

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 17/09/2018.



CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



Dissertação de Mestrado

Desenvolvimento *in situ* de nanocompósitos de celulose bacteriana contendo
laponita

Rafael Romano Domeneguetti

Araraquara

2018

Rafael Romano Domeneguetti

Desenvolvimento *in situ* de nanocompósitos de celulose bacteriana contendo
laponita

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Sidney José Lima Ribeiro

Co-Orientador: Prof. Dr. Hernane da Silva Barud

Araraquara

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

D668d Domeneguetti, Rafael Romano
Desenvolvimento "in situ" de nanocompósitos de celulose bacteriana contendo laponita / Rafael Romano Domeneguetti. – Araraquara : [s.n.], 2018
64 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química

Orientador: Sidney José Lima Ribeiro

Coorientador: Hernane da Silva Barud

1. Nanocompósitos (Materiais). 2. Argila. 3. Compósitos poliméricos. 4. Tecnologia de liberação controlada. 5. Curativos biológicos. I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Desenvolvimento *in situ* de nanocompósitos de celulose bacteriana contendo laponita"

AUTOR: RAFAEL ROMANO DOMENEGUETTI


ORIENTADOR: SIDNEY JOSE LIMA RIBEIRO

COORIENTADOR: HERNANE DA SILVA BARUD

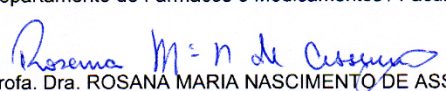
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. SIDNEY JOSE LIMA RIBEIRO

Departamento de Química Geral e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Dra. PATRICIA BENTO DA SILVA

Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP- Araraquara


Profa. Dra. ROSANA MARIA NASCIMENTO DE ASSUNÇÃO

Departamento de Química / Faculdade de Ciências Integradas do Pontal - UFU - Ituiutaba - MG

Araraquara, 17 de abril de 2018

Dados Curriculares

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Rafael Romano Domeneguetti

E-mail: rafaromanod@gmail.com

Nome em citações bibliográficas: Domeneguetti, Rafael R. ; Domeneguetti, R. R.

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Rua Professor Francisco Degni, 55, Quitandinha

Araraquara-SP

CEP: 14800 – 060

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

Graduação em Farmácia-bioquímica UNESP – Universidade Estadual Paulista, Araraquara/SP. Título do trabalho de conclusão de curso: Estudos de pré-formulação e desenvolvimento de cosméticos: Linha Aqua Vegetalli. Orientador: Marco Antônio Correa.

Mestrado em Biotecnologia – Universidade Estadual Paulista, Araraquara/SP. Título da dissertação: Desenvolvimento “in situ” de nanocompósitos de celulose bacteriana contendo laponita. Orientador: Sidney José Lima Ribeiro.

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

Assistente de suporte acadêmico

Instituto de Química, Unesp Araraquara

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigo publicado

Tercjak, A., Gutierrez, J., Barud, H. S., Domeneguetti, R. R. & Ribeiro, S. J. L. Nano- and macroscale structural and mechanical properties of in situ synthesized bacterial cellulose/PEO-b-PPO-b-PEO biocomposites. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**, 4142–4150 (2015).

Trabalhos publicados em anais de eventos

Rafael R. Domeneguetti, Vanessa Y. Sakai, Vera R. L. Constantino, Hernane S. Barud, Agnieszka Tercjak, Junkal Gutierrez, Sidney J. L. Ribeiro. "*In situ*" development of nanocomposites containing bacterial cellulose and laponite. 3ª Reunião sobre Argilas Aplicadas, realizada nos dias 7 e 8 de julho de 2017, no Instituto de Química da USP, em São Paulo (SP).

RESUMO

A celulose bacteriana (CB) é um nanomaterial que pode ser obtido a partir de bactérias do gênero *Gluconacetobacter*. O material é formado por uma rede de fios nanométricos que lhe confere enorme área superficial, surpreendente capacidade de absorção e retenção de água, boa elasticidade e fácil moldabilidade. O material também é biodegradável, biocompatível, atóxico e não alergênico. A CB pode ser sintetizada a partir de uma variedade de fontes de carbono, através de bactérias que são capazes de converter glicose à celulose como parte de seu metabolismo. Assim, a glicose atua não somente como fonte de energia para o microrganismo, mas também como precursora da biossíntese de CB. A CB produzida na superfície do meio de cultura pela bactéria *Gluconacetobacter xylinus* foi utilizada para a produção *in situ* de nanocompósitos com propriedades químicas e físicas modificadas devido a presença de laponita (LPN) que possui composição bem definida e livre de impurezas insolúveis, como partículas de sílica e óxidos de ferro. As dimensões nanométricas dessas argilas, aliadas ao seu formato circular e capacidade de produzir materiais transparentes, como filmes e dispersões, auxiliam na obtenção de nanocompósitos de alta homogeneidade. Neste trabalho foi realizada a preparação e caracterização de nanocompósitos de CB, por meio da incorporação *“in situ”* de LPN. Os filmes CB/LPN foram caracterizados morfologicamente, por microscopia eletrônica de varredura com EDS e microscopia de força atômica. Estruturalmente, por difração de raios X, análise termogravimétrica acoplado a espectrômetro de massas, espectroscopia de infravermelho e espectroscopia raman. Foram realizados ensaios de citotoxicidade frente a queratinócitos, inibição do crescimento bacteriano para *P. aeruginosas* e *S. Aureus* e dissolução *in vitro* de cafeína. O ensaio de inibição bacteriana não apresentou a morte das bactérias. Os nanocompósitos produzidos apresentaram uma maior estabilidade térmica e elevada viabilidade celular frente aos queratinócitos. No estudo preliminar de dissolução realizado, os nanocompósitos secos apresentaram perfil de liberação semelhante a CB pura seca. Foi observado uma alteração do perfil de liberação da CB pura úmida.

Palavras-chave: nanocompósitos, celulose bacteriana, laponita, desenvolvimento *“in situ”*, biocurativo tópico.

ABSTRACT

Bacterial cellulose (CB) is a nanomaterial that can be obtained from bacteria of the genus *Gluconacetobacter*. The material is formed by a network of nanometric wires that gives it enormous surface area, surprising capacity of water absorption and retention, good elasticity and easy moldability. The material is also biodegradable, biocompatible, non-toxic and non-allergenic. CB can be synthesized from a variety of carbon sources, through bacteria that are able to convert glucose to cellulose as part of their metabolism. Thus, glucose acts not only as a source of energy for the microorganism, but also as a precursor of CB biosynthesis. The CB produced on the surface of the culture medium through the bacterium *Gluconacetobacter xylinus* was used for the *in situ* production of nanocomposites with chemical and physical properties modified due to the presence of laponite (LPN) that has a well defined composition and free of insoluble impurities, as particles of silica and iron oxides. The nanometric dimensions of these clays, combined with their circular shape and the ability to produce transparent materials, such as films and dispersions, help to obtain nanocomposites of high homogeneity. In this work the preparation and characterization of CB nanocomposites was carried out by the *in situ* incorporation of LPN. The CB/LPN films were characterized morphologically by scanning electron microscopy with EDS and atomic force microscopy. Structurally, by X-ray diffraction, thermogravimetric analysis coupled to mass spectrometer, infrared spectroscopy and raman spectroscopy. Cytotoxicity tests against keratinocytes, inhibition of bacterial growth for *P. aeruginosa* and *S. aureus* and *in vitro* dissolution of caffeine were performed. The bacterial inhibition assay did not show bacterial killing. The nanocomposites produced showed a higher thermal stability, high cell viability against keratinocytes. In the pre-dissolution study performed, the dry nanocomposites presented a similar profile of dry pure CB. A change in the release profile of pure wet CB was observed.

