

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

VITÓRIA MARIA MEDALHA COLTURATO

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOCOMPÓSITOS
BASEADOS EM CELULOSE BACTERIANA E COPOLÍMERO
TRIBLOCO PE-PO-PE VISANDO A LIBERAÇÃO CONTROLADA
DE FÁRMACOS

ARARAQUARA, SP

2024

VITÓRIA MARIA MEDALHA COLTURATO

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOCOMPÓSITOS
BASEADOS EM CELULOSE BACTERIANA E COPOLÍMERO
TRIBLOCO PE-PO-PE VISANDO A LIBERAÇÃO CONTROLADA
DE FÁRMACOS**

Dissertação de Mestrado 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 Mestre em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Orientador: Prof. Dr. Hernane da Silva Barud

Coorientadoras: Dr^a. Marina de Lima Fontes e

Dr^a. Aline Ribeiro Passos

ARARAQUARA, SP

2024

C712o Colturato, Vitória Maria

Obtenção e caracterização de biocompósitos baseados em celulose bacteriana e copolímero tribloco PE-PO-PE visando a liberação controlada de fármacos/Vitória Maria Colturato. - Araraquara: Universidade de Araraquara, 2025.
65f.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química medicinal - UNIARA

Orientador: Prof. Dr. Hernane da Silva Barud

1. Celulose bacteriana. 2. Copolímero. 3. PEO-b-PPO-b-PEO. 4. Modificação *in situ* e *ex situ*. 5. Biocompósitos de CB. 6. Sistemas de liberação de fármacos. I. Título.

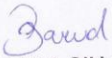
CDU 60


VITÓRIA MARIA MEDALHA COLTURATO

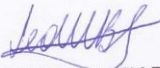
Dissertação apresentada a Universidade de Araraquara - UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Araraquara, 03 de junho de 2024.

BANCA EXAMINADORA


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


Prof. Dr. CLÓVIS AUGUSTO RIBEIRO
Instituto de Química de Araraquara - UNESP


Prof. Dr. LEONARDO MIZIARA BARBOZA FERREIRA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP

RESUMO

Sistemas matriciais capazes de controlarem a liberação de fármacos com consequente melhoria da eficácia terapêutica são de grande interesse para a indústria farmacêutica, principalmente aqueles advindos de fontes naturais e microrganismos, também designados como biopolímeros. A celulose bacteriana (CB) é um biopolímero obtido por rota biotecnológica que apresenta diversas propriedades desejáveis para tal aplicação, e que associada a materiais naturais ou sintéticos pode apresentar propriedades superiores e ainda mais notáveis. Sabe-se que o copolímero em bloco *PEO-b-PPO-b-PEO* possui a capacidade de formar micelas quando em solução aquosa, sendo estas estruturas de grande interesse, principalmente no que se refere ao transporte e liberação controlada de fármacos de uso tópico. Sendo assim, o presente estudo avaliou a incorporação do copolímero tribloco *PEO-b-PPO-b-PEO* com diferentes razões mássicas no meio de cultura *in situ* e *ex situ* para a obtenção de biocompósitos de CB e incorporação de diclofenaco de sódio (DS) em duas diferentes porcentagens (0,5% e 1% m/v), por método de adsorção. As análises físico-químicas e morfológicas confirmaram a presença do copolímero e do DS nas nanofibrilas da CB. A Microscopia Eletrônica de Varredura mostrou os domínios esféricos do copolímero na estrutura 3D da CB, bem como partículas características do DS, embora a homogeneidade e eficiência de incorporação do fármaco nas micelas não foi constatada. Os espectros de FT-IR evidenciaram as principais bandas de CB nativa, e bandas adicionais e deslocamentos dos picos para os biocompósitos de CB/copolímero com e sem DS, inferindo a presença dos materiais na estrutura da CB. A análise de DRX indicou maiores intensidades de picos cristalinos nos biocompósitos modificados *in situ*. A partir da determinação do ângulo de contato, constatou-se que a hidrofobicidade da superfície dos biocompósitos incorporados ou não com o DS não foi alterada significativamente quando comparada a CB nativa. Os testes biológicos *in vitro* demonstraram a atoxicidade dos materiais frente as células de fibroblastos, sugerindo a aplicação dos mesmos na área médico-farmacêutica, exceto os biocompósitos com 1% de DS, que apresentaram citotoxicidade significativa. O ensaio de liberação *in vitro* do DS, evidenciou que os materiais biocompósitos não controlaram a liberação do fármaco ao longo do tempo. Em 5 minutos, 26% (0,5% DS) e 55% (1% DS), alcançando 98% em 120 minutos. O modelo cinético de Peppas foi àquele que melhor representou a cinética de liberação do fármaco oriundo das matrizes dos biocompósitos. Sendo assim, os métodos de modificação *in situ* e *ex situ* provaram a presença do copolímero na estrutura da CB nativa, com alterações tanto da cristalinidade, molhabilidade e estabilidade térmica dos biocompósitos, bem como a atoxicidade frente a células de pele. Entretanto, novas abordagens de incorporação seja de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos precisam ser exploradas, a fim de otimizar o encapsulamento destes fármacos na estrutura das micelas e assim, garantir o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada.

PALAVRAS-CHAVE: Celulose Bacteriana; Copolímero *PEO-b-PPO-b-PEO*; Modificação *in situ* e *ex situ*; Biocompósitos de CB; sistemas de liberação controlada de fármacos.

ABSTRACT

Matrix systems capable of controlling the release of drugs with consequent improvement in therapeutic efficacy are of great interest to the pharmaceutical industry, especially those coming from natural sources and microorganisms, also known as biopolymers. Bacterial cellulose (BC) is a biopolymer obtained through a biotechnological route that presents several desirable properties for such an application, and which, when combined with natural or synthetic materials, can present superior and even more notable properties. It is known that the PEO-b-PPO-b-PEO block copolymer has the ability to form micelles when in aqueous solution, and these structures are of great interest, especially with regard to the transport and controlled release of drugs for topical use. Therefore, the present study evaluated the incorporation of the triblock copolymer PEO-b-PPO-b-PEO with different mass ratios in the *in situ* and *ex situ* culture medium to obtain BC biocomposites and incorporation of diclofenac sodium (DS) in two different percentages (0.5% and 1% w/v), by adsorption method. Physicochemical and morphological analyzes confirmed the presence of the copolymer and DS in BC nanofibrils. Scanning Electron Microscopy (SEM) showed the spherical domains of the copolymer in the 3D structure of the BC, as well as characteristic particles of the DS, although the homogeneity and efficiency of incorporation into the micelles was not verified. The FT-IR spectra showed the main bands of native BC, and additional bands and peak shifts for the CB/copolymer biocomposites with and without DS, inferring the presence of the materials in the BC structure.. XRD analysis indicated higher intensities of crystalline peaks in the *in situ* modified biocomposites. From the determination of the contact angle, it was confirmed that the hydrophilicity of the surface of the biocomposites incorporated or not with DS was not significantly changed when compared to native CB. *In vitro* biological tests demonstrated the non-toxicity of the materials against fibroblast cells, suggesting their application in the medical-pharmaceutical area, except for biocomposites with 1% DS, which showed significant cytotoxicity. The *in vitro* DS release assay showed that the biocomposite materials did not control the release of the drug over time. In 5 minutes, 26% (0.5% DS) and 55% (1% DS), with release up to 98% in 120 minutes. Peppas' kinetic model was the one that best represented the kinetics of drug release from biocomposite matrices. Therefore, the *in situ* and *ex situ* modification methods proved the presence of the copolymer in the structure of the native BC, with changes in both the crystallinity and wettability of the biocomposites, as well as the non-citotoxicity against skin cells. However, novel incorporation methods for both hydrophilic and hydrophobic drugs need to be explored in order to optimize the encapsulation of these drugs in the micelle structure and thus enable the development of controlled release systems.

KEYWORDS: Bacterial cellulose; *PEO-PPO-PEO Triblock Copolymers*; *In situ and Ex situ modification*; BC-based Biocomposites; Controlled Drug Delivery Systems.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais vantagens do desenvolvimento de novas formas farmacêuticas voltadas a liberação controlada de moléculas terapêuticas (Autoria própria).....	11
Figura 2. a) Ilustração da síntese de CB na interface ar/meio líquido por bactérias gram-negativas do gênero <i>Komagataeibacter</i> ; b) Imagem fotográfica da manta gelatinosa de CB obtida após 5 dias de cultivo e que passou pelo processo de purificação em solução de NaOH; c) Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) que evidencia a rede 3D de nanofibras dispostas de maneira aleatória, característico da CB; d) Estrutura química da CB representada por unidades glicosídicas unidas por ligações do tipo β -1 \rightarrow 4 (Autoria própria).....	15
Figura 3. a) Estrutura química do copolímero tribloco PEO-PE-PEO; b) copolímero em solução aquosa; c) Estrutura micelar do copolímero tribloco PEO-PE-PEO após atingir a concentração micelar crítica; d) Representação da incorporação de um fármaco lipofílico entre a região hidrofóbica da micela. Adaptado de Khaliq et al. (2023); Hussein & Youssry (2018).....	19
Figura 4. Microscopia Eletrônica de Varredura da CB nativa (micrografia da esquerda) e Copolímero tribloco PEO-b-PPO-b-PEO (micrografia da direita).	28
Figura 5. Microscopia Eletrônica de Varredura do biocompósito CB/copolímero 0,5% pós modificação <i>Ex situ</i> (micrografia da esquerda) e <i>In situ</i> (micrografia da direita).	29
Figura 6. Microscopia Eletrônica de Varredura do biocompósito CB/copolímero 1% pós modificação <i>Ex situ</i> (micrografia da esquerda) e <i>In situ</i> (micrografia da direita).	29
Figura 7. Microscopia Eletrônica de Varredura do biocompósito CB/copolímero 3% pós modificação <i>Ex situ</i> (micrografia da esquerda) e <i>In situ</i> (micrografia da direita).	29
Figura 8. Microscopia Eletrônica de Varredura do biocompósito CB/copolímero 5% pós modificação <i>Ex situ</i> (micrografia da esquerda) e <i>In situ</i> (micrografia da direita).	30
Figura 9. Microscopia Eletrônica de Varredura do biocompósito CB/copolímero 10% pós modificação <i>Ex situ</i> (micrografia da esquerda) e <i>In situ</i> (micrografia da direita).	30
Figura 10. Difratoogramas de Raios-X das amostras de CB nativa e copolímero tribloco.....	32

Figura 11. Difrátogramas de raios-X dos biocompósitos de 0,5%, 1%, 3%, 5% e 10% de copolímero para o método <i>Ex situ</i> e <i>In situ</i> , respectivamente	33
Figura 12. FT-IR/ATR das amostras de CB nativa e do copolímero tribloco PE-PO-PE.....	34
Figura 13. FT-IR das amostras de biocompósitos de CB/copolímero PE-PO-PE obtidos <i>in situ</i> , nas concentrações de (c) 0,5%; (d) 1%; (e) 3%; (f) 5%; e (g) 10% de copolímero, respectivamente.....	34
Figura 14. FT-IR das amostras de biocompósitos de CB/copolímero PE-PO-PE obtidos <i>ex situ</i> , nas concentrações de (c) 0,5%; (d) 1%; (e) 3%; (f) 5%; e (g) 10% de copolímero, respectivamente.....	34
Figura 15. Termogramas da CB nativa e do copolímero tribloco	35
Figura 16. Termogramas dos biocompósitos de CB/copolímero PE-PO-PE 0,5% obtidos <i>In situ</i> e <i>Ex situ</i>	36
Figura 17. Termogramas dos biocompósitos de CB/copolímero PE-PO-PE 1% obtidos <i>In situ</i> e <i>Ex situ</i>	37
Figura 18. Termogramas dos biocompósitos de CB/copolímero PE-PO-PE 3% obtidos <i>In situ</i> e <i>Ex situ</i>	37
Figura 19. Termogramas dos biocompósitos de CB/copolímero PE-PO-PE 5% obtidos <i>In situ</i> e <i>Ex situ</i>	37
Figura 20. Termogramas dos biocompósitos de CB/copolímero PE-PO-PE 10% obtidos <i>In situ</i> e <i>Ex situ</i>	37
Figura 21. Valores de ângulos de contato (a) e tensão superficial (b) para as amostras de CB nativa (HS) e biocompósitos de CB/copolímero PE-PO-PE obtidos <i>in situ</i> e <i>ex situ</i> , nas concentrações de 0,5, 1%, 3%, 5% e 10% de copolímero, respectivamente	40
Figura 22. Avaliação da viabilidade (%) de células L929 após 24 h de tratamento com as amostras de: Controle de sobrevivência (CS), e biocompósitos de CB/copolímero PE-PO-PE obtidos <i>in situ</i> e <i>ex situ</i> (a e b, respectivamente), nas concentrações de 0,5%, 1%, 3%, 5% e 10% de copolímero. A viabilidade celular (%) foi determinada pelo ensaio colorimétrico utilizando MTT	42
Figura 23. Microscopia Eletrônica de Varredura da CB nativa com 0,5% (esquerda) e 1% de DS (direita).	43
Figura 24. Microscopia Eletrônica de Varredura dos biocompósitos de CB/copolímero 5% <i>in situ</i> com 0,5% (esquerda) e 1% de DS (direita).....	43

Figura 25. Microscopia Eletrônica de Varredura dos biocompósitos de CB/copolímero 5% <i>ex situ</i> com 0,5% (esquerda) e 1% de DS (direita).....	44
Figura 26. Difratoogramas de raios-X da CB incorporada e biocompósitos contendo 5% de copolímero <i>in situ</i> e <i>ex situ</i> incorporados com 0,5% DS e 1% DS.....	Erro!
Indicador não definido.	
Figura 27. FT-IR das amostras de CB nativa incorporado com 0,5% e 1% DS (1 e 2, respectivamente) e dos biocompósitos de CB/copolímero 5% <i>in situ</i> (3 e 4) e <i>ex situ</i> (5 e 6) incorporados com 0,5% e 1% de DS.....	45
Figura 28. Termogramas da CB nativa incorporada com 0,5% de DS (1) e 1% de DS (2).....	46
Figura 29. Termogramas dos biocompósitos de CB/Copolímero 5% <i>in situ</i> , incorporado com 0,5% (3) e 1% de DS (4).	46
Figura 30. Termogramas dos biocompósitos de CB/copolímero 5% PE-PO-PE <i>ex situ</i> , incorporado com 0,5% (5) e 1% de DS (6).....	46
Figura 31. Valores de ângulos de contato (a) e tensão superficial (b) para as amostras de Biocompósitos de CB/copolímero 5% <i>in situ</i> e <i>ex situ</i> , incorporados com 0,5% e 1% de DS.....	48
Figura 32. Avaliação da viabilidade (%) de células L929 após 24 h de tratamento com as amostras: (1) CB nativa incorporado com 0,5% DS, (2) CB nativa incorporado com 1% DS, (3) Biocompósito de CB/copolímero PE-PO-PE 5% obtido <i>in situ</i> incorporado com 0,5% DS, (4) Biocompósito de CB/copolímero PE-PO-PE 5% obtido <i>in situ</i> incorporado com 1% DS, (5) Biocompósito de CB/copolímero PE-PO-PE 5% obtido <i>ex situ</i> incorporado com 0,5% DS e (6) Biocompósito de CB/copolímero PE-PO-PE 5% obtido <i>ex situ</i> incorporado com 1%. A viabilidade celular (%) foi determinada pelo ensaio colorimétrico utilizando MTT.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tabela representativa da espessura da CB nativa e Biocompósitos <i>In situ</i>	31
Tabela 2. Valores das componentes polares e dispersivas dos líquidos sondas (água e diiodometano).	39
Tabela 3. Resultados do ensaio de liberação dos materiais a partir de diferentes modelos matemáticos.....	50

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 <i>Sistemas de liberação de fármacos e biopolímeros</i>	10
1.2 <i>Celulose Bacteriana: propriedades e aplicações</i>	13
1.3 <i>Biocompósitos</i>	16
1.4 <i>Copolímeros: estrutura, organização e aspectos gerais dos sistemas micelares</i>	18
2. OBJETIVOS	21
2.1 <i>Objetivo Geral</i>	21
2.2 <i>Objetivos específicos</i>	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 <i>Obtenção das membranas de Celulose Bacteriana (CB)</i>	22
3.2 <i>Modificação In situ com o Copolímero Tribloco</i>	23
3.3 <i>Modificação Ex situ com o Copolímero Tribloco</i>	23
3.4 <i>Incorporação do Diclofenaco de sódio</i>	24
3.5 <i>Caracterização morfológica e físico-química dos biocompósitos sem e com o fármaco</i>	24
3.6 <i>Ensaio In Vitro de Citotoxicidade dos Biocompósitos sem e com o fármaco</i>	25
3.7 <i>Determinação do Perfil de Liberação in vitro do diclofenaco de sódio</i>	26
3.7.1 <i>Curva de calibração</i>	27
3.7.2 <i>Avaliação do perfil de liberação in vitro</i>	27
3.7.3 <i>Determinação dos modelos cinéticos</i>	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1 <i>Biocompósitos de CB/Copolímero PE-PO-PE</i>	28
4.1.1 <i>Análise Morfológica</i>	28
4.1.2 <i>Difração de Raios-X (DRX)</i>	31
4.1.3 <i>Análise da composição química por FT-IR/ATR</i>	33
4.1.4 <i>Avaliação das propriedades térmicas por Termogravimetria (TGA/DTG)</i>	35
4.1.5 <i>Análise de molhabilidade por Ângulo de Contato (AC)</i>	38
4.1.6 <i>Avaliação da citotoxicidade por método colorimétrico</i>	41
4.2 <i>BIOCOMPÓSITOS 5% CONTENDO 0,5% E 1% DE DICLOFENACO DE SÓDIO</i>	43
4.2.1 <i>Análise Morfológica</i>	43
4.2.3 <i>Análise da composição química por FT-IR</i>	44
4.2.4 <i>Avaliação das propriedades térmicas por Termogravimetria (TGA/DTG)</i>	46
4.2.5 <i>Análise de molhabilidade por Ângulo de Contato (AC)</i>	47
4.2.6 <i>Avaliação da citotoxicidade por método colorimétrico</i>	48
4.2.7 <i>Ensaio de Liberação do Diclofenaco de sódio</i>	49
4. CONCLUSÃO	52
5. PERSPECTIVAS FUTURAS	53
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sistemas de liberação de fármacos e biopolímeros

Nas últimas décadas muitos estudos têm sido focados no desenvolvimento de novas formas farmacêuticas ou sistemas carreadores visando a liberação controlada de fármacos (GARG *et al.*, 2019; SUN *et al.*, 2019; SEVERINO *et al.*, 2019) O princípio básico da liberação controlada de um fármaco concentra-se na entrega do ingrediente ativo diretamente no local de interesse e de sua liberação em velocidade pré-determinada por um período de tempo definido, sem que haja necessidade da administração sucessiva de doses. Diferentemente dos sistemas de liberação convencionais, essa estratégia garante a maximização da eficácia terapêutica, menores custos de tratamento, redução de possíveis efeitos secundários/adversos, e melhor adesão do paciente ao tratamento (NAYAK *et al.*, 2018).

Dada as vantagens de prescrição e administração destes fármacos, e a importância de mais estudos e investimentos nesse segmento, o mercado global de vendas deste setor prevê um faturamento de 124.17 bilhões de dólares até 2032, com uma taxa de crescimento anual de 9.6% entre 2023 a 2032. Dentre os principais impulsionares desse setor está o fármaco TAR-200 (GemRIS™), que permite a liberação controlada de gencitabina, um quimioterápico empregado no tratamento de câncer de bexiga músculo invasivo. Empresas como Merck, Jhonson & Jhonson, Pfizer, Capsugel, atuam como as principais detentoras no desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas, incluindo, implantes, sistemas transdérmicos, lipossomas, microcápsulas, micro/ nanoesferas e hidrogéis (PRECEDENCE RESEARCH, 2022). A Figura 1 evidencia as principais propriedades dos sistemas de liberação controlada:

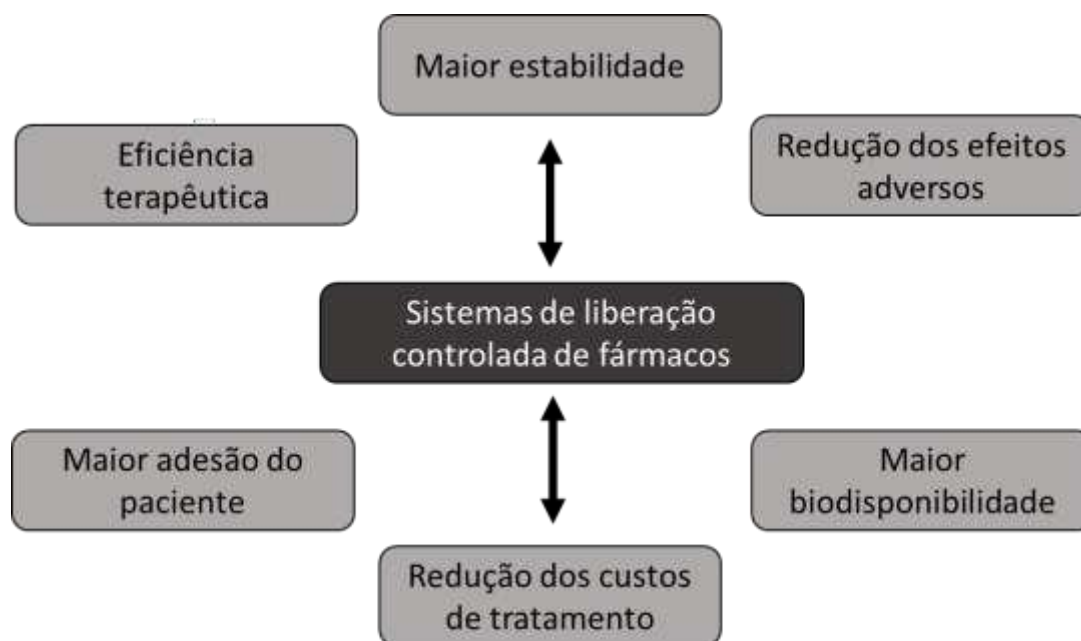


Figura 1. Principais vantagens do desenvolvimento de novas formas farmacêuticas voltadas a liberação controlada de moléculas terapêuticas (Autoria própria).

