante o bioprocesso para a produção de Jaburetox.....	46
Figura 11. Purificação da proteína recombinante Jaburetox por cromatografia de exclusão por tamanho utilizando Superdex 200.....	47
Figura 12. Funcionalização das matrizes com superfície ativada e acoplamento do peptídeo Jaburetox utilizando os reagentes EDC e NHS.....	49
Figura 13. Ensaio de unidades formadoras de colônia para <i>Candida albicans</i> incubada com as matrizes de PLA com Jaburetox adsorvido e covalentemente ligado.....	50
Figura 14. Ensaio de unidades formadoras de colônia para <i>Candida albicans</i> incubada com as matrizes de PLA/cetoconazol com Jaburetox adsorvido e covalentemente ligado	51

Figura 15. Ensaio de viabilidade celular de queratinócitos (HaCaT) pelo método de MTT após incubação por 48 h com matrizes de PLA..... 54

Figura 16. Ensaio de viabilidade celular de queratinócitos (HaCaT) pelo método de MTT após incubação por 48 h com matrizes de PLA/cetoconazol . 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de biopolímeros e suas características.....	22
Tabela 2. Categorias de aplicação biomédicas e biotecnológicas do polímero PLA.....	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
°C	Graus Celsius
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar, do inglês, complementary deoxyribunucleic acid
cm	Centímetro
DMEM	Meio de Eagle modificado da Dulbecco, do inglês, <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade Ótica
EDC/NHS	N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida/N-hidroxisuccinimida)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético, do inglês, <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
g	grama
h	Hora
Hz	Hertz
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo, do inglês, <i>isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>
JBU	Urease de feijão-de-porco, do inglês, <i>jack-bean urease</i>
JBURE-II	Urease de feijão-de-porco II
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
L	Litros

LB	Meio de cultura Luria Bertani
lpm	Litros por minuto
M	Molar
min	Minutos
µg	Micrograma
mg	Miligrama
mm	Milimetro
mm/h	Milimetro por hora
µM	Micromolar
mM	Milimol
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio, do inglês, <i>3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide</i>
nm	Nanômetro
<i>p</i>	Probabilidade de Significância
PBS	Tampão Fosfato Salino
PLA	Poli(ácido láctico), do inglês, <i>polylactic acid</i>
pH	Potencial de Hidrogênio, do inglês, potential hydrogen
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
rpm	Rotações por minuto
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida-Dodecil Sulfato de Sódio, do inglês, polyacrylamide gel electrophoresis
TCEP	Tris(2-carboxietil)fosfina, do inglês, tris(2-carboxyethyl)phosphine
tRNAs	RNA (ácido ribonucleico) transportador, do inglês, ribonucleic acid transportation
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

UV Ultravioleta

V Volts

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. BIOCURATIVOS	17
1.2. BIOMATERIAIS.....	21
1.2.1. Poli(ácido láctico) – PLA –.....	23
1.3. UREASES.....	25
1.3.1. Ureases de feijão-de-porco (<i>Canavalia ensiformis</i>)	26
1.3.2. Peptídeo recombinante Jaburetox	27
1.4. EXPRESSÃO HETERÓLOGA E BIOPROCESSO	27
2. JUSTIFICATIVA	30
3. OBJETIVOS	31
3.1. Objetivos Gerais:.....	31
3.2. Objetivos Específicos:.....	31
4. METODOLOGIA.....	32
4.1. Produção e Purificação da Proteína Recombinante Jaburetox.....	32
4.2. Bioprocesso	33
4.3. Determinação do Crescimento de Biomassa Bacteriana.....	35
4.4. Determinação de Unidades Formadoras de Colônia por mL (UFC/mL) e Estabilidade do Plasmídeo.....	35
4.5. Determinação da Densidade Óptica	36
4.6. <i>Western Blot</i>	36
4.7. Preparação das Matrizes de PLA.....	36
4.8. Matriz de PLA Funcionalizada com Jaburetox Adsorvido e Ligado Covalentemente.....	38
4.9. Atividade Antifúngica.....	39
4.10. Viabilidade Celular de Queratinócitos (HaCaT) Humanos	40
5) RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1. Bioprocesso	41
5.2. Potencial Antifúngico das Matrizes Contendo Jaburetox Adsorvido e Covalentemente Ligado	48
5.3. Viabilidade de Queratinócitos em Contato com as Matrizes de PLA e PLA Contendo Cetoconazol.....	53
6. CONCLUSÕES	56

7. REFERÊNCIAS..... 58

1. INTRODUÇÃO

1.1. BIOCURATIVOS

A pele tem como função primordial proteger nosso organismo das ameaças presentes na interação entre o ambiente e o corpo. Essa interação pode gerar alguns danos ou ferimentos leves que são facilmente revertidos ou curados. No entanto, alguns desses danos podem ser mais complexos e para que ocorra o processo de cicatrização são necessários tratamentos e cuidados mais intensos (LI et al., 2015). Os curativos convencionais, sintéticos ou naturais, como gaze e algodão, têm demonstrado desvantagens tanto no processo de cura, deixando as feridas com baixa umidade, quanto no desconforto dos pacientes devido ao fato de aderirem à superfície das feridas (RADHAKUMARY; ANTONTY; SREENIVASAN, 2011). O desenvolvimento de novas metodologias para obtenção de curativos está permitindo a utilização de materiais com características que aumentam a taxa de cura e proteção das feridas (FONDER et al., 2008).

Uma ferida pode ser descrita como um defeito ou ruptura da pele. Sua causa pode estar ligada a danos físicos, químicos, térmicos ou por alguma condição fisiológica (ZAHEDI et al., 2010). Atualmente, as feridas são classificadas entre agudas e crônicas. As feridas agudas (Figura 1A) possuem um tempo menor de cicatrização, de oito a doze semanas, e são normalmente relacionadas a danos físicos ou térmicos (BOATENG et al., 2008). Já as feridas crônicas (Figura 1B) possuem uma difícil cicatrização, levando um tempo superior a doze semanas e estão relacionadas a condições fisiológicas como doenças ou infecções (BOATENG et al., 2008).

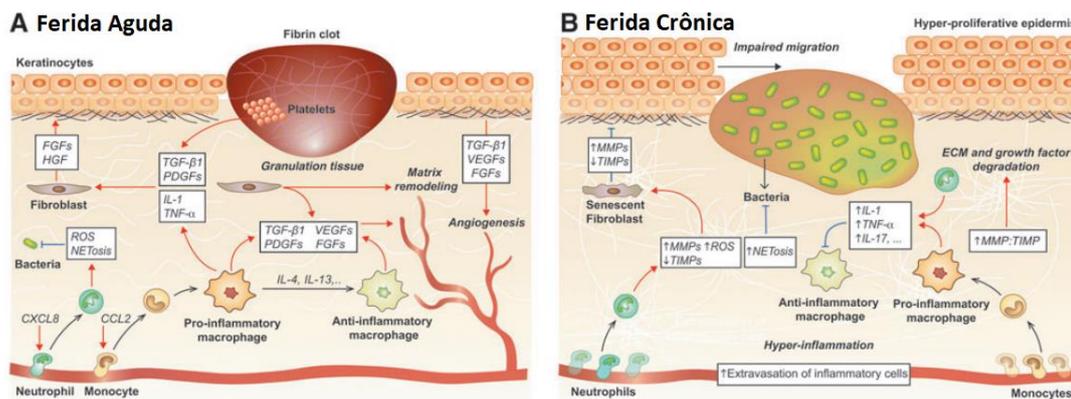


Figura 1. Visão geral bioquímica do ambiente de ferida aguda e crônica: (A) Ferida aguda com uma série coordenada de eventos divididos em quatro fases sobrepostas: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação tissular. (B) A ferida crônica apresenta elevado número de células inflamatórias e formação de biofilme que impede a restauração da homeostase tissular. Fonte: Larouche, Sheoran, Maruyama, & Martino, 2018, adaptado.

Os desafios do tratamento desses tipos de feridas e suas particularidades estimulam o desenvolvimento de materiais e a busca de novas moléculas para a criação de novos curativos, com maior proteção contra infecções e que contribuam com o processo de cicatrização. Esses curativos buscam abranger, por meio das suas características físicas e químicas, as particularidades necessárias para que ocorra de forma rápida e eficiente o processo de cicatrização das feridas. Dentre os curativos desenvolvidos que possuem propriedades interessantes estão os hidrocoloides, os hidrogéis e os biológicos (BOATENG et al., 2008; FLETCHER et al., 2011; FONDER et al., 2008).

Os curativos do tipo hidrocoloides são úmidos, possuem um suporte que pode ser um material semipermeável ou um filme e uma camada que pode conter géis biocompatíveis produzidos a partir de proteínas como colágeno e gelatina, por exemplo (FLETCHER et al., 2011). Essa camada em contato com a ferida absorve os fluídos e mantém, assim, a umidade na ferida (FLETCHER et al., 2011). Manter uma ferida úmida e quente melhora o rendimento do processo de cura (BOATENG et al., 2008). Sua aplicação é aconselhada em feridas na fase de epitelização e na fase de granulação (DUMVILLE et al., 2012). Contudo, seu uso tem sido questionado em feridas infeccionadas devido ao seu potencial de manter a ferida úmida e com baixa taxa de oxigênio

(MCINTOSH, 2007). A semipermeabilidade dos curativos do tipo hidrocoloides, juntamente com a competição entre microrganismos e células corporais por nutrientes e oxigênio, geram um ambiente de hipóxia, fomentando a isquemia tissular. A presença do oxigênio e de suas espécies reativas é fundamental para o processo de cicatrização pois estão presentes na modulação da migração na adesão e na proliferação celular e na apoptose (CHAUDHURI et al., 2006). A falta de oxigênio também interfere na eficiência do sistema imunológico. Por exemplo, os leucócitos, importantes célula do sistema imunológico, por meio da NADPH oxidase, convertem o oxigênio em um íon superóxido e em espécies reativas de oxigênio que são letais para bactérias (HUNT et al., 2004).

Os hidrogéis são outra formulação que têm se destacado devido às suas características pois são compostos por um ou mais polímeros hidratados (FONDER et al., 2008). Além de apresentam permeabilidade à água, ao oxigênio e aos metabólitos, também possuem uma estrutura flexível e estável no ambiente de inchaço (AHMED, 2015). Sua flexibilidade os torna um material interessante pois podem ser aplicados e removidos sem grande interferência na ferida (FONDER et al., 2008). Permitem a troca e absorção da secreção presente nas feridas, o que confere um ambiente úmido e propício para o processo de cicatrização (CHENG et al., 2017). A aplicação de hidrogéis é aconselhada em feridas secas ou com baixa secreção porque o excesso de umidade pode danificar a pele na região periférica à ferida, dificultando o processo de cura do ferimento (BAKER, 2005).

Os curativos biológicos ou biocurativos são preparados a partir de biomateriais que atuam no processo de cicatrização ou na proteção da ferida contra microrganismos patogênicos (BOATENG et al., 2008). Normalmente são produzidos a partir de biopolímeros devido a suas características como bioadsorção, biodegradação e biocompatibilidade (AMASS et al., 1998). As características dos biopolímeros possibilitam a utilização da metodologia de eletrofiação (em inglês, *electrospinning*) para a produção de fibras, com intuito de desenvolver matrizes. Essa técnica é simples, robusta e possui um baixo custo para a produção de fibras com diâmetros que variam de nanômetros a

vários micrômetros e que podem conter fármacos ou outras moléculas bioativas em sua composição (CHOU; CARSON; WOODROW, 2015). A técnica consiste em gerar uma diferença de potencial entre a agulha de uma seringa contendo a solução do biopolímero e o coletor que normalmente é uma chapa de alumínio (Figura 2). O êmbolo é submetido a uma pressão e o jato contendo a solução, sob diferença de potencial, forma uma rede de fibras na superfície da chapa de alumínio (CHOU; WOODROW, 2017). Essas matrizes, além de atuarem como uma barreira física de proteção para as feridas, também podem ter incorporadas em sua estrutura moléculas bioativas e fármacos de interesse, os quais serão liberados de forma controlada na ferida (CHOU; WOODROW, 2017).

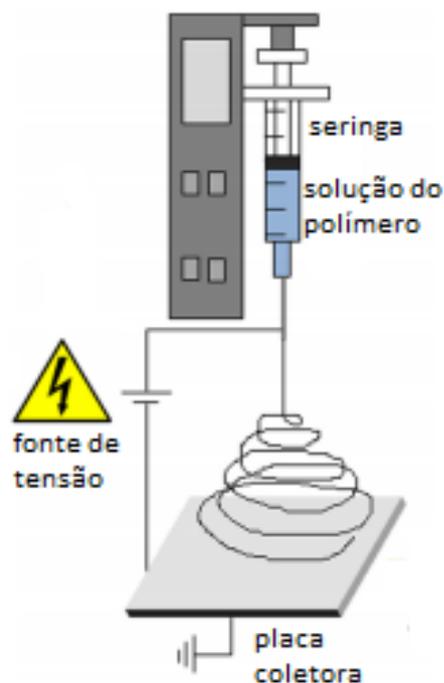


Figura 2: Esquema representativo da técnica de *Electrospinning*. Fonte: (FELGUEIRAS; AMORIM, 2017), adaptado.

1.2. BIOMATERIAIS

A crescente demanda pelo desenvolvimento de novos produtos com maior eficiência, sustentabilidade e qualidade está fomentando a utilização de biomateriais principalmente na área médica, em produtos de uso humano e animal. Nos últimos anos, houve um aumento no interesse do desenvolvimento de biomateriais biodegradáveis e com biocompatibilidade a sistemas biológicos (NAIR & LAURENCIN, 2007).