Keywords: nanocomposites, bacterial cellulose, laponite, *in situ* development, topical bio curative

Lista de Figuras

Figura 1. Modelo de produção de um compósito onde tem-se uma matriz e um reforço gerando um produto com propriedades diferentes dos materiais de partida.....	14
Figura 2. Esquema detalhado da estrutura lamelar da Laponita.....	15
Figura 3. Ilustração de um sistema de liberação de fármaco por difusão, através de uma matriz.....	16
Figura 4 Processo de esfoliação da laponita e adição para desenvolvimento do nanocompósito " <i>Ex situ</i> ".....	18
Figura 5. A produção de CB em meio de cultura modificado incorporação " <i>in situ</i> ". B - CB formada submetida a presença de um material (" <i>ex situ</i> ").	18
Figura 6. Produção de CB através do cultivo de microrganismos em meio de cultura formando uma matriz polimérica (esquerda). Produção de nanocompósito através da modificação do meio de cultura (modificação " <i>in situ</i> ", através da adição de copolímero de block) formando nanocompósito (direita).	19
Figura 7. Placa com meio HS sólido após o processo de ativação, observa-se uma camada de microrganismos na superfície.	22
Figura 8. CB formada após 3 dias de repique do microrganismo da placa para o meio líquido de cultivo.....	23
Figura 9. Manta de CB com 3 dias de crescimento, após o processo de purificação e neutralização.....	24
Figura 10. Filmes obtidos. CB pura (A), CB + 0,1% LP (B), CB + 0,25% LP (C), CB + 0,50% LP (D), CB + 0,75% LP (E), CB + 1,0% LP (F).	33
Figura 11. Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura – A) CB pura, B) CB-LPN 0,1 %, C) CB-LPN 0,25%. Ao lado tem-se as imagens com aumento A1) CB pura, B1) CB-LPN 0,1 %, C1) CB-LPN 0,25%.	35
Figura 12. Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura - D) CB-LPN 0,5%, E) CB-LPN 0,75% e F) CB-LPN 1,0%. Ao lado imagens com aumento, D ¹) CB-LPN 0,5%, E ¹) CB-LPN 0,75% e F ¹) CB-LPN 1,0%.	36
Figura 13. EDS, Amostra de CB - LPN 0,75%.	37
Figura 14. Análise MFA, CB pura com escala de 5;3;2 e 1 micrometro.	38
Figura 15 - Análise MFA, CB-LPN 0,1% com escala de 5;3;2 e 1 micrometro.....	39
Figura 16 Análise MFA, CB-LPN 0,25% com escala de 5;3;2 e 1 micrometro.	40
Figura 17 Análise MFA, CB-LPN 0,50% com escala de 5;3;2 e 1 micrometro.	41

Figura 18 Análise MFA, CB-LPN 0,75% com escala de 5;3;2 e 1 micrometro.	42
Figura 19 - Análise MFA, CB-LPN 1,0% com escala de 5;3;2 e 1 micrometro.	43
Figura 20. Análise de difração de raios X.	45
Figura 21. Análises de TGA, a imagem apresenta as curvas da LPN, CB pura e dos nanocompósitos obtidos, identificados na figura.	46
Figura 22. TGA acoplado a espectrômetro de massas.	48
Figura 23. Espectros de Infravermelho, LPN pura, CB pura e nanocompósitos obtidos, legenda na figura.	50
Figura 24. Espectros de Raman, LPN e CB puras, e nanocompósitos obtidos. Legendas na figura.	51
Figura 25 Gráficos Viabilidade Celular dos nanocompósitos.	52
Figura 26 - Teste de inibição do crescimento bacteriano, <i>P. aeruginosa</i>	53
Figura 27 - Teste de inibição do crescimento bacteriano, <i>S. aureus</i>	53
Figura 28 Concentrações de CFN x Absorbância, determinação da equação da reta.	54
Figura 29 Comparativo da concentração de CFN liberada no ensaio.	56

Lista de Tabelas

Tabela 1 Massa real de laponita dos nanocompósitos.....	47
Tabela 2 Atribuições dos espectros de FTIR.....	48
Tabela 3 Atribuições FTIR LPN.....	49
Tabela 4 - Média da viabilidade celular dos queratinócitos frente aos nanocompósitos.	52
Tabela 5 - Dados para equação da reta.....	54
Tabela 6 Relação das massas dos nanocompósitos.	55
Tabela 7 Média da % liberada de CFN no ensaio de dissolução.	55

SUMÁRIO

1	Introdução	12
1.1	Lesão Cutânea	12
1.2	Celulose Bacteriana	12
1.3	Compósitos	13
1.4	Laponita	15
1.5	Filmes poliméricos para liberação de fármacos	15
1.6	Desenvolvimento de nanocompósito de CB pela modificação “ <i>in situ</i> ” e “ <i>ex situ</i> ”	17
1.7	Cafeína	19
2	Objetivos	21
2.1	Objetivo Geral	21
2.2	Objetivos específicos	21
3	Materiais e Métodos	22
3.1	Ativação do microrganismo, produção de CB e purificação das biomembranas	22
3.2	Preparação dos nanocompósitos de CB-LPN	24
3.3	Técnicas de Caracterização	25
3.3.1	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia de Força Atômica (MFA)</i>	25
3.3.2	<i>Difração de Raios-X (DRX)</i>	26
3.3.3	<i>Análise Termogravimétrica acoplada à espectrometria de massas (TGA-MS)</i>	26
3.3.4	<i>Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</i>	26
3.3.5	<i>Espectroscopia Raman com Transformada de Fourier</i>	26
3.4	Ensaio de citotoxicidade celular	27
3.4.1	<i>Extração das amostras</i>	27
3.4.2	<i>Cultura de células</i>	27
3.4.3	<i>Avaliação da Citotoxicidade</i>	27
3.5	Ensaio de inibição bacteriana	28
3.5.1	<i>Linhagens bacterianas e condições de crescimento</i>	29
3.5.2	<i>Teste de inibição de crescimento bacteriano (REMA)</i>	29
3.6	Ensaio de dissolução de fármaco	29
3.6.1	<i>Determinação “in vitro” do perfil de liberação da cafeína</i>	30
4	Resultados e discussão	32
4.1	Análises Morfológicas	33

4.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	34
4.1.2 Microscopia de Força Atômica.....	38
4.2 Análises Estruturais	43
4.2.1 Análise de Difração de Raios X	43
4.2.2 Análise Termogravimétrica acoplado a espectrometria de massas (TGA-MS) 45	
4.2.3 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	48
4.2.4 Espectroscopia Raman com Transformada de Fourier.....	50
4.3 Ensaio de viabilidade celular	51
4.4 Ensaio de Inibição bacteriana.....	52
4.5 Ensaio de Dissolução	54
5 Conclusão.....	57
6 Perspectivas.....	59
Referências.....	60

1 Introdução

1.1 Lesão cutânea

No decorrer da vida, a pele sofre inúmeras injúrias que podem ser classificadas como traumáticas (escoriações, perfurações, cortes, queimaduras), cirúrgicas (incisões realizadas por material cortante hospitalar) e patológicas (diabetes, dislipidemias, infecções).