Ressalta-se que o controle da liberação da substância ativa até o tecido-alvo, concentra-se especialmente em mecanismos de partição, ativação modulada por pressão hidrodinâmica, ativação mecânica, ativação química (responsivo a pH, clivagem enzimática ou reações de hidrólise), bem como a partir de mecanismos envolvendo o uso de sistemas baseados em polímeros. Neste último caso, as primeiras formulações desenvolvidas utilizaram polímeros degradáveis tais como o poliuretano, borracha de silicone e poli(etileno-co-acetato de vinila), sendo o princípio de difusão àquele que predominou e ainda predomina dentre os três principais mecanismos envolvidos com a liberação controlada de fármacos por sistemas poliméricos (KAMALY *et al.*, 2016).

A difusão é governada por (i) movimentos aleatórios do fármaco para a parte externa da matriz polimérica mediante intumescimento e aumento do tamanho dos poros, por (ii) mecanismos que envolvem a permeabilidade e espessura da membrana polimérica, onde as moléculas são passivamente difundidas para fora da matriz, e através da (iii) convecção causada por pressão osmótica, com enfoque para sistemas utilizando membranas semipermeáveis (KAMALY *et al.*, 2016).

Os sistemas poliméricos exibem como principais vantagens, a possibilidade e facilidade na conjugação entre a substância com efeito terapêutico e a matriz

polimérica a partir de uma variedade de ligações químicas (covalentes e não-covalentes), a habilidade de incorporação tanto de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos, a habilidade em liberar macromoléculas, a proteção contra enzimas proteolíticas e componentes do plasma sanguíneo, somado a gama de polímeros quimicamente validados para tal aplicação, e a possibilidade de escalabilidade dos diferentes componentes poliméricos (QING *et al.*, 2022).

Comparado aos polímeros sintéticos convencionais que demonstram uma estrutura mais aleatória e simples, os biopolímeros oriundos de fontes naturais (alginato, quitosana, colágeno, gelatina, amido, fibroína de seda, celulose, ácido hialurônico, dentre outros), configuram-se como moléculas complexas que adotam estruturas tridimensionais definidas, e que são semelhantes as macromoléculas encontradas na matriz extracelular (MEC) (GHEORGHITA *et al.*, 2021). Os biopolímeros tem inúmeras vantagens em relação aos polímeros sintéticos, tais como, baixa toxicidade, biodegradabilidade, sustentabilidade, e elevada hidrofiliabilidade, embora careçam de propriedades térmicas e mecânicas. Suas aplicações se estendem as diferentes áreas, incluindo a área farmacêutica (SHARIATINIA, 2019), cosmética (JUNCAN *et al.*, 2021), alimentos (BARBOSA *et al.*, 2023), agricultura (BLAGA *et al.*, 2022), e no desenvolvimento de dispositivos médicos (KAMEL & KHATTAB, 2020). Ademais, os biopolímeros podem ser empregados em diferentes formas, tais como os filmes, membranas, fibras, esponjas, aerogel, hidrogéis e como invólucros para alimentos (INÁCIO, 2022; GHEORGHITA *et al.*, 2021).

Assim, pode-se dizer que os sistemas matriciais biopoliméricos são de grande interesse da indústria farmacêutica, pois apresentam características físicas e químicas adequadas para tal aplicabilidade (INÁCIO, 2022). Somado a isso, a possibilidade de desenvolver sistemas de liberação controlada de fármacos empregando sistemas baseados em biocompósitos na forma de sistemas micelares, sistemas baseados em micropartículas e/ ou nanopartículas, aumenta ainda mais o interesse por esses materiais (LAZARINI & LUSTRI, 2018).

Os biocompósitos são sistemas compostos por duas ou mais fases, sendo pelo menos um de origem natural, e que pode ser empregado tanto como matriz ou reforço. Recentemente, Busuioc *et al.* (2023), publicaram um estudo com enfoque no

desenvolvimento de filmes biocompósitos em monocamada e multicamadas baseados em álcool polivinílico (PVA) e CB nanofibrilada para a incorporação de tetraciclina. Como resultados obtidos, os autores constataram que a liberação de tetraciclina foi influenciada pela estrutura dos filmes, e pela composição e espessura das camadas. As nanofibrilas de CB provaram ser um fator chave para a liberação controlada do fármaco de escolha, com uma liberação alcançando alguns dias para o sistema multicamadas. Além disso, os biocompósitos evidenciaram manter a estabilidade do fármaco e garantir sua eficiência antimicrobiana.

A CB e seus derivados (etilcelulose, metilcelulose, carboximetilcelulose e hidroxipropilmetilcelulose) são amplamente empregados como excipientes de formulações farmacêuticas e como reservatórios de substâncias ativas. A estrutura química, e a distribuição de seus diferentes grupos funcionais influenciam diretamente na viscosidade e solubilidade, fatores estes que determinam a taxa e tempo de liberação de diferentes fármacos (LUKOVA *et al.*, 2023). Portanto, acredita-se que os polissacarídeos, com destaque para os materiais baseados em celulose, podem ser considerados uma excelente estratégia para a obtenção de novos sistemas de liberação controlada de fármacos.

1.2 Celulose Bacteriana: propriedades e aplicações

A celulose ou biocelulose $(C_6H_{10}O_5)_n$ é o biopolímero mais abundante da natureza, oriundo de fontes vegetais e de micro-organismos, tais como bactérias, fungos ou protozoários (AMARAL *et al.*, 2020). A CB é obtida através do processo de fermentação acética de bactérias gram-negativas pertencentes aos gêneros *Komagataeibacter*, *Agrobacterium*, *Achromobacter*, e *Rhizobium*, tanto em cultivo estático e agitado, a partir do uso de meios sintéticos e não sintéticos. A CB também pode ser designada como nanocelulose cristalina ou celulose nativa (LEAL *et al.*, 2020; MARESTONI *et al.*, 2020).

O primeiro relato da obtenção de CB foi descrito por Brown em 1886, que observou a formação de uma película gelatinosa sobre a interface ar/meio líquido oriunda do cultivo da anteriormente denominada *Gluconacetobacter xylinus* (formalmente designada como *Komagataeibacter xylinus*) em meio a base de vinagre (BROWN, 1886)

Classificada como um homopolímero natural, a CB é constituída de unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 4). Sua estrutura química possui três hidroxilas livres por unidade glicosídica que interagem entre si por meio de ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares. Contudo, a CB também conta com ligações do tipo Van der Waals e hidrofóbicas, que levam a formação das cadeias paralelas (CLARO *et al.*, 2022).

Macroscopicamente, a CB constitui-se como uma membrana altamente hidratada, que pode apresentar diferentes formatos e tamanhos, dependendo do aparato onde a cepa bacteriana é cultivada, enquanto microscopicamente, a CB é formada por uma rede tridimensional de nanofibrilas (com diâmetro que varia entre 2 a 4 nm e 100 nm de largura), semelhante as fibras colágenas presentes na MEC, e que lhe garante uma elevada área superficial, elevada resistência mecânica, e elevada capacidade de retenção de água (teor superior à 90%) (DE OLIVEIRA BARUD *et al.*, 2016). Somado a isso, diferentemente da celulose oriunda da parede das plantas, a CB possui elevada pureza química, e é atóxica, tornando-a um biopolímero excepcional para a área biomédica (TROVATTI *et al.*, 2016; PICHETH *et al.*, 2017).

Sabe-se que o meio de cultivo utilizado, o pH do meio, a porcentagem de oxigênio e o modo de cultivo (estático ou agitado), podem influenciar diretamente nas características morfológicas e físicas da CB (DE OLIVEIRA BARUD *et al.*, 2016; LIYASKINA *et al.*, 2017). A Figura 2 apresenta a síntese da película de CB em meio de cultura estático, oriundo do cultivo de bactérias do gênero *Komagataeibacter* em meio *Hestrim Schramm* (HS), e sua rede 3D de nanofibras que tem como unidade fundamental cadeias glicosídicas unidas por ligações do tipo β -1 \rightarrow 4.

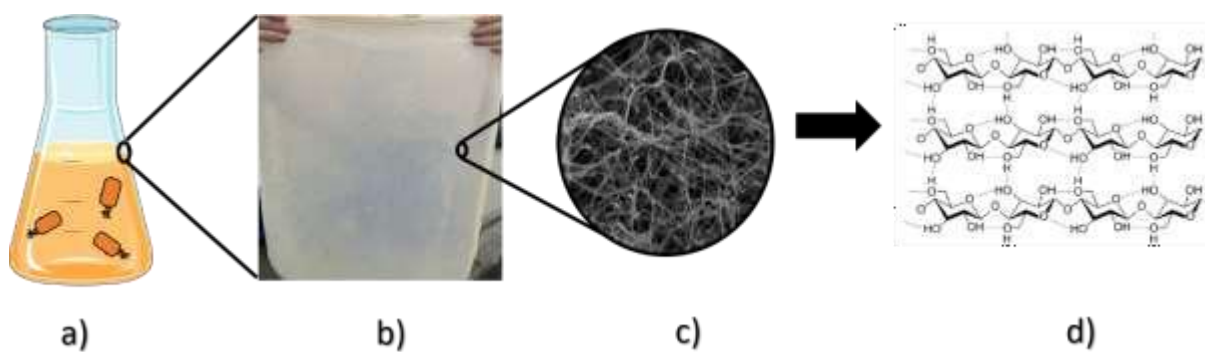


Figura 2. a) Ilustração da síntese de CB na interface ar/meio líquido por bactérias gram-negativas do gênero *Komagataeibacter*; b) Imagem fotográfica da manta gelatinosa de CB obtida após 5 dias de cultivo e que passou pelo processo de purificação em solução de NaOH; c) Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) que evidencia a rede 3D de nanofibras dispostas de maneira aleatória, característico da CB; d) Estrutura química da CB representada por unidades glicosídicas unidas por ligações do tipo β -1 \rightarrow 4 (Autoria própria).

Diante do supracitado, a CB tem sido amplamente empregada nas áreas de alimentos e embalagens, eletrônica, cosmética, têxtil, fabricação de papel funcional, bioengenharia e engenharia tecidual, especialmente com o desenvolvimento de *scaffolds* de CB/hidroxiapatita e novos biocurativos para o tratamento de feridas crônicas. Na área médica, a CB também tem sido empregada como constituinte de válvulas cardíacas, no revestimento de *stents*, implantes de cartilagem e menisco (MARESTONI *et al.*, 2020; ARAUJO *et al.*, 2018; LAZARINI *et al.*, 2018; BARUD *et al.*, 2016; LUSTRI *et al.*, 2015).

Diferentes abordagens metodológicas demonstram a potencialidade da CB como matriz ou reforço de sistemas de liberação de fármacos. Dentre os fármacos incorporados na matriz de CB, cita-se o diclofenaco de sódio (DS), doxorrubicina, ibuprofeno e tetraciclina, destinados tanto para o tratamento de feridas de pele, como também para o tratamento de diferentes tipos de câncer. Como exemplo, microesferas baseadas em CB/óxido de grafeno reduzido (rGO) foram preparadas através da incorporação *in situ* de GO durante o cultivo sob agitação da cepa *Komagataeibacter medellinensis* (ID13488). Após secagem por liofilização, as microesferas foram empregadas para a incorporação de ibuprofeno. Os resultados de liberação *in vitro* demonstraram uma liberação de 63% do fármaco após 6 h de ensaio. O estudo ainda demonstrou a possibilidade em projetar sistemas de liberação baseados em CB responsivo a eletroestímulos, tendo em vista as propriedades condutivas do rGO (URBINA *et al.*, 2020). Chanabodeechalermrung e

colaboradores (2022), também reportaram o desenvolvimento de materiais baseados em CB/alginate, CB/pectina e CB/alginate/pectina preparados em diferentes razões mássicas (m/v), com posterior reticulação com cloreto de cálcio (CaCl) e secagem por liofilização para a obtenção de materiais semelhantes a esponjas. Em seguida, o fármaco PHMB (polihexametileno biguanida), um potente antimicrobiano, foi incorporado e avaliado quanto a eficiência de encapsulação e atividade biológica. Dentre os resultados obtidos, constatou-se uma maior resistência mecânica, maior intumescimento, e maior eficiência de incorporação do fármaco no sistema constituído por CB/alginate, evidenciando uma liberação controlada do PHMB em tampão Tris-HCl, pH 7.4. Somado a isso, os autores reportaram boa atividade antibacteriana frente aos patógenos *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, e atoxicidade frente a queratinócitos humanos.

Portanto, o uso da CB combinada a outras partículas ou materiais poliméricos orgânicos e inorgânicos, assume propriedades adicionais e que pode encontrar aplicações em diversas áreas, inclusive no campo de *drug delivery* (TERCJAK *et al.*, 2015).

1.3 Biocompósitos

Com o avanço da biotecnologia, tem-se explorado a interação entre diferentes matrizes biopoliméricas derivadas de plantas e de diferentes tipos de animais, tais como a celulose, amido, quitina, ácido poli-L-lático (PLA), hidroxialcanoatos (PHA), poli-3-hidroxi-butirato (PHB), com materiais de reforço, seja de origem fóssil (fibras de vidro, nanotubos de carbono, argilas, sílica, e grafite), assim como os bio-baseados, incluindo fibras oriundas da madeira, a seda e a lã de origem animal, e a juta, quenafe, cânhamo e linho, oriundos da biomassa agrícola. Essas interações têm com o intuito otimizar as propriedades dos materiais nomeados biocompósitos e ofertar características adicionais que atendam às necessidades do mercado, especialmente no que se refere as melhorias de desempenho e baixo custo (NAGALAKSHMAIAH *et al.*, 2019)

O termo biocompósito se refere tanto aos compósitos onde apenas um componente é de origem biológica/biodegradável, assim como quando ambos os componentes são de base biológica. É importante ressaltar que na combinação

entre uma matriz de origem renovável com um reforço de origem sintética, ou na combinação de uma matriz sintética com um reforço natural, os materiais são parcialmente biodegradáveis, enquanto na interação entre uma matriz e reforço de origem natural, esses materiais são ditos como biocompósitos verdes, termo conhecido como *Green Biocomposites* (NAGALAKSHMAIAH *et al.*, 2019).

A interação sinérgica entre o reforço e a matriz confere ao biocompósito propriedades superiores em comparação com os componentes vistos de forma separada. O componente de reforço possui como principais atribuições, o aumento da rigidez, da resistência ao calor, corrosão e condutividade do biocompósito, enquanto a matriz contribui para a processabilidade e proteção do material de reforço (MANU *et al.*, 2022; VENTURA, 2009). A utilização de constituintes de origem natural em biocompósitos torna-os particularmente atrativos para a indústria, tanto em termos de viabilidade econômica quanto de responsabilidade ambiental.

Na esfera biológica, a aplicação dos biocompósitos se estende a diversos campos, incluindo o uso em implantes (VALENTE *et al.*, 2020), suturas (SPALEK *et al.*, 2022), aparelhos dentários (FURTOS *et al.*, 2016) e enxertos cardíacos (WERTHEIMER *et al.*, 2021). Na indústria farmacêutica, os biocompósitos oferecem a capacidade de controlar as taxas de liberação de fármacos e aumentar sua meia-vida. Isso é possível devido à configuração molecular extensa dos polímeros, que pode interagir com outras estruturas por meio de ligações covalentes ou não-covalentes, aprimorando a solubilidade, estabilidade e permeabilidade dos fármacos (LOPES *et al.*, 2015).

Uma abordagem para modular a liberação controlada de fármacos foi proposta por Bodhibukkana *et al.* (2006), que investigaram a obtenção de polímeros molecularmente impressos (MIP) baseados em celulose bacteriana (CB) para a liberação transdérmica de propranolol. Os MIPs foram sintetizados pela copolimerização *in situ* da CB utilizando ácido metacrílico e dimetacrilato de etilenoglicol como agentes de reticulação. Os resultados indicaram melhorias no transporte seletivo do propranolol através da pele. Além disso, termoplásticos biodegradáveis solúveis em água, como poli(óxido de etileno) e poli(álcool vinílico), têm sido empregados na produção de biocompósitos à base de CB.

1.4 Copolímeros: estrutura, organização e aspectos gerais dos sistemas micelares

Um copolímero é uma macromolécula formada por mais de um tipo de monômero com repetições distintas que interagem entre si por meio de ligações químicas. De acordo com a disposição de seus monômeros, os copolímeros podem ser divididos em quatro classes: em bloco, alternado, estatístico, e enxertado (YOKOYAMA, 1992). Tratando-se dos copolímeros em bloco, estes são uma classe específica de copolímeros, nos quais as unidades monoméricas são agrupadas em bloco ao longo da cadeia polimérica. Essas macromoléculas podem ser configuradas em arquiteturas moleculares lineares, ramificadas e cíclicas (AGUDELO, 2015). As estratégias para a síntese dos copolímeros incluem principalmente: (1) a adição sequencial de monômeros através de técnicas de polimerização controlada; e (2) reações de acoplamento que exploram as extremidades ativas dos diferentes segmentos de cada cadeia (FENG *et al.*, 2017).

Dentre os polímeros sintéticos, destacam-se os copolímeros de estrutura tribloco A-B-A. Este tipo de copolímero foi sintetizado pela primeira vez em 1950 pela BASF Corporation, apresentando como constituintes dois grupos hidrofílicos laterais de poli(óxido de etileno) (PEO) e um grupo lipofílico central de poli(óxido de propileno) (PPO). Atualmente são comercializados com diferentes denominações, sendo elas, Pluronic®, Poloxamers®, Synperonic® e Tetronic® (FREITAS *et al.*, 2023).

Pluronic tem um custo relativamente barato devido à sua rota sintética simples que ocorre por meio de polimerização de adição. Em geral, a fase de iniciação da síntese envolve a polimerização das unidades de óxido de propileno (PO) e subsequentemente, os grupos etóxi (EO) crescem em ambos os lados da cadeia PPO. Assim, podem ser obtidas cadeias poliméricas com diferentes comprimentos dos blocos PEO-PPO-PEO, que depende da quantidade de monômeros iniciadores, sendo mais de cinquenta copolímeros Pluronic diferentes disponíveis comercialmente (FREITAS *et al.*, 2023).

Os copolímeros Pluronic são surfactantes não iônicos, anfílicos, que apresentam boa dispersão em água, além de excelentes propriedades umectantes. Em relação às aplicações na área farmacêutica, eles têm sido empregados como

excipientes em diferentes formulações, incluindo o desenvolvimento de novas nanopartículas (NPs), bem como em aplicações envolvendo novos carreadores de fármacos, garantindo-lhes propriedades umectantes, maior espalhabilidade, além de formas farmacêuticas emulsificantes e espumantes. Para formulações intravenosas, o Pluronic também minimiza a tensão superficial entre a forma farmacêutica contendo o ingrediente ativo e as proteínas plasmáticas, aumentando o seu tempo de meia-vida na circulação sanguínea (FREITAS *et al.*, 2023; ZARRINTAJ, 2023).

Uma propriedade extremamente interessante desses copolímeros é a capacidade das moléculas individuais se auto-organizarem em micelas quando em solução aquosa. As micelas podem possuir a forma esférica, de bastonete e lamelar, dependendo para isso da massa molar dos blocos de EO e PO, da concentração do copolímero (concentração micelar crítica, CMC) e da temperatura empregada durante a reação. Sabe-se que todas as estruturas micelares possuem um núcleo hidrofóbico devido à presença das cadeias de PO e uma extremidade hidrofílica formada por cadeias de EO disposta em volta do núcleo, garantindo o aprisionamento de diferentes fármacos (hidrofílicos ou lipofílicos) em sua estrutura micelar (HUYSECOM *et al.*, 2023; KHALIQ *et al.*, 2023; PANKAJ *et al.*, 2022; AGUDELO, 2015).

A Figura 3 representa a estrutura molecular do copolímero em bloco PEO-PPO-PEO, a estrutura básica de uma micela após atingir a CMC, e a incorporação de um fármaco lipofílico, tal como o diclofenaco de sódio (DS) sobre a rede hidrofóbica da micela.

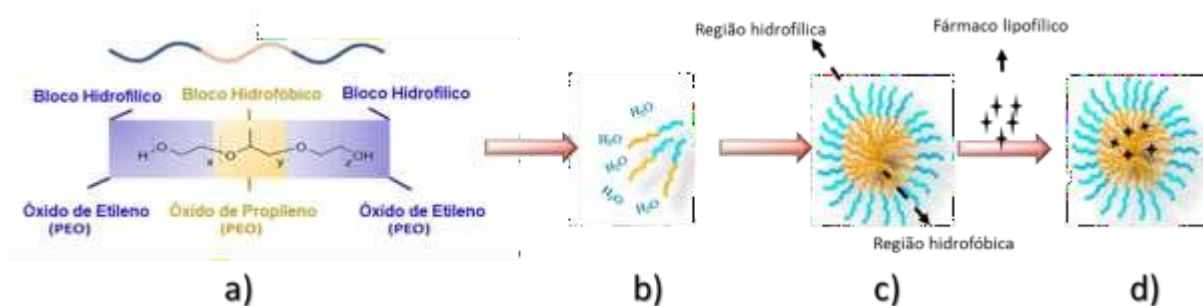


Figura 3. a) Estrutura química do copolímero tribloco PEO-PE-PEO; b) copolímero em solução aquosa; c) Estrutura micelar do copolímero tribloco PEO-PE-PEO após atingir a concentração micelar crítica; d) Representação da incorporação de um fármaco lipofílico entre a região hidrofóbica da micela. Adaptado de Khaliq et al. (2023); Hussein & Youssry (2018).