Um biomaterial tem por definição “ser qualquer substância natural ou sintética desenvolvida para interagir com sistemas biológicos, causando nenhum ou mínimo tipo de reação alérgica, inflamatória ou tóxica quando em contato com tecido ou fluído orgânico” (ULERY et al., 2011). Os biomateriais possuem uma composição variada, podendo ser polímeros naturais ou artificiais, cerâmicas e metais. Sua utilização tem como objetivo tratar ou substituir órgãos e tecidos, cuja função foi afetada (HOLZAPFEL et al., 2013). Na Tabela 1 encontram-se alguns exemplos de biopolímeros.

Tabela 1: Exemplos de biopolímeros e suas características

Biopolímero	Composição	Características
Celulose	β -(1 \rightarrow 4)-D-glicose	- Hidrofílica -Propriedades dependem do comprimento da cadeia
Amido	Resíduos de D-glicose ligados por ligações glicosídicas α -(1,4)	- Solúvel em água aquecida - Viscoso, gelatinização
Quitosana	β -(1,4)-2-amino-desoxi-D-glicose	- Solúvel em solventes ácidos - Bioadesivo para superfícies carregadas negativamente - Biodegradável
Xantana	$C_{35}H_{49}O_{29}$	- Alta viscosidade
β -Glicana	Monômeros de D-glicose ligados por ligações β -glicosídicas	- Ativação imunológica em humanos - Capacidade de absorção do colesterol
Poli(ácido láctico)	$(C_3H_4O_2)_n$	- Biodegradável - Baixa imunogenicidade

Fonte: CHANG et al., 2016, adaptado.

Os polímeros naturais destacam-se entre os biomateriais pois apresentam características que abrangem tanto eficiência quanto

sustentabilidade, tornando-os ótimos candidatos para o desenvolvimento de novos produtos na área médica. Sua degradação é resultado da ação de microrganismos que, em alguns casos, pode ocorrer dentro de semanas ou meses (BRITO et al., 2011).

1.2.1. Poli(ácido lático) – PLA

A aplicação de polímeros como biomateriais tem contribuído com o avanço da medicina e o desenvolvimento de novos produtos biodegradáveis. Além disso, também pode-se ressaltar a baixa interferência, ou praticamente nula, dos biopolímeros com os fármacos ou com as moléculas bioativas, o que os torna interessantes carreadores dos mesmos (CHRASTINA; MASSEY; SCHNITZER, 2011). O poli(ácido lático) ou PLA está entre os polímeros que se destacam (Figura 3).

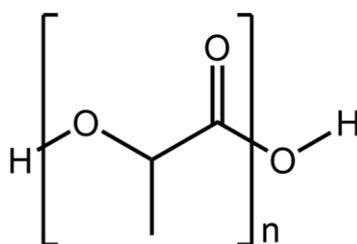


Figura 3: Representação estrutural da unidade repetitiva do PLA

Fonte: Autor

O PLA é um polímero biodegradável e sua decomposição gera subprodutos atóxicos como ácido lático, dióxido de carbono e água (DRUMOND et al., 2004). Possui uma longa história de segurança em uso humano e é aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos para uso em suturas, implantes ósseos e vacinas. Apresenta baixa imunogenicidade, bioabsorvidade e propriedades físico-químicas e mecânicas apropriadas para uso em diferentes dispositivos médicos-hospitalares (TYLER & GULLOTTI, 2016.). Pode dar origem a um polímero antimicrobiano pois

permite a incorporação de biomoléculas ou extratos com ação antimicrobiana, as quais podem inibir a multiplicação de fungos e bactérias (ERDOHAN; ÇAM; TURHAN, 2013). Essa característica é de grande interesse pois minimiza os problemas ao meio ambiente, reduzindo a toxicidade residual desses fármacos, ao mesmo tempo aumentando a eficiência e a seletividade contra os microrganismos (P PAWAR et al., 2014). Na Tabela 2 são elencadas algumas aplicações do PLA.

Tabela 2: Categorias de aplicação biomédicas e biotecnológicas do polímero PLA.

Categoria	Aplicação
Ortopédico	<ul style="list-style-type: none"> - Regeneração de lesão do nervo periférico e medula espinhal - Parafusos bioabsorvíveis - Reparo de menisco - Regeneração óssea guiada
Cárdico	<ul style="list-style-type: none"> - Reconstrução da parede torácica
Odontológico	<ul style="list-style-type: none"> - Regeneração tecidual guiada - Enchimentos biocompatíveis
Cirurgia Plástica	<ul style="list-style-type: none"> - Suturas - Preenchimentos dérmicos - Enxerto de pele
Oncológica	<ul style="list-style-type: none"> - Liberação de fármacos - Nanopartículas - Micelas - Hidrogéis termorresistentes - Vacinas

Fonte: (TYLER et al., 2016), adaptado.

A capacidade do PLA de ser processado de diferentes formas proporciona uma vasta aplicação na área médica (P PAWAR et al., 2014).

Devido às suas características de biocompatibilidade e bioabsorvibilidade, o PLA é utilizado como implante para reconstruções ósseas, atuando como suporte no qual os osteoblastos podem multiplicar, crescer e mineralizar (SUPRONOWICZ et al., 1996). Por meio da eletrofiação, esse biomaterial pode ser utilizado para o desenvolvimento de matrizes, explorando as características de bioadsorção e biocompatibilidade. Sendo assim, o PLA torna viável a produção de um biocurativo que contém, em sua estrutura, biomoléculas ou fármacos de interesse.

1.3. UREASES

As ureases são metaloenzimas amplamente distribuídas na natureza, sendo isoladas de plantas, fungos e bactérias (MOBLEY et al., 1989; SIRKO & BRODZIK, 2000; Follmer, 2008). No entanto, não são sintetizadas por animais. São responsáveis pela catálise da hidrólise da ureia que resulta na formação de amônia e dióxido de carbono. A ureia, substrato da reação, é amplamente disponível, estando presente na urina de animais, na decomposição de compostos nitrogenados de organismos mortos e em fertilizantes. Portanto, a produção de ureases possibilita que os organismos utilizem fontes exógenas e endógenas de ureia como fonte de nitrogênio para suas demandas metabólicas (FOLLMER, 2008; KRAJEWSKA, 2009; MOBLEY; HAUSINGER, 1989).

As ureases são sintetizadas por bactérias de solo e bactérias anaeróbicas que estão presentes no trato digestório de ruminantes, contribuindo na reciclagem de compostos nitrogenados (POLACCO; HOLLAND; OTHERS, 1993). São fatores de virulência de infecções humanas do trato gastrointestinal e urinário, possibilitando a sobrevivência em pH desfavorável a estes organismos por promover a alcalinização do meio (MOBLEY et al., 1995). Em plantas, as ureases são encontradas em todos os tecidos, com maior abundância nas sementes (POLACCO & HOLLAND, 1993; SIRKO & BRODZIC, 2000). Sua principal função é a hidrólise da ureia. No entanto, nos últimos anos, outras atividades biológicas tem sido atribuídas às ureases como

antifúngica e inseticida, entre outras, as quais são independentes da atividade ureolítica (CARLINI & LIGABUE-BRAUN, 2016).

1.3.1. Ureases de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*)

A semente de feijão-de-porco, *Canavalia ensiformis*, contém três isoformas de ureases conhecidas por JBU ou JBURE-I (de *Jack bean urease*; SUMNER, 1926), JBURE-II (PIRES-ALVES et al., 2003; MULINARI et al., 2011) e canatoxina (CARLINI & GUIMARÃES, 1981; FOLLMER et al., 2001). A JBU, uma das primeiras ureases estudadas, possui massa molecular de 90,77 kDa e uma cadeia peptídica de 840 aminoácidos (Zerner, 1991). Os estudos dessa isoforma de urease resultaram em importantes descobertas, dentre elas o fato de serem enzimas de origem proteica e que podem ser cristalizadas (SUMNER, 1926) e a do papel biológico do íon de níquel (Ni^{2+}) encontrado em seu sítio ativo, classificando-as como metaloenzimas (DIXON et al., 1975). A isoforma JBURE-II teve seu cDNA clonado em *Escherichia coli* (MULINARI et al., 2011; PIRES-ALVES et al., 2003), sendo esta bactéria capaz de expressar a isoforma com a mesma massa molecular da JBU. Por fim, a terceira isoforma, a canatoxina, apresenta massa molecular de 95 kDa, sendo que em seu sítio ativo estão presentes níquel e zinco (CARLINI & GUIMARÃES, 1981).

A canatoxina apresenta atividade antifúngica (OLIVEIRA et al., 1999) e inseticida (CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002), dentre outras atividades (CARLINI & LIGABUE-BRAUN, 2016). A ativação proteolítica das ureases pelo sistema digestório dos insetos foi demonstrada *in vitro* utilizando-se enzimas digestivas de *Callosobruchus maculatus* para melhor entendimento do mecanismo que confere a ação entomotóxica. Foram gerados peptídeos *in vitro*, sendo os mesmos testados contra *Rhodnius prolixus*. O peptídeo ativo derivado da canatoxina foi denominado pepcanatox (FERREIRA-DASILVA et al., 2000). Baseado na sequência N-terminal deste peptídeo e utilizando como molde o cDNA da isoforma JBURE-II obteve-se, por expressão heteróloga em *E. coli*, um peptídeo recombinante denominado Jaburetox 2Ec (MULINARI et al., 2007). Este peptídeo continha, além da cauda de histidinas, um epitopo viral V5, proveniente do vetor de clonagem. Recentemente, foi realizada uma

nova clonagem e expressão em *E. coli* do peptídeo, em um novo vetor, o qual gera um peptídeo apenas com a cauda de histidinas, sendo este denominado apenas como Jaburetox (POSTAL et al., 2012).

1.3.2. Peptídeo recombinante Jaburetox

Jaburetox apresenta atividade inseticida contra uma ampla diversidade de insetos, inclusive os que eram resistentes às isoformas de urease (CARLINI & LIGABUE-BRAUN, 2016). Além disso, Jaburetox apresenta atividade antifúngica contra fungos de importância agrônômica e médica (POSTAL et al., 2012). Essa atividade fungitóxica deve-se à permeabilização de membranas das leveduras, a alterações no transporte de H⁺ e no metabolismo energético (POSTAL et al., 2012). Recentemente, a atividade antibacteriana desse peptídeo foi descrita contra bactérias de importância clínica (BECKER-RITT; PORTUGAL; CARLINI, 2017). Sua estrutura tridimensional foi elucidada, sendo caracterizada como da família das proteínas intrinsecamente desordenadas. Possui estabilidade perante uma ampla faixa de pH e elevada termoestabilidade (LOPES et al., 2015). Não apresentou toxicidade a ratos e camundongos quando administrada por via oral ou peritoneal, com doses cinco vezes maiores do que aquelas testadas com a canatoxina (MULINARI et al., 2007). Estas características tornam este peptídeo recombinante de grande interesse biotecnológico, em particular no controle de infecções fúngicas e bacterianas, sendo um excelente candidato a ser utilizado no desenvolvimento de curativos bioativos.

1.4. EXPRESSÃO HETERÓLOGA E BIOPROCESSO

A necessidade constante de desenvolver processos e produtos mais eficientes aliados aos interesses de atividades mais sustentáveis tornam as biomoléculas um promissor campo de estudos. A extração e a purificação de biomoléculas tratava-se de um processo custoso, trabalhoso e pouco rentável, uma vez que eram necessárias dezenas de quilogramas de matéria-prima para obtenção de microgramas da molécula de interesse. Felizmente, após o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, o processo tornou-se

mais rentável, permitindo o estudo e a aplicação de diversas biomoléculas. O organismo mais comumente utilizado como célula hospedeira tem sido a *E. coli* (ROSANO & CECCARELLI, 2014). As características como rápido crescimento celular aliado com o extenso conhecimento da fisiologia e do metabolismo e os avanços na manipulação genética tornam *E. coli* um sistema de expressão muito versátil (SWARTZ, 2001). As características da célula hospedeira são fundamentais para obter um sistema de expressão eficiente. A escolha do promotor adequado, a estabilidade do plasmídeo, a frequência de códons e as modificações pós-traducionais devem ser levadas em consideração (TRIPATHI, 2009).

A produção de peptídeos ou proteínas recombinantes em larga escala utilizando biorreatores é bastante explorada pela indústria com diferentes tipos de cultivos. O cultivo comumente utilizado para expressão de proteínas recombinantes por *E. coli* é do tipo submerso. Esse tipo de fermentação permite a utilização de métodos como o descontínuo (ou de batelada), descontínuo alimentado (ou de batelada alimentada) e contínuo. A batelada é quando o processo fermentativo ocorre até o consumo total dos nutrientes do meio, sem adição dos mesmos durante o processo fermentativo, tendo ao final do processo fermentativo somente o caldo fermentado (LIPOVSKY et al., 2016). A batelada alimentada difere um pouco pois, durante a fermentação, ocorre a adição de meio de cultura (TAPIA et al., 2017). Dessa forma, não há um novo inóculo, somente a adição de meio novo contendo os nutrientes para que o processo de fermentação continue ocorrendo. Por fim, o método contínuo baseia-se na adição de meio de cultura de forma constante e ao mesmo tempo em que o caldo fermentado é retirado, com manutenção do volume do bioprocessamento (LIMA et al., 2001).

