



CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



Dissertação de Mestrado

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

Rafael Romano Domenegueti

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 Domenegueti, Rafael Romano
Desenvolvimento "in situ" de nanocompósitos de celulose bacteriana contendo laponita / Rafael Romano Domenegueti. – 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.

Elaboração: Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Biblioteca do Instituto de Química, Unesp, câmpus de Araraquara



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

COORDENADOR: 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 morfológicamente, 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 *Komagaeibacter 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 μ m 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}

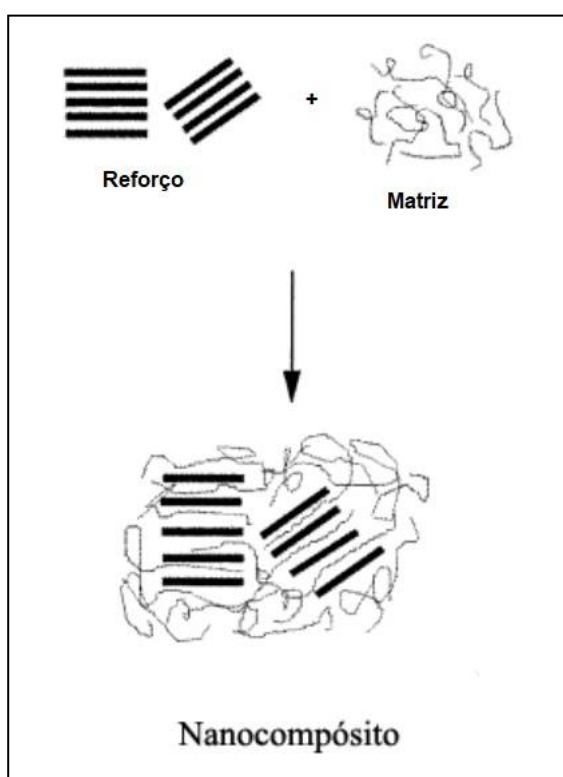
1.3 Compósitos

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, suprimindo 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

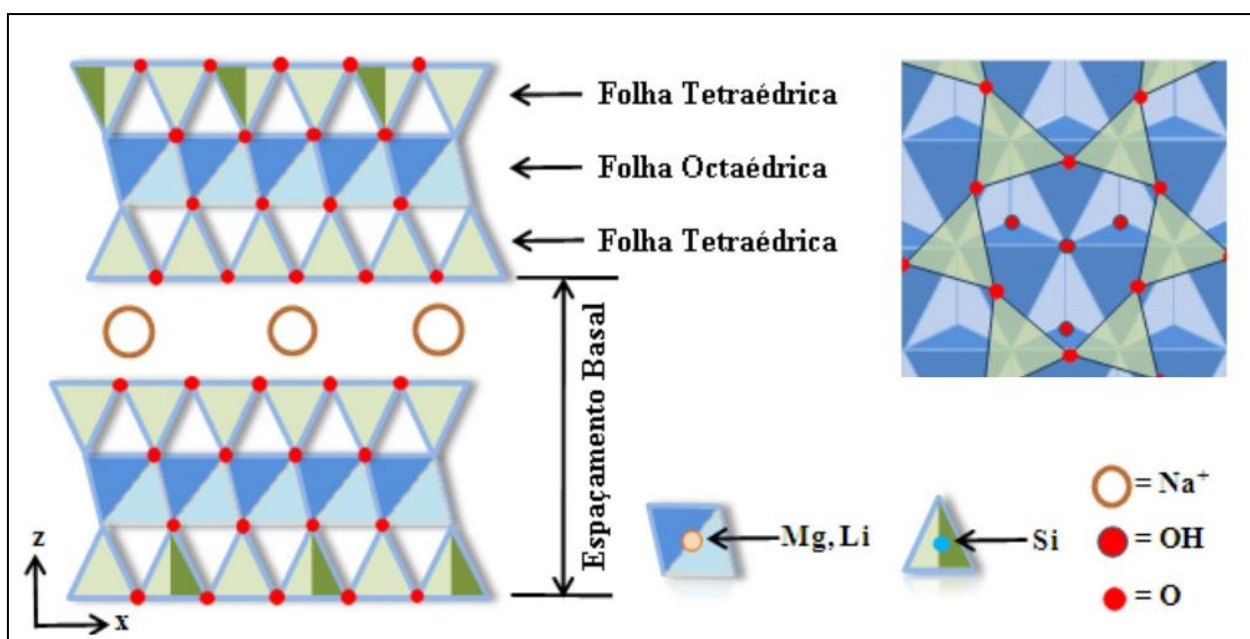
O uso de biocompósitos pode apresentar uma vantagem quando comparado a outros sistemas de liberação devido a atoxicidade, biocompatibilidade, e características específicas de cada biomaterial, como no caso da CB.¹⁴

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

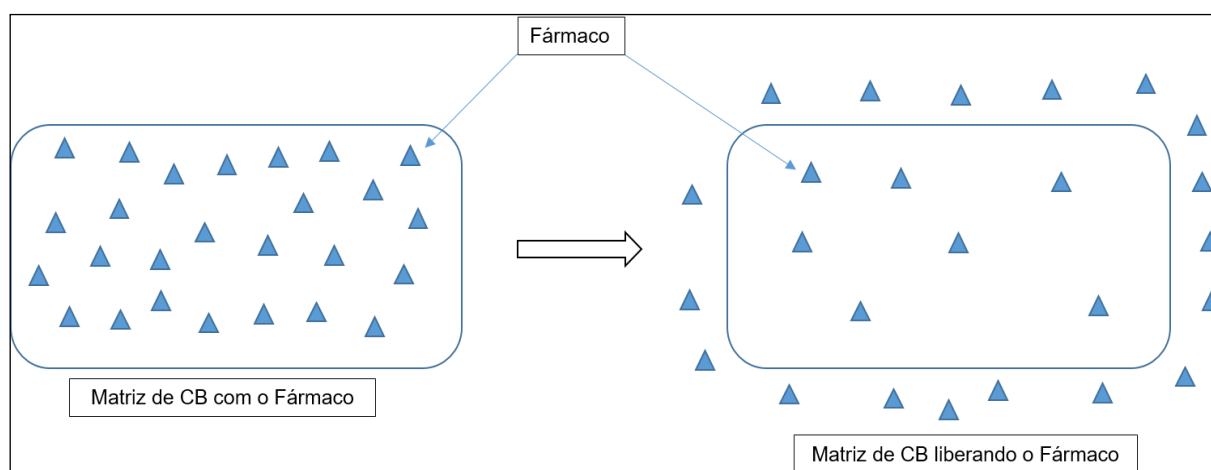
Tornou-se crescente, nas últimas décadas, o uso da tecnologia associada à modificação da liberação de fármacos, no que se refere à utilização de novas formulações farmacêuticas, por meio de sistemas matriciais poliméricos que auxiliem no transporte eficaz dessas substâncias e possam garantir a resposta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

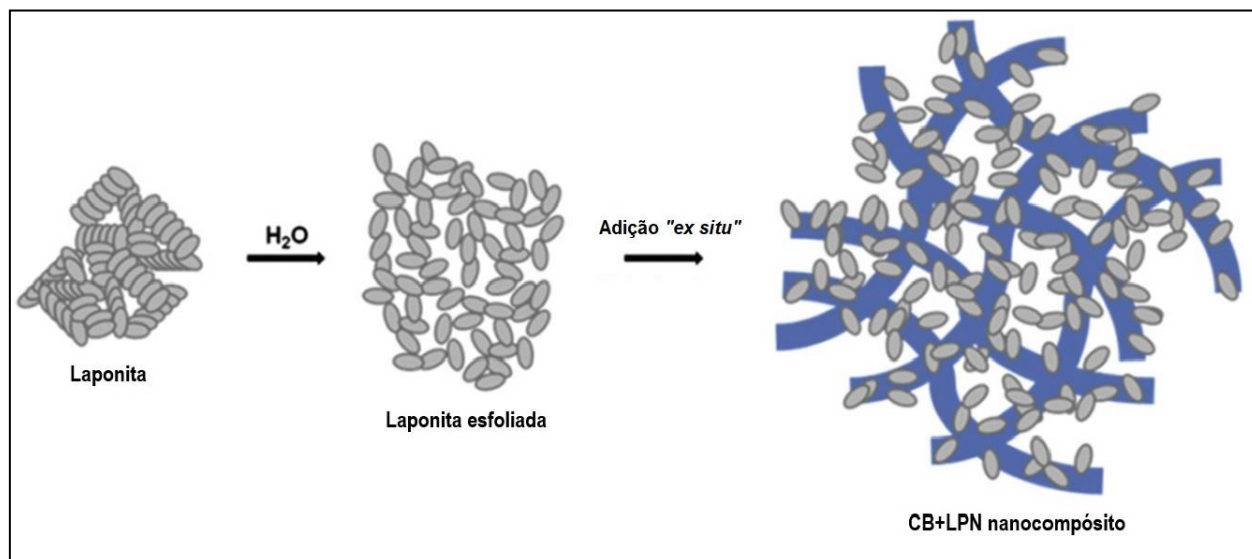
A CB apresenta liberação por difusão do fármaco incorporado, porém estudos da literatura mostram que a liberação do fármaco é muito rápida. Nos ensaios de dissolução, 80% do fármaco incorporado na matriz de CB pura é liberado nos primeiros 15 minutos.^{23,36}

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

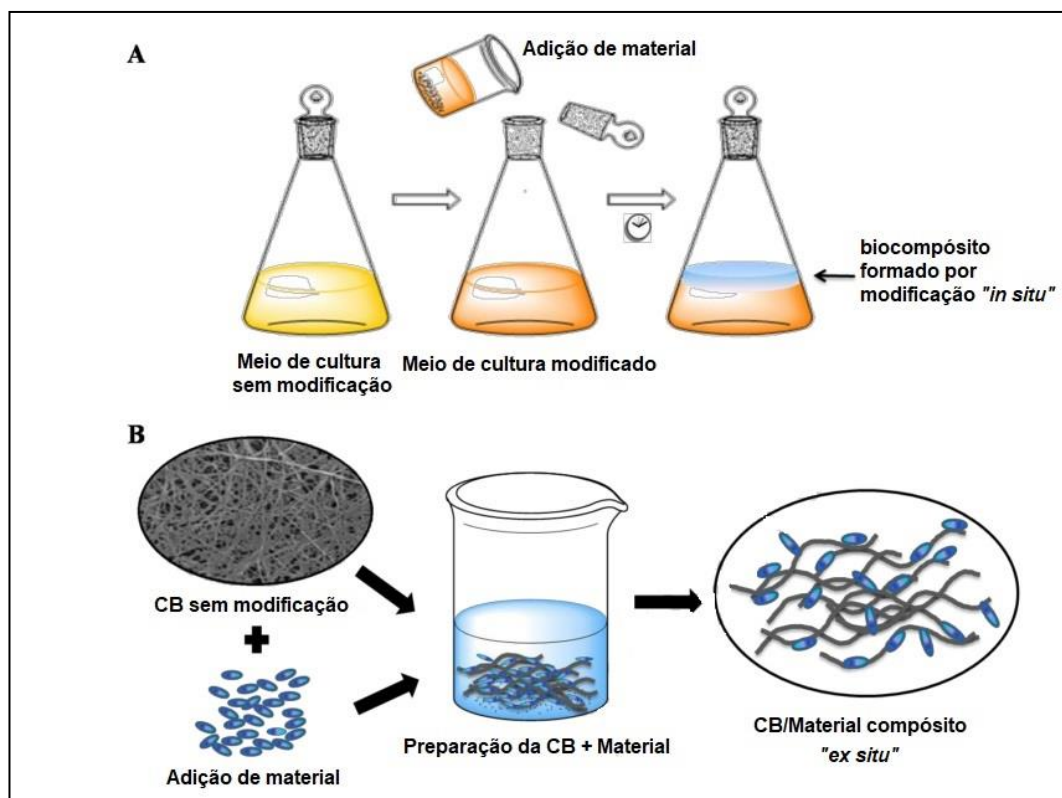
Figura 4 Processo de esfoliação da laponita e adição para desenvolvimento do nanocompósito "Ex situ".



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

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Esse trabalho teve como objetivo a preparação *in situ* e caracterização de nanocompósitos de CB contendo LPN.

2.2 Objetivos específicos

- Preparação "*in situ*" de nanocompósitos de CB variando a concentração de LPN;
- Caracterização dos nanocompósitos obtidos através de análise morfológica, térmica e estrutural;
- Determinação da citotoxicidade celular frente à linhagem de queratinócitos humanos normais (Hacat);
- Determinação da inibição bacteriana pelo método REMA (*resazurin microtiter assay*) frente a *P. aeruginosa* e *S. Aureus*;
- Determinação *in vitro* do perfil de liberação do fármaco cafeína.

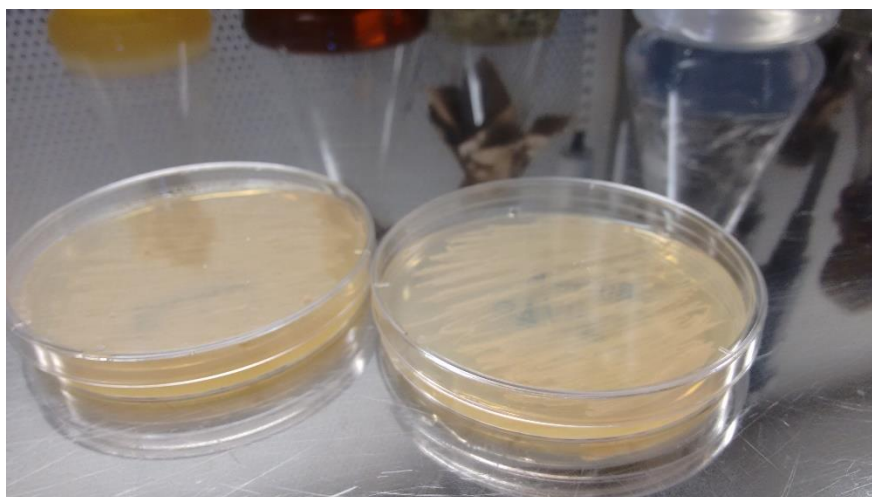
3 Materiais e Métodos

3.1 Ativação do microrganismo, produção de CB e purificação das biomembranas

Inicialmente, procedeu-se à ativação da *Gluconacetobacter xylinus* (ATCC 23760), microrganismo utilizado neste trabalho para a produção de celulose.