Cerca de um milhão de pessoas sofrem queimaduras no Brasil a cada ano segundo dados do Ministério da Saúde.¹

Quando uma dessas feridas demoram, ou não se cicatrizam por motivos intrínsecos, têm-se as feridas crônicas.

As feridas crônicas são consideradas um dos principais problemas de saúde pública da atualidade. Estimativas do Ministério da Saúde apontam que este problema afeta a rotina de aproximadamente 5 milhões de brasileiros todos os anos. Dados estatísticos do Instituto Nacional do Seguro Social (INSS), indicam que esta doença, desenvolvida por diversos motivos, está entre as dez principais causas de afastamento do trabalho no Brasil.

O tratamento das feridas crônicas é um desafio para o Sistema Único de Saúde (SUS), pois requer a criação de políticas públicas com investimentos que assegurem a incorporação de novas tecnologias e produtos para cuidar desse pacientes.²

1.2 Celulose bacteriana

A celulose bacteriana (CB), pode ser produzida por bactérias pertencentes aos gêneros *Gluconacetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Sarcina* e *Salmonella*. A diferença significativa entre elas é a capacidade de massa de celulose produzida em cultura. As bactérias do gênero *Gluconacetobacter* são as que mais vêm chamando a atenção dos pesquisadores, pois elas são capazes de sintetizar celulose em quantidades comerciais. Este gênero é composto de bactérias Gram negativas aeróbias estritas. A produção de celulose pela *Gluconacetobacter xylinus* (*Acetobacter xylinum* ou *Komagaeibater xylinum*) foi descoberta em 1886 por A.

J. Brown, o qual observou que o microrganismo produzia celulose na presença de glicose e oxigênio.³

A fibra de celulose típica é formada de cadeias poliméricas longas compostas de D-glicose, sendo que os monômeros de açúcar de cada cadeia são unidos por ligações β -1,4 glicosídicas. As ligações inter e intra-cadeias são feitas por cadeias adjacentes de β -1,4-glucano. As dimensões das fibras variam de 1 a 9 μm de comprimento (2 mil a 18 mil resíduos de glicose) e de 1 a 25 nm de largura (10 a 250 cadeias).⁴ A estrutura cristalina e a largura das fibras de CB sintetizadas por espécies de *Gluconacetobacter* são semelhantes à celulose de muitas plantas e algas. Entretanto, a CB é quimicamente pura, livre de lignina, hemicelulose e pectinas. Além disso, ela apresenta cadeias de celulose nanométricas (3 a 8 nm) organizadas em um arranjo estrutural tridimensional, o qual gera um sistema altamente cristalino (60- 80%), com excelente força mecânica. A celulose vegetal, por sua vez, não apresenta a estrutura tridimensional supracitada.^{5,6} Outras vantagens da CB incluem a sua enorme área superficial conferida pela rede de fios nanométricos, surpreendente capacidade de absorção e retenção de água, boa elasticidade, além de ser biodegradável, biocompatível, atóxica, não alergênica e facilmente moldável.⁷⁻⁹ Devido às diversas vantagens da CB, ela é utilizada para diferentes propósitos, como nas indústrias alimentícia (fibras dietéticas, “nata de côco”) e têxtil; na produção de dispositivos opto-eletrônicos; na medicina (tubos para cirurgia, substitutos temporários da pele, lentes de contato), entre outros.¹⁰

Na literatura já é evidenciado o uso da CB para o tratamento de feridas, assim como já existem produtos comerciais de CB para o tratamento de feridas.^{6,11,12,13, 14}

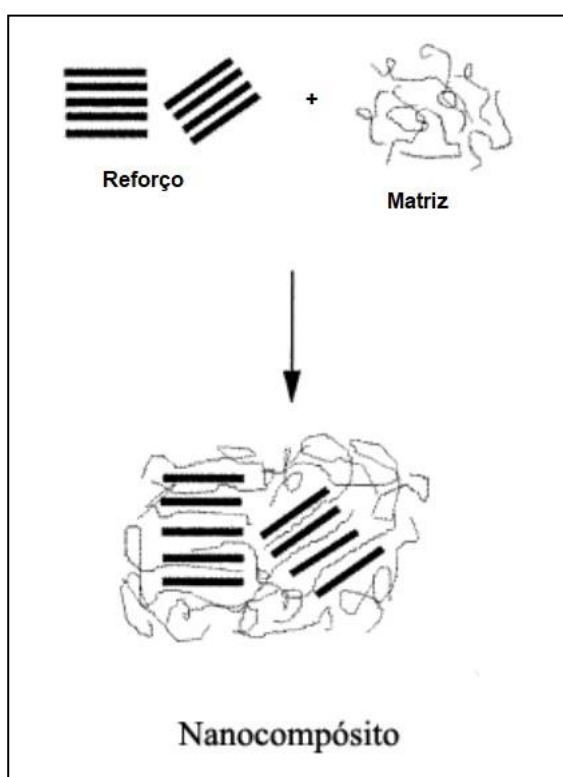
1.3 Compósitos

A combinação química e estrutural de diferentes materiais levou à produção de uma nova classe de materiais denominados de compósitos. O uso de compósitos foi descrito primeiramente no século XX, utilizados inicialmente em aplicações elétricas como dielétricos, devido às suas propriedades eletromagnéticas consideráveis. Já nas décadas de 80 e 90, o uso de compósitos tornou-se muito comum nas indústrias em geral, com destaque no segmento aeronáutico e aeroespacial.¹⁵

Os compósitos são materiais com pelo menos dois componentes (fases), com propriedades físicas e químicas distintas, que juntos formam um novo material com propriedades adicionais e somente vistas quando existe essa possível combinação.¹⁶

Os materiais que podem compor um material compósito podem ser classificados em dois tipos: matriz e reforço. A matriz é o que irá conferir estrutura ao material, como por exemplo, as matrizes poliméricas. Enquanto o reforço é caracterizado como materiais que irão reforçar as propriedades mecânicas, eletromagnéticas ou químicas do material compósito como um todo, tais como as fibras orgânicas, fibras de carbono, fibras metálicas, entre outras.¹⁷ Na figura 1, tem-se o exemplo de uma matriz sendo reforçada e gerando um compósito com propriedades diferentes dos materiais de partida.