A produção de biomoléculas como peptídeos recombinantes depende de muitas variáveis como o organismo de expressão, a temperatura, a disponibilidade de oxigênio, pH, agitação e meios de cultivo (BIRD et al., 2004; CORISDEO & WANG, 2004). Portanto, não há um sistema de expressão único que abranja de forma eficiente todas essas variáveis para todas as proteínas ou peptídeos recombinantes em *E. coli* (SCHUMANN & FERREIRA, 2004).

Cada biomolécula necessita de diversos estudos para atingir a eficiência de expressão desejada pelas indústrias.

A complexidade das variáveis presentes na expressão de proteínas recombinantes exige que o processo seja estudado e acompanhado nas escalas laboratorial, piloto e industrial. A regra para a ampliação da escala em bioprocessos é manter, nas diferentes escalas, as condições ótimas de cultivo (GERAATS, 1994).

Na escala laboratorial, os cultivos são de volumes menores, na faixa de até um litro, e normalmente são feitos em vidrarias como frascos do tipo Erlenmeyer. É nessa escala que são estabelecidas as condições ótimas de cultivo do organismo e definida a variável de interesse que possui maior sensibilidade às mudanças de escalonamento (CORTÉS et al., 2005).

A escala piloto é realizada em pequenos biorreatores que variam em volume entre três a dez litros. Existem muitos critérios de ampliação da escala baseados na similaridade necessária para se atingir a mesma eficiência obtida em escalas reduzidas. As similaridades geométrica, cinética, dinâmica, química e térmica são importantes critérios que devem ser observados de um escalonamento ao outro (GERAATS, 1994). A homogeneidade do sistema é outro parâmetro que sofre alteração quando ocorre a mudança de escala, a solubilidade do oxigênio também é afetada significativamente devido à pressão hidrostática gerada pelo maior volume do biorreator (WANG et al., 2015). Portanto, existem vários parâmetros a serem estudados e entendidos num cultivo que visa produzir compostos bioativos em escala piloto e, acima desta, em escala industrial (acima de 10 L).

2. JUSTIFICATIVA

A contaminação de ferimentos por microrganismos patogênicos ou oportunistas é um tema de grande preocupação à classe médica. Os pacientes após uma cirurgia apresentam, muitas vezes, sistema imunológico debilitado, tornando-se suscetíveis a infecções por microrganismos oportunistas. Os polímeros antimicrobianos têm surgido como uma opção para atenuar ou solucionar esse problema, com o intuito de reduzir a contaminação de materiais e pacientes. O desenvolvimento de curativos utilizando o polímero PLA, com ou sem cetozonazol na sua composição, em conjunto com as características antimicrobianas da proteína recombinante Jaburetox, mostra-se uma possível ferramenta na prevenção de infecções de pacientes recém operados ou com feridas crônicas como, por exemplo, diabéticos que sofrem frequentes amputações em função das feridas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais:

- Escalonamento da produção de Jaburetox em biorreator de 5 L.
- Produção de biocurativos utilizando a proteína recombinante Jaburetox como agente antifúngico contra *Candida albicans*.

3.2. Objetivos Específicos:

- Analisar os parâmetros para a produção de Jaburetox em biorreator de 5 L;
- Purificar Jaburetox utilizando cromatografias de afinidade e de gel filtração;
- Preparar as matrizes eletrofiadas de PLA e funcionalizar com Jaburetox por meio de adsorção e ligação covalente;
- Preparar as matrizes eletrofiadas contendo cetoconazol e funcionalizar com Jaburetox por meio de adsorção e ligação covalente;
- Avaliar a ação antifúngica das matrizes;
- Avaliar a viabilidade celular de queratinócitos humanos em contato com as matrizes por meio do método MTT.

4. METODOLOGIA

4.1. Produção e Purificação da Proteína Recombinante Jaburetox

Para a produção da proteína recombinante Jaburetox em escala laboratorial foram utilizadas células de *Escherichia coli* BL21(DE3) - RIL contendo o plasmídeo pET23a-*Jaburetox*. As células foram cultivadas em 40 mL de caldo Luria Bertani (LB) contendo 100 µg/mL de ampicilina e 40 µg/mL de cloranfenicol *overnight*. Todo o conteúdo foi inoculado em 1 L de meio de autoindução [10 g de triptona, 5 g de extrato de leveduras, 5 mg de glicerol, 3,3 g de (NH₄)₂SO₄, 6,8 g de KH₂PO₄, 7,1 g de NaHPO₄, 0,5 g de glicose, 2 g de lactose e 0,12 g de MgSO₄ por litro de água destilada], com 100 µg/mL de ampicilina e 40 µg/mL de cloranfenicol, divididos em 4 frascos Erlenmeyer de 1 L com 250 mL de meio e cultivados a 37 °C, 180 rpm, até absorvância a 600 nm de aproximadamente 0,7. As condições de indução foram *overnight*, 20 °C, 180 rpm. Devido às características de interesse biotecnológico do Jaburetox, também foi realizado um bioprocesso em escala piloto em fermentador de 5 L utilizando parâmetros adaptados a partir daqueles descritos em TOMAZETTO (2006) para a produção de Jaburetox 2-Ec, metodologia que será descrita em detalhes abaixo. Após o cultivo, as células foram centrifugadas a 8.000 x g durante 10 min a 4 °C. As células foram ressuspensas em tampão A (Tris-HCl a 50 mM, pH 7,5, 500 mM de NaCl e 20 mM de imidazol) e lisadas em sonicador de ponta por 20 ciclos de 1 min com frequência de 99 Hz. O sobrenadante foi separado por centrifugação a 15.000 x g por 40 min a 4 °C e adicionado à uma coluna de afinidade *Chelating Sepharose* (GE Healthcare) carregada com Ni²⁺, previamente equilibrada com tampão A. Foi efetuada lavagem da coluna com tampão B (Tris-HCl a 50 mM, pH 7,5, 500 mM de NaCl e 70 mM de imidazol) e a eluição foi realizada com tampão C (Tris-HCl a 50 mM, pH 7,5, 500 mM de NaCl e 500 mM de imidazol). A fração rica em Jaburetox foi transferida para uma coluna de cromatografia de exclusão por tamanho (*Hiload Superdex 200 26/60 Prep Grade*) pré-equilibrada com tampão D (fosfato de sódio a 50 mM, EDTA a 1 mM e Tris (2-carboxietil) fosfina – TCEP – a 1 mM), em um sistema *Äkta Purifier* (GE Life Technologies; Lopes et al., 2015 com pequenas modificações). A pureza da amostra foi

verificada por SDS-PAGE a 15 % e a concentração de proteína determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

4.2. Bioprocesso

O fermentador utilizado para executar o bioprocesso foi o *Infors Minifors* com capacidade de 5 L, do fabricante INFORS HT (Figura 4). O equipamento é um reator de tanque agitado, possui um bloco de alumínio com serpentina de refrigeração integrada para controle da temperatura, um amostrador, um agitador de pás planas (Rushton), uma entrada de ar comprimido, um eletrodo para controle do pH (previamente calibrado antes da esterilização), aparato controlador de espuma com injeção de antiespumante, um alimentador com bomba para adição de meio de cultura, ácidos e bases e um exaustor de CO₂.



Figura 4: Foto do fermentador *Infors Minifors* do fabricante INFORS HT. Fonte: Autor

O processo fermentativo foi realizado no laboratório de Biologia de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica, sob coordenação da professora Marilene H. Vainstein do Centro de Biotecnologia da UFRGS. O cultivo foi realizado utilizando as mesmas células do cultivo laboratorial. Para o pré-inóculo, as células foram cultivadas em 30 mL de caldo LB, ampicilina e cloranfenicol na mesma concentração do cultivo em escala laboratorial, por 5 h, a 37 °C, 150 rpm. Todo o conteúdo foi inoculado em 270 mL de caldo LB com ampicilina e cloranfenicol, *overnight*, 37 °C, 150 rpm para a realização do inóculo do reator. Após o cultivo, o mesmo foi inoculado em 2,7 L de meio de autoindução previamente autoclavado dentro do biorreator por 15 min, foram

adicionadas também ampicilina e cloranfenicol e cultivado a 37 °C, 400 rpm, aeração de 2 lpm (litros por minuto) – ar comprimido, até absorvância a 600 nm de aproximadamente 0,7. Após alcançar essa absorvância, a temperatura foi reduzida para 20 °C. O tempo de bioprocessamento foi de 5 h. Os parâmetros como pH, temperatura (parâmetros fornecidos pelo biorreator), Massa Seca, UFC/mL e densidade óptica (descritos abaixo) foram acompanhados a cada hora do bioprocessamento pela retirada de amostras em triplicata. A cada retirada de amostra, 10 mL do cultivo foram descartados. Com os resultados foram gerados gráficos considerando a média e o desvio padrão utilizando o programa *GraphPad Prism* (Versão 5.0 para Windows).

4.3. Determinação de Biomassa Bacteriana

Foram coletados 10 mL de amostra do biorreator divididos em tubos de microcentrífuga previamente pesados em balança analítica e centrifugados a 8.000 x g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de células foi mantido em estufa a 50 °C até atingir massa constante. Os valores obtidos de massa seca foram considerados para o volume de 3 L de bioprocessamento.

4.4. Determinação de Unidades Formadoras de Colônia por mL (UFC/mL) e Estabilidade do Plasmídeo

Foram coletadas amostras do biorreator para a realização da determinação de Unidades Formadoras de Colônia/mL pelo método de *Drop Plate*. Foram utilizados 20 µL de cada amostra, as quais foram submetidas a diluições seriadas em 180 µL de solução salina (NaCl a 0,85 %) realizadas em microplacas de 96 poços estéreis. As diluições foram semeadas em ágar LB contendo os antibióticos ampicilina e cloranfenicol nas mesmas concentrações utilizadas no cultivo e incubadas por 24 h a 37 °C (MARTINELLI et al., 2017).

4.5. Determinação da Densidade Óptica

Foram coletadas amostras para a determinação da densidade óptica pela leitura de absorbância no comprimento de onda de 600 nm utilizando o meio de autoindução como branco. As leituras foram realizadas no equipamento *NanoDrop 2000c* da Thermo Scientific.

4.6. Western Blot

As análises de *Western blot* foram realizadas de acordo com MARTINELLI et al. (2016). Foi realizado uma SDS-PAGE com gel de poliacrilamida a 15 % com as amostras dos tempos 0 a 5 h, sendo Jaburetox purificado utilizado como controle positivo. As bandas de proteína foram eletrotransferidas do gel para membrana de PVDF (Hybond-P, GE Healthcare), sendo a membrana previamente ativada em metanol. A eletrotransferência foi realizada por 1 h a 4 °C e 100 V. Ao término, as membranas foram bloqueadas por 2 h com 5 % de leite em pó desnatado em solução de Tris HCl (0,05 M), NaCl (0,15 M) – TBS -, lavada, após incubada com o anticorpo anti-Jaburetox preparado em coelho (1:7.500) em TBS com 5 % de leite e 0,05 % de Tween 20 por 2 h. Após, a membrana foi novamente lavada 3 vezes com TBS e, posteriormente, exposta ao anticorpo secundário anti IgG de coelho preparado em cabra e conjugado com fosfatase alcalina, (1:10.000) com TBS com 5 % de leite desnatado e 0,05 % de Tween 20. A detecção colorimétrica foi realizada utilizando 30 mM de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato *p*-toluidina e cloreto de tetrazólio-nitroazul a 0,75 mM.

4.7. Preparação das Matrizes de PLA

As matrizes foram construídas utilizando o equipamento de electrospinning, representado na figura 5. A solução de PLA a 11 % para o preparo das matrizes foi realizada a partir da solubilização de PLA comercial em uma mistura dos solventes diclorometano:etanol na proporção de 4:1. A

solução ficou em repouso *overnight* à temperatura ambiente para a completa solubilização do polímero. A preparação das matrizes contendo cetoconazol seguiu o mesmo protocolo de preparação da solução de PLA, com a adição de 1 g/L de cetoconazol (VERAS et al., 2016). As matrizes foram obtidas por meio de eletrofiação utilizando uma seringa de vidro de 10 mL a qual foi preenchida com solução polimérica e adaptada ao aparelho de eletrofiação. A solução foi ejetada a uma vazão de 20,5 mm/h, com umidade de aproximadamente 60 %, através de uma agulha de 0,7 mm de diâmetro. Entre a ponta da agulha e o coletor estático, separados por uma distância de 15 cm, foi aplicada uma diferença de potencial de aproximadamente 14 kV. O tempo de deposição do polímero sobre a placa coletora foi de aproximadamente 40 min para cada matriz. A cada 10 mL de solução polimérica, foi possível preparar três matrizes com diâmetro de 90 mm. A preparação das matrizes foi realizada no Laboratório Poli-BIO, sob coordenação do professor Daniel Weibel do Instituto de Química da UFRGS.