A bactéria armazenada em placas de Petri (como na figura 7) com meio Hestrin & Schramm (HS), foi inicialmente repicada para placas recém preparadas com o meio HS e armazenadas em estufa com circulação de ar com controle de temperatura a 28 °C por 72 horas.⁴³

Figura 7. Placa com meio HS sólido após o processo de ativação, observa-se uma camada de microrganismos na superfície.



Fonte: Autor, 2018.

Após o crescimento das bactérias na superfície da placa com o HS, o microrganismo foi raspado da superfície da placa com uma alça de cultivo e transferido para um meio líquido de produção contendo 50 gramas de glicose anidra, 4 gramas de extrato de levedura, 2 gramas de fosfato de potássio bibásico anidro, 0,72 gramas de sulfato de magnésio heptahidratado e 20 mililitros de Álcool Etílico, para o desenvolvimento e multiplicação das bactérias. O meio de cultura líquido com o microrganismo foi colocado na estufa com circulação de ar e controle de temperatura a 28 °C por 72 horas. Passado esse tempo, um filme de CB (como ilustrado na figura 8) foi formado na superfície do meio de cultura, indicando que o microrganismo está pronto para produção.

A partir desse ponto, foi escolhido o recipiente e volume para produção da CB, sendo que foi utilizado um volume de aproximadamente 90% de meio líquido, para aproximadamente 10% de meio com o microrganismo, em um frasco com uma relação de uma parte de líquido para quatro partes de ar.

Figura 8. CB formada após 3 dias de repique do microrganismo da placa para o meio líquido de cultivo.



Fonte: Autor, 2018.

É importante salientar que, após a pesagem e preparo dos meios, todo material foi esterilizado em autoclave a 121 °C, 1 atm por 20 minutos, e toda a manipulação de meio, placas e vidrarias foi feita dentro de fluxo laminar previamente limpo com solução alcoólica 70% e submetido a iluminação UV.

Um meio líquido com a alíquota de microrganismo foi feito e incubado a 28 °C por 24 horas, então a alíquota de 10 % desse meio foi adicionada em 90% de meio de cultura, e esse frasco ficou por 72 horas a 28 °C para formação da biomembrana de CB.

Em 3 dias, a biomembrana foi formada e então retirada do meio de cultura e adicionado a água deionizada para começar a retirada do meio de cultura e limpeza da biomembrana. Foram realizadas aproximadamente 5 trocas de água a cada 2 horas, durante 4 dias, até um clareamento visível da biomembrana e eliminação do cheiro característico de meio de cultivo (produção de ácido acético durante a formação da CB).

A biomembrana foi adicionado a um Becker com 1 litro de água deionizada e aquecido por 20 minutos a 80 °C. Em seguida, foi adicionada uma quantidade de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1M, suficiente para que esta solução do Becker ficasse com uma concentração 0,1M de NaOH. A biomembrana então ficou nessa solução por

40 minutos a 80 °C, em seguida foi removida da solução e adicionada a um frasco plástico contendo água deionizada. Foram realizadas trocas de água desse frasco até a água atingir o pH 7. Na figura 9, tem-se uma foto de uma manta de CB com 3 dias de crescimento, após o processo de purificação e neutralização, a espessura quando úmida é de 6 milímetros, massa úmida 240 gramas e espessura seca 0,07 milímetros, massa seca 2,15 gramas.

Depois desse processo, a biomembrana pode ser utilizada úmida para incorporações ou outras atividades, ou seca, o material é seco em um molde que mantenha a biomembrana esticada enquanto seca. A secagem é feita em estufa de circulação de ar a 50 °C.³⁸

Figura 9. Manta de CB com 3 dias de crescimento, após o processo de purificação e neutralização.



Fonte: Autor, 2018.

3.2 Preparação dos nanocompósitos de CB-LPN

Para o ensaio, foi utilizado uma laponita sintética XLG da BYK-Chemie ($\text{Na}_{0,7}[\text{Mg}_{5,5}\text{Li}_{0,3}]\text{Si}_8\text{O}_{20}(\text{OH})_4$) e foram determinadas concentrações de 0,1%, 0,25%, 0,50%, 0, 75% e 1,0% de LPN massa/volume total de meio, com base no desenvolvimento “*in situ*” realizado no trabalho com Tercjak et al, em 2015, e devido a geleificação que a LPN gera quando esfoliada e solubilizada em água.

Foi adicionada uma massa de LPN ao meio de cultura em função do volume total de meio de cultura (50 ml), utilizado no ensaio. Massas de LPN 50mg (0,1%), 125mg (0,25%), 250mg (0,50%), 375mg (0,75%) e 500mg (1,00%) foram pesadas e submetidas

a um sonificador de bancada por 15 minutos, para que ocorresse a esfoliação e solubilização do material, em seguida foi esterilizada juntamente com o restante do material, em autoclave.

Não foi possível adicionar uma maior quantidade de LPN ao meio de cultura, pois após autoclavação, o meio acabou ficando com a consistência muito alta (rígido, como se fosse meio sólido), não permitindo assim a inoculação do microrganismo ao meio de cultura modificado.

Os meios de cultura modificados e autoclavados foram levados para o fluxo laminar, juntamente com o meio de cultura com os microrganismos. As soluções com diferentes concentrações foram adicionadas a frascos Erlenmeyer contendo o meio de cultura líquido e a alíquota de 10% do meio líquido com o microrganismo foi adicionado a cada Erlenmeyer. Os frascos foram levados a estufa de circulação de ar a 28 °C por 72 horas, juntamente com um frasco sem adição de LPN para produção da biomembrana de CB pura (controle).

Após 72 horas, formaram-se biomembranas em todos os frascos com diferentes concentrações de LPN, os mesmos foram retirados do meio de cultura para o processo de lavagem, purificação e secagem, e então foram caracterizados.⁴⁴

3.3 Técnicas de Caracterização

3.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia de Força Atômica (MFA)

As imagens de MEV foram obtidas em um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV-FEG) modelo JEOL JSM 7500F acoplado com um equipamento de EDS Noran System 7/Thermo scientific instalado no Instituto de Química de Araraquara. As amostras foram colocadas sobre um suporte de cobre, recobertas com uma camada de carbono com espessura de 1-10 nm, operando na faixa de tensão de 2 kV. Análise realizada no instituto de química da Unesp, Araraquara.

As imagens de MFA correspondentes foram obtidas operando em modo de captura com um microscópio de sonda de varredura Dimension ICON da Bruker equipado com uma ponta de silício integrada/“cantilever” com uma frequência de ressonância de 300 kHz. As taxas de varredura variaram de 0,7 a 1,2 Hz. Análise realizada por Agnieszka Tercjak, do grupo de materiais e tecnologias (GMT), do departamento de engenharia química e ambiental da escola politécnica da Universidade do País Basco (UPV/EHU), em San Sebastián, Espanha

3.3.2 Difração de Raios-X (DRX)

Os padrões de difração de raios X (DRX) das amostras foram registrados em um difractômetro Rigaku, modelo Miniflex, utilizando radiação $\text{CuK}\alpha$ (1,541 Å, 30 kV, 15 mA, passo de digitalização de 0,03°) e filtro de Ni. Análise realizada no Laboratório de sólidos lamelares do instituto de química da USP São Paulo-SP.

É uma técnica que permite realizar estudos estruturais em materiais, determinando sua estrutura cristalina e sua fração percentual cristalina. Possibilita a determinação da célula unitária de um dado elemento, e ainda no caso da LPN a medida da Distância Basal da LPN.

3.3.3 Análise Termogravimétrica acoplada à espectrometria de massas (TGA-MS)

As análises térmicas acopladas em massa (análise termogravimétrica e espectrometria de massa, TGA-MS) foram registradas em um modelo de termoanálise Netzsch TGA / DSC (Differential Scanning Calorimetry) 490 PC Luxx acoplado a um espectrômetro de massa Aëolos 403 C, usando um cadinho de alumínio, sob ar sintético Fluxo de 50 ml/min e uma taxa de aquecimento de 10°C/min. Análise realizada no Laboratório de sólidos lamelares do instituto de química da USP São Paulo-SP.

3.3.4 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os filmes obtidos e a LPN foram identificados no espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier da marca Thermo Scientific, modelo Nicolet IS5, através do módulo de transmissão ID1, com varredura de 4000-400 cm^{-1} , background realizado com 32 escaneamentos e amostras submetidas a 32 escaneamentos por análise, com uma resolução de 2 cm^{-1} , realizado no Laboratório de Química Geral e Inorgânica do instituto de química da Unesp, Araraquara.

É uma ferramenta poderosa na identificação de determinados grupos funcionais e nos estudos de conformação e estrutura de moléculas.

3.3.5 Espectroscopia Raman com Transformada de Fourier

Os espectros de Raman com transformada de Fourier (FT-Raman) foram registrados num espectrômetro FT-Raman Bruker FRS-100/S usando radiação de

excitação de 1064 nm (Nd: YAG laser Coherent Compass 1064-500 N) e um detector Ge. Escala espectral de 3500-50 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} , 1024 varreduras e intensidade de 15 mW. Análise realizada no Laboratório de sólidos lamelares do instituto de química da USP São Paulo-SP.

A espectroscopia Raman é uma técnica fotônica de alta resolução que pode proporcionar, em poucos segundos, informação química e estrutural de muitos materiais, orgânicos ou inorgânicos permitindo assim sua identificação.

3.4 Ensaio de citotoxicidade celular

O ensaio de citotoxicidade celular foi realizado na faculdade de ciências farmacêuticas, Unesp Araraquara, no laboratório de microbiologia do Prof. Dr. Fernando Pavan. Ensaio realizado pela pós-doutoranda Isabel Silva.

3.4.1 Extração das amostras

As amostras foram extraídas em ambientes estéreis, quimicamente inertes utilizando técnicas de assepsia de acordo com as normas da ISO 10993-12. Os materiais com área de superfície de 6 cm^2/mL , foram submetidos a extração com meio de cultura LB (bactérias) e DMEM (células) por 24 horas a 37 °C.

3.4.2 Cultura de células

As células HaCat (BCRJ:0341), queratinócitos humanos normais espontaneamente imortalizados, foram adquiridas do banco de células do Rio de Janeiro e cultivadas em meio DMEM (Sigma®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (v/v) (Vitrocell®), solução de antibiótico/antimicótico (Sigma®, 100 U de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de sulfato de estreptomicina e 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anfotericina B) e sulfato de kanamicina (Sigma®, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). As culturas foram mantidas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO_2 .

3.4.3 Avaliação da Citotoxicidade

Este ensaio foi realizado com o intuito de determinar o índice de citotoxicidade (IC_{50} : a maior concentração em que o composto permite 50% de viabilidade celular). O teste foi realizado segundo as diretrizes da ISO 10993-5 que regula sobre testes de citotoxicidade para dispositivos médicos.

A avaliação da citotoxicidade foi realizada a partir do ensaio REMA (*resazurin microtiter assay*), onde a resazurina (Sigma[®]), corante de cor azul não fluorescente, é reduzida por células metabolicamente ativas, ao corante resofurina, de cor rosa e fluorescente.⁴⁵

Inicialmente, células na concentração de $2,5 \times 10^5$ células/mL foram semeadas em placas de 96 poços com volume de 100 µL/poço de meio de cultura e incubadas até a aderência das células (24 horas) a 37 °C. Em seguida, o meio foi removido e as células foram tratadas com os eluatos extraídos, conforme descrito acima, em concentrações que variaram de 0,8 a 100% com volume final de 100 µL/poço, durante um período de 24 horas. Após o tratamento o meio foi removido e uma solução de 50 µL de resazurina (0,01%, dissolvida em meio de cultura) foi adicionada e incubada a 37 °C. por três horas.⁴⁶

Como controles foram utilizados: A) branco (apenas meio de cultura, sem células); B) controle negativo (com células e sem tratamento); C) controle positivo (com células tratadas com doxorrubicina na concentração de 100 nmol/mL); D). Foram realizados no mínimo 3 experimentos independentes.

As placas foram lidas em leitor de fluorescência (Synergy H1, Biotek[®]) utilizando-se os comprimentos de onda de 530 nm (excitação) e 590 nm (emissão).

A porcentagem de viabilidade celular foi determinada aplicando-se a fórmula a seguir, considerando a igual à média da leitura dos orifícios controle negativo (orifícios apenas com células e meio de cultura) e b o resultado de cada orifício com a respectiva diluição do composto analisado.

$$\% \text{ de Viabilidade Celular} = \frac{100 \times b}{a}$$

3.5 Ensaio de inibição bacteriana

O ensaio de inibição bacteriana foi realizado na faculdade de ciências farmacêuticas, Unesp Araraquara, no laboratório de microbiologia do Prof. Dr. Fernando Pavan. Ensaio realizado pela pós-doutoranda Isabel Silva.

3.5.1 Linhagens bacterianas e condições de crescimento

As linhagens *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 13388) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) foram fornecidas pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) e cultivadas à 37 °C em meio Luria Bertani (LB) sólido.

3.5.2 Teste de inibição de crescimento bacteriano (REMA)

Avaliação de inibição de crescimento bacteriano foi realizado utilizando o ensaio REMA com algumas modificações.⁴⁷

As bactérias foram inoculadas em meio sólido LB e cultivadas em estufa à 37°C por 24h. Após este período foram inoculadas em 3 mL meio líquido (4 a 5 colônias) por 18h a 37 °C. A concentração do inóculo foi corrigida para $2,5 \times 10^5$ células/poço em volume final de 100 µL de meio de cultura. Foram adicionados 100 µL do eluato obtido após a extração em concentrações que variaram de 0,8 a 100%.

Os controles: negativo e positivo foram constituídos de 100 µL de meio de cultura e solução de antibiótico (kanamicina 15.6 µg/mL) diluída em LB, respectivamente. Em seguida submetidas à incubação à 37°C, por 24h. Após esse período foi adicionada uma solução de resazurina por três horas na concentração de 0,01% em água destilada estéril. As placas foram lidas em leitor de fluorescência (Synergy H1, Biotek®) utilizando-se os comprimentos de onda de 530 nm (excitação) e 590 nm (emissão).