Figura 1. Modelo de produção de um compósito onde tem-se uma matriz e um reforço gerando um produto com propriedades diferentes dos materiais de partida.



Fonte: Modificado de Peixoto, 2012.

Diferentes termoplásticos biodegradáveis solúveis em água, também têm sido utilizados para a produção de nanocompósitos à base de CB, que podem ser utilizados em uma gama de aplicações, entre eles estão, poli (óxido de etileno)¹⁸, poli (álcool vinílico)¹⁹ e polímeros naturais como quitosana²⁰ gelatina²¹ e aloe vera.²²

Dessa maneira, pode-se constatar que a produção de biocompósitos com diversas matrizes poliméricas podem originar importantes sistemas de liberação de fármacos, suprindo as barreiras existentes no que se refere à liberação de fármaco em diferentes órgãos e/ou tecidos alvo, além da melhoria da solubilidade e de sua estabilidade.²³

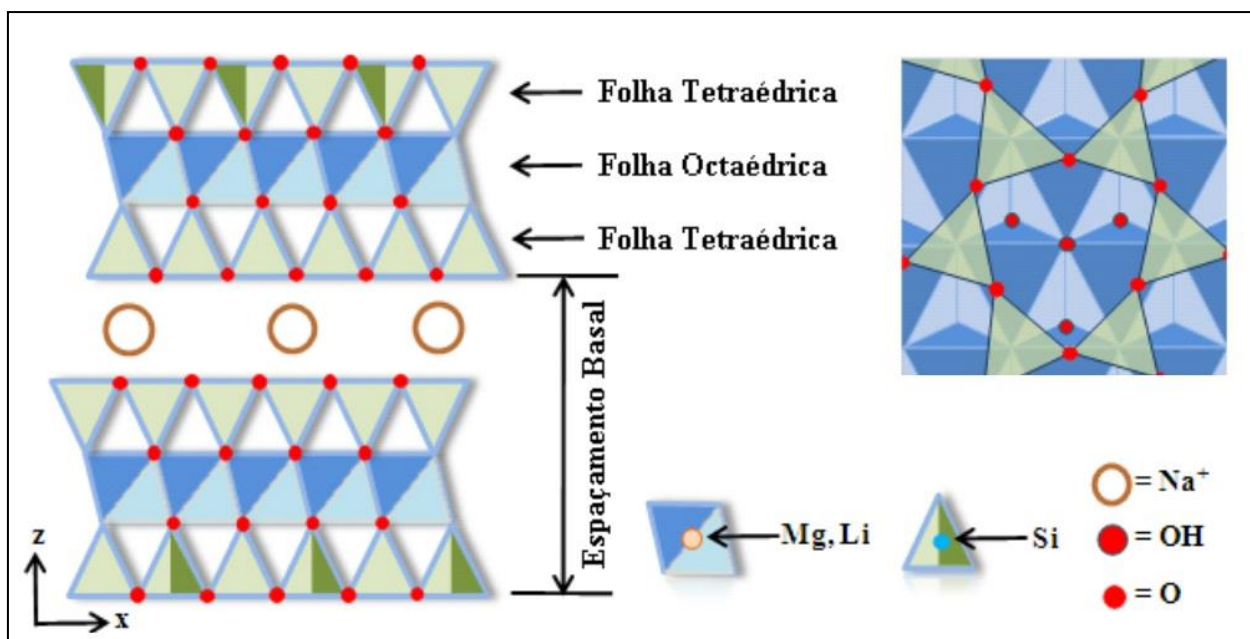
O uso de biocompósitos pode apresentar uma vantagem quando comparado a outros sistemas de liberação devido a atoxicidade, biocompatibilidade, e características específicas de cada biomaterial, como no caso da CB.¹⁴

1.4 Laponita

A utilização de argilas sintéticas como a Laponita (estrutura cristalina monoclinica, hectorita), possui diversas vantagens sobre as argilas naturais, por possuírem composições bem definidas e livres de impurezas insolúveis, como partículas de sílica e óxidos de ferro. Na figura 2, tem-se um exemplo ilustrando a LPN.

As dimensões nanométricas dessas argilas (cerca de 25 nm de diâmetro), aliadas ao seu formato circular e capacidade de produzir materiais transparentes, como filmes e dispersões, auxiliam na obtenção de nanocompósitos de alta homogeneidade.²⁴⁻²⁸

Figura 2. Esquema detalhado da estrutura lamelar da Laponita.



Fonte: Modificado de Perotti, 2013.

1.5 Filmes poliméricos para liberação de fármacos

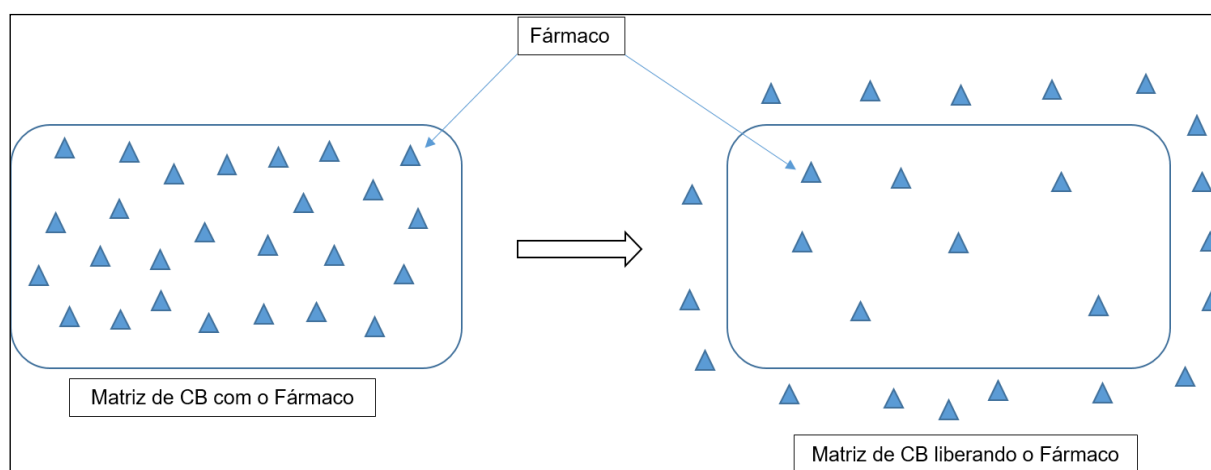
Tornou-se crescente, nas últimas décadas, o uso da tecnologia associada à modificação da liberação de fármacos, no que se refere à utilização de novas formulações farmacêuticas, por meio de sistemas matriciais poliméricos que auxiliem no transporte eficaz dessas substâncias e possam garantir a resposta terapêutica.²⁹

Assim, pode-se dizer que os sistemas matriciais poliméricos são de grande interesse pela indústria farmacêutica, pois apresentam grande versatilidade, eficácia e baixo custo.³⁰ Na figura 3, tem-se um esquema de filme polimérico que por meio de difusão, promove a liberação de um fármaco.