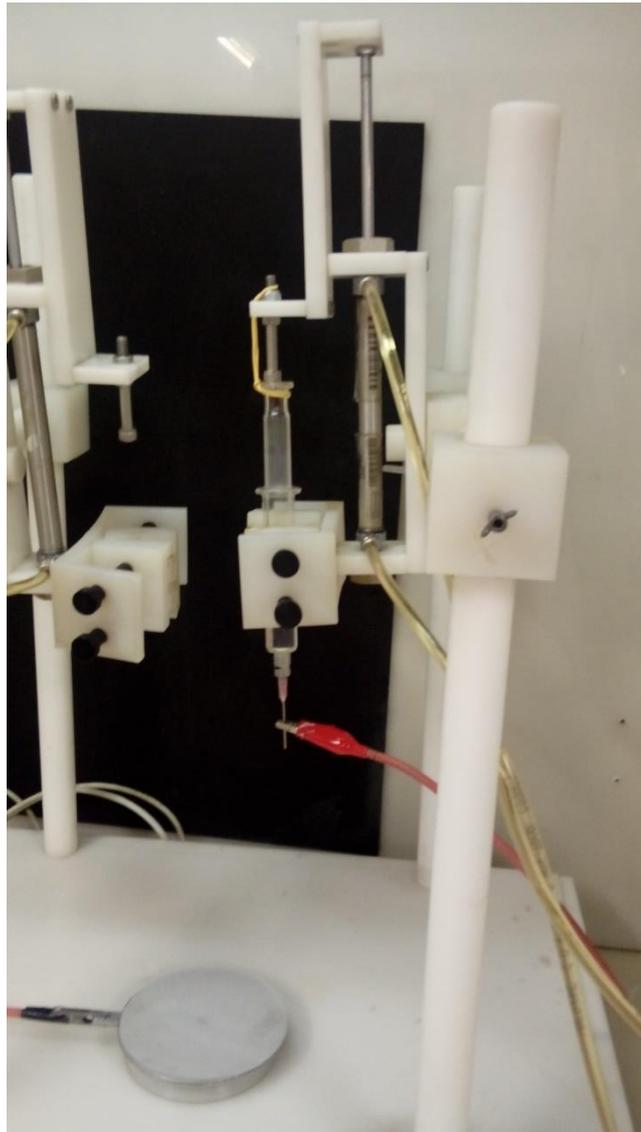


Figura 5: Equipamento de *Eletrospinning* com seringa contendo solução polimérica. Fonte: autor

4.8. Matriz de PLA Funcionalizada com Jaburetox Adsorvido e Ligado Covalentemente

As matrizes na dimensão de 1 x 1 cm foram tratadas com solução de NaOH a 0,5 M por 25 min e foram posteriormente lavadas com água destilada (8 lavagens e mais duas lavagens com PBS (tampão fosfato de sódio a 0,02 M, NaCl a 0,15 M, pH 7,5, por 10 min cada) e colocadas na estufa a 28 °C para secar *overnight*. Após o período de secagem, para o preparo das matrizes com Jaburetox adsorvido, as matrizes foram expostas a uma solução contendo Jaburetox na concentração de 33 μ M em tampão PBS durante 24 h. Por fim, o

excesso da solução foi removido, as matrizes foram lavadas com água destilada e colocadas na estufa a 28 °C para secar. Para o preparo de Jaburetox ligado covalentemente, as matrizes previamente tratadas alcalinamente foram tratadas com uma solução contendo os reagentes de acoplamento como o sistema N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida/N-hidroxisuccinimida (EDC/NHS) na concentração de 200 mM de EDC e 150 mM de NHS em tampão fosfato salino (PBS) por 3 h. Em seguida, o excesso desta solução foi removido e outra solução contendo Jaburetox na concentração de 33 µM, também em PBS, foi adicionada durante 24 h (GAMBA, 2013, com modificações). Por fim, o excesso foi removido, as matrizes foram lavadas com água destilada e mantidas em estufa a 28 °C *overnight*. As matrizes contendo cetoconazol foram submetidas aos mesmos tratamentos para a adição do Jaburetox.

4.9. Atividade Antifúngica

Candida albicans CE022 foi cultivada em placas de ágar Sabouraud por 24 h a 28 °C. Após o tempo de incubação, algumas colônias foram emulsionadas em caldo Sabouraud, homogeneizadas e as células quantificadas em câmara de Neubauer. As matrizes foram esterilizadas em luz ultravioleta (UV), em câmara de fluxo laminar, por 10 min para cada lado. Placas de 24 poços estéreis foram utilizadas para o ensaio. As matrizes foram incubadas com 10⁴ células/mL de *C. albicans* e caldo Sabouraud, com um volume final de 1 mL, a 28 °C por 24 h. Como controle negativo foi utilizada a matriz sem a incorporação de Jaburetox com tratamento alcalino e sem tratamento alcalino. Após 24 h de incubação, 20 µL da suspensão de células de cada poço foram diluídas seriadamente em solução salina e semeadas em placas contendo ágar Sabouraud pelo método de *Drop plate* para determinar o número de UFC/mL após incubação por 24 h a 28 °C (MARTINELLI et al., 2016). Os dados foram avaliados pelo teste de ANOVA, seguido do teste de Tukey, usando o *software GraphPad Prism* (Versão 5.0 para Windows). Um *p* < 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

4.10. Viabilidade Celular de Queratinócitos (HaCaT) Humanos

As matrizes de 1 x 1 cm de PLA e PLA/cetoconazol contendo Jaburetox adsorvido, além dos controles com e sem tratamento alcalino, foram esterilizadas em luz UV por 1 h cada lado e incubadas com 25.000 queratinócitos humanos (HaCaT) por poço, contados previamente em câmara de Neubauer em 1 mL de meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de penicilina: estreptomicina. As células em contato com as matrizes foram incubadas por 48 h em estufa a 37 °C com teor de 5 % de CO₂. Após 48 h, foi realizado o teste de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]). Os sobrenadantes dos poços de cultivo foram descartados e as células que estavam aderidas nas matrizes ou nos poços (controle negativo) foram incubadas com o reagente de MTT a 0,25 mg/mL por 4 h a 37 °C. Após este tempo de incubação, foram adicionados 500 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) – duas lavagens de 250 µL cada, incubados por 25 min sob agitação. Os resultados foram obtidos por meio do cálculo da diferença de absorbâncias obtidas nos comprimentos de onda de 630 nm e 570 nm. Estes testes foram realizados no Laboratório de Hematologia e Células Tronco da Faculdade de Farmácia da UFRGS sob coordenação da Professora Patricia Pranke.

5) RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Bioprocesso

Com o intuito de obter maior quantidade da proteína recombinante Jaburetox para fins de formulação de curativos a base de PLA foi realizado um bioprocesso em um fermentador submerso Minifors, sendo um cultivo do tipo batelada. Os parâmetros analisados durante o processo fermentativo a cada hora foram densidade ótica, biomassa seca, pH, temperatura e estabilidade do plasmídeo. Ao final do bioprocesso, foi calculado o rendimento e este foi comparado ao rendimento de um processo fermentativo de 1 L realizado em frasco Erlenmeyer com controle de temperatura e agitação de 180 rpm.

As células utilizadas foram *E. coli* BL21(DE3) – RIL (POSTAL et al., 2012) que permitem a expressão de sequências gênicas ricas em A/T em virtude de possuírem cópias extras de genes que codificam tRNAs capazes de reconhecer os respectivos códons ricos em A/T, o que frequentemente limita a tradução de proteínas heterólogas em *E. coli* (*Manual BL21-CodonPlus (DE3)-RIL Competent Cells by Agilent Technologies*). O plasmídeo utilizado foi o pET23a-Jaburetox (POSTAL et al., 2012) que apresenta como características o sistema de expressão T7, um gene que confere resistência à ampicilina (ampR), sequência codificadora de cauda de histidinas e o gene codificador do peptídeo Jaburetox (POSTAL et al., 2012).

O tempo de duração de 5 h do processo fermentativo realizado neste trabalho foi escolhido baseado nos resultados obtidos de um bioprocesso anterior, seguindo as mesmas análises e procedimentos, no entanto com duração de 10 h. De acordo com resultados de *Western blot*, a partir da 6ª hora ocorreu a maior formação da forma dimérica do Jaburetox, com prejuízo para a produção da forma monomérica (Figuras 6 e 7). Este fato foi considerado uma desvantagem pois o dímero de Jaburetox não apresenta atividades biológicas, de acordo com resultados preliminares do grupo, tornando-o inviável para os objetivos do trabalho.

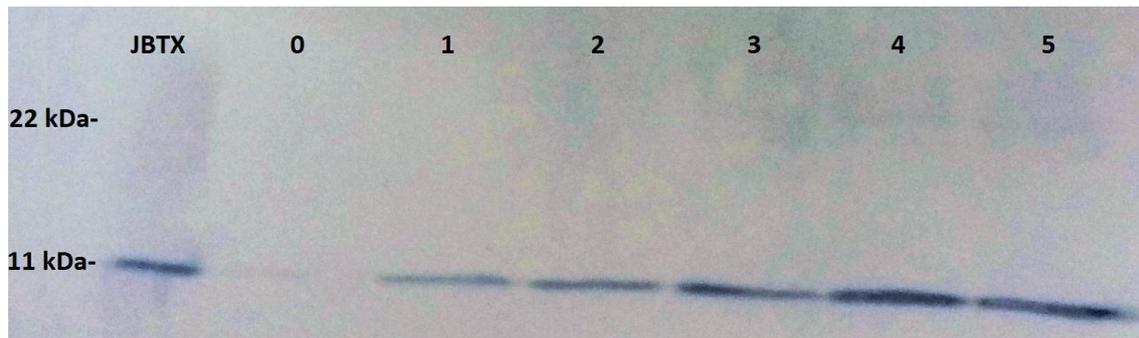


Figura 6: *Western blot* com as amostras (0 a 5 h) coletadas do bioprocesso para a produção de Jaburetox realizado por 10 h. Amostras, coletadas em triplicata, dos diferentes tempos de cultivo (0 a 5) e amostra purificada de Jaburetox (JBTX) como controle positivo.

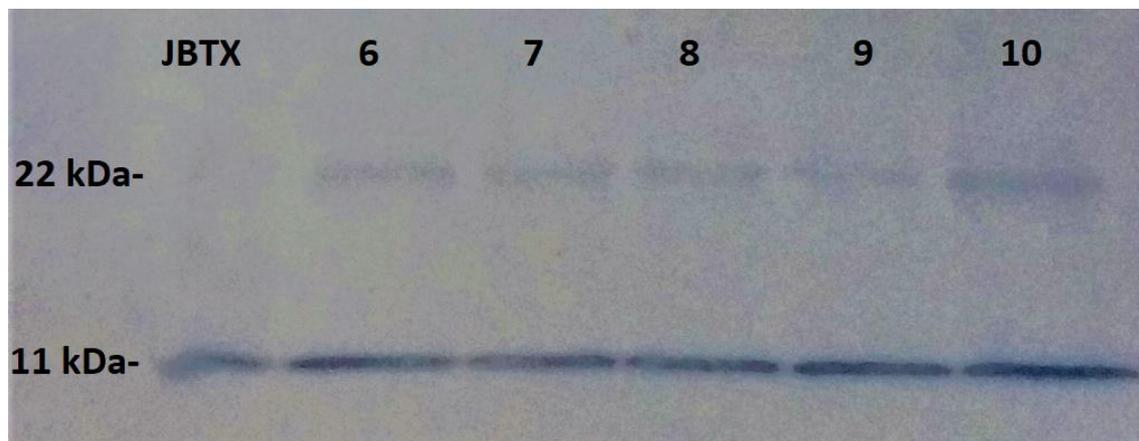


Figura 7: *Western blot* com as amostras (6 a 10 h) coletadas do bioprocesso para a produção de Jaburetox realizado por 10 h. Amostras coletadas em triplicata, dos tempos (6 a 10) e amostra purificada de Jaburetox (JBTX) como controle positivo.

Infelizmente, por problemas com o amostrador do reator, as amostras retiradas ao longo deste primeiro bioprocesso foram bastante variáveis, tornando-as inválidas para uma análise cinética. Portanto, parâmetros como densidade ótica, biomassa seca e UFC/mL não foram possíveis de serem analisadas. No entanto, foi constatada a viabilidade do plasmídeo e a produção da proteína recombinante durante todo o processo fermentativo (Figuras 6 e 7).

Em um segundo bioprocesso, com a retirada de 10 mL previamente à coleta da amostra, foi possível analisar os dados obtidos ao longo do

bioprocesso. A densidade ótica manteve-se crescente, de acordo com a Figura 8, demonstrando, assim, que durante todo o tempo observado do bioprocesso, o crescimento bacteriano manteve-se na fase exponencial, tendo como maior multiplicação os tempos de 1 e 2 h. A multiplicação acentuada apresentada neste intervalo também foi observada por COLLINS et al. (2013) e BABAEIPOUR et al. (2010) que utilizaram a bactéria *E. coli* BL21 (DE3). Somente o final da fase “Lag” (tempos 0 e 1) pode ser observado. Isto se deve provavelmente ao fato de termos realizado um inóculo com células já ambientadas e com metabolismo ativo. O decréscimo observado na variação positiva do processo demonstrou que o crescimento provavelmente estava direcionando-se para a fase estacionária, etapa em que as bactérias estabilizam a multiplicação (TORTORA et al., 2016). Portanto, apenas o final da fase “Lag” e a fase exponencial foram observadas. As fases estacionária e de decaimento não foram constatadas durante o tempo analisado do processo fermentativo. Os dados de biomassa concordam com os dados de densidade ótica, apresentando também uma pequena fase “Lag” e de multiplicação exponencial ao longo de todo o bioprocesso.