Três experimentos independentes foram realizados, e os dados obtidos foram utilizados para determinação dos valores de C_{IM90} a partir da reta de regressão logarítmica.

O potencial inibitório de cada tratamento foi expresso pela porcentagem de morte bacteriana, calculada em relação ao controle negativo segundo a fórmula:

$$\% \text{ Bactérias mortas} = \left[\frac{\text{UAF do controle negativo} - \text{UAF do teste}}{\text{UAF do controle negativo}} \right] * 100$$

UAF = Unidade arbitrária de fluorescência

3.6 Ensaio de dissolução de fármaco

Para o ensaio de dissolução foi escolhido a cafeína como fármaco, devido a sua alta solubilidade em água, baixo custo, e por ser um material de relativa simplicidade para

validação e quantificação por espectrofotometria de UV/Vis. A cafeína ainda possui potencial para ser utilizado no tratamento de psoríase, celulite, além de agir aumentando a vasodilatação dos vasos sanguíneos, melhorando assim a vascularização local.^{42,48,40,41}

Foram obtidas curvas analíticas da cafeína (CFN) em solução de tampão fosfato 0,1M, pH 5,8, que simula o pH da pele. Partindo de uma solução estoque, foram tomadas alíquotas para o preparo de diluições na faixa de concentração entre 5 µg/mL e 45 µg/mL.

As leituras da cafeína foram realizadas em um espectrofotômetro de UV/Vis (Thermo Fisher Scientific's Evolution Array UV-Visible) com comprimento de onda fixo de 272 nm. Os valores médios da triplicata das leituras de cada concentração foram utilizados para a obtenção das curvas analíticas para o cálculo da equação da reta.⁴⁹

Foi realizado uma validiação do método através da linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).

A linearidade do método foi determinada através da obtenção da curva analítica da cafeína em tampão fosfato (0,1 mol/L; pH 5,8). A partir de soluções estoque contendo 1000 µg/mL do fármaco, foram preparadas diluições com concentrações variando de 5 a 45 µg/mL, em triplicata. Uma curva analítica da concentração de cafeína *versus* absorbância foi obtida.³⁴

A precisão foi avaliada em dois níveis: repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (interdias) em dias consecutivos. A exatidão foi determinada através da porcentagem de recuperação das amostras em relação ao padrão correspondente. Os limites foram estimados por: $LQ = DP \times 10/IC$ e $LD = DP \times 3/IC$. (DP= desvio padrão do intercepto com o eixo y de três curvas de calibração e IC= média dos coeficientes angulares das respectivas curvas).^{42,}

3.6.1 Determinação “in vitro” do perfil de liberação da cafeína

Os ensaios de dissolução para a determinação “in vitro” do perfil de liberação da cafeína foram realizados para as amostras de CB pura úmida, CB pura seca, CB-LPN 1,0% Úmida e CB-LPN 1,0% seca. Foram escolhidos esses nanocompósitos devido a maior quantidade de LPN detectada através da análise de TGA-MS.

O processo de incorporação da cafeína se deu através da solubilização de 50 mg de cafeína em 5 mL tampão fosfato 0,1 M pH 5,8. Os nanocompósitos úmidos foram pesados e tiveram sua massa reduzida em 1/3 (desidratação).

Após, esse processo, a solução de cafeína solubilizada foi adicionada dentro de uma placa de Petri juntamente com o nanocompósito e através do intumescimento (característica do material) o fármaco foi incorporado.

O material então foi seco e separado para o experimento de dissolução. Para as amostras úmidas após intumescimento os nanocompósitos já foram separados para o teste.^{36,23}

As determinações foram realizadas no dissolutor de 3 cubas (Ethiktechnology modelo 299/3) com meio de dissolução preparados de acordo com a United States Pharmacopeia USP 31 (2008), realizados em tampão fosfato (0,1M, pH 5,8), durante 5 h à $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, utilizando aparato V (pás sobre discos), sob velocidade de agitação de 50 rpm com as amostras incorporadas com 50 mg de CFN.

Durante o ensaio, alíquotas de 2 mL foram coletadas em intervalos de tempo pré-estabelecidos, filtradas em membrana de acetato de celulose (0,22 μm), e em seguida repostos com o mesmo volume de meio a fim de manter as condições *sink* (condição de infinita solubilidade).^{23,36} A análise quantitativa de cafeína liberada foi realizada em espectrofotômetro UV-visível, $\lambda = 272\text{ nm}$ (Thermo Fisher Scientific's Evolution Array UV-Visible).

4 Resultados e discussão

Nesse trabalho foi proposta uma rota alternativa de síntese de nanocompósitos de CB contendo LPN, por meio do processo de produção *“in situ”*.

A figura 10, apresenta as imagens dos nanocompósitos obtidos, através do desenvolvimento *“in situ”* e a imagem de uma membrana de CB pura que serviu como controle.

Em A, tem-se a CB pura, apresentando um filme rugoso e com um certo grau de opacidade. Observa-se que conforme aumentou-se a concentração de LPN na amostra (B-F), os filmes obtidos apresentam cada vez mais transparência. Pode-se concluir isso ao fato da LPN gerar tal característica ao nanocompósito, como descrito em Perotti 2011.³⁷ Conforme aumentou-se a concentração de LPN nos filmes obtidos foi possível observar uma redução da massa tanto úmida quanto seca dos nanocompósitos, comparados com a CB pura.

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).



Fonte: Autor, 2018.

4.1 Análises Morfológicas

Foram realizadas imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia de Força Atômica com a finalidade de avaliar parâmetros como a morfologia apresentada nos filmes obtidos, assim como o tamanho e a dispersão das partículas de LPN na matriz de CB.

Observa-se que independentemente da concentração de LPN adicionada no meio, a membrana de CB atuou como matriz no controle, estabilização e dispersão da LPN. Resultados similares a esses têm sido observados para outros sistemas que usam a CB como matriz na estabilização de nanopartículas de prata e sílica, porém através do desenvolvimento “*pós situ*”.^{50, 51}

4.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

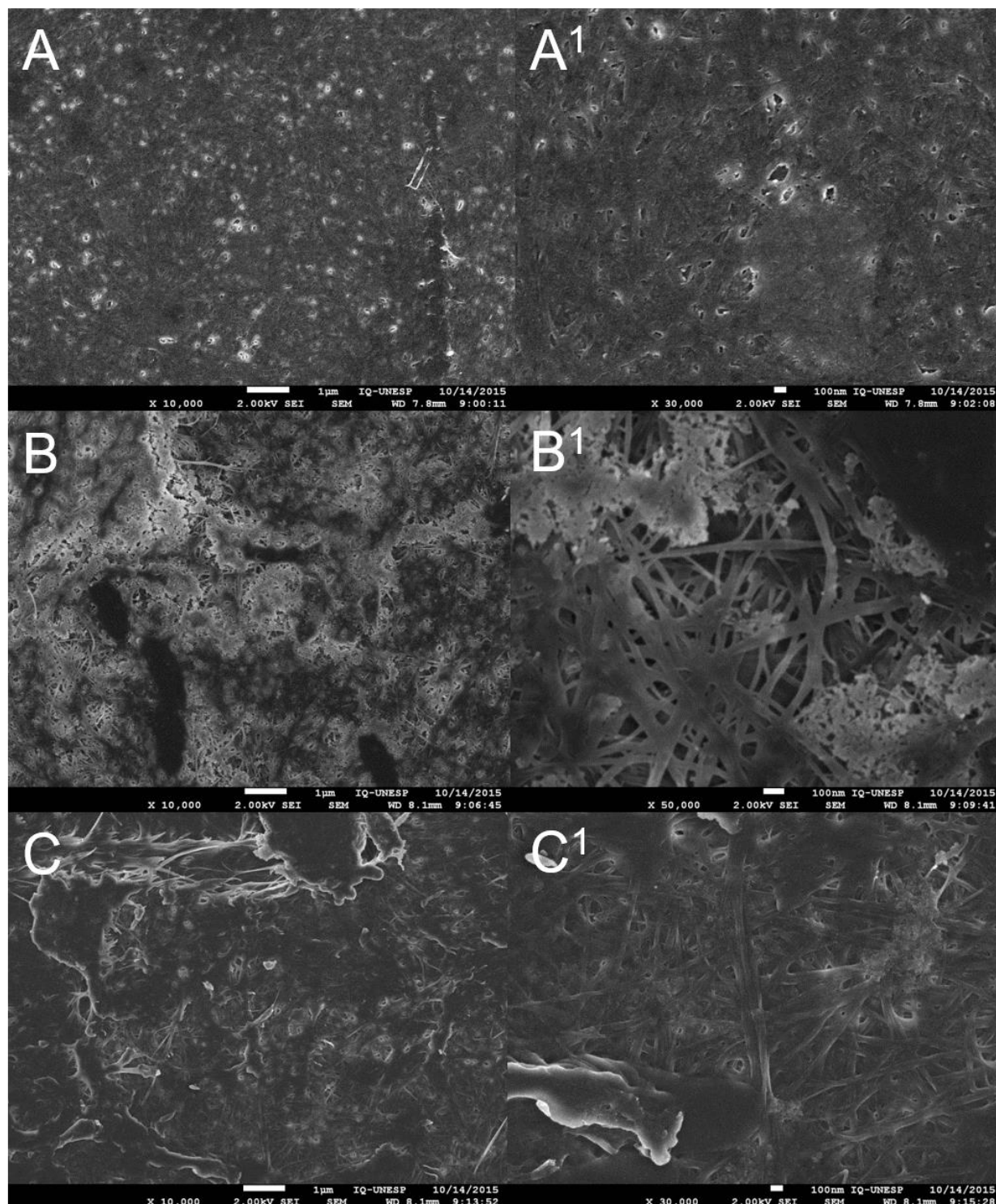
As figuras 11 e 12 apresentam imagens da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Na figura 13, tem-se a medida de espectroscopia de fotoelétrons de raios x (EDS) do nanocompósito CB-LPN 0,75%.

Na Imagem A, tem-se a CB pura seca, apresentando morfologia com um emaranhado de fibras, colapsados, formando uma grande rede, facilmente visível na imagem A¹. Nas imagens (B-F e B¹-F¹), é possível observar que a estrutura de fibras da CB continua intacta, apresentando um emaranhado de nanofibras formando uma rede, porém depositadas nessas nanofibras aparecem partículas, aglomerados e placas, diferentemente da CB pura, indicando assim uma possível deposição da LPN no material.

As imagens de MEV, de B¹-F¹ mostram que a estrutura fibrosa da celulose bacteriana se manteve inalterada. Observa-se ainda a presença de muitos sítios com a deposição de aglomerados de diversos tamanhos, dispersos sobre as nanofibras dos nanocompósitos produzidos.

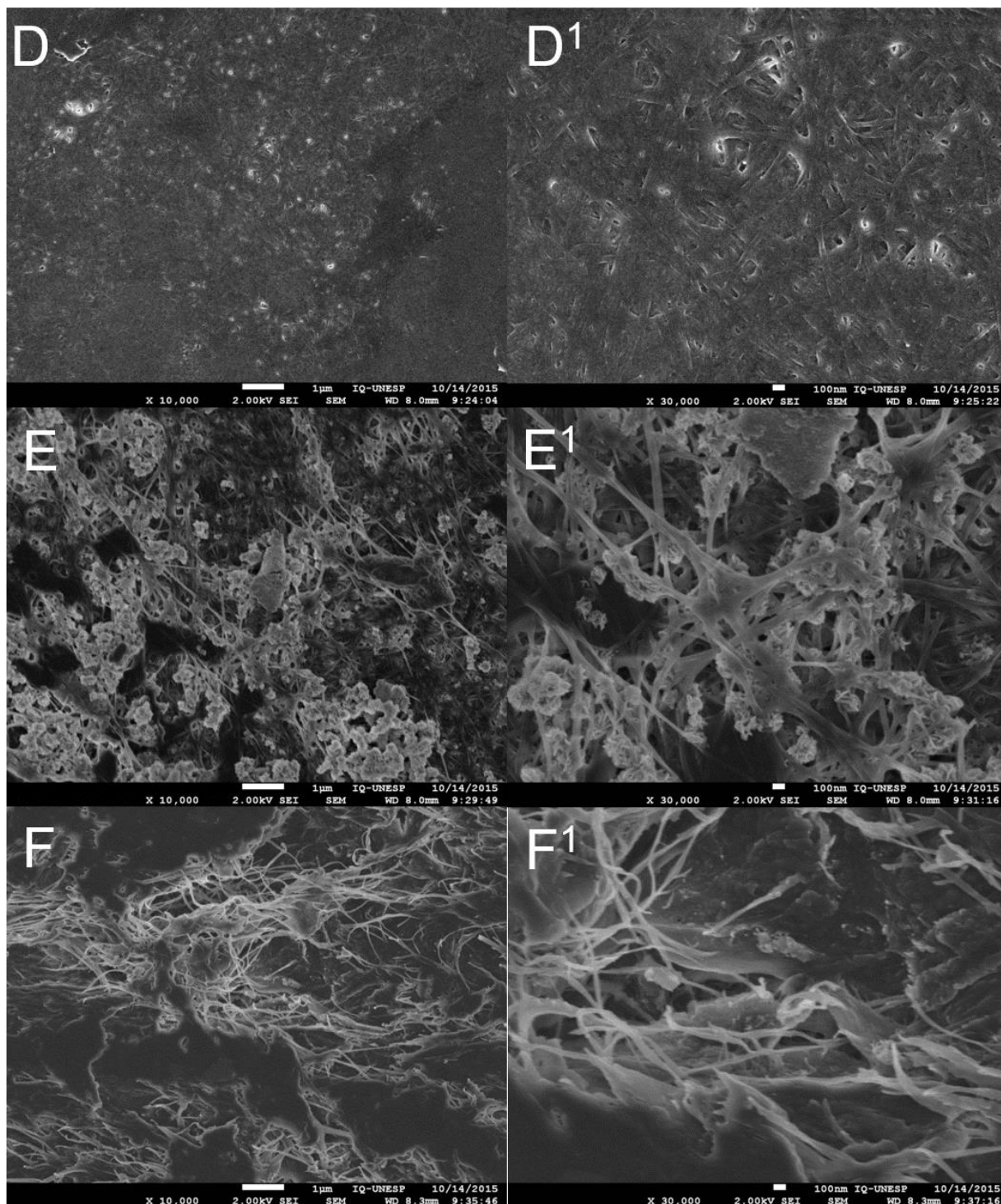
As medidas de EDS confirmam que os cristais são formados por átomos característicos da LPN inserida no desenvolvimento da membrana (Na, Mg e Si)^{37,52}.