A difusão consiste na passagem das moléculas do soluto, do local de maior concentração para o de menor concentração até estabelecer um equilíbrio. O agente bioativo encontra-se envolvido por um filme ou membrana polimérica (sistema reservatório), ou disperso uniformemente em uma matriz (sistema matricial). Em ambos os casos, a difusão ocorre por meio de gradiente de concentração.

O controle químico pode ocorrer também por meio da degradação da matriz (erosão), sendo a taxa de liberação, nesse caso, dependente da escolha do polímero.

Figura 3. Ilustração de um sistema de liberação de fármaco por difusão, através de uma matriz.



Fonte: Autor, 2018.

Neste contexto podemos definir esses sistemas de filmes poliméricos, como aqueles que controlam substâncias bioativas, molecularmente dispersas ou dissolvidas num suporte resistente à desintegração, ressaltando que os mesmos podem ser formados por cadeias de uma ou mais substâncias químicas polimerizadas, que juntos funcionam como agentes moduladores da liberação.³⁰

A busca desses sistemas está fortemente ligada ao uso de biomateriais, pois estes apresentam propriedades desejáveis, tais como, biocompatibilidade, atoxicidade, entre outros.³¹ De acordo com Park (1984) um biomaterial deve apresentar as seguintes características gerais para ser usado como matriz de liberação de fármaco: ser biocompatível, atóxico, quimicamente projetado para suas funções de uso, estabilidade mecânica, peso e densidade adequados, baixo custo, reproduzível e de fácil fabricação.³²

Dessa forma, polímeros, tais como a CB e derivados da celulose, em geral são muito difundidos na literatura, no que se refere ao estudo destes compostos aplicáveis na indústria farmacêutica, sendo que os derivados da celulose em geral já são utilizados como aglutinantes, no revestimento de comprimidos, como suportes para o uso de antimicrobianos sintéticos e naturais que possam garantir o tratamento de feridas e úlceras de pele de difícil cicatrização.^{29,30,33,34,35}

Sabe-se que os sistemas poliméricos podem levar ao controle e prolongamento das taxas de liberação dependendo da seleção de um polímero apropriado, o qual pode manter sua estrutura constante durante o contato com o meio aquoso, ou ainda, possibilitar sua expansão (intumescimento) em razão do relaxamento das cadeias poliméricas, seguido, ou não, de erosão.³³ Esses mecanismos (intumescimento, erosão e difusão) permitem que as moléculas de fármaco se difundam através da matriz polimérica de maneira lenta e gradual.³⁰

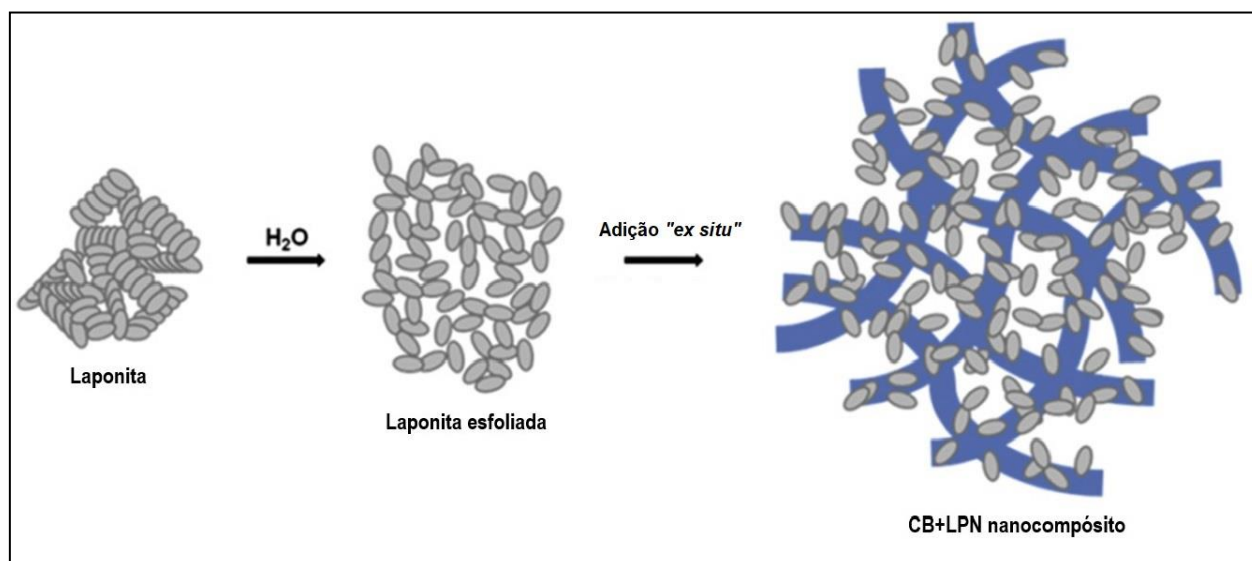
A CB apresenta liberação por difusão do fármaco incorporado, porém estudos da literatura mostram que a liberação do fármaco é muito rápida. Nos ensaios de dissolução, 80% do fármaco incorporado na matriz de CB pura é liberado nos primeiros 15 minutos.^{23,36}

1.6 Desenvolvimento de nanocompósito de CB pela modificação “*in situ*” e “*ex situ*”

Existe, de maneira geral, duas formas mais usuais de produzir nanocompósitos a partir da CB.

A primeira delas, como ilustrado na figura 4 é a mais comumente utilizada é a produção “*ex situ*”, onde acontece primeiramente a produção da manta de celulose bacteriana e, em seguida, com essa manta úmida ou seca, um segundo composto é adicionado para que ocorra alguma modificação, através de métodos químicos ou físicos, de acordo com o que se deseja.³⁷

