

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

JHONATAN MIGUEL SILVA

NANOCOMPÓSITOS ORGÂNICO-INORGÂNICOS BASEADOS EM CELULOSE
BACTERIANA/MATRIZES LAMELARES ORGANOMODIFICADAS PARA
APLICAÇÃO BIOMÉDICA

ARARAQUARA, SP

2024

JHONATAN MIGUEL SILVA

NANOCOMPÓSITOS ORGÂNICO-INORGÂNICOS BASEADOS EM CELULOSE
BACTERIANA/MATRIZES LAMELARES ORGANOMODIFICADAS PARA
APLICAÇÃO BIOMÉDICA

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

Mestre Jhonatan Miguel Silva

Orientador: Prof. Dr. Hernane da Silva Barud

Co-orientadoras: Prof.Dr^a.Vera Regina Leopoldo Constantino
e Dr^a. Aline Ribeiro Passos

ARARAQUARA, SP

2024

FICHA CATALOGRÁFICA

S58n Silva, Jhonatan Miguel

Nanocompósitos orgânico-inorgânicos baseados em celulose bacteriana/
matrizes lamelares organomodificadas para aplicação biomédica/Jhonatan
Miguel Silva. – Araraquara: Universidade de Araraquara, 2024.

143f.

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

Orientador: Prof. Dr. Hernane da Silva Barud

1. Celulose bacteriana. 2. Laponita. 3. Compósitos. 4. Curativos
multifuncionais. 5. Ciprofloxacina. 6. Liberação de fármacos. I. Título.

CDU 577.4

A minha família,
quem me acompanhou nesses quase 10 anos de pesquisa até aqui.
A meus professores, em especial o Toni (*in memoriam*),
os culpados disso tudo.

Essa tese não foi construída em quatro anos. Ela é resultado de uma década de conhecimento acumulado, aprimoramento, experiências, contatos, colegas, amigos, família. Cada ponto dessa complexa rede tem grande importância com suas contribuições, contudo, existe pontos constantes, que deixaram essa trama bem entrelaçada e me permitiu chegar aqui.

O primeiro ponto a agradecer não poderia deixar de ser a minha família, meus pais e irmãos, o ponto central, a base, de onde tudo começou. Aos meus pais, que talvez não saibam ao certo a dimensão da influência deles, deixo aqui as palavras do meu padrinho “você tem que tirar o chapéu para seus pais, eles conseguiram educar e formar vocês, não é qualquer um que consegue”. Pois bem, meus pais são trabalhadores informais, crescemos na “banca de calçado”, onde dia e noite eles trabalham. Quando ele disse “não é qualquer um”, ele se refere a nossa história. Eles não tiveram a oportunidade de se educarem formalmente, mas pela força e suor, pelo seu sangue, nos educaram e nos possibilitaram uma educação de qualidade apesar de tudo. Sem o exemplo de vocês, José Antônio e Lúcia, eu não teria nem começado. Não tem como agradecer nessa dimensão, não existe palavras, a não ser eu amo vocês.

Agora agradeço a família que eu escolhi, ou que me escolheu, não sei bem ao certo. Minha esposa, Samanta, quem acompanhou realmente de perto tudo isso. Samanta, você chorou meu choro, riu minhas alegrias, me colocou para cima quando precisei, me alertou e orientou quando foi preciso. Mais que minha esposa, você se tornou parte de mim. Essa parte se multiplicou e veio nossos pequenos, Vinícius e Cecília, eles são a representação do resultado de todo nosso amor e carinho. Eu amo vocês, ao infinito e além, muito além.

Nessa rede, os amigos foram pontos cruciais, às vezes como pontapé inicial (viu Toni, você foi o responsável, foi você que me indicou para a iniciação científica, quase como uma convocação, seja onde estiver, eu lhe agradeço por ser essa centelha). Alguns amigos foram suporte, maioria das vezes emocional, nesse sentido agradeço demais ao meu querido amigo Gabriel Ribeiro quem teve a paciência de me escutar, de me aconselhar, e ser esse “psicólogo” informal.

Acontece as vezes de alguns começaram como colegas, mas se tornaram amigos no percurso, e aqui cabe o agradecimento ao meu orientador e amigo Prof. Hernane. O senhor me ajudou no mestrado, me convidou ao doutorado e nesse percurso fui evoluindo e aprendendo com você, e se é para atribuir responsável, você sabe que foi um dos principais atores e apoiadores da Bioclívea, se esse doutorado é muito mais que um doutorado, foi graças a seu apoio.

E se tratando de apoio, aqui eu venho agradecer as minhas Co-orientadoras, Prof. Vera Constantino e Aline Passos. A Vera, que mais de uma vez entrou em reunião comigo e me orientou por onde seguir, realizou medidas e corrigiu diversos textos, muito obrigado pela paciência e parceria. A Aline, quem me abriu as portas do mundo de luz síncrotron e permitiu realizar diversos experimentos base desse trabalho, realizou medidas, corrigiu textos, orientou, foi mediadora e companheira de laboratório em Campinas, te agradeço demais por todo esse apoio.

Ainda no cerne dos apoios, parte desse trabalho foi realizado no laboratório GNanoBio (FCFRP-USP/SP) no comando da Prof. Priscyla Marcato a qual agradeço por nos abrir seu laboratório e nos ajudar a avançar no trabalho. Não posso deixar de citar e agradecer a Tais Massaro que me acompanhou no laboratório e foi essencial. A Tais é uma dessas pessoas ímpares no mundo, que não mede esforços em ajudar a quem precisa, seja com palavras amigas durante o café ou colocando a mão na massa. De colega, virou amiga.

E como bem sabem, pesquisa não é feita só de experimentos e laboratório, mas também de colegas e cafés, que ajudam a lapidar as ideias e mudam o rumo das coisas. Agradeço demais aos colegas do Grupo BioPolMat, em especial aos que contribuíram diretamente, Marina, Vitória, Amanda, Marco, Sophia, Lais. Agradeço também as colegas Analú e Prof. Fernanda Brighenti, Unesp – Araraquara, que contribuíram com testes de atividade antibacteriana.

Agradeço também aos órgãos de fomento e fundações, PPG em Biotecnologia/UNIARA, FUNDUNESP, FINEP, CNPq, CAPES, FAPESP, que forneceram taxas, diárias, bolsas e financiamento para a execução desse trabalho.

*“When I heard the learn’d astronomer,
When the proofs, the figures, were ranged in columns before me,
When I was shown the charts and diagrams, to add, divide, and measure them,
When I sitting heard the astronomer where he lectured
with much applause in the lecture-room,
How soon unaccountable I became tired and sick,
Till rising and gliding out I wander’d off by myself,
In the mystical moist night-air, and from time to time,
Look’d up in perfect silence at the stars.”*

Walt Whitman

RESUMO DA TESE

Nesse trabalho foram realizadas pesquisas acerca do desenvolvimento e caracterização de compósitos a base de celulose bacteriana (CB) e laponita (Lap), organofuncionalizados, como potenciais curativos multifuncionais e sistemas de liberação de fármacos para o tratamento de feridas cutâneas. Para isso, no Capítulo 1 foi realizada uma prospecção tecnológica sobre o uso de compósitos do tipo celulose bacteriana e argilas como materiais promissores no desenvolvimento de novos curativos, avaliando o cenário atual sobre feridas e a necessidade de novos curativos modernos. Desta forma, verificou-se que o desenvolvimento utilizando a celulose bacteriana e argilas, apesar de serem pesquisados como curativos e sistema de liberação de fármacos, a produção de compósitos com esses materiais é pouco explorada na literatura o que seria interessante na obtenção de curativos multifuncionais. Já no Capítulo 2 o leitor estará a parte do desenvolvimento e caracterização de compósitos CB/Lap, contendo diferentes teores de argila, com o objetivo de verificar o comportamento do material frente a adsorção e liberação do fármaco antibacteriano Ciprofloxacina. Os compósitos obtidos apresentaram maior resistência térmica, maior capacidade de adsorção e liberação sustentada do fármaco em comparação com a CB isolada, indicando que materiais obtidos são promissores para a aplicação em curativos tópicos. No Capítulo 3 foi aprofundada a caracterização estrutural dos compósitos CB/Lap utilizando técnicas de luz Síncrotron (USAXS e Microtomografia Ptico-gráfica 3D) obtidos no Sírius/LNLS-CNPq, com o objetivo de compreender melhor a interferência da argila na estrutura do material e compreender a relação entre a estrutura e o comportamento da amostra durante o processo de liberação do fármaco. Foi possível entender de forma mais aprofundada as interações da laponita com a CB, indicando deposição superficial da argila nas fibras do polímero e um comportamento de “agregação” ocasionada pela argila, demonstrando assim a relação estrutura atividade no processo de liberação de fármacos. Por fim, no Capítulo 4 foram obtidos materiais funcionalizados com organossilano para ancoragem de grupos amino (-NH₂) visando obter um material multifuncional, com propriedade antibacteriana intrínseca e com liberação de fármaco pH dependente. Técnicas de infravermelho e Raman demonstram a modificação superficial dos compósitos com inserção de grupos amino e como perspectiva, em trabalhos futuros pretende-se realizar testes de adsorção e liberação de fármacos bem como avaliar a atividade antibacteriana das amostras.

Palavras-chave: Celulose Bacteriana, Laponita, Compósitos, Curativos multifuncionais, Ciprofloxacina, Liberação de Fármacos.

THESIS SUMMARY

In this work, research was carried out into the development and characterization of organofunctionalized composites based on bacterial cellulose (BC) and laponite (Lap) as potential multifunctional dressings and drug release systems for the treatment of skin wounds. To this end, Chapter 1 carried out a technological survey on the use of bacterial cellulose composites and clays as promising materials in the development of new dressings, evaluating the current wound scenario and the need for new modern dressings. It was found that although bacterial cellulose and clays have been researched as dressings and drug release systems, the production of composites with these materials is little explored in the literature, which would be interesting in obtaining multifunctional dressings. In Chapter 2, the reader will learn about the development and characterization of CB/Lap composites, containing different clay contents, with the aim of verifying the behavior of the material in relation to the adsorption and release of the antibacterial drug Ciprofloxacin. The composites obtained showed greater thermal resistance, adsorption capacity and sustained release of the drug compared to CB alone, indicating that the materials obtained are promising for application in topical dressings. In Chapter 3, the structural characterization of the CB/Lap composites was further developed using synchrotron light techniques (USAXS and 3D microtomography) obtained at Sírius/LNLS-CNPEN, with the aim of better understanding the interference of the clay in the structure of the material and understanding the relationship between the structure and the behaviour of the sample during the drug release process. It was possible to gain a deeper understanding of the interactions between laponite and CB, indicating surface deposition of the clay on the polymer fibers and an "aggregation" behavior caused by the clay, thus demonstrating the structure activity relationship in the drug release process. Finally, in Chapter 4, materials functionalized with organosilane were obtained to anchor amino groups (-NH₂) in order to obtain a multifunctional material with intrinsic antibacterial properties and pH-dependent drug release. Infrared and Raman techniques show the surface modification of the composites with the insertion of amino groups and, as a prospect, in future work we intend to carry out adsorption and drug release tests as well as evaluating the antibacterial activity of the samples.