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%.



Fonte: Autor, 2018.

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, D¹) CB-LPN 0,5%, E¹) CB-LPN 0,75% e F¹) CB-LPN 1,0%.



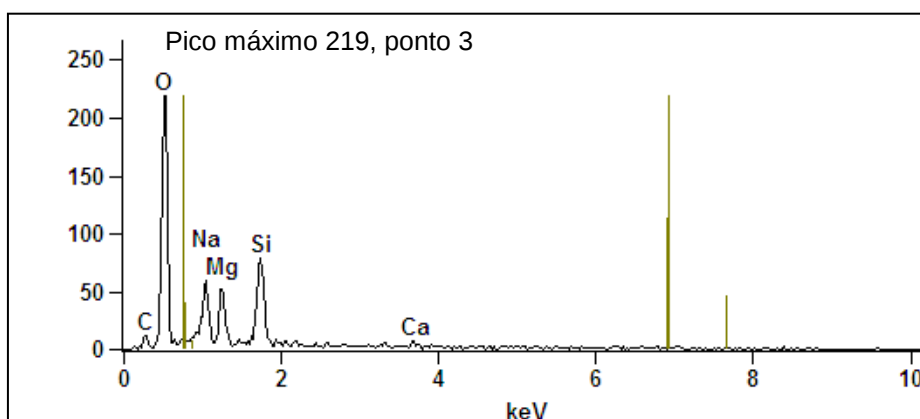
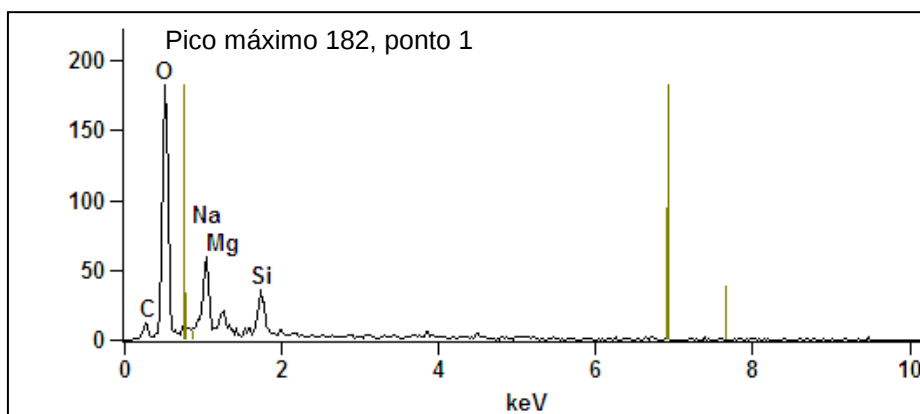
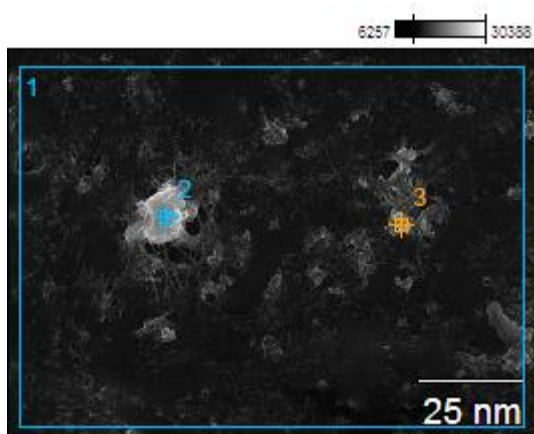
Fonte: Autor, 2018.

Na imagem da figura 13, através da análise de EDS, foi possível identificar a presença de Na, Mg, Si, os principais íons presentes na estrutura da LPN. No EDS através do Microscópio do MEV é selecionado uma área específica, e sobre essa área raios-X são irradiados, cada átomo emite um sinal determinado para essa radiação,

assim pode se ter uma ideia da constituição qualitativa da amostra. Também através da imagem do EDS, pode-se medir com a ajuda da escala, a presença de aglomerados e placas com um pouco menos de 25 nm. A LPN se apresenta na forma de grânulos micrométricos com diâmetro médio de 20 - 30 nm.²⁸

Na superfície da CB (figura 3) é possível observar a presença de pequenos agregados dos grânulos individuais e também pequenas placas, sendo esse dado mais um para enfatizar a presença da LPN nas fibras da CB.⁵³

Figura 13. EDS, Amostra de CB - LPN 0,75%.



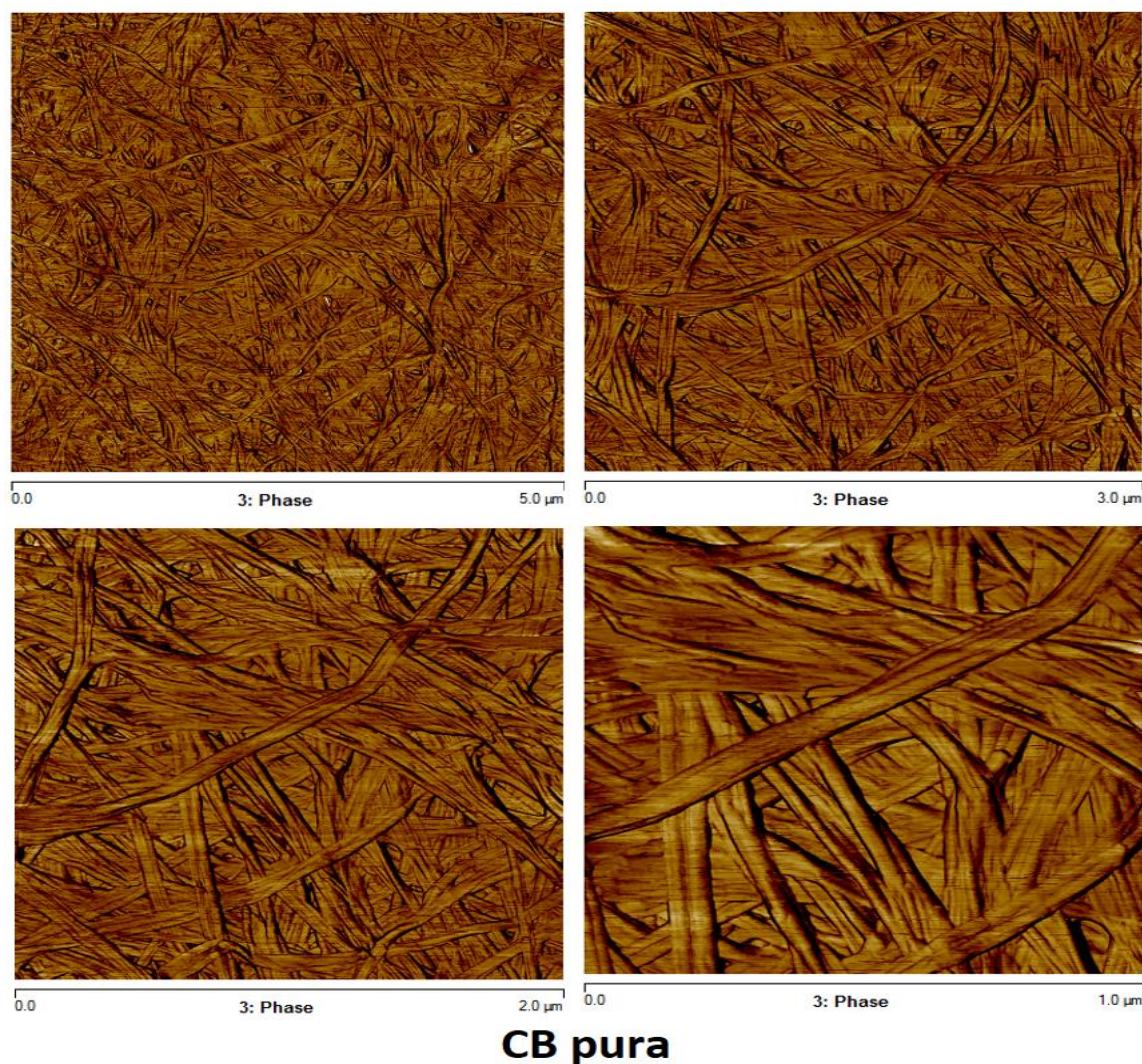
Fonte: Autor, 2018.

4.1.2 Microscopia de Força Atômica

As figuras 14, 15, 16, 17, 18 e 19 elucidam os MFA da CB pura e dos Nanocompósitos, respectivamente.

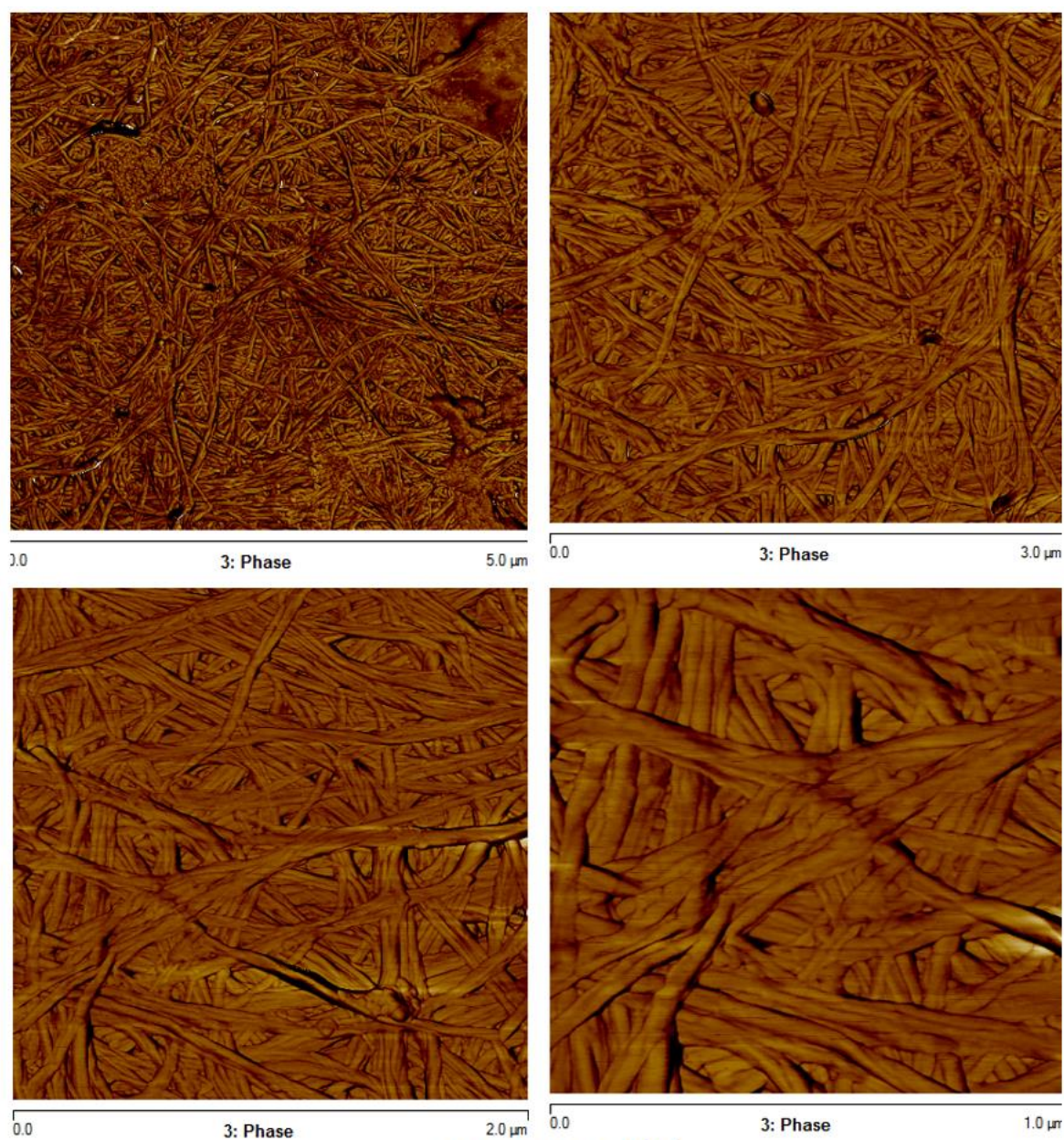
A figura 14 revela uma superfície formada por uma rede de nanofibras, num arranjo desordenado, característico da CB.⁴⁴ Já nas figuras 15, 16, 17, 18 e 19, observa-se a presença das nanofibras de forma desordenada, porém sobre elas aparecem depositadas partículas e pequenos aglomerados, ao que tudo indica ser o material incorporado. É possível observar também que a incorporação do material não alterou a estrutura e organização das nanofibras da CB, mantendo assim suas características visuais.

Figura 14. Análise MFA, CB pura com escala de 5;3;2 e 1 micrometro.



Fonte: Autor, 2018.