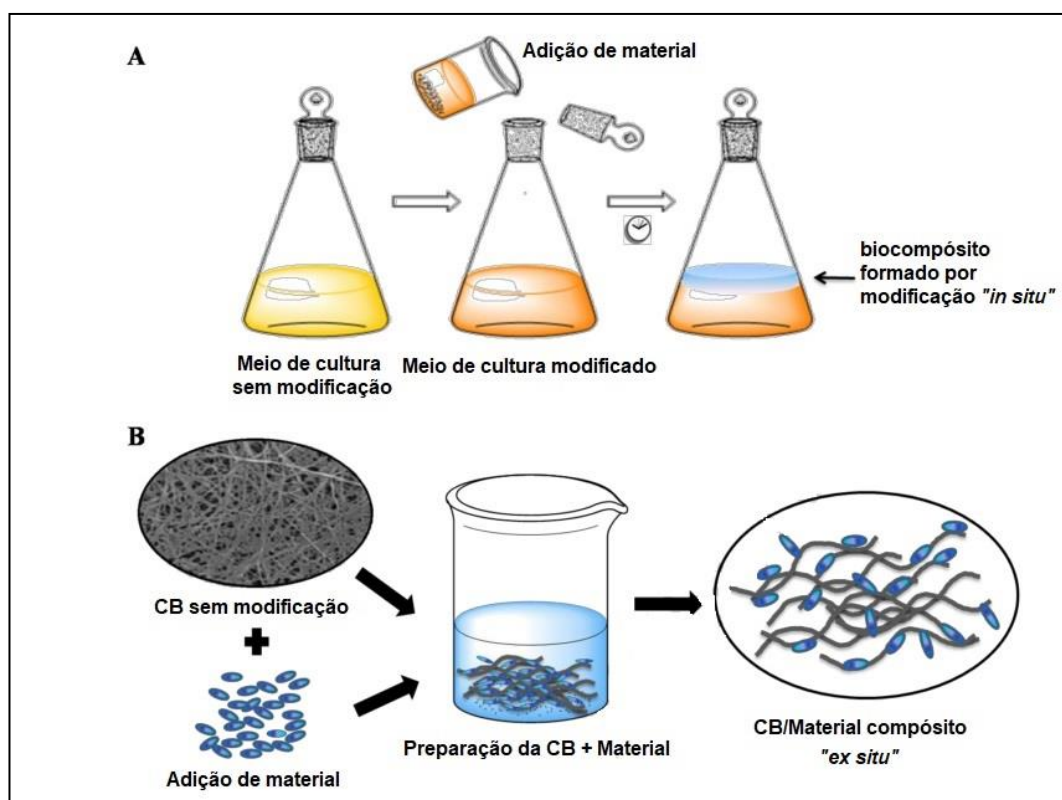
Figura 4 Processo de esfoliação da laponita e adição para desenvolvimento do nanocompósito "Ex situ".



Fonte: Modificada de Perotti, 2011.

A outra maneira, ilustrada na figura 5, é a produção de um nanocompósito através da incorporação de algum composto, durante o processo de produção da CB, ou seja, da modificação do meio de cultura, através da adição de algum material. Esse tipo de produção é chamado de desenvolvimento "in situ".

Figura 5. A produção de CB em meio de cultura modificado incorporação "in situ". B - CB formada submetida a presença de um material ("ex situ").



Fonte: Modificado de Stumpf, 2016.

A vantagem do “*in situ*” é a forma com que ocorre a formação do novo biocompósito obtido, através do desenvolvimento dentro do meio de cultivo, de um nanocompósito que terá a deposição do material nas fibras de CB que vão sendo formadas pelas bactérias conforme o nanocompósito é formado.^{38,39}

Em 2015, Tercjak et al elucidaram esse modelo (ilustrado na figura 6) de produção de um nanocompósito pelo desenvolvimento “*in situ*”, que serviu de ideia para este trabalho, porém utilizando a LPN.

O objetivo de gerar um nanocompósito utilizando a CB e a LPN veio através das características desses materiais, que possuem uma alta capacidade de adsorção (CB materiais hidrofílicos e a LPN devido a sua estrutura lamelar que pode incorporar substâncias), além de serem biocompatíveis e capazes de serem utilizados na área médica. Imagina-se que os nanocompósitos obtidos aumentarão a capacidade de liberação de fármacos devido à alta porosidade e capacidade de adsorção da CB e da LPN, fazendo com que os nanocompósitos obtidos sejam utilizados como uma nova matriz na liberação tópica de fármacos.

Figura 6. Produção de CB através do cultivo de microrganismos em meio de cultura formando uma matriz polimérica (esquerda). Produção de nanocompósito através da modificação do meio de cultura (modificação “*in situ*”, através da adição de copolímero de block) formando nanocompósito (direita).



Fonte: Modificada de Tercjak et al, 2015.

1.7 Cafeína

A cafeína pode ser utilizada topicamente para atenuar a celulite, melhorar a circulação local através de seu efeito vasodilatador, além de ter grande potencial para o tratamento de psoríase.^{40,41}

É um fármaco facilmente solúvel em água, de estabilidade razoável e que possui um baixo custo de aquisição.

A espectroscopia UV-Vis é uma ferramenta analítica consolidada, de aplicação simples, custo baixo e boa sensibilidade para determinação de cafeína.

A absorção de radiação eletromagnética na região do ultravioleta (UV) pela cafeína foi descrita no início do século 20 por Hartley (1905). Posteriormente, Holiday (1930) descreveu que a cafeína apresentava um limite máximo de absorção no UV entre os comprimentos de onda de 271 e 275 nm.⁴²

5 Conclusão

Uma nova rota de síntese, através do desenvolvimento “*in situ*”, com modificação do meio de cultura, levou a produção de nanocompósitos contendo CB e LPN.

A morfologia realizada pelas microscopias, nos mostrou que de fato ocorreu a deposição de material sobre a superfície das nanofibras de CB. Material que se depositou na forma de partículas, grânulos, pequenos aglomerados e placas, conforme as microscopias obtidas.

O EDS identificou a presença de Si, Mg e Na, materiais presentes na constituição da LPN. A caracterização estrutural por TGA-MS, através da comparação da perda de massa da CB pura, LPN pura e dos nanocompósitos, permitiu confirmar e quantificar a presença de LPN (material inorgânico) em cada nanocompósito produzido. Em atmosfera oxidativa a CB sofre combustão total até 480°C, dessa forma a massa residual presente em 650°C pertence a LPN. A curva DTG também elucidou o aumento da estabilidade térmica dos nanocompósitos devido a presença de LPN.

As caracterizações estruturais, através das análises de espectroscopia de infravermelho e Raman, e os difratogramas de raios X, corroboraram que nos nanocompósitos havia a presença de LPN devido aos picos característicos de Si. As características modificadas nos espectros dos nanocompósitos, apresentou o achatamento e diminuição da intensidade dos picos, comparando os espectros com a CB pura, e entre eles (conforme se aumenta a concentração de LPN). Caracterizando assim uma alteração na estrutura da CB pela presença de LPN.

No ensaio de citotoxicidade, obteve-se uma alta viabilidade celular dos queratinócitos que foram submetidos a concentrações do eluato de contato. Apresentando assim uma aplicação dos nanocompósitos sintetizados como biocurativos de uso tópico ou como material para engenharia de tecidos.

O ensaio de inibição bacteriana frente a duas importantes bactérias responsáveis por infecções cutâneas (*S. Aureus* e *P. Aeruginosa*), não apresentou alteração significativa quando comparado com o fármaco controle.

O ensaio de dissolução delineado preliminar utilizando cafeína em tampão fosfato 0,1 M, pH 5,8, de acordo com a farmacopeia americana, mostrou que ocorreu uma pequena alteração do perfil de liberação da CFN, quando comparada com o nanocompósito controle (CB pura). Nesse mesmo ensaio, foi possível observar que a CB pura úmida apresenta uma liberação diferente, quando comparado com os outros

materiais do ensaio (CB seca, CB-LPN 1,0% seca e CB-LPN 1,0% úmida), sendo esse um dado novo, não encontrado por hora na literatura.

