

UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA- UNIARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM
MEDICINA REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL

GUILHERME PACHECO PEREIRA

MATERIAIS BASEADOS EM CELULOSE BACTERIANA PARA
APLICAÇÕES MÉDICAS

Araraquara, SP

2018

GUILHERME PACHECO PEREIRA

**MATERIAIS BASEADOS EM CELULOSE BACTERIANA PARA
APLICAÇÕES MÉDICAS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor(a) em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Orientador: Prof. Dr. Hernane da Silva Barud

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Eliane Trovatti

Araraquara, SP

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

P491m Pereira, Guilherme Pacheco

Materiais baseados em celulose bacteriana para aplicações médicas/
Guilherme Pacheco Pereira. – Araraquara: Universidade de Araraquara,
2018.

106f.

Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
em Medicina Regenerativa e Química medicinal _Universidade de
Araraquara-UNIARA

Orientador: Prof. Dr. Hernane da Silva Barud

Coorientador: profa. Eliane Trovatti

1. Celulose bacteriana. 2. Compósitos. 3. Liberação de fármacos.
4. Cicatrização. I. Título.

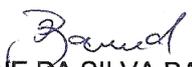
CDU 62-1

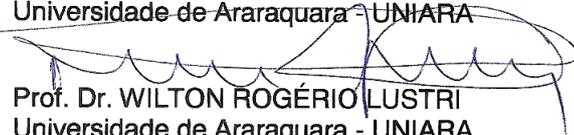
GUILHERME PACHECO PEREIRA

Tese apresentada a Universidade de Araraquara - UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

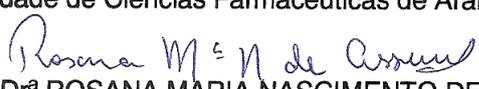
Araraquara, 23 de março de 2018.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. HERNANE DA SILVA BARUD (Orientador)
Universidade de Araraquara - UNIARA


Prof. Dr. WILTON ROGÉRIO LUSTRI
Universidade de Araraquara - UNIARA


Prof. Dr. MARLUS CHORILLI
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP


Profª Drª ROSANA MARIA NASCIMENTO DE ASSUNÇÃO
Universidade Federal de Uberlândia – Campus de Pontal


Profª Drª VANUSCA DALOSTO JAHNO
Universidade de Feevale – Novo Hamburgo - RS

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade da vida e evolução.

A meus pais, Rute e Sebastião (*in memoriam*) pelos ensinamentos, suporte e paciência.

Ao meu orientador Hernane e coorientadora Eliane pela orientação, estímulo e confiança.

Aos amigos, especialmente à Andréia Meneguim, pelos ensinamentos, amizade, ajuda e companheirismo.

Aos professores e funcionários da UNIARA e do Programa de pós-graduação em Biotecnologia – Química Medicinal e Medicina Regenerativa, principalmente aqueles que contribuíram diretamente para a execução desse trabalho.

Aos meus alunos de iniciação científica Gabriela Marcondes e Gabriel Martins pelo suporte e pela amizade

Ao Instituto de Química de Araraquara UNESP/IQAr pela realização de algumas análises.

Ao professor Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho do Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados da Universidade Federal do Piauí por ceder alguns dos materiais necessários para desenvolvimento do trabalho.

Ao professor Guillermo Castro e aos pesquisadores Maximiliano Cacicedo e German Islan, por terem me recebido com afetividade e pelo suporte recebido no Laboratório de Nanobiomateriales da Universidad Nacional de La Plata – La Plata (Argentina).

À CAPES, pelo apoio financeiro na forma de bolsa de doutorado.

RESUMO

Essa tese foi dividida em cinco capítulos, sendo que todos contemplam a celulose bacteriana (CB). O primeiro deles, trata da introdução acerca do polímero, sendo abordado desde o contexto histórico, produção, características físico-químicas até suas possíveis utilizações. O segundo avalia possíveis alterações que um tratamento de prensagem para retirada de água pode ocasionar nas propriedades físico-químicas, mecânicas e térmicas do polímero. Observou-se que o tratamento não promoveu alteração na estabilidade térmica, tampouco alterações químicas da membrana, porém, foi observado que as propriedades mecânicas foram alteradas com diminuição da resistência à perfuração das amostras submetidas ao tratamento de prensagem. O terceiro capítulo é sobre a utilização de resíduos do cajueiro como fonte alternativa de meio de cultivo para a produção da CB e foi demonstrado que o meio suplementado com 50% de exsudato de caju e com metade da glicose adicionada no meio de cultivo padrão (Hestrin Schramm) forneceram o mesmo rendimento (6 gL^{-1}); além disso, os meios sem glicose e adicionados dos resíduos, forneceram 2,3 e $2,8 \text{ gL}^{-1}$ para goma de caju e exsudato de caju, respectivamente, sem alterações morfológicas, térmicas e químicas. A partir do quarto capítulo, a tese retrata o estudo da CB em aplicações práticas, como a adição da argila paligorsquita para a produção de nanocompósitos, bem como sua caracterização e estudo de liberação *in vitro* do fármaco metronidazol. Os resultados indicaram que a morfologia foi alterada com o recobrimento da CB pela paligorsquita, houve aumento da cristalinidade e da estabilidade térmica dos compósitos com o aumento da concentração de reforço, além do retardo da liberação do fármaco metronidazol na membrana em que foi utilizado 15% da argila. Finalmente, o quinto capítulo retrata a adição quitosana à CB juntamente com o fármaco ciprofloxacino, seguido de caracterização do compósito, e testes *in vitro* e estudo *in vivo* afim de avaliar a propriedade de regeneração tecidual de feridas em camundongos. Foi observado que o filme desenvolvido foi capaz de reduzir 90 % da área da ferida no décimo quarto dia de experimento, enquanto a celulose pura reduziu 95,58 % e ambas com 100% de cicatrização no vigésimo primeiro dia. Além disso, não demonstrou ser citotóxica nem mutagênica e apresentaram o mesmo perfil de liberação do fármaco ciprofloxacino no estudo de dissolução. De maneira geral, a CB demonstrou sua versatilidade, desde a possibilidade de redução de custos, a manufatura de nanocompósitos, até sua aplicação obtida com sucesso no uso em liberação de fármacos e biocurativos.

Palavras-chave: celulose bacteriana, compósitos, liberação de fármacos, cicatrização.

ABSTRACT

The current thesis was divided into five chapters, all of them concerning bacterial cellulose (CB). The first chapter presents the introduction about the polymer, approaching the historical context, production, physicochemical characteristics and its possible uses. The second one evaluates possible changes that a pressing treatment can cause in the physico-chemical, mechanical and thermal properties of the polymer. It was observed that the treatment did not promote alteration in the thermal stability, nor any chemical changes of the membrane, however, it was observed the mechanical properties were altered with reduction of the puncture resistance of the samples subjected to the pressing treatment. The third chapter is about the use of cashew residues as an alternative source of culture medium for the production of CB and it has been demonstrated that the medium supplemented with 50% cashew exudate and with half of the glucose added in the standard culture medium (Hestrin Schramm) furnished the same yield (6 gL⁻¹); in addition, the glucose-free media added to the residues furnished 2.3 and 2.8 gL⁻¹ for cashew gum and cashew exudate, respectively, without morphological, thermal or chemical changes. From the fourth chapter, the thesis describes the study of CB in practical applications, such as the addition of palygorskite clay for the production of nanocomposites, as well as its characterization and study of the in vitro release of the drug metronidazole. The results indicated that the morphology was altered with the coating of CB by palygorskite, there was an increase in the crystallinity and thermal stability of the composites with the increase of the reinforcement concentration, besides the delay of the release of metronidazole in the membrane in which 15% of the clay was used. Finally, the fifth chapter depicts chitosan addition to CB together with the drug ciprofloxacin, followed by composite characterization, in vitro and in vivo study aiming to evaluate the tissue regeneration property of wounds in mice. It was observed that the film was able to reduce 90% of the wound area on the 14th day of the experiment, while the pure cellulose reduced 95.58% and both had a 100% healing on the twenty-first day. In addition, it was not observed neither cytotoxic nor mutagenic effects and the developed film presented the same drug release profile of the ciprofloxacin in the dissolution study. In general, CB shows its versatility, from the possibility of cost reduction, manufacture of nanocomposites, until its application successfully obtained in the use in drug release and biocuratives.

Key-words: bacterial cellulose, composites, drug delivery, wound healing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química de celulose bacteriana	4
Figura 2 - Prensa Hidráulica, utilizada para eliminação de H ₂ O da membrana de CB.	16
Figura 3 - Micrografias obtidas por MEV da amostra sem tratamento de prensa (CB) e as demais com tratamento (CB 1-9).....	20
Figura 3 - Espectros de FTIR da amostra de CB sem tratamento e das amostras CB1, CB4 e CB7 com tratamento.....	21
Figura 5 - Curvas de TG/DTG da amostra sem tratamento (CB), e com tratamento (CB1, CB4 e CB7).	24
Figura 6 - Produção de CB a partir dos meios de cultura HS, HSGC, HSEC GC e CT em 7 dias.....	32
Figura 7 - Micrografias obtidas por MEV das amostras de membrana de CB com 7 dias de incubação em meio HS (a), HSGC (b), HSEC (c), GC (d) e EC (e) da barra de escala = 100 nm.	34
Figura 8 - Espectro de FTIR das membranas de CB obtidas nos meios HS, HSGC, HSEC, GC e EC em 7 dias de incubação.	35
Figura 8 - Curvas TG das amostras de CB obtidas nos meios HS, HSGC, HSEC, GC e EC, após 7 dias de incubação.....	36
Figura 10 - DRX das membranas de CB: (a) CB e obtida no meio HS; (b) CB obtida no meio HSEC, depois de 7 dias de incubação.	37
Figura 11 - Diagrama esquemático dos canais da paligorsquita.	48
Figura 12 - Micrografias obtidas por MEV das amostras de CB, CB/PLG1 e CB/PLG5 com aumentos de 5.000 e 50.000 da superfície.....	54
Figura 13 - Micrografias obtidas por MEV das amostras de CB/PLG7 e CB/PLG10 e CB/PLG15 com aumentos de 5.000 e 50.000 da superfície.	55
Figura 14 - Difratomogramas de raios - X da CB pura e dos nanocompósitos CB/PLG.	56
Figura 15 - Curvas TG/DTG para os nanocompósitos CB/PLG obtidos com diferentes cargas de paligorsquita.	60
Figura 16 - Perfil de perda de massa dos biocompósitos CB/PLG obtidos durante 120 h de ensaio em 25 °C.....	61

Figura 17- Permeabilidade ao vapor de água para nanocompósitos de CB/PLG. ...	62
Figura 18 - Perfil de liberação de MTZ a partir da CB dos nanocompósitos de CB/PLG1, CB/PLG7 e CB/PLG15 em pH 5.8, de 0 a 180 min.	64
Figura 19 - Estrutura química de quitina e quitosana.	74
Figura 20 - Micrografias obtidas por MEV-FEG das superfícies e dos cortes transversais da CB pura e do filme de CB/QTS/CIP.	84
Figura 21 - Espectro de FTIR das amostras de CB, CB/QTS/CIP, CB/QTS, QTS/CIP e CIP.	85
Figura 22 - Curvas TG/DTG do filme de CB, quitosana, CB/QTS e CB/QTS/CIP.	87
Figura 23 - Perfil de liberação de CIP a partir da membrana de CB e do biocurativos de CB/QTS/CIP em pH 5.8 no intervalo de 0 a 360 min.	89
Figura 24 - Halos de inibição dos filmes de CB/QTS e CB/QTS/CIP para <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. aureus</i>	90
Figura 25 - Imagem obtida por microscopia de epifluorescência com filtros UV (495 - 505 nm) a 400x para determinação da atividade antimicrobiana de <i>P. aeruginosa</i> pelo método de coloração de biofilmes com Kit LIVE / DEAD BacLight.	91
Figura 26 - Imagem obtida por microscopia de epifluorescência com filtros UV (495 - 505 nm) a 400x para determinação da atividade antimicrobiana de <i>S. aureus</i> pelo método de coloração de biofilmes com Kit LIVE / DEAD BacLight.	93
Figura 27 - Gráfico dos resultados do ensaio de citotoxicidade pelo método de MTT / viabilidade celular da CB e do filme de CB/QTS/CIP.	94
Figura 28 - Gráfico DotPlot da porcentagem da redução da área da lesão tratadas com CB.	97
Figura 29 - Gráfico DotPlot da porcentagem da redução da área da lesão tratadas com CB/QTS/CIP.	97
Figura 30 - Acompanhamento clínico das feridas nos dias 0, 7, 14 e 21 dias de experimento com CB e CB/QTS/CIP.	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variáveis analisadas no processo de secagem da membrana de CB.	17
Tabela 2 - Propriedades mecânicas das amostras de CB sem tratamento e de CB com diferentes tratamentos de prensagem.....	23
Tabela 3 - Propriedades mecânicas das membranas de CB cultivadas em meio de cultivo HS e HSEC.	38
Tabela 4 - Índices de cristalinidade (Crl) calculados a partir da equação de Segal para a CB pura e biocompósitos CB/PLG.	57
Tabela 5 - Dados termogravimétricos de CB dos nanocompósitos CB/PLG.	58
Tabela 6 - Coeficiente de correlação do MTZ liberada a partir do nanocomposito de CB/PLG15 obtidos através de diferentes modelos matemáticos para tampão fosfato (pH 5,8).	66
Tabela 7 - Atividade mutagênica expressa através da média e desvio padrão do número de revertentes / placa e índice de mutagenicidade nas linhagens TA98, TA100, TA97a e TA102 de <i>S. typhimurium</i> após o tratamento com os extratos de CB e CB/QTS/CIP.	95
Tabela 8 - Porcentagem da redução da área original da ferida após 2, 7, 14 e 21 dias de tratamento com CB e CB/QTS/CIP.	96

ABREVIATURAS

Ap – Alongamento durante a perfuração

ATR – Reflectância total atenuada

CB – Celulose bacteriana

CIP – Ciprofloxacino

CrI – Índice de cristalinidade

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO - Dimetilsulfóxido

DRX - Difractometria de raio X

DTG - Derivada da análise termogravimétrica

EC - Exsudato de cajueiro

Ep - Energia gasta durante a perfuração

FTIR - Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

GC - Goma de caju

HS - Hestrin e Schramm

IM - Índice de mutagenicidade

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

MTZ - Metronidazol

PLG - Paligorsquita

PVA - Permeabilidade ao vapor d'água

QTS - Quitosana

Rp - Resistência à perfuração

SFB - Soro fetal bovino

TG - Análise termogravimétrica

TPP - Tripolifosfato

TTVA - Taxa de transmissão ao vapor d'água

UR - Umidade relativa

USP - United States Pharmacopeia (Farmacopeia Americana)

UV-Vis - Ultravioleta visível

Apresentação

Essa tese foi dividida em cinco capítulos, sendo que todos contemplam a celulose bacteriana (CB). O primeiro deles, trata da introdução acerca do biopolímero, onde é abordado desde o contexto histórico, produção, características físico-químicas até suas possíveis utilizações.

Devido à grande utilização da CB em diversas áreas, o processamento pós-produção é bastante variado. Porém, na maioria de suas aplicações, faz-se necessário a retirada total ou parcial da água mantida dentre as fibras da membrana e, dentre esses procedimentos, inclui-se a prensagem. Entretanto, pouco se conhece a respeito de possíveis alterações que um tratamento de prensagem pode ocasionar nas propriedades físico-químicas e mecânicas do biopolímero. Dessa forma, o segundo capítulo reporta os resultados do tratamento de prensagem nas características da membrana, em que foi observado principalmente influência nas propriedades mecânicas.

Uma vez que nosso grupo de pesquisas (BIOPOLMAT) vem produzindo membranas quase que diariamente, foi possível observar um custo considerável na aquisição de reagentes da composição do meio de cultivo necessário para a síntese do biopolímero, somado ao fato de que a bactéria superprodutora *Komagataeibacter rhaeticus* requer quantidades maiores de glicose que a maioria de outras bactérias necessitam para a produção de CB. Com o objetivo de se prospectar alternativas para a redução do custo de produção do biopolímero, o Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados/LIMAV da Universidade Federal do Piauí, que em uma de suas linhas de pesquisa trabalha com resíduos de produtos locais, gentilmente nos cedeu, em parceria, resíduos de cajueiro, tais como o exsudato extraído do tronco e a goma (exsudato purificado). Esses resíduos foram adicionados no meio de cultivo e obteve-se êxito em conseguir uma redução de 50 % da quantidade de glicose adicionada. O terceiro capítulo aborda a utilização dos resíduos no meio de cultivo como alternativa à produção da CB. Este capítulo já foi publicado em forma de artigo na revista *Industrial Crops and Products* com o seguinte título: “*Development and characterization of bacterial cellulose produced by cashew tree residues as alternative carbon source*”.

A partir do quarto capítulo, a tese retrata o estudo da CB em aplicações práticas, como a utilização da argila paligorsquita, que também é proveniente da parceria com a UFPI, para a produção de biocompósitos com a celulose bacteriana, bem como sua caracterização e estudo de liberação *in vitro* do fármaco metronidazol a partir do nanocompósito desenvolvido. A proposta do desenvolvimento do compósito veio a partir da problemática relatada na literatura em que a utilização apenas da celulose para uso em liberação controlada de fármacos tem a desvantagem de que independente do fármaco utilizado, ocorre um “*burst*” de liberação de 80 % nos primeiros 30 min. A partir de várias concentrações testadas do argilomineral, foi destacado principalmente o controle efetivo da liberação do fármaco metronidazol com a sua adsorção na suspensão de 15 % da argila com posterior incorporação na membrana.

Finalmente, os resultados apresentados no quinto capítulo, os quais foram parcialmente obtidos durante a permanência do aluno no Laboratório de Nanobiomateriales da Universidad Nacional de La Plata, na Argentina, retrata a adição da CB com a quitosana, um polímero natural bastante conhecido e utilizado na indústria farmacêutica pelas ótimas propriedades, como boa interação com a pele devido às cargas positivas e também devido às propriedades antimicrobianas e formação de gel. No desenvolvimento do filme de CB/quitosana, foi adicionado o fármaco ciprofloxacino, seguido de caracterização do compósito e um estudo *in vivo* afim de avaliar a propriedade de regeneração tecidual de feridas em camundongos.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO SOBRE CELULOSE BACTERIANA.....	1
1. INTRODUÇÃO	2
2. REFERÊNCIAS.....	6
CAPÍTULO 2 ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA PÓS PROCESSO DE PRENSAGEM	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo Geral	15
2.2. Objetivos Específicos	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1. Materiais	15
3.2. Produção das membranas de CB	15
3.3. Prensagem das membranas	16
3.4. Planejamento composto central.....	17
3.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	17
3.6. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	18
3.7. Avaliação das propriedades mecânicas por texturômetro	18
3.8. Análise termogravimétrica TG/DTG	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	19
4.1. MEV.....	19
4.2. FTIR	21
4.3. Avaliação das propriedades mecânicas por texturômetro	22
4.4. Análise termogravimétrica TG/DTG	23
5. CONCLUSÕES	24
6. REFERÊNCIAS.....	25

CAPÍTULO 3 ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOCELULOSE PRODUZIDA A PARTIR DE RESÍDUOS DE CAJUEIRO (<i>ANACARDIUM OCCIDENTALE</i>) COMO FONTE ALTERNATIVA DE CARBONO PARA O MICRORGANISMO <i>KOMAGATAEIBACTER RHAETICUS</i>.....	27
1. INTRODUÇÃO	28
2. OBJETIVOS	29
2.1. Objetivo Geral:.....	29
2.2. Objetivo Específico:	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1. Materiais	30
3.2. Purificação do EC – Isolamento da goma de caju	30
3.3. Produção de CB	30
3.4. MEV.....	31
3.5. FTIR	31
3.6. Análise termogravimétrica (TG)	31
3.7. Difratomia de Raio X (DRX)	31
3.8. Avaliação das propriedades mecânicas por texturômetro	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1. Produção de CB	32
4.2. MEV.....	33
4.3. FTIR	34
4.4. Curvas TG.....	36
4.5. DRX.....	37
4.6. Avaliação das propriedades mecânicas por texturômetro	38
5. CONCLUSÃO.....	39
6. REFERÊNCIAS.....	39
CAPÍTULO 4 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCOMPÓSITOS DE CELULOSE BACTERIANA/PALIGORSQUITA COMO ESTRATÉGIA PARA ADMINISTRAÇÃO DO AGENTE ANTIMICROBIANO METRONIDAZOL (MTZ).....	45

1. INTRODUÇÃO	46
2. OBJETIVOS	48
2.1. Objetivo Geral:.....	48
2.2. Objetivos Específicos:	49
3. MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1. Materiais	49
3.2. Obtenção das membranas de celulose bacteriana	49
3.3. Purificação da Paligorsquita	49
3.4. Obtenção do biocompósito celulose bacteriana / paligorsquita (CB/PLG).....	50
3.5. Interação do MTZ com PLG e incorporação da membrana de CB	50
3.6. MEV.....	50
3.7. DRX.....	50
3.8. Análise termogravimétrica TG/DTG	51
3.9. Permeabilidade ao vapor d'água (PVA)	51
3.10. Determinação <i>in vitro</i> do perfil de liberação de MTZ nos nanocompósitos	52
3.10.1. Curvas analíticas do metronidazol obtidas por espectroscopia de absorção na região do Ultravioleta – Visível (UV – Vis).....	52
3.10.2. Determinação “ <i>in vitro</i> ” do perfil de liberação do MTZ	52
3.10.3. Análise dos mecanismos de liberação <i>in vitro</i> do MTZ	53
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4.1. MEV.....	53
4.2. DRX.....	56
4.3. Análise termogravimétrica TG/DTG	57
4.4. PVA	60
4.5. Determinação <i>in vitro</i> do perfil de liberação de metronidazol nos nanocompósitos	63
4.6. Análise dos mecanismos de liberação <i>in vitro</i> do MTZ	64
5. CONCLUSÃO.....	66
6. REFERÊNCIAS.....	66

CAPÍTULO 5 BIOCURATIVOS DE CELULOSE BACTERIANA COM QUITOSANA E CIPROFLOXACINO: DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i> DA CICATRIZAÇÃO.....	71
1. INTRODUÇÃO	72
2. OBJETIVOS	75
2.1. Objetivo Geral	75
3. MATERIAIS E MÉTODOS	75
3.1. Materiais	75
3.2. Produção do curativo de CB/Quitosana com ciprofloxacino (CB/QTS/CIP)	76
3.3. MEV.....	76
3.4. FTIR	77
3.5. Análise termogravimétrica TG/DTG.....	77
3.5.1. Determinação <i>in vitro</i> do perfil de liberação de ciprofloxacino	77
3.5.2. Curva analítica do ciprofloxacino obtida por espectroscopia de absorção na região do UV-Vis	77
3.5.3. Determinação “ <i>in vitro</i> ” do perfil de liberação do CIP	77
3.6. Atividade antimicrobiana por método de difusão em disco	78
3.7. Atividade antimicrobiana pelo método de coloração de biofilmes com Kit LIVE / DEAD BacLight®	78
3.8. Ensaio de citotoxicidade pelo método de MTT / Viabilidade Celular do biocurativo de CB/QTS/CIP e de CB	79
3.9. Avaliação da mutagenicidade pelo Teste de Ames	80
3.10. Experimento de cicatrização <i>in vivo</i>	81
3.10.1. Animais	81
3.10.2. Modelo de Lesão Cutânea	82
3.10.3. Grupos Experimentais	82
3.10.4. Eutanásia.....	82
3.10.5. Análise Macroscópica	83
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	83
4.1. MEV.....	83

4.2.	FTIR	84
4.3.	Análise termogravimétrica TG/DTG	86
4.4.	Liberação <i>in vitro</i> do ciprofloxacino.....	87
4.5.	Atividade antimicrobiana por método de difusão em disco	89
4.6.	Atividade antimicrobiana pelo método de coloração de biofilmes com Kit LIVE / DEAD BacLight®	90
4.7.	Ensaio de citotoxicidade pelo método de MTT / viabilidade celular	93
4.8.	Avaliação da mutagenicidade pelo teste de Ames	94
4.9.	Experimento de cicatrização <i>in vivo</i>	95
5.	CONCLUSÃO.....	100
6.	REFERÊNCIAS.....	101
	CONCLUSÃO GERAL.....	106

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO SOBRE CELULOSE BACTERIANA

1. INTRODUÇÃO

Os consumidores, a indústria e o governo estão cada vez mais exigentes para o desenvolvimento e utilização de produtos obtidos a partir de recursos sustentáveis, biodegradáveis, não baseados em petróleo e que tenham baixos riscos à saúde e à segurança humana, animal e ambiental (MOON *et al.*, 2011).

A celulose é um dos polímeros mais abundantes, de baixo custo, facilmente disponível em todo o mundo e é tradicionalmente extraído a partir de plantas ou de seus resíduos. A biossíntese de celulose tem lugar não apenas em plantas, mas também podem ser secretadas por bactérias, tais como *Acanthamoeba sp*, *Achromobacter sp.* e *Komagataeibacter sp*, algas (*Valonia*, *Chaetomorpha spp.*) e fungos (BROWN JUNIOR, 2004; KLEMM *et al.*, 2005).

A celulose bacteriana ou biocelulose (CB) foi relatada a primeira vez por A. J. Brown em 1886 que, trabalhando com fermentação do vinagre, constatou uma fina película na superfície do meio líquido. Ao analisar a estrutura química do produto formado, percebeu que esta era idêntica à da celulose vegetal. Porém, apenas num passado recente que a sua aplicabilidade é realizada (TAKAI, TSUTA e WATANABE, 1975).

Ao longo dos últimos anos, existe um crescente interesse em pesquisas e aplicações comerciais de celulose bacteriana. Exemplos importantes incluem alimentação livre de calorias, tal como nata de coco (JAGANNATH *et al.*, 2008), uso como embalagens ativas (Padrão *et al.*, 2016), aditivos alimentícios (SHI *et al.*, 2013), biosensores (LI *et al.*, 2016; PIRICH *et al.*, 2017), displays flexíveis (UMMARTYOTIN *et al.*, 2012; PINTO *et al.*, 2015), membranas acústicas (VANDAMME *et al.* 1998), aditivos na produção de treliças e papel (TABARSA *et al.*, 2017), dentre outras.

Porém, recentemente a CB e seus compósitos têm se destacado e vêm sendo estudados e utilizados para fins médicos de alta performance, que vão desde biocurativos ou substituto temporário de peles no tratamento de queimaduras e úlceras (CZAJA *et al.*, 2006; HU *et al.*, 2009), suporte para crescimento celular e uso na engenharia de tecidos (SVENSSON *et al.*, 2005; DE OLIVEIRA BARUD *et al.*, 2015), utilização em cicatrização de perfurações da membrana timpânica (SILVEIRA *et al.*, 2016), estudo para o desenvolvimento de vasos sanguíneos (SCHUMANN *et al.*, 2009; WIPPERMANN *et al.*, 2009), aplicações oftálmicas como lentes de contato

(LEVINSON e GLONEK *et al.*, 2010 e córnea artificial (HUI *et al.*, 2009), suporte para regeneração óssea (PETERSEN e GATENHOLM, 2011), liberação controlada de fármacos (TROVATTI *et al.*, 2011; ABEER, MOHD AMIN e MARTIN, 2014, FONTES *et al.*, 2018), cosméticos (AMNUAIKIT *et al.*, 2011; PACHECO *et al.*, 2017; LANCÔME BLANC EXPERT SUN LOVING ZONE BIO-CELLULOSE MASK), dentre outros produtos comercializados. Ainda, neste contexto, pesquisas confirmam argumentos para uma perspectiva positiva de celulose bacteriana na sua utilização como um eficiente biomaterial na área médica.

O biopolímero é produzido principalmente por bactérias Gram-negativas do gênero *Komagataeibacter* (anteriormente classificada como gênero *Acetobacter* e *Gluconacetobacter*) (VELÁQUEZ-RIAÑO e BOJACÁ, 2017). Estas bactérias são estritamente aeróbicas e capazes de produzir celulose como um produto extracelular em meios estáticos (na interface ar - meio) em que uma membrana é sintetizada na superfície do meio de cultivo, e também sob agitação, em que o oxigênio está disperso no meio de cultivo e são formadas esferas no lugar da membrana. Outras técnicas de produção também são utilizadas, como em reatores de forma contínua e semicontínua (CACICEDO *et al.*, 2015).

A maneira como o biopolímero é produzido, varia de acordo com a demanda e de sua aplicação, o que é dependente das considerações práticas, tais como a capacidade de expansão e os custos de produção (LUSTRI *et al.*, 2015). Embora existam maneiras distintas de se produzir CB, o principal objetivo é atingir a quantidade máxima de produção. Além disso, deve-se considerar que sua estrutura morfológica e propriedades físicas e mecânicas são estritamente influenciadas pelo método de cultivo (KRYSTYNOWICZ *et al.*, 2002). As condições ótimas para crescimento são de temperaturas entre 25 e 30 °C e com valores de pH entre 4 e 7 (IGUCHI, YAMANAKA e BUDHIONO, 2000; CZAJA, ROMANOVICZ e BROWN, 2004).

A formação do biopolímero possui características intrínsecas que o diferencia da celulose vegetal, tal como sua morfologia formada pelo arranjo tridimensional composto por nano e microfibrilas secretados para o ambiente externo pelos poros presentes na superfície da parede da célula bacteriana (TROVATTI, 2013). O diâmetro dessas fibras varia de 25 a 100 nm com comprimento na escala micrométrica (LEE *et al.*, 2014).

Quanto a estrutura química, a celulose é um homopolímero constituído de monômeros de glicose ligados por ligações glicosídicas β 1,4 como ilustra a figura 1.

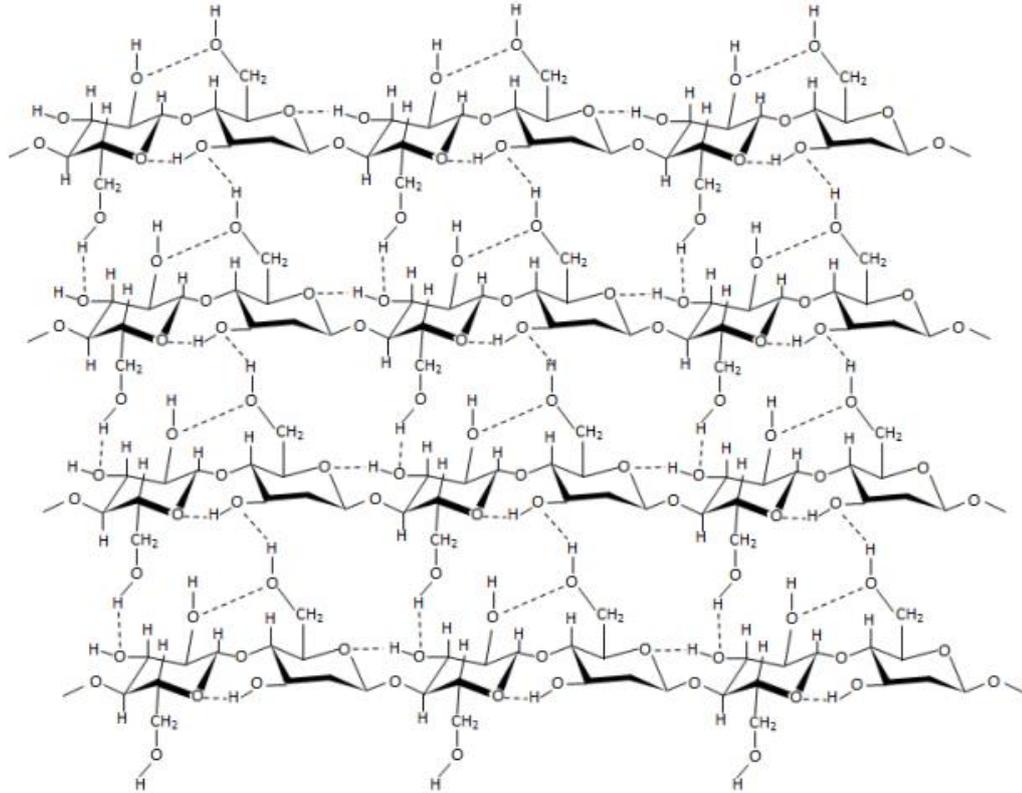


Figura 1 - Estrutura química de celulose bacteriana

Fonte: LUSTRI et al., 2015

Embora a composição química da CB seja idêntica à da celulose vegetal, a CB é livre de algumas moléculas como lignina, hemicelulose e pectina, além de apresentar diferença em suas propriedades e morfologia (ESA, TASIRIN e RAHMAN, 2014; HEINZE, 2015).