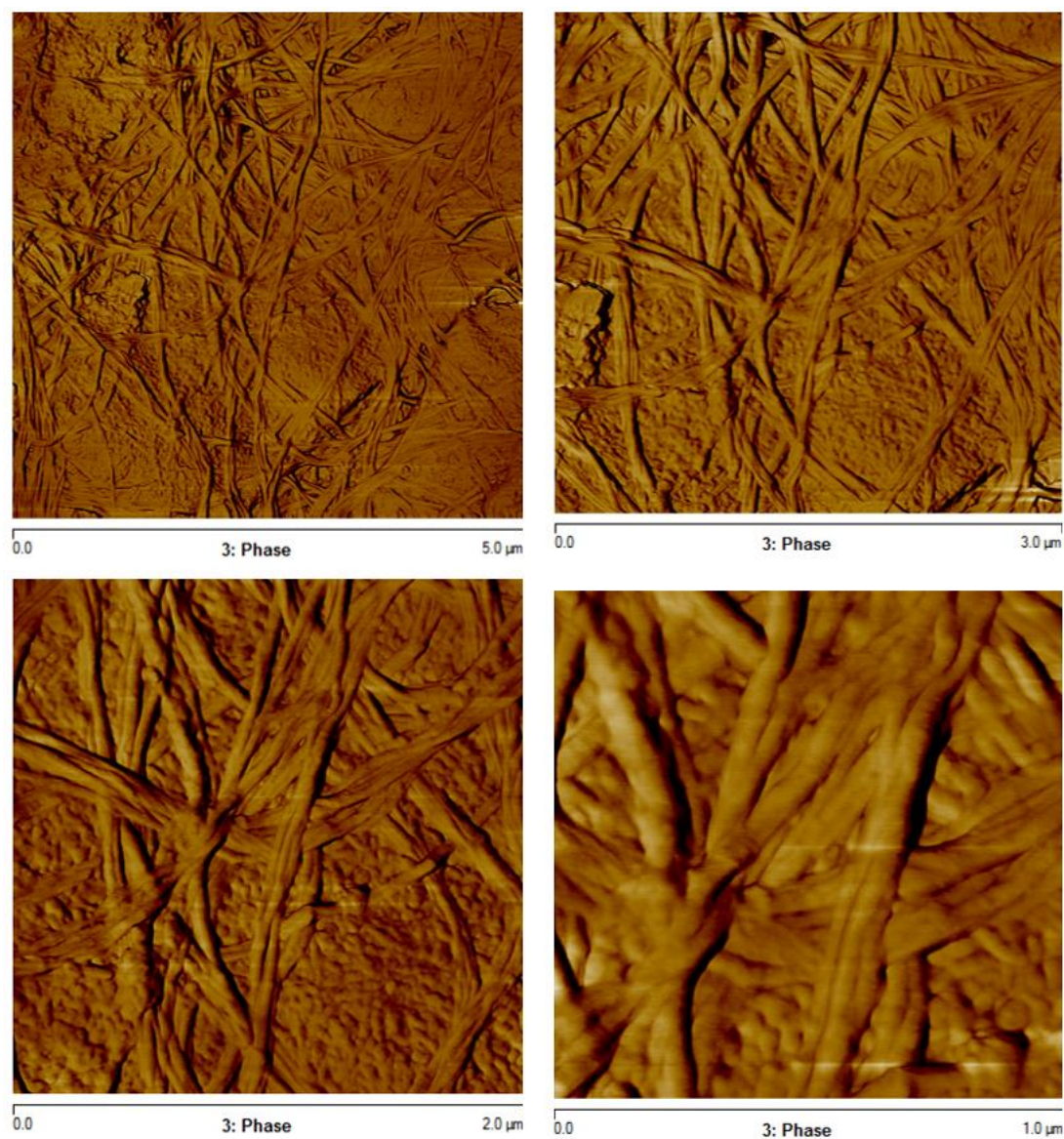
Figura 15 - Análise MFA, CB-LPN 0,1% com escala de 5;3;2 e 1 micrometro.



CB-LPN 0,1%

Fonte: Autor, 2018.

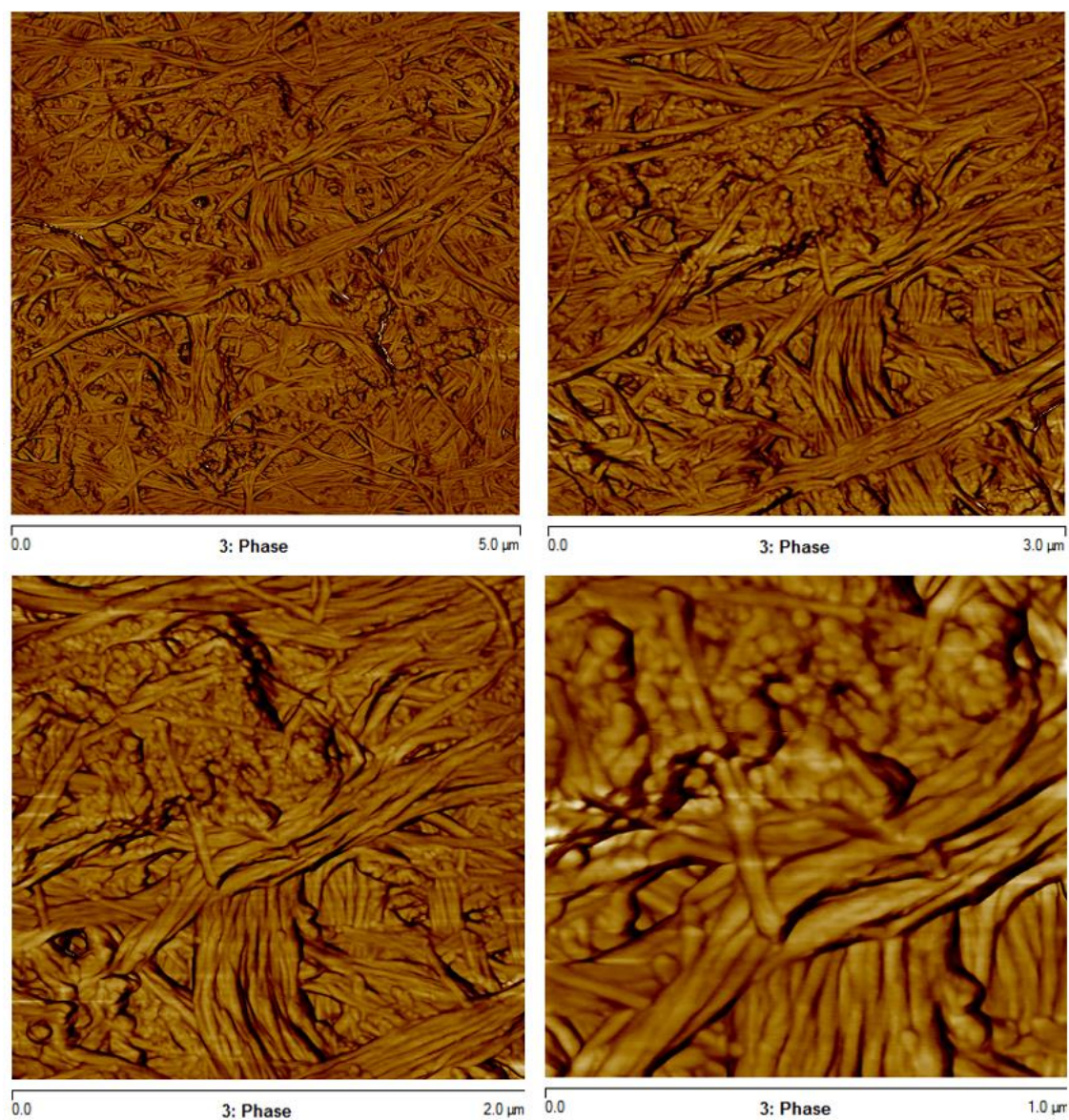
Figura 16 Análise MFA, CB-LPN 0,25% com escala de 5;3;2 e 1 micrometro.



CB-LPN 0,25%

Fonte: Autor, 2018.

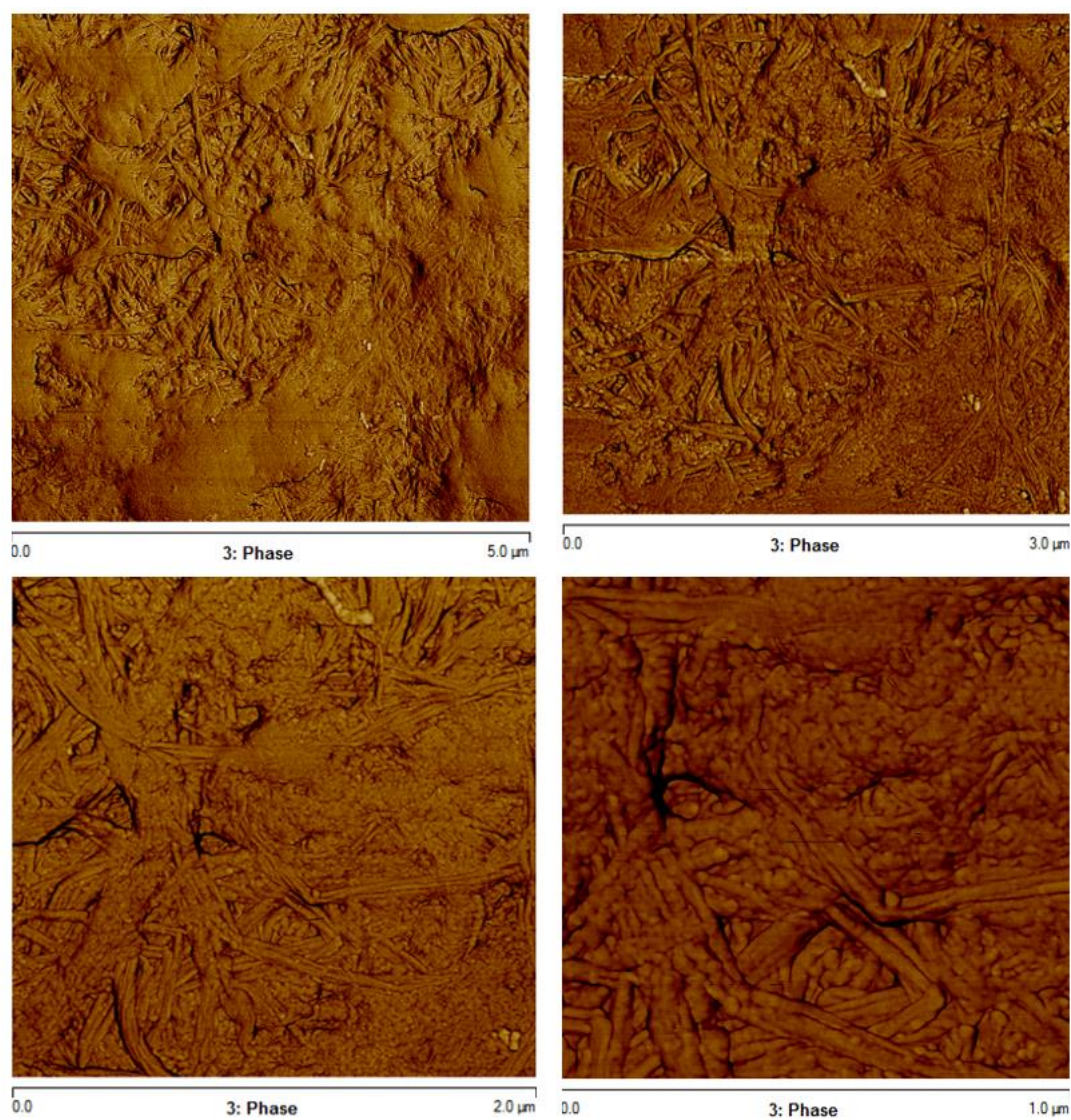
Figura 17 Análise MFA, CB-LPN 0,50% com escala de 5;3;2 e 1 micrometro.



CB-LPN 0,50%

Fonte: Autor, 2018.

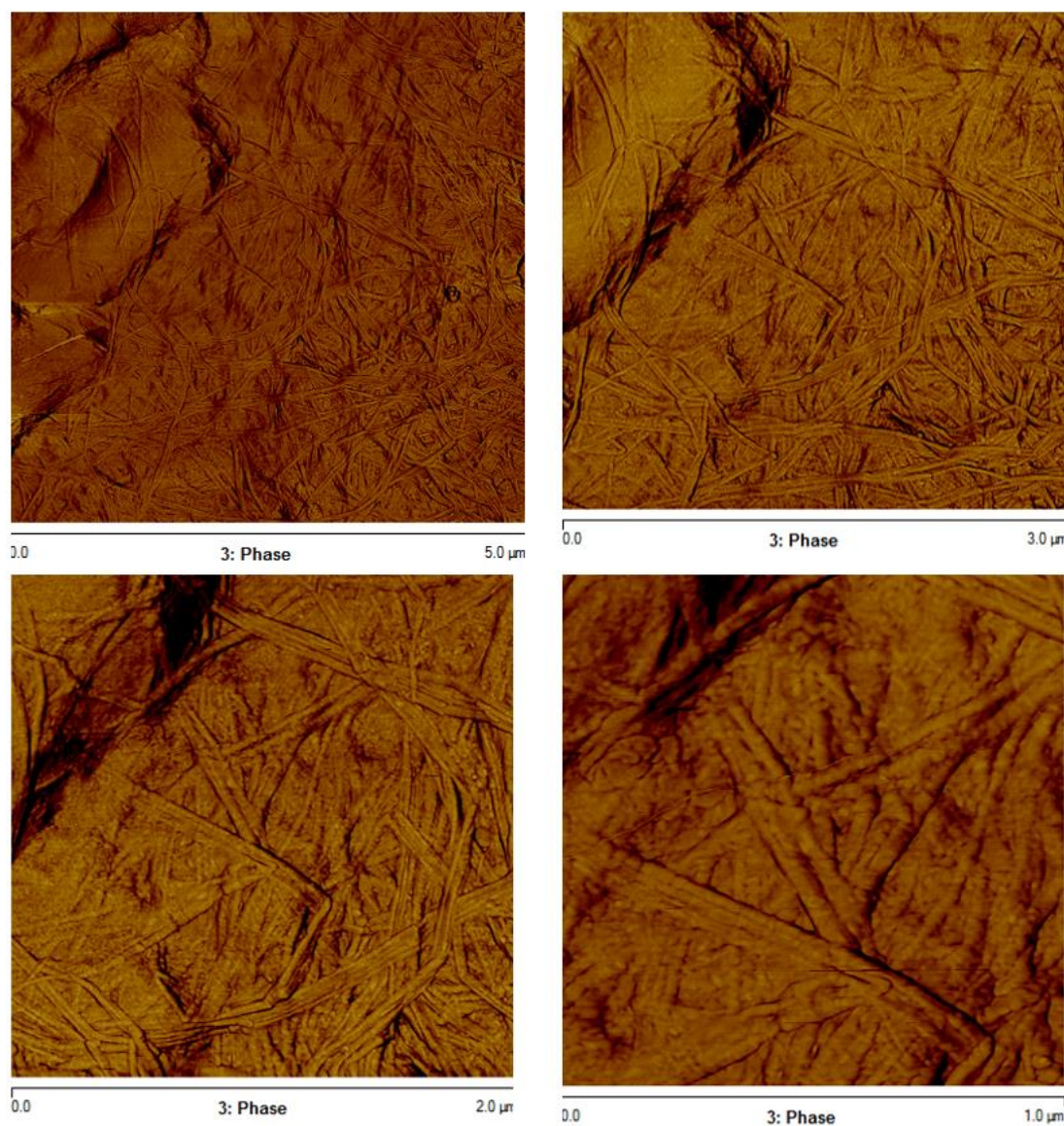
Figura 18 Análise MFA, CB-LPN 0,75% com escala de 5;3;2 e 1 micrometro.