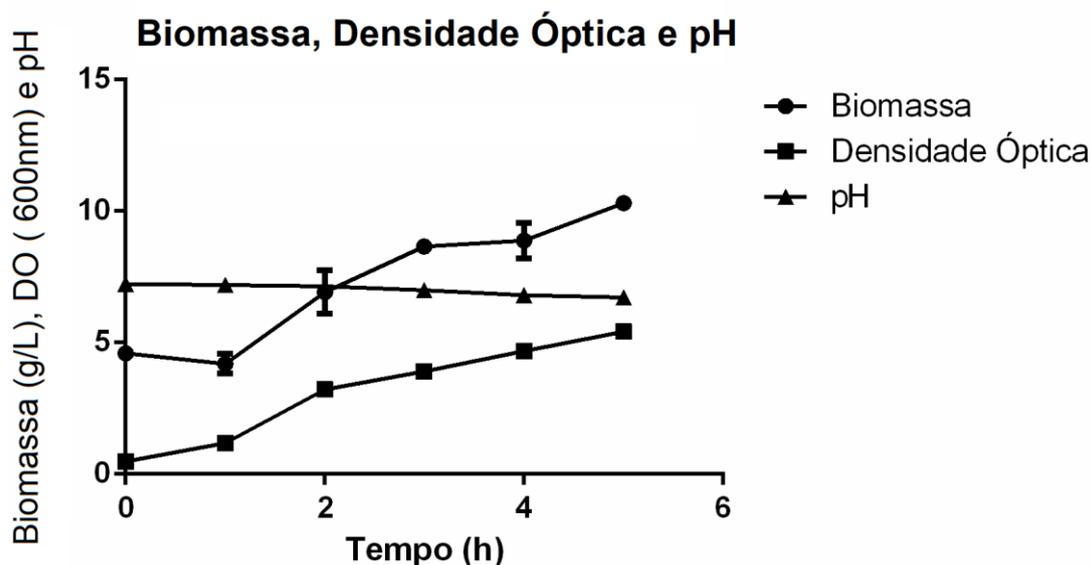


Figura 8: Acompanhamento da biomassa, da densidade ótica e do pH durante o bioprocesso para a produção de Jaburetox. Os valores representam médias aritméticas e desvios padrões das amostras coletadas em triplicatas.

O pH do cultivo variou pouco durante o processo fermentativo, sendo o pH inicial de 7,23 e o pH final de 6,72 (Figura 8). Provavelmente, em função da composição do meio de autoindução que contém fosfatos de sódio e potássio, houve o efeito de tamponamento do meio de cultivo. Não foi utilizado o recurso de correção de pH com ácidos e bases disponíveis no biorreator. Essa variação também foi diferente da observada em TOMAZETTO (2006) que obteve um pH final de 5,20 o qual comprometeu o crescimento da biomassa. Segundo TOMAZETTO (2006), a acidificação do meio provavelmente é decorrente do aumento da concentração do ácido acético, liberado durante a fermentação. Sabe-se que o acúmulo de ácido acético inibe a multiplicação de *E. coli*, o que resulta na diminuição ou estagnação da biomassa e interfere na síntese do peptídeo (DE MARÉ et al., 2005). Contudo, não é possível observar influência dessa variável na multiplicação bacteriana durante o tempo acompanhado no presente processo fermentativo.

Os resultados obtidos na determinação de Unidades Formadoras de Colônia (Figura 9) demonstram que ocorreu a multiplicação bacteriana mais acentuada a partir da 2ª hora. Este resultado contrariou os dados obtidos pelos dois experimentos anteriores, os quais apresentaram multiplicação exponencial já a partir da 1ª hora. Esta determinação foi importante para verificar a viabilidade celular durante o bioprocessamento, uma vez que as leituras de densidade óptica e a biomassa consideram também células inviáveis.

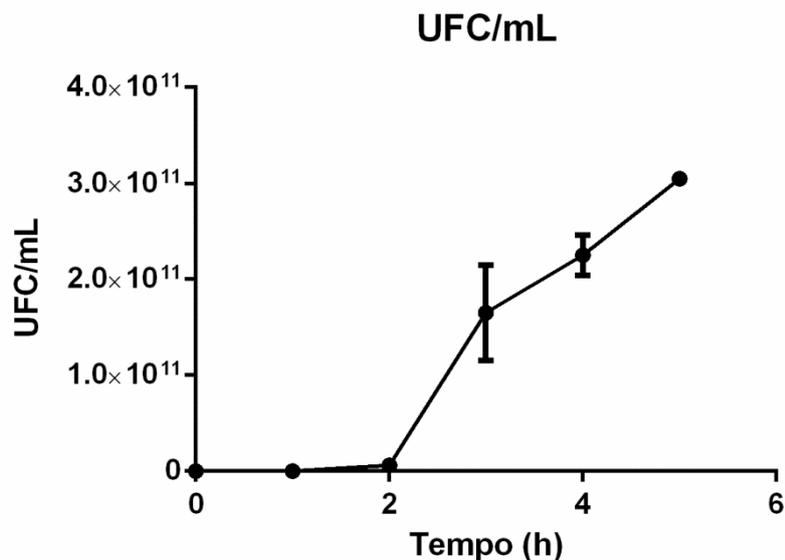


Figura 9: Acompanhamento das unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL) de *Escherichia coli* BL21 RIL durante o bioprocesso para a produção de Jaburetox. Os valores representam médias aritméticas e desvios padrões das amostras coletadas em triplicatas

Outro parâmetro analisado foi a estabilidade do plasmídeo durante o processo fermentativo. Durante todos os tempos analisados, ocorreu o aumento de UFC, demonstrando que durante todo o processo o plasmídeo pET23a-Jaburetox foi estável, principalmente pois os meios LB utilizados na determinação de UFC/mL continham os dois antibióticos em sua composição. Esse resultado foi diferente do encontrado em trabalho anterior do grupo (TOMAZETTO, 2006) produzindo Jaburetox 2-Ec em escala piloto, que utilizou o organismo *E. coli* BL 21 (DE3) com vetor recombinante pET101/*jaburetox2Ec*, onde foi observada instabilidade do plasmídeo ao longo do processo fermentativo. Dessa forma, a mudança do vetor de expressão trouxe vantagens na produção de Jaburetox em maior escala, não sendo necessária a reposição dos antibióticos ao longo do bioprocessos. C₂H₄O₃

A multiplicação bacteriana foi observada em todos os parâmetros analisados. Para confirmar a presença da produção da proteína, foi realizado um *Western blot* com as frações coletadas durante a fermentação (Figura 10).

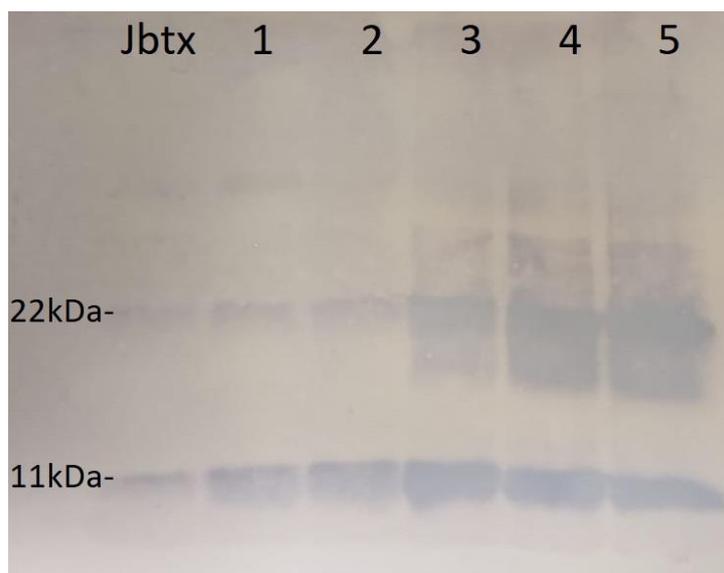


Figura 10: *Western blot* das amostras coletadas durante o bioprocesso para a produção de Jaburetox. Amostras, coletadas em triplicata, dos tempos (1 a 5) e amostra purificada de Jaburetox (JBTX) como controle positivo.

Analisando o *Western blot* (Figura 10), foi possível constatar a presença da proteína recombinante em todos os tempos acompanhados. Também foi visualmente possível observar o aumento da concentração da proteína pelo aumento da intensidade das bandas com o decorrer do processo fermentativo. No entanto, também foi possível observar a formação do dímero de Jaburetox que precisa ser separado da forma monomérica ativa, pois a dimerização da proteína parece trazer prejuízos para suas atividades biológicas, de acordo com dados prévios do grupo de pesquisa.

A purificação do Jaburetox foi realizada em duas etapas, uma cromatografia de afinidade, realizada em bancada, e uma cromatografia de gel filtração, que foi realizada em cromatógrafo líquido Äkta. O cromatograma da gel filtração (Figura 11) apresentou dois picos com absorvância a 280 nm relevantes. O primeiro, próximo ao volume de retenção de 200 mL, trata-se da forma dimérica de Jaburetox. O segundo (250 mL) e com a maior absorvância, é a porção que representa a proteína recombinante Jaburetox na sua forma monomérica e ativa.

Cromatografia de gel filtração

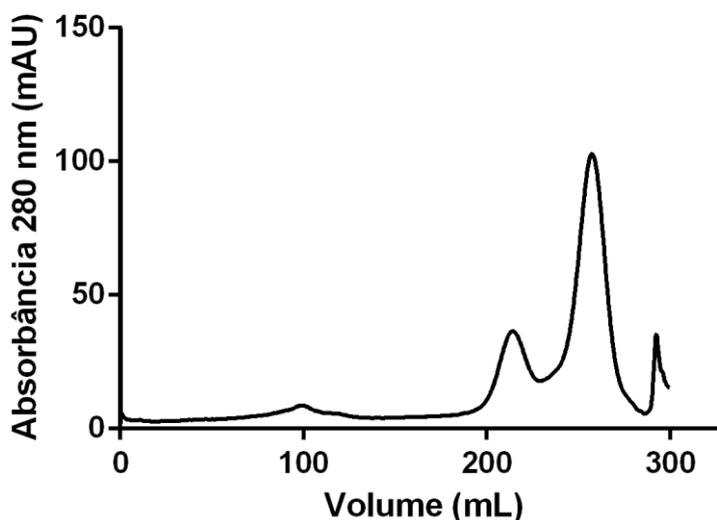


Figura 11: Purificação da proteína recombinante Jaburetox por cromatografia de exclusão por tamanho utilizando *Superdex 200* (Hiload Superdex 200 26/60 Prep Grade)

O rendimento obtido ao final do processo fermentativo foi de 22 mg em 3 L de cultivo, equivalente a um total de 7,33 mg/L. O rendimento calculado, considerando a biomassa, foi de 2,16 μg de Jaburetox por mg de biomassa total. Provavelmente, poder-se-ia ter rendimentos maiores, pois foram observadas algumas limitações do fermentador, o que podem ter levado ao decréscimo do rendimento. A dificuldade encontrada para a diminuição da temperatura do fermentador de 37° C para a temperatura de indução de 20° C, condição determinada previamente pelo grupo em escala laboratorial (LOPES et al., 2015), foi um provável fator de interferência do rendimento. Essa dificuldade ocorreu em função do biorreator não ser encamisado e, sim, apresentar um bloco de refrigeração em apenas uma face e não em toda a sua extensão. A temperatura mais baixa obtida durante o processo foi de 30,6° C, distante 10,6° C da temperatura ideal de indução da expressão. Com o intuito de comparar se houve uma melhora no rendimento do processo de produção da proteína recombinante Jaburetox, foi realizada uma fermentação em escala

laboratorial de 1 L. O rendimento obtido foi de 2,4 mg/L, menor quando comparado com a fermentação em biorreator que foi de 7,33 mg/L. Portanto, o uso do biorreator permitiu a obtenção de um rendimento 305,42% maior.

Rendimentos mais elevados na produção de Jaburetox haviam sido obtidos anteriormente (LOPES et al., 2015), principalmente nos experimentos realizados para a produção da proteína para a determinação da sua estrutura tridimensional (LOPES et al., 2015). Contudo, estes experimentos foram direcionados para a produção da proteína para experimentos de RMN e alguns parâmetros tornar-se-iam inviáveis para a produção em larga escala (LOPES et al., 2015).

Alguns parâmetros do bioprocessamento podem explicar essa melhora no rendimento como, por exemplo, as maiores agitação e aeração utilizadas no fermentador que conferem maior disponibilidade de oxigênio e homogeneização dos nutrientes do meio para as bactérias. Outro fator que pode ter interferido no rendimento é o tempo de fermentação, pois o tempo de fermentação em escala laboratorial foi de cerca de 20 h e em fermentador foi de 5 h. Como observado (Figuras 6 e 7), após determinado tempo de bioprocessamento, observou-se o acúmulo da forma dimérica do peptídeo. Portanto, ocorreu a diminuição da forma ativa da proteína recombinante Jaburetox, gerando uma diminuição no rendimento do processo.

5.2. Potencial Antifúngico das Matrizes Contendo Jaburetox Adsorvido e Covalentemente Ligado

A incorporação de Jaburetox às matrizes de PLA, seja por adsorção ou ligação covalente, necessita de etapas preparatórias para a funcionalização da matriz, disponibilizando-a para a ligação com o composto bioativo. A primeira etapa de ativação da superfície das matrizes foi realizada com uma hidrólise alcalina, disponibilizando a função ácido carboxílico pela hidrólise da ligação éster do PLA, o que permite a interação intermolecular com o peptídeo por meio de ligações fracas, de modo a se obter uma incorporação por adsorção (GAMBA, 2013).