Apesar, da pequena alteração observada no ensaio de dissolução, mais testes precisam ser feitos alterando pH, fármaco, condições de incorporação do fármaco, para que ocorra uma conclusão mais apurada sobre a capacidade do nanocompósito promover a liberação controlada de fármaco.

A LPN possui uma estrutura lamelar com um espaço basal considerável, aproximadamente 1,73 nm, sendo já consolidado na literatura que quando pura sua estrutura apresenta potencial para carrear fármacos e promover alteração da liberação dos compostos, além de ter propriedades muito interessantes para o uso na engenharia de tecidos e na área médica.⁶⁵

Dessa forma, a combinação da CB com a LPN nos remete a ter grandes perspectivas para esse novo biocompósito.

Referências

- 1 Brasil, P. Um milhão de brasileiros sofrem queimaduras por ano. (2017). Available at: <http://www.brasil.gov.br/saude/2017/06/um-milhao-de-brasileiros-sofrem-queimaduras-por-ano>.
- 2 OERJ. Cinco milhões de pessoas convivem com feridas crônicas no Brasil. (2015). Available at: <https://oestadorj.com.br/cinco-milhoes-de-pessoas-convivem-com-feridas-cronicas-no-brasil/>. (Accessed: 21st February 2018)
- 3 Brown, A. J. On an Acetic Ferment which form Cellulose. (1886).
- 4 Ross, P., Mayer, R. & Benziman, M. Cellulose Biosynthesis and Function in Bacteria. *Microbiol. Rev.* **55**, 35–58 (1991).
- 5 Czaja, W., Romanovicz, D. & Brown, R. M. Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. *Cellulose* **11**, 403–411 (2004).
- 6 Czaja, W., Krystynowicz, A., Bielecki, S. & Brown, R. M. Microbial cellulose - The natural power to heal wounds. *Biomaterials* **27**, 145–151 (2006).
- 7 Klemm, D., Schumann, D., Udhardt, U. & Marsch, S. Bacterial synthesized cellulose—artificial blood vessels for microsurgery. *Prog. Polym. Sci.* **26**, 1561–1603 (2001).
- 8 Klemm, D., Heublein, B., Fink, H. P. & Bohn, A. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **44**, 3358–3393 (2005).
- 9 Wouk. MEMBRANA BIOLÓGICA (Biofill£) - ESTUDO COMPARATIVO COM OUTROS AGENTES PROMOTORES DA CICATRIZAÇÃO DA PELE EM SUÍNOS: ASPECTOS CLÍNICOS, HISTOPATOLÓGICOS E MORFOMÉTRICOS * . *Archives* **3**, 31–37 (1998).
- 10 Barud, H. da S. Preparo e caracterização de novos compósitos de celulose bacteriana. 1–114 (2006).
- 11 Wu, J. *et al.* In situ synthesis of silver-nanoparticles/bacterial cellulose composites for slow-released antimicrobial wound dressing. *Carbohydr. Polym.* **102**, 762–771 (2014).
- 12 Hakkarainen, T. *et al.* Nanofibrillar cellulose wound dressing in skin graft donor site treatment. *J. Control. Release* **244**, 292–301 (2016).
- 13 Ullah, H., Wahid, F., Santos, H. A. & Khan, T. *Advances in biomedical and pharmaceutical applications of functional bacterial cellulose-based nanocomposites. Carbohydrate Polymers* **150**, (Elsevier Ltd., 2016).
- 14 de Oliveira Barud, H. G. *et al.* A multipurpose natural and renewable polymer in medical applications: Bacterial cellulose. *Carbohydr. Polym.* **153**, 406–420 (2016).
- 15 Ventura, A. M. F. M. Os Compósitos e a sua aplicação na Reabilitação de Estruturas metálicas. *Ciência Tecnol. dos Mater.* **21**, 10–19 (2009).
- 16 Crocker, J. Natural materials. *Mater. Technol.* **23**, 174–178 (2008).

- 17 Zimmerli, B., Strub, M., Jeger, F., Stadler, O. & Lussi, A. Composite materials: composition, properties and clinical applications. A literature review. *Schweiz. Monatsschr. Zahnmed.* **120**, 972–86 (2010).
- 18 Marcos, X., Pérez-Casas, S., Llovo, J., Concheiro, A. & Alvarez-Lorenzo, C. Poloxamer-hydroxyethyl cellulose- α -cyclodextrin supramolecular gels for sustained release of griseofulvin. *Int. J. Pharm.* **500**, 11–19 (2016).
- 19 Li, X., Qin, J. & Ma, J. Silk fibroin/poly (vinyl alcohol) blend scaffolds for controlled delivery of curcumin. *Regen. Biomater.* **2**, 97–105 (2015).
- 20 Wang, K., Lin, S., Nune, K. C. & Misra, R. D. K. Chitosan-gelatin based microgel for sustained drug delivery. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **5063**, 1–20 (2016).
- 21 Kruppke, B. *et al.* Gelatine modified monetite as a bone substitute material: An in vitro assessment of bone biocompatibility. *Acta Biomater.* **32**, 275–285 (2016).
- 22 Xie, J.-H. *et al.* Advances on Bioactive Polysaccharides from Medicinal Plants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **56**, S60–S84 (2016).
- 23 Trovatti, E. *et al.* Biocellulose membranes as supports for dermal release of lidocaine. *Biomacromolecules* **12**, 4162–4168 (2011).
- 24 Shemper, B. S. *et al.* Synthetic clay nanocomposite-based coatings prepared by UV-Cure photopolymerization. *J. Appl. Polym. Sci.* **93**, 1252–1263 (2004).
- 25 Poyard, S. *et al.* A new method for the controlled immobilization of enzyme in inorganic gels (laponite) for amperometric glucose biosensing. *Sensors Actuators B Chem.* **33**, 44–49 (1996).
- 26 Cummins, H. Z. Liquid, glass, gel: The phases of colloidal Laponite. *J. Non. Cryst. Solids* **353**, 3891–3905 (2007).
- 27 Loyens, W., Jannasch, P. & Maurer, F. H. J. Poly(ethylene oxide)/Laponite nanocomposites via melt-compounding: Effect of clay modification and matrix molar mass. *Polymer (Guildf).* **46**, 915–928 (2005).
- 28 Aray, Y. *et al.* Electrostatics for exploring the nature of water adsorption on the laponite sheets surface. *J. Phys. Chem. B* **107**, 8946–8952 (2003).
29. Das, N. & Das, S. Controlled release of oral dosage forms. *Pharm. Technol.* **15**, 10–17 (2003).
- 30 Lopes, C. M., Lobo, J. M. S. & Costa, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. *Rev. Bras. Ciências Farm.* **41**, 143–154 (2005).
- 31 Credou, J. & Berthelot, T. Cellulose: from biocompatible to bioactive material. *J. Mater. Chem. B* **2**, 4767–4767 (2014).
- 32 Park, J. B. *Biomaterials Science and Engineering*. (Springer US, 1984). doi:10.1007/978-1-4613-2769-1