CB-LPN 0,75%

Fonte: Autor, 2018.

Figura 19 - Análise MFA, CB-LPN 1,0% com escala de 5;3;2 e 1 micrometro.



CB-LPN 1,0%

Fonte: Autor, 2018.

4.2 Análises Estruturais

4.2.1 Análise de Difração de Raios X

Devido à natureza hidrofílica das argilas intercaladas com íons de metais alcalinos, o difratograma de argilas puras, geralmente, apresenta um pico largo acima do pico do espaçamento basal, relacionado apenas à presença de íons Na^+ ($2\theta/\text{graus} = 6,75^\circ$; $d_{001} = 13,1\text{\AA}$). Esse fenômeno é ocasionado pela presença de uma pseudo-camada de moléculas de água (valor próximo a $2,5\text{\AA}$ de espessura)⁵⁴ que rodeiam os cátions

presentes no domínio interlamelar, acarretando em um aumento no espaçamento basal detectado.⁵⁵

Os difratogramas (figura 20), normalizados (0,100) apresentam a presença de picos muito característicos da CB em, aproximadamente, 15° e 22° referentes as contribuições das fases cristalinas I α e I β presentes na CB ⁵⁶.

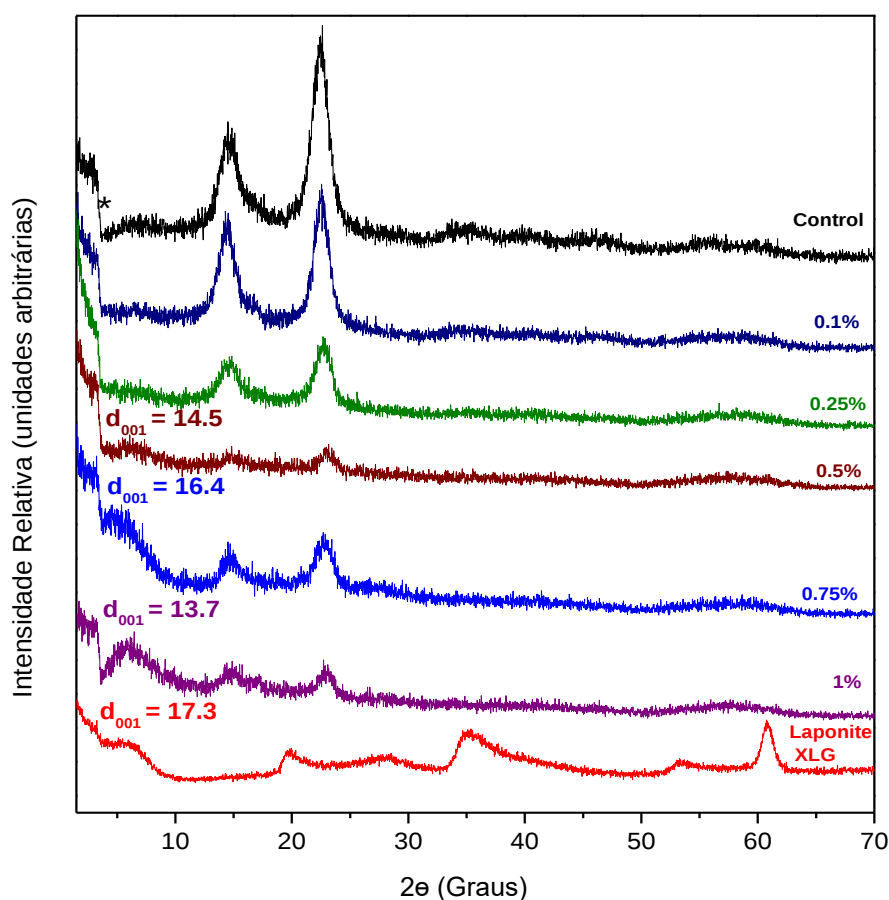
O padrão XRD de LPN na forma de Na⁺ tem um pico amplo, em cerca de 6,75° (2 θ) associado ao espaçamento basal (d_{001}) de cerca de 1,73 nm.

Essa distância entre as lamelas é suficiente para incorporação da cafeína nos nanocompósitos, considerando o tamanho de aproximadamente de 1 nm do fármaco.

As medidas do espaçamento basal da LPN pura e dos nanocompósitos, mostra que ocorre uma redução desse espaçamento basal, após a incorporação *“in situ”*. Este fenômeno pode estar acontecendo devido a uma aglomeração da LPN presente na amostra, ou devido a uma maior desorganização da estrutura da LPN quando incorporada.

Também é possível observar um achatamento dos picos em 15° e 22°, o que sugere que com o aumento da concentração de LPN na estrutura do nanocompósito vai ocorrendo uma redução da cristalinidade, alterando a organização estrutural original da LPN e da CB levando assim a uma redução do espaçamento basal.

Figura 20. Análise de difração de raios X.



Fonte: Autor, 2018.

4.2.2 Análise Termogravimétrica acoplado a espectrometria de massas (TGA-MS)

Os dados de TG-MS e DTG da CB, LPN e nanocompósitos CB-LPN são mostrados na figura 21. O aumento do teor de argila nos nanocompósitos, resulta em um aumento da massa residual (constituída praticamente de Argila térmica).

Todos os nanocompósitos produzidos, apresentam o primeiro evento de perda de massa (~5%) associado à perda de água (processo de desidratação que ocorre até cerca de 150°C), observado nas curvas TG, mas melhor visualizado na figura 22.

O segundo evento (faixa de 228-350°C) de perda de massa, mostra um pequeno deslocamento para maiores temperaturas, quando o teor de argila é aumentado, começando em 228°C para celulose bacteriana e a 260° C para a amostra BC-LP 1%, de acordo com os dados na figura 22. A presença de argila na matriz polimérica deve atuar como uma barreira protetora contra a decomposição da cadeia de carbono, deslocando o início do processo de decomposição. As partículas de argila podem dificultar o contato do nanocompósito com o oxigênio molecular³⁷.

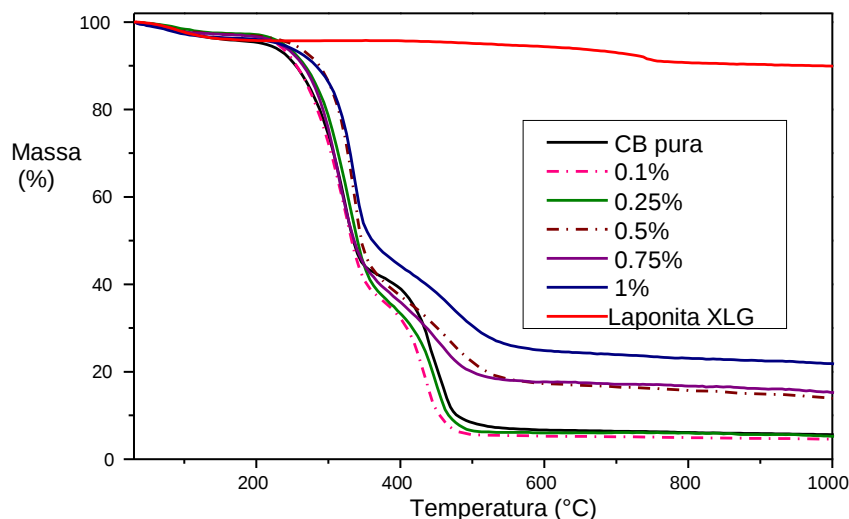
O estabelecimento de ligações de hidrogênio entre partes orgânicas e inorgânicas também pode causar dificuldades à liberação de moléculas de água produzidas pela condensação de grupos hidroxila da CB, considerando que a água é a principal espécie volátil lançada no segundo evento (como observado na figura 22)⁵⁷.

O terceiro evento envolvendo perda de massa está relacionado à fase orgânica, e é observado acima de 350°C. A LPN é termicamente estável até cerca de 650°C, observado nas figuras 21 e 22. O processo de desidroxilação das camadas da LPN, é observado acima desta temperatura.

A LPN exibe um evento de perda de massa, que ocorre desde a temperatura ambiente, até aproximadamente 200°C, relacionado com a liberação de moléculas de água presentes no domínio interlamelar e adsorvidas na superfície externa das lamelas.⁵⁸

Um segundo evento ocorre na região dos 750°C, relacionado a desidroxilação das camadas da argila.³⁷

Figura 21. Análises de TGA, a imagem apresenta as curvas da LPN, CB pura e dos nanocompósitos obtidos, identificados na figura.



Fonte: Autor, 2018.

Assim, considerando que a perda de massa até 600°C, é apenas associada à liberação de água adsorvida e à decomposição de CB, é possível estimar a massa de argila incorporada nos nanocompósitos obtidos. Em 650°C toda matéria orgânica (CB) foi pirolisada, não restando mais massa de resíduo significativa. Assim, a massa obtida em 650°C é a LPN presente nos nanocompósitos. Têm-se na tabela 1 as concentrações de LPN incorporadas nos nanocompósitos.

Tabela 1 Massa real de laponita dos nanocompósitos.

Amostra	Massa inicial TG	% Massa 650 °C	Massa de LPN
CB Pura	6,43 mg	1,11	-
CB LPN 0,10%	4,04 mg	8,75	0,35 mg
CB LPN 0,25%	4,90 mg	6,04	0,30 mg
CB LPN 0,50%	4,26 mg	16,9	0,72 mg
CB LPN 0,75%	3,44 mg	17,51	0,60 mg
CB LPN 1,00%	5,80 mg	24,36	1,41 mg

Fonte: Autor, 2018.

Este aumento percentual no teor de LPN, no nanocompósito CB-LPN, ocorre devido ao processo de secagem final para obter os materiais híbridos, o que eleva consideravelmente a porcentagem da fase inorgânica no produto seco. Antes do processo de secagem, os nanocompósitos contêm um grande teor de água e uma pequena quantidade de CB e LPN.

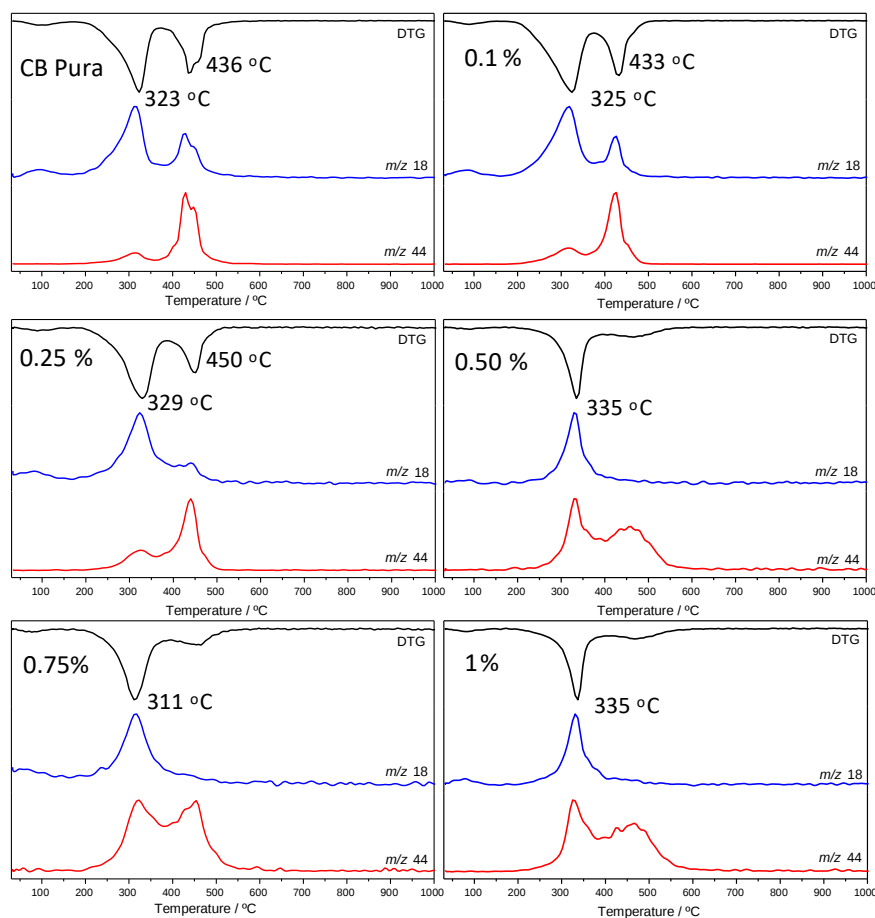
As curvas MS associadas aos fragmentos m/z 18 em m/z 44 (atribuído à liberação de moléculas de água e dióxido de carbono, respectivamente) são mostrados na figura 22 e estão sendo analisados juntamente com a curva DTG.

O segundo evento de perda de massa é principalmente composto por perda de água associada a decomposição de cadeia, associada a uma pequena liberação de CO_2 (devido ao início da oxidação da cadeia orgânica da CB). Vê-se também a decomposição de carbono primário por volta de 320°C , esse segundo evento é sensível à atmosfera. Esses dados corroboram a natureza, oxidativa parcial, do processo.

Na figura 22, vemos também que a CB pura produz mais CO_2 do que água, no terceiro evento de perda de massa, mas a intensidade relativa da liberação de dois gases parece mudar sensivelmente quando o teor de LPN é aumentado nos nanocompósitos. O terceiro passo de perda de massa começa em 358°C para CB pura e em aproximadamente 400°C para o nanocompósito 1%. Maiores quantidades de LPN nos nanocompósitos também tornam mais amplo o terceiro evento de perda de massa. Nenhum outro fragmento gasoso foi detectado em quantidades apreciáveis nas condições experimentais utilizadas no presente trabalho.³⁷

A CB possui perfil térmico dependente da atmosfera. Em atmosfera oxidante temos dois eventos de degradação mais relevantes (quebra da cadeia e posterior degradação em CO_2 e H_2O).