Keywords: Bacterial cellulose, Laponite, Composites, Multifunctional dressings, Ciprofloxacin, Drug release.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA: COMPÓSITOS A BASE DE CELULOSE BACTERIANA E ARGILAS COMO CURATIVOS TÓPICOS E SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

RESUMO.....	15
1 – INTRODUÇÃO.....	16
1.1 – Cenário Problema: Feridas cutâneas.....	17
1.2 – Celulose bacteriana como curativos tópicos	18
1.3 – Compósitos CB-argilas para controle da liberação de ativos.....	25
2 – OBJETIVO.....	27
3 – MÉTODOS.....	27
4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	28
4.1 – CB como curativos tópicos.....	28
4.2 – CB como sistemas de liberação de fármacos (DDS).....	31
4.3 - Compósitos a base de CB e argilas para sistema de liberação de fármacos e curativos tópicos.....	33
5 – CONCLUSÃO DO CAPÍTULO 1.....	36
6 – REFERÊNCIAS.....	36

CAPÍTULO 2 NANOCOMPÓSITOS COMO POTENCIAIS CURATIVOS MULTIFUNCIONAIS A BASE DE CELULOSE BACTERIANA E LAPONITA – OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E LIBERAÇÃO DO FÁRMACO CIPROFLOXACINA

RESUMO.....	45
RESUMO GRÁFICO.....	46
1 – INTRODUÇÃO.....	47
1.1 – Laponita e o uso no meio biomédico.....	47
1.2 – Compósitos orgânicos-inorgânicos em sistemas de liberação de fármacos e curativos.....	49
1.3 – Ciprofloxacina.....	51
2 – OBJETIVOS.....	53
2.1 – Objetivo principal	53
2.2 – Objetivos específicos.....	53
3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
3.1 – Materiais.....	53
3.2 – Métodos.....	53
3.2.1 <u>Obtenção dos compósitos CB/Lap</u>	54
3.2.2 <u>Caracterizações físico-químicas</u>	54

3.2.3	Testes de adsorção	59
	3.2.3.1 - Cinética de adsorção	59
	3.2.3.2 - Equilíbrio de adsorção	61
3.2.4	Testes de Liberação	62
4	– RESULTADOS E DISCUSSÕES	65
4.1	– Caracterizações	66
4.2	– Adsorção do fármaco Ciprofloxacina	84
4.1.1	– Cinética de adsorção	84
4.2.2	– Equilíbrio de adsorção	87
4.3	– Liberação do fármaco ciprofloxacina e atividade antibacteriana	91
5	– CONCLUSÃO DO CAPÍTULO 2	97
6	– REFERÊNCIAS	98

CAPÍTULO 3 – CARACATERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPÓSITOS A BASE DE CELULOSE E LAPONITA UTILIZANDO TÉCNICAS DE LUZ SÍNCROTRON

RESUMO	106
RESUMO GRÁFICO	107
1 – INTRODUÇÃO	108
1.1 – Linha Cateretê – Sírius/LNLS - CNPEM	109
1.2 - Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo e Ultrabaixo Ângulo (SAXS e USAX)....	109
1.3 – Imagem por Difração de Raios-X Coerentes – Pticografia 3D (CXDI).....	110
2 – OBJETIVOS	110
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	110
3.1 – Materiais	110
3.2 – Métodos	111
4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES	112
4.1– Espalhamento de Raios-X a Ultra Baixo Ângulo (USAXS).....	112
4.2 – Pticografia 3D (CXDI).....	119
5 – CONCLUSÃO DO CAPÍTULO 3	124
6 – REFERÊNCIAS	124

CAPÍTULO 4 – PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPÓSITOS A BASE DE CELULOSE BACTERIANA E LAPONITA ORGANOFUNCIONALIZADOS COM GRUPOS AMINO VISANDO APLICAÇÕES MÉDICO-FARMACEUTICAS

RESUMO	128
RESUMO GRÁFICO	129
1 – INTRODUÇÃO	130
1.1– Processo sol-gel e funcionalização de materiais	131
2 – OBJETIVOS	133
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	133
3.1 – Materiais	133

3.2 – Métodos.....	134
4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	134
5 – CONCLUSÃO DO CAPÍTULO 4.....	143
6 – REFERÊNCIAS.....	144
CONCLUSÃO DA TESE.....	147

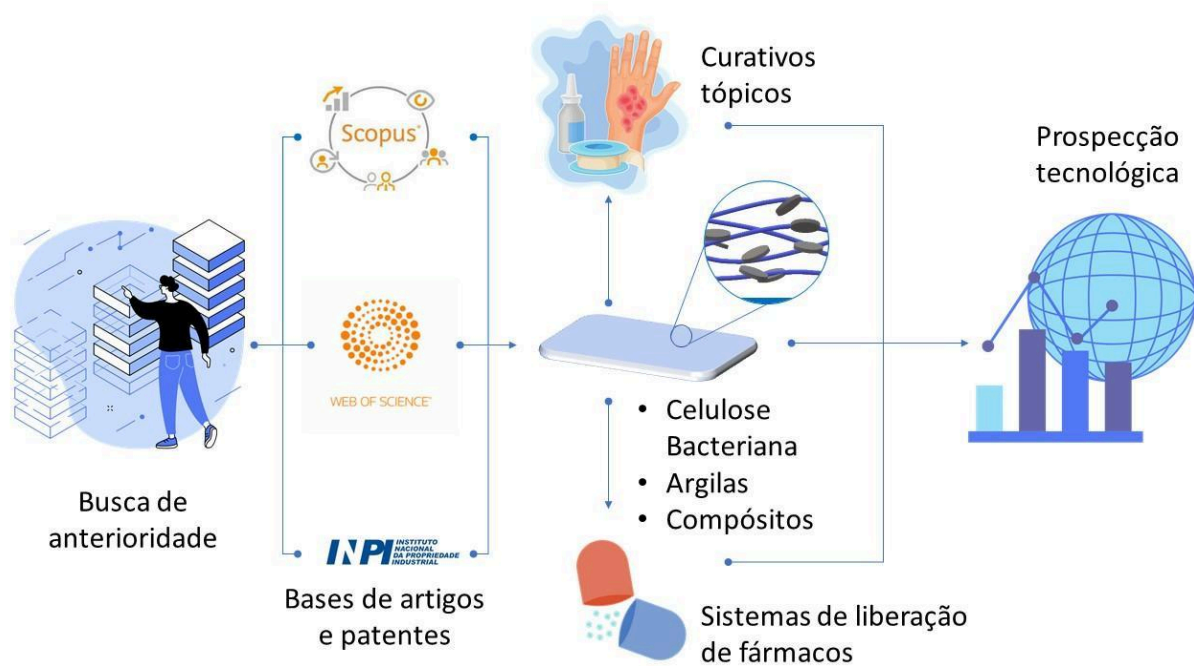
**CAPÍTULO 1 - PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA: COMPÓSITOS A BASE DE
CELULOSE BACTERIANA E ARGILAS COMO CURATIVOS TÓPICOS E
SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS**

RESUMO

Prospecção tecnológica é um instrumento para mapear desenvolvimentos científicos e tecnológicos futuros capazes de influenciar de forma significativa uma indústria, a economia ou a sociedade como um todo. Um assunto de grande relevância a ser avaliado são as feridas. É fato que as feridas, sejam elas crônicas ou agudas, são uma das principais causas de morte em todo o mundo e impactam, não apenas a saúde e bem-estar humano, como também geram impactos econômicos nos sistemas de saúde. O desenvolvimento de curativos avançados para tratamento de feridas com propriedades específicas como o controle da umidade local, remoção de exsudatos, com propriedades contra micro-organismos, isolamento térmico, que permita troca gasosa e se adapte a ferida sem aderir a superfície é almejado. Portanto, o desenvolvimento de materiais inovadores para adentrar o mercado de curativos tópicos é relevante e promissor, visto a tendência crescente no cenário mercadológico para os próximos anos, nesse sentido destaca-se a celulose bacteriana. Assim, neste capítulo realizou-se uma prospecção tecnológica com o objetivo de levantar os possíveis trabalhos e patentes já desenvolvidos envolvendo celulose bacteriana (CB) e seus compósitos utilizando argilas, bem como vislumbrar as tecnologias emergentes nas áreas de curativos e sistemas de liberação de fármacos utilizando esses materiais.

Palavras-chave: Prospecção tecnológica, Curativos, Feridas, Celulose Bacteriana, Argilas, Mercado.

RESUMO GRÁFICO



1 – INTRODUÇÃO

Neste capítulo, com o objetivo de buscar os possíveis trabalhos e patentes desenvolvidos envolvendo celulose bacteriana (CB) e seus compósitos utilizando argilas, bem como vislumbrar as tecnologias emergentes nas áreas de curativos e sistemas de liberação de fármacos utilizando esses materiais, foi realizado uma prospecção tecnológica em bases de dados e patentes.

O termo “prospecção tecnológica”, quando avaliado em sua etimologia e significado, é a junção das palavras “prospecção”, que segundo o Dicionário Online da Língua Portuguesa (Dicio), tem origem no latim “*Prospectione*” (ação de prospectar ou pesquisar), que significa:

“Sondagem; método ou processo que busca descobrir ou investigar algo numa determinada área: prospecção de clientes, de negócios.

[Geologia] Análise minuciosa que, feita através de técnicas especializadas, avalia um terreno, buscando encontrar jazidas minerais, petrolíferas ou gasosas: prospecção de petróleo.

[Figurado] Investigação dos sentimentos, dos pensamentos ou das sensações de alguém: prospecção afetiva, emocional, física.

Ação ou efeito de prospectar, de analisar ou de avaliar algo.”

(RIBEIRO et al., 2023)

Com a palavra “tecnológica”, relativo à “tecnologia”, palavra originada do grego “*Tekhne*” (técnica, ofício) e “*logia*” (estudo), cuja definição é:

Ciência que estuda os métodos e a evolução num âmbito industrial: tecnologia da internet.

Procedimento ou grupo de métodos que se organiza num domínio específico: tecnologia médica.

Teoria ou análise organizada das técnicas, procedimentos, métodos, regras, âmbitos ou campos da ação humana.

(RIBEIRO et al., 2023)

Desta forma, “Prospecção tecnológica” tem como significado literal a investigação, avaliação ou sondagem minuciosa de tecnologias, ou seja, técnicas, procedimentos, métodos ou regras da ação humana. Em outras palavras, a prospecção tecnológica visa investigar as

tecnologias já existentes em um determinado campo de estudo da ciência, indústria, economia e sociedade com o objetivo de verificar possíveis tecnologias emergentes ou oportunidades de inovação.

Ainda para sedimentar a definição do termo, segundo Kupfer e Tigre (KUPFER; TIGRE, 2004) “a prospecção tecnológica pode ser definida como um meio sistemático de mapear desenvolvimentos científicos e tecnológicos futuros capazes de influenciar de forma significativa uma indústria, a economia ou a sociedade como um todo”. Já de acordo com Coelho (COELHO; COELHO, 2003):

“o termo “prospecção tecnológica” designa atividades de prospecção centradas nas mudanças da capacidade funcional ou no tempo e com significado de uma inovação. Visa incorporar informações ao processo de gestão tecnológica tentando predizer possíveis estados futuros da tecnologia ou condições que afetam sua contribuição para as metas estabelecidas” (COELHO; COELHO, 2003)

Portanto, a abordagem de prospecção desenvolvida no presente capítulo serve como estudo das tecnologias anteriores envolvendo a CB e os compósitos com argilas para o uso como curativos tópicos e sistemas de liberação de fármacos com o objetivo de compreender o estágio de desenvolvimento desse mercado e as oportunidades de inserção tecnológica para sanar possíveis dores deste mercado.

1.1 – Cenário problema: Feridas cutâneas

A pele, o maior órgão do corpo humano, é a primeira e mais extensa barreira de proteção do organismo conta o meio externo, incluindo patógenos, traumas físicos, químicos, térmicos e por radiação ultravioleta. Além disso, é responsável pela manutenção da temperatura corporal, serve de barreira para perda de água e facilita funções metabólicas, como a síntese da vitamina D (ABDO; SOPKO; MILNER, 2020; HSU et al., 2022; MAYET et al., 2014; ZHANG, 2020; ZHENG et al., 2020; ZHOU et al., 2022). Justamente pela função de proteção, a pele é um órgão muito suscetível a injúrias, sejam físicas ou patológicas, ocasionando as feridas (ZHOU et al., 2022).