Para as matrizes que tiveram incorporação via ligação covalente, foram necessárias outras etapas além da hidrólise alcalina para promover uma ligação forte do Jaburetox à matriz polimérica. A reação de acoplamento (Figura 12) foi realizada com o sistema EDC/NHS, os quais são excelentes grupamentos de saída, sendo capazes de favorecer o acoplamento do Jaburetox à superfície da matriz (GAMBA, 2013).

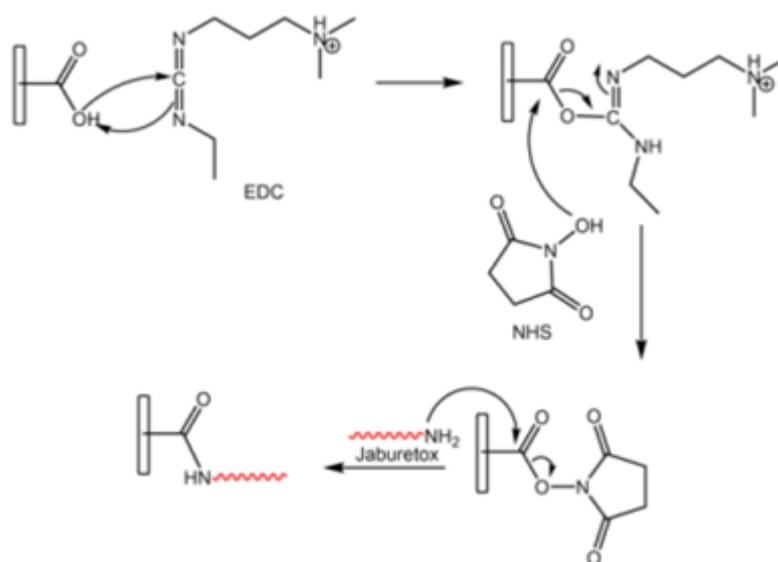


Figura 12: Funcionalização das matrizes com superfície ativada e acoplamento do peptídeo Jaburetox utilizando os reagentes EDC e NHS. Jaburetox está representado em vermelho, dando destaque para o seu grupamento amino terminal. Fonte: Autor

Após as reações para a funcionalização das matrizes de PLA, o potencial antifúngico foi avaliado utilizando a metodologia de *Drop Plate* e o organismo escolhido para a realização dos testes foi *Candida albicans*. Esta levedura apresenta relevância clínica em feridas (ISIBOR et al., 2008), além de ser suscetível ao Jaburetox purificado (Postal et al., 2012). *C. albicans* é um fungo leveduriforme pertencente à microbiota humana. No entanto, este microrganismo oportunista é capaz de causar infecções superficiais ou sistêmicas. O aumento da ocorrência de infecções por *C. albicans* tem sido observado nos últimos anos, principalmente em pacientes

imunocomprometidos. A habilidade de formar biofilmes também é de importância clínica, pois essas comunidades apresentam resistência à ação de agentes antifúngicos e ao sistema imune do paciente (BELATO et al., 2018).

Os resultados obtidos para as matrizes de PLA com Jaburetox adsorvido e covalentemente ligado se encontram na Figura 13.

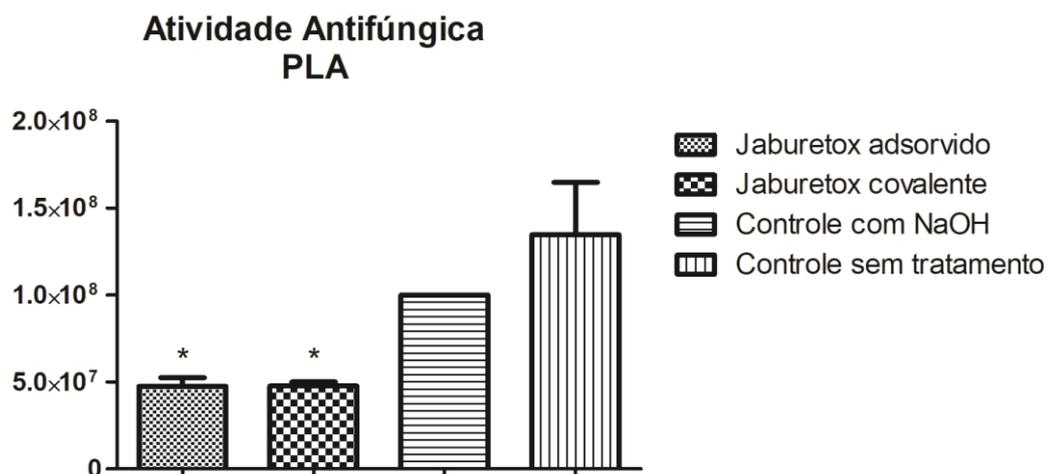


Figura 13: Ensaio de contagem de UFC/mL para *Candida albicans* incubada com as matrizes de PLA com Jaburetox adsorvido e covalentemente ligado. Os dados (n=3) realizados em três experimentos independentes foram avaliados por ANOVA seguido do teste de Tukey usando o software *GraphPad Prism* (Versão 5.0 para Windows) e um $p < 0,05$. * diferença significativa quando comparado com controle sem tratamento.

Na Figura 13 pode-se observar a atividade antifúngica de ambas as formas de ligação do Jaburetox à matriz, tanto adsorvida quanto covalente, apresentando diferença significativa em relação ao controle sem tratamento alcalino. Corroborando os resultados obtidos anteriormente, que demonstram a ação antifúngica de Jaburetox purificado (POSTAL et al., 2012). A eficiência dos tratamentos tanto da ativação da matriz pela hidrólise alcalina quanto das reações de acoplamento usando o EDC/NHS seguida pela reação de substituição com o Jaburetox também puderam ser observadas. Com o intuito de desenvolver um produto, no caso, um curativo bioativo, a metodologia aplicada para a produção das matrizes com Jaburetox ligado covalentemente torna-se desfavorável economicamente, pois necessita de mais reagentes,

tornando a produção do produto mais demorada e custosa. Corroborando o estudo apresentado, TAWAKKAL et al. (2014) e SCAFFARO et al. (2018) demonstraram a versatilidade do polímero PLA na funcionalização com diversas moléculas bioativas ou materiais que possibilitam o desenvolvimento de materiais com atividade antimicrobiana. Os resultados obtidos em conjunto com trabalhos encontrados da literatura (ADOMAVIČIŪTĖ et al., 2017; AHMED et al., 2016; GEORGE et al., [s.d.]; TONCHEVA et al., 2011) sugerem que o PLA é um biopolímero com características interessantes, pois podem ser formadas fibras a partir dele, sendo que as mesmas podem ser funcionalizadas com compostos com atividade biológica.

As matrizes de PLA contendo cetoconazol apresentaram atividade antifúngica aproximadamente 100 vezes maior quando comparada com as matrizes sem o fármaco antifúngico (Figuras 14 e 15).

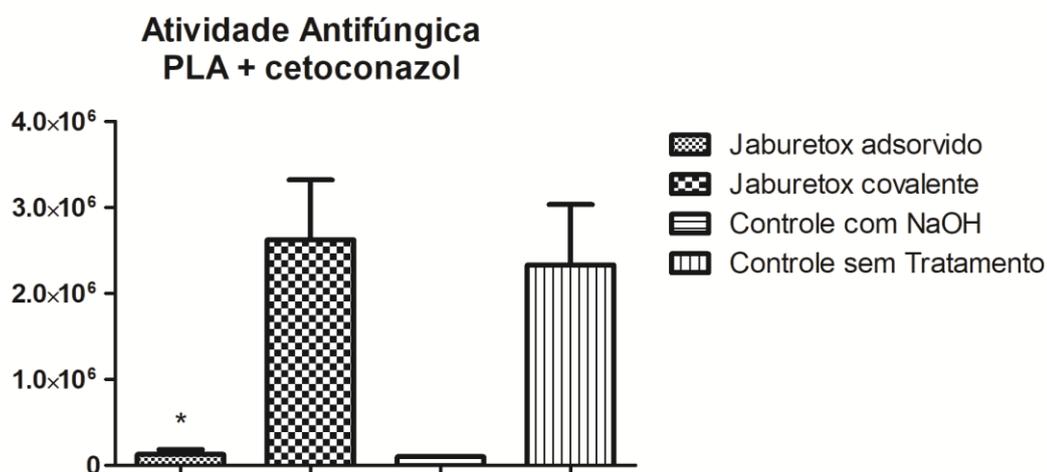


Figura 14: Ensaio de contagem de UFC/mL para *C. albicans* incubada com as matrizes de PLA/cetoconazol com Jaburetox adsorvido e covalentemente ligado. Os dados (n=3) realizados em três experimentos independentes foram avaliados por ANOVA seguido do teste de Tukey usando o software *GraphPad Prism* (Versão 5.0 para Windows) com um $p < 0,05$. * diferença significativa quando comparado com controle sem tratamento.

A atividade antifúngica das matrizes eletrofiadas com cetoconazol apresentada neste estudo concorda com resultados obtidos em VERAS et al. (2016). Estes autores desenvolveram fibras contendo cetoconazol, porém utilizando outro polímero de importância médica, a policaprolactona. Além disso, os autores testaram a atividade contra fungos filamentosos e não contra leveduras. O resultado obtido com as matrizes com o Jaburetox ligado covalentemente indicou que o tratamento de funcionalização a partir das reações de acoplamento interferiu de forma negativa na ação antifúngica, provavelmente causando degradação do fármaco cetoconazol (Figura 14). As matrizes com Jaburetox adsorvido causaram inibição do crescimento fúngico, apresentando diferença estatística significativa quando comparadas com o controle sem tratamento. Portanto, há a indicação de uma possível ação sinérgica entre a proteína recombinante Jaburetox e o fármaco cetoconazol. Contudo, outros testes deverão ser realizados para confirmar essa relação, pois é possível observar que o controle com tratamento alcalino apresentou inibição do crescimento de *C. albicans* praticamente equivalente às matrizes com Jaburetox adsorvido, sendo então necessários mais ensaios para confirmar o papel do Jaburetox nas matrizes contendo o fármaco. Com o intuito de diminuir a excessiva alcalinização das matrizes após o tratamento com NaOH, foi realizada a lavagem das matrizes com PBS. Todavia, como perspectivas desse trabalho, tem-se a intenção de testar diferentes formas de hidrólise da ligação éster como, por exemplo, hidrólise ácida para que uma simples alcalinização do meio não seja responsável pela inibição do crescimento fúngico.

Se confirmado o sinergismo entre cetoconazol e Jaburetox, isso possibilitará o desenvolvimento de nova estratégia contra fungos resistentes ao fármaco como algumas espécies de *Candida* (KRISHNASAMY et al., 2018) incluindo *C. albicans* (ODDS, 1993). Pensando em produto final, esse resultado é interessante. Além de conferir maior eficiência antifúngica à matriz, permite futuramente estudar uma possível diminuição da concentração do fármaco presente na composição da matriz. Conseqüentemente, tornando possível o desenvolvimento de um produto com menor impacto ambiental. Outra grande vantagem é a liberação do fármaco de forma controlada uma vez que, à

medida que a matriz de PLA vai sendo degradada em contato com a pele, o fármaco pode ser liberado de forma gradual na ferida, diminuindo a necessidade de trocas do curativo.

As matrizes de PLA e PLA/cetoconazol apresentaram diferenças tecnológicas. As matrizes de PLA apresentaram uma maior facilidade de manuseio, já as matrizes de PLA com o fármaco apresentaram uma grande fragilidade, provavelmente pela incorporação do fármaco entre as cadeias poliméricas. Mais estudos serão necessários para confirmar a fragilidade das fibras que contém o antifúngico. No entanto, no estudo de VERAS et al. (2016), as nanofibras de policaprolactona funcionalizadas com cetoconazol apresentaram maior resistência e menor grau de degradação quando comparadas com nanofibras de policaprolactona pura, o que não parece ocorrer com as fibras de PLA funcionalizadas com cetoconazol utilizadas para produzir as matrizes testadas.

5.3. Viabilidade de Queratinócitos em Contato com as Matrizes de PLA e PLA Contendo Cetoconazol

Os queratinócitos são o principal tipo celular da epiderme. Participam do processo de cicatrização de uma ferida, atuando na reepitelização para restabelecer a epiderme (KIRKER & JAMES, 2017). Os queratinócitos basais migram ativamente para o local da ferida, onde ligam-se com proteínas de membrana para atuarem na formação da membrana basal. O processo de reepitelização está completo quando um epitélio escamoso e estratificado cobre a ferida e a função dérmica é restaurada (MARTINS et al., 2013). Devido à importância dos queratinócitos no processo de cicatrização de feridas, foi realizado o teste de toxicidade pelo ensaio de MTT para verificar se as matrizes, contendo ou não o antifúngico em sua estrutura e funcionalizadas com a proteína recombinante Jaburetox, apresentavam toxicidade para esse tipo celular. Os resultados para as matrizes de PLA estão apresentadas na Figura 15. Como não verificou-se diferença significativa entre os tratamentos de

adsorção e covalente para as matrizes de PLA, foram realizados testes de viabilidade apenas com as matrizes com Jaburetox adsorvido.