Ressalta-se que o tamanho da micela é um elemento crucial para garantir que o fármaco seja liberado de forma controlada, exercendo impacto direto em sua biodisponibilidade. A faixa de tamanho das micelas mais explorada para tal aplicação está entre de 10 a 100 nm, tamanho esse que permite a incorporação eficaz do fármaco nas vesículas endocíticas, facilitando o transporte para o tecido-alvo e, assim, promovendo uma distribuição mais eficiente (KHALIQ *et al.*, 2023; ISHIDA *et al.*, 1999). Outro aspecto relevante na formação das micelas é a temperatura micelar crítica (MCT). Para a maioria dos copolímeros, a faixa ideal de temperatura está entre 25 °C a 40 °C. Nesse intervalo, ocorre a desidratação progressiva das cadeias de PO e EO, tornando-os insolúveis em solução aquosa, culminando com a formação das micelas (AGUDELO, 2015).

Sahu *et al.* (2010) avaliaram a eficiência de encapsulação de curcumina nas micelas do copolímero F68 utilizando método de hidratação de filmes finos, seguido da liofilização. O F-68 é composto por uma média de 25-30 unidades no segmento PPO e 75-85 unidades de PEO em cada segmento. A eficiência de incorporação foi de 25,72% quando a razão 1:5 (fármaco/copolímero) foi empregada. Por outro lado, quando os autores aumentaram a razão para 1:50, a eficiência de incorporação foi de 70,24%. Pelo ensaio de liberação *in vitro*, constatou-se que 20% do fármaco foi liberado nas primeiras 4 h, alcançando 80% em 240 h. O tempo estimado para liberar 50% do fármaco foi de 36 h.

Tercjak e colaboradores (2015) avaliaram os efeitos da modificação *in situ* do meio de cultura para a síntese de CB a partir da adição do copolímero em bloco F68 em diferentes razões mássicas (0,5, 1 e 1,5% m/v). Os resultados de ATR-FTIR demonstraram a interação entre a CB/F68, com o deslocamento do pico em 3345 cm⁻¹ equivalente ao estiramento de O-H, evidenciando a interação química entre o grupo OH de BC e o bloco EO do copolímero. Adicionalmente pela análise de DRX dos biocompósitos de BC/F68, foi constatado a presença de três picos cristalinos em 14,9 °, 17,2 ° e 23 ° na região de 2θ, característico da celulose I, com um sutil aumento do índice de cristalinidade de 77% para CB nativa para 79-82% nos diferentes biocompósitos de CB/F68. As análises de Microscopia de Força Atômica (AFM), demonstraram a presença de uma estrutura tridimensional de fibras em todos os biocompósitos, sem alteração significativa no diâmetro das fibras (25-100 nm), embora com a adição de 1% de copolímero, tenha sido observado a presença de

domínios bem dispersos entre as fibras (diâmetro de 25-50 nm) e a partir da adição da 1,5% de copolímero, constatou-se o recobrimento da superfície da CB em diferentes áreas. Influência significativa foi observada em relação a nanorugosidade média (Ra) da CB pura frente aos biocompósitos, com valores de 55 nm frente a 130 nm para o biocompósito contendo 3% de copolímero, respectivamente. Contudo, ainda não existem trabalhos que avaliaram a influência de diferentes métodos de modificação (*in situ* e *ex situ*) para a obtenção de biocompósitos de CB/copolímero tribloco PE-PO-PE como um sistema matricial para a liberação controlada de fármacos.

Considerando o exposto, esse estudo visou avaliar a aplicabilidade de biocompósitos de CB/copolímero tribloco PE-PO-PE como um potencial sistema de liberação controlada do DS, sendo este o fármaco modelo do estudo. Para tal, diferentes razões mássicas do copolímero Pluronic® F68 foram empregadas durante os métodos de modificação *in situ* e *ex situ*, com posterior avaliação de suas propriedades morfológicas, físico-químicas, do perfil de liberação *in vitro* do DS e avaliação da citotoxicidades dos biocompósitos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo desse estudo concentrou-se na obtenção e caracterização físico-química de biocompósitos de CB/copolímero tribloco PE-PO-PE obtidos através da modificação *in situ* e *ex situ*, e na investigação da aplicabilidade destes materiais como um possível sistema de liberação controlada de fármacos, utilizando como fármaco modelo, o diclofenaco de sódio.

2.2 Objetivos específicos

- I. Obter biocompósitos baseados em celulose bacteriana/copolímero PE-PO-PE utilizando diferentes razões mássicas durante o cultivo *in situ* e *ex situ* de bactérias do gênero *Komagataeibacter* (AF1).
- II. Caracterizar os biocompósitos sem e com fármaco, quanto à morfologia,

composição estrutural, índice de cristalinidade, estabilidade térmica, molhabilidade e transparência , utilizando as técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (FT-IR), Difração de raios-X (DRX), análise termogravimétrica (TGA/DTG), Ângulo de contato (AC) e Espectroscopia de UV-Vis.

- III. Realizar os testes de incorporação e liberação *in vitro* do diclofenaco de sódio nas concentrações de 0,5% e 1% (m/v) nos biocompósitos deCB/5% Copolímero PE-PO-PE.
- IV. Realizar o ensaio de citotoxicidade *in vitro* a fim de verificar a não toxicidade dos biocompósitos obtidos sem e com o fármaco.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção das membranas de Celulose Bacteriana (CB)

A produção das membranas de CB foi realizada em parceria com a empresa HB Biotech de Araraquara/SP. Para a produção da CB, utilizou-se a cepa AF1 (*Komagateibacter rhaeticus*) em meio de cultivo HS, que apresenta a seguinte composição básica: 2% (m/v) glicose, 0,5% (m/v) peptona, 0,5% extrato de levedura, 0,27% (m/v) fosfato dissódico anidro e 0,115% (m/v) ácido cítrico monohidratado. Após o preparo do pré-inóculo e inóculo, obedecendo 10% do volume das bandejas de cultivo, as membranas de CB foram obtidas após 8 dias de cultivo, sob modo estático a 28 °C. Para a remoção dos microrganismos, realizou-se a etapa de purificação através de um tratamento químico utilizando solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M por 40 minutos a 80 °C, sendo posteriormente lavada com água destilada até atingir pH neutro. As membranas de CB purificadas foram utilizadas tanto como controle (CB nativa), como também para a obtenção dos biocompósitos oriundos da modificação *ex situ*, apresentado no tópico 3.3.

3.2 Modificação *In situ* com o Copolímero Tribloco

O copolímero Pluronic® F-68 foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich ® (CAS: 9003-11-6).

Os biocompósitos obtidos a partir da modificação *in situ* foram preparados de acordo com o método descrito por Tercjak et al. (2015), desenvolvido em parceria com o nosso grupo de pesquisa, BioPolMat.

Na síntese dos biocompósitos, diferentes porcentagens do copolímero foram incorporadas no meio de cultura convencional (HS). Assim, porcentagens de 0,5%, 1%, 3%, 5% e 10% m/v foram adicionadas a um frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 90 mL de meio HS e 10 mL de pré-inóculo contendo a cepa AF1. Após um período de 8 dias de cultivo em estufa com circulação de ar, sob condições estáticas a 28 °C, as membranas gelatinosas resultantes foram obtidas. Posteriormente, as membranas modificadas com o copolímero foram lavadas com água destilada para a remoção do excesso de meio e submetidas a etapa de purificação com NaOH 0,1 M, conforme método descrito no tópico anterior. Com o término da purificação, os materiais foram secos em estufa com circulação de ar a 40 °C por 8 horas para seguirem com as caracterizações morfológicas, físico-químicas e biológicas.

3.3 Modificação *Ex situ* com o Copolímero Tribloco

As membranas obtidas após o cultivo somente em meio HS (tópico 3.1.) foram recortadas nas dimensões de 10 cm x 10 cm posterior incorporação do copolímero tribloco, obedecendo as mesmas razões mássicas descritas anteriormente. Sendo assim, as diferentes porcentagens de copolímero (0,5%, 1%, 3%, 5% e 10%), foram previamente solubilizadas em 100 mL de água destilada, e simultaneamente, o excesso de água das membranas de CB foi removido com auxílio de papel filtro. Em seguida, as membranas de CB foram imersas nas diferentes soluções de copolímero F-68, permanecendo em agitação por um período de 12 horas. Com o término da modificação *ex situ*, os materiais também foram secos em estufa com circulação de ar, conforme descrito na seção anterior.

3.4 Incorporação do Diclofenaco de sódio

A incorporação do DS (S0765000 - Sigma-Aldrich®) em filmes de CB nativa e biocompósitos de CB/copolímero foi realizada de acordo com método proposto por Silva et al. (2014). Para a incorporação, optou-se por utilizar apenas os filmes de CB/copolímero 5% pós modificação *in situ* e *ex situ*, respectivamente. Portanto, 8 cm² de cada membrana drenada foi empregado para a incorporação de duas diferentes concentrações de DS: 0,5% (m/v) e 1% (m/v). Previamente a essa etapa, o DS foi mantido *overnight* em solução salina tamponada, pH 7.4 para completa dissolução. Após a solubilização, 8 mL de cada solução contendo o fármaco foi vertida sobre as membranas drenadas e mantidas por 48 horas em temperatura ambiente. Para finalizar, as membranas foram secas em temperatura de 40°C por 12 horas. A incorporação de DS 0,5% e 1% foi conduzida em duplicata para cada membrana.

3.5 Caracterização morfológica e físico-química dos biocompósitos sem e com o fármaco

As membranas de CB nativa, o copolímero PE-PO-PE e os biocompósitos de CB/copolímero PE-PO-PE com e sem fármaco foram caracterizados morfológicamente pela técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV-FEG, Modelo JSM IT500HR). O preparo das amostras consistiu na deposição de uma camada fina de carbono a fim de torná-las condutoras. Estruturalmente os materiais foram caracterizados por Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (FTIR) utilizando o espectrofotômetro Agilent Cary 630 e por Difractometria de raios-X (DRX), empregando o equipamento DRX-6000, Shimadzu. Os espectros de FT-IR foram obtidos na faixa de 4000 cm⁻¹ a 600 cm⁻¹, com um total de 32 varreduras e resolução de 4 cm⁻¹. Os parâmetros para a análise de DRX envolveu o uso de radiação CuK α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), com tensão de 40 kV, corrente de 30 mA, e varredura angular de 5° a 70° (ângulo de Bragg - 2θ) e passo angular de 0,02 por segundo. Tratando-se da análise térmica, 5 mg de cada amostra foram submetidas a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min em uma faixa de 29 °C a 700 °C, sob um fluxo de ar sintético de 100 mL/min⁻¹. O equipamento utilizado para a avaliação de perda de massa *versus* temperatura foi o TGA Q600 SDT (TA Instruments). A determinação

da alteração da molhabilidade da superfície dos diferentes materiais foi realizado através da medição do ângulo de contato em goniômetro Ramé-Hart modelo 260-F, por meio da avaliação de dois líquidos-sonda: água deionizada e diiodometano. Cada amostra foi submetida à medição de três gotas, sendo cada medição repetida três vezes, perfazendo um total de nove medidas por amostra. Através da teoria de Young-Laplace (WU, 2007), foram determinadas as propriedades hidrofílicas/hidrofóbicas do material, assim como sua tensão superficial. Esse processo envolveu a aplicação das equações e parâmetros estabelecidos por Wu et al. (1971). Para calcular esses parâmetros, foi empregado o método harmônico utilizado em superfícies poliméricas, conforme descrito por Wu (CHIBOWSKI; TERPILOWSKI, 2009).

3.6 Ensaio *In Vitro* de Citotoxicidade dos Biocompósitos sem e com o fármaco

Para o ensaio, utilizou-se fibroblastos murino derivados de tecido conjuntivo (L929) adquiridos da ATCC (*American Type Culture Collection*), que foram gentilmente cedidas pelo laboratório da Prof^a. Gisele Faria da Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP.

Inicialmente, as células foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e antibióticos (penicilina 100 U/mL; estreptomicina 0,1 mg/mL), com posterior incubação em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após 2 repiques consecutivos, iniciou-se o ensaio de citotoxicidade, empregando uma concentração de 2x10⁴ células/poço, que foram incubadas em placa de 96 poços. A placa foi mantida por 24 h em incubadora, respeitando os mesmos parâmetros de temperatura e porcentagem de CO₂ descritos anteriormente.

Paralelamente ao plaqueio das células, os meios de extração (tratamento) empregando os filmes de CB pura e os biocompósitos de CB/Copolímero tribloco PE-PO-PE com e sem incorporação do fármaco modelo foram preparados de acordo com a ISO 10993-12. Para tal, 3 cm² de cada filme foi disposto em tubo cônico com a adição de 3 mL de meio de cultura (DMEM + 10% de soro fetal bovino). Os filmes

em contato com o meio foram deixados sob agitação por 24 h a 37°C. Finalizado o período de agitação, os meios foram filtrados em filtro de seringa 0.22 µm. Após a filtragem, estes foram adicionados sobre a monocamada celular empregando 100 µL/poço, seguido da incubação em estufa de CO₂ por mais 24 h. Decorrido as 24 h de tratamento, os meios de extração foram removidos, seguido da lavagem com *Phosphate Buffer Saline* (PBS) por duas vezes consecutivas. Finalizado essa etapa, 100 µL de MTT (*3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide*) previamente diluído na concentração de 1 mg/mL foram adicionados em cada poço. A placa foi novamente incubada a 37°C, ao abrigo da luz, até a observação da formação dos cristais violeta de formazana (3 horas). Finalizado o período de incubação, o MTT foi retirado dos poços e os cristais de formazana formados foram dissolvidos adicionando-se 50 µL de álcool isopropílico absoluto.

Os valores de absorbância (Abs) foram obtidos em espectrofotômetro de microplacas (SoftMax® Pro 5), com leitura em comprimento de onda a 570 nm. Como controle de morte celular (controle positivo), as células foram tratadas com DMSO (Dimetilsulfóxido) a 10% e como controle de sobrevivência (controle negativo), as células foram tratadas com DMEM + 10% SFB. Os experimentos foram conduzidos em triplicata, em três ensaios independentes, incluindo os controles (MOSMANN *et al.*, 1983). Com os valores de Abs, calculou-se a média da porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle de sobrevivência (100%), conforme apresentado pela equação abaixo (norma ISO 10993-5):

$$\frac{(Abs\ da\ amostra - Abs\ branco)}{(Abs\ do\ controle\ de\ sobrevivência - Abs\ branco)} \times 100$$

3.7 Determinação do Perfil de Liberação *in vitro* do diclofenaco de sódio

Para determinar o perfil de liberação *in vitro* do DS foram realizados os experimentos: curva de calibração, estudo de liberação *in vitro* e determinação dos modelos cinéticos de liberação do fármaco oriundo dos filmes de CB nativa e biocompósitos de CB/copolímero.

3.7.1 Curva de calibração

A partir do preparo de uma solução mãe de 20 ug/mL, preparou-se oito diferentes concentrações do DS, sendo elas: 2 ug/mL, 4 ug/mL, 6 ug/mL, 8 ug/mL, 10 ug/mL, 12 ug/mL, 14 ug/mL e 16 ug/mL. Todas as diluições foram realizadas em solução salina tamponada, pH 7.4. A determinação da Abs foi conduzida em equipamento de Espectroscopia UV-Vis (Perkin Elmer, modelo Lambda 365), em comprimento de 276 nm. As análises foram conduzidas em triplicata para cada concentração. Após a determinação das Abs, realizou-se a plotagem do gráfico (Abs *versus* concentração) para a determinação do coeficiente de correlação de Pearson (r^2) e obtenção da equação da reta através do software Excel.

3.7.2 Avaliação do perfil de liberação *in vitro*

Para determinar o perfil de liberação *in vitro* do DS incorporado na CB nativa e nos diferentes biocompósitos, empregou-se o dissolutor modelo 299 (Ethik), aplicando o método de dissolução com o uso de cesto rotatório (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Para tal, 8 cm² de cada amostra. Para o ensaio, uma solução aquosa de tampão fosfato, pH 5.5 (pH da pele), foi preparada e vertida nas cubas em volume total de 400 mL/cada. O meio de dissolução foi mantido sob temperatura de 37 ± 0,5 °C durante todo o ensaio. Os filmes de CB/DS e biocompósitos de CB/copolímero/DS foram então alocados nos cestos e imersos nas cubas do dissolutor sob agitação constante de 50 rpm. Alíquotas de 1 mL foram coletadas em diferentes intervalos de tempo: 5, 15, 20, 25, 30, 60, 90, 120 minutos, sendo feita a reposição imediata do mesmo volume em cada tempo. Os valores de Abs foram determinados por Espectroscopia UV-Vis (Perkin Elmer, modelo Lambda 365), com leitura em 276 nm. As análises foram realizadas em duplicata para cada amostra.

3.7.3 Determinação dos modelos cinéticos

Para compreender a cinética e o mecanismo de liberação do DS oriundo dos biocompósitos, empregou-se dois modelos matemáticos, sendo eles: Higuchi, e Korsmeyer-Peppas, de acordo com as equações abaixo:

[Modelo de Higuchi]
$$Q_t = \kappa H t^{1/2}$$

Onde Q_t é igual a taxa de liberação do fármaco na raiz quadrada do tempo ($t^{1/2}$), κH é a constante de dissolução de Higuchi

Modelo de Korsmeyer-Peppas

$$Qt = At^n$$

Onde Qt é igual a taxa do fármaco no tempo t , A é a constante da taxa de liberação, que incorpora características estruturais e geométricas do dispositivo de liberação, e n é o expoente da liberação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Biocompósitos de CB/Copolímero PE-PO-PE

4.1.1 Análise Morfológica

A Figura 4 evidencia os aspectos morfológicos tanto da CB nativa e copolímero, enquanto as Figuras 5 a 9 evidenciam os aspectos morfológicos dos diferentes biocompósitos de CB/copolímero à 0,5%, 1%, 3%, 5% e 10% após modificação *in situ* e *ex situ*, respectivamente.

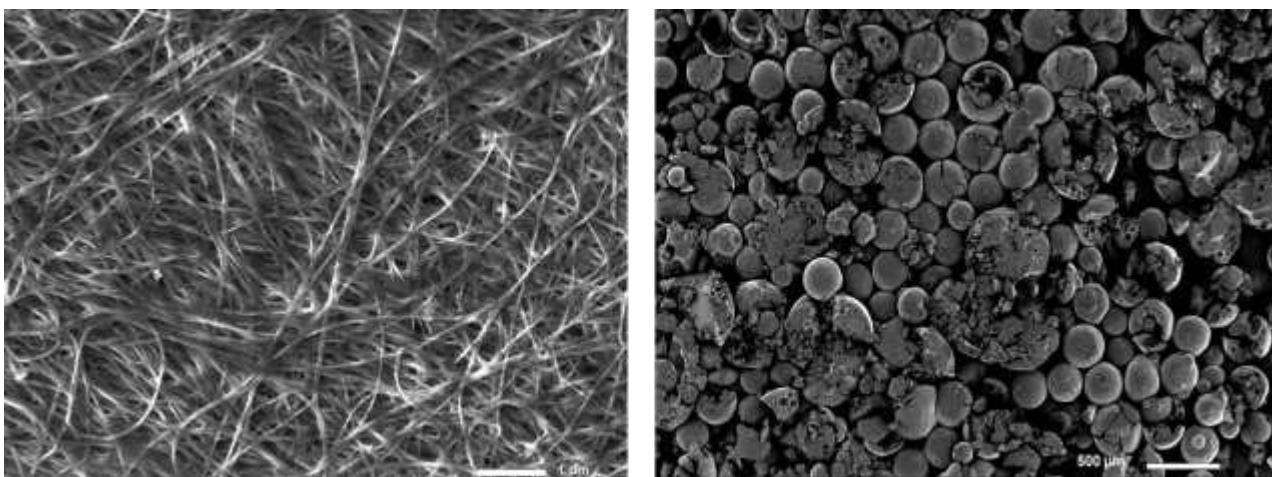


Figura 4. Microscopia Eletrônica de Varredura da CB nativa (micrografia da esquerda) e Copolímero tribloco PEO-b-PPO-b-PEO (micrografia da direita).

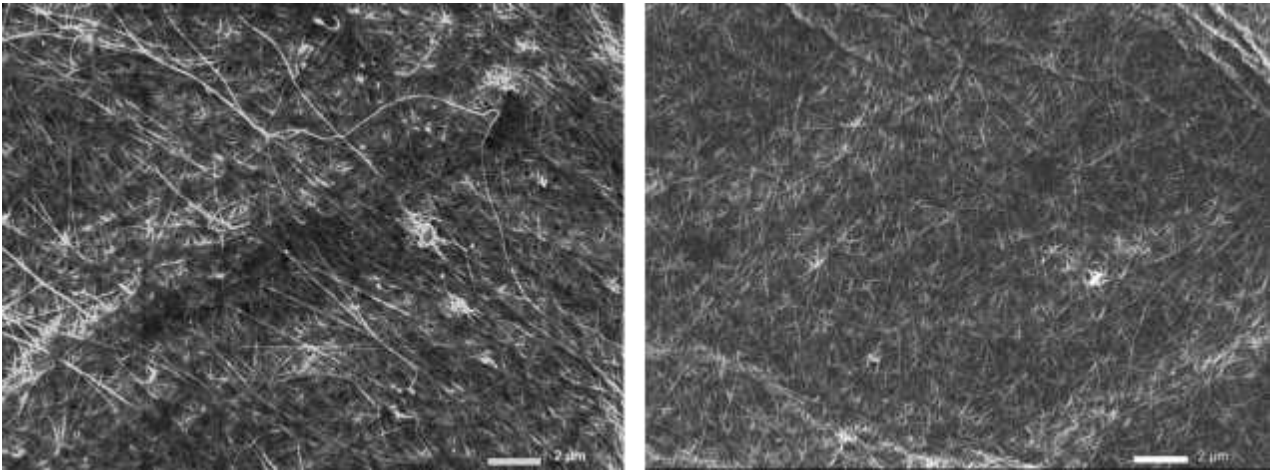


Figura 5. Microscopia Eletrônica de Varredura do biocompósito CB/copolímero 0,5% pós modificação *Ex situ* (micrografia da esquerda) e *In situ* (micrografia da direita).