Feridas podem ser definidas como a injúria dos tecidos de um órgão, prejudicando sua estrutura e função. As feridas cutâneas ocorrem pelo rompimento da pele, que pode ocorrer por diversos fatores como traumas físicos, térmicos, químicos ou patológicos (BOATENG et al., 2008; LAZARUS et al., 1994; PERCIVAL, 2002; WHITNEY, 2005).

Além disso, podem ser avaliadas por diversos fatores como o tipo de injúria, o grau da ferida, a duração do ferimento, o fluxo de sangue, infecção, inflamação, dentre outros parâmetros. São classificadas também como agudas ou crônicas a depender do tempo de cura da ferida. (BOATENG et al., 2008; LAZARUS et al., 1994; PERCIVAL, 2002; WHITNEY, 2005).

Feridas agudas são aquelas que evoluem para cicatrização, ou seja, que passam pelas fases homeostase, inflamação, proliferação, maturação e remodelação, entre 8-12 semanas, deixando cicatrizes mínimas (BOATENG et al., 2008; DAI; SHIH; KHACHEMOUNE, 2020; LAZARUS et al., 1994; WHITNEY, 2005). Já as feridas crônicas são aquelas que não evoluem para o processo normal de cicatrização no período de 12 semanas e podem aparecer com frequência. A perturbação do processo de cicatrização pode estar associada à fatores como o tamanho da ferida – feridas com diâmetro maior que 4 cm não evoluem para cicatrização sem intervenção (ZHOU et al., 2022) – falta de cuidados primários ou cuidados precários da ferida, infecções bacterianas, diabetes, problemas vasculares, entre outros (BOATENG et al., 2008; DAI; SHIH; KHACHEMOUNE, 2020; EAGLSTEIN; FALANGA, 1997; LAZARUS et al., 1994; MACDONALD; GEYER, 2010; MAYET et al., 2014; SEN et al., 2009).

É fato que as feridas, sejam elas crônicas ou agudas, são uma das principais causas de morte em todo o mundo e impactam, não apenas a saúde e bem-estar humano, como também geram impactos econômicos nos sistemas de saúde (MACHADO et al., 2022). Vale ressaltar que as causas mais comuns de feridas na clínica médica são por queimaduras, úlceras venosas ou por pressão, em membros inferiores de diabéticos e em decorrência de radioterapias (HENRIQUE DE SOUZA, PEDRO, SMANIOTTO, FERREIRA, MARCUS CASTRO, ISAAC, CESAR, GALLI, 2012).

Tratando-se do cenário brasileiro de feridas apenas por queimaduras, segundo estimativas de 2018 do Ministério da Saúde, avaliou-se que ocorram em média cerca de 1 milhão de incidentes por queimaduras todo ano, dos quais cerca de 100 mil pacientes buscam atendimento hospitalar e desses aproximadamente de 2,5 mil pacientes irão a óbito direta ou

indiretamente em função de suas lesões. As infecções são responsáveis por 80% desses óbitos (BRASIL, 2018).

Conseqüentemente, dados do Ministério da Saúde demonstraram que o Sistema Único de Saúde (SUS) gastou cerca de 55 milhões de reais por ano apenas para o tratamento de pacientes queimados (BRASIL, 2018a).

Avaliando um cenário internacional, dados do livro de 2010 “Wound and lymphoedema management” da Organização Mundial da Saúde (OMS) (MACDONALD; GEYER, 2010) demonstram que nos Estados Unidos, cerca de 2% da população (aproximadamente 6 milhões de pessoas) sofreram com feridas crônicas e de acordo com dados do trabalho de Heher et al (HEHER et al., 2018) gasta-se cerca de US\$ 25 bilhões de dólares anualmente no tratamento desses pacientes.

Agora, segundo Nussbaum *et al* (NUSSBAUM et al., 2018), a estimativa do gasto anual dos EUA no tratamento de pacientes com feridas crônicas ultrapassa US\$ 33 bilhões de dólares (MACHADO et al., 2022; NUSSBAUM et al., 2018).

Sob um prisma mercadológico, de acordo com relatório de junho de 2022 do site Markets and Markets (MARKETS, 2022), o mercado mundial de tratamento de feridas está projetado para US\$ 27,2 bilhões de dólares com uma taxa de crescimento anual (CAGR) de 5,4%. Já de acordo com trabalho de Sen *et al* (SEN, 2019), estimativas apontavam que em 2022, no mercado dos Estados Unidos e Europa, os produtos para tratamento de feridas alcançariam um mercado acima de US\$ 15 bilhões de dólares passando de US\$ 22 bilhões de dólares até 2024.

O tratamento de feridas cutâneas é considerado como um desafio de saúde global, e o desenvolvimento de ferramentas para auxiliar no tratamento pode trazer grande impacto social e orçamentário, tanto para os governos e sistemas de saúde dos países quanto para o bem estar dos pacientes e familiares (MACDONALD; GEYER, 2010; MACHADO et al., 2022).

No tratamento de feridas cutâneas, os curativos são parte essencial para o processo de cura, uma vez seu uso tem como objetivo servir como barreira física contra o ambiente externo, prevenindo o contato direto com micro-organismos patogênicos e futuras injúrias. Contudo, o uso de curativos tradicionais como gazes, bandagens e algodão, ainda largamente utilizados, apresentam desvantagens significativas no tratamento de feridas como a adesão no local da lesão, gerando novos ferimentos, e a livre passagem de vapor de água, ocasionando

assim o ressecamento da ferida e dificultando o processo de re-epitelização e cicatrização (HE et al., 2021; MACHADO et al., 2022; MAYET et al., 2014; SYED ABDULLAH et al., 2022; ZHANG, 2020).

O desenvolvimento de curativos avançados para tratamento de feridas com propriedades específicas como o controle da umidade local, remoção de exsudatos, com propriedades contra micro-organismos, isolamento térmico, que permita troca gasosa e se adapte a ferida sem aderir a superfície é almejado (MACHADO et al., 2022; MAYET et al., 2014; SYED ABDULLAH et al., 2022; ZHENG et al., 2020). Além disso, com base nos panoramas anteriormente apresentados o desenvolvimento de novos materiais inovadores para adentrar o mercado de curativos tópicos é relevante e promissor, visto a tendência crescente no cenário mercadológico para os próximos anos.

Nesse sentido, curativos a base de celulose bacteriana têm se demonstrados promissores para tal finalidade (OLIVEIRA BARUD, Héli da Gomes et al., 2016; SOUSA et al., 2021; SYED ABDULLAH et al., 2022)

1.2 – Celulose bacteriana como curativos tópicos

A celulose (fórmula química $(C_6H_{12}O_5)_n$) é o biopolímero mais abundante do planeta. Pode ser definida como uma macromolécula linear e não ramificada, composta por repetidas unidades de celobiose a qual é formada por duas unidades de glicose na conformação de β -d-anidroglicopiranoose, unidas por ligações glicosídicas na posição β -(1 \rightarrow 4) (BROWN, 2003; ESA; TASIRIN; RAHMAN, 2014; FADEL et al., 2017; KLEMM et al., 2005; POTULSKI et al., 2014; QIU; NETRAVALI, 2014; SILVA, 2018; SOUSA et al., 2021), como demonstrado na Figura 1.

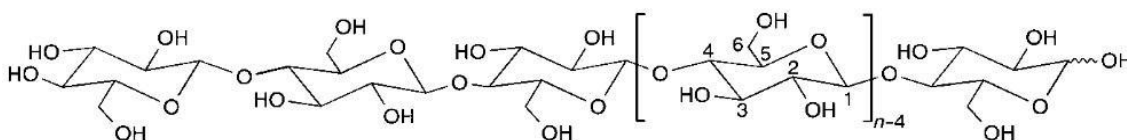


Figura 1: Estrutura molecular da celulose (n= grau de polimerização) (KLEMM et al., 2005 Publisher Tax ID EU826007151)

O biopolímero é extraído principalmente de fonte vegetal, contudo, pode ser produzido por diversos organismos como algas, animais marinhos (como os animais presentes no subfilo Urochordata ou Tunicados) e por bactérias, como as do gênero *Komagateibacter*, *Acetobacter*, *Acanthamoeba* e *Achromobacter spp* (ESA; TASIRIN; RAHMAN, 2014; FADEL et al., 2017; KLEMM et al., 2005; QIU; NETRAVALI, 2014; SOUSA et al., 2021).

A celulose de origem vegetal, apesar da sua grande biodisponibilidade, frequentemente é encontrada associada com outros polímeros naturais, como lignina e hemicelulose, necessitando de processos químicos agressivos para sua purificação, como o processo Kraft que utiliza hidróxido de sódio e sulfeto de sódio para a obtenção da celulose a partir da madeira, o que gera poluentes ambientais tais como o dióxido de enxofre, efluentes com suspensões de fibras finas que podem aumentar turbidez, aumento na Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) e causar asfixia ou alterar crescimento e composição sanguínea de peixes (BATISTA, 2018; SOUSA et al., 2021)

Já a celulose produzida por bactérias, aqui denominada de celulose bacteriana (CB), é isenta de lignina e hemicelulose em sua composição, e é formada por estruturas nanométricas tridimensionais em forma de rede. Comparada com a celulose vegetal, a CB apresenta propriedades bastante distintas como: elevada pureza, alto grau de polimerização (até 8000), alta cristalinidade (70-80%), elevada estabilidade mecânica e biocompatibilidade (BARUD, H. S. et al., 2012; ESA; TASIRIN; RAHMAN, 2014; HU et al., 2014; OLIVEIRA BARUD, H. G. et al., 2015). Além disso, o diâmetro médio das fibras (40-70 nm) da CB resulta em uma grande porosidade e elevada área superficial possibilitando uma maior retenção de água em sua estrutura (até 99%) (FADEL et al., 2017; HU et al., 2014; QIU; NETRAVALI, 2014; SOUSA et al., 2021; ZHENG et al., 2020). A Figura 2 demonstra o material em sua forma hidratada obtida em meio de cultivo estático.



Figura 2: Manta purificada e hidratada de celulose bacteriana.

Devido suas características, a CB é um material muito promissor na área biomédica, e tem sido pesquisada para o uso como vasos sanguíneos artificiais (KLEMM et al., 2001; LEE; PARK, 2017; SCHUMANN et al., 2009), como *scaffolds* na engenharia de tecidos (JIA et al., 2009; NEMATI; GHOLAMI, 2021), curativo para lesões na pele (MENEGASSO et al., 2022; PORTELA et al., 2019), liberação modificada de fármacos (ABEER; MOHD AMIN; MARTIN, 2014), entre outras aplicações (ESA; TASIRIN; RAHMAN, 2014; FADEL et al., 2017; KLEMM et al., 2005; OLIVEIRA BARUD, et al., 2016), como demonstrado na Figura 3.

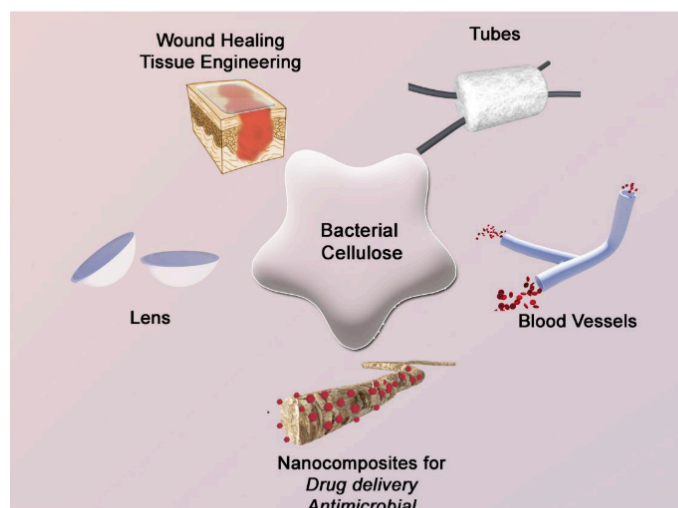


Figura 3: Aplicações da celulose bacteriana na área biomédica. Fonte: (OLIVEIRA BARUD et al., 2016 Publisher Tax ID GB 494 6272 12)

Em comparação com os curativos tradicionais, as membranas de CB apresentam vantagens interessantes no tratamento de lesões cutâneas, como a facilidade de aplicação e adaptação à região da ferida, o alívio imediato da dor local e a propriedade de não aderir na região lesionada prevenindo o surgimento de novos danos decorrentes do tratamento (HSU et al., 2022; MUANGMAN et al., 2011; ULLAH et al., 2016; ZHENG et al., 2020; ZHOU et al., 2022).