Devido à forte interação entre os grupos hidroxila, existe uma tendência para que as fibras de CB se organizem por ligações intramoleculares e intermoleculares (ligações de hidrogênio), o que permite a produção de folhas com elevada porosidade e área superficial (DE OLIVEIRA BARUD *et al.*, 2016).

As ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxilas mantêm as cadeias juntas e respondem pelo alto grau de cristalinidade, baixa solubilidade e degradabilidade da celulose quando utilizada *in vivo*. A rede de nanofibras produz um

biomaterial com alta resistência mecânica, altos valores de retenção de água, além de maior grau de cristalinidade e biocompatibilidade, quando comparada à celulose vegetal (HELENIUS *et al.*, 2006; MYIAMOTO *et al.*, 1989; NAKAGAITO e YANO, 2014).

Quanto à estrutura cristalina, as cadeias de celulose são sintetizadas e formadas em microfibrilas constituídas por domínios amorfos e cristalinos e o grau de cristalinidade (razão entre a massa de domínios cristalinos e a massa total da celulose) e dimensões das fibras são diretamente proporcionas à sua origem (KLEMM *et al.*, 2006). O grande interesse em pesquisar a orientação cristalina da celulose é devido a influência dessas características nas propriedades físicas, bem como sua acessibilidade à modificação química, intumescimento e fenômenos de adsorção e propriedades mecânicas (SOUZA LIMA e BORSALI, 2003). Tanto a celulose vegetal bacteriana como a nativa (a chamada celulose I) coexistem duas modificações cristalinas $I\alpha$ (triclínica) e $I\beta$ (monoclínica). A diferença consiste nas ligações de hidrogênio e na conformação com as cadeias vizinhas de celulose. A proporção entre as frações $I\alpha$ e $I\beta$ em qualquer amostra de celulose nativa está relacionada com a origem. A CB e a celulose extraída de algas (*Valonia*) contém em maior quantidade a célula unitária $I\alpha$, triclínica, enquanto nas celulosas de algodão, rami e madeira predominam a célula unitária $I\beta$, monoclínica (KLEMM *et al.*, 2002).

Durante o processo de produção, após a síntese, a membrana é lavada para remoção de células bacterianas, ácidos orgânicos, sais, açúcares residuais e outros componentes do meio de cultura, que estão na rede de nanofibras. Ao contrário da celulose vegetal, a CB é facilmente purificada com solução de hidróxido de sódio (NaOH) e com baixo consumo de energia (SANI e DAHMAN, 2010).

Uma das principais características deste biopolímero em questão é a capacidade do controle de sua estrutura supramolecular, por exemplo, com a adição de compostos solúveis no meio de cultivo, que pode alterar a biossíntese da celulose produzida pela bactéria, podendo também ser adsorvido e cristalizar uma nova composição da rede de nanofibras, alterando a morfologia e propriedades mecânicas. Além disso, a bactéria produtora, o meio de cultivo utilizado e o tipo de secagem podem modificar o polímero produzido. Essas modificações são conhecidas como modificações *in situ* (KLEMM *et al.*, 2009).

Outro tipo de modificação ocorre quando se insere outros materiais nas fibras de CB após o cultivo, como a incorporação de monômeros, polímeros, metais, dentre outros compostos na membrana *in natura*, alterando características específicas, e também, ampliando o campo de pesquisa com o biopolímero (KLEMM *et al.*, 2009). Essas interações podem ser físicas ou ocorrer por meio de ligações de hidrogênio entre a CB e o material de reforço incorporado. As substâncias adicionadas podem facilmente penetrar e incorporar dentro da matriz porosa da CB e/ou se ligarem às hidroxilas presentes. Esta estratégia é muito mais simples e mais utilizada do que a estratégia de síntese *in situ*, principalmente por manter as propriedades da CB aliadas à estrutura do material adicionado na maioria das vezes, formando compósitos (SHAH *et al.*, 2013).

Os compósitos de CB superam suas limitações e aumentam a gama de aplicações. Os exemplos mais aplicados são na área biomédica, onde é largamente utilizada pela síntese de compostos usando outros polímeros ou materiais bioativos, conferindo propriedades antibacterianas, antivirais, antifúngicas, cicatrizantes dentre outras. Somado a isso, trabalhos com nanopartículas tem sido publicados com a sua incorporação na membrana de CB para diversas aplicações, incluindo nanopartículas de prata (Ag), ouro (Au), paládio (Pd), óxido de ferro (FeO), platina (Pt) e óxido de titânio (TiO₂) (SHAH *et al.*, 2013).

Diante do exposto, observa-se que a CB apresenta características que a torna uma importante matriz para apresentação de diversos tipos de formulações para aplicações médicas, aspecto que será explorado nos capítulos posteriores.

2. REFERÊNCIAS

ABEER, M. M.; IQBAL, M. C.; MARTIN, C. A review of bacterial cellulose-based drug delivery systems: Their biochemistry, current approaches and future prospects, **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.66, pp.1047–1061, 2014.

AMNUAIKIT, T.; CHUSUIT, T.; RAKNAM, P.; BOONME, P. Effects of a cellulose mask synthesized by a bacterium on facial skin characteristics and user satisfaction, **Medical Devices (Auckland, N.Z.)**, v.4, pp.77–81, 2011.

BROWN, A. J. On an acetic ferment which forms cellulose, **Journal of the Chemical Society, Transactions**, v. 49, pp. 432, 1886.

CACICEDO, M.L., CESCO, K., BOSIO, V.E., PORTO, L.M., CASTRO, G.R. Self-assembly of carrageenin-CaCO₃ hybrid microparticles on bacterial cellulose films for doxorubicin sustained delivery, **Journal of Applied Biomedicine**, v. 13, pp.239–248, 2015.

CZAJA, W.; KRYSZYNOWICZ, A.; BIELECKI, S.; BROWN JUNIOR, R. Microbial cellulose the natural power to heal wounds, **Biomaterials**, v. 27, pp.145–151, 2006.

CZAJA, W.; ROMANOVICZ, D.; BROWN, R. M. Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture, **Cellulose**, v. 11 (3–4), pp.403–411, 2004.

FONTES, M. L.; MENEGUIN, A. B.; TERCJAK, A.; GUTIERREZ, J.; CURY, B. S. F.; DOS SANTOS, A. M.; RIBEIRO, S. J. L.; BARUD, H. S. Effect of in situ modification of bacterial cellulose with carboxymethylcellulose on its nano/microstructure and methotrexate release properties, **Carbohydrate Polymers**, v.179, pp.126-134, 2018.

HEINZE T. (2015) Cellulose: Structure and Properties. In: ROJAS O. (eds) **Cellulose Chemistry and Properties: Fibers, Nanocelluloses and Advanced Materials. Advances in Polymer Science**. Springer, Cham, pp.1-53.

HELENIUS, G.; BÄCKDAHL, H.; BODIN, A.; NANNMARK, U.; GATENHOLM, P.; RISBERG, B. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose, **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 76 (2), pp.431–438, 2006.

HU, W.; CHEN, S.; LI, X.; SHI, S.; SHEN, W.; ZHANG, X.; WANG, H. In situ synthesis of silver chloride nanoparticles into bacterial cellulose membranes, **Materials Science and Engineering: C**, v. 29 (4), pp.1216-1219, 2009.

HUI, J.; YUANYUAN, J.; JIAO, W.; YUAN, H.; YUAN, Z.; SHIRU, J. Potentiality of bacterial cellulose as the scaffold of tissue engineering of cornea. **Biomedical Engineering and Informatics, 2009**. BMEI'09. 2nd International Conference on (pp. 1-5): IEEE. 2009

IGUCHI, M.; YAMANAKA, S.; BUDHIONO, A. Bacterial cellulose - a masterpiece of nature's arts, **Journal of Materials Science**, v. 35 (2), pp.261–270, 2000.

JAGANNATH, A.; KALAISELVAN, A.; MANJUNATHA, S. S.; RAJU, P. S.; BAWA, A. S. The Effect of pH, Sucrose and Ammonium Sulphate Concentrations on The Production of Bacterial Cellulose (Nata-De-Coco) by *Acetobacter xylinum*, **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.24, pp.2593–2599, 2008.

KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H-P.; BOHN, A. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material, **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, pp.3358–3393, 2005.

KLEMM, D., SCHMAUDER, H.-P., HEINZE, T., ed. **Biopolymers. Cellulose**, ed. E. VANDAMME, BEATS, S. D., STEINBUCHER, A. Vol. 6, Wiley-VCH: Weinheim. 275-319, 2002.

KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; KRAMER, F.; HEßLER, N.; KOTH, D.; SULTANOVA, B. Nanocellulose Materials – Different Cellulose, Different Functionality, **Macromolecular Symposia**, v. 280, (1), pp.60–71, 2009.

KRYSTYNOWICZ, A.; CZAJA, W.; WIKTOROWSKA-JEZIERSKA, A.; GONÇALVES-MISKIEWICZ, M.; TURKIEWICZ, M.; BIELECKI, S. Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose, **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 29, pp.189–195, 2002.

LANCÔME PARIS. **Lancôme Blanc Expert Sun Loving Zone Bio-Cellulose Mask**. (Made in Japan).

LEE, K-Y.; BULDUM, G.; MANTALARIS, A.; BISMARCK, A. More Than Meets the Eye in Bacterial Cellulose: Biosynthesis, Bioprocessing, and Applications in Advanced Fiber Composites, **Macromolecular Bioscience**, v. 14 (1), pp.10-32, 2014.

LEVINSON, D. J., & GLONEK, T. Microbial cellulose contact lens. US Patents, US7832857B2. 2010.

LI, G.; SUN, K.; LI, D.; LV, P.; WANG, Q.; HUANG, F.; WEI, Q. Biosensor based on bacterial cellulose-Au nanoparticles electrode modified with laccase for hydroquinone detection, **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 509, pp.408-414, 2016.

LUSTRI, W. R.; DE OLIVEIRA BARUD, H. G.; BARUD, H. S.; PERES, M. F. S.; GUTIERREZ, J.; TERCJAK, A.; JUNIOR, O. B. O.; RIBEIRO, S. J. L. In: POLETTO, M.; JUNIOR, H. L. O, (ed) **Microbial Cellulose - Biosynthesis Mechanisms and Medical Applications, Cellulose - Fundamental Aspects and Current Trends - InTech**, pp.133-156, 2015.

MIYAMOTO, T.; TAKAHASHI, S.; ITO, H.; INAGAKI, H.; NOISHIKI, Y. Tissue biocompatibility of cellulose and its derivatives, **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 23 (1), pp.125-33, 1989.

MOON, R. J.; MARTINI, A.; NAIRN, J.; SIMONSEN, J.; YOUNGBLOOD, J. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites, **Chemical Society Reviews Home**, v.40 (7), pp.3941–3994, 2011.

NAKAGAITO, A. N.; YANO, H. (2014) Cellulose-Nanofiber-Based Materials. In: HINESTROZA, J. P. e Netravali, A. N. (ed) **Cellulose Based Composites: Cellulose Based Composites**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 1 – 25.

DE OLIVEIRA BARUD, H. G.; SILVA, R. R.; BARUD, H. S.; TERCJAK, A.; GUTIERREZ, J.; LUSTRI, W. R.; OLIVEIRA, O. B.; RIBEIRO, S. J. L. A multipurpose

natural and renewable polymer in medical applications: Bacterial cellulose, **Carbohydrate Polymers**, v. 153, pp.406-420, 2016.

PACHECO, G.; NOGUEIRA, C. R.; MENEGUIN, A. B.; TROVATTI, E.; SILVA, M. C. C.; MACHADO, R. T. A.; RIBEIRO, S. J. L.; SILVA FILHO, E. C.; BARUD, H. S. Development and characterization of bacterial cellulose produced by cashew tree residues as alternative carbon source, **Industrial Crops and Products**, v.107, pp.13-19, 2017.

PADRÃO, J.; GONÇALVES, S.; SILVA, J. P.; SENCADAS, V.; LANCEROS-MÉNDEZ, S.; PINHEIRO, A. C.; VICENTE, A. A.; RODRIGUES, L. R.; DOURADO, F. Bacterial cellulose-lactoferrin as an antimicrobial edible packaging, **Food Hydrocolloids**, v. 58, pp.126-140, 2016.

PETERSEN, N.; GATENHOLM, P. Bacterial cellulose-based materials and medical devices: Current state and perspectives, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, pp.1277–1286, 2011.

PINTO, E. R. P.; BARUD, H. S.; SILVA, R. R.; PALMIERI, M.; POLITO, W. L.; CALIL, V. L.; CREMONA, M.; RIBEIRO, S. J. L.; MESSADDEQ, Y. Transparent composites prepared from bacterial cellulose and castor oil based polyurethane as substrates for flexible OLEDs, **Journal of Materials Chemistry C Home**, v. 3 (44), pp.11581-11588, 2015.

PIRICH, C. L.; FREITAS, R. A.; TORRESI, R. M.; PICHETH, G. F.; SIERAKOWSKI, M. R. Piezoelectric immunochip coated with thin films of bacterial cellulose nanocrystals for dengue detection, **Biosensors and Bioelectronics**, v.92, pp.47-53, 2017.

R. M. BROWN JUNIOR. Cellulose Structure and Biosynthesis: What is in Store for the 21st Century? **Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry**, v. 42, pp.487–495, 2004.

SANI, A.; DAHMAN, Y. Improvements in the production of bacterial synthesized biocellulose nanofibres using different culture methods. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, pp.151–164, 2010.

SCHUMANN, D. A.; WIPPERMANN, J.; KLEMM, D. O.; KRAMER, F.; KOTH, D.; KOSMEHL, H.; WAHLERS, T.; SALEHI-GELANI, S. Artificial vascular implants from bacterial cellulose: preliminary results of small arterial substitutes. **Cellulose**, v. 16, pp.877–885, 2009.

SHAH, N.; UL-ISLAMA, M.; KHATTAKA, W.A.; PARKA, J.K. Overview of Bacterial Cellulose Composites: A Multipurpose Advanced Material. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, pp.1585–1598, 2013.

SHI, Z.; ZHANG, Y.; PHILLIPS, G. O.; YANG, G. Utilization of bacterial cellulose in food. **Food Hydrocolloids**, v. 35, pp.539-545, 2014.

SILVEIRA, F. C. A.; PINTO, F. C. M.; NETO, S., S. C.; LEAL, M. C.; CESÁRIO, J.; AGUIAR, J. L. A. Treatment of tympanic membrane perforation using bacterial cellulose: a randomized controlled trial, **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 82(2), pp.203-208, 2016.

SVENSSON, A.; NICKLASSON, E.; HARRAH, T.; PANILAITIS, B.; KAPLAN, D. L.; BRITTBERG M.; GATENHOLM, P. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage, **Biomaterials**, v. 26 (4), pp.419-431, 2005.

TABARSA, T.; SHEYKHNAZARI, S.; ASHORI, A.; MASHKOUR, M.; KHAZAEIAN, A. Preparation and characterization of reinforced papers using nano bacterial cellulose, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, pp.334-340, 2017.

TAKAI, M.; TSUTA, Y.; WATANABE, S. Biosynthesis of Cellulose by *Acetobacter Xylinum*. I. Characterizations of Bacterial Cellulose, **Polymer Journal**, v. 7, pp.137–146, 1975.

TROVATTI, E. (2013) Bacterial Cellulose. In: DUFRESNE A., THOMAS S, AND POTHAN S, (ed) **Biopolymer Nanocomposites: Processing, Properties, and Applications**, 1st edn. John Wiley & Sons, pp.339–366.

TROVATTI, E.; SILVA, N. H. C. S.; DUARTE, I. F.; ROSADO, C. F.; ALMEIDA, I. F.; COSTA, P.; FREIRE, C. S. R.; SILVESTRE, A. J. D.; NETO, C. P. Biocellulose Membranes as Supports for Dermal Release of Lidocaine. **Biomacromolecules**, v.12 (11), pp.4162–4168, 2011.

UMMARTYOTIN, S.; JUNTARO, J.; SAIN, M.; MANUSPIYA, H. Development of transparent bacterial cellulose nanocomposite film as substrate for flexible organic light emitting diode (OLED) display, **Industrial Crops and Products**, v. 35 (1), pp.92-97, 2012.

VANDAMME, E. J.; DE BAETS, S.; VANBAELEN, A.; JORIS, K.; DE WULF, P. Improved production of bacterial cellulose and its application potential. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59: pp.93-99, 1998.

VELÁQUEZ-RIAÑO, M.; BOJACÁ, V. Production of bacterial cellulose from alternative low-cost substrates. **Cellulose**, v. 24, (7), pp.2677–2698, 2017.

WIPPERMANN, J.; SCHUMANN, D.; KLEMM, D.; KOSMEHL, H.; SALEHI-GELANI, S.; WAHLERS, T. Preliminary Results of Small Arterial Substitute Performed with a New Cylindrical Biomaterial Composed of Bacterial Cellulose. **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**, v. 37 (5), pp.592-596, 2009.

CAPÍTULO 2

ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA PÓS PROCESSO DE PRENSAGEM

1. INTRODUÇÃO

Dentre as principais características da CB, a capacidade de adsorção de água é uma das mais conhecidas, podendo reter 99 % de líquidos devido a sua grande quantidade de grupos hidroxilas favorecendo de ligações de hidrogênio com moléculas de água e outros solventes polares (REBELO *et al.*, 2018; ESA, 2014).

Embora extensivamente estudados nos últimos anos, as propriedades de CB estão longe de ser completamente compreendidas, em particular sobre os processos de purificação e secagem e quais são seus efeitos correspondentes nas propriedades das fibras.

A maioria das pesquisas e produtos de CB são oriundos da membrana já desidratada e o processamento pós-produção da retirada de água mantida dentre as fibras da membrana é bastante variado. Somado a isso, pouco se conhece a respeito de possíveis alterações que um tratamento de prensagem pode ocasionar nas propriedades físico-químicas e mecânicas da CB após a prensagem.

Klemm e colaboradores em 2006 relatam a influência de tratamentos químicos na membrana de CB, que em comparação da purificação de membranas usando carbonato de potássio ou de sódio com o tratamento comum com soluções de hidróxido de sódio ou potássio aquoso 0,1–2,0N. Os autores consideraram que a purificação de hidróxido leva a uma diminuição a resistência à tração e de alongamento do material, sendo menor esse efeito no caso de tratamento com carbonato. Além disso, a taxa de transmissão de oxigênio é maior após lavagem com carbonato.

Trabalhos com este citado no parágrafo anterior são bastante escassos na literatura, principalmente acerca da influência de processos físicos praticados rotineiramente na produção das membranas, nas propriedades da CB. Dessa forma, o capítulo reporta sobre a influência do tratamento de prensagem nas características morfológicas, químicas, mecânicas e térmicas da CB.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Caracterização da estrutura da CB (avaliação morfológica, química, mecânica e térmica) após processo de prensagem com a utilização de prensa hidráulica e secagem.

2.2. Objetivos Específicos

- Obter membranas de CB por processo estático, prensagem e secagem.
- Analisar morfológicamente a superfície da CB;
- Avaliar a estrutura química;
- Avaliar a propriedade mecânica por texturômetro;
- Avaliar termogravimetricamente.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

D-glicose anidra, ácido cítrico, etanol, fosfato de potássio bibásico (KH_2PO_4), fosfato de sódio bibásico (Na_2HPO_4), sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) todos foram adquiridos da marca Synth[®]. Peptona, ágar e extrato de levedura foram adquiridos da marca Merck.

3.2. Produção das membranas de CB

A bactéria gram-negativa *Komagataeibacter rhaeticus* foi previamente isolado por Dos Santos *et al.* (2014). As cepas foram mantidas em refrigeração entre 4 e 8 °C até sua ativação em meio de cultura sólido composto por 20 gL⁻¹ de glicose, 5 gL⁻¹ de extrato de levedura, 5 gL⁻¹ de peptona, 2,7 gL⁻¹ de (Na_2HPO_4), 1,15 gL⁻¹ de ácido cítrico, 20 gL⁻¹ de ágar e água destilada. Para a ativação, os microrganismos foram incubados à 28 °C por 72 h. Uma vez ativadas, as bactérias foram inoculadas em meio de cultura líquido composto por 50 gL⁻¹ de glicose, 4 gL⁻¹ de extrato de levedura, 0,73 gL⁻¹ de ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 2 gL⁻¹ de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), 20 gL⁻¹

de etanol e água destilada. Esta solução foi incubada à 28 °C por 24 h e chamada de pré-inoculo (MACHADO *et al.*, 2016). Para o cultivo, esta solução foi inoculada em erlenmeyers de 1 L na proporção de 1:9 de pré-inoculo: meio HS (20 mL de pré-inoculo para 180 mL de meio HS) e incubadas à 28 °C por 168 h em processo estático. As membranas produzidas foram lavadas exaustivamente com água destilada e depois purificadas imersas em solução 0,1 M de NaOH por 45 min à 80 °C, seguida de exaustivas lavagens com água destilada até atingir pH neutro.

3.3. Prensagem das membranas

Para auxiliar no processo de secagem, as membranas foram prensadas em prensa hidráulica Skay 1,5 ton como mostra a figura 1, nas pressões de 1, 2, e 3 toneladas nos períodos de 10, 20 e 30 segundos, conforme planejamento composto central descrito no item 3.4. Posteriormente, as membranas foram secas em estufa com circulação forçada de ar à 38 °C por 24 h.



Figura 2 - Prensa Hidráulica, utilizada para eliminação de H₂O da membrana de CB.

3.4. Planejamento composto central

A fim de avaliar o processo de prensagem das membranas, foi realizado um planejamento composto central analisando algumas variáveis, verificando assim, sua influência nas características da CB. As variáveis analisadas foram tempo e força de prensagem de acordo com um planejamento fatorial completo $3 \times 3 \times 3 = 9$. As variáveis foram divididas em três níveis sendo 1 (menor), 2 (intermediário) e 3 (alto). A tabela 1 apresenta o total de 9 experimentos realizados.

Espessura: referente a 168 h de produção da CB.

Força: níveis 1 (1 toneladas), 2 (2 toneladas) e 3 (3 toneladas)

Tempo: níveis 1 (10 segundos), 2 (20 segundos) e 3 (30 segundos)

Tabela 1 - Variáveis analisadas no processo de prensagem das membranas de CB.

Experimento	Força	Tempo
CB	0	0
CB1	1	1
CB 2	1	2
CB 3	1	3
CB 4	2	1
CB 5	2	2
CB 6	2	3
CB 7	3	1
CB 8	3	2
CB 9	3	3

3.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia da superfície das amostras foi observada em um microscópio eletrônico de varredura (JEOL JMF-6700F). Todas as amostras foram depositadas em suportes de cobre, recobertas por uma camada de carbono com microscópio operando na tensão de 2 kV.

3.6. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR foram obtidos utilizando o espectrômetro BRUKER 70 com resolução 4 cm^{-1} utilizando 16 varreduras na região espectral de 4000 a 400 cm^{-1} em acessório de refletância total atenuada (ATR). Foram analisadas as amostras CB, CB1, CB4 e C7, representando uma amostra de cada força efetuada na prensagem para ser avaliada pela técnica.

3.7. Avaliação das propriedades mecânicas por texturômetro

As propriedades mecânicas foram analisadas utilizando um texturômetro modelo TA-XT2 (Stable Micro Systems) equipado com uma sonda em aço inoxidável com ponteira esférica (5 mm). Para execução das medidas, a espessura das membranas foi analisada utilizando um micrômetro digital MDC-Lite (Mitutoyo®) em 5 posições diferentes nas amostras. As análises foram feitas em sextuplicata e os valores das médias foram calculados. Então, as seções de CB foram fixadas num suporte com orifício circular ($D=10 \text{ mm}$) e a sonda foi acionada através da membrana com velocidade de 1 mm s^{-1} e força de gatilho de $0,005 \text{ kg}$. As curvas força-deslocamento foram registradas até a ruptura do filme e utilizadas para determinar a resistência à perfuração (R_p), o alongamento durante a perfuração (A_p), a energia de perfuração (E_p), que foram calculados a partir das equações de 1 a 4 (MENEQUIN *et al.*, 2014; LIMMATVAPIRAT *et al.*, 2007):

$$R_p = \frac{F_{max}}{A_{CS}} \quad \text{Equação (1)}$$

onde F_{max} (N) é a força máxima aplicada e A_{CS} (mm^2) é a área de seção transversal das membranas colocadas no orifício circular, com $A_{CS} = 2rh$, onde r é o raio do orifício e h é a espessura da membrana.

$$A_p = \frac{\sqrt{r^2 + d^2} - r}{r} \times 100 \quad \text{Equação (3)}$$

onde r (mm) é o raio da membrana exposta na placa do orifício e d o deslocamento da sonda do ponto de contato para o ponto de punção.

$$E_p = \frac{AUC}{V} \quad \text{Equação (4)}$$

onde AUC é a área sob a curva de força *versus* o deslocamento e V o volume da membrana ($V = \pi r^2 h$, onde r é o raio do orifício e h é a espessura da membrana) colocada na placa do orifício.

3.8. Análise termogravimétrica TG/DTG

As análises termogravimétricas foram efetuadas utilizando equipamento modelo SDT Q600 (TA Instruments, USA) com taxa de aquecimento de 20 °C/min sob atmosfera de nitrogênio de temperatura ambiente até 600 °C. Foram analisadas as amostras CB, CB1, CB4 e C7, representando uma amostra de cada força efetuada na prensagem para ser avaliada pela técnica.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. MEV

As micrografias da morfologia das amostras obtidas por MEV estão representadas na figura 2, com a CB sem tratamento e as demais com o tratamento de prensagem, conforme o planejamento composto central. As micrografias apresentaram a estrutura tridimensional, distribuídas de forma aleatória e porosa, que é característica da CB.

As membranas com tratamento (CB 1-9) apresentaram discreta aproximação entre as fibras quando comparadas com a amostra sem tratamento (CB), isso se deve, provavelmente devido compactação sofrida pelas fibras na aplicação da força para retirada de água pela prensagem. Além disso, é possível afirmar que existe um tendência das fibras se alinharem e se organizarem mais do que quando comparadas à CB sem tratamento de prensagem.

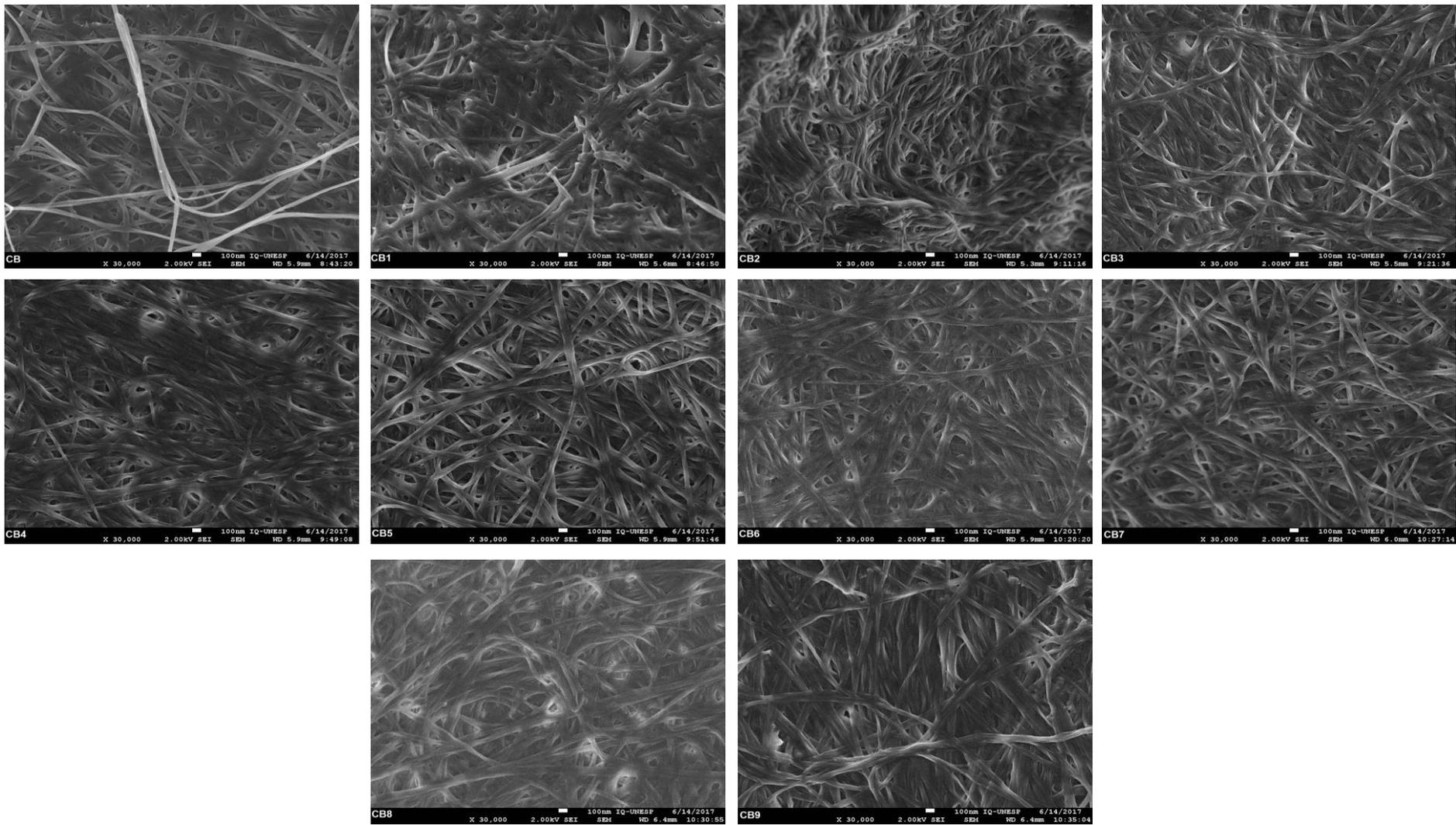


Figura 3 - Micrografias obtidas por MEV da amostra sem tratamento de prensa (CB) e as demais com tratamento (CB 1-9).

4.2. FTIR

A figura 3 apresenta os espectros de FTIR das amostras de CB sem tratamento e os espectros das amostras CB1, CB4 e CB7 com tratamento.

A CB apresenta bandas bem características na região, 1106 e 1165 cm^{-1} a ligação C-O de álcool primário, e a ligação C-O-C, respectivamente. A banda larga em 3346 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento do OH. A banda em 1642 cm^{-1} foi atribuída a O-H de água adsorvida. Bandas características de estiramentos de CH dos grupos CH_2 e CH_3 podem ser observadas em 2894 cm^{-1} .

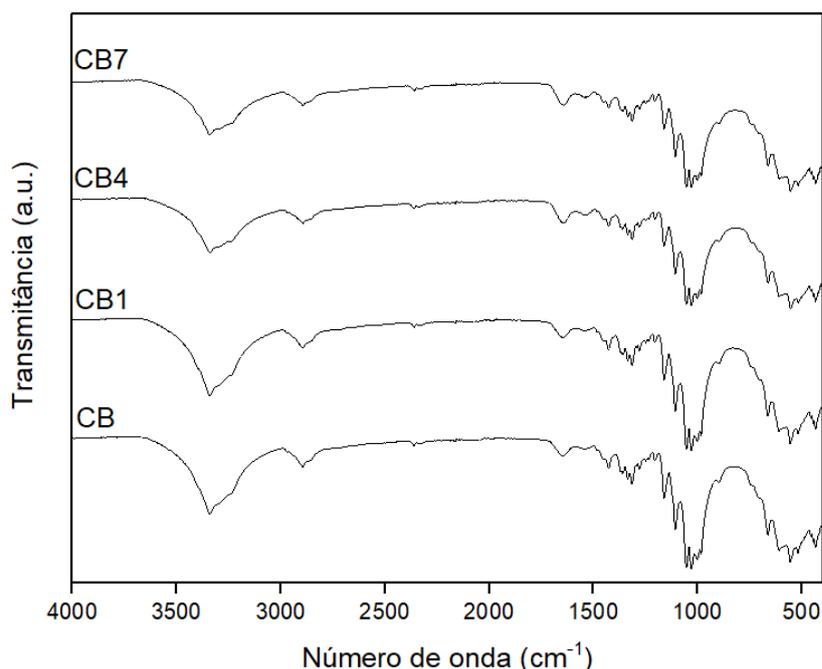


Figura 4 - Espectros de FTIR da amostra de CB sem tratamento e das amostras CB1, CB4 e CB7 com tratamento.