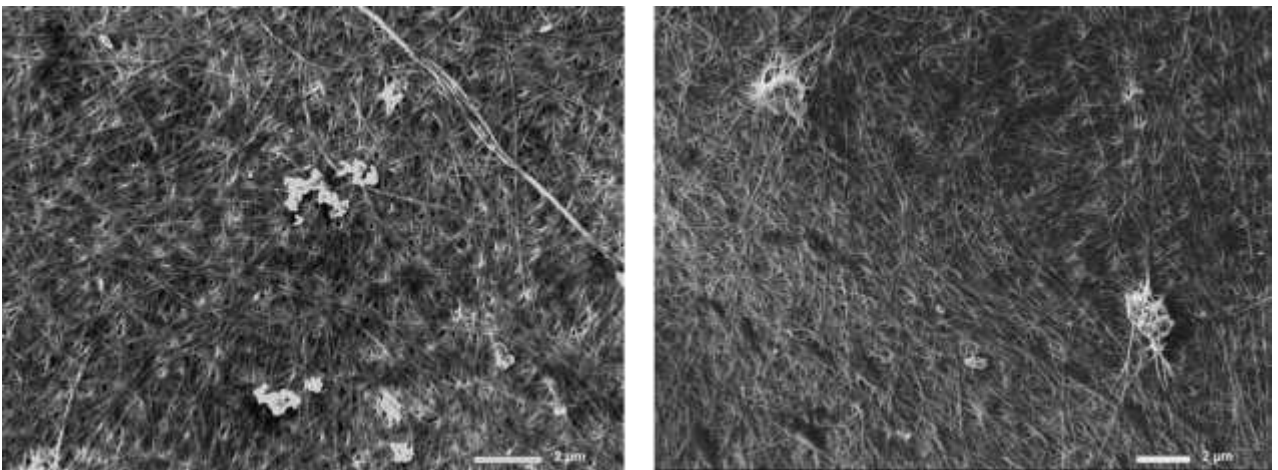


Figura 6. Microscopia Eletrônica de Varredura do biocompósito CB/copolímero 1% pós modificação *Ex situ* (micrografia da esquerda) e *In situ* (micrografia da direita).

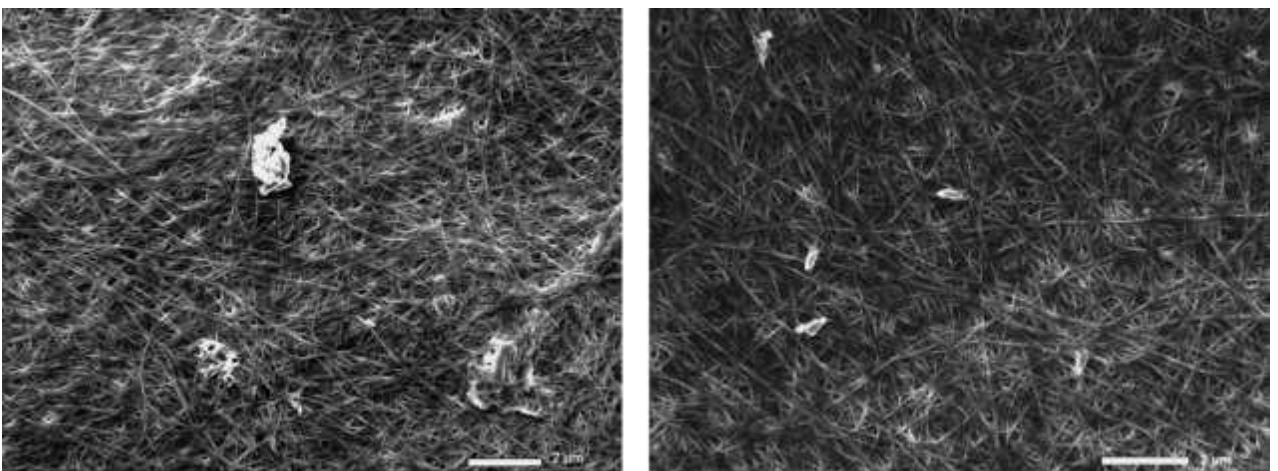


Figura 7. Microscopia Eletrônica de Varredura do biocompósito CB/copolímero 3% pós modificação *Ex situ* (micrografia da esquerda) e *In situ* (micrografia da direita).

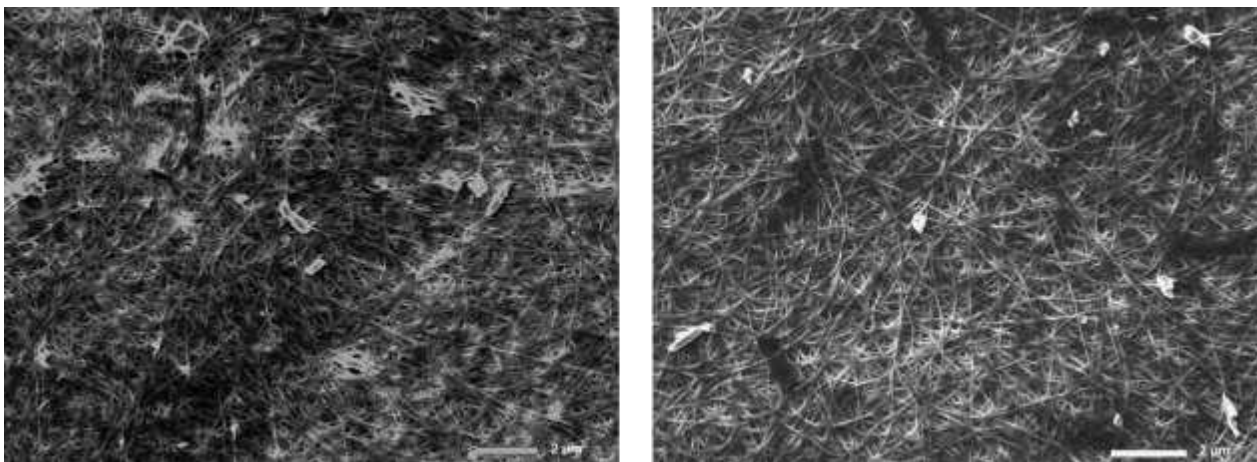


Figura 8. Microscopia Eletrônica de Varredura do biocompósito CB/copolímero 5% pós modificação *Ex situ* (micrografia da esquerda) e *In situ* (micrografia da direita).

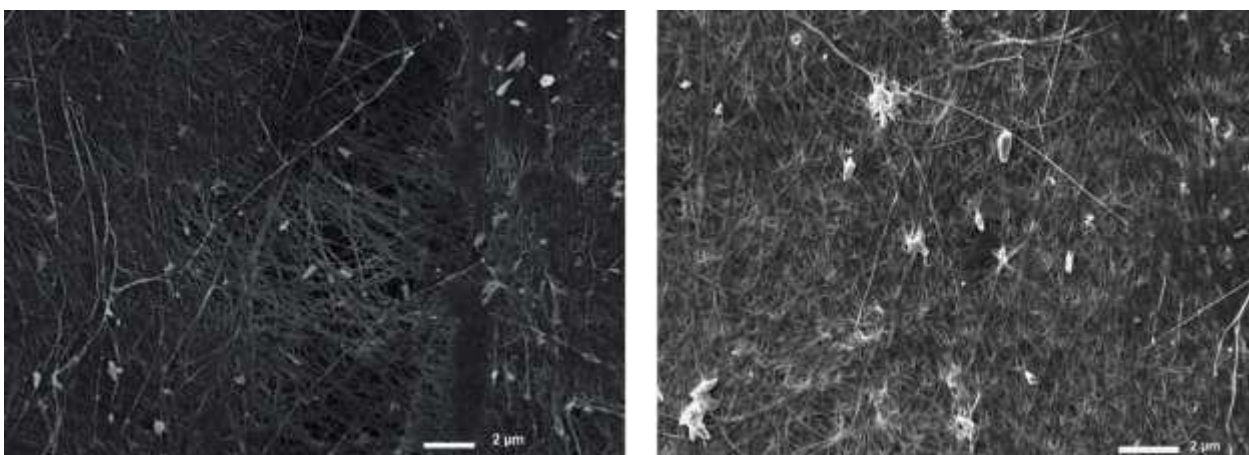


Figura 9. Microscopia Eletrônica de Varredura do biocompósito CB/copolímero 10% pós modificação *Ex situ* (micrografia da esquerda) e *In situ* (micrografia da direita).

A análise por MEV da CB nativa revelou a presença de fibrilas nanométricas e alongadas que se entrelaçam formando uma rede interconectada e tridimensional. Essa disposição das fibrilas confere ao material uma estrutura porosa, além de elevada resistência e flexibilidade (DOMENEGUETTI *et al.*, 2023). Já para o copolímero tribloco PEO-b-PPO-b-PEO (F-68), constatou-se a presença de partículas esféricas e de tamanho similar, embora também tenha sido verificado a presença de fragmentos menores. Constatou-se em todos os biocompósitos de CB/copolímero (Figuras de 5 a 9), a presença da mesma rede interconectada de

nanofibrilas, embora pode-se inferir uma redução perceptível e visual no diâmetro das fibrilas para os biocompósitos de CB com diferentes porcentagens de copolímero. Ademais, foi possível constatar a presença de domínios esféricos, dispersos entre as redes de nanofibrilas, característico do copolímero F68, bem como um aumento crescente destes domínios à medida que maior porcentagem de copolímero foi incorporada a partir do emprego de ambos os métodos de modificação.

Infere-se que a interação entre o copolímero e as redes de nanofibrilas foi governada por ligações de hidrogênio intermoleculares entre os grupos hidroxilas da CB e a extremidade PEO, conforme sugerido por Tercjak et al. (2015). Porém, vale ressaltar que os biocompósitos obtidos a partir da inserção de 10% de copolímero *in situ*, levaram a obtenção de membranas com espessura significativamente menor, como apresentado na Tabela 1, sugerindo que essa porcentagem de copolímero pode ter causado toxicidade para as bactérias durante a síntese.

AMOSTRA	ESPESSURA (mm)
CB nativa	0,028333 ± 0,004784233
Biocompósito 0,5%	0,028667 ± 0,007717225
Biocompósito 1%	0,024667 ± 0,002867442
Biocompósito 3%	0,019667 ± 0,008178563
Biocompósito 5%	0,023 ± 0,005715476
Biocompósito 10%	0,006667 ± 0,001699673

Tabela 1. Tabela representativa da espessura da CB nativa e Biocompósitos *In situ*.

4.1.2 Difração de Raios-X (DRX)

O índice de cristalinidade de materiais baseados em CB tem influência direta em suas propriedades físicas, especialmente em seu comportamento mecânico

(resistência a tração e módulo elástico), e em sua estabilidade térmica (LANGARI, 2019).

A Figura 11 mostra os espectros de XRD para biocompósitos CB/EPE. Os espectros exibem predominantemente o padrão característico de CB. A desconvolução gaussiana revelou os picos cristalinos e o halo amorfo de celulose, bem como um halo em algumas amostras potencialmente atribuídas a EPE. O índice cristalino (Crl), tamanho do cristalito (τ), microdeformação (ϵ) e função discriminante Z de Wada e Okano foram calculados (Tabela 2). A função discriminante Z foi > 0 para todas as amostras, indicando uma estrutura cristalina triclinica do tipo rico em α , com picos de cristal em $14,5^\circ$, $16,5^\circ$ e $22,5^\circ$, correspondendo aos planos de reflexão (100), (010) e (110), respectivamente (Illa et al., 2019).

Isso pode indicar que o EPE cristalino está intercalado na estrutura da celulose. A microdeformação quantifica as imperfeições e o estresse interno de um material (Surdu, György, 2023). Um desvio da cristalinidade ideal resulta no alargamento do pico de XRD, que pode surgir de fatores como tamanho do cristalito, microdeformação, heterogeneidade da solução sólida e variações de temperatura. Os biocompósitos BNC/EPE exibiram valores de microdeformação próximos uns dos outros. No entanto, valores ligeiramente mais altos foram observados para as amostras *in situ*, o que se reflete em tamanhos de cristalito marginalmente menores (Tabela 2). O índice de cristalinidade (Crl) da amostra CB pura foi de $34,5 \pm 0,6\%$ (Tabela 2). CB/EPE 1% *Ex situ* mostrou mudanças insignificantes no valor de Crl, mas uma diminuição em Crl foi observada com concentrações mais altas de EPE. Para as amostras *in situ*, 1% de EPE aumentou o Crl para $63,8 \pm 0,6\%$, sem alteração para 5% de EPE e uma diminuição apenas em 10% de EPE.

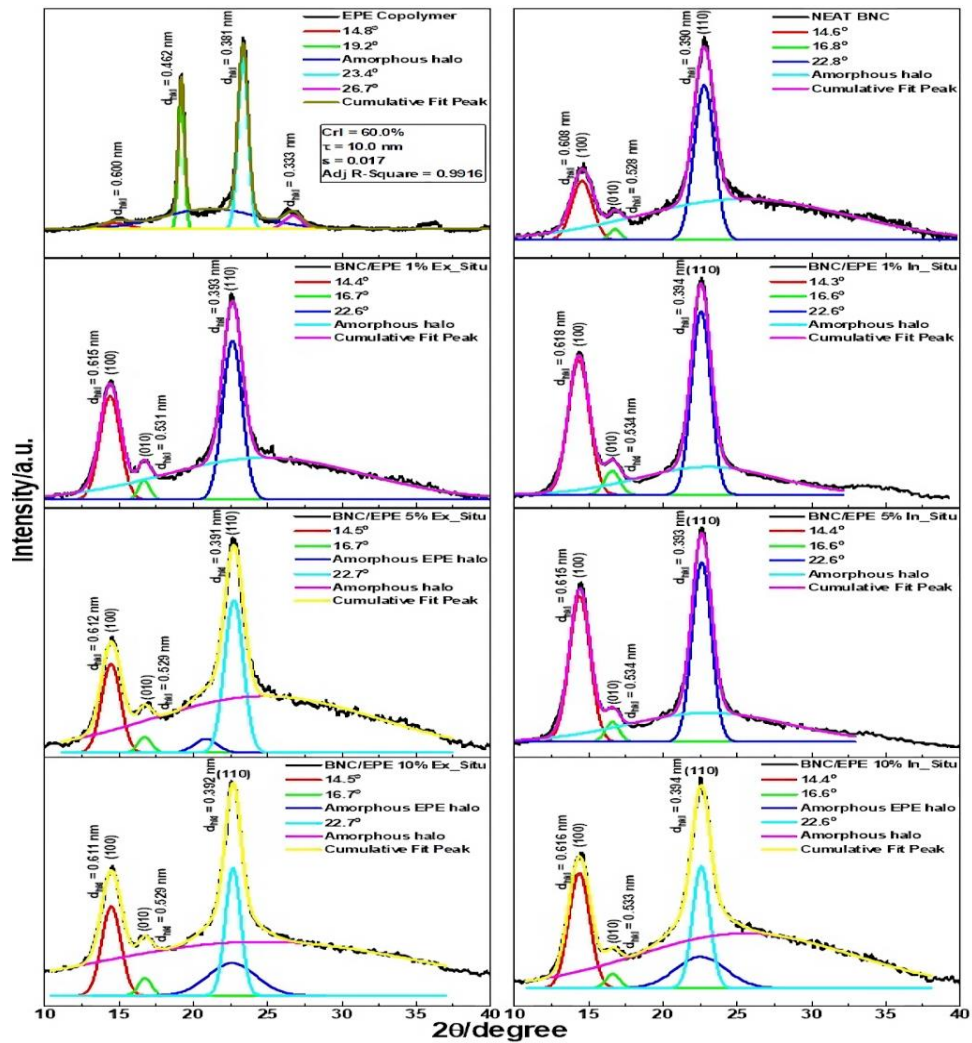


Figura 11. Difratomogramas de XRD de copolímero EPE, BNC puro e biocompósitos BNC/EPE (1%, 5% e 10%) preparados por métodos Ex situ e In situ. A deconvolução gaussiana dos picos foi incluída.

Tabela 2. Parâmetros calculados da deconvolução gaussiana do pico de XRD para copolímero EPE, BNC puro e biocompósitos BNC/EPE.

Amostras	Índice Cristalino (CrI)		Tamanho do cristalito (τ)		MicroStrain (ϵ)		Z - Função Discriminante		R-Square
	%	SD	nm	SD	*	SD	*	SD	
EPE	60.0	0.5	10.0	0.3	0.017	0.001	-	-	0.9914
CB	34.5	0.6	6.3	0.7	0.039	0.002	4.1	0.2	0.9916
CB/EPE biocompósitos									
1% <i>Ex situ</i>	39.4	0.6	6.3	0.4	0.039	0.001	13.0	0.1	0.9934
5% <i>Ex situ</i>	26.8	1.1	6.1	0.5	0.039	0.002	9.7	0.2	0.9908
10% <i>Ex situ</i>	16.6	1.8	6.4	0.2	0.037	0.001	9.0	0.1	0.9972
1% <i>In situ</i>	63.8	0.6	5.5	0.2	0.043	0.001	14.6	0.1	0.9965
5% <i>In situ</i>	59.1	0.9	5.8	0.3	0.041	0.001	10.3	0.2	0.9957
10% <i>In situ</i>	26.0	0.5	6.0	0.3	0.040	0.002	13.2	0.2	0.9964

4.1.3 Análise da composição química por FT-IR/ATR

A Figura 12 apresenta os espectros de FT-IR/ATR obtidos da CB nativa e do copolímero tribloco PE-PO-PE. O espectro de FT-IR da CB nativa demonstrou bandas características de sua estrutura química, dentre elas, a banda em 3345 cm^{-1} (alongamento O-H da celulose tipo I), 3240 cm^{-1} (O-H ligado a hidrogênio), 2895 cm^{-1} (alongamento CH dos grupos CH_2), 2854 cm^{-1} (alongamento assimétrico de CH_2), 1650 cm^{-1} (movimento de flexão da água absorvida H-O-H), 1427 cm^{-1} (flexão simétrica de CH_2), 1365 cm^{-1} (flexão de CH), 1160 cm^{-1} (alongamento assimétrico de C-O-C) e 1060 cm^{-1} (alongamento de C-O). Por outro lado, o espectro do copolímero tribloco demonstrou uma banda característica em 1462 cm^{-1} , atribuído à vibração de flexão C-H e uma banda em 1098 cm^{-1} , atribuída ao alongamento do grupamento éter (C-O-C).

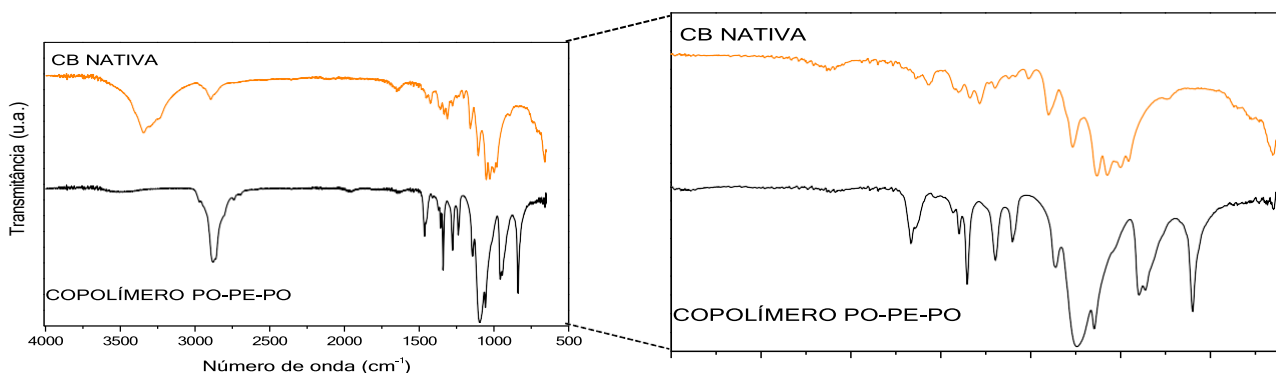


Figura 12. FT-IR/ATR das amostras de CB nativa e do copolímero tribloco PE-PO-PE.

As Figuras 13 e Figura 14 apresentam os espectros dos biocompósitos de CB/PE-PO-PE obtidos via modificação *In situ* e *Ex situ*, respectivamente. Os resultados evidenciaram a presença do mesmo padrão de bandas observado para a CB nativa, que foram computados nos mesmos comprimentos de onda, sem a presença de bandas adicionais.