Além disso, devida sua estrutura nanométrica em forma de rede, a celulose bacteriana consegue efetivamente servir de barreira física contra infecção por micro-organismos do meio externo e apresenta uma taxa satisfatória de transmissão de vapor de água, característica importante para a manutenção da umidade local necessária para evita a formação de crostas e conduzir o crescimento celular no processo de granulação (ZHOU et al., 2022).

Vale ressaltar ainda que, devido a elevada capacidade de absorção de água em sua estrutura, os curativos a base de celulose bacteriana conseguem promover a adsorção do excesso de exsudatos durante a fase inflamatória que acelera o processo de cura e encurtam o tempo de tratamento da lesão (HSU et al., 2022; MUANGMAN et al., 2011; ULLAH et al., 2016; ZHENG et al., 2020; ZHOU et al., 2022).

Segundo Portela *et al* (PORTELA et al., 2019), uso da CB em curativos foi descrito em meados de 1980 e desde então tem sido constantemente melhorado. Hoje, a CB já é produzida industrialmente e comercializada para tratamento de ferimentos na pele, com por exemplo o curativo Nexfill[®], da empresa brasileira Seven Biotecnologia, avaliado como tecnologia para incorporação no SUS (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE CIÊNCIA, 2018b) e o curativo Nanocell[®] da empresa Thai Nano Cellulose demonstrada no trabalho de Muangman *et al* (MUANGMAN et al., 2011).

Avaliando um possível impacto orçamentário do uso de celulose bacteriana como curativo tópico na rede do Sistema Único de Saúde (SUS), o relatório de 2018 da CONITEC (Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS) o relatório (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE CIÊNCIA, 2018a), compara o custo para o tratamento de úlceras venosas em membros inferiores utilizando o procedimento padrão (bandagens e sulfadiazina de prata) com o tratamento utilizando a biocelulose comercial Nexfill[®]. No relatório em questão chegou-se à conclusão que apesar do maior custo do curativo em relação às bandagens tradicionais, a membrana de biocelulose possui indicação

para troca a cada sete dias, utilizando assim de um menor número de insumos quando comparado ao curativo padrão (com indicação para trocas diárias).

Desta forma, além dos benefícios associados ao uso da biocelulose conforme levantados anteriormente, o custo de tratamento será menor. Sendo assim, ainda segundo os dados da CONITEC, considerando uma estimativa a da população brasileira com úlceras venosas dos membros inferiores no decorrer de 5 anos, a análise do impacto orçamentário apresentou uma economia estimada no valor de R\$ 56,6 milhões de reais ao longo dos 5 anos. O que demonstra a viabilidade econômica e tecnológica do material para uso como curativos.

Contudo, apesar das vantagens de uso em curativos, as membranas puras de CB são limitadas por não possuírem ação antibacteriana, servindo apenas de barreira contra tais micro-organismos (BARUD, et al., 2013; OLIVEIRA BARUD, H. G. et al., 2015; ZHENG et al., 2020). O que é um problema, pois prevenir infecções em feridas com perda de pele é de elevada prioridade, infecções elevam o tempo, o custo de tratamento e aumentam a taxa de mortalidade de pacientes, sendo necessárias novas intervenções como a administração sistêmica e/ou local de agentes antibióticos e o uso de bandagens incorporadas com prata, iodo ou outros agentes antimicrobianos (MACDONALD; GEYER, 2010; ZHENG et al., 2020; ZHOU et al., 2022).

Desta forma, a modificação da celulose bacteriana para liberação de fármacos ou partículas com propriedades antibacterianas pode ser uma rota capaz de contornar tal limitação.

1.3 – Compósitos CB-argilas para controle da liberação de ativos

Pensando no uso multifuncional da CB, como curativo antibacteriano e em sistemas para liberação de fármacos, é possível propor filmes de CB que possam servir não apenas como curativo tópico mas também como matriz de liberação, podendo assim entregar à ferida espécies ativas de interesse, que auxiliarão em diversos aspectos como a ação antibacteriana, a diminuição da dor local, abreviação da fase inflamatória, aceleração da cura e cicatrização do tecido prejudicado (ABEER; MOHD AMIN; MARTIN, 2014; MUANGMAN et al., 2011).

A incorporação de ativos com propriedades antibacterianas em membranas de CB já é amplamente explorada na literatura (ZHENG et al., 2020). Alguns exemplos incluem agente antimicrobianos orgânicos como Amicacina e Ceftriaxona (VISMARA et al., 2019),

Amoxicilina (YE et al., 2018), Ciprofloxacina (SYED ABDULLAH et al., 2022), cetoprofeno (SUN et al., 2019), própolis vermelha (MACHADO et al., 2022) e agentes inorgânicos como nanopartículas de prata (CHATCHAWANWIROTE; CHUYSINUAN; THANYACHAROEN, 2019), nanopartículas de cobre (WEI et al., 2018), dióxido de titânio (KHALID et al., 2017), entre outros (ZHENG et al., 2020).

Contudo, a liberação de ativos em matrizes não-degradáveis, como é o caso da celulose bacteriana, é regida por mecanismos do modelo Fikiano, no qual a liberação é regida pela difusão do solvente pela matriz, concentração do ativo na membrana e o caminho de difusão (espessura dos filmes). Desta forma, a estrutura e composição da matriz é diretamente relacionada com o perfil de liberação do material (FU; KAO, 2010). Assim, devido ao livre movimento de gases e solventes pela membrana de CB, o sistema de entrega de agentes segue um modelo de liberação rápida do princípio ativo (“*burst release*”), que, apesar de ser utilizada em certas estratégias de administração de fármacos, possui efeitos negativos, podendo ser farmacologicamente perigosos (BADSHAH et al., 2018; HUANG; BRAZEL, 2001). Uma estratégia para modificar o perfil de liberação da CB é a obtenção de nanocompósitos utilizando cargas inorgânicas argilosas.

Compósitos do tipo polímero-argilas são conhecidos e amplamente discutidos na literatura para diversas finalidades (VALAPA et al., 2017). E se tratando de sistemas para controle de liberação de fármacos (do inglês “*Drug Delivery Systems*” ou “DDS”) o desenvolvimento de novos compósitos orgânico-inorgânicos combina as vantagens dos polímeros (como biodegradabilidade, capacidade de intumescimento, baixa toxicidade) com características interessantes das argilas (como baixo custo, elevada capacidade de adsorção, capacidade de troca catiônica, aumento da resistência térmica e química de componentes incorporados) gerando novos materiais com propriedades farmacocinéticas promissoras para no controle de liberação de espécies ativas (GÂREA; VOICU; IOVU., 2017).

A combinação de argilas-polímeros é uma rota vantajosa para DDS, uma vez que as cargas inorgânicas podem agir no controle da liberação de ativos, ao modificar a estrutura do polímero, influenciando assim nas propriedades de intumescimento, servindo de barreira dificultando a passagem de solvente e vapores através da membrana e podem interagir diretamente com a espécie ativa, seja através das cargas superficiais das argilas e/ou por canais internos de difusão (GÂREA; VOICU; IOVU., 2017; MENEGUIN et al., 2021). Além disso, segundo trabalho de Gârea *et al* (GÂREA; VOICU; IOVU., 2017)

Os nanocompósitos baseados em polímeros e argilas são materiais atraentes com notável potencial para o desenvolvimento de DDS controlado devido às propriedades vantajosas, tais como (1) alta eficiência de encapsulamento de drogas (EE), (2) maior estabilidade do ativo contra variação de pH e ação enzimática, (3) baixa liberação de droga, e (4) um perfil de liberação de droga controlada, respectivamente.

Desta forma, visto as diversas vantagens anteriormente apresentadas, o presente trabalho mapeou o uso de celulose bacteriana e argilas para o desenvolvimento de compósitos para curativos tópicos e DDS, utilizando pesquisa de termos específicos nas bases de dados Web of Science, Scopus, e nas bases de patentes Derwen e INPI. As palavras-chave bem como os resultados e metodologias utilizadas se encontram descritas nos itens a seguir.

2 – OBJETIVOS

Levantar os possíveis trabalhos e patentes já desenvolvidos envolvendo celulose bacteriana (CB) e compósitos utilizando argilas, bem como vislumbrar as tecnologias emergentes nas áreas de curativos e sistemas de liberação de fármacos utilizando esses materiais.

3 – MÉTODOS

Para esta pesquisa foram realizadas buscas de anterioridade em bases de artigos e patentes para o período de 2010 até 2022. Os artigos foram pesquisados nas bases Web of Science e Scopus e as patentes nas bases Derwent (Web of Science), Scopus e INPI. As buscas foram focadas no biopolímero “celulose bacteriana” e nas cargas denominadas “argila”. O objetivo foi pesquisar estas duas palavras-chave e suas aplicações na área de curativos e liberação de fármacos.

As palavras-chave utilizadas para as pesquisas de curativos foram “wound dressing” e “bandage” com propósito de englobar mais artigos e patentes possíveis e “drug delivery” e “drug release” para pesquisas relacionadas a liberação de fármaco. Já para pesquisas no INPI

foram utilizadas as palavras-chave “curativo de ferida” e “liberação de fármaco” e “liberação controlada de fármaco”.

As pesquisas de artigos em inglês na Scopus e Web of Science bem como busca de patentes na Derwent e Scopus foram realizadas com as seguintes palavras-chave para pesquisar curativos de feridas utilizando CB e argilas, separadamente: “bacterial cellulose” AND “wound dressing”; “bacterial cellulose” AND “bandage”; “clay” AND “wound dressing” e “clay” AND “bandage”. Para pesquisar a palavra-chave “bacterial cellulose” também foi utilizada a palavra-chave “biocellulose” com objetivo de englobar mais artigos e patentes.

Já para pesquisas relacionadas a DDS de trabalhos nas bases Scopus e Web of Science bem como, na busca de patentes na Derwent e Scopus utilizou-se as seguintes palavras-chave: “bacterial cellulose” AND “drug delivery”; “bacterial cellulose” AND “drug release”; “clay” AND “drug delivery”; “clay” AND “drug release”.

Por fim, com o objetivo de levantar os trabalhos utilizando de celulose bacteriana e argilas realizou-se a busca com as palavras-chave “clay” AND “bacterial cellulose” tanto para aplicação em curativos como para a liberação de fármaco, conforme realizado anteriormente.

Para buscas de artigos nas bases de pesquisa, as palavras foram pesquisadas nos campos de título, resumo e palavras-chave. Os dados coletados foram apresentados na forma de gráficos e tabelas e estão disponíveis em resultados e discussões. Vale ressaltar ainda que, com o objetivo de evitar duplicidade de trabalhos, para cada busca com termos equivalentes, os artigos encontrados foram adicionados em listas utilizando ferramentas disponíveis nos periódicos de busca, cruzando assim os dados coletados e eliminando a duplicidade.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 – CB como curativos tópicos

A Figura 4 demonstra o número de trabalhos utilizando CB como curativo entre os anos 2010-2022 disponíveis nas plataformas Scopus e Web of Science.