Figura 22. TGA acoplado a espectrômetro de massas.



Fonte: Autor, 2018.

4.2.3 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A figura 23 apresenta os espectros de espectroscopia vibracional na região do infravermelho para a CB pura (a), a LPN pura (g) e os nanocompósitos obtidos (b-f). No espectro CB pura (a), as principais atribuições que caracterizam o polímero de celulose estão representados na tabela 2.^{52,56,59}

Tabela 2 Atribuições dos espectros de FTIR.

Atribuição	cm ⁻¹
estiramento OH	3500
estiramento assimétrico CH	2900
deformação OH	1600
deformação CH ₂	1400
deformação CH ₃	1370
deformação CO	1320-1030

Fonte: Autor, 2018.

Os espectros LPN pura (g) e no dos nanocompósitos (d-f) apresentam um forte sinal referentes aos modos vibracionais da sílica. Estão representados na tabela 3.

Tabela 3 Atribuições FTIR LPN.

Atribuição	cm⁻¹
estiramento Si-O-Si	460
deformação Si-O-Si	785
deformação Si-OH	940
vibração Si-O-Si	1085

Fonte: Autor, 2018.

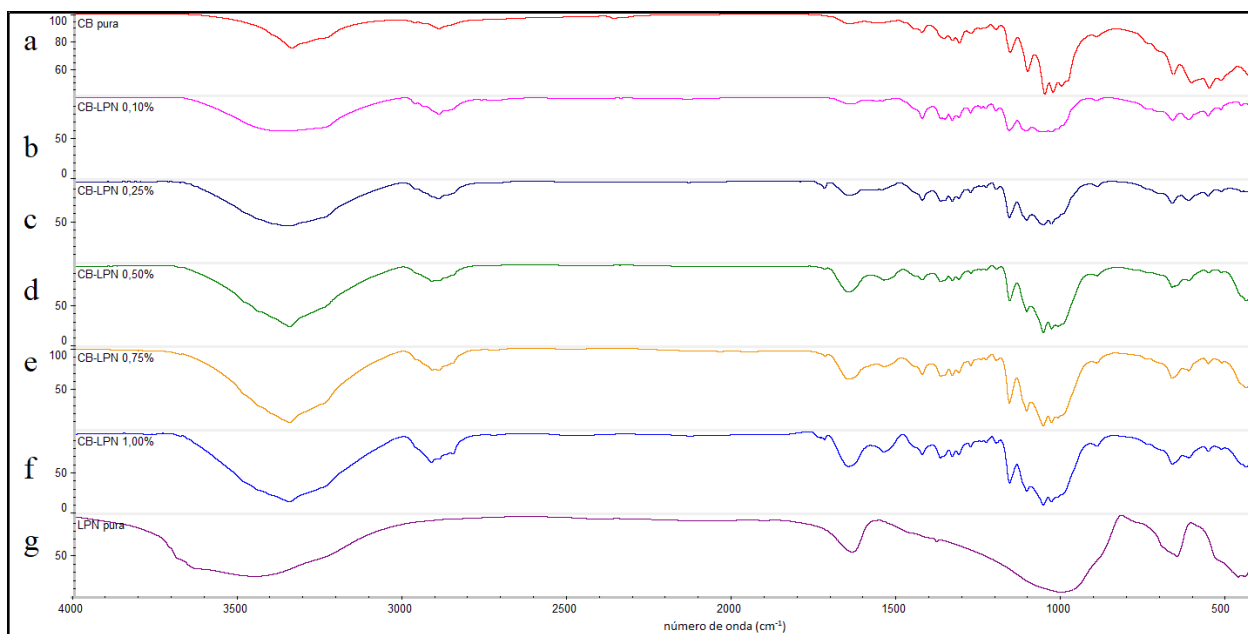
Esse aumento está relacionando ao acréscimo de LPN.¹⁰

A banda na região do estiramento O-H em 3000-3500 cm⁻¹, característico da CB pura (a) vai ficando mais fina à medida que a quantidade de LPN aumenta nos compósitos (f>e>d>c>b). Isso pode significar que a laponita está alterando as interações de ligações de hidrogênio intra ou inter cadeias da CB.^{52,37}

Vibrações originárias da absorção de moléculas de água na região de 3500 cm⁻¹ v (OH) também foram observadas em todos os espectros, o que caracteriza capacidade de absorver água dos materiais. Os resultados obtidos a partir da espectroscopia na região do infravermelho apresentaram contribuições da CB e da LPN mais intenso nos espectros dos nanocompósitos d-f.

Para a celulose, em geral, observa-se a presença e a diminuição de algumas bandas, em 900 cm⁻¹ (v C-O), em 1370 cm⁻¹ (ligação C-H), 1430 cm⁻¹ (ligação CH₂), e em 2900 cm⁻¹ (v CH₂). Esta diminuição está relacionada à presença dos grupos inorgânicos na superfície da CB.

Figura 23. Espectros de Infravermelho, LPN pura, CB pura e nanocompósitos obtidos, legenda na figura.



Fonte: Autor, 2018.

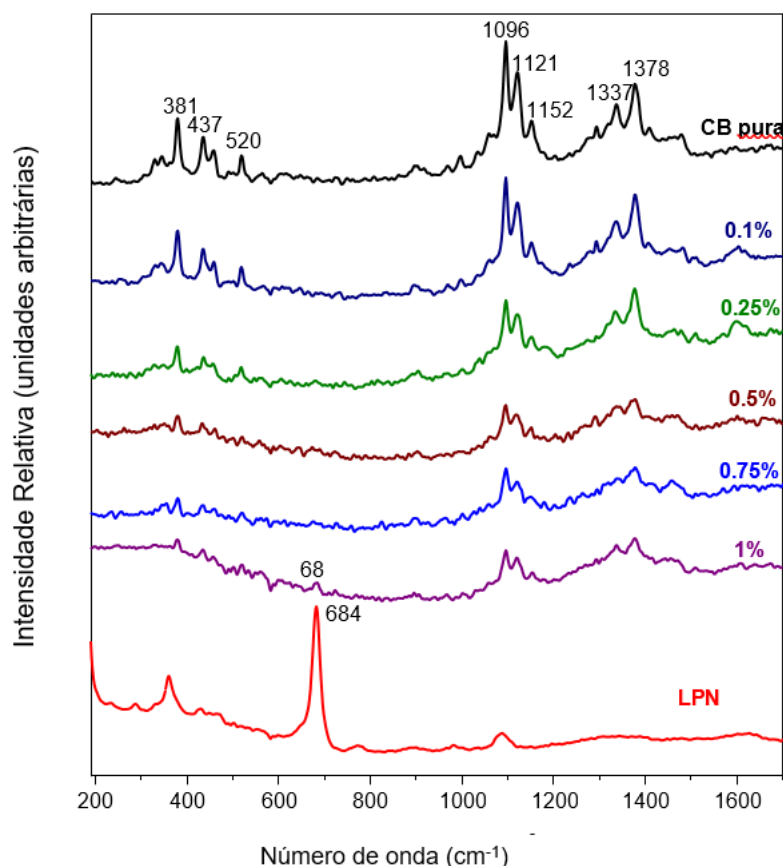
4.2.4 Espectroscopia Raman com Transformada de Fourier

Como observado na figura 24, as principais bandas que caracterizam a CB estão na região de $600\text{--}150\text{ cm}^{-1}$, região em que as vibrações predominantes se referem aos modos vibracionais δ (CCC), δ (CCO) δ (COC), δ (CO), τ (COH); a região de $1.150\text{ cm}^{-1} - 1.120\text{ cm}^{-1}$ são as principais vibrações se referem aos modos vibracionais (CH₂), δ (HCC), δ (HOC), δ (COH)v (CC), ν (CO)⁶⁰.

A presença de uma banda em 680 cm^{-1} no Raman é relativa ao estiramento simétrico da ligação Si-O da argila.⁵³

Fazendo uma leitura dos máximos das bandas e um comparativo entre os espectros, é perceptível que elas não sofrem deslocamento. De um modo geral, a presença da LPN parece diminuir a cristalinidade dos nanocompósitos quando comparados com a CB pura, porque a largura das bandas aumenta e também vemos uma redução da intensidade dos picos. Acredita-se que a laponita está entre as cadeias da CB, alterando de alguma maneira as ligações de H intracadeias, e desse modo alterando a cristalinidade através da sua presença. A LPN na superfície dos nanocompósitos também pode ser a responsável por essa alteração da intensidade dos picos do espectro de FT Raman, corroborando assim com os dados obtidos de DRX.^{58,61}

Figura 24. Espectros de Raman, LPN e CB puras, e nanocompósitos obtidos. Legendas na figura.



Fonte: Autor, 2018.

4.3 Ensaio de viabilidade celular

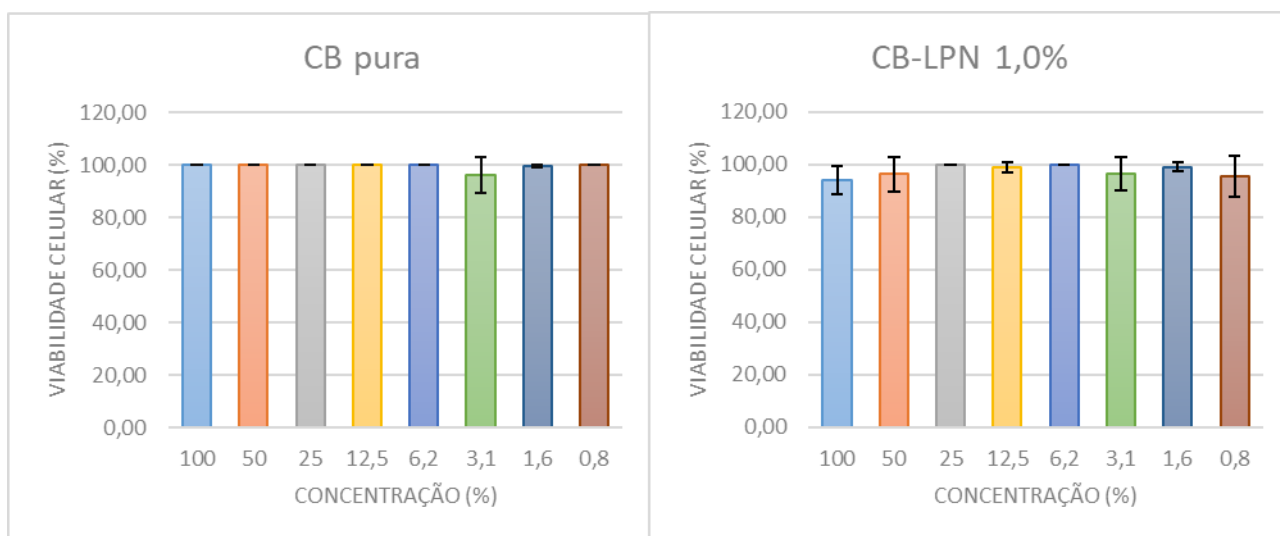
O ensaio de citotoxicidade com células de queratinócitos foram feitos com concentrações crescentes do eluato de contato direto com o material segundo norma da ISO 10993-5. Tal linhagem foi escolhida visando que o nanocompósito produzido têm como objetivo o uso como um biocurativo tópico. Os dados da tabela 4 e figura 25, indicam que independentemente da concentração do eluato obtido as células apresentaram uma elevada viabilidade, indicando que os nanocompósitos não apresentam toxicidade frente aos queratinócitos, como mencionado por Haraguchi e colaboradores.^{63, 64}

Tabela 4 - Média da viabilidade celular dos queratinócitos frente aos nanocompósitos.

CB Pura								
Concentração(%)	100	50	25	12,5	6,2	3,1	1,6	0,8
Média	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	96,05	99,61	100,00
DP	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,84	0,67	0,00
CB-LPN 1,0%								
Concentração (%)	100	50	25	12,50	6,2	3,1	1,6	0,8
Média	94,00	96,29	100,00	98,86	99,87	96,45	99,04	95,54
DP	5,31	6,43	0,00	1,97	0,23	6,16	1,66	7,73

Fonte: Autor, 2018.

Figura 25 Gráficos Viabilidade Celular dos nanocompósitos.

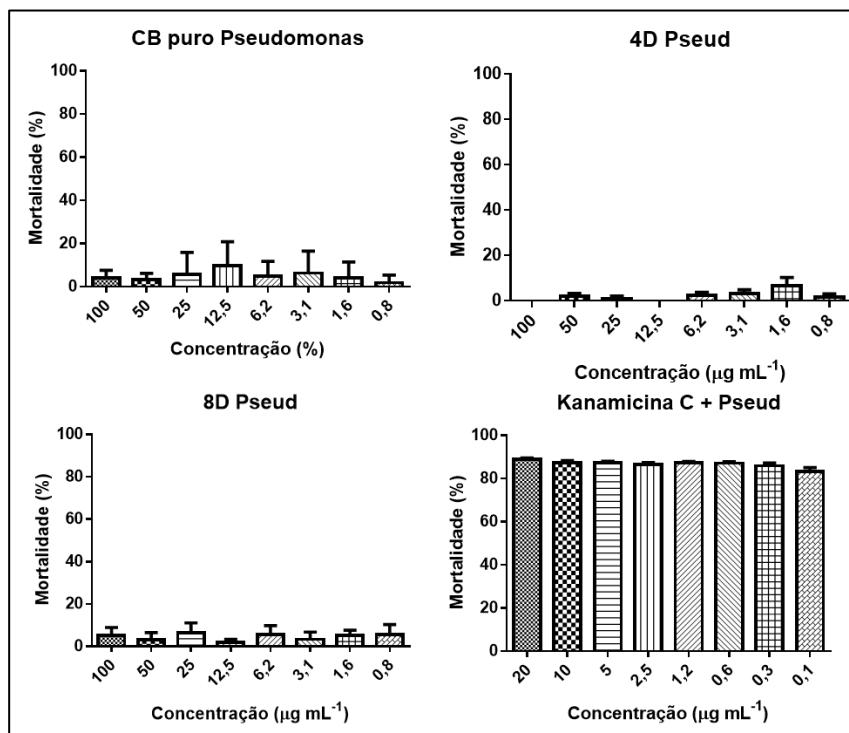


Fonte: Autor, 2018.