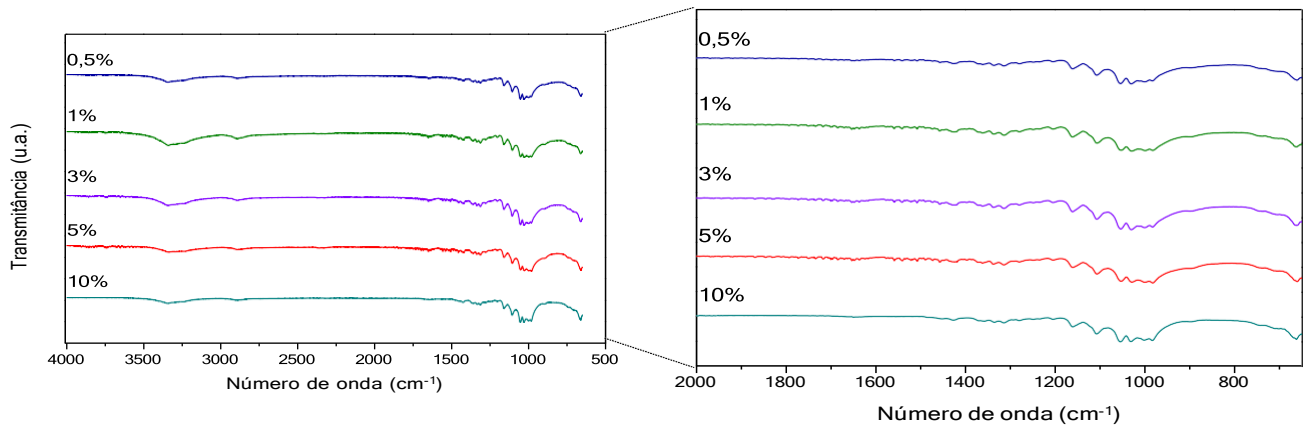


Figura 13. FT-IR das amostras de biocompósitos de CB/copolímero PE-PO-PE obtidos *in situ*, nas concentrações de (c) 0,5%; (d) 1%; (e) 3%; (f) 5%; e (g) 10% de copolímero, respectivamente.

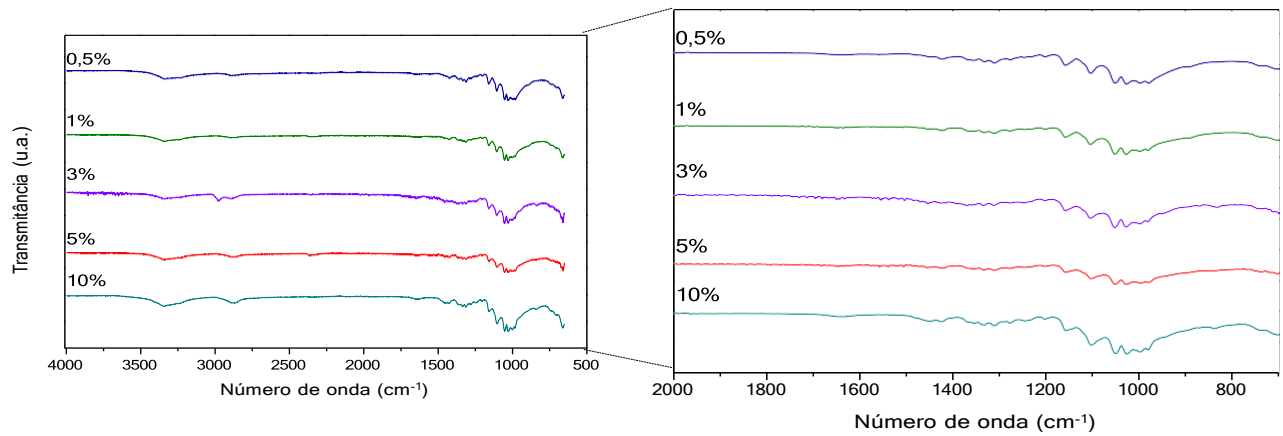


Figura 14. FT-IR das amostras de biocompósitos de CB/copolímero PE-PO-PE obtidos *ex situ*, nas concentrações de (c) 0,5%; (d) 1%; (e) 3%; (f) 5%; e (g) 10% de copolímero, respectivamente.

4.1.4 Avaliação das propriedades térmicas por Termogravimetria (TGA/DTG)

A análise termogravimétrica monitora reações químicas e conversões físicas que ocorrem durante o processo de aquecimento de uma amostra, detectando a perda de massa em função da temperatura e do tempo. A análise por Termogravimetria (TG) e Derivada Termogravimétrica (DTG) avalia as propriedades térmicas e da estabilidade dos materiais biomédicos. A compreensão das propriedades térmicas dos biocompósitos é fundamental para determinar sua estabilidade sob condições de processamento e armazenamento, bem como para compreender os mecanismos de degradação térmica (LOOF, 2016). A Figura 15 exhibe as curvas referente à análise de TG/DTG para a amostra de CB nativa e copolímero tribloco. As Figuras de 16, 17, 18, 19 e 20 apresentam as curvas TG/DTG dos biocompósitos de CB/copolímero tribloco obtidos via modificação *In situ* e *Ex situ*.

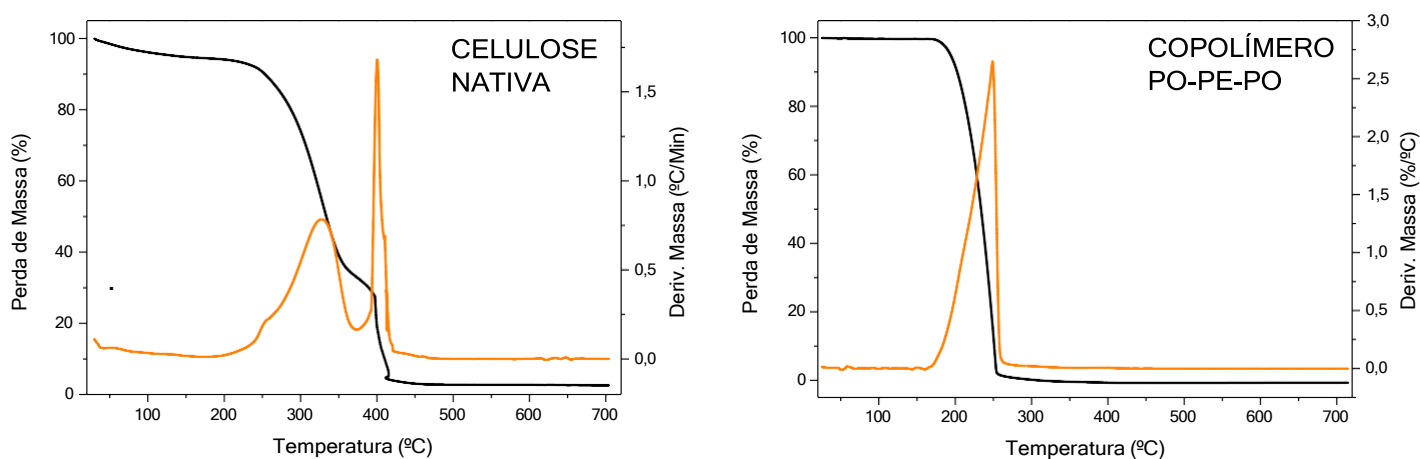


Figura 15. Termogramas da CB nativa e do copolímero tribloco.

O termograma da CB nativa apresentou três eventos principais de perda de massa: o primeiro evento na faixa de 80 °C - 170 °C, e relacionado com a perda de água intermolecular da celulose, enquanto o segundo evento foi observado na faixa de 240 °C - 328 °C, onde há a despolimerização das cadeias glicosídicas. O terceiro evento ocorreu por volta de 350 °C - 400 °C, onde há uma degradação máxima de sua estrutura, levando a uma massa residual de 0%. Já para o copolímero tribloco, observou-se apenas um evento relacionado com a perda de massa do material, que

iniciou-se em 175°C, e atingiu um pico máximo em 250°C, com uma perda de 96% e massa residual de 2% na temperatura de 700°C.

Em relação aos biocompósitos de CB/copolímero tribloco para modificações *in situ* e *ex situ*, pode-se constatar a presença de três principais eventos de perda de massa: o primeiro evento térmico ocorre até 100°C, associada a saída de água presente dentre das lamelas da CB, enquanto o segundo evento térmico entre 250°C – 400°C pode ser relacionado com a despolimerização e degradação das cadeias poliméricas. Acima de 400°C, constatou-se a carbonização das amostras, e a obtenção de diferentes massas residuais para os diferentes biocompósitos obtidos via *in situ*, alcançando valores de 3%, 4%, 2,5%, 14% e 2%, respectivamente. Ademais, para os biocompósitos obtidos via *ex situ*, os valores de massa residual foram de 3%, 5%, 2,6%, 14% e 0%. Nesse sentido, infere-se que o copolímero estava presente na estrutura dos biocompósitos de CB, embora não foi encontrado um aumento proporcional da massa residual com o aumento da porcentagem de copolímero adicionado *in situ* e *ex situ*.

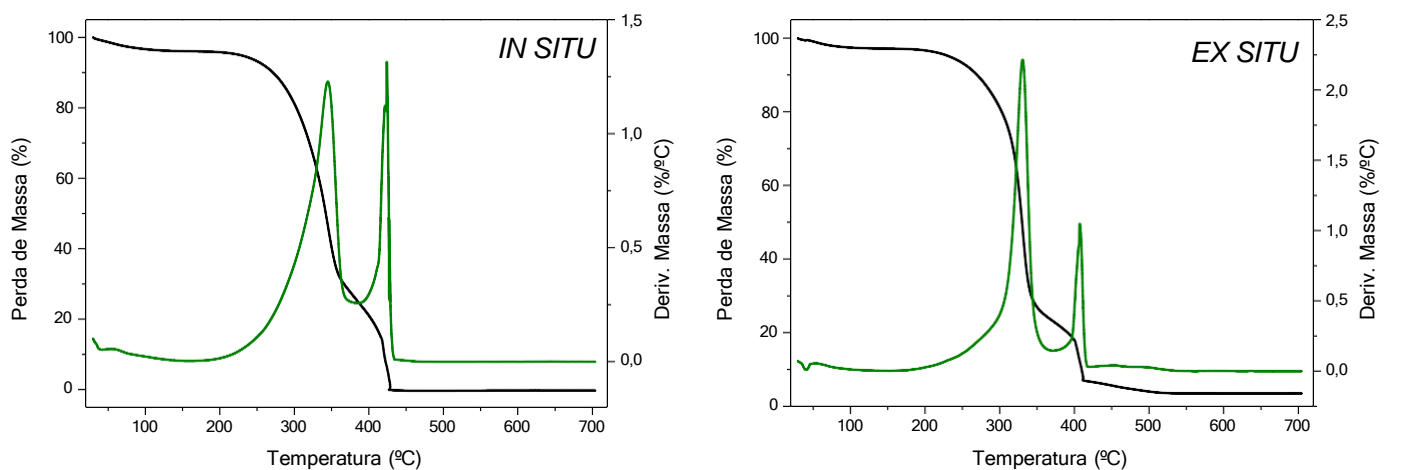


Figura 16. Termogramas dos biocompósitos de CB/copolímero PE-PO-PE 0,5% obtidos *In situ* e *Ex situ*.

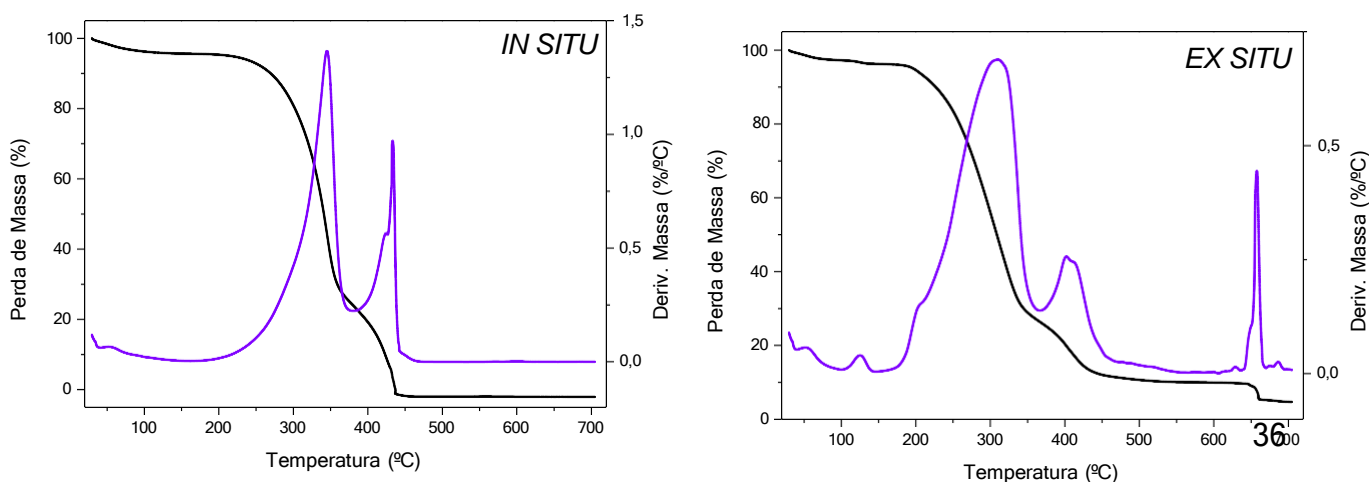


Figura 17. Termogramas dos biocompósitos de CB/copolímero PE-PO-PE 1% obtidos *In situ* e *Ex situ*.

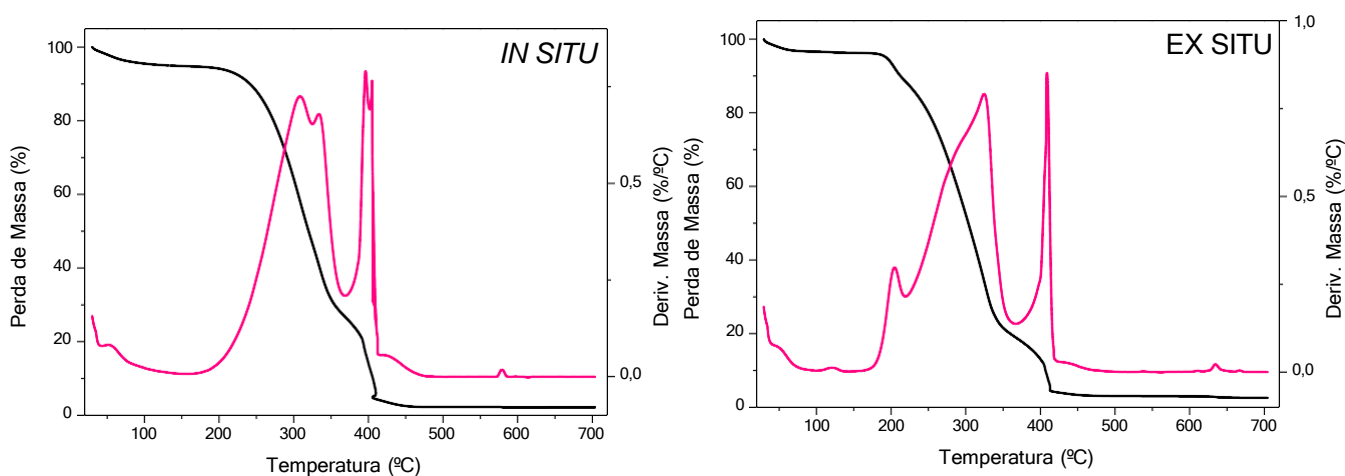


Figura 18. Termogramas dos biocompósitos de CB/copolímero PE-PO-PE 3% obtidos *In situ* e *Ex situ*.

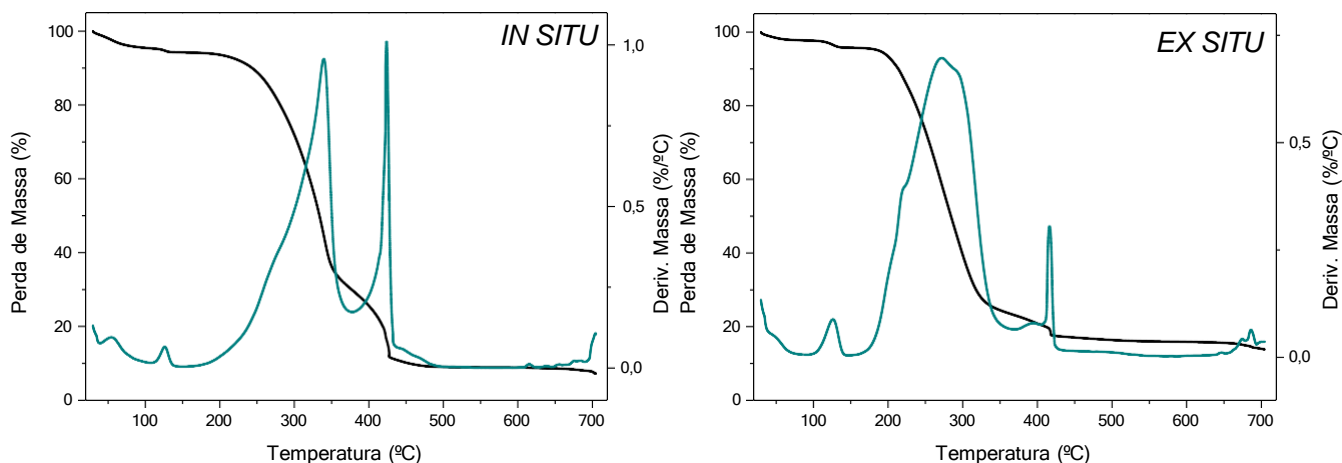


Figura 19. Termogramas dos biocompósitos de CB/copolímero PE-PO-PE 5% obtidos *In situ* e *Ex situ*.

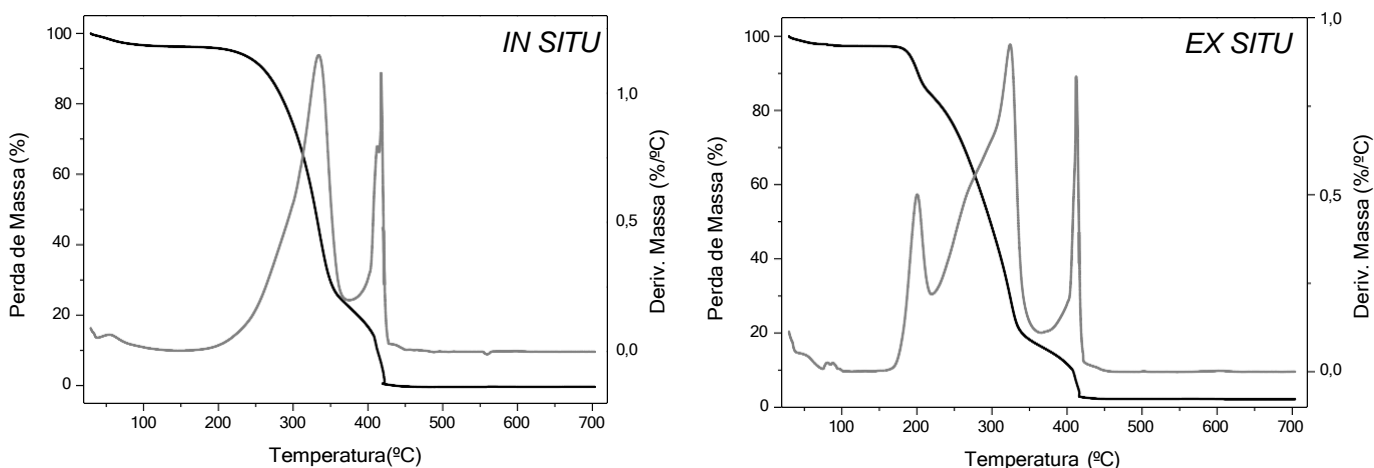


Figura 20. Termogramas dos biocompósitos de CB/copolímero PE-PO-PE 10% obtidos *In situ* e *Ex situ*.

4.1.5 Análise de molhabilidade por Ângulo de Contato (AC)

A molhabilidade de uma superfície é um parâmetro físico que expressa a afinidade entre um líquido e uma fase sólida. Quando um líquido entra em contato com uma superfície sólida, ocorre a formação de uma interface sólido-líquido. Essa interação resulta no deslocamento de outro fluido, quando realizado em ar ambiente geralmente é uma fase de vapor. A forma assumida pela gota líquida é determinada pela competição entre as interações coesivas entre moléculas semelhantes na fase líquida e as interações adesivas entre as fases sólida e líquida. Ou seja, a molhabilidade de uma superfície depende da afinidade entre o líquido e a superfície sólida, influenciando a área de contato e a forma da gota líquida. Assim, o ângulo de contato, enquanto propriedade termodinâmica que define a molhabilidade de superfícies sólidas, desempenha um papel relevante nas modernas aplicações tecnológicas e na ciência dos materiais.

A Figura 21 (a) apresenta o ângulo de contato medido em água para as amostras pura, modificadas pelo copolímero de forma *in situ* e *ex situ*. Os ângulos obtidos tanto para a superfície da CB nativa (HS), quanto para as superfícies dos biocompósitos de CB/copolímero tribloco em diferentes porcentagens (0,5% - 10%), foram inferiores a 90°, indicando que os biocompósitos apresentam características hidrofílicas, assim como a CB.

Ao observar os resultados, tem-se que a modificação *in situ* da CB com o copolímero tribloco não promoveu uma mudança significativa nos valores de ângulo de contato em relação a CB nativa [Fig. 21 (a)]. No entanto, para as amostras modificadas via método *ex situ*, nota-se que em maiores concentrações de copolímero, os valores de ângulo de contato tendem a aumentar, com um aumento significativo para o biocompósito CB/copolímero 1%, conduzindo a uma redução da molhabilidade da superfície do material, tornando-a menos hidrofílica. Esse fato, pode estar relacionado ao método de obtenção dos biocompósitos, uma vez que pelo método *ex situ*, o copolímero pode se concentrar na superfície da matriz de CB, preenchendo os poros existentes entre as fibrilas, resultado esse que foi observado nas imagens de MEV.