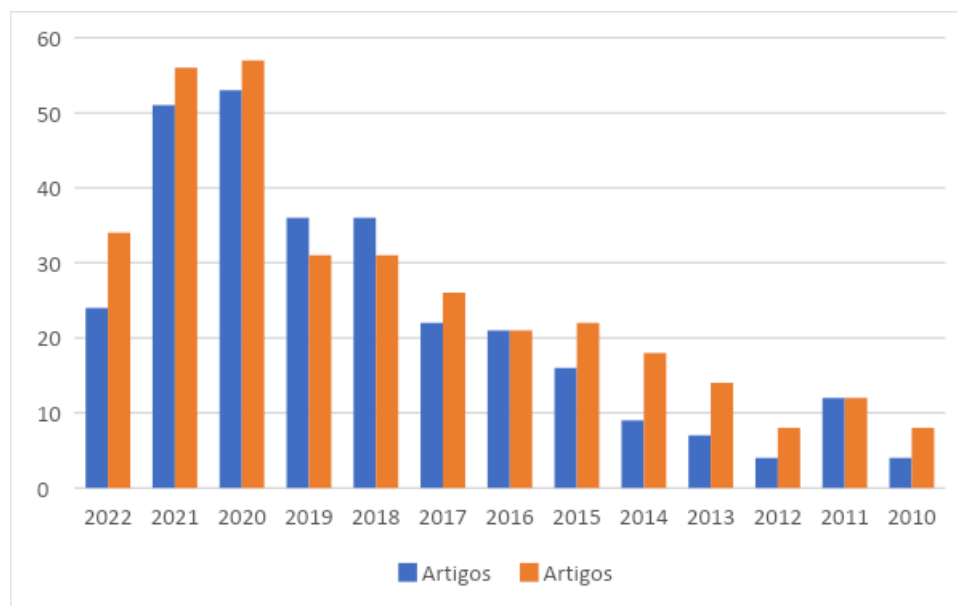


Figura 4: Artigos publicados sobre uso de CB como curativo entre 2010-2022. Termos utilizados na pesquisa: “Bacterial Cellulose” AND “Wound dressing”; “Bacterial Cellulose” AND “Bandage”.

Analisando os valores apresentados, nota-se o aumento no número de trabalhos na área de curativos utilizando CB em ambas bases de dados. Tal crescimento evidencia o interesse em pesquisas utilizando o biopolímero como curativo de feridas. Vale ressaltar que no trabalho de Sousa *et al* (SOUSA et al., 2021), o qual realizou uma prospecção tecnologia do uso da CB para aplicações biomédicas (termos utilizados no trabalho: “Bacterial cellulose” AND “biomedic*”, “Bacterial cellulose” AND “medic*”, “Bacterial cellulose” AND “calcium phosphate”, “Bacterial cellulose” AND “modification”, “Bacterial cellulose” AND “bone”, observou-se um aumento semelhante no número de artigos publicados para uso da CB em curativos tópicos.

É interessante verificar que o número total de trabalhos coletados no recorte de data desta pesquisa é de 338 e 295 nas bases de dados Scopus e Web of Science, respectivamente. Ainda comparando com o trabalho de Sousa *et al* (SOUSA et al., 2021), entre 2011-2020 encontrou-se cerca de 245 e 280 trabalhos.

Agora, afim de analisar geograficamente as publicações coletadas, a Figura 5 demonstra a distribuição decrescente dos trabalhos de acordo com os países de origem da pesquisa.

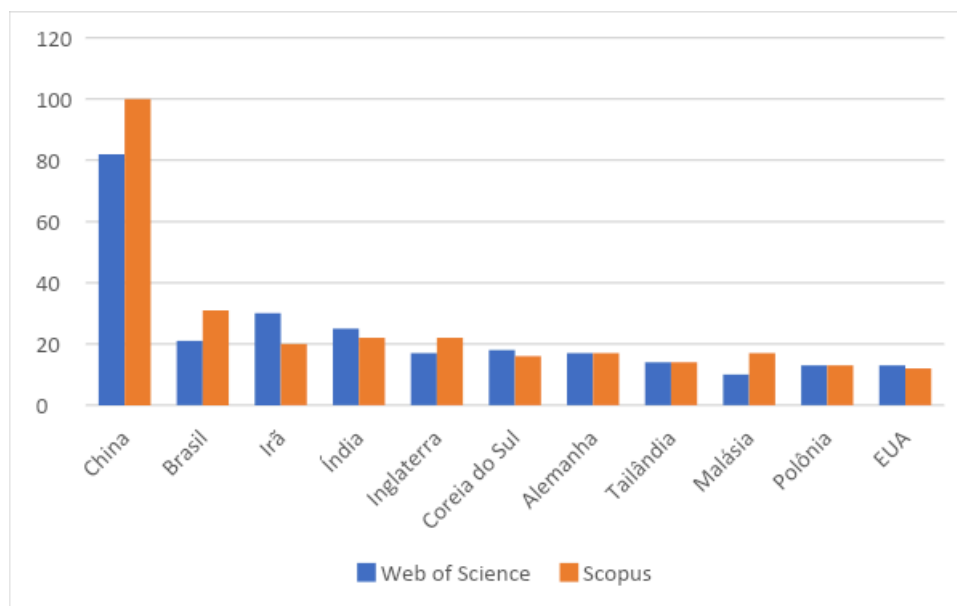


Figura 5: Países com maior número de trabalhos investigando o uso da CB como curativo.

Observa-se no gráfico da Figura 5 que a China lidera em número bruto de artigos (100 e 82 artigos localizados no Scopus e Web of Science, respectivamente), mais de três vezes em relação ao segundo colocado na lista, no caso o Brasil, com 31 e 21 trabalhos publicados. A produção industrial de CB na China iniciou-se em meados de 1996, pela empresa Hainan Yeguo Foods Co. Ltd, para suprir a demanda de nata de coco, uma sobremesa que se popularizou no Japão e países sul-asiáticos e acelerou a produção do biopolímero no país (ZHONG, 2020). Atualmente, segundo Zhong *et al* (ZHONG, 2020), a empresa é a maior produtora de produtos utilizando CB em todo o mundo, o que pode justificar os números observados.

Nesse cenário, o Brasil se encontra como o segundo maior país a desenvolver pesquisas utilizando CB como curativo tópico. Desta forma, fica evidente o interesse de grupos de pesquisa nacionais em desenvolver novos curativos com o biopolímero. Destaca-se ainda que o autor brasileiro com mais publicações utilizando CB em curativos é o Prof. Dr. Sidney José Lima Ribeiro (docente no Instituto de Química – Unesp/Araraquara – SP).

Agora, se tratando de registro de patentes, o cenário observado muda de figura. A Tabela 1 demonstra o número de registros de patentes encontrados nas bases Scopus, Derwent e Instituto Nacional de Proteção Industrial (INPI).

Tabela 1: Patentes encontradas entre 2010-2022 sobre CB como curativo. Termos utilizados na pesquisa: “Bacterial Cellulose” AND “Wound dressing”; “Bacterial Cellulose” AND “Bandage”.

Local de registro	Scopus	Derwen	INPI
Escritório de Patentes e Marcas Registradas dos Estados Unidos	229	1	0
Escritório Europeu de patentes	55	0	0
Escritório de patentes do Japão	20	1	0
Organização Mundial de Propriedade Intelectual	25	9	0
Escritório de Propriedade Intelectual do Reino Unido	1	0	0
China	0	39	0
Brasil	0	0	3

Os escritórios que mais registraram patentes protegendo uso da CB como curativo foram os localizados nos Estados Unidos e Europa, respectivamente, seguidos pela China.

No Brasil, encontrou-se apenas 3 patentes registradas no INPI com o recorte desta pesquisa. Em comparação com o número de publicações fica evidente que o desenvolvimento de produtos utilizando CB para curativos tópicos no Brasil ainda é incipiente.

Portanto, sob prisma mercadológico, o Brasil tem grande potencial no desenvolvimento de novos produtos para curativos utilizando CB, visto o número de trabalhos publicados investigando tal aplicação, contudo, é necessário converter tal conhecimento de pesquisa em novas patentes para uma aplicação mercadológica.

4.2 – CB como sistemas de liberação de fármacos (DDS)

Tratando-se do uso de membranas de celulose bacteriana em sistemas de liberação de fármacos, encontrou-se um total de 285 e 369 artigos nas bases Scopus e Web of Science, respectivamente. A Figura 6 demonstra o número de publicações por ano relacionadas ao tema no período entre 2010-2022.

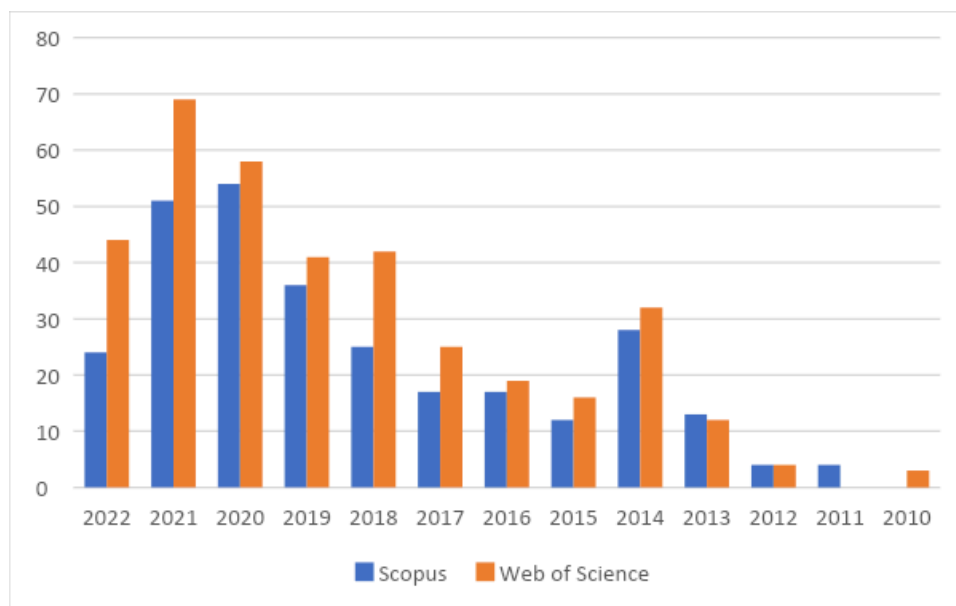


Figura 6: Trabalhos utilizando CB em DDS entre 2010-2022 nas bases de dados Scopus e Web of Science. Termos utilizados na pesquisa: “Bacterial Cellulose” AND “Drug delivery”; “Bacterial Cellulose” AND “Drug release”.

Ao avaliar o gráfico, nota-se que o número de trabalhos investigando a CB em DDS aumentou no decorrer dos anos 2010-2014, teve uma queda em 2015 e continuou crescendo até 2021. É interessante verificar que se observou um perfil muito semelhante em publicações com o uso de CB para curativos. Desta forma, fica claro que pesquisas utilizando CB para fins biomédicos tem crescido durante os anos, o que denota o interesse no desenvolvimento científico para tal área.

Na avaliação geográfica desses artigos, disponível na Figura 7, nota-se mais uma vez que a China lidera em número de pesquisas (151 trabalhos), seguido novamente pelo Brasil (64 trabalhos) sendo mais uma vez o Prof. Dr. Sidney José Lima Ribeiro o autor brasileiro que mais aparece nas pesquisas.