Todas as amostras apresentaram espectro característico da CB, e não foram observadas diferenças entre as bandas nos espectros. Os espectros obtidos demonstraram alta similaridade, indicando que pelo FTIR não foi possível demonstrar o comprometimento da estrutura química da CB após o processo de prensagem.

4.3. Avaliação das propriedades mecânicas por texturômetro

Os parâmetros relacionados às propriedades mecânicas das amostras estão representados na tabela 2. Foram analisados os parâmetros de resistência à perfuração (R_p), alongamento durante a perfuração (A_p) e a energia empregada durante a perfuração (E_p).

A amostra sem tratamento (CB) apresentou maior resistência a perfuração quando comparada as demais amostras submetidas à prensagem. Isso pode ser atribuído ao colapso sofrido pelas fibras com a compactação sofrida durante a prensagem e secagem, tornando as fibras mais friáveis e quebradiças, diferentemente das fibras da membrana sem tratamento, que apenas se colapsaram com a secagem, corroborando com as micrografias apresentadas na MEV.

Pôde se observar que as amostras CB1, CB2, CB3, CB4, CB5 e CB6 apresentaram uma progressiva resistência a perfuração de acordo com aumento gradativo de força e tempo de prensagem. Porém, as amostras CB7, CB8 e CB9, tiveram baixos valores de resistência a perfuração, possivelmente devido ao rompimento com desfragmentação de algumas partes da membrana durante a prensagem, sugerindo que a força de 3 toneladas pode ter causado o rompimento das fibras e conseqüentemente diminuindo sua resistência.

Para o alongamento durante a perfuração, a CB sem tratamento apresentou menores valores quando comparadas as demais amostras. Isso pode ser explicado devido ao fato de que conforme as membranas foram mais compactadas e colapsadas, foi possível observar uma tendência das fibras a se alinharem. Com o alinhamento das fibras, diminui-se os pontos de contato em que uma fibra se cruza com a outra e nesses pontos, pode-se afirmar que exista um ponto de resistência maior. E uma vez que existe a diminuição desses pontos, as fibras se alongam mais até o momento da sua ruptura e conseqüentemente, aumentando os valores de alongamento a perfuração.

A energia gasta durante a perfuração está correlacionada com a resistência da amostra durante a perfuração, pois os dados mostram que quanto maior a resistência, maior será a energia utilizada até sua ruptura.

Tabela 2 - Propriedades mecânicas das amostras de CB sem tratamento e de CB com diferentes tratamentos de prensagem.

Amostra	R_p (MPa)	A_p (%)	E_p (x10⁻⁴ kJ m⁻³)
CB	69,95 ± 5,79	3,85 ± 0,26	5,12 ± 0,618
CB1	9,13 ± 1,68	27,39 ± 1,92	1,29 ± 0,357
CB2	12,06 ± 2,49	20,06 ± 3,40	1,58 ± 0,569
CB3	19,83 ± 3,72	15,96 ± 2,50	2,08 ± 5,00
CB 4	29,56 ± 5,17	14,73 ± 2,04	2,27 ± 0,757
CB 5	39,69 ± 3,95	5,95 ± 1,08	2,85 ± 0,388
CB 6	44,13 ± 2,28	19,72 ± 2,51	3,06 ± 0,976
CB 7	26,41 ± 10,07	9,91 ± 3,90	2,81 ± 0,570
CB 8	30,59 ± 1,24	11,63 ± 3,35	2,63 ± 0,841
CB 9	8,65 ± 0,99	19,60 ± 3,28	1,83 ± 0,916

4.4. Análise termogravimétrica TG/DTG

A figura 4 mostra as curvas TG/DTG das membranas de CB sem tratamento e com tratamento (amostras 1, 4 e 7). Todas as amostras apresentaram comportamento térmico semelhante e pelas curvas obtidas, observou-se duas perdas de massa. A primeira, uma pequena perda de massa com início em temperatura ambiente até 146 °C que é relacionada à perda de água superficial (~ 4,0 – 5,2 %) (DE SALVI *et al.*, 2012). O segundo evento de perda de massa foi atribuído ao processo de decomposição da CB em temperaturas entre 280 e 401 °C, com a temperatura máxima entre 372 – 375 °C (76 – 88 %). A degradação da celulose inclui a despolimerização, desidratação e decomposição de unidades de glicose (BARUD *et al.*, 2008). Por fim, como demonstrado pelo FTIR em que o tratamento não influenciou no perfil químico da CB, nesse caso, os resultados mostram que a estabilidade térmica das membranas com tratamento também não foi afetada, uma vez que o perfil térmico se manteve igual à amostra sem tratamento.

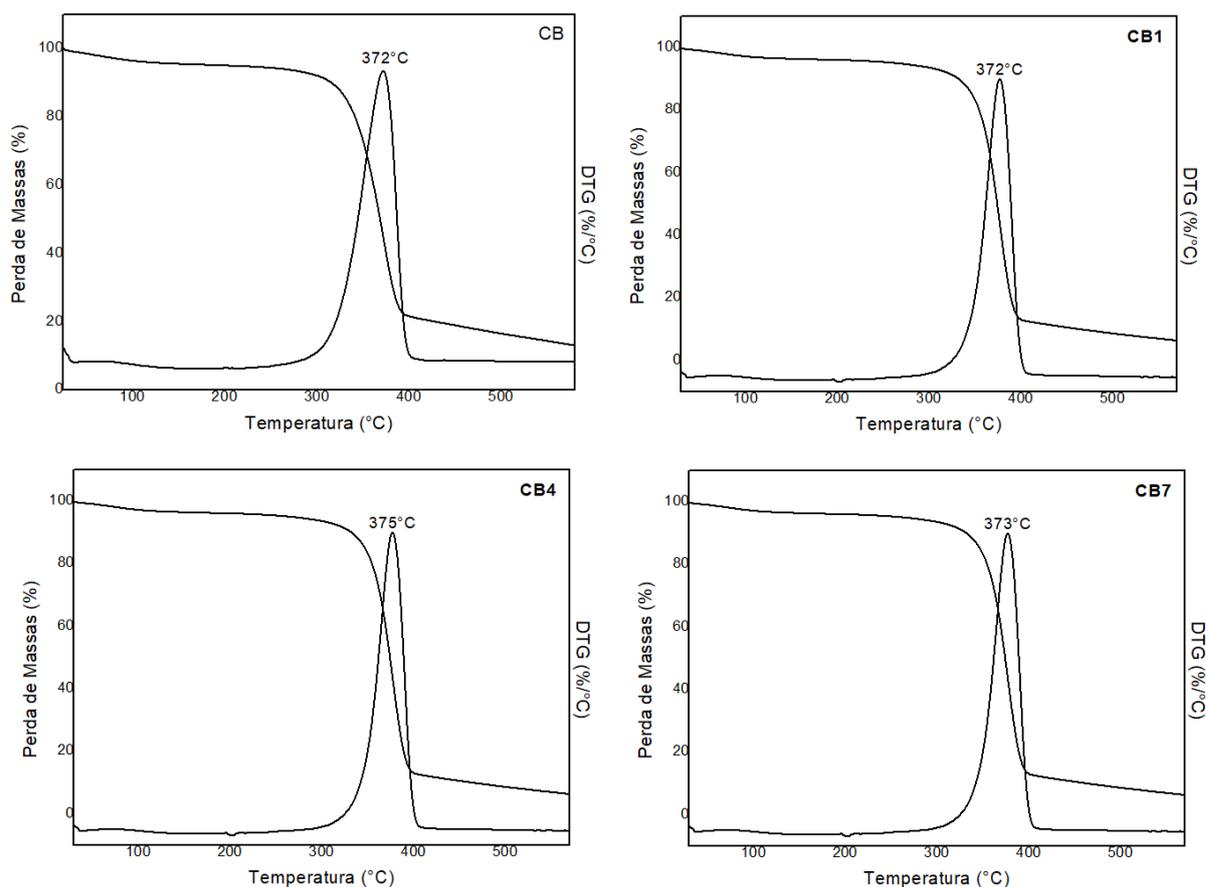


Figura 5 - Curvas de TG/DTG da amostra sem tratamento (CB), e com tratamento (CB1, CB4 e CB7).

5. CONCLUSÕES

Nesse trabalho foram produzidas membranas de CB e prensadas em prensa hidráulica para verificar possíveis alterações sofridas devido ao processo de prensagem. Para os parâmetros químicos e térmicos, não foi possível observar diferenças após os tratamentos. Para morfologia e propriedades mecânicas, houve influência do tratamento para esses resultados, porém, é discreta frente à diversas possibilidades da utilização do biopolímero, por exemplo, na utilização da membrana como um biocurativos. Além disso, o processo de retirada de água pela prensa, pode acelerar o tempo do processo de produção industrial da CB, uma vez que força a água sair das fibras e possivelmente reduzindo o número de etapas de lavagem.

6. REFERÊNCIAS

BARUD, H. S.; JÚNIOR, A M. A.; SANTOS, D. B.; ASSUNÇÃO, R. M. N.; MEIRELES, C. S.; CERQUEIRA, D. A.; FILHO, G. R.; RIBEIRO, C. A.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Thermal behavior of cellulose acetate produced from homogeneous acetylation of bacterial cellulose, **Thermochimica Acta**, v. 471 (1–2), pp.61-69, 2008.

DE SALVI, D. T. B.; BARUD, H. S.; CAIUT, J. M. A.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Self-supported bacterial cellulose/boehmite organic–inorganic hybrid films. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 63 (2), pp.211–218, 2012.

DOS SANTOS, R. A. C.; BERRETTA, A. A.; BARUD, H. S.; RIBEIRO, S. J. L.; GONZÁLEZ-GARCÍA, L. N.; ZUCCHI, T. D.; RIAÑO-PACHÓN, D. M. Draft Genome Sequence of *Komagataeibacter rhaeticus* Strain AF1, a High Producer of Cellulose, Isolated from Kombucha Tea. **Genome Announcements**, v. 2 (4), 2014.

ESA, F.; TASIRIN, S M.; RAHMAN, N.A. Overview of bacterial cellulose production and application. **Agriculture and Agricultural Science Procedia** 2, pp.113–119, 2014.

LIMMATVAPIRAT, S; LIMMATVAPIRAT, C.; PUTTIPIPAKHACHORN, S.; NUNTANID, J.; LUANGTANA-ANAN, M. Enhanced enteric properties and stability of shellac films through composite salts formation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67 (93), pp.690–698, 2007.

MACHADO, R. T. A.; GUTIERREZ, J.; TERCJAK, A.; TROVATTI, E.; UAHIB, F. G. M.; MORENO, G. P.; NASCIMENTO, A. P.; BERRETTA, A. A.; RIBEIRO, S. J. L.; BARUD, H. S. *Komagataeibacter rhaeticus* as an alternative bacteria for cellulose production. **Carbohydrate Polymers**, v. 152: pp.841-849, 2016.

MENEGUIN, A. B.; CURY, B. S. F.; EVANGELISTA, R. C. Films from resistant starch-pectin dispersions intended for colonic drug delivery. **Carbohydrate Polymers** v. 99, pp.140–149, 2014.

REBELO, A. R.; ARCHER, A. J.; CHEN, X.; LIU, C.; YANG, G.; LIU, Y. Dehydration of bacterial cellulose and the water content effects on its viscoelastic and electrochemical properties, **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 19 (1), 203-211, 2018.

CAPÍTULO 3

ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO DE
BIOCELULOSE PRODUZIDA A
PARTIR DE RESÍDUOS DE
CAJUEIRO (*ANACARDIUM
OCCIDENTALE*) COMO FONTE
ALTERNATIVA DE CARBONO
PARA O MICRORGANISMO
*KOMAGATAEIBACTER
RHAETICUS*

1. INTRODUÇÃO

As excepcionais propriedades físico-químicas, disponibilidade e caráter renovável da celulose tem aumentado sua gama de aplicações nas últimas décadas. Encorajada pela diminuição da demanda de papel, a celulose tem sido utilizada no desenvolvimento de novos materiais e compósitos, incluindo materiais multifuncionais e/ou nanoestruturados (CARREIRA *et al.*, 2011; JOYE e MCCLEMENTS, 2016; WANG *et al.*, 2016).

Apesar das promissoras propriedades da CB, sua aplicação ainda é limitada devido ao alto custo de produção, incluindo o meio de cultura. Na tentativa de superar esta desvantagem, algumas estratégias foram propostas como a produção de celulose bacteriana a partir de meios de cultura de baixo custo (CACICEDO *et al.*, 2016).

O meio de cultivo tradicional para a produção de CB em estudos acadêmicos é conhecido como meio HS, de Hestrin e Schramm (1954). Diversas modificações nas composições no meio HS têm sido propostas, como a utilização de mono e dissacarídeos como frutose, sacarose, maltose, celobiose, xilose e galactose têm sido utilizadas com sucesso como fontes de carbono (ISHIHARA *et al.*, 2002; KESHK e SAMESHIMA 2005). Resíduos industriais ou subprodutos de agroindústrias também já foram utilizados para a produção de CB, por exemplo, pó de konjac (HONG e QIU 2008), melão de beterraba (KESHK *et al.*, 2006), melão de cana de açúcar (TYAGI e SURESH 2016), licor de milho (NORO *et al.*, 2004), caldo de cana e melão de açúcar (LAZARINI *et al.*, 2016) como fonte de carbono, nitrogênio e outros nutrientes.

A respeito da utilização de resíduos/subprodutos, o Brasil é um país essencialmente agroindustrial, e a cadeia produtiva do caju tem uma importante representatividade na cadeia alimentícia em determinadas regiões do país. Os principais produtos na indústria de caju são o suco e a castanha de caju, e a os principais subprodutos são a polpa da fruta e o exsudato do tronco. O exsudato é periodicamente extraído do cajueiro para aumentar a produção da castanha de caju, que é considerado o produto de maior valor agregado. Cada cajueiro (*Anacardium occidentale*) produz aproximadamente 700 g de exsudato/ano que são desperdiçados. O exsudato de cajueiro (EC) é rico em mono e

dissacarídeos, proteína arabinogalactânica e sais minerais (COSTA *et al.*, 1996; MENESTRINA *et al.*, 1998; PEREIRA-NETTO *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 1993; SILVA *et al.*, 2010). O EC é constituído de 70 % de heteropolissacarídeos ramificados, que quando purificados, são chamados de goma de caju (GC). Sua cadeia polimérica principal é formada de unidades de glicose ligadas por ligações glicosídicas β -(1→4). Alguns açúcares podem integrar a estrutura ramificada da GC, como arabinose, ramnose glicose e ácido glicurônico. A produção anual de EC e GC é de pelo menos 68.000 e 48.000 toneladas/ano, respectivamente (RODRIGUES *et al.*, 1993). Estas grandes quantidades de subprodutos mostram a importância econômica e a possibilidade de agregação de valor a estes resíduos. Além disso, nem o exsudato e nem a goma de caju já foram utilizados como meio de cultivo. Sendo assim, o objetivo desse capítulo consistiu em utilizar esses resíduos como meio de cultivo e avaliar as propriedades das membranas obtidas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral:

Utilizar e avaliar o EC e GC como fonte de carbono para a produção de CB.

2.2. Objetivo Específico:

Suplementar e/ou substituir com EC e GC como fonte de carbono do meio de cultivo HS;

Avaliar o rendimento das membranas a partir das suplementações ou substituições da fonte de carbono no meio de cultivo;

Caracterizar as membranas obtidas por MEV, DRX, FTIR, TGA e avaliar as propriedades mecânicas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

D-glicose anidra, ácido cítrico, etanol, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ todos foram adquiridos da marca Synth®. Peptona, ágar e extrato de levedura foram adquiridos da marca Merck. EC foi coletado no Centro de Ciências Agrárias (CCA) na Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, Piauí, Brasil, e utilizados puros ou após etapas de purificação, denominado como GC.

3.2. Purificação do EC – Isolamento da goma de caju

O isolamento da GC seguiu com a utilização da metodologia adaptada descrita por Rodrigues *et al.*, 1993. O EC em solução aquosa (10 % p/v) foi preparado e agitado por 12 horas. A solução foi neutralizada com NaOH 1M e filtrada em papel de filtro. A GC foi subsequentemente precipitada e adicionou-se o volume de etanol correspondente a 4 vezes o volume inicial da solução. O precipitado de GC foi separado por filtração e lavado sucessivamente com etanol e acetona, o que resultou num pó branco que foi recolhido e secado em estufa a 30 °C por 24 horas (RODRIGUES *et al.*, 1993).

3.3. Produção de CB

As membranas foram obtidas conforme item 3.1 do capítulo 2.

O meio de cultivo HS sem suplementação, foi utilizado como padrão. Os meios em que foram utilizados os resíduos de caju como fonte alternativa de carbono foram formulados pela substituição total ou parcial da glicose por EC ou GC e foram denominados de HSEC (25 gL^{-1} glicose mais 25 gL^{-1} de EC), HSGC (25 gL^{-1} glicose mais 25 gL^{-1} de GC), GC (50 gL^{-1} de GC) e EC (50 gL^{-1} de EC).

Após o crescimento, as membranas foram lavadas exaustivamente com água destilada e depois purificadas utilizando solução diluída de NaOH 0,1 M por 45 min a 80 °C, seguida de exaustivas lavagens com água destilada até atingir pH neutro.

3.4. MEV

Conforme descrito no item 3.4 no Capítulo 1

3.5. FTIR

Conforme descrito no item 3.5 no Capítulo 1

3.6. Análise termogravimétrica (TG)

As análises termogravimétricas foram efetuadas utilizando equipamento modelo SDT Q600 (TA Instruments, USA) com taxa de aquecimento de 20 °C/min sob atmosfera de nitrogênio de temperatura ambiente até 1000°C.

3.7. Difractometria de Raio X (DRX)

O padrão de difração das amostras foi determinado a partir de difratogramas obtidos no difratômetro de raios X Shimadzu, modelo XDR6000, sob radiação de Cu-K α ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$) e com varredura de raios X de ângulo aberto 2θ entre 10° e 80° . A cristalinidade (C) foi determinada utilizando o método de Segal (SEGAL *et al.*, 1959). O índice de cristalinidade foi calculado de acordo com a equação 5:

$$CrI = \left(\frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \right) \times 100 \quad \text{Equação (5)}$$

Onde: CrI expressa o índice de cristalinidade relativo, I_{002} é a intensidade máxima (em unidades arbitrárias) referente ao pico 002 e I_{am} é a intensidade da difração na mesma unidade em 18° (2θ).

3.8. Avaliação das propriedades mecânicas por texturômetro

Conforme descrito no item 3.6 no capítulo 1

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Produção de CB

O efeito da substituição total ou parcial da fonte de carbono do meio de cultura com EC ou GC na produção de biocelulose foi investigado e os resultados variaram de 2,3 gL⁻¹ (meio GC) a 6,0 gL⁻¹ (HSGC e HSEC), como mostrado na figura 5. Com resíduos puros de GC e EC foram produzidos 2,3 e 2,8 gL⁻¹, respectivamente. Os meios HSEC e HSGC conduziram ao rendimento de cerca de 6 gL⁻¹, valores idênticos ao rendimento obtido utilizando o meio HS de referência, indicando que a substituição de 50 % de glucose não afetou a produção de CB.

Acerca dos custos de produção, 1 L de meio de cultivo HS custou R\$ 18,90, R\$ 16,42 para os meios HSEC e HSGC (redução de 16,35 %) e R\$ 12,68 para o meio os meios EC e GC (redução de 33 %).

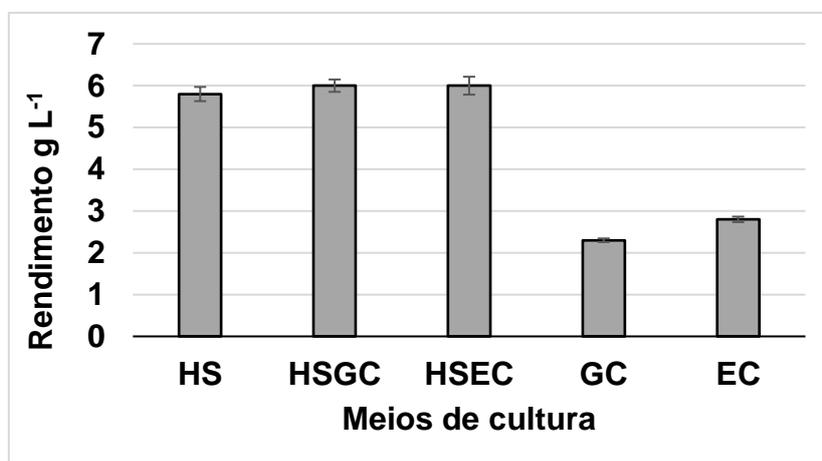


Figura 6 - Produção de CB a partir dos meios de cultura HS, HSGC, HSEC GC e CT em 7 dias.

Na literatura já foram foram propostos resíduos industriais ou subprodutos para a produção de CB e na maioria dos casos, os rendimentos estão abaixo do valor apresentado pelo meio HS no presente trabalho. Por exemplo, os resíduos

de indústrias de cervejaria levaram a uma produção de CB de 1,74 a 2,41 gL⁻¹ (KHATTAK *et al.*, 2015); a partir de águas residuais de destilaria de vinho de arroz, a produção de CB foi de cerca de 6,31 gL⁻¹ (WU e LIU 2012). Em trabalho com águas residuais provenientes da fermentação de lipídios, foi produzido 0,4 a 0,6 gL⁻¹ (HUANG *et al.*, 2016), de melaço de cana de açúcar foram produzidos 1,64 gL⁻¹ (ÇAKAR *et al.*, 2014) e 7,62 gL⁻¹ (BAE e SHODA, 2004). Manitol e sacarose também foram utilizados como fontes alternativas de carbono para a produção de CB, resultando valores de 1,9 e 1,6 gL⁻¹, respectivamente (MOHAMMADKAZEMI *et al.*, 2015). Outros açúcares, como sacarose e glicose geraram rendimentos de 2 e 3 gL⁻¹, respectivamente (CASTRO *et al.*, 2012).

4.2. MEV

As micrografias de MEV apresentadas na figura 6 mostram a morfologia da superfície das membranas de CB produzidas a partir dos diferentes meios de cultura. A análise realizada não mostrou diferenças na morfologia das nanofibras obtidas das diferentes fontes de carbono. Todas as amostras apresentaram a estrutura porosa em rede 3-D, característica da CB na qual as nanofibras têm cerca de 20-50 nm de diâmetro e são dispostas aleatoriamente.

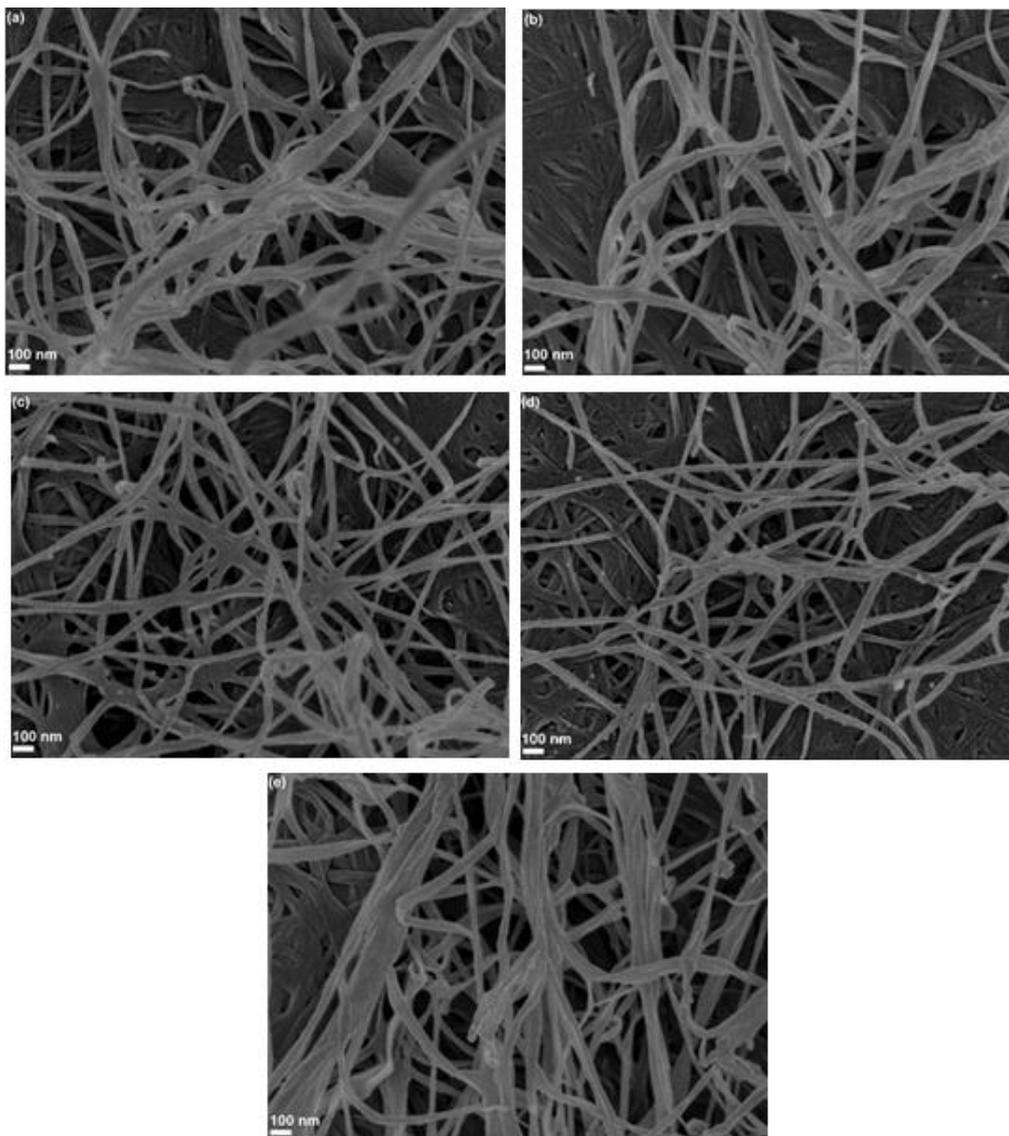


Figura 7 - Micrografias obtidas por MEV das amostras de membrana de CB com 7 dias de incubação em meio HS (a), HSGC (b), HSEC (c), GC (d) e EC (e) da barra de escala = 100 nm.

4.3. FTIR

A espectroscopia de FTIR de CB produzida em meio HS, HSGC, HSEC, EC, GC foi realizada para detectar qualquer possível efeito da composição dos diferentes meios de cultura sobre o perfil do espectro de celulose.

As bandas típicas de celulose foram observadas em 1102 e 1165 cm^{-1} correspondendo ao alongamento simétrico da ligação C-O de álcool primário, e

estiramento assimétrico da ligação C-O-C, respectivamente, e próximo de 3300 cm^{-1} (banda larga) correspondente ao estiramento do OH. A banda a 1340 cm^{-1} foi atribuída à deformação C-H (CH_3 ou O-H em flexão plana) e a banda a 1400 cm^{-1} foi relacionada à deformação do CH_2 e OH em flexão plana. Outras bandas foram atribuídas à flexão de O-H de água adsorvida (1645 cm^{-1}), estiramento CH dos grupos CH_2 e CH_3 (a 2900 cm^{-1}) também podem ser vistas.

Os espectros de FTIR das amostras (figura 7) demonstraram alta similaridade, sugerindo que as amostras têm estrutura química semelhante, indicando o não comprometimento da estrutura química CB obtida a partir de uma composição diferente de meio de cultivo.

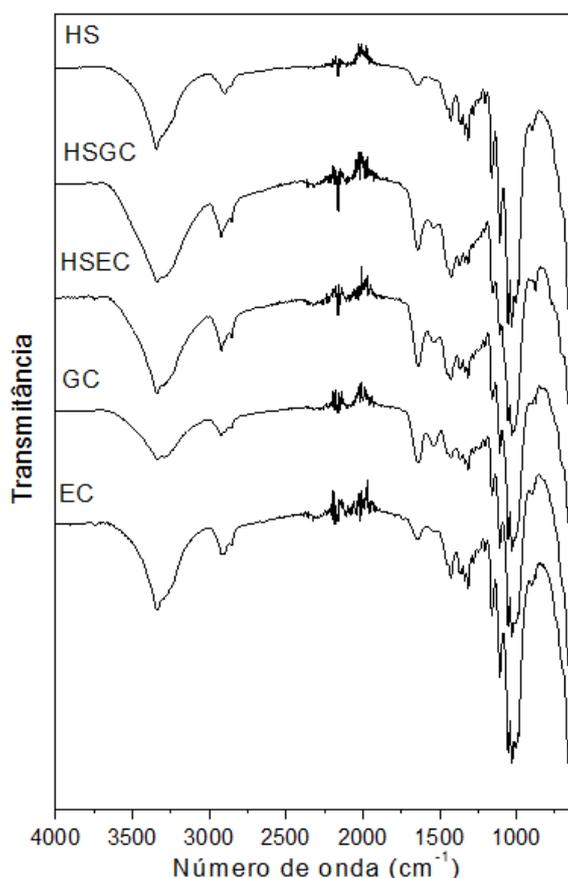


Figura 8 - Espectro de FTIR das membranas de CB obtidas nos meios HS, HSGC, HSEC, GC e EC em 7 dias de incubação.

4.4. Curvas TG

A figura 8 mostra as curvas TG das membranas de CB obtidas nos meios HS, HSGC, HSEC, GC e EC em 7 dias de incubação. Todas as amostras mostraram um comportamento térmico semelhante. Duas perdas de massa características foram observadas para as membranas. A primeira, uma pequena perda de massa começando em temperatura ambiente até 180 °C relacionada à perda de água superficial (~ 3,9 - 9,10 %) (DE SALVI *et al.*, 2012).

O segundo evento de perda de massa foi atribuído ao processo de decomposição da amostra entre 200 e 400 °C, com a temperatura máxima de decomposição em torno de 345 - 364 °C (71 – 82 %). A degradação da celulose inclui a despolimerização, desidratação e decomposição de unidades de glicose (BARUD *et al.*, 2008). Além disso, a similaridade das amostras frente a análise térmica é concordante com os resultados obtidos nas análises morfológicas e química (MEV e FTIR, respectivamente), indicando que mesmo utilizando diferentes meios para obtenção das membranas de CB, as propriedades das mesmas são muito similares a CB obtida em meio HS.

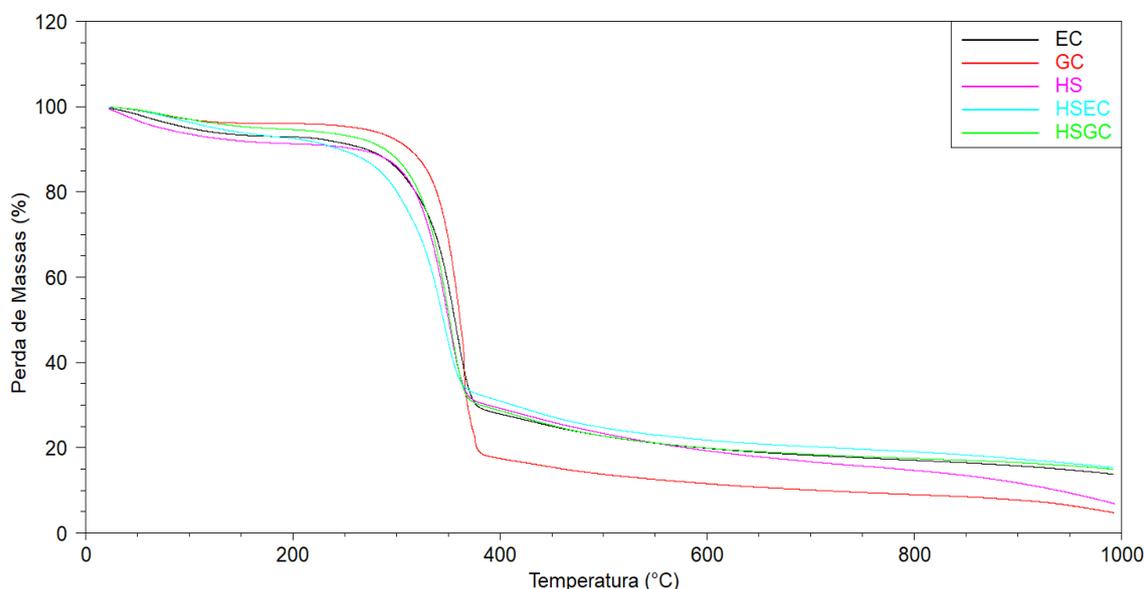


Figura 9 - Curvas TG das amostras de CB obtidas nos meios HS, HSGC, HSEC, GC e EC, após 7 dias de incubação.