Para o cálculo da tensão superficial, foram utilizados água deionizada e diiodometano como líquidos sonda. A tensão superficial pode ser definida como a

relação de forças que atuam diferentemente na parte mais superficial de um líquido em comparação com as forças que atuam internamente. Quando duas superfícies estão em contato formando duas fases, sólido e líquido, é possível calcular a tensão superficial aparente formada na interface (PAIVA 2020; YUAN; LEE, 2013; ZETTLEMOYER, 1974).

Partindo da medida do ângulo de contato (θ), é possível obter a equação conhecida como Equação de Young-Dupré, que antecede a tensão superficial (Zettlemoyer, 1974), conforme representada abaixo:

$$\gamma_{Lv} (1 + \cos \theta) = 2 (y_L^p y_L^d)^{\frac{1}{2}} \quad \text{Eq. (1)}$$

Onde γ_L é a tensão superficial do líquida, y_L^p e y_L^d são as componentes dispersivas e polares do líquido.

A partir da equação 1 de Young-Dupré, uma expressão geral pode ser obtida, onde leva-se em consideração as componentes polares y_S^p e dispersivas y_S^d dos sólidos conforme demonstrado por Owens e Wendt (Annamalai et al., 2016):

$$\gamma_L (1 + \cos \theta) = 2 (y_S^d y_L^d)^{\frac{1}{2}} + (y_S^p y_L^p)^{\frac{1}{2}} \quad \text{Eq. (2)}$$

Para calcular a tensão superficial e as componentes polares e dispersivas dos materiais obtidos, recorreu-se à equação aproximada de Wu (1978) de superfícies poliméricas, baseando-se em média harmônica (equação 3)

$$\gamma_L (1 + \cos \theta) = \frac{4y_S^d y_L^d}{y_S^d + y_L^d} + \frac{4y_S^p y_L^p}{y_S^p + y_L^p} \quad \text{Eq. (3)}$$

Os valores das componentes polares e dispersivas dos líquidos sondas, assim como sua energia de interface, conforme descrito por Zettlemoyer (1974), estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Valores das componentes polares e dispersivas dos líquidos sondas (água e diiodometano).

Líquido Sonda		Água	Diiodometano
Coef. Liq/vap	γ_L (mN/m)	72.8	50.8
Componente polar Liq/Vap	y_L^d (mN/m)	51.0	0.0

Componente dispersiva	γ_L^p (mN/m)	21.8	50.8
-----------------------	---------------------	------	------

Com base nas medidas do ângulo de contato e nas componentes listadas na tabela 1 dos líquidos sonda utilizados, foi possível determinar a tensão superficial da CB nativa, e dos biocompósitos de CB/copolímero via métodos *in situ* e *ex situ*, conforme evidenciado na Figura 21b.

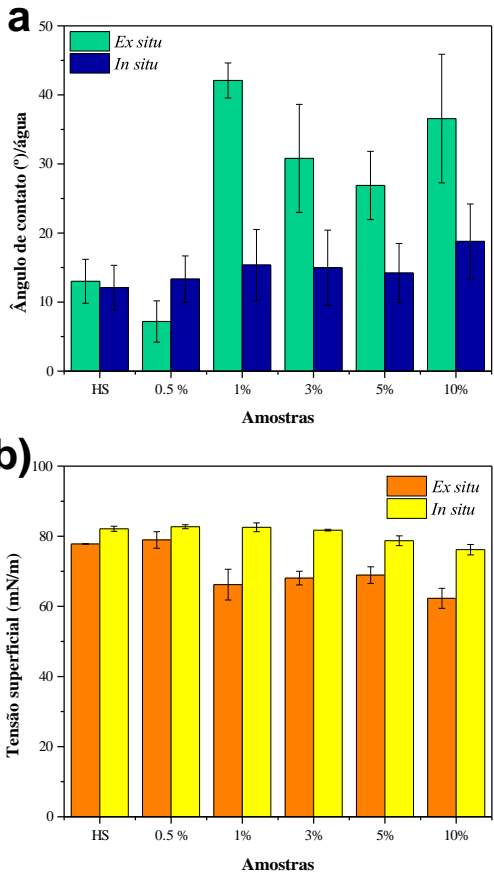


Figura 21. Valores de ângulos de contato (a) e tensão superficial (b) para as amostras de CB nativa (HS) e biocompósitos de CB/copolímero PE-PO-PE obtidos *in situ* e *ex situ*, nas concentrações de 0,5, 1%, 3%, 5% e 10% de copolímero, respectivamente.

Semelhante ao que ocorre com o ângulo de contato, a tensão superficial para as amostras *in situ* não apresentam diferença em relação a amostra de CB nativa (HS). Já para as amostras *ex situ*, nota-se uma tendência de redução dos valores da tensão superficial com o aumento da concentração do copolímero. Tal fato é

semelhante ao observado por Barbosa et al. (2023), quando modificou filmes à base de cebola com a argila Laponita. De acordo com os autores, o aumento do ângulo de contato faz com que a energia superficial se torne menor do que a tensão superficial do líquido, mantendo o formato de gota. Conseqüentemente, a tensão interfacial entre o sólido e o líquido diminui, uma vez que a interação entre eles se torna menor (CARRIER; BONN, 2015).

4.1.6 Avaliação da citotoxicidade por método colorimétrico

O MTT, conhecido como (*3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide*), é capaz de penetrar em células viáveis e em suas mitocôndrias através de sua polaridade positiva, sendo metabolizado através de desidrogenases mitocondriais em um segundo composto conhecido como formazan (*E,Z-1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan*). Essa metabolização indica que as células estão vivas e ativas, e por isso, pode ser empregado para a determinação da citotoxicidade de compostos desconhecidos e que podem vir a terem uma aplicação médico-farmacêutica. O MTT é um sal de coloração amarela que, após sua metabolização a formazan, passa a apresentar uma cor púrpura e, por isso, é considerado um método colorimétrico. Essa intensidade de cor pode ser mensurada através de um espectrofotômetro de microplacas, onde os valores de absorbância são diretamente proporcionais ao aumento da intensidade da cor (GHASEMI *et al.*, 2021).

A figura 22 demonstra a porcentagem de viabilidade celular de fibroblastos murinos após o tratamento com os meios de extração oriundos dos diferentes biocompósitos de CB/copolímero tribloco *in situ* e *ex situ* e CB nativa. Os resultados confirmam que tanto a CB nativa quanto os diferentes biocompósitos são considerados atóxicos para a linhagem de fibroblastos L929, uma vez que a viabilidade celular para todos os tratamentos testados se manteve acima de 70% (ISO 10993-5).

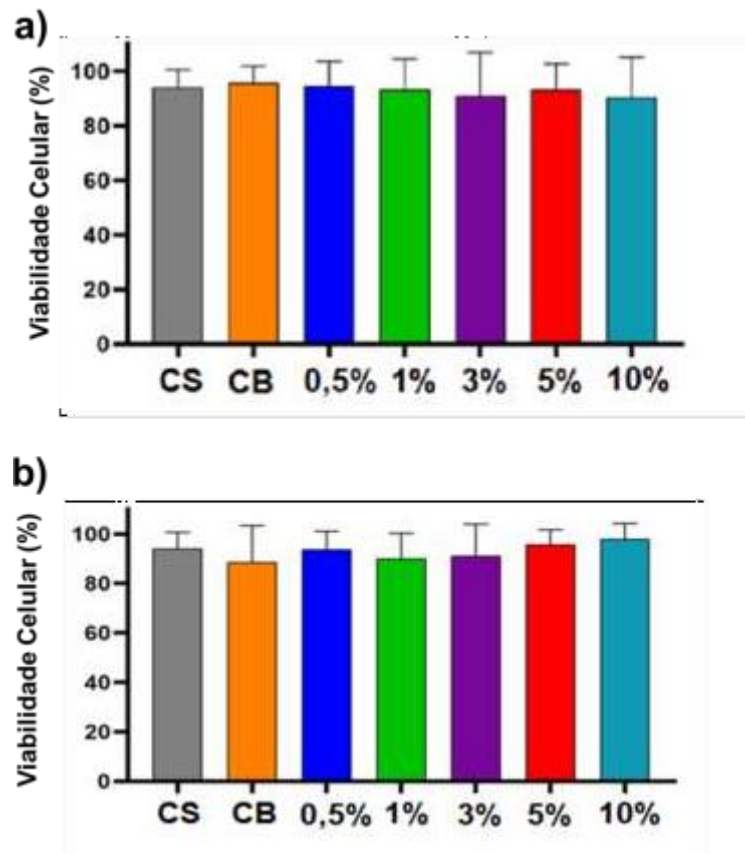


Figura 22. Avaliação da viabilidade (%) de células L929 após 24 h de tratamento com as amostras de: Controle de sobrevivência (CS), e biocompósitos de CB/copolímero PE-PO-PE obtidos *in situ* e *ex situ* (a e b, respectivamente), nas concentrações de 0,5%, 1%, 3%, 5% e 10% de copolímero. A viabilidade celular (%) foi determinada pelo ensaio colorimétrico utilizando MTT.

4.2 BIOCOMPÓSITOS 5% CONTENDO 0,5% E 1% DE DICLOFENACO DE SÓDIO

4.2.1 Análise Morfológica

Nas figuras 22, 23 e 24 são representadas as características morfológicas dos biocompósitos de CB/copolímero 5% contendo 0,5% 1% de DS.

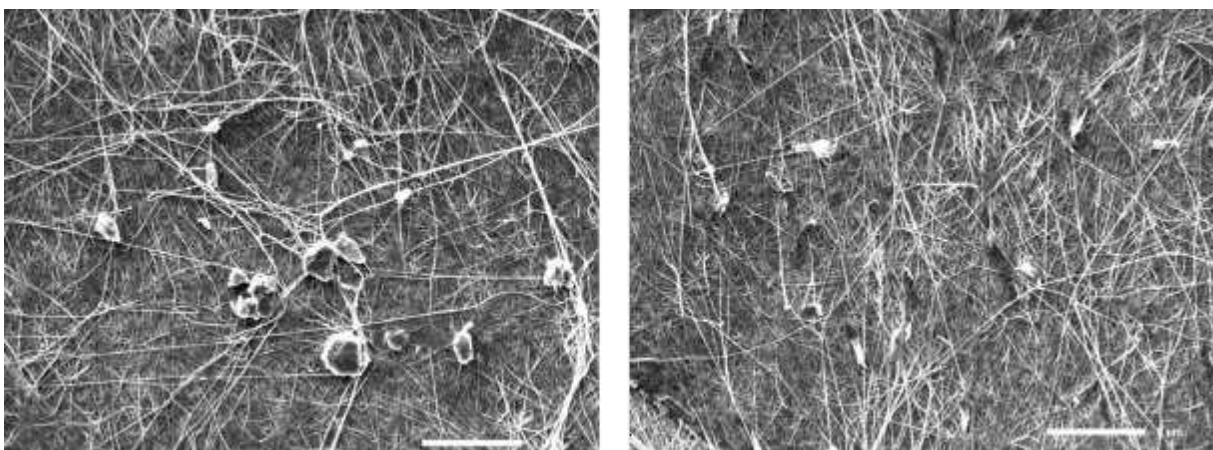


Figura 23. Microscopia Eletrônica de Varredura da CB nativa com 0,5% (esquerda) e 1% de DS (direita).

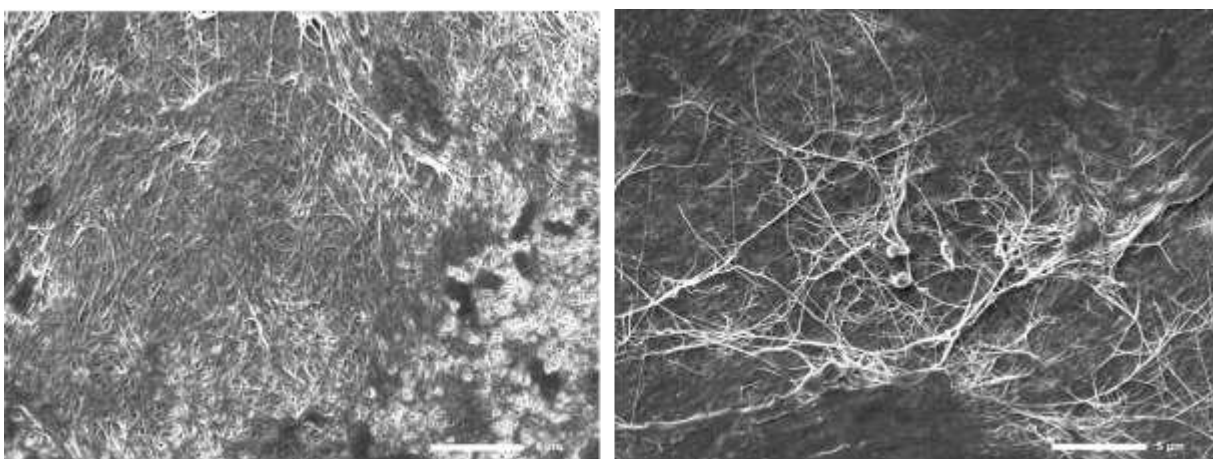


Figura 24. Microscopia Eletrônica de Varredura dos biocompósitos de CB/copolímero 5% *in situ* com 0,5% (esquerda) e 1% de DS (direita).

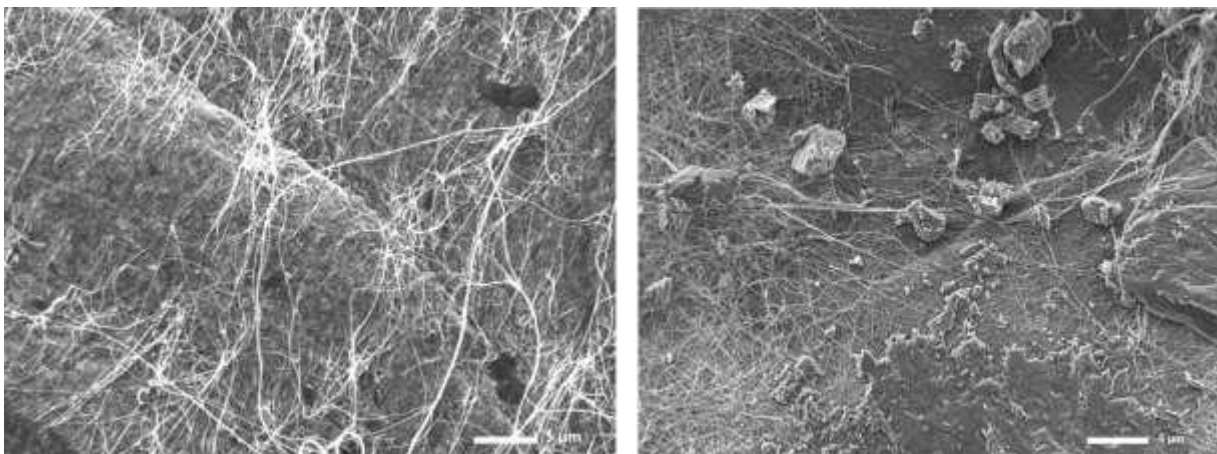


Figura 25. Microscopia Eletrônica de Varredura dos biocompósitos de CB/copolímero 5% *ex situ* com 0,5% (esquerda) e 1% de DS (direita).

Nas imagens da Figura 23, observou-se a presença de estruturas aglomeradas sobre a superfície da CB nativa, sugerindo a presença do fármaco após método de incorporação. Para os biocompósitos de CB/copolímero 5% *In situ* e *Ex situ* (Figuras 24 e Figura 25), observou-se a presença de domínios esféricos e estruturas aglomeradas sobre a superfície das fibras, mas sem a distinção clara entre o copolímero e o fármaco. Outro achado foi em relação a quantidade dessas estruturas aglomeradas, com maior quantidade quando maior concentração de fármaco foi empregada durante a incorporação, ficando evidente que a incorporação conduziu ao aprisionamento do fármaco entre as fibrilas.

4.2.3 Análise da composição química por FT-IR

A compreensão das interações moleculares entre os componentes dos biocompósitos é essencial para elucidar os mecanismos de incorporação e liberação de fármacos, bem como para avaliar a estabilidade química do material. Portanto, a figura 27 apresenta os espectros referentes aos biocompósitos de CB/copolímero 5%, incorporados com DS (0,5 e 1%).

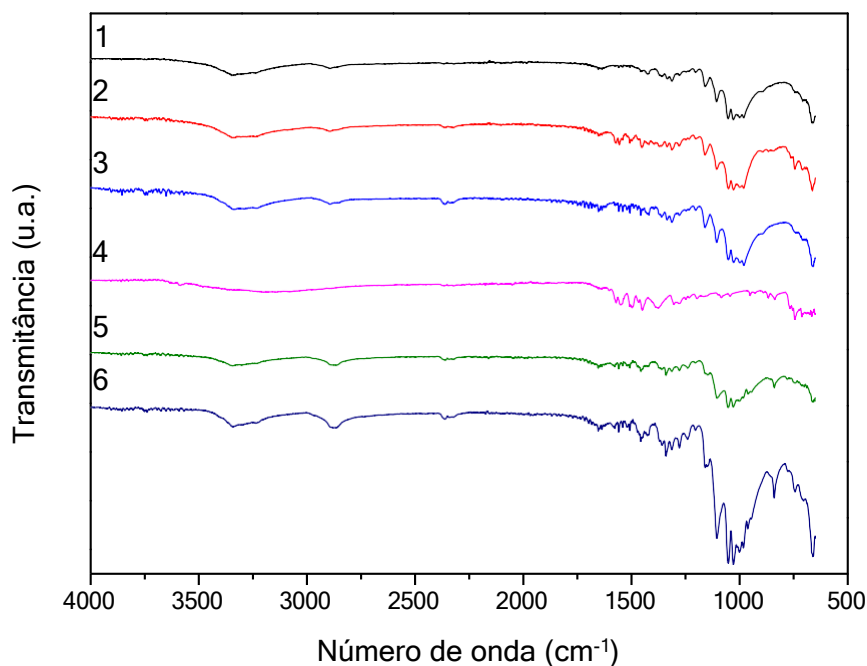


Figura 26. FT-IR das amostras de CB nativa incorporado com 0,5% e 1% DS (1 e 2, respectivamente) e dos biocompósitos de CB/copolímero 5% *in situ* (3 e 4) e *ex situ* (5 e 6) incorporados com 0,5% e 1% de DS.

Além das bandas características da CB nativa e do copolímero, o espectro de FT-IR de ambas as amostras revelam diversas bandas distintas associadas aos grupos funcionais presentes na molécula do DS. Notavelmente, observamos picos em 3390 cm^{-1} , indicativos dos grupos NH da amina secundária, em 1574 cm^{-1} , relacionados ao grupo C=O dos íons carboxila, em 1289 cm^{-1} , atribuídos à vibração C-CO-C, e em 746 cm^{-1} , correspondentes às vibrações C-Cl. Adicionalmente, identificamos uma banda em torno de 3320 cm^{-1} , possivelmente associada aos estiramentos NH da amina secundária do fármaco. Outras características espectrais incluem bandas em aproximadamente 1580 cm^{-1} e 1450 cm^{-1} , atribuídas na literatura às vibrações de estiramento C=O e C=C, respectivamente. A presença de uma nova banda em 1290 cm^{-1} , relacionada à ligação C-CO-C, confirma a incorporação do fármaco nos biocompósitos. Vale ressaltar que os espectros 1, 2 e 3, apresentam bandas mais aparentes da CB, já as amostras 4,5 e 6 apresentam um perfil mais semelhante aos espectros do DS, indicando que o fármaco estava de maneira mais disponível na superfície do biocompósito.

4.2.4 Avaliação das propriedades térmicas por Termogravimetria (TGA/DTG)

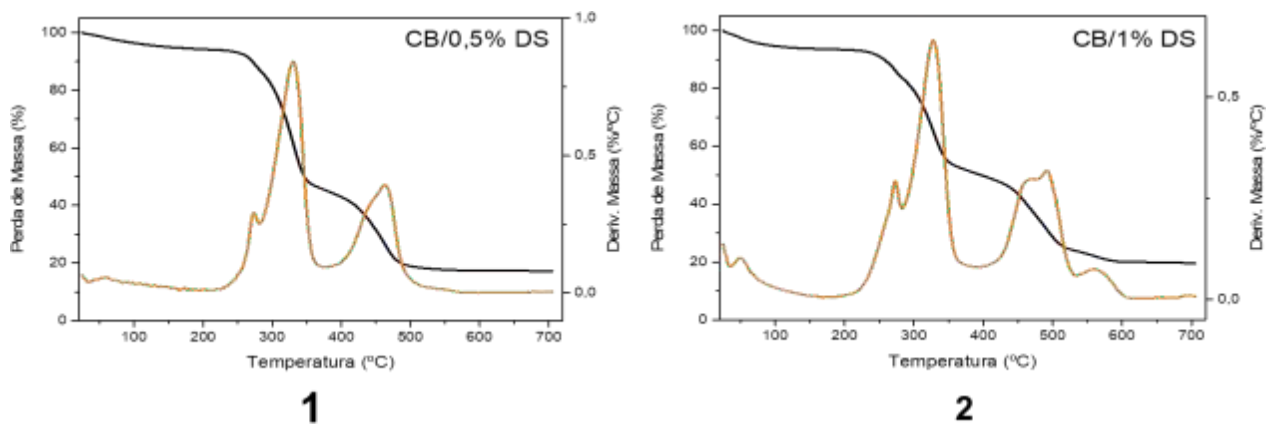


Figura 27. Termogramas da CB nativa incorporada com 0,5% de DS (1) e 1% de DS (2).