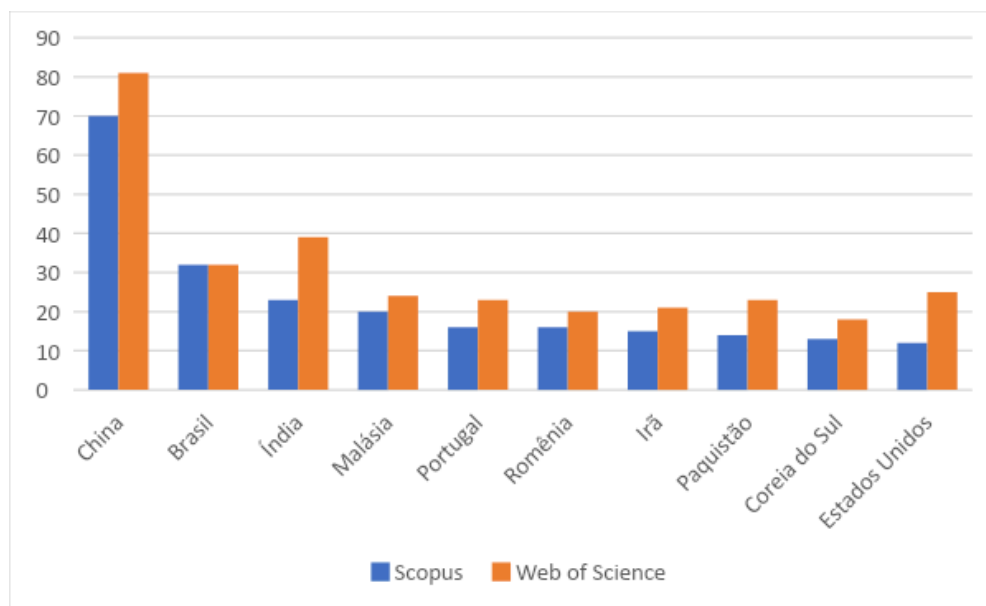


Figura 7: Países com maior número de trabalhos investigando o uso da CB em sistemas de liberação de fármacos.

Outra avaliação que desperta o interesse é em relação ao tipo de fármaco e a finalidade do sistema de liberação de fármacos. Analisou-se os 285 trabalhos disponíveis na base de dados Scopus, e dos trabalhos avaliados cerca de 20% são voltados para liberação de fármacos ou ativos com propriedades antibacterianas. Os mesmos 20% são destinados a liberação de fármacos em feridas cutâneas e ao relacionar os dados verifica-se que 10% dos artigos são destinados a curativos com propriedades antibacterianas.

Avaliando as patentes encontradas, disponíveis na Tabela 2, fica claro que existe maior registro de trabalhos envolvendo CB em sistemas de liberação de fármacos quando comparado para o uso como curativos. No Brasil, foi localizada 7 patentes registradas, sendo 6 no INPI.

Tabela 2: Patentes encontradas entre 2010-2022 utilizando CB para sistemas de liberação de fármacos. Termos utilizados na pesquisa: “Bacterial Cellulose” AND “Drug delivery”; “Bacterial Cellulose” AND “Drug release”.

Local de registro	Scopus	Derwen	INPI
Escritório de Patentes e Marcas Registradas dos Estados Unidos	365	4	0
Escritório Europeu de patentes	40	1	0
Escritório de patentes do Japão	57	1	0
Organização Mundial de Propriedade Intelectual	12	1	0
China	0	11	0
Brasil	0	1	6

Apesar do número maior de patentes registradas, em comparação com o número de trabalhos publicados ainda fica claro a necessidade de investimento no desenvolvimento de produtos utilizando CB.

De acordo com os resultados levantados, nota-se um interesse em pesquisas para desenvolvimento de sistemas de liberação utilizando CB, visto que o material apresenta características muito relevantes para tal finalidade como: elevada pureza, boa biocompatibilidade, grande área superficial, capacidade de retenção de água em sua estrutura (AMIN et al., 2012; OSSOWICZ-RUPNIEWSKA et al., 2021). Vale a pena ressaltar que de acordo com trabalhos na literatura (MENEGUIN et al., 2021; VISMARA et al., 2019) a CB tem um perfil de liberação de fármaco acelerado (*burst release*), contudo, a modificação estrutural do biopolímero podem ocasionar em sistemas de liberação controlada de ativos.

Uma rota para obter sistemas de liberação controlada de fármacos utilizando CB é a obtenção de compósitos com argilas. Semelhante ao trabalho de Meneguín *et al* (MENEGUIN et al., 2021) que obteve compósitos utilizando CB e a argila fibrilar Paligorskita para liberação do fármaco metronidazol, o qual observou-se um aumento no tempo de liberação do fármaco quando comparado ao biopolímero isolado. Desta forma, o item 4.3 analisará os possíveis trabalhos envolvendo CB em compósitos com cargas inorgânicas argilosas.

4.3 – Compósitos a base de CB e argilas para sistema de liberação de fármacos e curativos tópicos.

As argilas já são amplamente investigadas na literatura como DDS. Muito provavelmente pela elevada capacidade de adsorção, capacidade de troca catiônica, resistência térmica e química que pode proporcionar a espécies ativas (GÂREA; VOICU; IOVU., 2017; MENEGUIN et al., 2021). Sendo assim, avaliou-se o uso de argilas de DDS e o resultado está demonstrado na Figura 8.

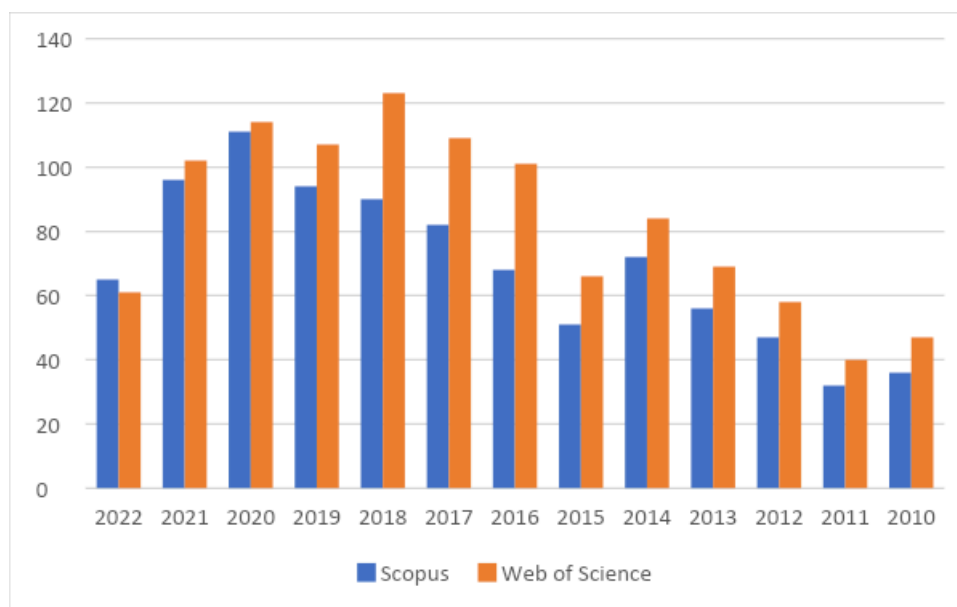


Figura 8: Trabalhos utilizando argilas em DDS entre 2010-2022 nas bases de dados Scopus e Web of Science. Termos utilizados na pesquisa: “Clay” AND “Drug delivery”; “Clay” AND “Drug release”.

Foram encontrados 900 e 1081 trabalhos relacionados ao uso de argilas em DDS, nas bases Scopus e Web of Science, respectivamente. Mais uma vez nota-se um perfil crescente no número de trabalhos entre 2010 e 2022, indicando assim um aumento no interesse acadêmico em avaliar argilas para liberação de fármacos.

É comum também a associação de cargas argilosa com polímeros naturais para o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos, como é o caso do trabalho Kevadiya *et al* (KEVADIYA et al., 2014), que obteve hidrogéis a base de gelatina-montmorilonita para a liberação controlada do fármaco ciprofloxacina.

Contudo, apesar das evidentes vantagens mencionadas anteriormente para aplicações em DDS, tanto das argilas quanto do biopolímero CB (ambos amplamente pesquisados para tal finalidade), a junção desses materiais para obtenção de nanocompósitos em sistemas de

liberação de fármacos ainda é pouquíssimo explorado na literatura. Entre 2010-2022 apenas 6 artigos foram encontrados (disponíveis na Tabela 3).

O mesmo se observa em compósitos a base de CB-argilas para curativos tópicos. No recorte temporal avaliado no presente trabalho, apenas 5 trabalhos foram encontrados.

Importante ressaltar que nenhuma patente relacionada ao uso de compósitos CB-argilas para curativos tópicos e em sistemas de liberação de fármacos foi encontrada e que foram encontrados artigos de revisão e para ambas aplicações.

Tabela 3: Compósitos CB e argilas para uso em curativos e/ou sistemas de liberação de fármacos.

Título do trabalho	Aplicação	Base de dados	Referência
Bacterial cellulose-MMTs nanoreinforced composite films: novel wound dressing material with antibacterial properties	Curativos	Web of Science	(UL-ISLAM et al., 2013)
Microwave-Assisted Synthesis of Hybrid Polymer Materials and Composites	Revisão	Web of Science	(BOGDAL; BEDNARZ; MATRAS-POSTOLEK, 2014)
Biomaterials from Nature for Advanced Devices and Therapies – Cap 21 Bacterial Cellulose	Revisão	Scopus	(BARUD, Hernane S. et al., 2016)
Evaluation of Different Methods for Cultivating <i>Gluconacetobacter hansenii</i> for Bacterial Cellulose and Montmorillonite Biocomposite Production: Wound-Dressing Applications	Curativos	Scopus e Web os Science	(HODEL et al., 2020)
Nanocellulose/palygorskite biocomposite membranes for controlled release of metronidazole	Liberação de fármacos	Web of Science e Scopus	(MENEGUIN et al., 2021)
Nanocellulose – Cap 16: Applications of Bacterial Cellulose	Revisão	Scopus	(WAHID; ZHONG, 2021)
A Review of Pickering Emulsions: Perspectives and Applications	Revisão	Web of Science	(BRITO et al., 2022)
Bacterial nanocellulose containing diethylditiocarbamate bio-curatives: physicochemical characterization and drug delivery evaluation	Liberação de fármacos	Web of Science	(BORBA et al., 2022)

Desta forma, o desenvolvimento de nanocompósitos utilizando argilas e CB como curativos multifuncionais é de grande relevância e apresenta elevado caráter inovativo.

5 – CONCLUSÃO DO CAPÍTULO 1

No presente capítulo realizou-se uma prospecção tecnológica para avaliação do cenário científico e mercadológico de compósitos a base de CB e argilas para uso como curativos e sistemas de liberação de fármacos.

Ficou evidente a demanda mundial para novas tecnologias em curativos, e a vantagem do uso de CB para tal finalidade. Evidenciou também o crescente número de trabalhos entre 2010-2022 pesquisando o uso de CB em curativos, o que demonstra o caráter promissor do biopolímero frente a tal finalidade. Ainda durante a pesquisa verificou-se que o Brasil tem destaque mundial em trabalhos utilizando celulose bacteriana, sendo o segundo país no mundo em número de pesquisas. A mesma conclusão foi alcançada quando avaliado uso de CB em sistemas de liberação de fármacos, em especial na liberação de agentes antimicrobianos.

Agora, se tratando de compósitos utilizando CB e argilas. Apesar das argilas serem amplamente pesquisadas para produção de compósitos e em sistemas de liberação de fármacos, a obtenção de nanocompósitos utilizando CB para tal finalidade ainda é pouquíssimo explorado na literatura. O mesmo segue para os compósitos CB-argila em curativos tópicos.

Portanto, o desenvolvimento de nanocompósitos utilizando CB e argilas é uma rota promissora e pouco explorada para o desenvolvimento de curativos multifuncionais com propriedades de liberação de fármacos em feridas cutâneas.