- 33 Pezzini, B. R., Silva, M. A. S. & Ferraz, H. G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. *Rev. Bras. Ciências Farm.* **43**, 12 (2007).
- 34 Marcolongo, R. Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica. 127 (2003).
- 35 Sulaeva, I., Henniges, U., Rosenau, T. & Potthast, A. Bacterial cellulose as a material for wound treatment: Properties and modifications: A review. *Biotechnol. Adv.* **33**, 1547–1571 (2015).
- 36 Silva, N. H. C. S. *et al.* Bacterial cellulose membranes as transdermal delivery systems for diclofenac: In vitro dissolution and permeation studies. *Carbohydr. Polym.* **106**, 264–269 (2014).
- 37 Perotti, G. F., Barud, H. S., Messaddeq, Y., Ribeiro, S. J. L. & Constantino, V. R. L. Bacterial cellulose-laponite clay nanocomposites. *Polymer (Guildf)*. **52**, 157–163 (2011).
- 38 Tercjak, A., Gutierrez, J., Barud, H. S., Domenegueti, R. R. & Ribeiro, S. J. L. Nano- and macroscale structural and mechanical properties of in situ synthesized bacterial cellulose/PEO-b-PPO-b-PEO biocomposites. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**, 4142–4150 (2015).
- 39 Stumpf, T. R., Yang, X., Zhang, J. & Cao, X. In situ and ex situ modifications of bacterial cellulose for applications in tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C* (2016). doi:10.1016/j.msec.2016.11.121
- 40 Silva, N. H. C. S. *et al.* Topical caffeine delivery using biocellulose membranes: A potential innovative system for cellulite treatment. *Cellulose* **21**, 665–674 (2014).
- 41 Vali, A. *et al.* Evaluation of the efficacy of topical caffeine in the treatment of psoriasis vulgaris. *J. Dermatolog. Treat.* **16**, 234–237 (2005).
- 42 Nagata, N. cafeína por espectrometria UV-Vis associada a ferramentas matemáticas Simultaneo Determinação simultânea de paracetamol e cafeína por espectrometria UV-Vis associada a ferramentas matemáticas.
- 43 Hestrin, S. & Schramm, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose*. *Biochem. J.* **58**, 345–352 (1954).
- 44 Donini, I. A. N. *et al.* Biosíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. *Eclét. Quim.* **35**, 165–178 (2010).
- 45 Palomino, J. *et al.* Resazurin Microtiter Assay Plate : Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis Resazurin Microtiter Assay Plate : Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobail Agents Chemother.* **46**, 2720–2722 (2002).
- 46 Silva, I. C., Polaquini, C. R., Regasini, L. O., Ferreira, H. & Pavan, F. R. Evaluation of

cytotoxic, apoptotic, mutagenic, and chemopreventive activities of semi-synthetic esters of gallic acid. *Food Chem. Toxicol.* **105**, 300–307 (2017).

47 Silva, I. C. & Ferreira, H. Drug Sensitivity Assay of *Xanthomonas. citri* subsp. *citri* Using REMA Plate Method. **3**, 1–4 (2013).

48 Diepvens, K., Westerterp, K. R. & Westerterp-Plantenga, M. S. Obesity and thermogenesis related to the consumption of caffeine, ephedrine, capsaicin, and green tea. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* **292**, R77–R85 (2006).

49 Lohar, R. J., Patil, V. M., Gaikwad, R. G. & Patil, S. S. Development and validation of uv-visible spectrophotometric method for estimation of selected antiseptic drug in bulk and pharmaceutical dosage form. *World J. Pharm. Pharm. Sci.* **5**, 1197–1205 (2016).

50 Barud, H. S. *et al.* Self-supported silver nanoparticles containing bacterial cellulose membranes. *Mater. Sci. Eng. C* **28**, 515–518 (2008).

51 Santos, M. V. Nanocompósitos baseados em celulose bacteriana para aplicações ópticas. (2012).

52 Barud, H. S. Novos Materiais Multifuncionais Baseados em Celulose Bacteriana. 172 (2010).

53 Perotti, G. F. Nanocompósitos Orgânico -Inorgânicos de Polímero Biodegradável e Estruturas Lamelares. 184 (2013).

54 Lagaly, G. *Colloid Clay Science, Handbook of Clay Science.* (2006).

55 Brindley, G. W. *Order-Disorder in 2:1 Type Layer Silicates, in Crystal Structures of Clay Minerals and Their X-Ray Identification Mineralogical Society.* (Mineralogical Society of Great Britain and Ireland, 1980). doi:10.1180/mono-5

56 Sugiyama, J., Persson, J., Chanzy, H., Recherche, C. De & Vbgktales, M. Combined Infrared and Electron Diffraction Study of the Polymorphism of Native Celluloses. 2461–2466 (1991).

57 Ray, S. S. & Bousmina, M. Biodegradable polymers and their layered silicate nanocomposites: In greening the 21st century materials world. *Prog. Mater. Sci.* **50**, 962–1079 (2005).

58 Doeff, M. M. & Reed, J. S. Li ion conductors based on laponite / poly (ethylene oxide) composites. *Solid State Ionics* **113–115**, 109–115 (1998).

59 Grube, M., Shvirksts, K., Denina, I., Ruklisa, M. & Semjonovs, P. Fourier-transform infrared spectroscopic analyses of cellulose from different bacterial cultivations using microspectroscopy and a high-throughput screening device. *Vib. Spectrosc.* **84**, 53–57 (2016).

60 Schenzel, K. & Fischer, S. NIR FT Raman spectroscopy - A rapid analytical tool for detecting the transformation of cellulose polymorphs. *Cellulose* **8**, 49–57 (2001).

61 Valencia, G. A. Propriedades físicas de filmes à base de biopolímero reforçados com laponita. 125 (2017).

62 Lima, M. De *et al.* Effect of in situ modification of bacterial cellulose with carboxymethylcellulose on its nano/microstructure and methotrexate release properties. *Carbohydr. Polym.* **179**, 126–134 (2017).

63 Oliveira, R. L. de *et al.* Transparent organic-inorganic nanocomposites membranes based on carboxymethylcellulose and synthetic clay. *Ind. Crops Prod.* **69**, 415–423 (2015).

64 Haraguchi, K., Takehisa, T. & Ebato, M. Control of cell cultivation and cell sheet detachment on the surface of polymer/clay nanocomposite hydrogels. *Biomacromolecules* **7**, 3267–3275 (2006).

65 Tomás, H., Alves, C. S. & Rodrigues, J. Laponite®: A key nanoplatform for biomedical applications? *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 1–14 (2016). doi:10.1016/j.nano.2017.04.016