4.5. DRX

Os difratogramas de raio X das CB produzidas em meio HS e HSEC (que foram escolhidas por apresentar maior rendimento de produção) estão ilustrados na figura 9. Picos característicos em ângulos 2θ de $14,8^\circ$, $16,7^\circ$ e 22° foram observados e relacionados aos planos $(1\bar{1}0)$, (110) e (200) , respectivamente. Além disso, picos de difração a $22,76^\circ$ e $22,80^\circ$ foram detectados e são atribuídos ao espaçamento interplanar característico da celulose nativa tipo I (KIM *et al.*, 2006).

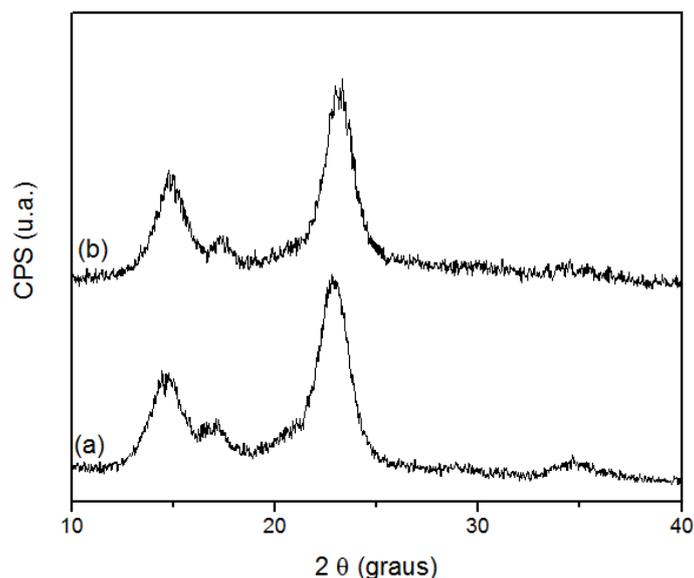


Figura 10 - DRX das membranas de CB: (a) CB e obtida no meio HS; (b) CB obtida no meio HSEC, depois de 7 dias de incubação.

Na equação de Segal, Crl expressa o grau relativo de cristalinidade, I_{002} é a intensidade máxima (em unidades arbitrárias) da difração de rede 002 e I_{am} é a intensidade de difração nas mesmas unidades em ângulo 2θ $22,76^\circ$. O valor de Crl foi de cerca de 78 e 80 % para HS e HSCTE, respectivamente. Estes valores são semelhantes aos relatados na literatura, e mostram que o resíduo alterou em apenas 2 % a cristalinidade das membranas (TROVATTI *et al.*, 2011, WU e LIU, 2013, LI *et al.*, 2015).

4.6. Avaliação das propriedades mecânicas por texturômetro

A tabela 3 apresenta as propriedades mecânicas (R_p , A_p , E_p e módulo na perfuração) das membranas CB produzidas tanto em meio HS como HSEC, o meio de cultivo de maior produção.

As propriedades mecânicas das membranas a partir do meio HS foram superiores às obtidas a partir do meio HSEC, no entanto, ambas as amostras apresentaram valores elevados de R_p e módulo na perfuração. Estes resultados não podem ser diretamente comparados com as propriedades mecânicas encontradas na literatura pois foram obtidos utilizando o modo de perfuração, enquanto que na maioria das publicações, os resultados são obtidos em modo de tensão. Contudo, o alto desempenho mecânico de CB permaneceu interessante e os valores de R_p para ambas as amostras estão na mesma faixa da resistência à tração presente na literatura obtida em tensão (BARUD *et al.*, 2011; PEROTTI *et al.*, 2011).

Tabela 3 - Propriedades mecânicas das membranas de CB cultivadas em meio de cultivo HS e HSEC.

Meio de cultura	R_p (MPa)	A_p (%)	E_p ($\times 10^{-4}$ kJ m ⁻³)	Módulo na perfuração (GPa)
HS	268,12 \pm 35,46	32,91 \pm 7,22	16,41 \pm 6,23	8,02 \pm 2,16
HSEC	144,86 \pm 44,90	39,69 \pm 8,74	5,16 \pm 1,48	4,04 \pm 1,81

O método usado para determinar as propriedades mecânicas das membranas CB exibiu valores de A_p no modo de perfuração bastante diferentes das propriedades determinadas no modo de tensão. No modo de tensão, o alongamento à ruptura é normalmente inferior a 5 % (RANI *et al.*, 2011, KHATTAK *et al.*, 2015), enquanto que no modo de perfuração foi cerca de 30 – 40 %. As propriedades descritas, sugerem o uso de membranas CB para aplicações nas quais serão expostas a forças de deformação.

Embora as diferenças entre os valores de R_p para as membranas produzidas no HS e no meio HSEC suplementado, ambos os substratos foram

eficientemente utilizados para a produção de CB, sugerindo que o meio de exsudado de cajueiro é uma fonte de carbono alternativa e promissora para a produção de CB.

5. CONCLUSÃO

Os resultados de MEV, FTIR, DRX, TGA e análise mecânica mostraram, em geral, que o exsudato de caju e a goma de caju têm grande potencial para serem utilizados como fonte de carbono para *K. rhaeticus* produzir CB. Adicionalmente, a morfologia e as propriedades das fibras produzidas por resíduos de cajueiro estavam de acordo com as obtidas a partir dos meios de cultura convencionalmente utilizados. Desta forma, a grande vantagem consiste em baratear o meio utilizado usando resíduos agroindustriais como GC e EC obtendo membranas com as mesmas características.

6. REFERÊNCIAS

BAE, S.; SHODA, M. Bacterial cellulose production by fed-batch fermentation in molasses medium. **Biotechnology Progress**, v. 20(5), pp.1366–1371, 2004.

BARUD, H. S.; JÚNIOR, A. M. A.; SANTOS, D. B.; ASSUNÇÃO, R. M. N.; MEIRELES, C. S.; CERQUEIRA, D. A.; FILHO, G. R.; RIBEIRO, C. A.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Thermal behavior of cellulose acetate produced from homogeneous acetylation of bacterial cellulose, **Thermochimica Acta**, v. 471 (1–2), pp.61-69, 2008.

BARUD, H. S.; REGIANI, T.; MARQUES, R. F. C.; LUSTRI, W. R.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Antimicrobial bacterial cellulose-silver nanoparticles composite membranes. **Journal of Nanomaterials**, v. 2011, pp.1–8, 2011.

CACICEDO, M. L.; CASTRO, M. C.; SERVETAS, I.; BOSNEA, L.; BOURA, K.; TSAFRAKIDOU, P.; DIMA, A.; TERPOU, A.; KOUTINAS, A.; CASTRO, G. R.

Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications. **Bioresource Technology**, v. 213, pp.172–180, 2016.

ÇAKAR, F.; KATI, A.; ÖZER, I.; DEMIRBAĞ, D. D.; ŞAHİN, F.; AYTEKİN, Ö. A. Newly developed medium and strategy for bacterial cellulose production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 92 (15), pp.35–40, 2014.

CARREIRA, P.; MENDES, J. A. S.; TROVATTI, E.; SERAFIM, L. S.; FREIRE, C. S. R.; SILVESTRE, A. J. D.; NETO, C. P. Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. **Bioresource Technology**, v. 102, pp.7354–7360, 2011.

CASTRO, C.; ZULUAGA, R.; ÁLVAREZ, C.; PUTAUX, J-L.; CARO, G.; ROJAS, O. J.; MONDRAGON, I.; GAÑÁN, P. Bacterial cellulose produced by a new acid-resistant strain of *Gluconacetobacter* genus. **Carbohydrate Polymers**, v. 89 (4), pp.1033–1037, 2012.

COSTA, S. M. O.; RODRIGUES, J. F.; PAULA, R. C. M. Monitorização do processo de purificação de gomas naturais: Goma do cajueiro. **Polímeros**, v. 2, pp.49–55, 1996.

DE SALVI, D. T. B.; BARUD, H. S.; CAIUT, J. M. A.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Self-supported bacterial cellulose/boehmite organic–inorganic hybrid films. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 63 (2), pp.211–218, 2012.

HESTRIN, S.; SCHRAMM, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. **Biochemical Journal**, v. 58(2), pp. 345–352, 1954.

HONG, F.; QIU, K. An alternative carbon source from konjac powder for enhancing production of bacterial cellulose in static cultures by a model strain

Acetobacter aceti subsp. xylinus ATCC 23770. **Carbohydrate Polymers**, v. 72(3), pp.545–549, 2008.

HUANG, C.; GUO, H-J.; XIONG, L.; WANG, V B.; SHI, S-L.; CHEN, X-F.; LIN, X-Q.; WANG, C.; LUO, J.; CHEN, X-D. Using wastewater after lipid fermentation as substrate for bacterial cellulose production by Gluconacetobacter xylinus. **Carbohydrate Polymers**, v. 136 (20), pp.198–202, 2016.

ISHIHARA, M.; MATSUNAGA, M.; HAYASHI, N.; TIŠLER, V. Utilization of D-xylose as carbon source for production of bacterial cellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31 (7), pp.986–991, 2002.

JOYE, I. J.; MCCLEMENTS, D. J. Biopolymer-based delivery systems: challenges and opportunities. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 16 (9), pp.1026–1039, 2016.

KESHK, S. M. A. S.; RAZEK, T. M. A.; SAMESHIMA, K. Bacterial Cellulose Production from Beet Molasses. **African Journal of Biotechnology**, v. 5(17), pp.1519–1523, 2006.

KESHK, S. M. A. S.; SAMESHIMA, K. Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production. **African Journal of Biotechnology**, v. 4 (6), pp.478–482, 2005.

KHATTAK, W. A.; KHAN, T.; UL-ISLAM, M.; WAHID, F.; PARK, J. K. Production, characterization and physico-mechanical properties of bacterial cellulose from industrial wastes. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 23 (1), pp.45–53, 2015.

KIM, S.Y.; KIM, J. N.; WEE, Y. J.; PARK, D. H.; RYU, H. W. Production of bacterial cellulose by Gluconacetobacter sp. RKY5 isolated from persimmon vinegar. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 131(1-3), pp.705–715, 2006.

LAZARINI, S. C.; AQUINO, R.; AMARAL, A. C.; CORBI, F. C. A.; CORBI, P. P.; BARUD, H. S.; LUSTRI, W. R. Characterization of bilayer bacterial cellulose membranes with different fiber densities: a promising system for controlled release of the antibiotic ceftriaxone. **Cellulose**, v. 23 (1), pp.737–748, 2016.

LI, Z.; WANG, L.; HUA, J.; JIA, S.; ZHANG, J.; LIU, H. Production of nano bacterial cellulose from waste water of candied jujube-processing industry using *Acetobacter xylinum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 120 (20), pp.115–119, 2015.

MENESTRINA, J.; IACOMINI, M.; JONES, C.; GORIN, P. A. J. Similarity of monosaccharide, oligosaccharide and polysaccharide structures in gum exudate of *Anacardium occidentale*. **Phytochemistry**, v. 47 (5), pp.715–721, 1998.

MOHAMMADKAZEMI, F.; AZIN, M.; ASHORI, A. Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media. **Carbohydrate Polymers**, v. 117 (6), pp.518–523, 2015.

NORO, N.; SUGANO, Y.; SHODA, M. Utilization of the buffering capacity of corn steep liquor in bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 64 (2), pp.199–205, 2004.

DE OLIVEIRA BARUD, H. G.; BARUD, H. S.; CAVICCHIOLI, M.; AMARAL, T. S.; OLIVEIRA JUNIOR, O. B.; SANTOS, D. M.; PETERSEN, A. L. O. A.; CELES, F.; BORGES, V. M.; OLIVEIRA, C. I.; OLIVEIRA, P. F.; FURTADO, R. A.; TAVARES, D. C.; RIBEIRO, S. J. L. Preparation and characterization of a bacterial cellulose/silk fibroin sponge scaffold for tissue regeneration. **Carbohydrate Polymers**, v.128 (5), pp.41–51, 2015.

PEREIRA-NETTO A. B.; PETTOLINO, F.; CRUZ-SILVA, C. T. A.; SIMAS, F. F.; BACIC, A.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.; IACOMINI, M.; MAURER, J. B. B. Cashew-nut tree exudate gum: Identification of an arabinogalactan-protein as a constituent of the gum and use on the stimulation of somatic embryogenesis. **Plant Science**, v. 173 (4), pp.468–477, 2007.

PEROTTI, G. F.; BARUD, H. S.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L.; CONSTANTINO, V. R. L. Bacterial cellulose–laponite clay nanocomposites. **Polymer**, v. 52 (1), pp.157–163, 2011.

RANI, M. U.; UDAYASANKAR, K.; ANU APPAIAH K. A. Properties of Bacterial Cellulose Produced in Grape Medium by Native Isolate *Gluconacetobacter* Sp. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 120 (5), pp. 2835–2841, 2011.

RODRIGUES, J. F.; DE PAULA, R. C. M.; COSTA, S. M. O. Métodos de isolamento de gomas naturais: Comparação através da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L). **Polímeros**, v.1, pp.31–36, 1993.

SEGAL, L.; CREELY, J.; MARTIN A.; C.M. CONRAD. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. **Textile Research Journal**, v. 29 (10), pp.786–794, 1959.

SILVA, T. M.; SANTIAGO, P.O.; PURCENA, L. L. A.; FERNANDES, K. F. Study of the cashew gum polysaccharide for the horseradish peroxidase immobilization – Structural characteristics, stability and recovery. **Materials Science and Engineering: C**, v. 30 (4), pp.526–530, 2010.

TROVATTI, E.; SILVA, N. H. C. S.; DUARTE, I. F.; ROSADO, C. F.; ALMEIDA, I. F.; COSTA, P.; FREIRE, C. S. R.; SILVESTRE, A. J. D.; NETO, C. P. Biocellulose Membranes as Supports for Dermal Release of Lidocaine. **Biomacromolecules**, v.12 (11), pp.4162–4168, 2011.

TYAGI, N.; SURESH, S. Production of cellulose from sugarcane molasses using *Gluconacetobacter intermedius* SNT-1: optimization & characterization. **Journal of Cleaner Production**, v. 112 (1), pp.71–80, 2016.

WANG B, YANG W, MCKITTRICK J.; MEYERS, M. A. Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. **Progress in Materials Science**, v. 76, pp.229–318, 2016.

WU, J-M.; LIU, R. H. Cost-effective production of bacterial cellulose in static cultures using distillery wastewater. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 115 (3), pp.284–290, 2013.

WU, J-M.; LIU, R. H. Thin stillage supplementation greatly enhances bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 90 (1), pp.116–121, 2012.

CAPÍTULO 4
DESENVOLVIMENTO E
CARACTERIZAÇÃO DE
NANOCOMPÓSITOS DE
CELULOSE
BACTERIANA/PALIGORSQUITA
COMO ESTRATÉGIA PARA
ADMINISTRAÇÃO DO AGENTE
ANTIMICROBIANO
METRONIDAZOL (MTZ)

1. INTRODUÇÃO

Grande parte dos biomateriais aplicados ao delineamento de novos sistemas de liberação controlada de fármacos são de origem polimérica, atribuindo aos sistemas propriedades desejáveis para o efetivo controle das taxas de liberação, o qual geralmente ocorre através de diferentes mecanismos, tais como difusão, intumescimento e/ou erosão. (LIM *et al.*, 2014; SVAGAN *et al.*, 2007).

Contudo, uma marcada desvantagem da utilização dos polímeros para o delineamento destes sistemas é sua pequena área de superfície específica, a qual está intimamente relacionada à capacidade de incorporação (ou associação) limitada de fármacos, tornando-o muitas vezes inviável para aqueles casos em que elevadas doses de princípio ativo são requeridos para a garantia do efeito terapêutico.

Tendo em vista a expansão do escopo das aplicações CB, sua estrutura altamente porosa, abundantes grupos hidroxilas disponíveis somada a propriedades únicas, a torna adequada para combinação com diferentes nanoestruturas, permite que ela seja utilizada com sucesso como matriz para a preparação de novos nanocompósitos, permitindo a adsorção de diferentes espécies, tais como reforços e fármacos (HU *et al.*, 2014). Resumidamente, dá-se o nome de nanocompósitos aos materiais híbridos contendo como fase dispersa uma espécie com pelo menos uma das dimensões em escala nanométrica (1-100 nm), subclassificando-se como nanocompósitos poliméricos aqueles que possuem um polímero como matriz (MORAES, BOTAN e LONA, 2014)

Outra importante alternativa tecnológica é o emprego de materiais argilosos como reforço de nanocompósitos, os quais por apresentarem quase que frequentemente tamanho nanométrico, possuem elevada área superficial, auxiliando na incorporação de quantidades maiores de fármacos (KONG *et al.*, 2014). Quando se obtém nanocompósitos baseados em polímeros-argila, as propriedades de cada material isolado são agregadas, garantindo elevada estabilidade, bem como alta capacidade adsortiva (KONG *et al.*, 2009). Outras vantagens atribuídas são a redução da adsorção de água, o aumento das

propriedades mecânicas e reológicas, além do efetivo controle das taxas de liberação (RODRIGUES *et al.*, 2013). No caso do desenvolvimento de nanocompósitos com CB, de acordo com a literatura, os fármacos incorporados na CB pura apresentam um *burst* de liberação de cerca de 80 % nos primeiros 15 min de ensaio (MENEGUIN *et al.*, 2017), sendo assim, com a incorporação de argilas em sua estrutura, espera-se que as taxas de liberação do fármaco adicionado ocorram de maneira controlada.

Argilas são substâncias naturais compostas por argilominerais, os quais compreendem uma classe de substâncias compostas por silicatos hidratados de alumínio, ferro ou magnésio, cuja estrutura básica consiste um octaedro em combinação com sílica tetraédrica (SiO_4), arranjados para formarem camadas tetraédricas e octaédricas (AGUIAR, NOVAES e GUARINO, 2002). Dentre os argilominerais mais utilizados na área farmacêutica, cita-se as esmectitas, caulinita, talco e a paligorsquita (PLG).

A PLG é uma argila natural hidrofílica especialmente disponível no Brasil na região de Guadalupe, no Estado do Piauí. O diagrama esquemático dos canais da paligorsquita está representada na figura 10, e é possível observar que é um silicato de magnésio hidratado. Tem morfologia fibrosa com estrutura cristalina 2:1, *i.e.*, 2 camadas de tetraedros de sílica periodicamente invertidos ligadas por 1 camada octaédrica, o que leva a formação de canais que acompanham toda a estrutura longitudinal da fibra (LÓPEZ-GALINDO, VISERAS e CEREZO, 2007).

Segundo Santana e colaboradores (2017), a interação da paligorsquita com biopolímeros se dá através da formação de ligações de hidrogênio a partir dos grupos silanois (Si-OH) na superfície da argila, conferindo ao nanocompósito obtido propriedades únicas como melhores propriedades mecânicas, podem permitir o efetivo controle das taxas de liberação.

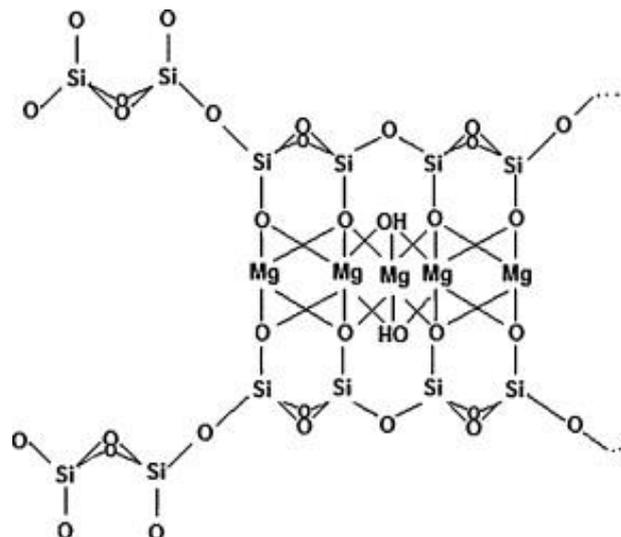


Figura 11 - Diagrama esquemático dos canais da paligorsquita.

Fonte – MIDDEA *et al.*, 2013.

O metronidazol (MTZ) é um agente antimicrobiano que tem sido utilizado por mais de 50 anos. Originalmente, era indicado no tratamento de infecção causada por *Trichomonas vaginalis* e para infecções protozoárias, como de amebíase e de giardíase. Mais tarde, o metronidazol foi introduzido no tratamento da vaginose bacteriana causada por *Gardnerella vaginalis*, ademais, para o tratamento de *Clostridium difficile*, sendo ainda recomendado como alternativa à vancomicina para o tratamento desta infecção. Além disso, nos regimes de tratamento para a erradicação de *Helicobacter pylori* ainda incluem metronidazol em combinação com outros agentes (LÖFMARK *et al.*, 2010).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral:

Desenvolver e caracterizar nanocompósitos de celulose bacteriana/paligorsquita como estratégia para administração tópica do agente antimicrobiano metronidazol.

2.2. Objetivos Específicos:

- Obter os nanocompósitos de CB/PLG;
- Caracterizar a morfologia, a cristalinidade, a permeabilidade ao vapor d'água, o perfil termogravimétrico e as propriedades mecânicas dos nanocompósitos CB/PLG.
- Avaliar a liberação *in vitro* do MTZ a partir dos nanocompósitos CB/PLG.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Paligorsquita foi coletada na região de Guadalupe, PI, Brasil; D-glicopirranose, etanol, ácido cítrico, fosfato de potássio monobásico, fosfato de sódio, sulfato de magnésio (Synth); peptona, ágar e extrato de levedura (Merck), metronidazol (HenriFarm).

3.2. Obtenção das membranas de celulose bacteriana

As membranas foram obtidas conforme item 3.1 do capítulo 2.

3.3. Purificação da Paligorsquita

A paligorsquita foi gentilmente cedida pelo professor Edson Cavalcanti da Silva Filho do Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados da Universidade Federal do Piauí, e foi lavada com água purificada e seca por 2 dias a 30 °C. Em seguida foi dispersa em 400 mL de tampão acetato de sódio pH 5.0 sob agitação magnética até temperatura de estabilização a 50 °C para precipitação dos carbonatos. Foram adicionados 120 mL peróxido de hidrogênio (35 %) a fim de remover materiais orgânicos do interior dos poros. A suspensão de paligorsquita foi centrifugada em 3000 rpm por 5 min, lavada com água purificada e seca.

3.4. Obtenção do biocompósito celulose bacteriana / paligorsquita (CB/PLG)

Para incorporação da paligorsquita, primeiramente as membranas de CB úmidas foram pesadas (*M₀*) e, em seguida, foram prensadas manualmente entre folhas de papel absorvente até que as membranas atingissem uma massa final específica (*M_f*), padronizando desta maneira o volume de água removido. Posteriormente, essas membranas foram imersas em 4 mL da suspensão de PLG em diferentes concentrações (1, 5, 7, 10 e 15 %; m/v) por 5 min alterando o lado da membrana periodicamente até a absorção total do líquido. Os nanocompósitos CB/PLG foram secos em estufa com circulação forçada de ar à 38 °C e nomeados de acordo com a concentração de paligorsquita, CB/PLG1, CB/PLG5, CB/PLG7, CB/PLG10 e CB/PLG15.

3.5. Interação do MTZ com PLG e incorporação da membrana de CB

A PLG foi dispersa em 5 mL de solução aquosa de MTZ (10 mg/mL) em diferentes proporções (1:1, 7:1 e 15:1) sob agitação magnética de 750 rpm em 30 °C por 72 h. Posteriormente, as membranas foram imersas na suspensão de PLG/MTZ conforme a descrição do item 3.4.

3.6. MEV

Descrito no item 3.4 do capítulo 2.

3.7. DRX

Descrito no item 3.8 do capítulo 3.

3.8. Análise termogravimétrica TG/DTG

As curvas TG/DTG foram realizadas em um equipamento TA Instruments usando uma célula SDT Q600 com razão de aquecimento 10 °/min, de 25 a 500 °C, sob atmosfera de nitrogênio (fluxo contínuo de 50 mL/min) em cadinhos de alumina contendo aproximadamente 7 mg de amostra.

3.9. Permeabilidade ao vapor d'água (PVA)

A permeabilidade dos filmes ao vapor de água foi determinada gravimetricamente segundo procedimento proposto por Meneguín e colaboradores., (2017). Seções circulares dos filmes, cujas espessuras foram previamente determinadas e firmemente fixadas no topo de recipientes de vidro de 20 mL de capacidade, com abertura de 1,1 cm contendo 10 mL de água destilada (100 % de umidade relativa - UR). Amostras de filmes também foram fixadas em frascos vazios (sem água), como referência. Ambos os conjuntos foram precisamente pesados ($\pm 0,0001$ g) e colocados no interior de um dessecador contendo sílica gel (0 % UR). Em intervalos específicos de tempo (24, 48, 72, 96 e 120 h), o perfil de perda de massa foi obtido para cada amostra e PVA calculada através da seguinte equação 6:

$$PVA = \frac{TTVA \times x}{AP_0(RH_1 - RH_2)} \quad \text{Equação(6)}$$

em que TTVA é a taxa de transmissão de vapor d'água obtido da inclinação da curva massa versus tempo; x é a espessura do filme (mm); A é a área de superfície do filme exposta ao permeante (m²); P₀ é a pressão de vapor da água pura (3,159 kPa a 25 °C); (RH₁ - RH₂) é o gradiente de umidade relativa.

3.10. Determinação *in vitro* do perfil de liberação de MTZ nos nanocompósitos

3.10.1. Curvas analíticas do metronidazol obtidas por espectroscopia de absorção na região do Ultravioleta – Visível (UV – Vis)

Foram obtidas curvas analíticas de MTZ 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 0,625 µg/mL e 30 µg/mL. As leituras de MTZ foram realizadas em um espectrofotômetro de UV - Vis (Hewlett Packard, Mod. 8453, com HP UV-Visible ChemStation Software) com comprimento de onda fixo de 320 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.

3.10.2. Determinação “*in vitro*” do perfil de liberação do MTZ

Os ensaios de dissolução para a determinação *in vitro* do perfil de liberação do metronidazol foram realizados para as amostras de CB, CB/PLG1, CB/PLG7 e CB/PLG15. AS determinações foram realizadas no dissolutor Hanson SR8-Plus (Chastworth, EUA) 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 3 h à $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, utilizando aparato V (pás sobre discos), sob velocidade de agitação de 50 rpm com as membranas de CB contendo 50 mg de fármaco. Durante o ensaio, alíquotas de 2 mL foram coletadas em intervalos de tempo pré-estabelecidos, filtradas em membrana de acetato (0,22 µm), e em seguida repostos com o mesmo volume de meio a fim de manter as condições *sink* (*condição de infinita solubilidade*). A análise quantitativa do fármaco liberado foi realizada em espectrofotômetro UV-visível ($\lambda = 320 \text{ nm}$).

3.10.3. Análise dos mecanismos de liberação in vitro do MTZ

Os mecanismos envolvidos no processo de liberação do fármaco foram avaliados através dos dados de liberação obtidos na seção 3.9.3 quais foram tratados com diferentes modelos matemáticos (Baker–Londsdale, Primeira-Ordem, Higuchi, Hixson–Crowell, Korsmeyer-Peppas e Weibull).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. MEV

As diferenças morfológicas dos biocompósitos de CB/PLG foram investigadas por MEV. As micrografias estão exibidas nas figuras 11 e 12.

A análise das micrografias da CB revelou a rede tridimensional característica das nanofibras interpenetradas formando um sistema altamente poroso. As nanofibras de CB arranjadas randomicamente apresentaram diâmetro médio entre 30 e 73 nm.

A paligorsquita pode ser observada sob a superfície dos nanocompósitos CB/PLG como estruturas fibrosas características na forma de agulha (Santana et al., 2017) com diâmetro médio entre 25 e 90 nm. Além disso, foi observado que a paligorsquita revestiu a superfície da CB e este processo se mostrou dependente da concentração. Dessa maneira, a amostra CB/PLG1 apresentou um revestimento não homogêneo devido à menor quantidade de paligorsquita, revelando regiões falhas na superfície, nas quais é possível observar as nanofibras de CB. No entanto, o aumento da concentração de paligorsquita foi responsável pelo recobrimento mais uniforme, levando a formação de uma rede bastante emaranhada e densa, revelando a presença de alguns aglomerados de paligorsquita a partir do seu emprego em concentrações acima de 10 %.

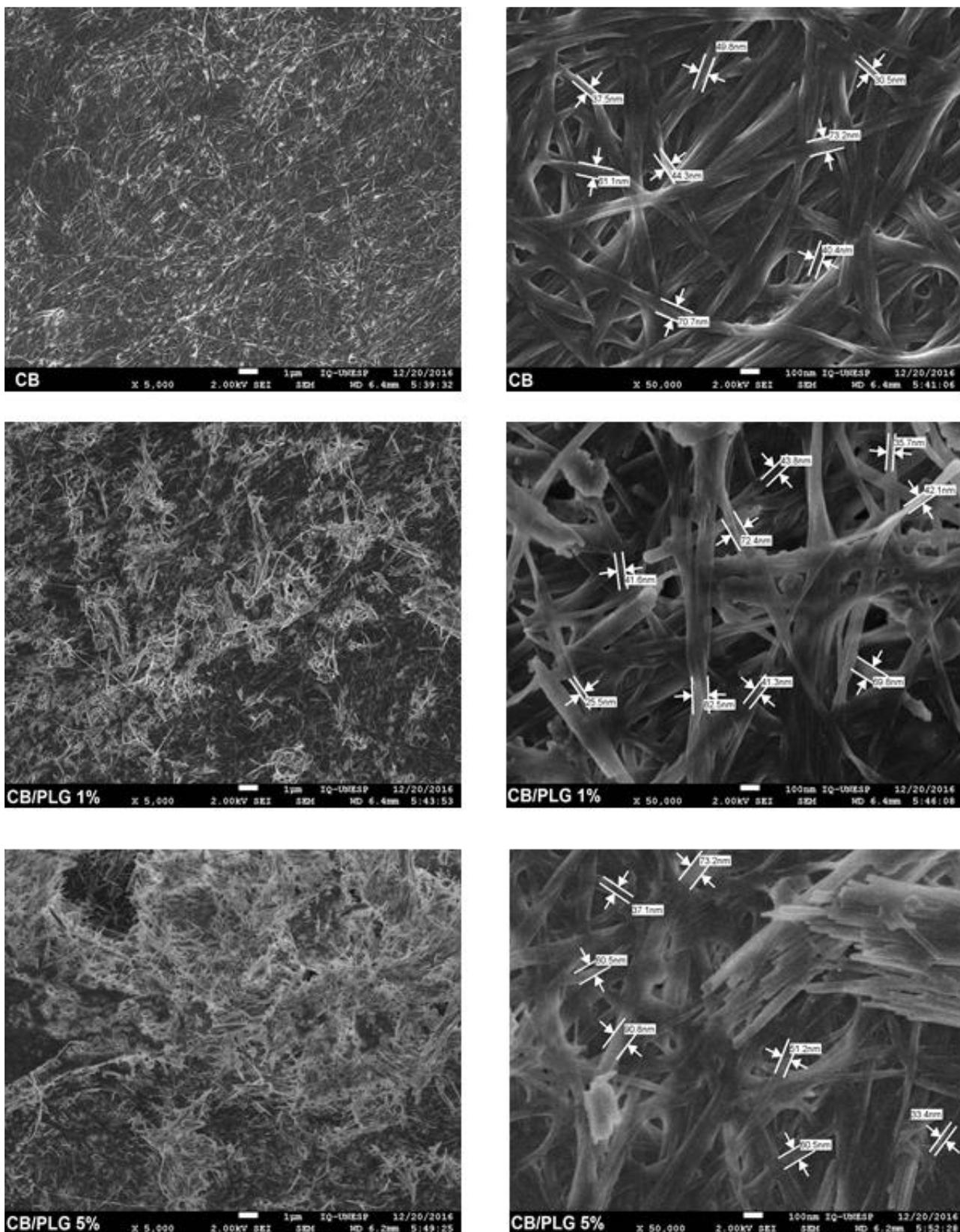


Figura 12- Micrografias obtidas por MEV das amostras de CB, CB/PLG1 e CB/PLG5 com aumentos de 5.000 e 50.000 da superfície.