6 – REFERÊNCIAS

ABDO, Joseph M.; SOPKO, Nikolai A.; MILNER, Stephen M. The applied anatomy of human skin: A model for regeneration. **Wound Medicine**, v. 28, n. September 2019, p. 100179, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.wndm.2020.100179>>.

ABEER, Muhammad Mustafa; MOHD AMIN, Mohd Cairul Iqbal; MARTIN, Claire. A review of bacterial cellulose-based drug delivery systems: Their biochemistry, current approaches and future prospects. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, n. 8, p.

1047–1061, 2014.

AMIN, Mohd Cairul Iqbal Mohd et al. Bacterial cellulose film coating as drug delivery system: Physicochemical, thermal and drug release properties. **Sains Malaysiana**, v. 41, n. 5, p. 561–568, 2012.

BADSHAH, Munair *et al.* Surface modification and evaluation of bacterial cellulose for drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2018. , v. 113, p. 526–533Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.135>>.

BARUD, H. S. et al. Transparent bacterial cellulose-boehmite-epoxi-siloxane nanocomposites. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, Utilizado na caracterização do material na parte de Transmitância., v. 43, n. 6, p. 973–977, 2012.

BOATENG, Joshua S. et al. Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 8, p. 2892–2923, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/jps.21210>>.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE CIÊNCIA, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Membrana de Biocelulose no tratamento de: lesões cutâneas com perda de pele, úlceras venosas e arteriais, lesões por pressão, queimaduras de segundo grau e áreas doadoras de enxerto TT - Biocellulose membrane, non-treatment of: lesoes cutaneous lesion, v. . [S.l: s.n.], 2018a. Disponível em: <http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2018/Relatorio_CurativoBiocelulose.pdf>.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE CIÊNCIA. Membrana de Biocelulose no tratamento de: lesões cutâneas com perda de pele, úlceras venosas e arteriais, lesões por pressão, queimaduras de segundo grau e áreas doadoras de enxerto TT - Biocellulose membrane, non-treatment of: lesoes cutaneous lesion, v. 2018b. Disponível em: <http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2018/Relatorio_CurativoBiocelulose.pdf>.

BROWN, R Malcolm. Cellulose Structure and Biosynthesis : What is in Store for the 21 st Century ? n. June, p. 487–494, 2003.

CHATCHAWANWIROTE, Lalitpun; CHUYSINUAN, Piyachat; THANYACHAROEN, Thanyaluck. Journal of Drug Delivery Science and Technology Green synthesis of photomediated silver nanoprisms via a light-induced transformation reaction and silver nanoprism-impregnated bacteria cellulose films for use as antibacterial wound dressings.

Journal of Drug Delivery Science and Technology, n. July, p. 101305, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101305>>.

DAI, Christina; SHIH, Shawn; KHACHEMOUNE, Amor. Skin substitutes for acute and chronic wound healing: an updated review. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 31, n. 6, p. 639–648, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/09546634.2018.1530443>>.

EAGLSTEIN, W. H.; FALANGA, V. Chronic wounds. **Surgical Clinics of North America**, v. 77, n. 3, p. 689–700, 1997.

ESA, Faezah; TASIRIN, Siti Masrinda; RAHMAN, Norliza Abd. Overview of Bacterial Cellulose Production and Application. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 2, p. 113–119, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2210784314000187>>.

FADEL, Guilherme et al. International Journal of Biological Macromolecules Bacterial cellulose in biomedical applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 97–106, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.171>>.

FU, Yao; KAO, Weiyuan John. Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 7, n. 4, p. 429–444, 2010.

FÜRSATZ, Marian et al. Functionalization of bacterial cellulose wound dressings with the antimicrobial peptide ϵ -poly-L- Lysine Functionalization of bacterial cellulose wound dressings with the antimicrobial peptide ϵ -poly-L-Lysine. 2018.

GÂREA, Sorina A.; VOICU, Anda I.; IOVU., Horia. **Clay-polymer Nanocomposites for Controlled Drug Release**. [S.l: s.n.], 2017.

HE, Wei et al. Bacterial Cellulose: Functional Modification and Wound Healing Applications. **Advances in Wound Care**, v. 10, n. 11, p. 623–640, 2021.

HEHER, P. et al. Fibrin-based delivery strategies for acute and chronic wound healing. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 129, p. 134–147, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.12.007>>.

HENRIQUE DE SOUZA, PEDRO, SMANIOTTO, FERREIRA, MARCUS CASTRO, ISAAC, CESAR, GALLI, Rafael. Systematization of dressings for clinical treatment of

wounds. **Revista brasileira cirurgia plástica**, v. 27, n. 4, p. 623–626, 2012.

HSU, Chou Yi et al. The Antimicrobial Effects of Bacterial Cellulose Produced by *Komagataeibacter intermedius* in Promoting Wound Healing in Diabetic Mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 10, 2022.

HU, Weili et al. Functionalized bacterial cellulose derivatives and nanocomposites. **Carbohydrate Polymers**, Artigo de revisão, utilizado na introdução para abordar as características interessantes da celulose, além disso possui um tópico sobre nanocompósitos que poderá ajudar a definir o termo. ainda não foi utilizado. *Caracterização Transmitância.*, v. 101, n. 1, p. 1043–1060, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.102>>.

HUANG, Xiao; BRAZEL, Christopher S. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 73, n. 2–3, p. 121–136, 2001.

JIA, Hui et al. Potentiality of bacterial cellulose as the scaffold of tissue engineering of cornea. **Proceedings of the 2009 2nd International Conference on Biomedical Engineering and Informatics, BMEI 2009**, p. 4–8, 2009.

KEVADIYA, Bhavesh D. et al. Biodegradable gelatin-ciprofloxacin-montmorillonite composite hydrogels for controlled drug release and wound dressing application. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 122, p. 175–183, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.06.051>>.

KHALID, Ayesha et al. RSC Advances healing and tissue regeneration in burn mice model. **RSC Advances**, v. 7, p. 47662–47668, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C7RA06699F>>.

KLEMM, Dieter et al. Bacterial synthesized cellulose - Artificial blood vessels for microsurgery. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 26, n. 9, p. 1561–1603, 2001.

KLEMM, Dieter et al. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 44, n. 22, p. 3358–3393, 2005.

LAZARUS, Gerald S. et al. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 2, n. 3, p. 165–170, 1994.

LEE, Seung Eun; PARK, Yong Seek. The role of bacterial cellulose in artificial blood vessels.

Molecular and Cellular Toxicology, v. 13, n. 3, p. 257–261, 2017.

MACDONALD, John M.; GEYER, Mary Jo. **Wound and lymphoedema management - World Health Organization (WHO)**. [S.l: s.n.], 2010.

MACHADO, B V S ; A S ; et al. Active Potential of Bacterial Cellulose-Based Wound Dressing: Analysis of Its Potential for Dermal Lesion Treatment. 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14061222>>.

MARKETS, Markets and. **Wound Care Market by Product - Global Forecast to 2027**. Disponível em: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/wound-care-market-371.html?gclid=Cj0KCKQiA5NSdBhDfARIsALzs2EA6jwOjBGEE_ltKw5apoHhIZdfR0KW9R5w3IVRQ VynGnfA8zKFhIMsaAv5jEALw_wcB>. Acesso em: 4 jan. 2022.

MARQUELE-OLIVEIRA, Franciane et al. Development, characterization and pre-clinical trials of an innovative wound healing dressing based on propolis (EPP-AF®)-containing self-microemulsifying formulation incorporated in biocellulose membranes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 136, p. 570–578, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.135>>.

MAYET, Naeema et al. A comprehensive review of advanced biopolymeric wound healing systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 8, p. 2211–2230, 2014.

MENEGASSO, Jaíne Ferrareis et al. Modified montmorillonite-bacterial cellulose composites as a novel dressing system for pressure injury. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 194, n. November 2021, p. 402–411, 2022.

MENEGUIN, Andréia et al. Nanocellulose/palygorskite biocomposite membranes for controlled release of metronidazole. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 188, n. July, p. 689–695, 2021.

MORAES, Paula Rodrigues Fontes De Sousa et al. Bacterial cellulose/collagen hydrogel for wound healing. **Materials Research**, v. 19, n. 1, p. 106–116, 2016.

MUANGMAN, Pornprom et al. Efficiency of microbial cellulose dressing in partial-thickness burn wounds. **Journal of the American College of Certified Wound Specialists**, v. 3, n. 1, p. 16–19, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcws.2011.04.001>>.

NEMATI, Elham; GHOLAMI, Ahmad. Nano bacterial cellulose for biomedical applications: A mini review focus on tissue engineering. **J. Adv. Appl. NanoBio Tech**, v. 2, n. 4, p.

93–101, 2021. Disponível em: <<http://www.aanbt.dormaj.comhttps://doi.org/10.47277/AANBT/2>>.

NUSSBAUM, Samuel R. et al. An Economic Evaluation of the Impact, Cost, and Medicare Policy Implications of Chronic Nonhealing Wounds. **Value in Health**, v. 21, n. 1, p. 27–32, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jval.2017.07.007>>.

OLIVEIRA BARUD, H. G. et al. A multipurpose natural and renewable polymer in medical applications: Bacterial cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 153, p. 406–420, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.059>>.

OSSOWICZ-RUPNIEWSKA, Paula et al. Transdermal delivery systems for ibuprofen and ibuprofen modified with amino acids alkyl esters based on bacterial cellulose. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 12, p. 1–18, 2021.

PERCIVAL, Nicholas J. Classification of Wounds and their Management. **Surgery (Oxford)**, v. 20, n. 5, p. 114–117, 2002.

PORTELA, Raquel et al. Bacterial cellulose: a versatile biopolymer for wound dressing applications. **Microbial Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 586–610, 2019.

POTULSKI, Daniele Cristina et al. Green composites from sustainable cellulose nanofibrils: A review. **Scientia Forestalis/Forest Sciences**, Artigo de Revisão, utilizado na introdução diversas vezes para falar sobre: vantagens ecológicas da celulose, Green compositos, métodos de obtenção de CNF. Além de classifica as diversas fibras naturais, definir o termo Celulose e elucidar sua estrutura., v. 40, n. 103, p. 345–351, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.078>>.

QIU, Kaiyan; NETRAVALI, Anil N. A Review of Fabrication and Applications of Bacterial Cellulose Based Nanocomposites. **Polymer Reviews**, v. 54, n. 4, p. 598–626, 2 out. 2014. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15583724.2014.896018>>.

RIBEIRO, Débora et al. **Dicionário Online de Português (Dicio)**. Disponível em: <<https://www.dicio.com.br/prospeccao/>>. Acesso em: 3 jan. 2023.

SCHUMANN, Dieter A. et al. Artificial vascular implants from bacterial cellulose: Preliminary results of small arterial substitutes. **Cellulose**, v. 16, n. 5, p. 877–885, 2009.

SEN, Chandan K. et al. Human skin wounds: A major and snowballing threat to public health

and the economy: PERSPECTIVE ARTICLE. **Wound Repair and Regeneration**, v. 17, n. 6, p. 763–771, 2009.

CHANDAN K. SEN. Human Wounds and Its Burden: An Updated Compendium of Estimates. **Advances in Wound Care**, v. 8, n. 2, p. 39–48, 2019.

SILVA, Jhonatan Miguel. **NANOCOMPÓSITO DE NFC/LAPONITA® UTILIZADO COMO SUPORTE NA PRODUÇÃO DE FILMES LUMINESCENTES COM COMPLEXO Eu (III) – LIGANTE 2-THENOILTRIFLUOROACETONA (TTA)**. 2018. 0–115 f. 2018.

SOUSA, Ricardo Barbosa de et al. CELULOSE BACTERIANA PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS: UMA PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA. **Trabalhos nas áreas de Fronteiras da Química**, p. 64–87, 2021. Disponível em: <<https://www.ptonline.com/articles/how-to-get-better-mfi-results>>.