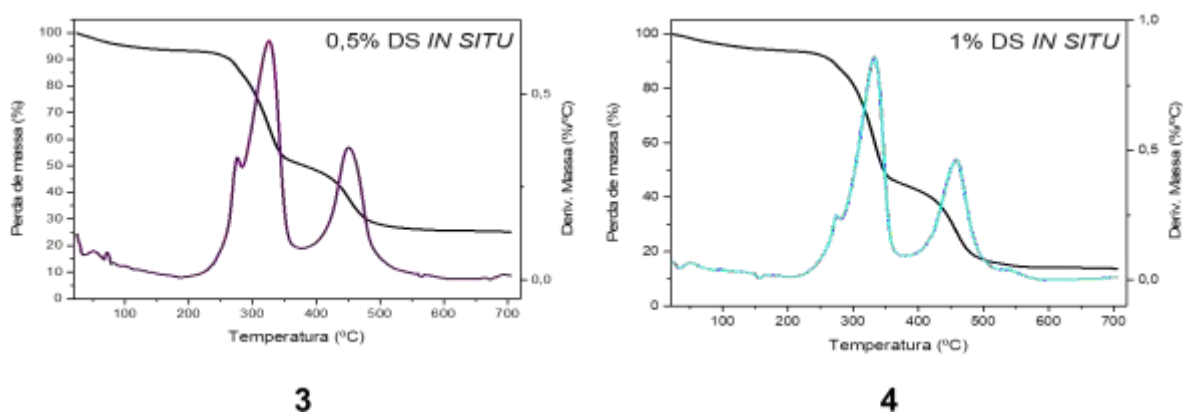


Figura 28. Termogramas dos biocompósitos de CB/Copolímero 5% *in situ*, incorporado com 0,5% (3) e 1% de DS (4).

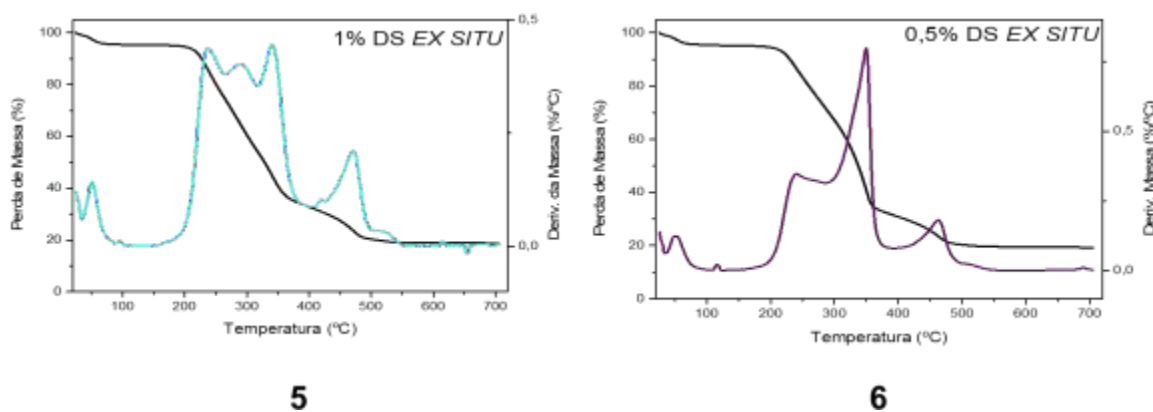


Figura 29. Termogramas dos biocompósitos de CB/copolímero 5% PE-PO-PE *ex situ*, incorporado com 0,5% (5) e 1% de DS (6).

A partir dos dados apresentados conseguimos comparar os dados tanto com a CB nativa sem fármaco (Figuras 15 à 20), quanto para o biocompósito CB/copolímero 5% *in situ* e *ex situ*. É possível notar que a adição do DS na CB e nos biocompósitos, levou ao deslocamento dos eventos de perda de massa, especialmente para os biocompósitos *ex situ*, com a presença de maior massa residual em 700°C, com valores de 25%, e 13% para os biocompósitos *in situ* contendo 0,5% e 1% de DS, respectivamente, e de 19% e 18% para os biocompósitos *ex situ* contendo 0,5% e 1% de DS.

O perfil de perda de massa do DS consiste em três eventos principais: o primeiro entre 288°C a 340°C, com uma perda de massa, acompanhada pela desidratação. Já no segundo evento, observa-se uma perda de massa à medida que a temperatura se aproxima de 443°C. Finalmente, no último evento, a pirólise do medicamento começa a partir de 457°C e continua até ficar completamente estático (SUHAIL, *et al.*, 2021).

4.2.5 Análise de molhabilidade por Ângulo de Contato (AC)

Os dados apresentados na Figura 31 se concentram na análise do ângulo de contato em biocompósitos de CB/copolímero 5% *in situ* e *ex situ* com duas diferentes concentrações do fármaco DS (0,5% e 1%).

Os resultados a seguir sugerem que a molhabilidade dos materiais não é influenciada pela presença do fármaco [Fig. 31(a)]. No entanto, conforme observado também nos dados dos biocompósitos de CB/copolímero 5% *ex situ* exibiram uma menor molhabilidade em comparação com os biocompósitos *in situ*, enquanto a CB nativa contendo o fármaco demonstrou um perfil de molhabilidade menor quando comparado aos biocompósitos. Além disso, pela análise da tensão superficial, a superfície da CB nativa não é afetada pela presença do fármaco [Fig. 31 (b)].

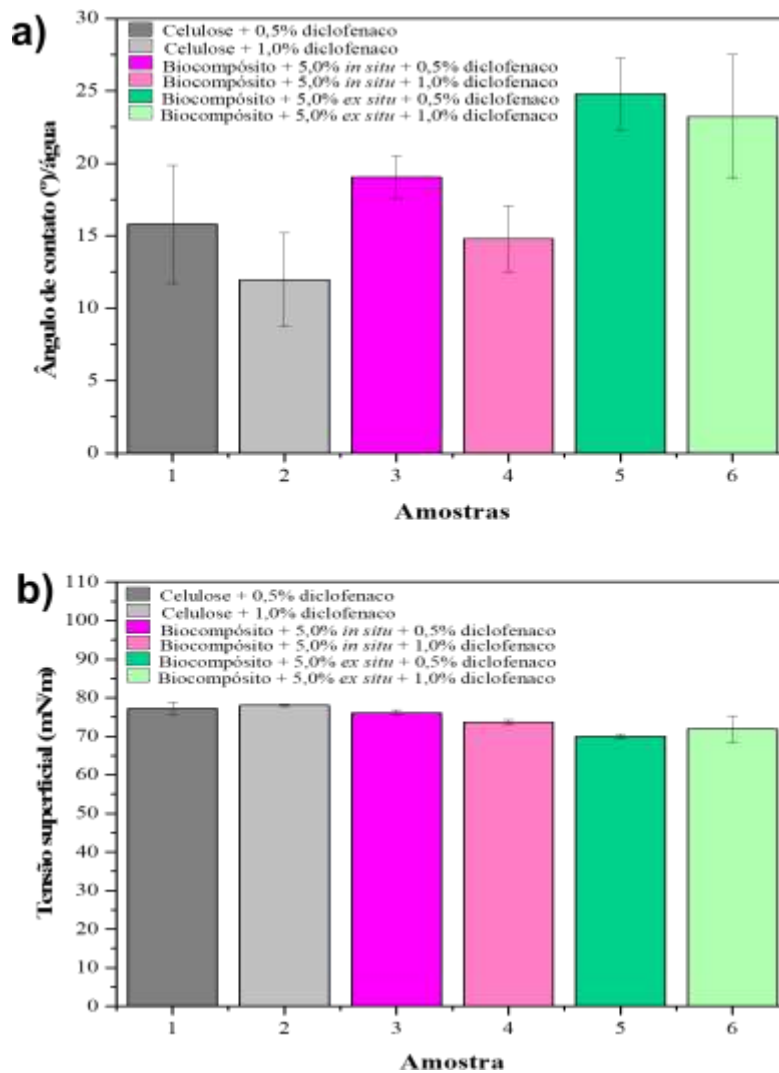


Figura 30. Valores de ângulos de contato (a) e tensão superficial (b) para as amostras de Biocompósitos de CB/copolímero 5% *in situ* e *ex situ*, incorporados com 0,5% e 1% de DS.

4.2.6 Avaliação da citotoxicidade por método colorimétrico

A Figura 32 demonstra a porcentagem de viabilidade celular de fibroblastos murinos após o tratamento com os meios de extração oriundos da CB nativa e dos diferentes biocompósitos de CB/copolímero tribloco *in situ* e *ex situ* 5% incorporados com 0,5% e 1% DS.

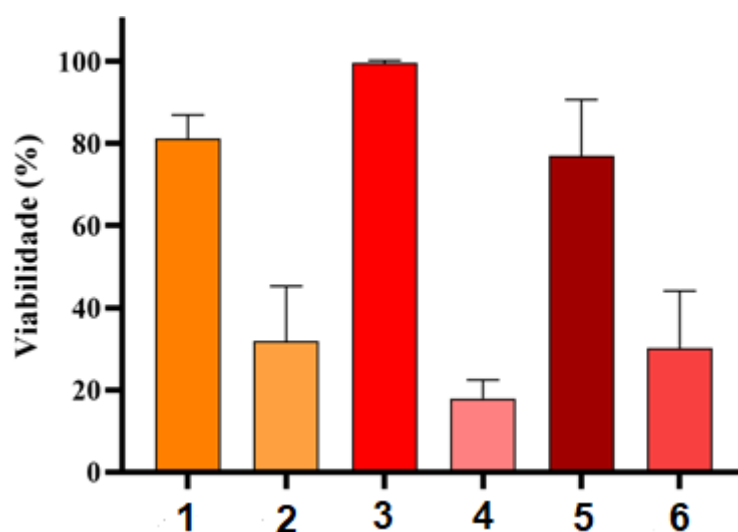


Figura 31. Avaliação da viabilidade (%) de células L929 após 24 h de tratamento com as amostras: (1) CB nativa incorporado com 0,5% DS, (2) CB nativa incorporado com 1% DS, (3) Biocompósito de CB/copolímero PE-PO-PE 5% obtido *in situ* incorporado com 0,5% DS, (4) Biocompósito de CB/copolímero PE-PO-PE 5% obtido *in situ* incorporado com 1% DS, (5) Biocompósito de CB/copolímero PE-PO-PE 5% obtido *ex situ* incorporado com 0,5% DS e (6) Biocompósito de CB/copolímero PE-PO-PE 5% obtido *ex situ* incorporado com 1%. A viabilidade celular (%) foi determinada pelo ensaio colorimétrico utilizando MTT.

Os resultados confirmam que todos os materiais utilizando 0,5% de DS (1,3 e 5) são considerados atóxicos para a linhagem de fibroblastos murino (L929), uma vez que a viabilidade celular para todos os tratamentos testados se manteve acima de 70% (ISO 10993-5). Todavia, as amostras contendo 1% de DS (2,4 e 6), demonstraram citotoxicidade para a linhagem de fibroblastos murino (L929), o que indica que a incorporação do fármaco diclofenaco nesta porcentagem já implica em uma redução de sua aplicabilidade para testes envolvendo o desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas.

4.2.7 Ensaio de Liberação do Diclofenaco de sódio

A compreensão do perfil de liberação de um fármaco é crucial para entender seu comportamento em diferentes sistemas, e os testes de dissolução *in vitro* desempenham um papel vital na previsão de sua eficácia *in vivo*. Esses testes recomendam o uso das "sink conditions", um método que evita a saturação do meio e permite uma avaliação eficaz da capacidade do sistema em regular as taxas de liberação.

Vários fatores influenciam na taxa de liberação de fármacos, incluindo a solubilidade do fármaco, difusão através da matriz, erosão da matriz e desorção do fármaco adsorvido. Além disso, a eficiência da liberação *in vitro* de uma molécula depende não apenas das características do meio/pH, mas também da natureza e das propriedades físico-químicas da matriz/carreador. Portanto, neste estudo, foi avaliado o perfil de liberação *in vitro* dos biocompósitos de CB/copolímero 5% incorporados com o DS a um pH de 5,5, que simula o pH da pele humana.

Os resultados experimentais demonstram que o fármaco seja da matriz de CB nativa, quanto dos biocompósitos de CB/copolímero 5% foi liberado rapidamente ao longo do tempo de ensaio (120 min), apresentando um perfil denominado de *burst release*. Verifica-se que em aproximadamente 5 minutos de ensaio, 26% de fármaco incorporado a 0,5% e 55% para 1% de fármaco incorporado, já havia sido liberado da CB nativa, enquanto para os biocompósitos, esses valores alcançaram 20% (0,5% DS) e 56% (1% DS) para os biocompósitos de CB/copolímero 5% *in situ* e 77% (0,5% DS) e 41% (1% DS) para obtidos via *ex situ*. Com o término do ensaio em 120 minutos, essas porcentagens alcançaram 53% e 68% de DS liberado da CB nativa, enquanto para os biocompósitos CB/copolímero 5% *in situ* foram de 61% para 0,5% de DS incorporado e 75% para 1% de DS incorporado, ademais, para os biocompósitos CB/copolímero 5% *ex situ* a liberação foi de 98% (0,5% DS) e 52% (1% DS). É importante enfatizar que para nenhuma formulação, o fármaco foi 100% liberado no tempo avaliado, sendo necessário a repetição dos experimentos para avaliarmos o perfil de liberação completo ao longo do tempo. A partir do emprego dos modelos matemáticos de Peppas, Higuchi e Weibul apresentados na Tabela 3, obteve-se os valores do coeficiente de correlação linear (R^2).

Tabela 3. Resultados do ensaio de liberação dos materiais a partir de diferentes modelos matemáticos.

Amostra	Modelo Kormeyer-Peppas R^2	Higuchi R^2	Weibul R^2
CB 0,5% DS	0,7798	0,5605	0,7795
CB 1% DS	0,9783	0,9285	0,9783
Biocompósito <i>In situ</i> 0,5% DS	0,8748	0,6811	0,8748
Biocompósito <i>In situ</i> 1% DS	0,9246	0,8074	0,9246
Biocompósito <i>Ex situ</i> 0,5% DS	0,8532	0,7259	0,8532

Biocompósito <i>Ex situ</i> 1% DS	0,9853	0,9078	0,9853
-----------------------------------	--------	--------	--------

Verificou-se que os coeficientes de correlação R^2 para o modelo de Peppas foi àquele que melhor representou a cinética de liberação do DS das matrizes de CB nativa e dos biocompósitos de CB/copolímero 5%. Esse modelo prevê que a liberação do fármaco ocorre em duas fases principais: inicialmente ocorre uma liberação rápida da matriz, característica da dissolução do fármaco, seguida por uma liberação mais lenta, onde ocorre a difusão do fármaco. Além do modelo de Peppas, o modelo de Weibull também pode ser aplicado para elucidar o comportamento cinético de liberação, que preconiza que o perfil de liberação de matrizes biopoliméricas é caracterizado pela dissolução do fármaco (liberação rápida e inicial) (ALVES, 2015). Esses resultados indicam que os biocompósitos de CB/copolímero 5%, em ambos os métodos de obtenção, não controlaram as taxas de liberação do DS.

Sistemas matriciais contendo copolímeros anfífilicos, como o F-68 são usados para incorporar principalmente moléculas hidrofóbicas, que geralmente são encapsuladas dentro das micelas que se auto organizam em solução, à medida que a concentração micelar crítica e a temperatura ideal são aprimoradas e validadas (NUMATA *et al.*, 2015).

A pesquisa guiada por a Volkova, *et al.*, demonstrou que diferentes copolímeros Pluronic possuem a capacidade de solubilizar formas neutras e aniônicas (como a sulfassalazina- SSZ), com uma eficiência maior para formas farmacêuticas neutras. Foi evidenciada a influência do comprimento dos blocos PEO e PPO sobre o seu efeito solubilizante. Os grupos PPO, juntamente com os grupos EO, desempenham um papel crucial na solubilização da SSZ, sugerindo que um fragmento da molécula SSZ é inserido no núcleo micelar, enquanto o outro fragmento interage parcialmente com a porção hidrofílica dos grupos EO através de ligações de hidrogênio.

Galarda e Goscianska, (2023) e Silva *et al.* (2014), demonstraram que a liberação do DS em diferentes matrizes incluindo a CB nativa, também culminou com um perfil de liberação sem controle ao longo do tempo, ocorrendo rapidamente logo no início do ensaio.

4. CONCLUSÃO

A partir do compilado de resultados apresentados no presente estudo, foi possível comprovar a eficiência da modificação *in situ* e *ex situ* de películas de CB com o copolímero tribloco PEO-PPO-PEO em diferentes razões mássicas. A presença de domínios do copolímero sobre a rede 3D de nanofibrilas da CB foi confirmada pelas análises de MEV. Em relação a análise de FT-IR foi comprovado a presença das principais bandas características da CB nativa, sem a presença de bandas adicionais após incorporação do copolímero. O DRX evidenciou dois principais picos relacionados com a região amorfa e cristalina da celulose I (14,5° e 22,7°), respectivamente, com maiores intensidades de pico para os biocompósitos obtidos por modificação *in situ* quando comparados aos biocompósitos obtidos *ex situ*. Os estudos de molhabilidade indicaram que a presença do copolímero e do fármaco modelo, não alterou significativamente a hidrofiliabilidade da superfície das amostras. No entanto, os biocompósitos obtidos via método *ex situ* apresentaram uma menor molhabilidade em maiores concentrações de copolímero, provavelmente devido a presença do copolímero entre os poros das fibrilas de CB. Ademais, o ensaio biológico *in vitro* utilizando a linhagem L929, confirmou a natureza atóxica dos diferentes materiais, tendo em vista que tanto a CB nativa, como o copolímero F-68 já são extensivamente empregados em diferentes áreas, incluindo as áreas médico-farmacêuticas, sendo considerados seguros para tal aplicação.

Para os biocompósitos de CB/copolímero 5% incorporados com duas diferentes porcentagens de DS pelo método de adsorção não evidenciou alterações significativas pelos ensaios de DRX e molhabilidade. Entretanto, as imagens de MEV demonstraram estruturas aglomeradas na superfície da celulose bacteriana (CB) nativa e biocompósitos, indicando a presença do fármaco após a incorporação. Os espectros de FT-IR revelaram bandas adicionais e características dos grupos funcionais do DS, confirmando sua incorporação nos biocompósitos. A adição do DS levou ao deslocamento dos eventos de perda de massa, especialmente nos biocompósitos *ex situ*, que apresentaram maior massa residual a 700°C.

Os testes de viabilidade celular demonstraram que os biocompósitos de CB/copolímero 5% contendo 0,5% de DS foram atóxicos para os fibroblastos

murinos, mantendo viabilidade acima de 70%. Entretanto, as amostras contendo 1% de DS mostraram citotoxicidade, sugerindo que essa concentração não é adequada para aplicações médico-farmacêuticas.

Os ensaios de liberação utilizando dissolutor, demonstraram uma rápida liberação do fármaco. Em 5 minutos do ensaio, 26% (0,5% DS) e 55% (1% DS) foram liberados da CB nativa, e valores semelhantes foram observados nos biocompósitos *In situ* e *Ex situ*. Em 120 minutos, a liberação alcançou até 98% para alguns biocompósitos. Os modelos matemáticos indicaram que o modelo de Peppas foi àquele que melhor representou a cinética de liberação do DS, com uma liberação rápida e inicial guiada pela dissolução e difusão oriundo das matrizes dos biocompósitos.

Em conclusão, os biocompósitos de CB/copolímero F-68 não controlaram as taxas de liberação do DS, havendo a necessidade de novas abordagens de incorporação baseadas no controle de temperatura e concentração micelar crítica para avaliar a possível otimização da incorporação de diferentes fármacos, tanto hidrofílicos, quanto hidrofóbicos, a fim de propor um novo sistema de liberação controlada de fármacos baseado em CB/copolímero tribloco.

5. PERSPECTIVAS FUTURAS

Pretende-se para as etapas futuras determinar as propriedades de topografia e nanorugosidade dos materiais biocompósitos por análises de Microscopia de Força Atômica (AFM) e também AFM-IR, e investigar a partir de novas estratégias de incorporação de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos, a eficiência de encapsulação nos diferentes biocompósitos de CB/copolímero, visando propor uma formulação com propriedades que otimize e controle a liberação de diferentes fármacos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUDELO, P.; JAVIER, A. Efeito de líquidos iônicos sobre a micelização de copolímeros tribloco. www.locus.ufv.br, [s. l.], 2015. Disponível em: <<https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/7632>>. Acesso em: 28 nov. 2023.

ILLA MP, SHARMA CS, KHANDELWAL M. Tuning the physiochemical properties of bacterial cellulose: effect of drying conditions. *Journal of Materials Science* 54(18):12024-12035, 2019.

CLARO, A. M.; AMARAL, N. C. D.; COLTURATO, M.V. M.; ALEIXO, N. A.; PAIVA, R.; CRUZ, S. A.; MONTEIRO, G. C.; SENRA, G.; RESENDE, F. A.; DEFFUNE, E.; ROSAS, M.; BARUD, H. S. Siloxane-modified bacterial cellulose as a promising platform for cell culture. *Cellulose*, v. 29, n. 18, p. 9597-9608, 2022.

AMARAL, N. C. Do.; CLARO, A. M.; MONTEIRO, G. C.; BARUD, H. S. Surface-Modified Bacterial Cellulose with Mercaptosilane as a Multifunctional Platform. *International Journal of Advances in Medical Biotechnology - IJAMB*, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 19-24, 2019.

ANDRITSOU, V.; DE MELO, E. M.; TSOUKO, E.; LADAKIS, D.; MARAGKOUDAKI, S.; KOUTINAS, A. A.; MATHARU, A. S. Synthesis and Characterization of Bacterial Cellulose from Citrus-Based Sustainable Resources. *ACS Omega*, v. 3, n. 8, p. 10365-10373, 2018.