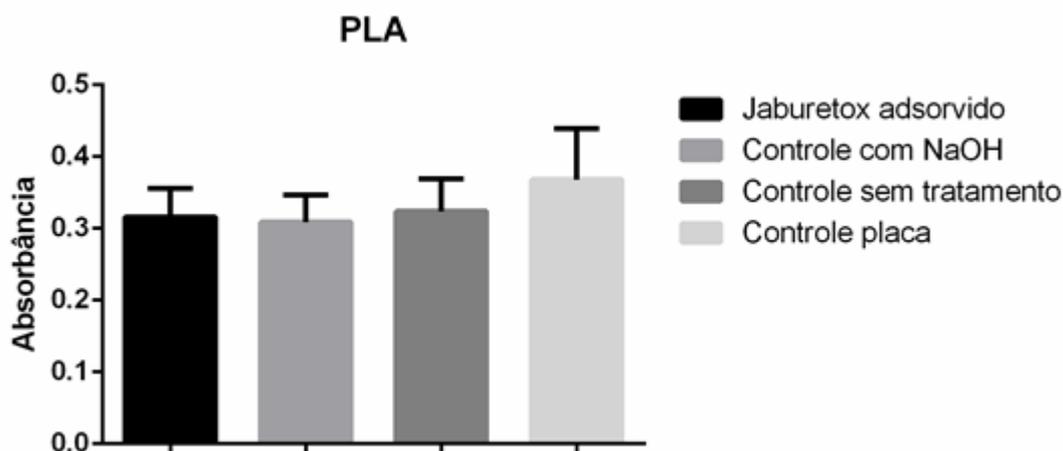


Figura 15: Ensaio de viabilidade celular de queratinócitos (HaCaT) pelo método de MTT após incubação por 48 h com matrizes de PLA. Os dados (n=4) foram avaliados por ANOVA seguido do teste de Tukey usando o *software GraphPad Prism* (Versão 5.0 para Windows) e um $p < 0,05$. * diferença significativa quando comparado com controle placa.

As matrizes PLA exclusivamente não apresentaram toxicidade em relação ao controle do experimento, o qual foi realizado sem a presença das matrizes (Figura 15). Ressalta-se que as matrizes contendo Jaburetox funcionalizado não apresentaram toxicidade quando comparadas com os controles placa e matriz sem tratatamento, indicando não serem tóxicas às células testadas. Os dados apresentados estão de acordo com as características de segurança e de biocompatibilidade do PLA discutidas em TYLER et al. (2016) e também da ausência de toxicidade de Jaburetox a mamíferos (MULINARI et al., 2007). Os resultados das matrizes contendo cetoconazol estão representados na Figura 16.

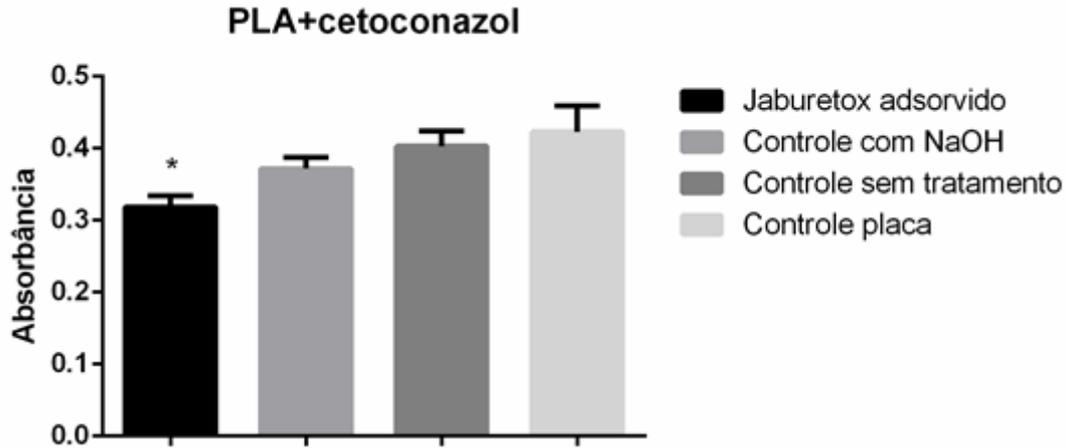


Figura 16: Ensaio de viabilidade celular de queratinócitos (HaCaT) pelo método de MTT após incubação por 48 h com matrizes de PLA/cetoconazol. Os dados (n=3) foram avaliados por ANOVA seguido do teste de Tukey usando o *software GraphPad Prism* (Versão 5.0 para Windows) e um $p < 0,05$. * diferença significativa quando comparado com controle placa

Já as matrizes contendo cetoconazol em sua estrutura, o único tratamento que apresentou diferença estatística significativa com relação ao controle placa foi o que continha a proteína Jaburetox adsorvida (Figura15). Esse resultado, quando comparado com os da literatura (MOHITI-ASLI et al., 2014; SAMBERG et al., 2012; SAMBERG et al., 2009), indica que as matrizes contendo o antifúngico cetoconazol com a proteína Jaburetox adsorvida apresentam leve toxicidade aos queratinócitos, afetando a viabilidade dos mesmos. Sabe-se que os queratinócitos são sensíveis à mudança de pH ou ao aumento da concentração de cálcio (TU et al., 1999). No entanto, estas não são prováveis interferências causadas pela interação com a matriz. As causas dessa toxicidade não estão claras e serão necessários novos experimentos para um melhor entendimento. Os resultados obtidos indicaram uma baixa toxicidade das matrizes desenvolvidas. Porém, serão necessários outros experimentos e testes com outros tipos celulares como, por exemplo, fibroblastos, para avaliar os efeitos de toxicidade e interferência no processo de cicatrização da pele.

6. CONCLUSÕES

Pelo presente estudo, buscou-se viabilizar a produção de matrizes de PLA contendo ou não o antifúngico cetoconazol e funcionalizadas ou não com a proteína recombinante Jaburetox. Além disso, o processo fermentativo em escala piloto para a produção da proteína recombinante foi executado com êxito.

A bactéria utilizada, *E. coli* BL21(DE3) – RIL, apresentou multiplicação adequada, com maiores taxas de multiplicação durante as primeiras horas do bioprocessamento. O plasmídeo pET23a-*Jaburetox* manteve-se estável durante todo o tempo do processo fermentativo. A proteína recombinante Jaburetox foi produzida durante todas as horas avaliadas, apresentando aumento até a última hora avaliada do bioprocessamento. Também foi observada a produção concomitante da forma não ativa, dimérica, da proteína. O rendimento do bioprocessamento foi de 7,33 mg/L, superior ao observado em escala laboratorial de 1 L, o qual apresentou um rendimento de 2,4 mg/L. Obteve-se uma melhora na produção de até 3 vezes com o processo realizado em biorreator. Os resultados apresentados pelo processo fermentativo foram promissores, demonstrando a viabilidade de escalonamento da produção de Jaburetox. O processo ainda pode ser otimizado a fim de aumentar a eficiência, sendo que outras variáveis poderão ser estudadas.

A metodologia de *electrospinning* utilizada na construção das matrizes de PLA e o antifúngico cetoconazol mostraram-se eficientes. As matrizes com cetoconazol apresentaram uma maior fragilidade quando comparadas com as que possuem somente PLA e outros protocolos deverão ser testados para aumentar a resistência das matrizes com o antifúngico presente na estrutura. As reações de funcionalização das matrizes foram eficientes tanto pela hidrólise alcalina quanto pelas reações de acoplamento usando EDC/NHS. Ambas as matrizes, covalente e adsorvida, apresentaram atividade antifúngica, no caso das matrizes de PLA. O tratamento de funcionalização da matriz com reações de acoplamento usando EDC/NHS parece afetar a eficiência do antifúngico cetoconazol. As matrizes produzidas somente com o biopolímero PLA não demonstraram toxicidade a queratinócitos humanos, um dos principais

tipos celulares presentes na derme. Com as matrizes contendo cetoconazol, somente o grupo com Jaburetox adsorvido apresentou toxicidade aos queratinócitos. No entanto, outros testes deverão ser realizados para confirmar a toxicidade das matrizes e sua influência no ambiente bioquímico da ferida.

Os resultados obtidos pelo estudo apresentaram-se promissores para o objetivo proposto, tendo como perspectivas novos ensaios de toxicidade em outras células presentes no processo de cicatrização de feridas, microscopia eletrônica de varredura para caracterização das fibras, testes com outras linhagens de fungos patogênicos e também de bactérias patogênicas, bem como fungos e bactérias resistentes, observação da colonização microbiana sob as matrizes e testes de caracterização físico-químicas das matrizes.

7. REFERÊNCIAS

ADOMAVIČIŪTĒ E, PUPKEVICIUTĒ S. JUŠKAITĒ V., ZILIUS M., STANYS S., PAVILONIS A., BRIEDIS V., Formation and Investigation of Electrospun PLA Materials with Propolis Extracts and Silver Nanoparticles for Biomedical Applications. **Journal of Nanomaterials**, [s. l.], v. 2017, n 2, p. 1-17, 2017.

AHMED M., Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. **Journal of advanced research**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 105–121, 2015.

AHMED J., HIREMATH N., JACOB H., Antimicrobial, rheological, and thermal properties of plasticized polylactide films incorporated with essential oils to Inhibit *Staphylococcus aureus* and *Campylobacter jejuni*. **Journal of food science**, [s. l.], v. 81, n. 2, p. E419--E429, 2016.

AMASS, W., AMASS, A., TIGHE, B., A review of biodegradable polymers: uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradation studies. **Polymer international**, [s. l.], v. 47, n. 2, p. 89–144, 1998.

BABAEIPOUR, V., ABBAS M., SAHEBNAZAR Z., ALIZADEH R., Enhancement of human granulocyte-colony stimulating factor production in recombinant E. coli using batch cultivation. **Bioprocess and biosystems engineering**, [s. l.], v. 33, n. 5, p. 591–598, 2010.

BAKER, P. D. Creating the optimal environment. An overview of dressings for chronic wounds. **Advance for nurse practitioners**, [s. l.], v. 13, n. 7, p. 37–38, 2005.

BECKER-RITT, A., PORTUGAL, C., CARLINI, CR., *Jaburetox*: update on a urease-derived peptide. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 32, 2017.

BELATO, K., OLIVEIRA, J., OLIVEIRA, F., OLIVEIRA, L., CAMARGO, S., Cytotoxicity and genotoxicity of thymol verified in murine macrophages (RAW 264.7) after antimicrobial analysis in *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*,

and *Streptococcus mutans*. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 40, p. 455–460, 2018.

BIRD, PI., PAK, SC., WORRALL, DM., BOTTOMLEY, SP., Production of recombinant serpins in *Escherichia coli*. **Methods**, [s. l.], v. 32, n. 2, p. 169–176, 2004.

BOATENG, JS., MATTHEWS, KH., STEVENS, H.NE., ECCLESTON GM., Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. **Journal of pharmaceutical sciences**, [s. l.], v. 97, n. 8, p. 2892–2923, 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, [s. l.], v. 72, p. 248–254, 1976.

CARLINI, CR., GROSSI-DE-SÁ, MF., Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, [s. l.], v. 40, n. 11, p. 1515–1539, 2002.

CARLINI, CR., GUIMARÃES, JA., Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. **Toxicon**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 667–675, 1981.

CARLINI, CR., LIGABUE-BRAUN, R., Ureases as multifunctional toxic proteins: A review. **Toxicon**, [s. l.], v. 110, p. 90–109, 2016.

CHANG, I., IM J., CHO, GC., Introduction of microbial biopolymers in soil treatment for future environmentally-friendly and sustainable geotechnical engineering. **Sustainability**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 251, 2016.

CHAUDHURI, V., POTTS, BR., KARASEK, MA., Mechanisms of microvascular wound repair I, role of mitosis, oxygen tension, and I-kappa B. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, [s. l.], v. 42, n. 10, p. 308–313, 2006.

CHENG, F., CHANGYU, L., XINJING, W., TINGSHENG, Y., HONGBIN, L., JINMEI, H., YUNDONG, H., Preparation and characterization of 2, 2, 6, 6-Tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO)-oxidized cellulose nanocrystal/alginate biodegradable composite dressing for hemostasis applications. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, [s. l.], v. 5, n. 5, p. 3819–3828, 2017.

CHOU, SF., CARSON, D., WOODROW, KA., Current strategies for sustaining drug release from electrospun nanofibers. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 220, p. 584–591, 2015.

CHOU, SF., WOODROW, KA., Relationships between mechanical properties and drug release from electrospun fibers of PCL and PLGA blends. **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials**, [s. l.], v. 65, p. 724–733, 2017.

CHRASTINA, A., MASSEY, KA., SCHNITZER, JE., Overcoming in vivo barriers to targeted nanodelivery. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 421–437, 2011.

COLLINS, T., SILVA, J., COSTA, A., BRANCA, F., MACHADO, R., CASAL, M., Batch production of a silk-elastin-like protein in *E. coli* BL21 (DE3): key parameters for optimisation. **Microbial cell factories**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 21, 2013.

CORISDEO, S., WANG, B., Functional expression and display of an antibody Fab fragment in *Escherichia coli*: study of vector designs and culture conditions. **Protein expression and purification**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 270–279, 2004.

CORTÉS, G., TRUJILLO-ROLDÁN, MA., RAMÍREZ, OT., GALINDO, E., Production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* under oscillating dissolved oxygen tension. **Process biochemistry**, [s. l.], v. 40, n. 2, p. 773–778, 2005.

DE MARÉ, L., VELUT, S., LEDUNG E., CIMANDER, C., NORMAN, B., NORDBERG, E., HOLST, O., HAGANDER, P., A cultivation technique for *E. coli* fed-batch cultivations operating close to the maximum oxygen transfer capacity of the reactor. **Biotechnology letters**, [s. l.], v. 27, n. 14, p. 983–990, 2005.