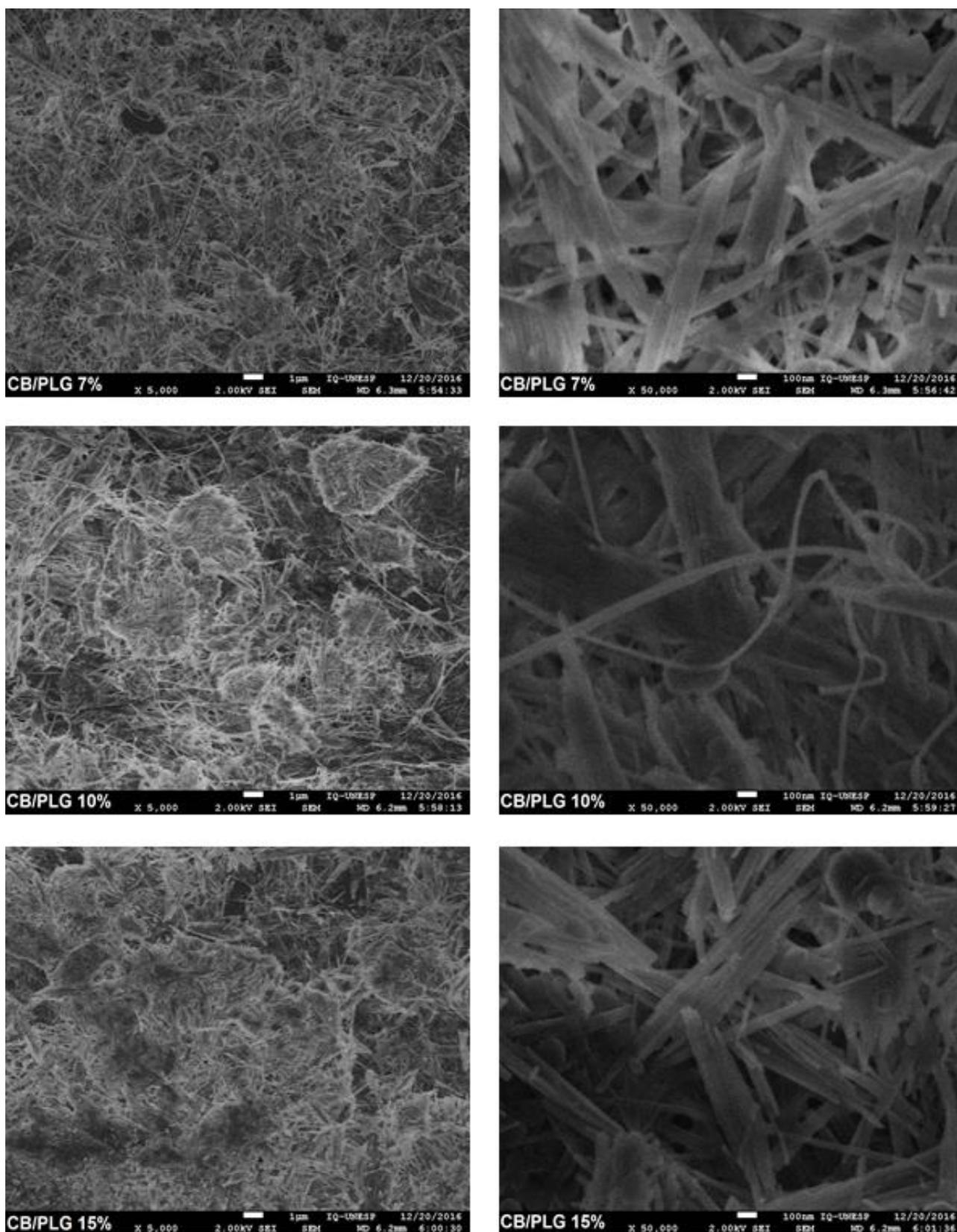


Figura 13 - Micrografias obtidas por MEV das amostras de CB/PLG7 e CB/PLG10 e CB/PLG15 com aumentos de 5.000 e 50.000 da superfície.

4.2. DRX

A figura 13 mostra os difratogramas da CB pura e de seus nanocompósitos com paligorsquita em diferentes cargas. Os difratogramas da CB pura são característicos da celulose nativa tipo I, apresentando picos em $14,6^\circ$ e $22,6^\circ$ (2θ), correspondentes às fases $I\alpha$ e $I\beta$, devido às sobreposições das reflexões dos planos $100_{I\alpha}$, $110_{I\beta}$ e $010_{I\alpha}$ em $14,6^\circ$ e dos planos $110_{I\alpha}$ e $200_{I\beta}$ em $22,6^\circ$ (BARUD *et al.*, 2015).

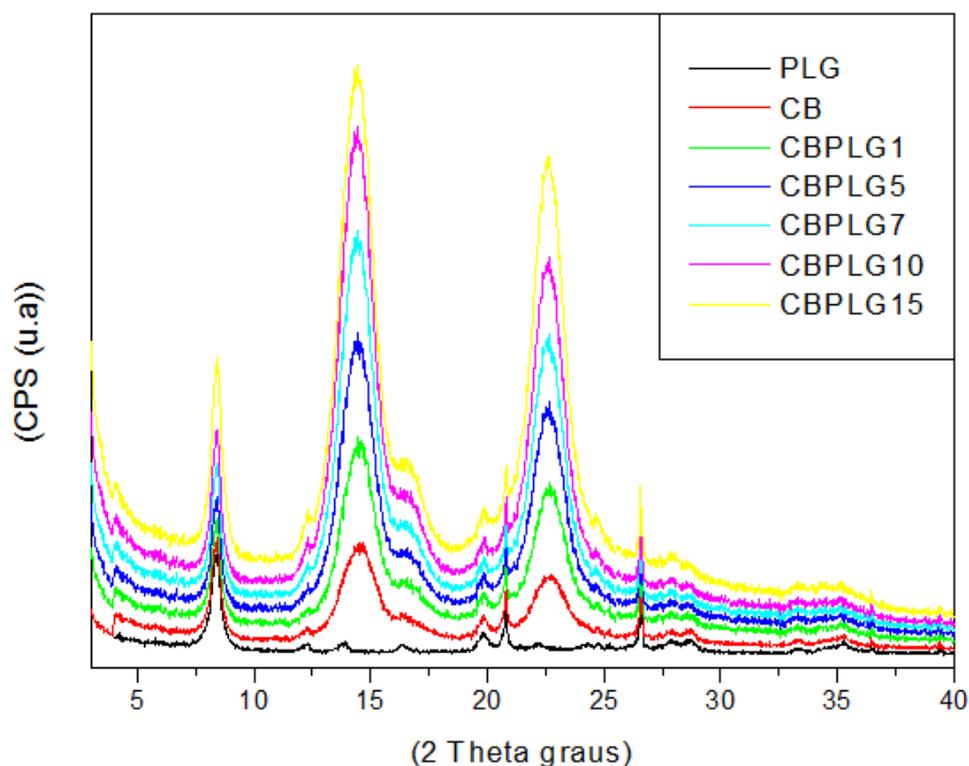


Figura 14 - Difratogramas de raios - X da CB pura e dos nanocompósitos CB/PLG.

Segundo a literatura, a paligorsquita apresenta um pico de maior intensidade em $8,5^\circ$ (2θ) relacionado à reflexão d (110), e outros picos de menor intensidade em $13,9^\circ$, $16,3^\circ$, $20,1^\circ$ e $28,9^\circ$ (SANTANA *et al.*, 2017; KONG *et al.*, 2014). No entanto, mediante uma comparação qualitativa, a incorporação da paligorsquita às membranas de CB não alterou as posições dos picos existentes.

Além disso, o difratograma da PLG apresentou picos cristalinos em 8,5°, 13,9°, 16,3°, 20,1° e 28,9°. Em relação aos nanocompósitos, verificou-se um aumento de cristalinidade, já que os picos característicos da CB foram mantidos, porém com surgimento de um novo pico em 8,5°, referente à presença de PLG.

Quantitativamente, a avaliação do índice de cristalinidade (Crl) (tabela 4) revelou que a PLG foi responsável pelo aumento da cristalinidade dos compósitos, variando entre 73 e 85 % em relação à CB (Crl de 70,6 %).

Tabela 4 - Índices de cristalinidade (Crl) calculados a partir da equação de Segal para a CB pura e biocompósitos CB/PLG.

Amostra	Crl (%)
CB pura	70,6
CB/PLG1	85,2
CB/PLG5	82,5
CB/PLG7	81,6
CB/PLG10	72,9
CB/PLG15	84,7

4.3. Análise termogravimétrica TG/DTG

O perfil das curvas TG/DTG dos biocompósitos CB/PLG estudados está apresentado na figura 14 e listados mais detalhadamente na tabela 5. De maneira geral, as amostras apresentaram comportamento bastante semelhante, com 2 perdas de massa nas amostras com até 7 % da argila. Todas amostras apresentaram um primeiro evento de discreta perda de massa, da ordem de 3 a 8 %, representado por um pequeno pico alargado observado na curva DTG entre 50 e 182 °C atribuído à perda de umidade (água) por evaporação durante o processo de aquecimento. O principal estágio de degradação dos nanocompósitos desenvolvidos foi observado entre 200 e 407°C, com temperatura de degradação máxima de 360 ± 10 °C e porcentagem de perda de massa entre 63 e 77 %, o qual está relacionado com a despolimerização e decomposição da dehidrocelulose em gases (BARUD *et al.*, 2015).

As amostras CB/PLG10 e CB/PLG15 apresentaram um pequeno pico com temperatura máxima em 260 °C (perda de massa de 2 %) que está relacionado à perda de H₂O do interior dos canais da argila, uma vez que o mineral contém água disposta de três formas distintas na sua estrutura: (a) coordenada a cátions da folha octaédrica, (b) zeolítica presente nos canais no qual interage tanto com a molécula de H₂O coordenada quanto com a folha tetraédrica e (c) água ligada à hidroxila no centro da folha octaédrica (GIONIS, 2006; XAVIER *et al.*, 2012).

Tabela 5 - Dados termogravimétricos de CB dos nanocompósitos CB/PLG.

Amostra	N.º de eventos	T_{inicial} (°C)	T_{max} degradação	T_{final} (°C)	Perda de Massa (%)
CB	1	25	-	182	8
	2	216	350	393	70
CB/PLG1	1	25	-	182	8
	2	200	360	407	77
CB/PLG5	1	25	-	169	3
	2	225	362	400	75
CB/PLG7	1	25	-	150	4
	2	233	360	400	70
CB/PLG10	1	25	-	150	5
	2	230	260	275	2
	3	284	360	400	63
CB/PLG15	1	25	-	150	4
	2	235	260	276	2
	3	283	362	400	65

Para os nanocompósitos CB/PLG, observa-se um aumento de 10°C na temperatura máxima de degradação do pico principal em comparação com a CB pura, indicando que a adição da paligorsquita foi responsável por um pequeno aumento na estabilidade térmica do nanocomposito. Esse aumento, pode ser explicado devido à propriedade da paligorsquita em restringir a mobilidade das cadeias, impedindo os rearranjos inter-intramoleculares e a despolimerização das cadeias da CB (CHENG *et al.*, 2011). Esse aumento na estabilidade térmica

pode ser explicado também, conforme descrito por Perotti e colaboradores 2011, citado por Oliveira e colaboradores 2015, em que a boa dispersão das partículas inorgânicas em filmes nanocompósitos devem promover uma barreira mecânica protetora contra a decomposição da cadeia do carbono, mudando o início do processo de decomposição para temperaturas superiores.

Por fim, pela análise de perda de massa (tabela 5) foi possível concluir que as amostras reforçadas com paligorsquita a partir de 10 % (CB/PLG10 e CB/PLG15) perderam menor quantidade de massa, sugerindo uma tendência ao aumento de estabilidade térmica com o aumento de reforço adicionado.

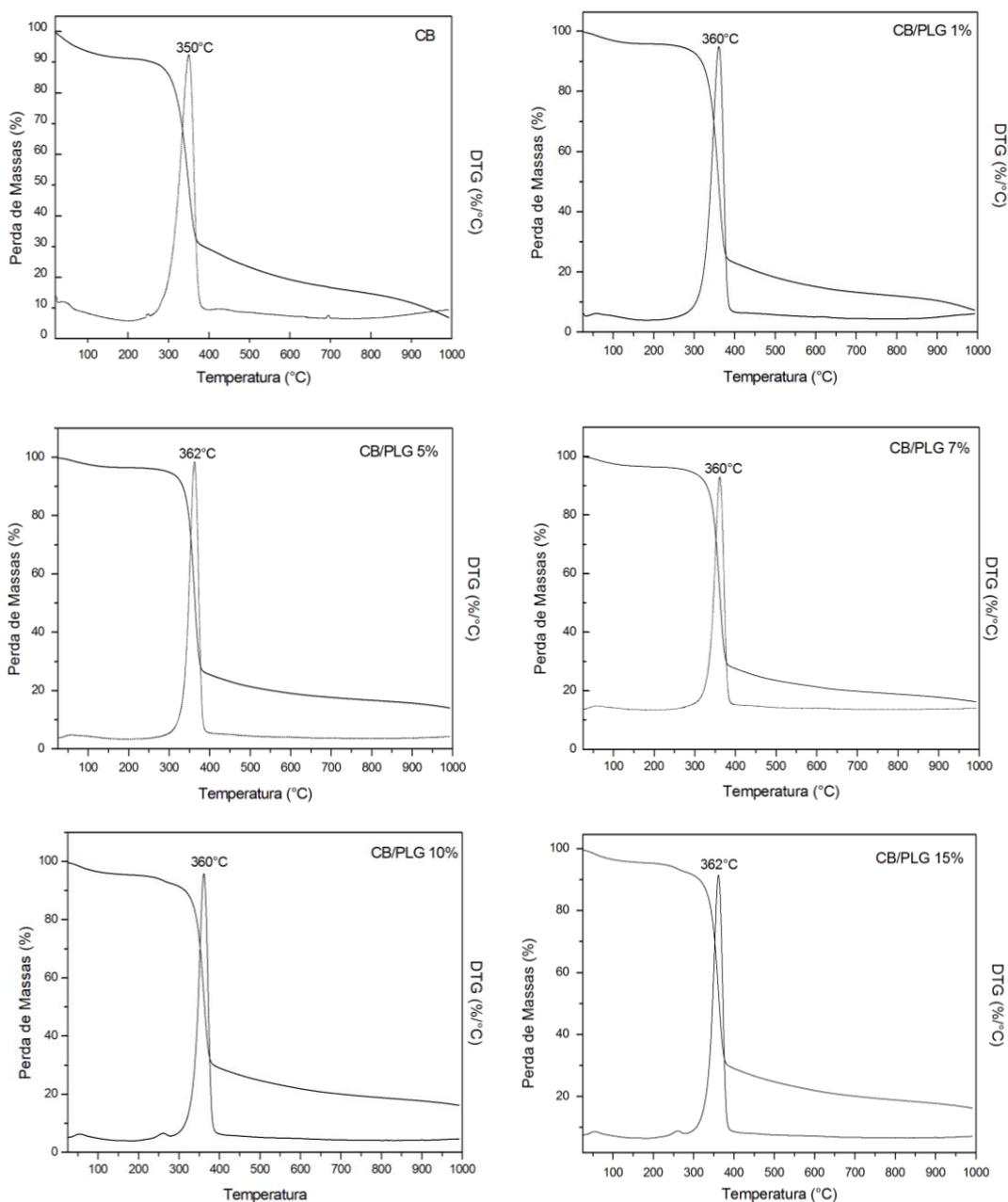


Figura 15 - Curvas TG/DTG para os nanocompósitos CB/PLG obtidos com diferentes cargas de paligorsquita.

4.4. PVA

A PVA pode ser definida como a TTVA por unidade de área através de uma membrana de espessura conhecida, induzida por um gradiente de pressão entre duas superfícies específicas, de umidade relativa e temperatura especificadas (ASTM, 1990). Frequentemente, a PVA é confundida com adsorção de água em massa, porém, esta corresponde à umidade na forma líquida, enquanto que o vapor de água é um gás, o que implica em diferenças nas quantidades que se movem, bem como nos mecanismos de movimentação.

O estudo de PVA também corrobora para o entendimento dos mecanismos de transferência e as interações matriz-reforço que podem ocorrer nos compósitos. Quando aplicado à área farmacêutica, é considerado ferramenta importante na verificação da proteção que um revestimento oferece à forma farmacêutica contra a umidade do ambiente durante sua estocagem (BERTUZZI *et al.*, 2007), a qual frequentemente está associada com a instabilidade daqueles fármacos que sofrem hidrólise.

A figura 15 mostra o gráfico do perfil da perda de massa dos biocompósitos CB/PLG (g), a partir do qual foi possível calcular as taxas de permeação de vapor de água (TPVA) (g/h), correspondentes à inclinação (*slope*) das retas. A TPVA se mostrou constante para todas as amostras, demonstrando uma relação linear entre perda de massa e tempo, com coeficiente de determinação R^2 variando entre 0,997 e 0,999. A linearidade do método proposto é sugestiva de que as condições pré-estabelecidas para a execução da metodologia foram mantidas durante todo o tempo de análise sem sofrer interferências de qualquer natureza.

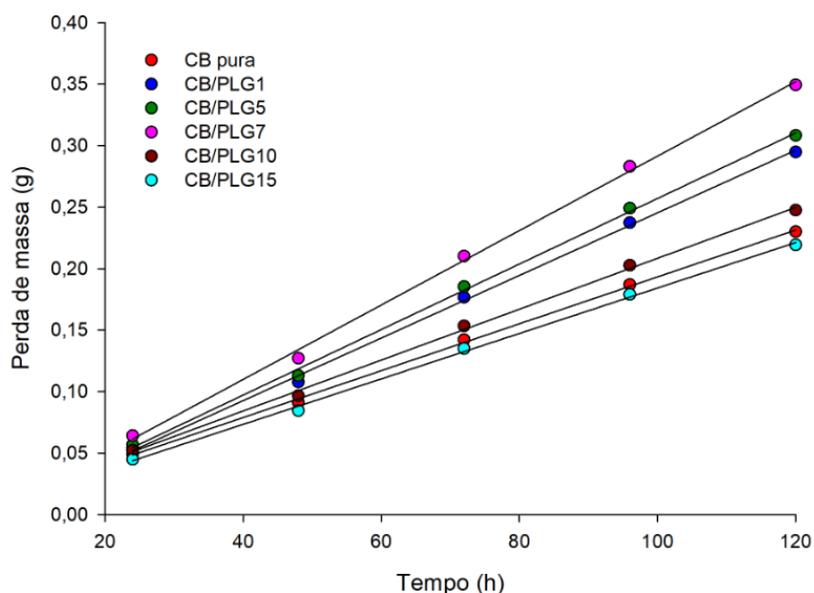


Figura 16 - Perfil de perda de massa dos biocompósitos CB/PLG obtidos durante 120 h de ensaio em 25 °C.

De maneira geral e sem exceção, a paligorsquita adicionada como carga aos biocompósitos baseados em CB foi capaz de reduzir significativamente os valores de PVA da CB ($p < 0,05$) em aproximadamente 24 a 45 % (figura 15), demonstrando sua elevada viabilidade técnica como ferramenta para o aumento das propriedades de barreira dos materiais. Tal comportamento pode ser explicado com base na formação de uma rede estrutural mais densa através do preenchimento dos espaços intersticiais vazios e, portanto, construção de uma barreira física que se opõe à difusão das moléculas de água.

Em compósitos baseados em polímero e argila, a construção dessa barreira física se dá de duas maneiras distintas, iniciando com a intercalação da argila entre as cadeias poliméricas devido ao seu tamanho nanométrico, o que leva à criação de canais tortuosos os quais aumentam significativamente o caminho difusional das moléculas durante a permeação. Em um segundo momento, há a deposição da argila sobre a superfície do material como uma barreira adicional à difusão. Obviamente que a extensão da redução dos valores de PVA são dependentes do tipo de argila, polímero, bem como da maneira como a argila interage com o polímero (fase separada, intercalada ou esfoliada) (DELHON *et al.*, 2010; NIELSEN, 1967).

De acordo com a figura 16, foi interessante observar que a adição de cargas maiores que 1 % de paligorsquita nos biocompósitos promoveram um pequeno aumento dos valores PVA; no entanto, estes ainda foram menores que aqueles encontrados para a CB pura. Tal comportamento sugere que, embora muitas vezes uma estrutura mais compactada seja construída, se o reforço apresentar características predominantemente hidrofílicas, o aumento de hidrofília total do sistema irá contribuir para o favorecimento da permeação do vapor de água. A medida em que não foram observadas diferenças significativas entre as amostras CB/PLG5, CB/PLG7, CB/PLG10 e CB/PLG15 ($p > 0,05$), sugere-se que pequenas quantidades desta argila (1 %) são suficientes para a elevação das propriedades de barreira dos biocompósitos.

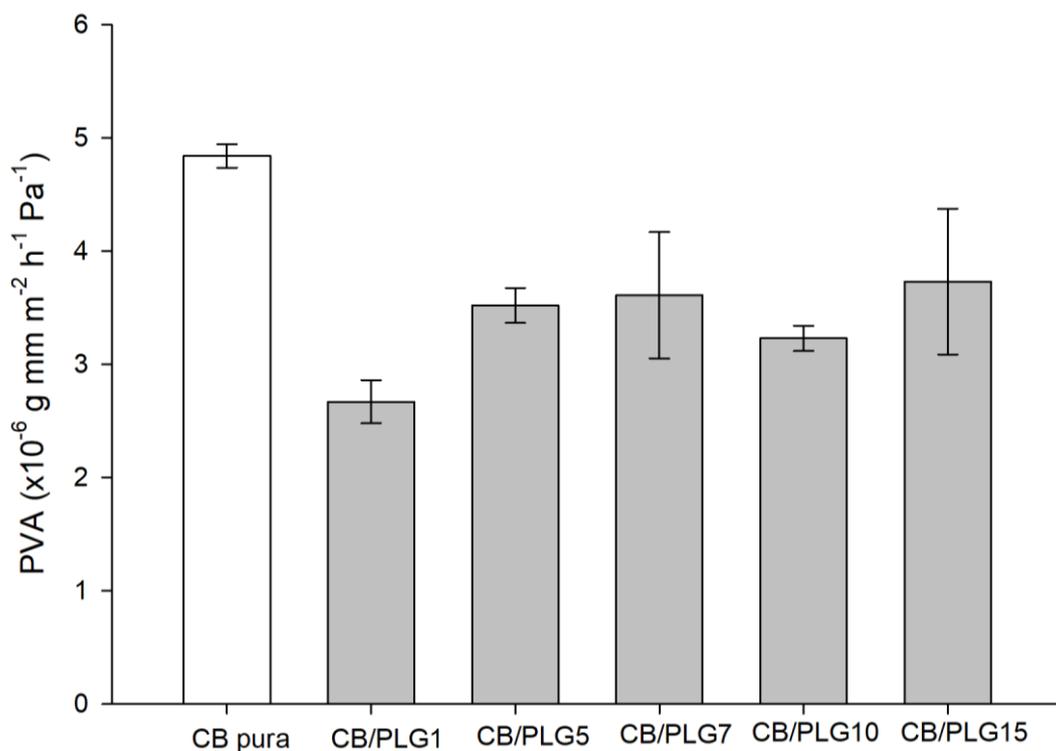


Figura 17- Permeabilidade ao vapor de água para nanocompósitos de CB/PLG.

4.5. Determinação *in vitro* do perfil de liberação de metronidazol nos nanocompósitos

Afim de verificar a influência da adição da PLG na CB na liberação do MTZ, os ensaios de dissolução foram realizados com a CB/fármaco e nos biocompósitos desenvolvidos nas concentrações de 1, 7 e 15 % de PLG, escolhidos com base nos valores mínimos, intermediário e máximo do argilo mineral e podem ser observados na figura 17. O perfil de liberação demonstrou que quando o MTZ é incorporado diretamente na membrana de CB (0 % de PLG) ocorreu um efeito *burst* de liberação (62 %) nos primeiros 30 min, que provavelmente é atribuído à alta porosidade da CB permitindo que as moléculas do fármaco adsorvidas, tenham livre difusão. Esse comportamento já foi descrito na literatura para outros fármacos por Meneguín *et al.*, (2017); Fontes *et al.*, (2018), o que torna necessário o desenvolvimento de estratégias que ofereçam o controle temporal da liberação. Após 180 min de experimento, 82 % do MTZ foi liberado.

As amostras CB/PLG1 e CB/PLG7 também não foram efetivas para o controle da liberação, mostrando similaridade com a amostra controle. Entretanto, a amostra preparada com a maior proporção de PLG (CB/PLG 15 %) permitiu o prolongamento das taxas de liberação, de modo que após 180 min de teste, apenas 60 % de MTZ foram liberados, permanecendo estáveis até o fim do teste, demonstrado pela região de platô no perfil de liberação.

Uma vez que a liberação cumulativa do fármaco pode ser calculada com relação à quantidade total de fármaco incorporado no sistema (M_0) e também com a quantidade de fármaco liberado no tempo infinito (M^∞), é importante ressaltar que a capacidade de liberação da carga total de fármaco foi avaliada através de um último ponto de coleta, conhecido como ponto infinito, garantindo a inexistência de interações mais fortes entre fármaco/argila que impossibilitem sua dessorção. Assim, pôde-se concluir que o aumento da concentração de PLG garantiu o controle das taxas de liberação associado à estrutura polimérica, conforme observado nas micrografias de MEV, em que o argilomineral fica retido em maior quantidade na superfície da membrana, deixando os espaços dos poros menores e/ou preenchidos. A PLG por ser uma argila com estrutura

fibrosa, forma canais de acordo com a organização de sua estrutura cristalina (SILVA *et al.*, 2016). Sendo assim, ocorre um aumento da sua área superficial favorecendo a ligação (catiônica) com o fármaco (AGUZZI *et al.*, 2007). Outras possibilidades são explicadas devido as moléculas de metronidazol poder estar orientada em direção paralela à superfície da argila, favorecendo a localização dos sítios de ligação e elevando a atração entre moléculas de metronidazol (HUSSEIN, 2005).

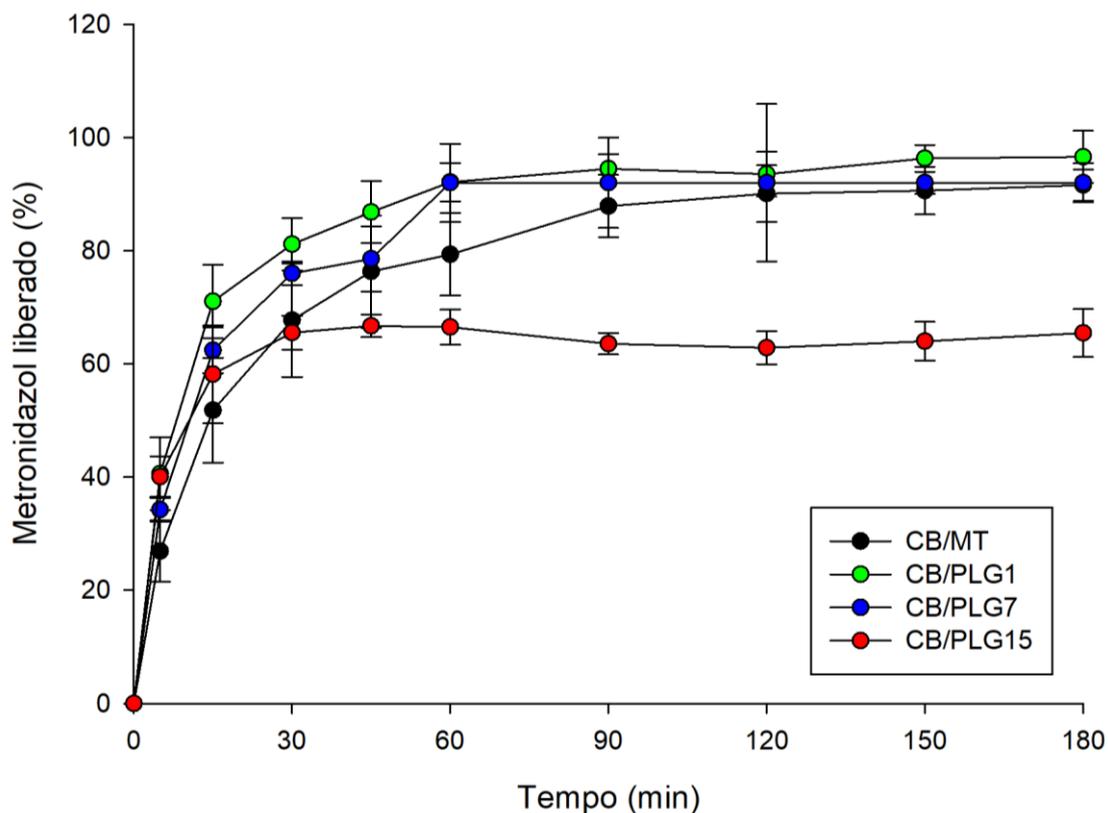


Figura 18 - Perfil de liberação de MTZ a partir da CB dos nanocompósitos de CB/PLG1, CB/PLG7 e CB/PLG15 em pH 5.8, de 0 a 180 min.

4.6. Análise dos mecanismos de liberação in vitro do MTZ

Os dados de liberação podem ser complementados com aplicação de modelos matemáticos, o que possibilita avaliar o mecanismo controlador da liberação, assim como os processos físicos e químicos envolvidos no processo (COSTA e LOBO, 2001). Independentemente do tipo de sistema de liberação desenvolvido, alguns fatores podem influenciar a cinética de liberação, como o tipo de fármaco, sua solubilidade, polimorfismo, tamanho de partícula e

concentração na forma farmacêutica (EL-ARINI e LEUEN-BERGER, 1995; SALOMON e DOELKER, 1980).

Baseado nos valores dos coeficientes de correlação ajustado (r^2) (tabela 6), verificou-se que as amostras CB/PLG15 em tampão fosfato 0,1M pH 5,8 se correlacionou melhor com o modelo de Weibull ($r^2 = 0,9938$). O modelo matemático de Weibull relaciona exponencialmente a fração do fármaco liberado, M_t/M_∞ , em função do tempo t (Eq. 7) e deve ser aplicado aos dados dos primeiros 63,2 % de liberação do fármaco (MANADAS *et al.*, 2002; COSTA e LOBO, 2001).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \exp(-at^b) \quad \text{Equação (7)}$$

Onde a é o parâmetro de escala e b é o parâmetro de forma.

De acordo com o parâmetro de forma (b), as curvas de liberação podem ser classificadas como sigmoidal ($b > 1$), exponencial ($b = 1$) e parábola ($b < 1$) (ARIFIN *et al.*, 2006; COSTA, LOBO, 2001). O valor de b também é um indicador do mecanismo de transporte do fármaco através da matriz polimérica, sendo que para valores de $b \leq 0,75$ a liberação ocorre através de difusão Fickiana. Quando $0,75 < b < 1$ têm-se difusão Fickiana associada ao Caso-II e para $b > 1$, um mecanismo de liberação complexo (PAPADOPOULOU *et al.*, 2006).

De acordo com o estudo cinético, o modelo matemático que melhor se correlacionou foi o de Weibull, com o parâmetro $0,75 < b < 1$ têm-se difusão Fickiana associada ao Caso-II, revelando que a liberação MTZ foi governada pelo mecanismo de intumescimento pelo relaxamento das cadeias poliméricas. Tal comportamento é coerente com as propriedades do material desenvolvido, uma vez que a CB é reconhecida como material de elevada absorção de líquidos, o que promove a expansão da rede (processo de intumescimento), conduzindo à difusão das moléculas de fármaco para o meio de dissolução, como indicado pelo modelo (ENSCORE, HOPFENBERG e STANNETT, 1977).