4.4 Ensaio de Inibição bacteriana

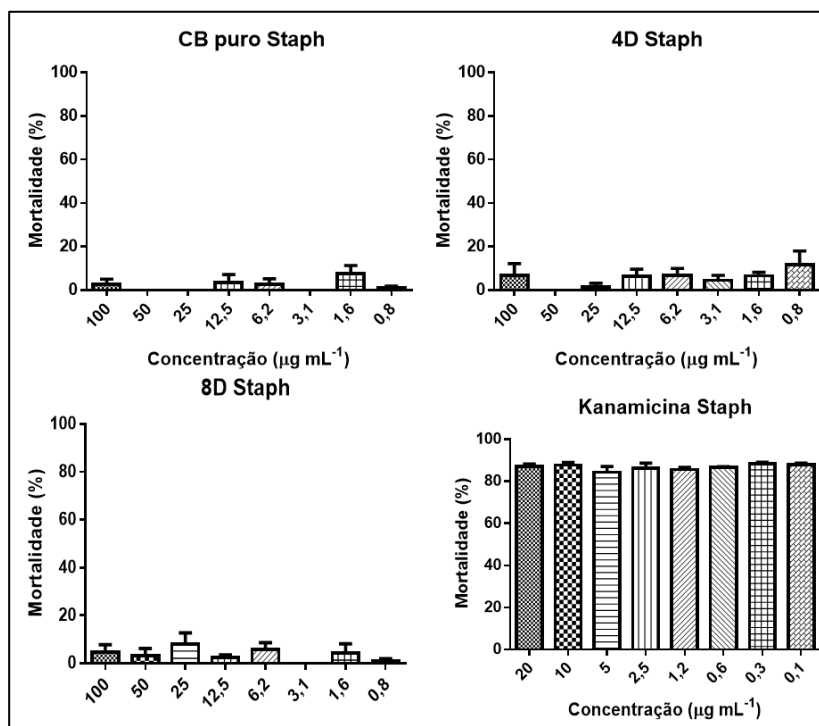
Considerando a composição da LPN (Laponita XLG (Buntech) ($\text{Na}_{0,7}[(\text{Mg}_{5,5}\text{Li}_{0,3})\text{Si}_8\text{O}_{20}(\text{OH})_4]$), e o fato de que durante o processo de formação dos nanocompósitos ocorreu uma redução do desenvolvimento normal da biocelulose, como observado na tabela 6. Foi realizado os ensaios de inibição bacteriana frente a duas bactérias que causam muitas infecções cutâneas, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 13388, Gram -) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538, Gram +). Como ilustrado nas figuras 26 e 27.

Figura 26 - Teste de inibição do crescimento bacteriano, *P. aeruginosa*.



Fonte: Autor, 2018.

Figura 27 - Teste de inibição do crescimento bacteriano, *S. aureus*.



Fonte: Autor, 2018.

Porém, como visto, os nanocompósitos com a mais alta concentração de LPN não apresentaram atividade antimicrobiana.

4.5 Ensaio de Dissolução

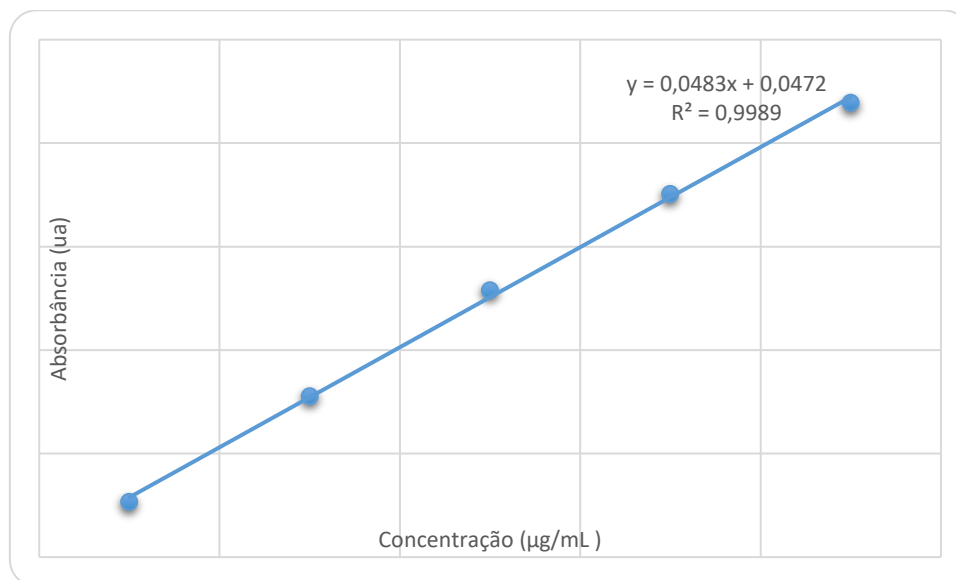
Para o ensaio de dissolução do fármaco, mediu-se a absorbância em 5 pontos com concentrações crescentes (medidas feitas em triplicata), calculou-se a média, o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV), como mostrado na tabela 5. Através, da média desses pontos e das concentrações determinadas, traçou-se a reta da concentração de CFN x Absorbância, como mostrado na figura 28 e determinou-se a equação da reta.

Tabela 5 - Dados para equação da reta.

Concentração $\mu\text{g/mL}$	5	15	25	35	45
n1	0,2584	0,7821	1,2930	1,7422	2,2009
n2	0,2675	0,7615	1,2863	1,7608	2,1963
n3	0,2713	0,7861	1,2856	1,7579	2,1855
média	0,2657	0,7766	1,2883	1,7536	2,1942
DP	0,0066	0,0132	0,0041	0,0100	0,0079
CV	2,4820	1,6986	0,3171	0,5707	0,3603

Fonte: Autor, 2018.

Figura 28 Concentrações de CFN x Absorbância, determinação da equação da reta.



Fonte: Autor, 2018.

A precisão foi avaliada em seis determinações ($2,6\mu\text{g/mL}$ para CFN). Os desvios DPRs foram menores que 5%. Na exatidão foram verificadas as recuperações das amostras nas concentrações de 80, 100 e 120% ($2,60$ e $3,12\mu\text{g/mL}$ para CFN). Os valores de recuperação variaram de 91,7 a 102,8% para CFN. O LD foi de $0,35\mu\text{g/mL}$ e o LQ foi de $1,20\mu\text{g/mL}$.

O ensaio de dissolução foi feito para 4 amostras, cada uma delas incorporadas com 50 mg de CFN. As amostras escolhidas foram CB pura seca, CB pura úmida, para que fosse feito o controle do ensaio, CB-LPN 1,0% seca e CB-LPN 1,0% úmida.

Esses nanocompósitos foram selecionados para observarmos se alguma modificação seria notada com a maior concentração de LPN, e também se a secagem do composto modificaria a liberação de fármaco da biomembrana. Na tabela 6, nós temos as massas referentes aos nanocompósitos antes do processo de incorporação da CFN.

Tabela 6 Relação das massas dos nanocompósitos.

	CB Pura Úmida	CB Pura seca	CB-LPN 1% úmida	CB-LPN 1% seca
Amostra 1	21 153 mg	160 mg	4 900 mg	32 mg
Amostra 2	19 100 mg	138 mg	5 205 mg	30 mg
Amostra 3	22 200 mg	148 mg	5 300 mg	35 mg

Fonte: Autor, 2018.

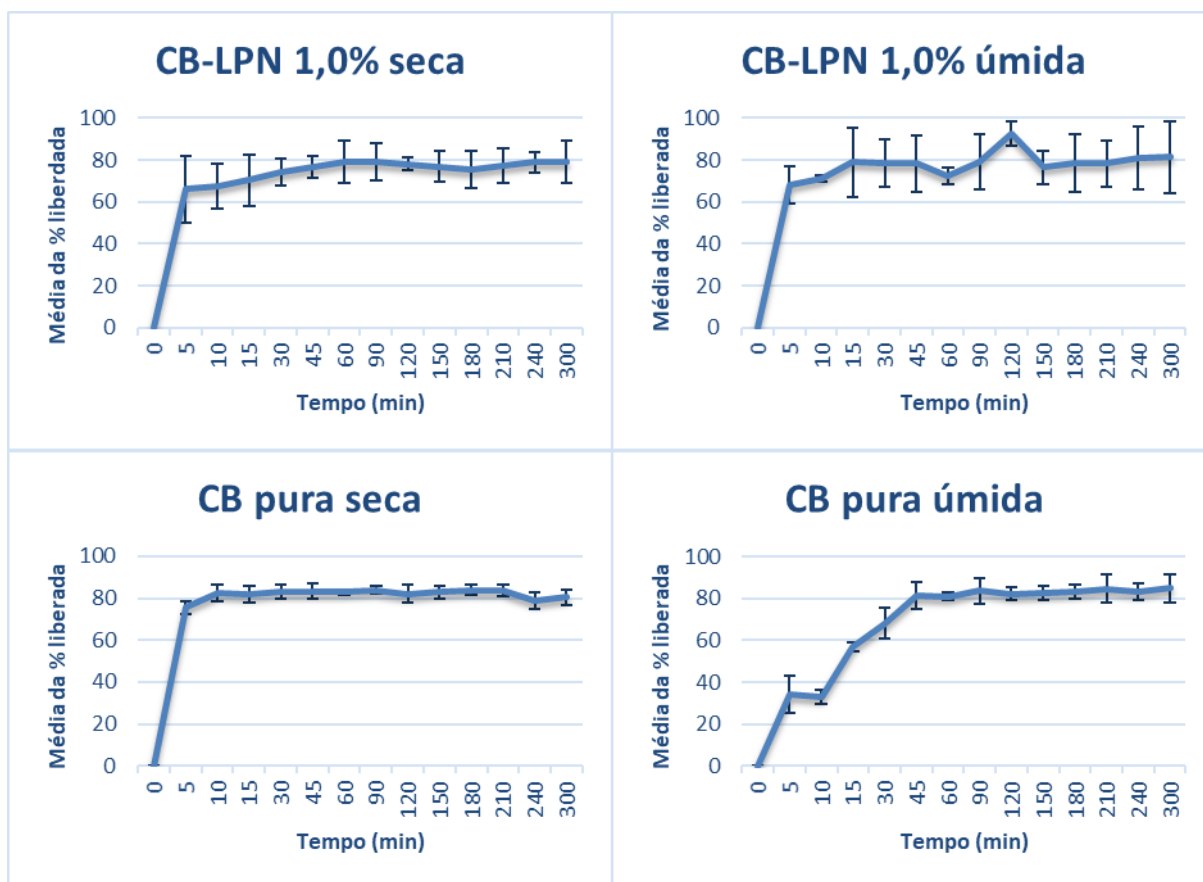
Realizou-se o ensaio em triplicata, alíquotas foram coletadas em 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120, 150, 180, 210, 240 e 300 min, respectivamente. Em 300 min, temos o ponto infinito, onde a haste do dissolutor foi submetida por uma hora a sua rotação máxima para garantir a liberação total do composto. O valor das médias das absorbâncias em 272 nm foi medido em espectrofotômetro de UV-Vis, e através da fórmula da equação da reta da figura 28, a concentração real de CFN foi determinada e estimada em porcentagem com seus respectivos DP, como mostrado na tabela 7 e figura 29, respectivamente.

Tabela 7 Média da % liberada de CFN no ensaio de dissolução.

CB-LPN 1,0% seca														
Tempo (min)	0	5	10	15	30	45	60	90	120	150	180	210	240	300
Média % Liberada	0	66	68	70	74	77	79	79	78	77	76	77	79	79
DP	0	16,01	10,55	12,14	6,58	5,36	9,90	8,75	3,16	7,16	8,97	8,39	5,11	10,11
CB-LPN 1,0% úmida														
Tempo (min)	0	5	10	15	30	45	60	90	120	150	180	210	240	300
Média % Liberada	0	68	71	79	79	78	72	79	93	77	79	78	81	81
DP	0,00	8,95	1,72	16,31	11,50	13,63	4,01	13,35	5,55	8,03	14,01	10,92	14,82	17,08
CB pura seca														
Tempo (min)	0	5	10	15	30	45	60	90	120	150	180	210	240	300
Média % liberada	0	76	82	82	83	83	83	84	82	83	84	84	79	81
DP	0	3,01	3,98	3,90	3,45	3,76	1,28	1,86	4,35	3,23	2,27	2,60	3,91	3,70
CB pura úmida														
Tempo (Min)	0	5	10	15	30	45	60	90	120	150	180	210	240	300
Média % Liberada	0	34	33	57	68	81	81	84	82	83	83	85	83	85
DP	0	8,99	3,36	2,14	7,59	6,33	1,86	6,16	3,00	3,28	3,36	6,82	3,99	6,75

Fonte: Autor, 2018.

Figura 29 Comparativo da concentração de CFN liberada no ensaio.



Fonte: Autor, 2018.

Como observado, os nanocompósitos contendo LPN não apresentaram uma alteração do perfil de liberação do fármaco quando comparado com a CB pura seca. Porém, pode-se observar no experimento uma pequena alteração no perfil de liberação da CB pura úmida.

Na CB pura úmida tem-se área superficial, área de contato, volume e espessura maiores quando comparados com a biomembrana seca, pode-se atribuir a essas características a alteração do perfil de liberação do produto quando úmido.¹¹

O fato de não vermos essa alteração no nanocompósito CB-LPN 1,0% úmido, pode estar ligado a massa menor quando comparado com a CB pura úmida.⁶²

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.

6 Perspectivas

O ensaio preliminar de dissolução com cafeína, apesar de não ter apresentado alteração significativa, possibilita a tentativa do uso de outros fármacos com diferentes propriedades e em diferentes faixas de pH.

O espaço interlamelar de 1.73 nm da LPN, e sua forma de se organizar quando esfoliada permite gerar grandes perspectivas para o composto na área de liberação de fármacos, juntamente com suas propriedades biocompatíveis e atóxicas. Além disso, o nanocompósito também pode ser direcionado para o uso nos estudos de engenharia tecidual.

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. *Eclet. 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 & Vbgtkales, 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