DIXON, NE., GAZZOLA, C., WATTERS, JJ., BLAKELEY, RL., Jack bean urease (EC 3.5. 1.5). Metalloenzyme. Simple biological role for nickel. **Journal of the American Chemical Society**, [s. l.], v. 97, n. 14, p. 4131–4133, 1975.

DUMVILLE, JC. SOARES, MO., O'MEARA, S., CULLUM, N., Systematic review

and mixed treatment comparison: dressings to heal diabetic foot ulcers. **Diabetologia**, [s. l.], v. 55, n. 7, p. 1902–1910, 2012.

ERDOHAN, ZÖ., ÇAM, B., TURHAN, KN., Characterization of antimicrobial polylactic acid based films. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 119, n. 2, p. 308–315, 2013.

FELGUEIRAS, HP., AMORIM, MTP., Functionalization of electrospun polymeric wound dressings with antimicrobial peptides. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 156, p. 133–148, 2017.

FERREIRA-DASILVA, CT., GOMBAROVITS, MEC., MASUDA, H., OLIVEIRA, CM., CARLINI, CR., Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. **Archives of insect biochemistry and physiology**, [s. l.], v. 44, n. April, p. 162–171, 2000.

FLETCHER, J., MOORE, Z., ANDERSON, I., MATSUZAKI, K., Pressure ulcers and Hydrocolloids. **Made Easy. Wounds International [Intenet]**, [s. l.], v. 2, n. 4, 2011.

FOLLMER, C., Insights into the role and structure of plant ureases. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 69, n. 1, p. 18–28, 2008.

FONDER, MA., LAZARUS GS., COWAN MD., ARONSON-COOK, B., CWOON, RN., KOHLI, A., MAMELAK, AJ., Treating the chronic wound: a practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [s. l.], v. 58, n. 2, p. 185–206, 2008.

GAMBA, Douglas. Síntese e caracterização de poliésteres biodegradáveis e biorreabsorvíveis para a utilização como matrizes tridimensionais em engenharia de tecidos. (dissertação de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul) [s. l.], 2013.

GEORGE, M., WEI-ZHENG S., ZHIGANG, Q., ADVAITA, B., MONTEMAGNO, C., Characterization of Cellulose Nanocrystals and PLA Based Thin Films with either Silver or Antimicrobial Peptide. [s. l.], [s.d.].

GERAATS, SMG., Scaling-up of a lipase fermentation process: a practical

approach. In: **Advances in bioprocess engineering**. [s.l.] : Springer, 1994. p. 41–46.

HOLZAPFEL, BM., REICHERT, JC., SCHANTZ, JT., GBURECK, U., RACKWITZ, L., NOTH, U., FRANZ, J., MAXIMILIAN, R., JURGEN, G., How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. **Advanced drug delivery reviews**, [s. l.], v. 65, n. 4, p. 581–603, 2013.

HUNT, TK., ELLISON, EC., SEN, CK., Oxygen: at the foundation of wound healing-introduction. **World journal of surgery**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 291–293, 2004.

ISIBOR, JO., OSENI A., EYAUFE, A., OSAGIE, R., TURAY, A., Incidence of aerobic bacteria and *Candida albicans* in post-operative wound infections. **African journal of microbiology research**, [s. l.], v. 2, n. 11, p. 288–291, 2008.

KIRKER, KR., JAMES, GA., *In vitro* studies evaluating the effects of biofilms on wound-healing cells: a review. **Apmis**, [s. l.], v. 125, n. 4, p. 344–352, 2017.

KRAJEWSKA, B., Ureasas I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s. l.], v. 59, n. 1–3, p. 9–21, 2009.

KRISHNASAMY, L., KRISHNAKAMUR, S., KUMARAMANICKAVEL, G., SAIKUMAR, C., Molecular Mechanisms of Antifungal Drug Resistance in *Candida* Species. **Journal of Clinical & Diagnostic Research**, [s. l.], v. 12, n. 9, 2018.

LAROUCHE, J., SHEORAN, S., MARUYAMA, K., MARTINO, MM., Immune regulation of skin wound healing: mechanisms and novel therapeutic targets. **Advances in wound care**, [s. l.], v. 7, n. 7, p. 209–231, 2018.

LI, Y., WANG, S., HUANG, R., HUANG, Z., HU, B., ZHENG, W., YANG, G., JIANG, X., Evaluation of the effect of the structure of bacterial cellulose on full thickness skin wound repair on a microfluidic chip. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 780–789, 2015.

LIMA, UA., AQUARONE, E., BORZANI, W., SCHMIDELL, W., *Biotechnologia*

industrial: processos fermentativos e enzimáticos. **São Paulo: Edgard Blücher**, [s. l.], v. 3, p. 1–43, 2001.

LIPOVSKY, J., PATAKOVA P., PAULOVA, L., POKOMY, T., RYCHTERA, M., MELZUCH, K., Butanol production by *Clostridium pasteurianum* NRRL B-598 in continuous culture compared to batch and fed-batch systems. **Fuel Processing Technology**, [s. l.], v. 144, p. 139–144, 2016.

LOPES, FC., DOBROVOLSKA, O., REAL-GUERRA, R., BROLL, V., ZAMBELLI, B., MUSIANI, F., UVERSKY, V., CARLINI, CR., CIURLI, S., Pliable natural biocide: *Jaburetox* is an intrinsically disordered insecticidal and fungicidal polypeptide derived from jack bean urease. **FEBS Journal**, [s. l.], p. n/a-n/a, 2015.

MARTINELLI, AH., LOPES, F., BROLL, V., DEFFERRARI, MS., LIGABUE-BRAUN, R., KAPPAUN, K., TICHOTA, D., FRUTTELO, LL., MOYETTA, N., DEMARTINI, DR., POSTAL, M., MEDEIROS-SILVA, M., BECKER-RITT, AB., PASQUALI, G., CARLINI, CR., Soybean ubiquitous urease with purification facilitator: An addition to the moonlighting studies toolbox. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 53, p. 245–258, 2017.

MARTINS, VL., CALEY, M., O'TOOLE, EA., Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair. **Cell and tissue research**, [s. l.], v. 351, n. 2, p. 255–268, 2013.

MCINTOSH, C., Are hydrocolloid dressings suitable for diabetic foot ulcers? **Wound Essentials**, [s. l.], v. 2, p. 170–172, 2007.

MOBLEY, HL., HAUSINGER, RP. Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. **Microbiological reviews**, [s. l.], v. 53, n. 1, p. 85–108, 1989.

MOHITI-ASLI, M., POURDEYHIMI, B., LOBOA, EG., Skin tissue engineering for the infected wound site: biodegradable PLA nanofibers and a novel approach for silver ion release evaluated in a 3D coculture system of keratinocytes and *Staphylococcus aureus*. **Tissue Engineering Part C: Methods**, [s. l.], v. 20, n. 10, p. 790–797, 2014.

MULINARI, F., STANISÇUASKI, F., BERTHOLDO-VARGAS, LR., POSTAL, M., OLIVEIRA-NETO, OB., RIGDEN, DJ., GROSSI-DE-SÁ, MF., CARLINI, CR., Jaburetox-2Ec: an insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*. **Peptides**, [s. l.], v. 28, n. 10, p. 2042–2050, 2007.

MULINARI, F., BECKER-RITT, AB., DEMARTINI, DR., LIGABUE-BRAUN, R., F., STANISÇUASKI, VERLI, H., FRAGOSO, RR., SCHROEDER, EK., CARLINI, CR., GROSSI-DE-SÁ, MF., Characterization of *JBURE-IIb* isoform of *Canavalia ensiformis* (L.) DC urease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, [s. l.], v. 1814, n. 12, p. 1758–1768, 2011.

ODDS, FC., Resistance of yeasts to azole-derivative antifungals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 463–471, 1993.

OLIVEIRA, AEA., GOMES, VM., SALES, MP., FERNANDES, KVS., CARLINI, CR., XAVIER-FILHO, J., The toxicity of jack bean [*Canavalia ensiformis* (L.) DC.] canatoxin to plant pathogenic fungi. **Revista Brasileira de Biologia**, [s. l.], v. 59, n. 1, p. 59–62, 1999.

PAWAR, R., TEKALE, S., SHISODIA, S., TOTRE, J., DOMB, A., Biomedical applications of poly (lactic acid). **Recent Patents on Regenerative Medicine**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 40–51, 2014.

PIRES-ALVES, M., GROSSI-DE-SÁ, MF., BARCELLOS, GBS., CARLINI, CR., MORAES, MG., Characterization and expression of a novel member (JBURE-II) of the urease gene family from jackbean [*Canavalia ensiformis* (L.) DC]. **Plant and cell physiology**, [s. l.], v. 44, n. 2, p. 139–145, 2003.

POLACCO, JC., HOLLAND, MA., Roles of urease in plant cells. **International review of cytology**, [s. l.], p. 65, 1993.

POSTAL, M., MARTINELLI, AHS., BECKER-RITT, AB., LIGABUE-BRAUN, R., DEMARTINI, DR., RIBEIRO, SFF., PASQUALI, G., GOMES, VM., CARLINI, CR., Antifungal properties of *Canavalia ensiformis* urease and derived peptides. **Peptides**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 22–32, 2012.

RADHAKUMARY, C., ANTONY, M., SREENIVASAN, K., Drug loaded

thermoresponsive and cytocompatible chitosan based hydrogel as a potential wound dressing. **Carbohydrate polymers**, [s. l.], v. 83, n. 2, p. 705–713, 2011.

ROSANO, GL., CECCARELLI, EA., Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in microbiology**, [s. l.], v. 5, p. 172, 2014.

SAMBERG, ME., LOBOA, EG., OLDENBURG, SJ., MONTEIRO-RIVIERE, NA., Silver nanoparticles do not influence stem cell differentiation but cause minimal toxicity. **Nanomedicine**, [s. l.], v. 7, n. 8, p. 1197–1209, 2012.

SAMBERG, ME., OLDENBURG, SJ., MONTEIRO-RIVIERE, NA., Evaluation of silver nanoparticle toxicity in skin *in vivo* and keratinocytes *in vitro*. **Environmental health perspectives**, [s. l.], v. 118, n. 3, p. 407–413, 2009.

SCAFFARO, R., LOPRESTI, F., MARINO, A., NOSTRO, A., Antimicrobial additives for poly (lactic acid) materials and their applications: current state and perspectives. **Applied microbiology and biotechnology**, [s. l.], v. 102, n. 18, p. 7739–7756, 2018.

SCHUMANN, W., FERREIRA, LCS., Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Genetics and Molecular Biology**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 442–453, 2004.

SUPRONOWICZ, PS., RICCI, J., BAKHRU, H., BIZIOS, R., Analysis of osteoblast mineral deposits on three-dimensional, porous, polylactic acid scaffolds. In: PROCEEDINGS OF THE 1996 5TH WORLD BIOMATERIALS CONGRESS. PART 2 (OF 2) 1996, **Anais...** [s.l: s.n.]

SWARTZ, JR., Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. **Current opinion in biotechnology**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 195–201, 2001.

TAPIA, F., JORDAN, I., GENZEL, Y., REICHL, U., Efficient and stable production of Modified Vaccinia Ankara virus in two-stage semi-continuous and in continuous stirred tank cultivation systems. **PloS one**, [s. l.], v. 12, n. 8, p. e0182553, 2017.

TAWAKKAL, Intan S. M. A. et al. A review of poly (lactic acid)-based materials for antimicrobial packaging. **Journal of food science**, [s. l.], v. 79, n. 8, p.

R1477--R1490, 2014.

TOMAZETTO, G., Estudo da estabilidade do plasmídeo e da expressão de *jaburetox-2Ec* em *Escherichia coli* BL 21 utilizando lactose como indutor. [s. l.], 2006 (dissertação de mestrado, Universidade Federal Do Rio Grande do Sul).

TONCHEVA, A., PANEVA, D., MANOLOVA, N., RASHKOV, I., Electrospun poly (L-lactide) membranes containing a single drug or multiple drug system for antimicrobial wound dressings. **Macromolecular research**, [s. l.], v. 19, n. 12, p. 1310–1319, 2011.

TORTORA, GJ., CASE, CL., FUNKE, BR., **Microbiologia-12ª Edição**. [s.l.] : Artmed Editora, 2016.

TRIPATHI, NK. High yield production of heterologous proteins with *Escherichia coli*. **Defence Science Journal**, [s. l.], v. 59, n. 2, p. 137, 2009.

TU, CL., BIKLE, DD., ODA, Y., Effects of a calcium receptor activator on the cellular response to calcium in human keratinocytes. **Journal of investigative dermatology**, [s. l.], v. 113, n. 3, p. 340–345, 1999.

TYLER, B., GULLOTTI, D., MANGRAVITI, A., UTSUKI, T., BREM, H., Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications. **Advanced drug delivery reviews**, [s. l.], v. 107, p. 163–175, 2016.

VERAS, FF., ROGGIA, I., PRANKE, P., PEREIRA, CN., BRANDELLI, A., Inhibition of filamentous fungi by ketoconazole-functionalized electrospun nanofibers. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 84, p. 70–76, 2016.

WANG, G., TANG, W., XIA, J., CHU, J., NOORMAN, H., Integration of microbial kinetics and fluid dynamics toward model-driven scale-up of industrial bioprocesses. **Engineering in life sciences**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 20–29, 2015.

ZAHEDI, P., REZAEIAN, I., RANAEI-SIADAT, S., JAFARI, S., SUPAPHOL, P., A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages. **Polymers for Advanced Technologies**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 77–95, 2010.