Tabela 6 - Coeficiente de correlação do MTZ liberada a partir do nanocomposito de CB/PLG15 obtidos através de diferentes modelos matemáticos para tampão fosfato (pH 5,8).

Modelo de Liberação	Amostra CB/PLG15
Baker- Lonsdale	<i>k</i> 0,0013
	<i>r</i> ² 0,281
Higuchi	<i>k</i> 6,6047
	<i>r</i> ² 0,0000
Korsmeyer-Peppas	<i>k</i> 43,4659
	<i>r</i> ² 0,9305
	<i>n</i> 0,0878
Primeira ordem	<i>k</i> 0,0188
	<i>r</i> ² 0,0000
Hixson- Crowell	<i>k</i> 0,0059
	<i>r</i> ² 0,0000
Weibull	<i>k</i> 64,99
	<i>r</i> ² 0,9938
	<i>b</i> 0,8439

5. CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos, foi possível concluir que a paligorsquita pode ser utilizada com sucesso para a obtenção de nanocompósitos baseados em celulose bacteriana, agregando novas propriedades estruturais, físico-químicas e de barreira a esses materiais. Além disso, na amostra CB/PLG15, foi eficiente para retardar a liberação do fármaco metronidazol.

6. REFERÊNCIAS

AGUIAR, M. R. M. P.; NOVAES, A. C.; GUARINO, A. W. S. Remoção de metais pesados de efluentes industriais por aluminossilicatos, **Química Nova**, v. 25, pp.1145-1154, 2002.

AGUZZI, P.; CERESO, C.; VISERAS, C.; CARAMELLA, C. Use of clays as drug delivery systems: Possibilities and limitations, **Applied Clay Science**, v. 36 (1–3), pp.22-36, 2007.

BERTUZZI, M. A.; VIDAURRE, E. F. C.; ARMADA, M.; GOTTIFREDI, J. C. Water vapor permeability of edible starch based films, **Journal of Food Engineering**, v. 80 (3), pp.972-978, 2007.

CHENG, L.; LIA, Z.; ZHANGA, Z. Poly(dimethylsiloxane)/palygorskite composites: preparation, characterization, and properties, **Polymers for Advanced Technologies**, vol. 22, p.2596–2601, 2010.

COSTA, P.; LOBO, J.M.S. Modeling and comparison of dissolution profile, **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.13, p.123–133, 2001.

DELHOM, C. D.; WHITE-GHOORAHOO, L. A.; PANG, S. S. Development and characterization of cellulose/clay nanocomposites, **Composites Part B: Engineering**, v. 41, pp.475–481, 2010.

EL-ARINI, S.K.; LEUENBERGER, H. Modeling of drug release from polymer matrices: effect of drug loading, **Internation Journal of Pharmaceutics**, v. 121, pp.141-148, 1995.

ENSCORE, D.J.; HOPFENBERG, H.B.; STANNETT, V.T. Effect of particle size on the mechanism controlling n-hexane sorption in glassy polystyrene microspheres, **Polymer**, v.18 (8), pp.793-800, 1977.

FONTES, M. L.; MENEGUIN, A. B.; TERCJAK, A.; GUTIERREZ, J.; CURY, B. S. F.; SANTOS, A. M.; RIBEIRO, S. J. L.; BARUD, H. S. Effect of in situ modification of bacterial cellulose with carboxymethylcellulose on its nano/microstructure and methotrexate release properties, **Carbohydrate Polymers**, v.179, pp.126-134, 2018.

GIONIS, V.; KACANDES, G.H.; KASTRITIS, I. D.; CHRYSSIKOS, G. D.. On the structure of palygorskite by mid- and near-infrared spectroscopy, **American Mineralogist**, v. 91 (7), pp.1125-1133, 2006.

HU, W.; CHEN, S.; YANG, J.; LI, Z.; WANG, H. Functionalized bacterial cellulose derivatives and nanocomposites, **Carbohydrate Polymers**, v. 101, pp.1043-1060, 2014.

HUSSEIN; H. K. A.; JALIL, W. A.; FADHEL, I. Efficacy of Attapulgite Clay as Adsorbent for Metronidazole Drug Overdose in vitro, **National Journal of Chemistry**, v. 20, pp.529- 539, 2005.

KONG, Y.; HANLI, G. E.; XIONG, J.; ZUO, S.; WEI, Y.; YAO, C.; DENG, L. Palygorskite polypyrrole nanocomposite: A new platform for electrically tunable drug delivery, **Applied Clay Science**, v. 99, pp.119–124, 2014.

KONG, Y.; YUAN, J.; WANG, Z.L.; YAO, S.P.; CHEN, Z.D. Application of expanded graphite/ attapulgite composite materials as electrode for treatment of textile wastewater, **Applied Clay Science**, v. 46, pp.358–362, 2009.

LIM, H. P.; TEY, B. T.; CHAN, E. S. Particle designs for the stabilization and controlled-delivery of protein drugs by biopolymers: A case study on insulin, **Journal of Controlled Release**, v. 186, pp.11–21, 2014.

LÖFMARK, S.; EDLUND, C.; NORD, C. E. Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections, **Clinical Infectious Diseases**, v. 50 (1), pp.16-23, 2010.

LÓPEZ-GALINDO, A.; VISERAS, C.; CEREZO, P. Compositional, technical and safety specifications of clays to be used as pharmaceutical and cosmetic products, **Applied Clay Science**, v. 36, pp.51–63, 2007.

MANADAS, R.; PINA, M., E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada, **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38 (4), pp.375-399, 2002.

MENEGUIN, A. B.; CURY, B. S. F.; DOS SANTOS, A. M.; FRANCO, D. F.; BARUD, H. S.; SILVA FILHO, E. C. Resistant starch/pectin free-standing films reinforced with nanocellulose intended for colonic methotrexate release, **Carbohydrate Polymers**, v. 157, pp.1013–1023, 2017.

MIDDEA, A.; FERNANDES, T. L. A. P.; NEUMANN, R.; GOMES, O. F. M.; SPINELLI, L. S. Evaluation of Fe(III) adsorption onto palygorskite surfaces, **Applied Surface Science**, v. 282, pp.253-258, 2013.

MORAES, S. B.; BOTAN, R.; LONA, L. M. F. Síntese e caracterização de nanocompósitos de poliestireno/hidroxissal lamelar, **Química Nova**, v. 37 (1), pp.18-21, 2014.

NIELSEN, L. E. Models for the permeability of filler polymer systems, **Journal of Macromolecular Science Chemistry A1**, pp. 929-942, 1967.

DE OLIVEIRA BARUD, H. G.; BARUD, H. S.; CAVICCHIOLI, M.; AMARAL, T. S.; OLIVEIRA JUNIOR, O. B.; SANTOS, DIEGO, M.; PETERSEN, A. L. O. A.; CELES, F.; BORGES, V. M.; OLIVEIRA, C. I.; OLIVEIRA, P. F.; FURTADO, R. A.; TAVARES, D. C.; RIBEIRO, S. J. L. Preparation and characterization of a bacterial cellulose/silk fibroin sponge scaffold for tissue regeneration, **Carbohydrate Polymers**, v.128, pp.41–51, 2015.

OLIVEIRA, R. L.; BARUD, H. S.; DE SALVI, D. T. B.; PEROTTI, G. F.; RIBEIRO, S. J. L.; CONSTANTINO, V. R. L. Transparent organic–inorganic nanocomposites membranes based on carboxymethylcellulose and synthetic clay, **Industrial Crops and Products**, v. 69, pp.415-423, 2015.

PAPADOPOULOU, V.; KOSMIDIS, K.; VLACHOU, M.; MASCHERAS, P. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 309, pp.44–50, 2006.

PEROTTI, G. F.; BARUD, H. S.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L.; CONSTANTINO, V. R. L. Bacterial cellulose-laponite clay nanocomposites, **Polymer**, v. 52 (1), pp.157–163, 2011.

RODRIGUES, L. A. D.; FIGUEIRAS, A.; VEIGA, F.; FREITAS, R. M.; NUNES, L. C. C.; SILVA FILHO, E. C.; LEITE, C. M. S. The systems containing clays and clay minerals from modified drug release: A review, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 103, p. 642– 651, 2013.

SALOMON, J.L.; DOELKER, E. Formulation des comprimés à libération prolongée, **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v.55, p.174-182, 1980.

SANTANA, A. C. S. G. V.; SOBRINHO, J. L. S.; SILVA FILHO, E. C.; NUNES, L. C. C. Obtaining the palygorskite:chitosan composite for modified release of 5-aminosalicylic acid, **Materials Science and Engineering: C**, v. 73, pp. 245-251, 2017.

SILVA, J. S.; VILARINHO, A. C. S. G.; BARUD, H. S.; SILVA FILHO, E. C.; NUNES, L. C. C. Utilização de argilas fibrosas e tubulares para a liberação modificadas de fármacos: uma revisão, **Revista Matéria**, v. 21(1), pp.204–212, 2016.

SVAGAN, A. J.; SAMIR, M. A. S. A.; BERGLUND, L. A. Biomimetic polysaccharide nanocomposites of high cellulose content and high toughness, **Biomacromolecules**, v. 8, pp.2556-2563, 2007.

XAVIER, K. C. M.; SILVA FILHO, E. C.; SANTOS, M. S. F.; SANTOS, M. R. M. C.; LUZ, A. B. Caracterização mineralógica, morfológica e de superfície da atapulgita de Guadalupe-PI, **Holos**, v. 5, 2012.

CAPÍTULO 5

**BIOCURATIVOS DE CELULOSE
BACTERIANA COM QUITOSANA E
CIPROFLOXACINO:
DESENVOLVIMENTO,
CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO
IN VIVO DA CICATRIZAÇÃO**

1. INTRODUÇÃO

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano, recobre toda a sua superfície e pode chegar a constituir 20% do peso corporal. É dividida em duas camadas distintas: a epiderme e a derme. A epiderme é a camada externa, composta por diferentes tipos celulares, como os queratinócitos, os melanócitos e as células de Langerhans e de Merkel (ARNOLD JUNIOR *et al.*, 1994). Entretanto, a pele pode sofrer lesões por meio da exposição de agentes químicos, físicos e biológicos de diversos tipos, formando o que se chama de feridas. Essas feridas podem comprometer a anatomia e fisiologia da pele, sendo necessários cuidados específicos para que não haja um maior comprometimento do organismo. A partir do momento que surge uma ferida, o organismo funcionaliza uma série de mecanismos fisiológicos que tem por finalidade a reparação tecidual, processo este conhecido como cicatrização (AGREDA, 2012).

A cicatrização de feridas cutâneas envolve caminhos complexos que empregam numerosas linhagens celulares, tecidos e mediadores intrínsecos e extrínsecos. O processo cicatricial de uma ferida envolve etapas gerais como a hemostasia, a inflamação, proliferação e remodelação tecidual (PERCIVAL *et al.*, 2015). Quando lesado, o tecido cutâneo precisa ser restaurado, pois torna-se porta de entrada ideal para microrganismos. A carga bacteriana nestas feridas é um ponto crítico importante do tratamento, que pode ser efetuado por curativos antimicrobianos, antissépticos e a prescrição de antibióticos tópicos ou sistêmicos (HOWELL-JONES *et al.*, 2006).

A importância clínica das lesões de pele tem sido ressaltada pela pesquisa e pela indústria, a fim de se obter curativos que possam abreviar o período de cicatrização e promover o conforto do paciente, sobretudo, pelo alívio da dor. No contexto da cicatrização, inúmeras são as opções comerciais de produtos e curativos que podem ser utilizadas para o tratamento de feridas. Entretanto, a maior parte desses curativos são importados e apresentam elevado valor agregado, o que encarece consideravelmente o tratamento (PEREIRA e BACHION, 2005).

Dentre uma grande diversidade de biopolímeros que podem ser usados para este fim, a CB e a quitosana são largamente estudadas e utilizadas. Somada às características físico-químicas e mecânicas citadas nos capítulos anteriores, a CB apresenta outras propriedades que a elege como um excelente biomaterial para utilização como biocurativo, como a alta biocompatibilidade, que é relacionada à semelhança que sua estrutura tem com o colágeno da matriz extracelular (diâmetro de ambos mede cerca de 100 nm) (PETERSEN e GATENHOLM, 2011), a capacidade de eliminar dor no local da ferida (por isolar as terminações nervosas) e a capacidade de absorver exsudatos (TORRES, COMMEAUX e TRONCOSO, 2012).

No entanto, a CB não possui propriedades antimicrobianas para prevenção de possíveis infecções quando usada no tratamento de feridas. Alguns esforços têm sido feitos para sanar essa questão, dentre eles, utilizando-a com moléculas ou polímeros antimicrobianos como a quitosana (LIN *et al.*, 2013).

A quitosana é um biopolímero obtido a partir da quitina presente no exoesqueleto de artrópodes, como insetos, crustáceos e alguns moluscos. A quitina é composta por 2-acetamido-2-deoxi- β -D-glicopiranosose unidos por ligações $\beta(1\rightarrow4)$ ou chamado de poli($\beta(1\rightarrow4)$ -N-acetil- β -D-glucosamina, conforme ilustrado na figura 19. O processo de desacetilação raramente é completo e quando o grau de acetilação resulta abaixo de 50 %, a quitina passa a ser chamada de quitosana (RINAUDO *et al.*, 2006).

A quitosana foi descoberta no século XIX, no entanto, somente nas últimas duas décadas tem crescido significativamente sua importância em função de ser uma fonte renovável e biodegradável, somado à sua funcionalidade em aplicações tecnológicas e biomédicas, tais como, sistemas de liberação de fármacos, engenharia de tecidos e pela sua capacidade de analgesia (MAZIERES *et al.*, 2011). Ademais, sabe-se das suas propriedades antifúngicas, antibacterianas e por sua absorção de exsudatos e capacidade cicatrizante em feridas (JEON, PARK e KIM, 2001; LIU *et al.*, 2006).

Considerando as propriedades antimicrobianas intrínsecas da quitosana, também é proposto a incorporação de ciprofloxacino como agente antimicrobiano tópico para o controle das infecções, pois a destruição vascular ocorrida em lesões, tem como consequências, a diminuição dos mecanismos de

defesa humoral e celular na área lesada que pode acarretar numa redução da eficácia dos antibacterianos sistêmicos administrados através de via oral, devido a redução do transporte dos antibióticos ao local da infecção (TAKEO, LEE e ITO, 2015).

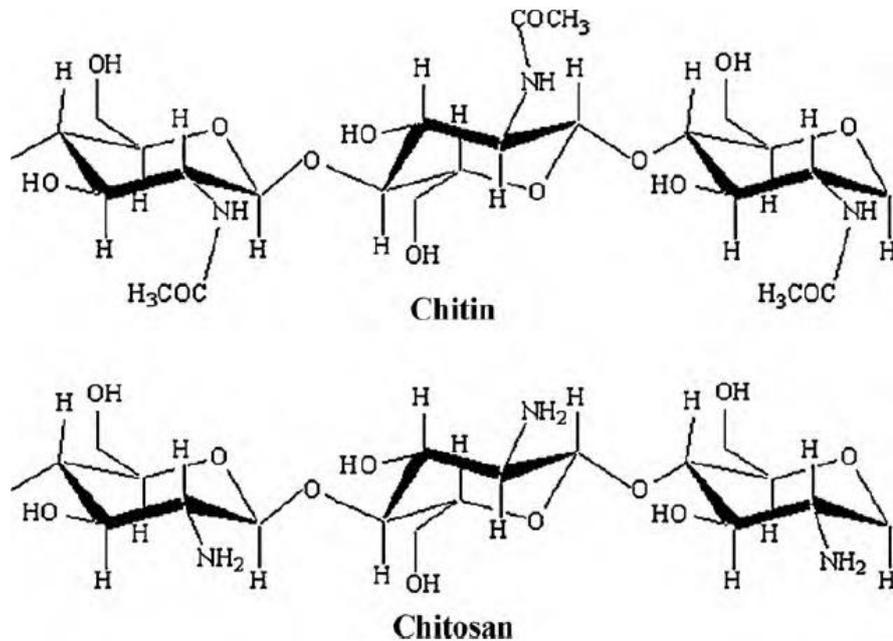


Figura 19 - Estrutura química de quitina e quitosana.

O ciprofloxacino (CIP), uma fluoroquinolona de segunda geração, é um quimioterápico antibacteriano sintético utilizado no tratamento de uma variedade de infecções bacterianas, particularmente para tratamentos respiratórios, urinários e gastrointestinais (SOUSA *et al.*, 2016).

As fluoroquinolonas, classe que está presente o CIP são agentes bactericidas que agem inibindo a topoisomerase IV de bactérias gram positivas e em bactérias gram negativas, seu alvo é a topoisomerase II, também conhecida como DNA girase. As DNA-topoisomerases mudam o número de ligações no DNA superenrolado através das quebras transitórias no DNA, que se torna topologicamente relaxado devido à quebra temporária em uma fita ou em ambas as fitas ao mesmo tempo (tipo II). Topoisomerases são essenciais para a viabilidade celular em células procarióticas e eucarióticas (RANG; DALE, 2003).

Em face ao exposto e considerando o conhecimento adquirido através das pesquisas com a CB, o objetivo do presente capítulo é desenvolver um novo biocurativo baseado em CB em associação à quitosana e CIP para potencial tratamento na cicatrização de feridas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Objetivo desse trabalho é o desenvolvimento, caracterização e avaliação *in vivo* da cicatrização do biocurativo de celulose bacteriana e quitosana associada ao ciprofloxacino.

2.2. Objetivos Específicos

- Obter os biocurativos de CB/QTS/CIP;
- Caracterizar por FTIR, MEV, TG/DTG;
- Avaliar a liberação *in vitro* do ciprofloxacino;
- Avaliar a citotoxicidade e a mutagenicidade *in vitro* dos biocurativos;
- Avaliar o potencial de cicatrização *in vivo* em camundongos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Quitosana, glicose, extrato de levedura, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, KH_2PO_4 , tripolifosfato de sódio (Sigma Aldrich), ciprofloxacino (Parafarm) Kit LIVE / DEAD BacLight (Thermo Fisher Scientific), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Kasvi), Dimetilsulfóxido (DMSO) (Synth), cloridrato de xilazina (Syntec), cloridrato de ketamina (Ceva), Dipirona (Lema – Injex biologic).

3.2. Produção do curativo de CB/Quitosana com ciprofloxacino (CB/QTS/CIP)

A CB foi produzida pela bactéria *Komagataeibacter xylinus* 23760 em meio líquido HS modificado contendo 20 g. L⁻¹ de glicose, 4 g. L⁻¹ de extrato de levedura, 0,73 g. L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 2 g. L⁻¹ de KH₂PO₄, 20 g. L⁻¹ de etanol e água destilada que foi incubada à 30 °C por 48 h em placas de 48 poços (10 mm), afim de se obter membranas de 10 mm de diâmetro. Após o crescimento das membranas, estas foram lavadas exaustivamente com água destilada e depois purificadas utilizando solução diluída de NaOH a 0,1 M por 45 min a 80 °C, seguida de exaustivas lavagens com água destilada até atingir pH neutro.

Seguida da lavagem, as membranas foram agitadas (270 rpm) por 18 h em solução de 2 % (p/v) de quitosana de baixo peso molecular e glicerol a 10% (v/v) numa temperatura de 30 °C. Para a agitação, foram distribuídas 10 membranas de CB em cada béquer contendo 20 mL da solução (2 % quitosana + 10 % de glicerol).

Em placa de cultivo celular de 48 poços, foram adicionados 100 µL da solução de quitosana e glicerol com ciprofloxacino na concentração de 0,5 mg/mL. Na sequência, as membranas foram retiradas da agitação e um excesso da solução em que foram agitadas foi retirado e adicionadas sobre a solução dentro do poço da placa onde estava a solução com o fármaco. Posteriormente, para reticulação da quitosana, foi adicionado 100 µL de solução de tripolifosfato de sódio 5 % (p/v) e secos à 38 °C em estufa de circulação forçada de ar. Após a secagem os filmes denominados CB/QT/CIP foram retirados da placa e então seguiu-se para as determinações.

3.3. MEV

A morfologia das amostras CB/ QTS foram analisadas em um microscópio eletrônico de varredura (Philips SEM 505). As amostras foram metalizadas com ouro usando um metalizador (Balzers SCD 030), obtendo uma espessura de camada entre 15 e 20 nm. Todas as imagens foram processadas pelo programa Soft Imaging System ADDA II.

3.4. FTIR

Conforme descrito no item 3.5 do capítulo 1

3.5. Análise termogravimétrica TG/DTG

As análises termogravimétricas foram efetuadas utilizando equipamento modelo SDT Q500 (TA Instruments, USA) a 10 °C/min sob atmosfera de nitrogênio até 900°C.

3.5.1. Determinação *in vitro* do perfil de liberação de ciprofloxacino

3.5.2. Curva analítica do ciprofloxacino obtida por espectroscopia de absorção na região do UV-Vis

Foram obtidas curvas analíticas de CIP em solução de tampão fosfato 10mM e pH 5,8. Partindo de uma solução estoque, foram tomadas alíquotas para o preparo de diluições na faixa de concentração entre 2,5 µg/mL e 15 µg/mL. As leituras de CIP em foram realizadas em espectrofotômetro de UV-Vis com leitor de microplacas (Tecan Infinite M200 Pro) com comprimento de onda em 277 nm. Os valores médios da triplicata das leituras da absorbância de cada concentração foram utilizados para a obtenção das curvas analíticas e para o cálculo da equação da reta.

3.5.3. Determinação "*in vitro*" do perfil de liberação do CIP

Os curativos obtidos foram liofilizados e após esta etapa foram colocados em tubos falcon de 50 mL contendo 20 mL de tampão fosfato 10mM (pH 5.8) e incubados em um agitador orbital termostático (agitação de 100 rpm) à 37 °C. Alíquotas de 500 µL do meio de dissolução foram retiradas em tempos pré-determinados durante 350 min e a absorbância foi medida fixando comprimento de onda em 277 nm. Posteriormente, 500 µL de meio de dissolução foram

repostos à mesma temperatura para reabastecer o volume da reação dos frascos.

3.6. Atividade antimicrobiana por método de difusão em disco

A atividade antimicrobiana dos filmes de CB e dos biocurativo (CB/QTS/CIP) foram determinadas pelo método de difusão em disco frente às bactérias *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, de acordo com o método International Clinical Standards (CLSI/NCCLS, 2007). As bactérias foram semeadas em placas contendo ágar Mueller-Hilton. As amostras medindo 10 mm foram posteriormente dispostos no centro da placa e incubados a 37 °C por 24 h. Posteriormente, as zonas de inibição foram determinadas utilizando o *software* Image J (National Institutes of Health - USA).

3.7. Atividade antimicrobiana pelo método de coloração de biofilmes com Kit LIVE / DEAD BacLight®

O kit comercial é composto por dois corantes fluorescentes, um verde, chamado SYTO9 e um vermelho, iodeto vermelho de propídio. Para os ensaios microbiológicos, *P. aeruginosa* e *S. aureus* (0,5 na escala de McFarland) inoculados em um ágar nutritivo e uma camada de 20 µL foi colocada na superfície de uma lâmina de vidro sob atmosfera estéril, seguido de incubação durante 24 h para permitir a formação de biofilmes.

Posteriormente, os biofilmes foram completamente cobertos com filmes de BC/QTS vazios e carregados com ciprofloxacino durante 10, 30 e 60 min. Após o tratamento, os biofilmes foram cuidadosamente lavados com água deionizada. Foram realizados controles com bactérias não tratadas (bactérias vivas) e com biofilme tratado com hipoclorito de sódio NaClO (baterias mortas).

Para a coloração do biofilme formado, ambos os corantes foram misturados em proporções iguais (0,75 µL de cada um em 0,5 mL de água deionizada estéril), aplicados acima do biofilme inteiro e mantidos ao abrigo de

luz durante 20 min. Em seguida, as lâminas foram lavadas com água deionizada e observadas em microscópio de epifluorescência Leica DM 2500 equipado com filtros UV (495-505 nm) com aumento de 400 vezes para determinar a viabilidade das bactérias. Os filtros utilizados foram U-MWG2 (excitação entre 510 e 550 nm e emissão a 590 nm), o que permite a observação de bactérias vivas com cor verde e U-MWB2 (excitação 460 e emissão 490 520 nm), com as quais as bactérias danificadas foram observadas com uma coloração vermelha. As imagens foram superpostas com o programa de manipulação de imagens GIMP 2 (software gratuito fornecido pela equipe Spencer Kimball, Peter Mattis e GIMP).

3.8. Ensaio de citotoxicidade pelo método de MTT / Viabilidade Celular do biocurativo de CB/QTS/CIP e de CB

20mg do curativo e da CB foram pesados e incubados em 1mL de meio de cultura DMEM suplementado com soro fetal bovino (SFB), antibióticos estreptomicina e penicilina e o antifúngico anfotericina B, e mantidos à 37°C por 24 h, de acordo com o ensaio de extração líquida (International Standard ISO 10993-5:2009). Assim, o meio de cultura contendo o extrato obtido após agitação com os filmes foi utilizado para o teste. Posteriormente, uma suspensão de células da linhagem GM07492 (fibroblasto humano) foi semeada na densidade de 1×10^4 células/poço. Estas células foram semeadas em placas de cultura de células de 96 poços e incubadas (incubadora Panasonic-CO₂ MOC-19 AIC-UV) à 37°C, 5 % de CO₂, *overnight* para a adesão das células. Após este período, o meio de cultura foi substituído por 100 µL do extrato e as placas foram incubadas à 37 °C, 5 % de CO₂ por 24 h. Decorrido o período experimental, os poços foram lavados 1x com SFB, e foram adicionados 50 µL de MTT. A placa de cultura foi novamente incubada em estufa 37°C por 4 horas. Após incubação, 100 µL de isopropanol foram adicionados aos poços e homogeneizados delicadamente para a solubilização dos cristais de formazan. Os valores de densidade óptica foram obtidos usando um espectrofotômetro (Polaris-CELER) com λ fixo de 570 nm e foram convertidos em percentagens de viabilidade celular relativa. Para controle negativo, foi utilizado a solução com DMEM, SFB, antibióticos e

antifúngicos. Para o controle positivo, foi utilizado solução de DMEM, SFB e 30 % de DMSO.

3.9. Avaliação da mutagenicidade pelo Teste de Ames

Os ensaios de mutagenicidade foram realizados de acordo com a metodologia de pré-incubação desenvolvida por Maron e Ames (1983). As linhagens bacterianas utilizadas foram TA98, TA100 e TA97a de *S. typhimurium*. Com auxílio de uma alça de inoculação, pequena quantidade da cultura estoque congelada foi semeada em 30 mL de caldo nutriente (Oxoid nº 2), incubada a 37 °C, por 14 - 16 h, em mesa agitadora (100 rpm), de modo a obter uma densidade de $1-2 \times 10^9$ bactérias/mL para o teste.

As amostras de CB e CB/QTS/CIP foram preparadas de acordo com os padrões recomendados pela ISO 10993-12:2007. Os filmes com 2,5 cm², previamente esterilizados com luz ultravioleta, permaneceram sob agitação por 72 h a 37 °C em 1 mL de DMSO. Após esse período, os extratos obtidos foram testados: 100 µL/ placa para celulose pura e 25 µL para celulose com quitosana, pois concentrações maiores induziram a morte das bactérias.

500 µL de tampão fosfato (0,2 M, pH 7,4) e 100 µL de cultura de bactérias foram adicionados em tubos de ensaio aos extratos, sendo incubados na estufa por 30 min à 37 °C. Decorrido o tempo de incubação, 2 mL de “*top ágar*” (ágar de superfície), suplementado com traços de L-histidina e D-biotina, foram adicionados à mistura presente nos tubos. O conteúdo de cada tubo, assim composto, foi levemente homogeneizado e vertido sobre a superfície de uma placa contendo ágar mínimo glicosado. As placas foram dispostas em uma bancada e, após solidificação do “*top ágar*”, foram incubadas por 48 h, à 37 °C. Ao término desse período, foi realizada a contagem do número de colônias revertentes por placa. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Os agentes mutagênicos padrões utilizados para confirmar as propriedades de reversão e especificidade de cada cepa (controles positivos) foram 4- nitrofenilenodiamino (10 µg / placa) para TA98 e TA97a, azida sódica (1,25 µg / placa) para TA100 e mitomicina C (0,5 µg / placa) para TA102. O controle negativo foi o DMSO (100 µL/ placa).

Os resultados foram analisados utilizando o programa estatístico Salanal (U.S. Environmental Protection Agency, Monitoring Systems Laboratory, Las Vegas, NV, versão 1.0, do Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, EUA), adotando o modelo de Bernstein et al. (1982). Os dados (revertentes/placa) foram avaliados pela análise de variância (ANOVA), seguido de uma regressão linear. O índice de mutagenicidade (IM) também foi calculado, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{IM} = \frac{\text{número de revertentes/ placa com o composto-teste (revertentes induzidas)}}{\text{número de revertentes/ placa com o controle (solvente) negativo}}$$

A amostra é considerada mutagênica quando o IM for maior ou igual a 2 (MORTELMANS e ZEIGER, 2000).

3.10. Experimento de cicatrização *in vivo*

3.10.1. Animais

Foram utilizados 50 (incluindo teste piloto com 2 animais) camundongos (*Mus musculus*), machos, linhagem Swiss, pesando aproximadamente 35 - 40g obtidos do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP. Durante todo o experimento, os animais permaneceram no Biotério da Universidade de Araraquara e foram alojados individualmente em caixas de polipropileno apropriadas para roedores, preenchidas com maravalha, em ambiente ventilado com exaustão de ar presente, temperatura (22 ± 2 °C), além de ciclo claro-escuro de 12 h. A fim de evitar a produção de qualquer tipo de estresse comportamental, nenhum procedimento experimental foi realizado no espaço destinado à manutenção dos animais. Tiveram acesso à água e comida *ad libitum*. O experimento foi após a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade de Araraquara - UNIARA (CEU-UNIARA) número 040/17. Para o desenvolvimento da pesquisa, foram tomados todos os cuidados, a fim de minimizar o número de animais utilizados e seu sofrimento.

3.10.2. Modelo de Lesão Cutânea

Este modelo envolve a completa remoção da epiderme, derme e tecido subcutâneo em uma extensão significativa (Davidson, 1998). Os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina (90 mg/kg) e cloridrato de xilazina (12 mg/kg) via intraperitoneal. Após a verificação do estado de consciência do animal (atrás da ausência de resposta ao pinçamento da pata e/ou da cauda). Após confirmação da anestesia, os animais foram posicionados em decúbito ventral e submetidos à tricotomia na região dorsal (local onde a lesão foi produzida) seguindo-se à antissepsia com uma solução de 10 % povidine-iodo.

Após limpeza do campo operatório, a lesão foi produzida com o auxílio de um *punch* cirúrgico de 8 mm de diâmetro com lâmina cortante na borda, retirando-se a pele e a tela subcutânea, expondo-se a fáscia muscular dorsal. Posteriormente, os animais foram mantidos em local aquecido, sob supervisão, até completa recuperação anestésica e posteriormente alojados em caixas individuais a fim de evitar contato entre as feridas operatórias. As lesões cutâneas foram avaliadas diariamente. Visando reduzir a dor no período pós-operatório foi utilizado como analgésico o fármaco dipirona na dose de 500 mg/Kg.

3.10.3. Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais com 24 animais cada. Assim nos dias 2, 7, 14 e 21 pós procedimento foram retirados aleatoriamente seis animais por grupo:

- Grupo 1 (G1): Tratados com o curativo CB/QTS/CIP.
- Grupo 2 (G2): Tratados apenas com a membrana de CB;

As membranas foram colocadas sobre as lesões com o auxílio de uma pinça anatômica esterilizada.

3.10.4. Eutanásia

Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados por aprofundamento de anestésico para posterior análise e avaliação do material coletado. O procedimento foi realizado no Biotério da Universidade de Araraquara.