HUYSECOM, A-S.; GLORIEUX, C.; THOEN, J.; THIELEMANS, W.; FUSTIN, C-A.; MOLDENAERS, P.; CARDINAEELS, R. Phase behavior of medium-length hydrophobically associating PEO-PPO multiblock copolymers in aqueous media. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 641, p. 521-538, 2023.

ARAÚJO, I. M.; ROSA; PACHECO, G.; LUSTRI, W. R.; AGNIESZKA TERCJAK; GUTIERREZ, J.; COSTA, O.; AZEVEDO, F.; FIGUÊREDO, G. S.; MARIA TORRES VEGA; JOSÉ, S.; BARUD, S. Hydrothermal synthesis of bacterial cellulose-copper oxide nanocomposites and evaluation of their antimicrobial activity. , v. 179, p. 341-349, 2018.

BARBOSA, M. L.; OLIVEIRA, L. M.; PAIVA, R.; DAMETTO, A. C.; DIAS, D. S.; RIBEIRO, C. A.; WRONA, M.; NERIN, C.; BARUD, H. S.; CRUZ, S. A. Evaluation the Potential of Onion/Laponite Composites Films for Sustainable Food Packaging with Enhanced UV Protection and Antioxidant Capacity. *Molecules*, v. 28, p. 6829, 2023.

BLAGA, A-C.; TANASĂ, A. M.; CIMPOESU, R.; TARATU-FARMUS, R-E.; SUTEU, D. Biosorbents Based on Biopolymers from Natural Sources and Food Waste to Retain the Methylene Blue Dye from the Aqueous Medium. *Polymers*, v.14, p. 2728, 2022.

BOLLENBACH, L.; BUSKE, J.; MÄDER, K.; GARIDEL, P. Poloxamer 188 as surfactant in

biological formulations - An alternative for polysorbate 20/80? International Journal of Pharmaceutics, [s. l.], v. 620, p. 121706, 2022.

BROWN, A. J. On na acetic fermente which forms cellulose. *Journal of the Chemical Society Transactions*, v. 49, p. 432-439, 1886.

BUSUIOC, C.; ISOPENCU, G. O.; DELEANU, I-M. Bacterial Cellulose-Polyvinyl Alcohol Based Complex Composites for Controlled Drug Release. *Appl. Sci.*, v.13, p.1015, 2023.

CHANABODEECHALERMRUNG, B.; CHAIWARIT, T.; SOMMANO, S. R.; RACHTANAPUN, P.; KANTRONG, N.; CHITTASUPHO, C.; JANTRAWUT, P. Dual Crosslinked Ion-Based Bacterial Cellulose Composite Hydrogel Containing Polyhexamethylene Biguanide. *Membranes (Basel)*. v.12, p.825, 2022.

DE OLIVEIRA, B. H. G. A multipurpose natural and renewable polymer in medical applications: Bacterial cellulose. 2016.

DE OLIVEIRA, B. H. G.; DA SILVA, R. R.; DA SILVA BARUD, H.; TERCJAK, A.; GUTIERREZ, J.; LUSTRI, W. R.; DE OLIVEIRA, O. B.; RIBEIRO, S. J. L. A multipurpose natural and renewable polymer in medical applications: Bacterial cellulose. *Carbohydrate Polymers*, v. 153, p. 406-420, 2016.

DENG, Y.; SONG, Y.; TIAN, Q.; HUANG, Z.; FAN, D.; SHE, Z.; LIU, X.; CHENG, X.; YU, B. Self-assembled micelles of novel amphiphilic copolymer cholesterol-coupled F68 containing cabazitaxel as a drug delivery system. *International Journal of Nanomedicine*, [s. l.], p. 2307, 2014. Acesso em: 2 set. 2021.

DI, Z.; SHI, Z.; ULLAH, M. W.; LI, S.; YANG, G. A transparent wound dressing based on bacterial cellulose whisker and poly(2-hydroxyethyl methacrylate). *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 105, p. 638-644, 2017.

FENG, X. J.; JIANG, L. Design and Creation of Superwetting/Antiwetting Surfaces. *Advanced Materials*, [s. l.], v. 18, n. 23, p. 3063-3078, 2006.

GARG, U.; CHAUHAN, S.; NAGAICH, U.; JAIN, N. Current Advances in Chitosan Nanoparticles Based Drug Delivery and Targeting. *Adv Pharm Bull*. v. 9, p. 195-204, 2019.

GHASEMI, M.; TURNBULL, T.; SEBASTIAN, S.; KEMPSON, I. The mtt assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, v.22, p.23, 2021.

GHEORGHITA, R.; ANCHIDIN-NOROCEL, L.; FILIP, R.; DIMIAN, M.; COVASA, M. Applications of Biopolymers for Drugs and Probiotics Delivery. *Polymers (Basel)*. v.13, p. 2729, 2021.

GUTIERREZ, J.; CARRASCO-HERNANDEZ, S.; BARUD, H. S.; OLIVEIRA, R. L.; CARVALHO, R. A.; AMARAL, A. C.; TERCJAK, A. Transparent nanostructured cellulose acetate films based on the self assembly of PEO-b-PPO-b-PEO block copolymer. *Carbohydrate Polymers*, [s. l.], v. 165, p. 437-443, 2017. Acesso em: 30 dez. 2021.

HUSSEIN, Y. H. A.; YOUSSEF, M. Polymeric Micelles of Biodegradable Diblock Copolymers: Enhanced Encapsulation of Hydrophobic Drugs. *Materials*, v.11, p. 688, 2018.

INÁCIO, I. F. Nanopartículas à base de excipientes naturais aplicadas como sanitizantes. *Repositorio.ufu.br*, [s. l.], 2022. Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/36153>>. Acesso em: 28 nov. 2023.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, "Biological evaluation of medical devices". Part 12: Sample preparation and reference materials, 4ed, ISO 10993-12, 2012.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. "Biological Evaluation of medical devices", Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity, 3ed, ISO 10993-5,

ISHIDA, O.; MARUYAMA, K.; SASAKI, K.; IWATSURU, M. Size-dependent extravasation and interstitial localization of polyethyleneglycol liposomes in solid tumor-bearing mice. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 190, p. 49-56, 1999.

-MENDOZA, J. G-H.; BARUD, H.S.; GUTIERREZ, J.; TERCJAK, A. Flexible photochromic cellulose triacetate based bionanocomposites modified with sol-gel synthesized V2O5 nanoparticles. v. 208, p. 50-58, 2019.

JUNCAN, A. M.; MOISĂ, D. G.; SANTINI, A.; MORGovan, C.; RUS, L-L.; VONICA-TINCU, A. L.; LOGHIN. F. Advantages of Hyaluronic Acid and Its Combination with Other Bioactive Ingredients in Cosmeceuticals. *Molecules*. v. 26, p.4429, 2021.

KABANOV, A. V.; NAZAROVA, I. R.; ASTAFIEVA, I. V.; BATRAKOVA, E. V.; ALAKHOV, V. Yu.; YAROSLAVOV, A. A.; KABANOV, V. A. Micelle Formation and Solubilization of Fluorescent Probes in Poly(oxyethylene-b-oxypropylene-b-oxyethylene) Volume 28, Number 7, March 27, 1995, pp 2303–2314. *Macromolecules*, [s. l.], v. 29, n. 27, p. 8999-8999, 1996. Acesso em: 17 maio. 2020.

KAMALY, N.; YAMEEN, B.; WU, J.; FAROKHZAD, O. C. Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release. *Chem Rev*. v. 116, p. 2602-2663, 2016.

KAMEL, S., KHATTAB, T. A. Recent Advances in Cellulose-Based Biosensors for Medical Diagnosis. *Biosensors (Basel)*. v.10, p. 67, 2020.

KHALIQ, N. U.; LEE, J.; KIM, S.; SUNG, D.; KIM, H. Pluronic F-68 and F-127 Based Nanomedicines for Advancing Combination Cancer Therapy. *Pharmaceutics*, [s. l.], v. 15, n. 8, p. 2102, 2023. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1999-4923/15/8/2102#:~:text=For%20instance%2C%20Pluronic-based%20nanoparticles>>.

Acesso em: 16 nov. 2023.

LANGARI, M. M.; NIKZAD, M.; GHOREYSHI, A. A.; MOHAMMADI, M. Isolation of Nanocellulose from Broomcorn Stalks and Its Application for Nanocellulose/Xanthan Film Preparation. *ChemistrySelect*, [s. l.], v. 4, n. 41, p. 11987-11994, 2019. Acesso em: 20 dez. 2020.

LAVRIC, G., OBERLINTNER, A.; FILIPOVA, I.; NOVAK, U.; LIKOZAR, B.; BRODNJAK, V. Functional Nanocellulose, Alginate and Chitosan Nanocomposites Designed as Active Film Packaging Materials. *Polymers*, v.13, p.2523, 2021.

LAZARINI, S. C.; AQUINO, R. De; 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*, [s. l.], 2015. Disponível em: <<https://repositorio.unicamp.br/acervo/detalhe/1225924>>. Acesso em: 28 nov. 2023.

LAZARINI, S. C.; LUSTRI, W. R. Bacterial cellulose: Application as drug delivery system. *International Journal of Advances in Medical Biotechnology - IJAMB*, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 7-10, 2018. Disponível em: <<https://www.journalamb.com/index.php/jamb/article/view/19>>. Acesso em: 28 nov. 2023.

LAZARINI, S. C.; YAMADA, C.; BARUD, H. S.; ELIANE TROVATTI; CORBI, P. P.; LUSTRI, W. R. Influence of chemical and physical conditions in selection of *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769 strains with high capacity to produce bacterial cellulose for application as sustained antimicrobial drug-release supports. *Journal of Applied Microbiology*, [s. l.], v. 125, n. 3, p. 777-791, 2018. Acesso em: 28 nov. 2023.

LEAL, S.; CECÍLIA CRISTELO; SILVESTRE, S.; FORTUNATO, E.; SOUSA, A.; ALVES, A.; CORREIA, D. M.; S. LANCEROS-MÉNDEZ; GAMA, M. Hydrophobic modification of bacterial cellulose using oxygen plasma treatment and chemical vapor deposition. *Cellulose*, [s. l.], v. 27, n. 18, p. 10733-10746, 2020. Acesso em: 27 set. 2023.

LIMA, L. R.; SANTOS, D. B.; SANTOS, M. V.; BARUD, H. S.; HENRIQUE, M. A.; PASQUINI, D.; PECORARO, E.; RIBEIRO, S. J. L. CELLULOSE NANOCRYSTALS FROM BACTERIAL CELLULOSE. *Química Nova*, [s. l.], 2015. Acesso em: 21 out. 2022.

LIYASKINA, E.; REVIN, V.; PARAMONOVA, E.; NAZARKINA, M.; PESTOV, N.; REVINA, N.; KOLESNIKOVA, S. Nanomaterials from bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. *Journal of Physics: Conference Series*, [s. l.], v. 784, p. 012034, 2017. Acesso em: 2 fev. 2021.

LOOF, D.; HILLER, M.; OSCHKINAT, H.; KOSCHEK, K. Quantitative and Qualitative Analysis of Surface Modified Cellulose Utilizing TGA-MS. *Materials*, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 415, 2016. Acesso em: 24 set. 2022.

LUKOVA, P., KATSAROV, P., PILICHEVA, B. Application of Starch, Cellulose, and Their Derivatives in the Development of Microparticle Drug-Delivery Systems. *Polymers*, v.15, p.3615, 2023.

LUSTRI, W. R.; BARUD, H. G. de O.; SILVA BARUD, H. Da; PERES, M. F. S.; GUTIERREZ, J.; TERCJAK, A.; JUNIOR, O. B. de O.; RIBEIRO, S. J. L. Microbial Cellulose — Biosynthesis Mechanisms and Medical Applications. [s.l.] : IntechOpen, 2015. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/chapters/49485>>

MANU, T.; NAZMI, A. R.; SHAHRI, B.; EMERSON, N.; HUBER, T. Biocomposites: A review of materials and perception. *Materials Today Communications*, [s. l.], v. 31, p. 103308, 2022. Acesso em: 10 jan. 2023.

MARESTONI, L. D.; BARUD, H. da S.; GOMES, R. J.; CATARINO, R. P. F.; HATA, N. N. Y.; RESSUTTE, J. B.; SPINOSA, W. A. Commercial and potential applications of bacterial cellulose in Brazil: ten years review. *Polímeros*, [s. l.], v. 30, n. 4, 2020. Acesso em: 19 maio. 2022.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, [s. l.], v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NAYAK, A. K.; AHMAD, S. A.; BEG, S.; ARA, T. J.; HASNAIN, M. S. Drug delivery: Present, past, and future of medicine. *Applications of Nanocomposite Materials in Drug Delivery*. Woodhead Publishing Series in Biomaterials, Chapter 12, p. 255-282, 2018.

NIGOGHOSSIAN, K. Membranas de celulose bacteriana contendo nanopartículas de YVO 4 :Yb 3+. [s.l: s.n.]. Disponível em:

<<https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=8d41367ffbaadd8b3f1191ad6a535284a8f01e28>>. Acesso em: 28 nov. 2023.

PICHETH, G. F.; PIRICH, C. L.; SIERAKOWSKI, M. R.; WOEHL, M. A.; SAKAKIBARA, C. N.; DE SOUZA, C. F.; MARTIN, A. A.; DA SILVA, R.; DE FREITAS, R. A. Bacterial cellulose in biomedical applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, [s. l.], v. 104, p. 97-106, 2017a. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813017313375>>. Acesso em: 14 out. 2019.

PICHETH, G. F.; PIRICH, C. L.; SIERAKOWSKI, M. R.; WOEHL, M. A.; SAKAKIBARA, C. N.; DE SOUZA, C. F.; MARTIN, A. A.; DA SILVA, R.; DE FREITAS, R. A. Bacterial cellulose in biomedical applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, [s. l.], v. 104, p. 97-106, 2017b. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813017313375>>

PRECEDENCE RESEARCH (2022). Controlled Release Drug Delivery Market (By Technology: Coacervation, Wurster Technique, Implants, Micro Encapsulation, Targeted Delivery, Transdermal, Others; By Release Mechanism: Partition Controlled Micro Reservoir Drug Delivery Systems, Polymer Based Systems, Drug Delivery Systems, which are Feedback Regulated, Drug Delivery Systems that are Activation-modulated, Chemically Activated; By Application) - Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends, Regional Outlook, and Forecast 2023-2032. Disponível em: <https://www.precedenceresearch.com/controlled-release-drug-delivery-market>. Acesso realizado em 29/11/2023.

QING, F.G.; ZI-MENG, H.; ZHANG, C. L.; HUAI, B. Y.; SHU, H. Y. Growing Bacterial Cellulose-Based Sustainable Functional Bulk Nanocomposites by Biosynthesis: Recent Advances and Perspectives. *Contas de Pesquisa de Materiais*, v.6,p. 608-619, 2022.

SEGAL, L.; CREELY, J. J.; MARTIN, A. E.; CONRAD, C. M. An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. *Textile Research Journal*, v. 29, p. 786-794, 1959.

SEVERINO, P.; DA SILVA, C.F.; ANDRADE L.N.; DE LIMA, O. D.; CAMPOS, J.; SOUTO, E.B. Alginate nanoparticles for drug delivery and targeting. *Curr. Pharm. Des.* v. 25, p.1312-1334, 2019.

SHARIATINIA, Z. Pharmaceutical applications of chitosan. *Adv Colloid Interface Sci.* v. 263, p.131-194, 2019.

SINGLA, P.; GARG, S.; MCCLEMENTS, J.; JAMIESON, O.; PEETERS, M.; MAHAJAN, R. K. Advances in the therapeutic delivery and applications of functionalized Pluronics: A critical review. *Advances in Colloid and Interface Science*, [s. l.], v. 299, p. 102563, 2022.

SUN, B.; ZHANG, M.; SHEN, J.; HE, Z.; FATEHI, P.; NI, Y. Applications of Cellulose-based Materials in Sustained Drug Delivery Systems. *Curr Med Chem*, v. 26, p.1485-2501, 2019.

TERCJAK, A.; GUTIERREZ, J.; BARUD, S.; DOMENEGUETTI, R. R.; JOSÉ, S. Nano- and Macroscale Structural and Mechanical Properties of in Situ Synthesized Bacterial Cellulose/PEO-b-PPO-b-PEO Biocomposites. v. 7, p. 4142-4150, 2015.

FARACO, T. A.; FONTES, M.; PASCHOALIN, R. T.; CLARO, A. M.; GONÇALVES, S.I.; CAVICCHIOLI, M.; LIRA, R.; CREMONA, M.; RIBEIRO, S; BARUD, H.S.; LEGNANI C.; Review of Bacterial Nanocellulose as Suitable Substrate for Conformable and Flexible Organic Light-Emitting Diodes. *Polymers*, v. 15, p. 479-479, 2023.

TROMBINO, S.; SOLE, R.; CURCIO, F.; CASSANO, R. Polymeric Based Hydrogel Membranes for Biomedical Applications. *Membranes*, v. 13, p. 576, 2023.

TROVATTI, E.; DOS SANTOS, A. M.; AMARAL, A. C.; MENEGUIN, A. B.; MATOS, B. D. M.; PACHECO, G.; DE CARVALHO, R. A.; LAZARINI, S. C.; CARDOSO, V. M. de O.; LUSTRI, W. R.; BARUD, H. D. S. Biopolímeros: aplicações farmacêutica e biomédica. *Eclética Química Journal*, v. 41, p. 01, 2017.

URBINA, L.; ECEIZA, A.; GABILONDO, N.; CORCUERA, M. A.; RETEGI, A. Tailoring the in situ conformation of bacterial cellulose-graphene oxide spherical nanocarriers. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 163, p. 1249-1260, 2020.

VARGA, N.; BÉLTEKI, R.; JUHÁSZ, Á.; CSAPÓ, E. Core-Shell Structured PLGA Particles Having Highly Controllable Ketoprofen Drug Release. *Pharmaceutics*, [s. l.], v. 15, n. 5, p. 1355, 2023. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37242597/>>. Acesso em: 28 nov. 2023.

VENTURA, A.MF.M. Os Compósitos e a sua aplicação na Reabilitação de Estruturas metálicas. *Ciência & Tecnologia dos Materiais*. v. 21, 2009. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/262585442_Os_Compositos_e_a_sua_aplicacao_na_Reabilitacao_de_Estruturas_metalicas>. Acesso realizado em 15.10.22.

YAMAMOTO, H.; HORII, F.; HIRAI, A. In situ crystallization of bacterial cellulose .2. Influences of different polymeric additives on the formation of celluloses I-alpha and I-beta at the early stage of incubation. *Cellulose*, v. 3, p. 229-242, 1996.

ZARRINTAJ, P.; RAMSEY, J. D.; SAMADI, A.; ATOUFI, Z.; YAZDI, M. K.; GANJALI, M. R.; AMIRABAD, L. M.; ZANGENE, E.; FAROKHI, M.; FORMELA, K.; SAEB, M. R.; MOZAFARI, M.; THOMAS, S. Poloxamer: A versatile tri-block copolymer for biomedical applications. *Acta Biomaterialia*, v. 110, p. 37-67, 2020.

ANNAMALAI, Meenakshi et al. Surface energy and wettability of van der Waals structures. *Nanoscale*, v. 8, n. 10, p. 5764-5770, 2016.

BARBOSA, Maciel L. et al. Evaluation the potential of onion/laponite composites films for sustainable food packaging with enhanced uv protection and antioxidant capacity. *Molecules*, v. 28, n. 19, p. 6829, 2023.

CARRIER, O.; BONN, D. Contact angles and the surface free energy of solids. In: *Droplet Wetting and Evaporation*. Academic Press, p. 15-23, 2015.

CHIBOWSKI, E; TERPILOWSKI, K. Surface free energy of polypropylene and polycarbonate solidifying at different solid surfaces. *Applied surface science*, v. 256, p. 1573-1581, 2009.

JESUS, L. A. O. Desenvolvimento e modificação a plasma de materiais a base de poli (ácido láctico)/ α - Ag_2WO_4 com potencial ação antimicrobiana. 2022.

PAIVA, R.S. Polipropileno reciclado para contato com alimento: etching e deposição de filmes de carbono amorfo hidrogenado por plasma. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de São Carlos, 2020.

WU, S. Calculation of interfacial tension in polymer systems. In: *Journal of Polymer Science Part C: Polymer Symposia*. New York: Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, p. 19-30, 1971.

YUAN, Y; LEE, T. R. Contact angle and wetting properties. In: *Surface science techniques*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 3-34, 2013.

ZETTLEMOYER, A. C. The surface tension of pure liquid compounds. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 46, p. 182, 1974.

DE FREITAS, C. F. et al. Recent advances of Pluronic-based copolymers functionalization in biomedical applications. *Biomaterials advances*, v. 151, n. 213484, p. 213484, 2023.

DOMENEGUETTI, R. R. et al. Structural and morphological properties of in-situ biosynthesis of biocompatible bacterial cellulose/Laponite nanocomposites. *Applied clay science*, v. 234, n. 106851, p. 106851, 2023.

FENG, H. et al. Block copolymers: Synthesis, self-assembly, and applications. *Polymers*, v. 9, n. 12, p. 494, 2017.

NAGALAKSHMAIAH, M. et al. Biocomposites. Em: *Green Composites for Automotive Applications*. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 197-215.

SUHAIL, M. et al. Fabrication and characterization of diclofenac sodium loaded hydrogels of sodium alginate as sustained release carrier. *Gels (Basel, Switzerland)*, v. 7, n. 1, p. 10, 2021.

SURDU VA, GYÓRGY R. X-ray diffraction data analysis by machine learning methods—a review. *Applied Sciences* 13(17):9992, 2023.