3.10.5. Análise Macroscópica

Para a análise macroscópica as lesões foram fotografadas com câmera digital Canon modelo EOS 60D disposta em um suporte com distância padronizada de 50 cm entre a câmera e o animal. Para cálculo da medição da redução do tamanho original da ferida, foi utilizado o *software* Image J (National Institutes of Health - USA) com a seguinte fórmula: $(\text{área da ferida dia zero} - \text{área da ferida no dia 2, 7, 14 e 21} / \text{área da ferida dia 0}) \times 100$. Os valores foram expressos em porcentagem de redução da área da ferida.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. MEV

As diferenças morfológicas do filme de CB/QTS/CIP e da CB foram investigadas por MEV e as micrografias estão exibidas na figura 18. A figuras 18 (a) da superfície e 18 (b) da transversal a apresentam a rede tridimensional porosa característica da CB. A figura 18 (c) da superfície, apresenta a superfície homogênea e lisa do biocurativo, que é característico da quitosana. Na figura 18 (d) é possível observar a mistura da quitosana e do glicerol com as fibras de CB, e a seção exata e que a superfície se distingue do restante do curativo, onde se tem a mistura dos polímeros, com aspecto mais denso do que observado na figura 18 (b).

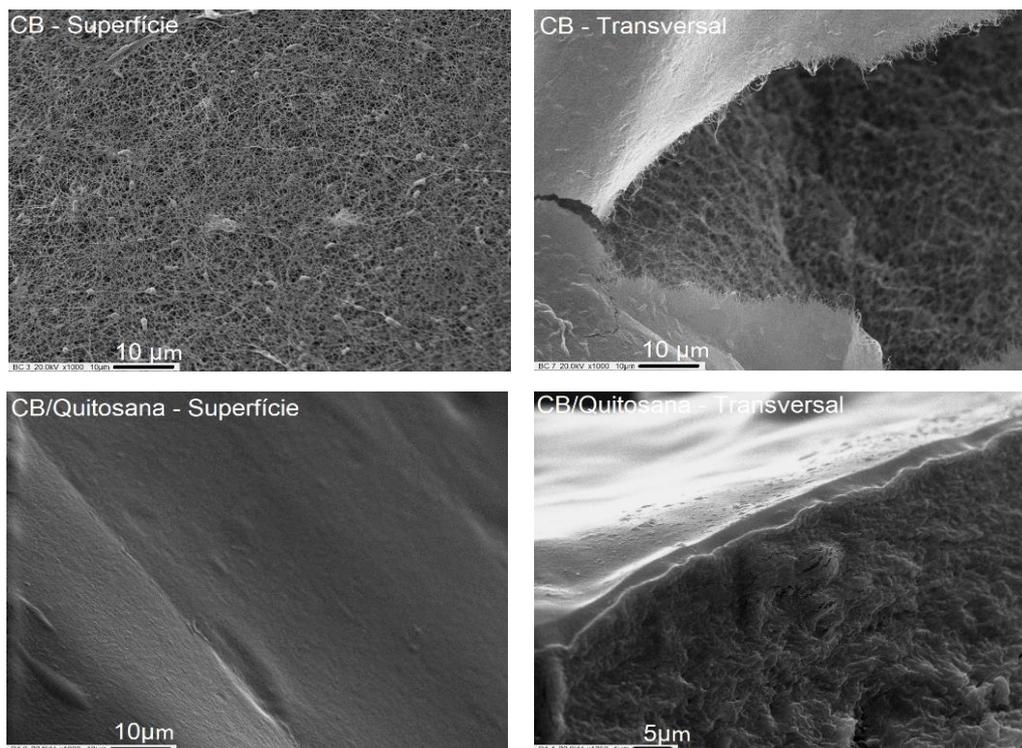


Figura 20 - Micrografias obtidas por MEV-FEG das superfícies e dos cortes transversais da CB pura e do filme de CB/QTS/CIP.

4.2. FTIR

A figura 19 mostra os espectros obtidos por FTIR das amostras de CB, CB/QTS/CIP, CB/QTS, QTS/CIP e CIP. As bandas características de celulose podem ser observadas em 1106 e 1160 cm^{-1} , correspondendo ao alongamento simétrico da ligação C-O de álcool primário, e estiramento assimétrico da ligação C-O-C, respectivamente. Outra atribuição pode feita em 3342 cm^{-1} (banda larga) correspondente ao alongamento do OH. Outras bandas foram atribuídas à flexão de O-H de água adsorvida (1642 cm^{-1}), alongamento CH dos grupos CH_2 e CH_3 (a 2895 cm^{-1}) também podem ser vistas (El SAIED *et al.*, 2008).

Para a o espectro de CB/QTS, as bandas características da quitosana estão evidenciadas devido à maior quantidade na superfície deste polímero, frente à celulose que está disposta mais na região central do curativo. As principais bandas que aparecem nesse espectro foram devido ao estiramento dos grupos OH entre 3630 cm^{-1} e 3015 cm^{-1} , que se sobrepõem à vibração de estiramento N-H característico da quitosana. As ligações entre C-H nos grupos -

CH₂ podem ser observadas em 2934 cm⁻¹ e -CH₃ em 2872 cm⁻¹. A região entre 1680-1480 cm⁻¹ foi relacionada com as ligações carbonila (C = O) do grupo amida CO-NH-R (amida secundária em 1645 cm⁻¹) e o grupo de amina protonada (NH₃ em 1574 cm⁻¹). Bandas na região de 1160 cm⁻¹ a 1000 cm⁻¹ foram atribuídas ao grupo CO. A banda do grupo metileno também foram atribuídas em 1373 cm⁻¹ (SILVA *et al.*, 2012).

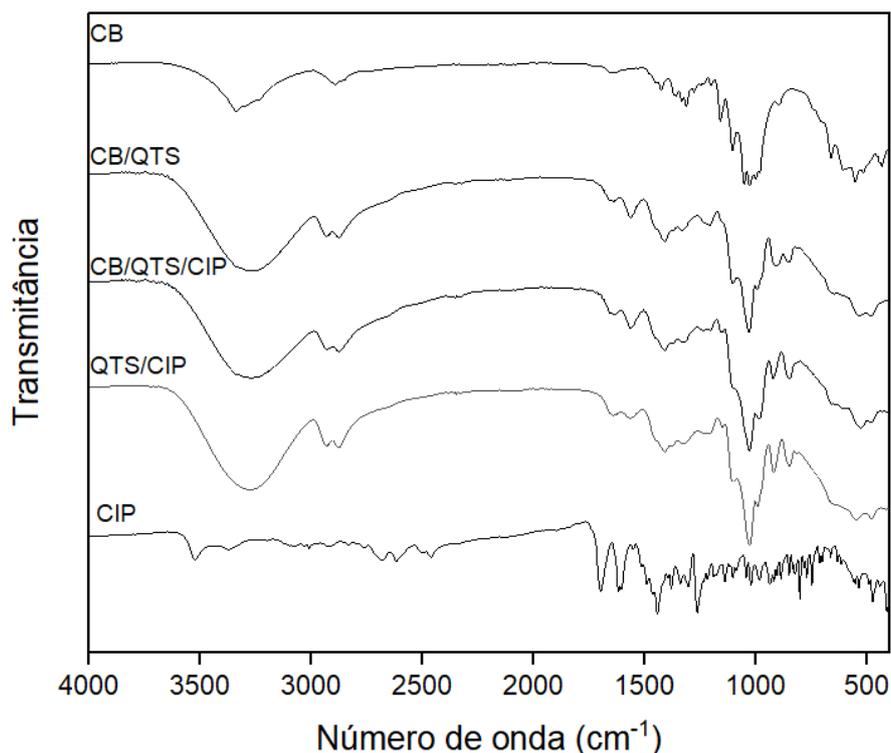


Figura 21 - Espectro de FTIR das amostras de CB, CB/QTS/CIP, CB/QTS, QTS/CIP e CIP.

No espectro de FTIR do ciprofloxacino, um pico proeminente em 3526 cm⁻¹ foi atribuído ao estiramento de OH (ligação de hidrogênio). Em 3010 cm⁻¹ a banda foi atribuída aos alquenos e estiramento dos C-H de aromáticos. As bandas na região 1625 a 1600 cm foi atribuído às quinolonas. As bandas na região de 1450 a 1400 cm foi atribuído à carbonila (C=O) e a banda 1266 à ao grupo O-H que indicou a presença de ácido carboxílico. Além disso, uma banda intensa entre 1050 e 1000 cm foi atribuído a ligação C-F (SAHOO *et al.*, 2011).

Devido à ausência de novas bandas no espectro de FTIR, conclui-se a compatibilidade dos materiais e que também não houve interação entre eles.

4.3. Análise termogravimétrica TG/DTG

O perfil das curvas TG/DTG do filme de CB, QTS, CB/QTS e CB/QTS/CIP estão apresentados na figura 20. A amostra de CB apresentou comportamento térmico característico, com duas perdas de massa. A primeira, uma pequena perda de massa de 5 % com início em temperatura ambiente até 126 °C que é relacionada à perda de água superficial (DE SALVI *et al.*, 2012). O segundo evento de perda de massa foi atribuído ao processo de decomposição da amostra em temperaturas entre 200 e 391 °C, com a decomposição máxima de 328 °C e perda de massas de 70 %. A degradação da CB inclui a despolimerização, desidratação e decomposição de unidades de glicose (BARUD *et al.*, 2008).

Para a QTS, pelo perfil térmico apresentado na figura 20, dois eventos distintos de perda em massa foram observados. O primeiro se estendeu desde o início do aquecimento até 132 °C, com a perda máxima em cerca em 57 °C, correspondendo a 10 % da perda de água e outras possíveis perdas de voláteis. A segunda perda de massa é refere-se à despolimerização e degradação da quitosana, a partir de 230 °C e com pico máximo de decomposição em 300 °C.

O perfil térmico apresentado para CB/QTS apresenta redução na estabilidade térmica, (temperatura máxima de degradação de 197 °C), quando comparado com CB (328 °C) e QTS (300 °C). Nesse caso, também é possível observar outros dois eventos concomitantes em temperatura de degradação máxima em 220 e 292 °C, que foi atribuído à QTS e CB, respectivamente. Para a amostra de CB/QTS/CIP, o comportamento se repete, com a temperatura máxima do principal evento de degradação em 194 °C, seguido de outros dois eventos com as temperaturas máximas de 250 e 292 °C, atribuídos respectivamente para QTS e CB.

Em geral, esse comportamento é observado porque os plastificantes são moléculas de baixo peso molecular, que quando adicionados, modificam a organização tridimensional da matriz polimérica, diminuindo as forças de atração intermolecular, aumentando o volume e a mobilidade das cadeias do polímero e

consequentemente, diminuindo a temperatura máxima de degradação do sistema (MOHSIN, HOSSIN e HAIK, 2011).

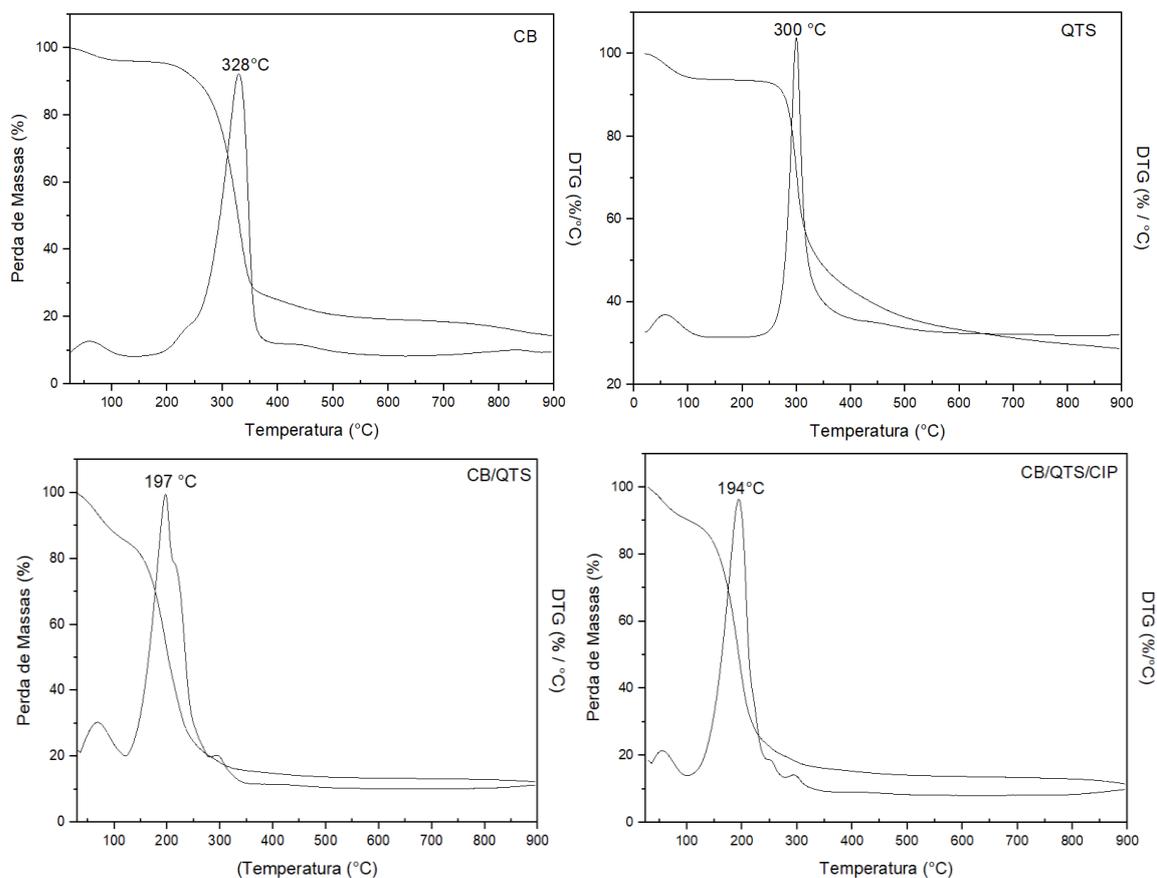


Figura 22 - Curvas TG/DTG do filme de CB, quitosana, CB/QTS e CB/QTS/CIP.

4.4. Liberação *in vitro* do ciprofloxacino

A figura 21 apresenta o gráfico de porcentagem de liberação do ciprofloxacino em função do tempo de ensaio realizado e foi possível observar que nos primeiros 15 min foram obtidas taxas médias de liberação de 18 % para CB/CIP e taxas médias de 36 % para o biocurativo desenvolvido. Logo, em 45 min foi observado um *burst* de aproximadamente 80 %, porém, posterior a isso, as taxas se mantiveram praticamente constantes para ambos os casos.

Contudo, não se observou diferença estatística significativa entre os filmes desenvolvidos e a CB pura.

O aumento nas taxas de liberação para a CB/CIP revela a influência do tamanho nanométrico das fibras na aceleração de liberação, em relação à grande área superficial e o curto caminho de difusão que o fármaco precisa percorrer de dentro das fibras para o meio de dissolução, conforme expressado pela equação de Noyes-Whitney (NOYES e WHITNEY, 1897). Somado a esse fator, o comportamento observado está associado a fatores intrínsecos da CB, como a alta cristalinidade e hidrofiliabilidade, bem como sua estrutura porosa, que juntos facilitam a liberação de fármacos através da matriz polimérica (MENEQUIN *et al.*, 2017).

A elevada taxa de liberação reportada pode também estar relacionada com a técnica de secagem por *solvent casting*, em que durante a evaporação o solvente (neste caso, água), moléculas de fármaco são arrastadas conjuntamente com as moléculas de água para a superfície do filme, tornando-se mais suscetível à dissolução. Deve-se destacar também que o glicerol é um plastificante e como tal se intercala entre as cadeias poliméricas, aumentando sua flexibilidade (AZEREDO *et al.*, 2010), o que pode contribuir para o aumento das taxas de liberação do fármaco.

Por fim, outra contribuição que pode ser associada ao *burst* de liberação do filme é a solubilidade da quitosana em meios com pH mais ácidos, e no ensaio em discussão, o valor de pH foi de 5.8, onde foi observado uma significativa erosão do filme após o ensaio, o que leva a sugerir que não se obteve total reticulação da quitosana com o TTP, uma vez que a reticulação é responsável pela diminuição da solubilidade aquosa em polímeros naturais.

Porém, as altas taxas liberadas devem contribuir para a liberação imediata do ciprofloxacino na ferida, contribuindo para a erradicação das bactérias presentes na lesão.

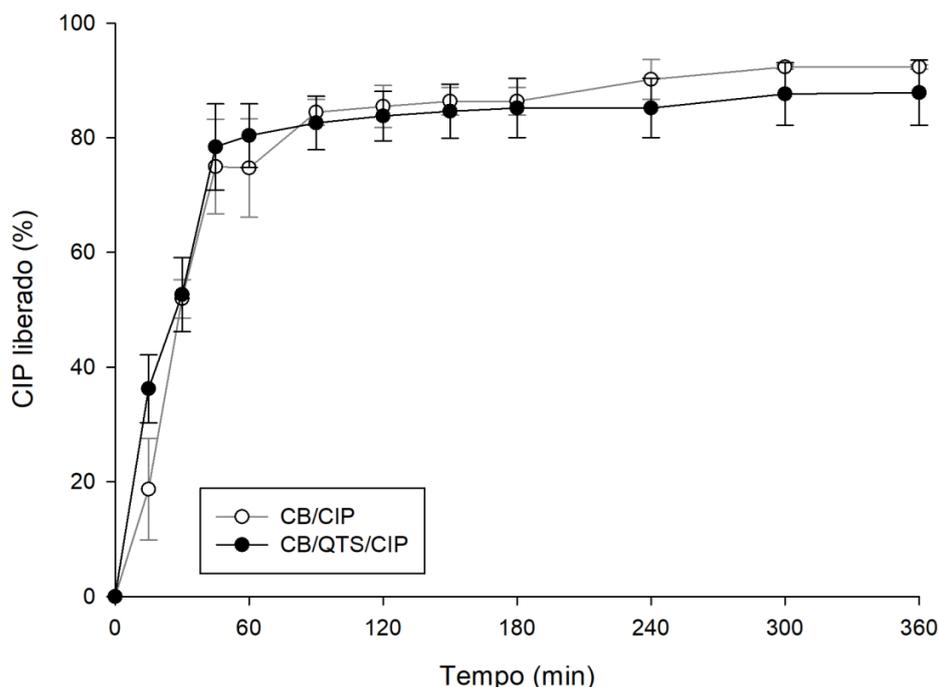


Figura 23 - Perfil de liberação de CIP a partir da membrana de CB e do biocurativo de CB/QTS/CIP em pH 5.8 no intervalo de 0 a 360 min.

4.5. Atividade antimicrobiana por método de difusão em disco

Foram testadas as atividades antimicrobianas do filme produzido com CB/QTS/CIP e CB/QTS em relação a diferentes microrganismos comumente associados à patologias recorrentes. Para o filme CB/QTS sem ciprofloxacino, os halos de inibição foram de 1,9 cm para *P. aeruginosa* e 1,2 cm para *S. aureus*. Porém, para o filme carregado com o antibiótico, observou-se uma atividade superior, com inibição de 5,5 cm para *P. aeruginosa* e 4,3 cm para *S. aureus*. Os halos de inibição formados pelos filmes podem ser observados na figura 22.

Somada à atividade do fármaco, a quitosana de baixo peso molecular já é conhecida pelas propriedades antimicrobianas e esse fato foi um dos principais atrativos para a escolha do polímero para o delineamento do biocurativo, e no teste realizado, foi possível comprovar através dos halos de difusão formados. Além disso, outros autores associam outros antibióticos à quitosana e seus derivados, afim de potencializar a capacidade antimicrobiana do sistema (TIN *et al.*, 2009).

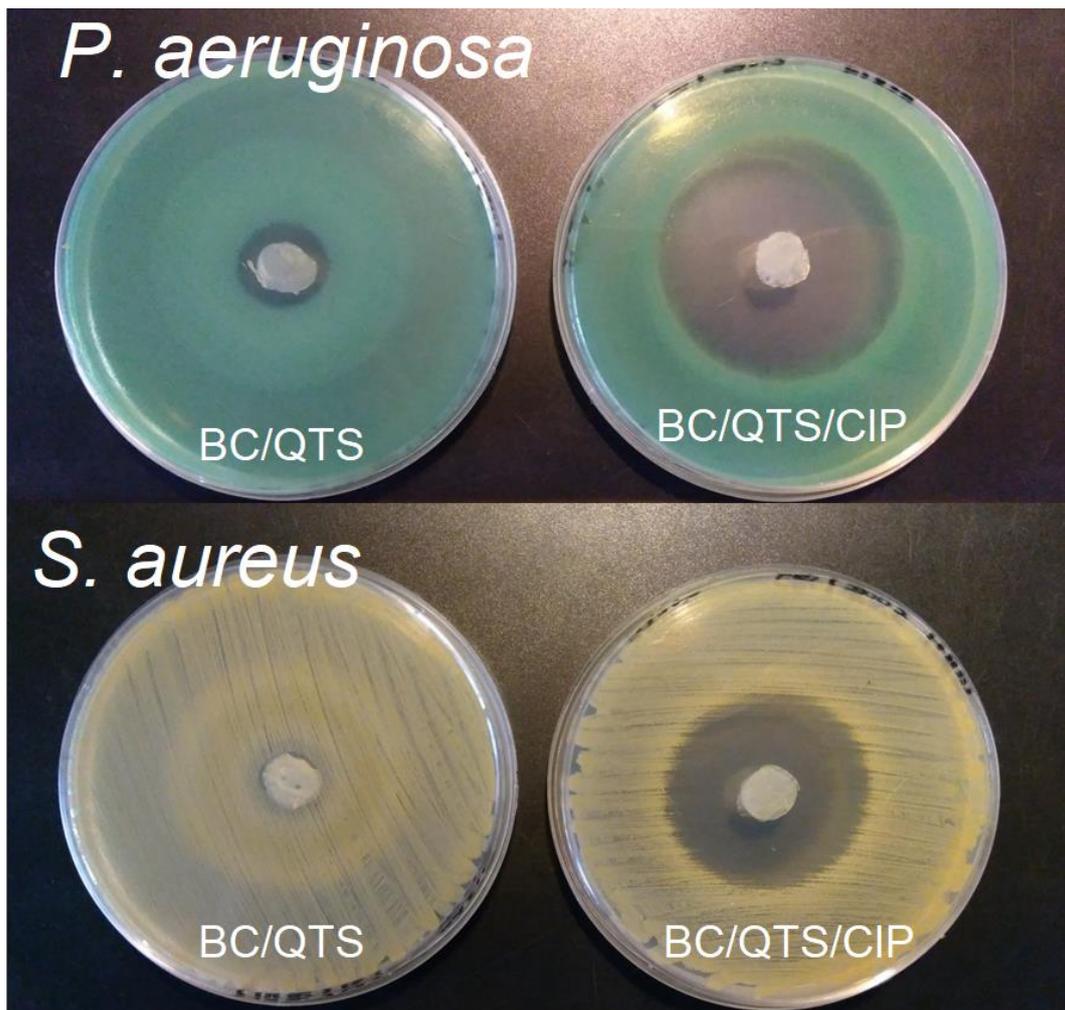


Figura 24 - Halos de inibição dos filmes de CB/QTS e CB/QTS/CIP para *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

4.6. Atividade antimicrobiana pelo método de coloração de biofilmes com Kit LIVE / DEAD BacLight®

A fim de complementar os resultados de atividade antimicrobiana realizadas pelo método de difusão em disco, foram realizadas pelo método de coloração de biofilmes com Kit LIVE / DEAD BacLight. AS imagens obtidas por microscopia de fluorescência podem ser observadas nas figuras 23 e 24, para *P. aeruginosa* e *S. aureus*, respectivamente.

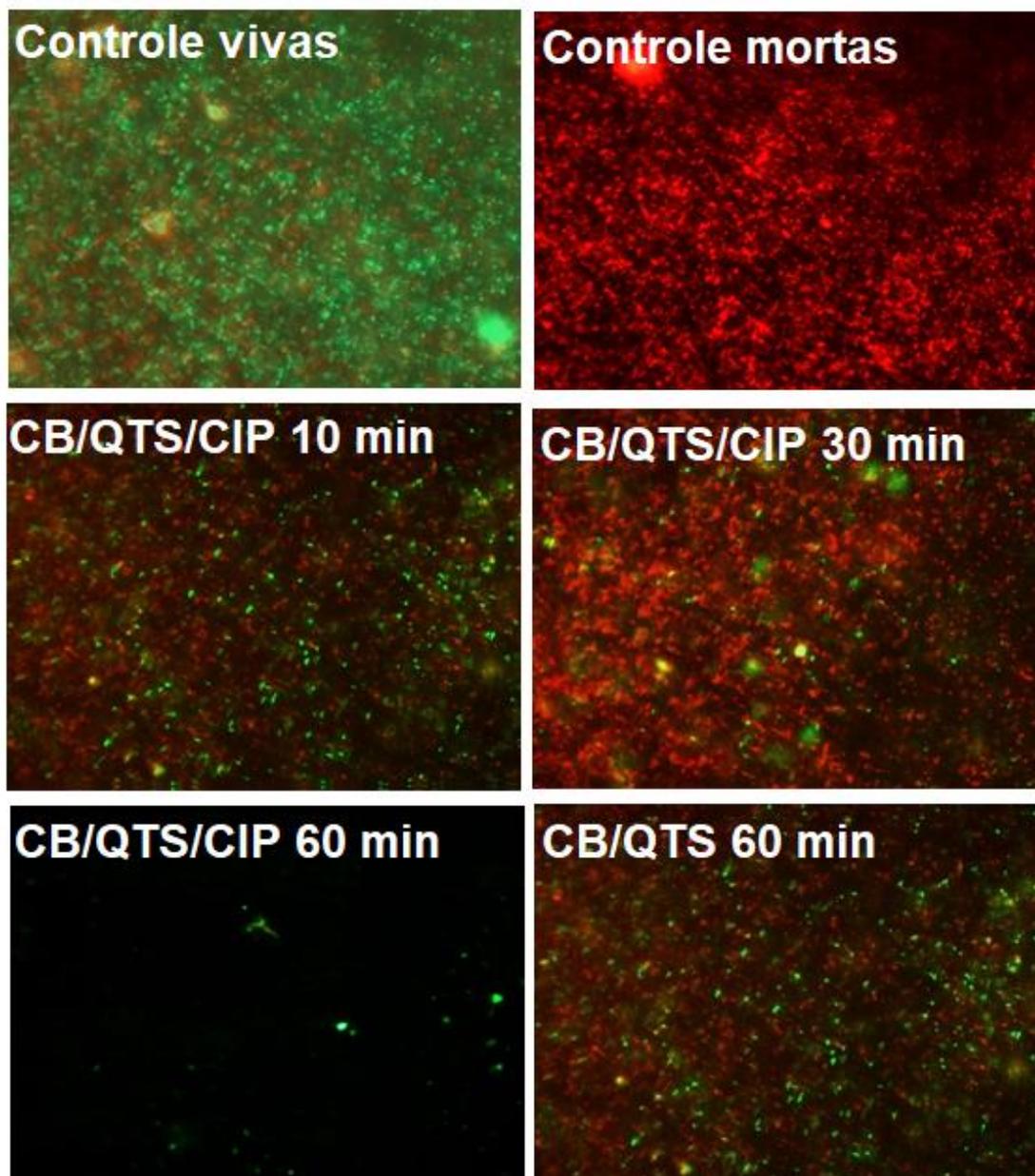


Figura 25 - Imagem obtida por microscopia de epifluorescência com filtros UV (495 - 505 nm) a 400x para determinação da atividade antimicrobiana de *P. aeruginosa* pelo método de coloração de biofilmes com Kit LIVE / DEAD BacLight.

Para *P. aeruginosa* o biofilme controle de 24 h demonstra uma pequena população de bactérias mortas (vermelhas), mas não significativa quando comparadas à população viável (verdes). Para o controle de bactérias mortas, é possível observar que o tratamento de 10 min com hipoclorito (controle negativo) foi capaz de gerar a morte celular de todo o biofilme. Nos primeiros 10 min de

tratamento com o filme de CB/QTS/CIP se observou uma marcada redução da população viável e com aumento das células vermelhas, já em 30 min, um aumento significativo de células mortas. Logo, em 60 mins de tratamento, não se observam bactérias devido à duas razões, primeiro pela debilidade da estrutura do biofilme pelo antibiótico e segundo pela forte interação das bactérias com a quitosana da superfície, que ao ser retirada da lâmina, leva com ela grande parte a população. Por fim, o tratamento do biofilme com CB/QTS sem ciprofloxacino por 60 min de contato, gerou uma redução notável de bactérias viáveis, porém, com efeito menor quando comparada com a do biocurativo desenvolvido.

Nos testes realizados para *S. aureus*, se observou o mesmo comportamento dos controles, ou seja, sem tratamento com maior número de células verdes e o tratado com NaClO com maior número de células vermelhas. Tanto aos 10 min quanto aos 30 min de contato com o filme CB/QTS/CIP é possível observar uma leve aparição de células mortas. Aos 60 min de exposição foi apresentado um aumento considerável de células mortas e poucas células viáveis. Entretanto, para o tratamento do biofilme com a membrana sem ciprofloxacino, houve um pequeno efeito bactericida com pequena população de bactérias mortas e uma maior população de células vivas.

Os resultados da atividade antimicrobiana pelo método de coloração de biofilmes podem ser positivamente correlacionados ao do teste de difusão em disco, uma vez que houve uma atividade maior *P. aeruginosa* quando comparada à *S. aureus*, tanto do filme desenvolvido quanto de CB/QTS sem o fármaco. Existem dois mecanismos conhecidos de ação antimicrobiana da quitosana, ambas relacionadas ao número de grupos amino ativos. Primeiro, a quitosana positivamente carregada interage com as cargas negativas das bactérias, levando a um aumento da permeabilidade da membrana bacteriana, o que leva à inibição do crescimento das células. Outro mecanismo envolve a ligação da quitosana ao DNA, que pode suprimir a produção de mRNA bacteriano (ROHAETI, LAKSONO e RAKHMAWATI, 2016).

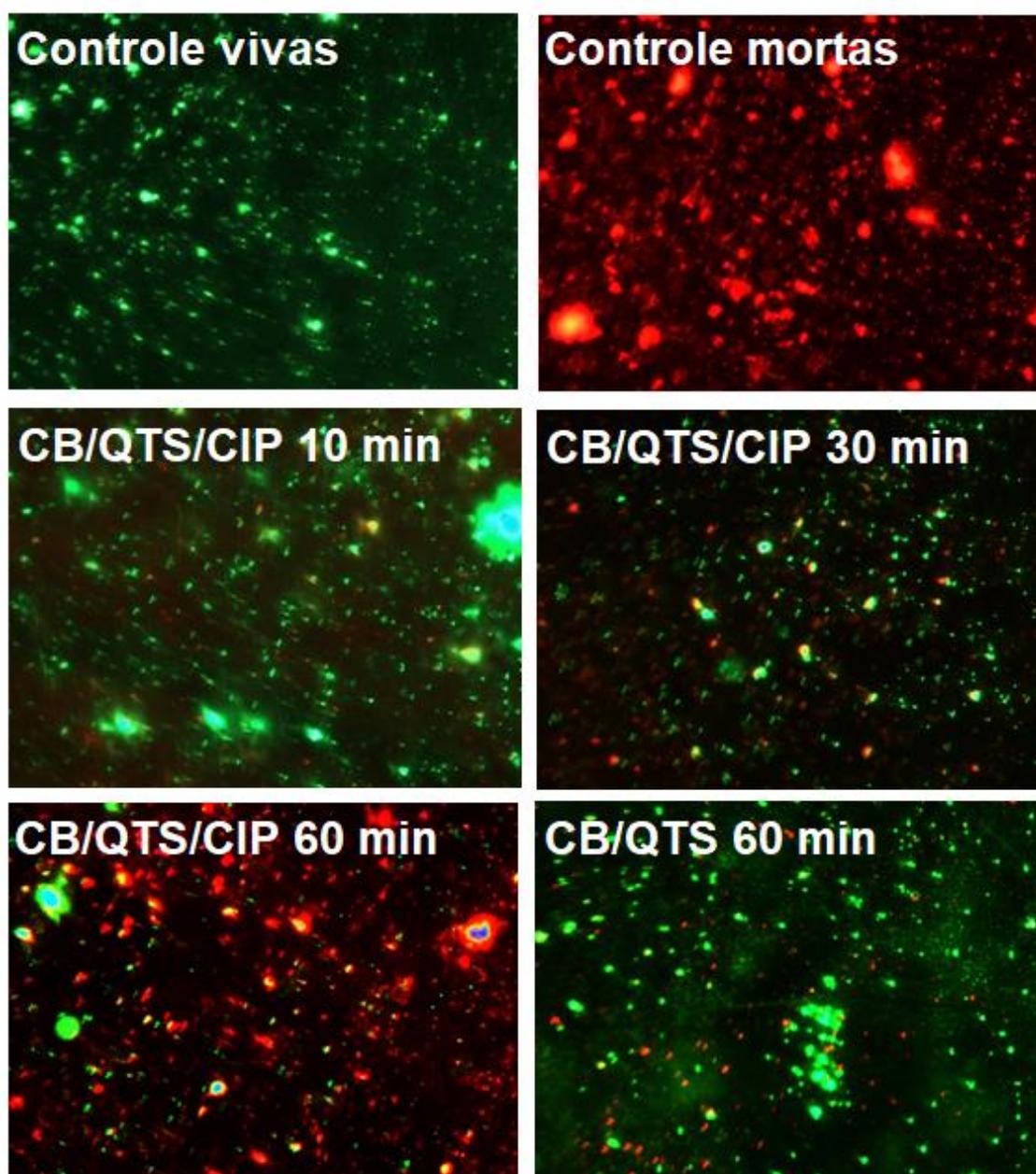


Figura 26 - Imagem obtida por microscopia de epifluorescência com filtros UV (495 - 505 nm) a 400x para determinação da atividade antimicrobiana de *S. aureus* pelo método de coloração de biofilmes com Kit LIVE / DEAD BacLight.

4.7. Ensaio de citotoxicidade pelo método de MTT / viabilidade celular

A figura 25 apresenta os resultados do ensaio de citotoxicidade do filme desenvolvido de CB/QTS/CIP com a membrana de CB, comparando

com o controle negativo (DMEM + SFB + antibiótico + antifúngico) e com controle positivo (DMEM+ SFF + 30 % de DMSO). Os resultados demonstram que o controle negativo e a CB determinaram o mesmo padrão de viabilidade celular, evidenciando a ausência de toxicidade proferida pelo extrato das membranas de CB analisadas. A característica atóxica das membranas de CB representa uma propriedade consolidada pela literatura científica, tanto em ensaios de extração como de adesão celular (TORRES, COMMEAUX e TRONCOSO, 2012). As amostras de CB/QT/CIP exibiram uma discreta redução na atividade metabólica das células, em contrapartida, não caracteriza uma influência citotóxica, considerando a porcentagem de viabilidade exibida nas análises (superior a 80 %).

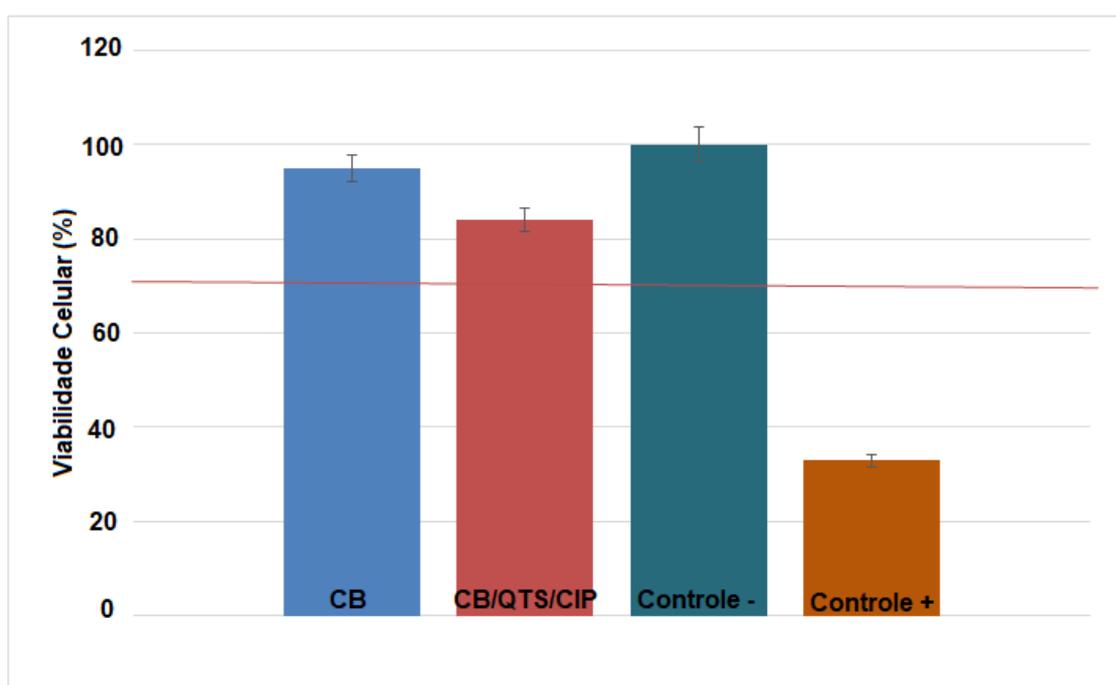


Figura 27 - Gráfico dos resultados do ensaio de citotoxicidade pelo método de MTT / viabilidade celular da CB e do filme de CB/QTs/CIP.

4.8. Avaliação da mutagenicidade pelo teste de Ames

Os resultados da média do número de revertentes / placa (M), o desvio padrão (DP) e o índice de mutagenicidade (IM) após os tratamentos com os

extratos obtidos de celulose pura e com quitosana, observados nas linhagens TA98, TA100 e TA97a de *S. typhimurium* estão apresentados na tabela 7.

Os extratos avaliados não induziram qualquer aumento estatisticamente significativo no número de revertentes quando comparado com o controle negativo, com um índice de mutagenicidade inferior a 2,0, em todas as linhagens testadas, demonstrando, dessa maneira, ausência de atividade mutagênica nas condições utilizadas deste estudo.

Tabela 7 - Atividade mutagênica expressa através da média e desvio padrão do número de revertentes / placa e índice de mutagenicidade nas linhagens TA98, TA100, TA97a e TA102 de *S. typhimurium* após o tratamento com os extratos de CB e CB/QTS/CIP.

Número de revertentes (M ± DP) / placa e IM				
Tratamentos	TA98	TA100	TA97a	TA102
DMSO	13 ± 4	108 ± 9	123 ± 3	310 ± 12
CB	12 ± 1 (0,92)	105 ± 10 (0,98)	122 ± 12 (0,99)	292 ± 31 (0,92)
CB/QTS/CIP	18 ± 2 (1,38)	113 ± 6 (1,05)	137 ± 7 (1,11)	298 ± 24 (0,96)
C+	435 ± 25 ^a	1539 ± 89 ^b	1756 ± 112 ^a	1982 ± 75 ^c

M ± DP = média e desvio padrão; Controle negativo: DMSO (100 µL/placa); Controle positivo (C+): ^a4-nitro-*o*-fenilenodiamino (10,0 µg/ placa – TA98, TA97a), ^bAzida Sódica (1,25 µg/placa – TA100) e ^cMitomicina C (0,5 µg/placa - TA102)

4.9. Experimento de cicatrização *in vivo*

Os resultados dos cálculos da medição da redução da área original da ferida estão dispostos na tabela 8. No segundo dia de tratamento, o biocurativo CB/QTS/CIP foi responsável pela redução de 7 % da lesão, enquanto que a CB pura não exerceu nenhum efeito na área cicatricial. Já no sétimo dia de tratamento, a lesão teve o diâmetro reduzido em 39,32 % quando tratadas com CB/QTS/CIP contra apenas 20,30 % quando tratadas somente com CB. Contrastando com os outros dias de verificação, os animais analisados no 14° dia com a CB pura, apresentaram resultado de reepitelização 5 % superior quando comparados ao biocurativo. Já no 21° dia de experimento, os animais obtiveram redução de 100 % da lesão em ambos os casos.

Tabela 8 - Porcentagem da redução da área original da ferida após 2, 7, 14 e 21 dias de tratamento com CB e CB/QTS/CIP.

	CB/QTS/CIP	CB
2 dias	6,96 ± 5,97 %	0
7 dias	39,32 ± 9,36 %	20,30 ± 9,22 %
14 dias	90,08 ± 2,44 %	95,58 ± 2,77 %
21 dias	100 %	99,30 ± 0,77 %

M ± DP = média e desvio padrão

Os resultados listados na tabela 8 podem ser visualizados com maior facilidade a partir da inserção do gráfico tipo Dotplot (figuras 26 e 27) onde visualiza-se a distribuição dos dados e é possível observar que tanto no 2º quanto no 7º dia de experimento, os dados apresentaram baixa normalidade devido à alta variabilidade de redução de área obtida. A partir do 14º, a normalidade dos dados foi extensivamente maior e observa-se com clareza a diferença de 5 % entre as duas amostras avaliadas no 14º dia e a concentração de pontos em 100 %.

Em termos práticos, algumas diferenças entre o biocurativo desenvolvido e a CB são importantes de serem relatadas. A primeira delas é a facilidade de aderência da CB ao tecido lesado, quando comparada ao filme desenvolvido, que devido à concentração de 10 % de glicerol, apresentou aspecto mais untuoso e com menor aderência ao tecido. Porém, pode-se observar na prática e também pela figura 28, que em alguns animais, a CB permanecia aderida até o 7 dia de experimento, enquanto o filme de CB/QT/CIP ficava aderido somente com auxílio de um suporte adesivo na parte superior, que se prendia nas laterais da área da ferida. No uso clínico, essa característica da CB não é considerada uma desvantagem, uma vez que pode ser retirada facilmente com auxílio de soro fisiológico ou mesmo no banho do paciente, ademais, cumpre com alguns dos principais requisitos de um curativo que se objetiva a inibição de sangramento e proteção da ferida de irritantes ambientais, bem como água e distúrbios eletrolíticos, sem a necessidade de auxílio adesivo para mantê-la no local desejado (JAYAKUMAR *et al.*, 2011).

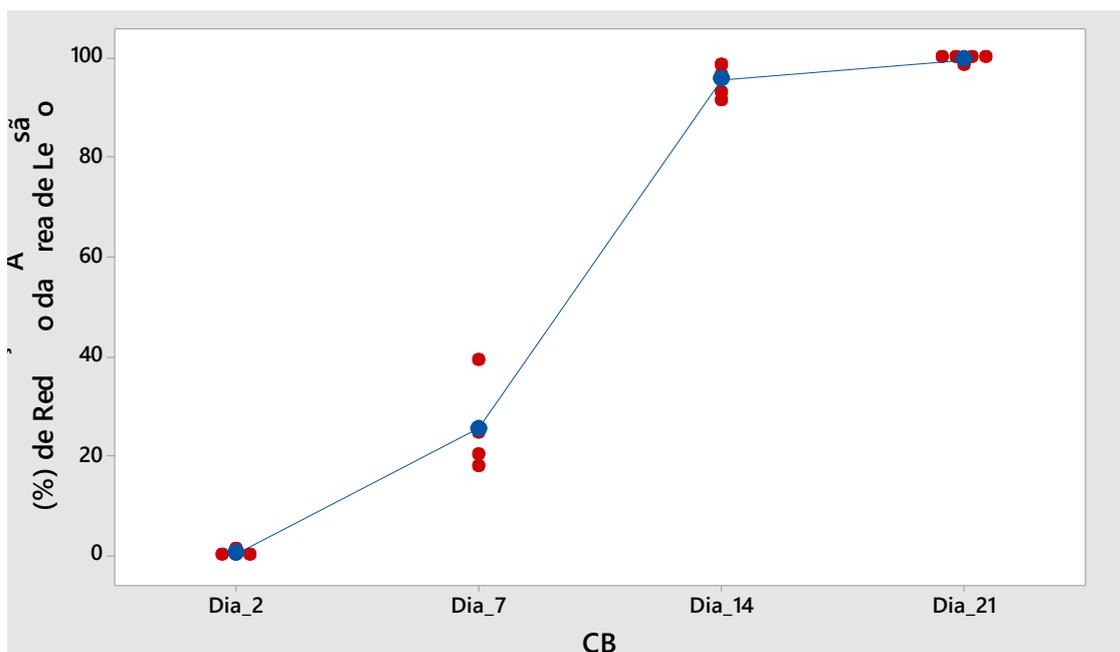


Figura 28 - Gráfico DotPlot da porcentagem da redução da área da lesão tratadas com CB.

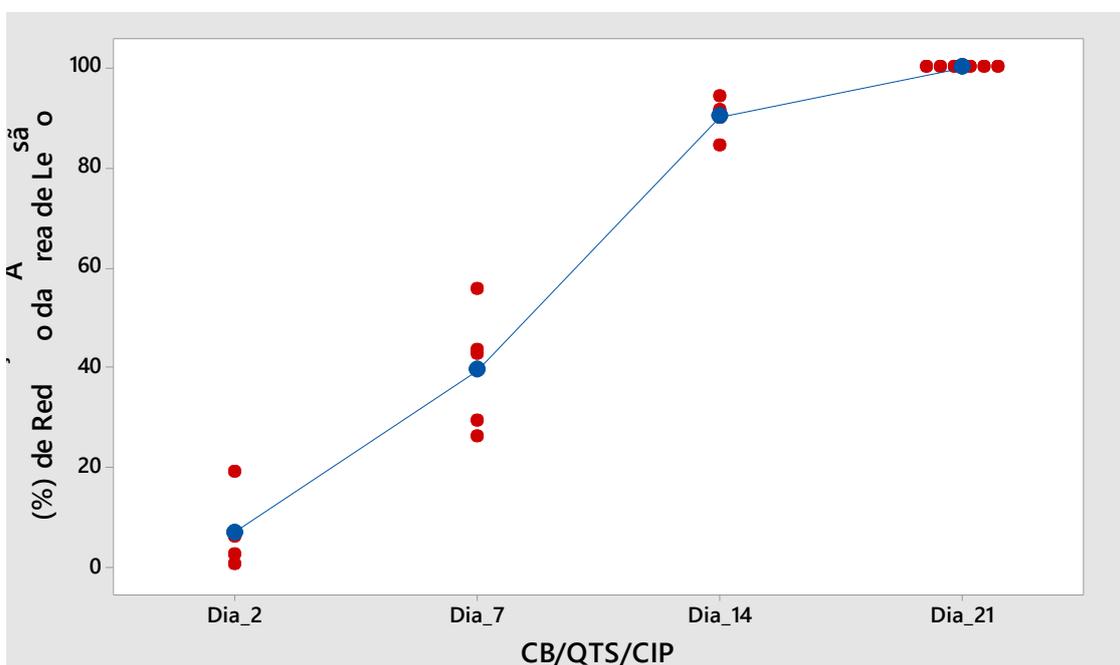


Figura 29 - Gráfico DotPlot da porcentagem da redução da área da lesão tratadas com CB/QTS/CIP.

Outras questões práticas a serem observadas tanto para a CB quanto para o biocurativo desenvolvido é a manutenção da umidade na interface curativo/ferida, a atuação como uma barreira para microrganismos e a não toxicidade ou qualquer sinal de irritabilidade na lesão.

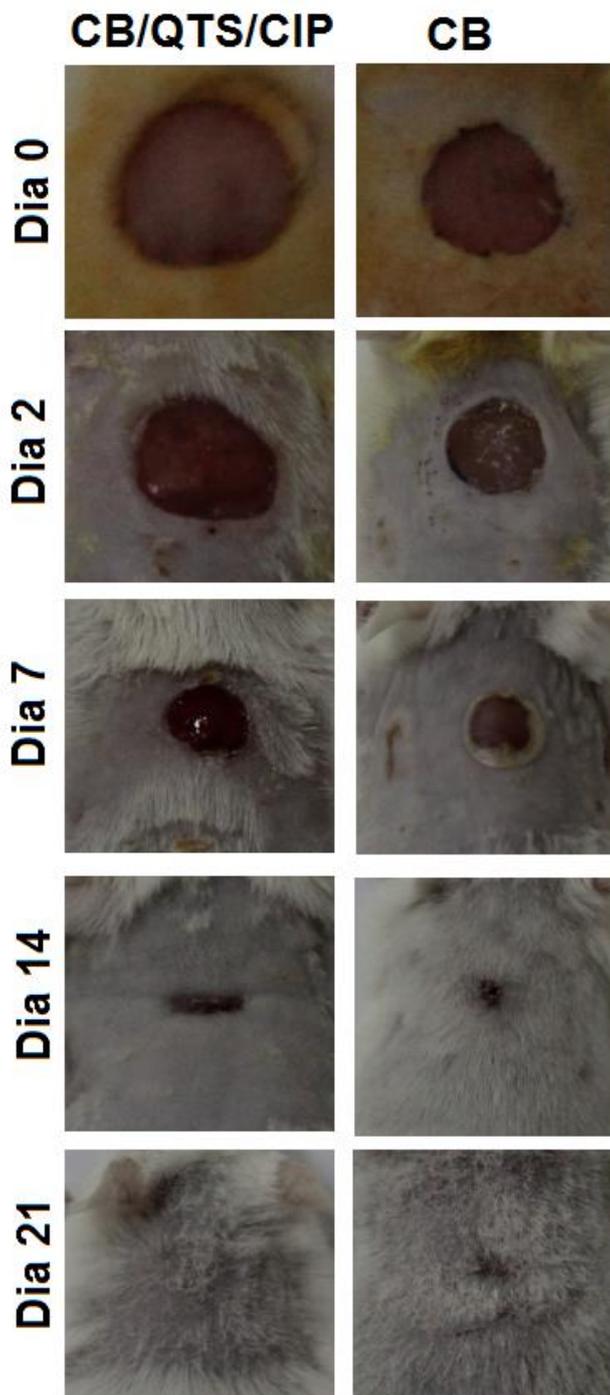


Figura 30 - Acompanhamento clínico das feridas nos dias 0, 7, 14 e 21 dias de experimento com CB e CB/QTS/CIP.

De maneira geral, a cicatrização de uma ferida envolve um complexo e uma orquestrada interação de diferentes tipos de células, principalmente neutrófilos, leucócitos, macrófagos, fibroblastos e queratinócitos. Dessa forma, a taxa rápida de fechamento da ferida observada neste estudo pode ser atribuída ao aumento da proliferação e migração de vários tipos de células para o tecido lesado (BARRIENTOS *et al.*, 2008).

Sobre os possíveis mecanismos de funcionamento tanto do filme de CB/QTS/CIP, tanto a quitosana, que teve maior contato com a pele lesada, quanto para a CB, fornecem uma matriz não proteica para crescimento de tecido com estimulação celular para a proliferação e organização de tecidos. Além disso, pelo fato de serem hemostáticas, ambas ajudam na coagulação do sangue e bloqueiam terminações nervosas, diminuindo a dor (JAYAKUMAR *et al.*, 2011). Para a quitosana, além disso, sabe-se que gradualmente ocorre a despolimerização e é liberado o N-acetil-p-D-glucosamina, que engatilha a proliferação de fibroblastos, ajuda na deposição de colágeno ordenado e estimula o aumento do nível de síntese de ácido hialurônico no local da ferida, conseqüentemente reduzindo o tempo de cicatrização e prevenindo cicatrizes hipertróficas (PAUL e CHARMA, 2004).

Embora ainda não haja na literatura relatos exatos acerca do mecanismo da cicatrização da CB, as impressões obtidas durante o experimento *in vivo* foi que conforme a passagem de tempo, o tecido formado até o 14^o tinha aspecto mais firme quando comparado ao tecido formado pelo filme de CB/QTS/CIP que parecia mais sensível ao movimento e toque. Esse fato foi verificado na cirurgia de retirada de tecido dos animais no 7^o dia de experimento. Esse tipo de afirmação, a princípio qualitativa, só poderá ser confirmada após os resultados da morfohistologia, porém, acredita-se que a reepitelização pode ocorrer das partes mais profundas para a superfície da lesão. Essas evidências têm sido observadas em outro trabalho em andamento pelo grupo em pesquisa clínica empregando curativos a base de celulose bacteriana pura, em que feridas crônicas têm sua profundidade diminuída com posterior redução da área.

Afim de somar à afirmação, Lin e colaboradores em 2013 mediu propriedades de retenção de água em filmes de CB comparando com CB/QTS

e constatou a superioridade da CB nesse aspecto. No presente trabalho, além de quitosana, foi utilizado o glicerol, que devido a sua polaridade, reduz ainda mais a absorvidade de água pelo biocurativo, comparando com a CB. Essa fato, pode corroborar com a teoria da terapia da ferida úmida, criada por Winter em 1962, em que em sua pesquisa pioneira iniciou a conceito de curativo para feridas que cria e mantém as condições ideais necessárias para a regeneração de tecido lesado a partir da manutenção do nível adequado de umidade e temperatura do leito da ferida, acelerando a cura, ativando o desbridamento autolítico, protegendo células recém-formadas, facilitando a angiogênese e a reepitelização e a protegendo de contaminação (CIECHANSKA, 2004).

Acerca da importância do uso do ciprofloxacino no filme desenvolvido, se deve principalmente porque algumas bactérias que colonizam áreas superficiais de feridas, como a *P. aeruginosa*, que se reproduzem no microambiente úmido e quente do tecido lesado, podendo progredir mais profundamente no tecido, levando a sepse e até a morte. Já a *S. aureus* é altamente invasiva e capaz de penetrar a lesão e entrar no tecido subcutâneo onde interfere com as defesas do hospedeiro (BRANSKI *et al.*, 2009). *S. aureus* é frequentemente encontrado no sangue de pacientes com queimadura séptica e outras lesões, o que é uma consequência provável da penetração de tecido lesionado (DE MACEDO, ROSA e CASTRO, 2003).

5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, o biocurativo desenvolvido não demonstrou ser citotóxico e mutagênico. Os testes *in vitro* de liberação demonstraram que as taxas de dissolução não diferenciaram entre a CB e o biocurativo, porém, com vantagem na liberação do antibiótico no início do tratamento, situação em que a ferida está mais susceptível à contaminação. Quanto à área de cicatrização, até o 7^o dia, o diâmetro cicatricial foi maior para o biocurativo, porém, no 14^o dia, a reepitelização foi superior para os animais tratados com CB pura e qualitativamente com formação de tecido mais consistente.

6. REFERÊNCIAS

AGREDA, J. J. S.; BOU, J. E. T. **Atenção Integral nos Cuidados das Feridas Crônicas**. Editora Epub, 488 p. 2012.

ARNOLD JUNIOR, H. L.; ODOM, R. B.; JAMES, W. D., A pele: estrutura básica e função; Doenças básicas da pele de Andrews: **Dermatologia clínica, 8° ed.** Manole, pp.1-14, 1994.

AZEREDO, H. M. C.; MATTOSO, L. H. C.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; CEOTTO FILHO, G.; MUNFORD, M. L.; WOOD, D.; MCHUGH, T. H. Nanocellulose Reinforced Chitosan Composite Films as Affected by Nanofiller Loading and Plasticizer Content, **Journal of Food Science**, v. 75 (1) pp.1–7, 2010.

BARRIENTOS, S.; STOJADINOVIC, O.; GOLINKO, M. S.; BREM, H.; TOMIC-CANIC, M. Growth factors and cytokines in wound healing, **Wound Repair and Regeneration**, v.16, pp.585–601, 2008.

BARUD, H. S.; JÚNIOR, A M. A.; SANTOS, D. B.; ASSUNÇÃO, R. M. N.; MEIRELES, C. S.; CERQUEIRA, D. A.; FILHO, G. R.; RIBEIRO, C. A.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Thermal behavior of cellulose acetate produced from homogeneous acetylation of bacterial cellulose, **Thermochemica Acta**, v. 471 (1–2), pp.61-69, 2008.

BERNSTEIN, L.; KALDOR, J.; MCCANN, J.; PIKE, M. C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the Salmonella test, **Mutation Research**, v. 97(4), pp.267–281, 1982.

BRANSKI, L. K.; AL-MOUSAWI, A.; RIVERO, H.; JESCHKE, M. G.; SANFORD, A. P.; HERNDON, D. N. Emerging infections in burns, **Surgical infections**, v. 10, pp.389–97, 2009.

CIECHAŃSKA, D. Multifunctional Bacterial Cellulose/ Chitosan Composite Materials for Medical Applications, **FIBRES & TEXTILES in Eastern Europe**, v. 12 (4), pp.69-72, 2004.

DE MACEDO, J. L.; ROSA, S. C.; CASTRO, C. Sepsis in burned patients, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, pp.647–52, 2003.

DE SALVI, D. T. B.; BARUD, H. S.; CAIUT, J. M. A.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Self-supported bacterial cellulose/boehmite organic–inorganic hybrid films, **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 63 (2), pp.211–218, 2012.

EL-SAIED, H.; EL-DIWANY, A. I.; BASTA, A. H.; ATWA, N. A.; EL-GHWAS, D. E. Production and characterization of economical bacteria cellulose, **Bioresources**, v. 3 (4) pp.1196-1217, 2008.

INTERNATIONAL CLINICAL STANDARDS. Antimicrobial susceptibility testing protocols. SCHWALBE, R.; STEELE-MOORE, L.; GOODWIN, A. C. (ed). Crc Press, 2007.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 10993-12. **Biological evaluation of medical devices – Part 12: Sample preparation and reference materials**. International Standard, 3 ed. 2007.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 10993-5. **Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity**. International Standard, 3 ed. 2009.

JAYAKUMAR, R.; PRABAHARAN, M.; SUDHEESH KUMAR, P.T.; NAIR, S.V.; TAMURA, H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications, **Biotechnology Advances**, v. 29 (3), pp.322-337, 2011.

JEON, Y. J.; PARK, P. J.; KIM, S. K. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor, **Carbohydrate Polymers**, v. 44, pp.71–76, 2001.

LIN, W-C.; LIEN, C-C.; YEH, H-J.; YU, C-M.; HSU, S-H. Bacterial cellulose and bacterial cellulose–chitosan membranes for wound dressing applications, **Carbohydrate Polymers**, v. 94 (1), pp.603-611, 2013.

LIU, N.; CHEN, X-G.; PARK, H-J.; LIU, C-G.; LIU, C-S.; MENG, X-H.; YU, L-J. Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of Escherichia coli, **Carbohydrate Polymers**, v. 64, pp.60–65, 2006.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, **Mutation Research**, v. 113, pp.173–215, 1983.

MENEGUIN, A. B.; CURY, B. S. F.; DOS SANTOS, A. M.; FRANCO, D. F.; BARUD, H. S.; SILVA FILHO, E. C. Resistant starch/pectin free-standing films reinforced with nanocellulose intended for colonic methotrexate release, **Carbohydrate Polymers**, v. 157, pp.1013–1023, 2017.

MOHSIN, M.; HOSSIN, A.; HAIK, Y. Thermal and Mechanical Properties of Poly (vinyl alcohol) Plasticized with Glycerol, **Journal of Applied Polymer Science**, v. 122, pp.3102–3109, 2011.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay, **Mutation Research**, v.455, pp.29–60, 2000.

NOYES, A. A.; WHITNEY, W. R. The rate of solution of solid substances in their own solutions, **Journal of the American Chemical Society**, v.19 (12), pp.930-934, 1897.

PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitosan and Alginate Wound Dressings: A Short Review, **Trends in Biomaterials & Artificial Organs**, v. 18 (1), pp 18-23, 2004.

PERCIVAL, S. L.; MCCARTY, S. M.; LIPSKY, B. Biofilms and Wounds: An Overview of the Evidence, **Advances in Wound Care**, v. 4 (7), pp. 373–381, 2015.

PEREIRA, A. L.; BACHION, M. M. Tratamento de feridas: análise da produção científica publicada na Revista Brasileira de Enfermagem de 1970-2003, **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 58 (2), 2005.

PETERSEN, N.; GATENHOLM, P. Bacterial cellulose-based materials and medical devices: Current state and perspectives, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, pp.1277–1286, 2011.

HOWELL-JONES, R. S.; PRICE, P. E.; HOWARD, A. J.; THOMAS, D. W. Antibiotic prescribing for chronic skin wounds in primary care, **Wound Repair and Regeneration**, v.14 (4), pp.387–393, 2006.

RANG, M.; DALE, J. **Farmacologia**. 5.ed. Elsevier, 2003.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications, **Progress in Polymer Science**, v. 31, pp.603–632, 2006.

ROHAETI, E.; LAKSONO, E.W.; RAKHMAWATI, A. Bacterial cellulose from rice waste water and its composite which are deposited nanoparticle as an antimicrobial material, **ALCHEMY jurnal penelitian kimia**, v.12 (1), p.70–87, 2016.

S. M. L. SILVA, BRAGA, C. R. C.; FOOK, M. V. L.; RAPOSO, C. M. O.; CARVALHO, L. H.; CANEDO, E. L. In: THEOPHILE, T. (ed) **Application of Infrared Spectroscopy to Analysis of Chitosan/Clay Nanocomposites, Infrared Spectroscopy - Materials Science, Engineering and Technology**, Intech, pp.43-62, (2012).

SAHOO, S.; CHAKRABORTI, C. K.; MISHRA, S. C. Qualitative analysis of controlled release ciprofloxacin/carbopol 934 mucoadhesive suspension, **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 2 (3), pp.195–204, 2011.

SOUSA, J.; ALVES, G.; OLIVEIRA, P.; FORTUNA, A.; FALCÃO, A. Intranasal delivery of ciprofloxacin to rats: A topical approach using a Thermoreversible in situ gel, **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, pp.30-37, 2016.

TAKEO, M.; LEE, W.; ITO, M. Wound Healing and Skin Regeneration, **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5 (1), 2015.

TIN, S.; SAKHARKAR, K. R.; LIM, C. S.; SAKHARKAR, M. K. Activity of Chitosans in combination with antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*, **International Journal of Biological Sciences**, v. 5 (2), pp.153–160, 2009.

TORRES, F. G.; COMMEAUX, S.; TRONCOSO, O. P. Biocompatibility of Bacterial Cellulose Based Biomaterials, **Journal of Functional Biomaterials**, v. 3, pp.864-878, 2012.

WINTER, G. D. Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig, **Nature**, pp.293-294, 1962.

CONCLUSÃO GERAL

De maneira geral, a CB se demonstrou como um material versátil e vantajoso para ambas aplicações e modificações propostas. No capítulo sobre a prensagem, foi possível acelerar o processo de retirada de água sem alterar a estrutura química, o que pode ser considerado como vantajoso para o uso em grande escala. No terceiro capítulo, foi possível produzir a CB com adição de resíduos no meio de cultivo e sem alterar as propriedades da membrana, com vantagem na redução de custos de produção. No quarto e quinto capítulo, em que de fato é utilizada para fins médicos, a CB confirmou sua versatilidade e funcionalidade, tanto na liberação do metronidazol, retardando a dissolução quando utilizada como nanocomposito juntamente com a argila paligorsquita, quanto no desenvolvimento de um biocurativo com quitosana e ciprofloxacino, que na avaliação *in vivo* se demonstrou eficiente na cicatrização de feridas.

COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Parecer do projeto sob o protocolo: nº. 040/17

Título do Projeto: Estudo da utilização de celulose bacteriana com quitosana associada à ciprofloxacino em lesões cutâneas induzidas em modelos experimentais de camundongos.

Pesquisador responsável: Doutor Hernane da Silva Barud

PARECER

O Projeto de Pesquisa intitulado “**Estudo da utilização de celulose bacteriana com quitosana associada à ciprofloxacino em lesões cutâneas induzidas em modelos experimentais de camundongos**”, sob sua orientação e coorientação do doutorando Guilherme Pacheco Pereira e com a colaboração do professor Doutor Nivaldo Antonio Parizotto, da doutoranda Glauce Regina Pigatto e do discente do curso de medicina Gabriel Lucas Martins, foi analisado por este Comitê.

O trabalho tem por objetivo avaliar o efeito de um filme de celulose bacteriana (CB) e quitosana associada ao ciprofloxacino, no processo cicatricial de lesões cutâneas induzidas em camundongos. Para isto, serão utilizados 74 (incluindo teste piloto com 2 animais) camundongos (*Mus musculus*), machos, linhagem *Swiss* com três meses de idade, pesando aproximadamente 25-35g.

A análise do referido projeto encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** por este Comitê.

Os autores, ao concluírem o trabalho devem encaminhar ao CEUA-UNIARA o Relatório Final de Atividades, na íntegra contendo os resultados e conclusões obtidas.

Araraquara, 28 de setembro de 2017.

Relator/Colegiado