SUN, Bianjing et al. Facile synthesis and light-induced antibacterial activity of ketoprofen functionalized bacterial cellulose membranes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 568, n. January, p. 231–238, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.01.051>>.

SYED ABDULLAH, Sharifah Sopliah et al. Development and evaluation of ciprofloxacin-bacterial cellulose composites produced through in situ incorporation method. **Biotechnology Reports**, v. 34, n. September 2021, p. e00726, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00726>>.

ULLAH, Hanif et al. **Advances in biomedical and pharmaceutical applications of functional bacterial cellulose-based nanocomposites**. [S.l.]: Elsevier Ltd., 2016. v. 150. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.029>>.

VALAPA, Ravi Babu et al. **An Overview of Polymers and Clay Nanocomposites**. [S.l.]: Elsevier Inc., 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-46153-5.00002-1>>.

VISMARA, Elena et al. Bacterial nanocellulose and its surface modification by glycidyl methacrylate and ethylene glycol dimethacrylate. Incorporation of vancomycin and ciprofloxacin. **Nanomaterials**, v. 9, n. 12, 2019.

WEI, He et al. In situ synthesis of bacterial cellulose/copper nanoparticles composite

membranes with long- term antibacterial property. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 0, n. 0, p. 000, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/09205063.2018.1528518>>.

WHITNEY, Jo Anne D. Overview: Acute and chronic wounds. **Nursing Clinics of North America**, v. 40, n. 2, p. 191–205, 2005.

YE, Shan et al. Flexible Amoxicillin-Grafted Bacterial Cellulose Sponges for Wound Dressing: In Vitro and in Vivo Evaluation. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 10, n. 6, p. 5862–5870, 2018.

ZHANG, Andi et al. Research status of self-healing hydrogel for wound management: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 2108–2123, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.109>>.

ZHENG, Lu et al. Latest Advances on Bacterial Cellulose-Based Antibacterial Materials as Wound Dressings. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, nov. 2020.

ZHONG, Chunyan. Industrial-Scale Production and Applications of Bacterial Cellulose. v. 8, n. December, p. 1–19, 2020.

ZHOU, Chen et al. De novo strategy with engineering a multifunctional bacterial cellulose-based dressing for rapid healing of infected wounds. **Bioactive Materials**, v. 13, n. August 2021, p. 212–222, 2022.

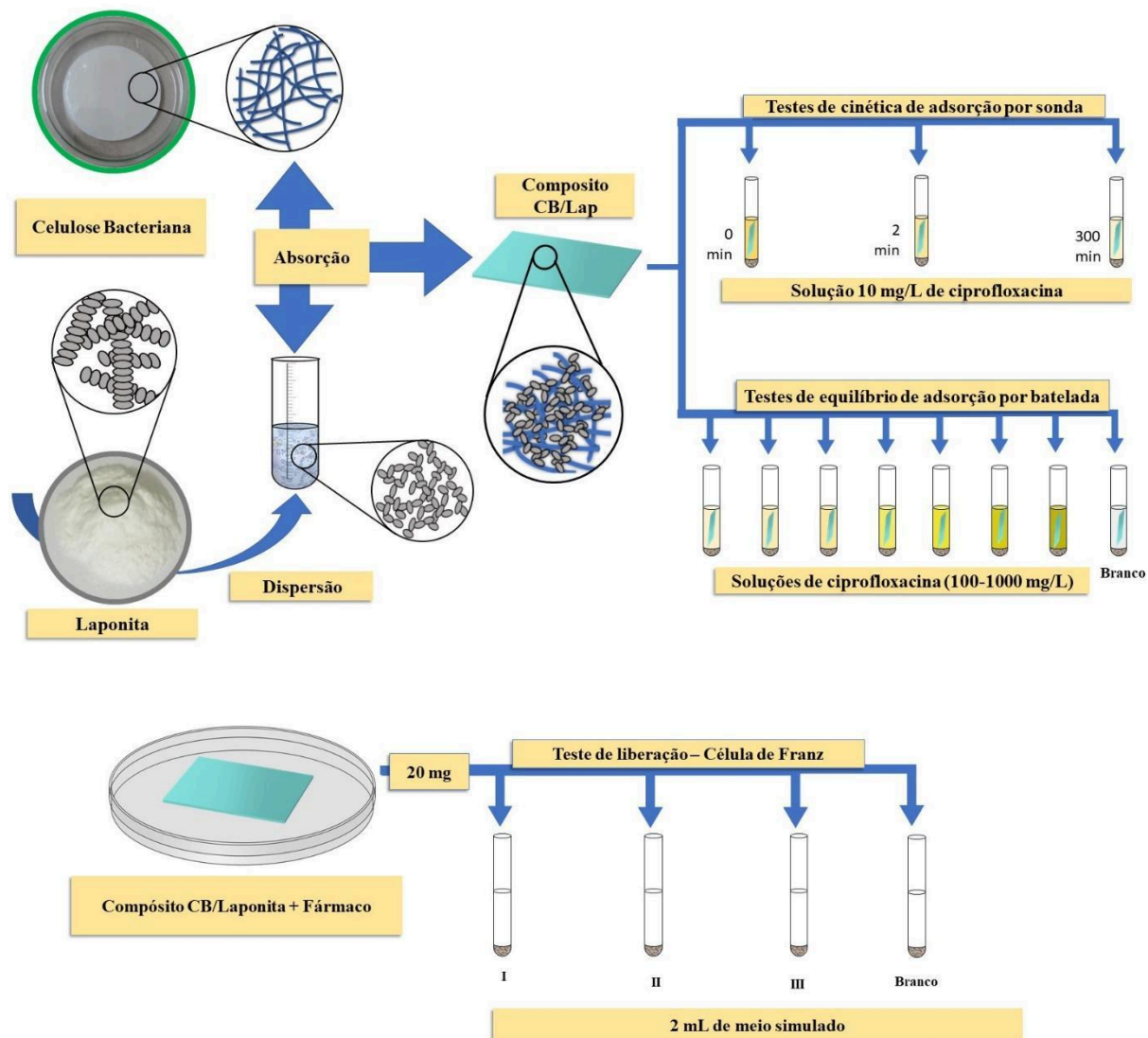
CAPITULO 2 - NANOCOMPÓSITOS A BASE DE CELULOSE BACTERIANA E LAPONITA COMO POTENCIAIS CURATIVOS MULTIFUNCIONAIS – OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E LIBERAÇÃO DO FÁRMACO CIPROFLOXACINA

RESUMO

A celulose bacteriana (CB) apresenta propriedades interessantes para o uso biomédico como citado anteriormente, contudo, possui limitações para seu uso em sistemas de liberação de fármacos e como curativos. Desta forma, objetivando um material para uso em curativos multifuncionais com propriedades antibacterianas e de liberação controlada de fármacos, no presente trabalho propôs-se a obtenção de nanocompósitos utilizando CB e laponita (Lap), com diferentes teores de argila, para estudo de adsorção e liberação do fármaco ciprofloxacina. Nos resultados de MEV, nota-se um aumento no diâmetro médio das fibras com aumento do teor de laponita e verifica-se uma agregação das fibras nos compósitos CB/Lap 15-50%. Já nos resultados de DRX, verificou-se que a presença da argila reduziu a cristalinidade relativa dos filmes conforme o aumento do teor da laponita, sendo que nos materiais CB/Lap 15-50% observou pico na região de 001 indicando o empilhamento da argila e a formação de agregados. Contudo, apesar da redução da cristalinidade, observou-se um aumento na estabilidade térmica dos compósitos em relação a CB. Já nos testes *in vitro* em linhagem de fibroblastos humanos, todos os materiais do presente trabalho apresentaram viabilidade celular acima de 70%, demonstrando que os materiais não apresentaram comportamento citotóxico nessas células. E se tratando dos resultados de adsorção e liberação, os compósitos obtiveram maior afinidade com o fármaco e maior capacidade de adsorção em relação a CB isolada, sendo capaz de adsorver cerca de 2,15 vezes (CB/Lap 15%) e controlar a liberação do fármaco (liberou cerca de 44,2% em 24 horas) comparado à CB (liberou 87,2% em 24 horas). Todos os compósitos obtidos apresentaram atividade antibacteriana frente linhagens de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, destacando-se os compósitos CB/Lap 30 e 50% com maior atividade em comparação com os demais materiais. Os materiais obtidos se demonstraram promissores para o desenvolvimento de curativos multifuncionais com capacidade de liberação controlada de fármaco antibacteriano.

Palavras-chave: Celulose Bacteriana, Laponita, Compósitos, Curativos tópicos, Liberação de fármacos, Ciprofloxacina

RESUMO GRÁFICO



1 – INTRODUÇÃO

1.1 - Laponita e o uso no meio biomédico

A laponita (fórmula $\text{Na}_{0,7}[(\text{Si}_8\text{Mg}_{5,5}\text{Li}_{0,4})\text{O}_{20}(\text{OH})_4](\text{H}_2\text{O})_n$) é uma argila lamelar de origem sintética, pertencente à família das esmectitas. Suas lamelas são do tipo 2:1 Tetraédrica-Octaédrica-Tetraédrica (TOT) com duas folhas de tetraedros de $[\text{SiO}_4]$ entre uma folha de octaedros de $[\text{MgO}_4(\text{OH})_2]$, unidas entre si por compartilhamento de átomos de oxigênio comum (LEZHNINA, et al., 2012; PEROTTI et al., 2011; SILVA, et al., 2018; SILVA, , 2018; TOMÁS; ALVES; RODRIGUES, 2018) como demonstrado pela Figura 1.

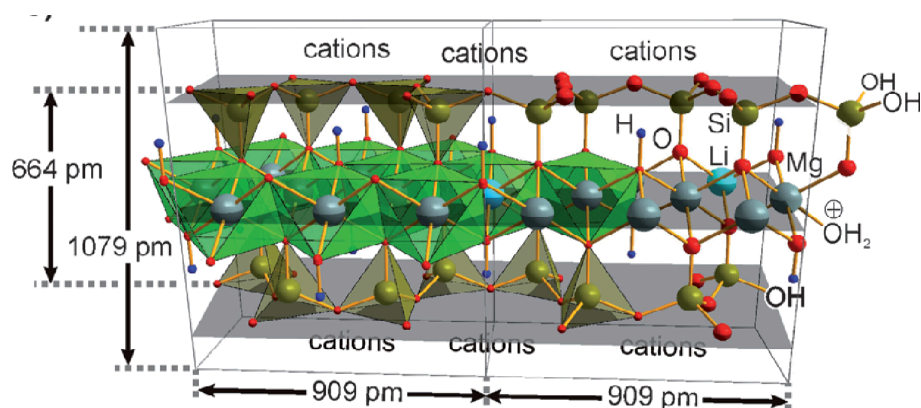


Figura 1: Estrutura das lamelas da laponita (LEZHNINA, et al., 2012 Publisher Tax ID EU826007151).

A laponita possui carga superficial negativa devido à troca isomórfica de parte dos íons Mg^{2+} por Li^+ que provoca uma deficiência em cargas positivas em sua lamela. Desta forma, íons sódio (Na^+) acomodam-se no espaço entre as lamelas para contrabalancear essas cargas. Por isso, a laponita apresenta grande expansibilidade, uma vez que os íons Na^+ podem ser hidratados, ocasionando no aumento do espaço interlamelar da argila. Ademais, devido a elevada troca catiônica, os cátions de sódio (Na^+) podem ser facilmente trocados por outros de maior interesse como cátions de lantanídeos, fármacos e partículas carregadas positivamente (LEZHNINA, et al., 2012; PEROTTI et al., 2011; SILVA, et al., 2018; SILVA, 2018; TOMÁS; ALVES; RODRIGUES, 2018).

A laponita possui propriedades físico-químicas únicas, comparada às demais esmectitas, tais como: boa dispersão em sistemas aquosos, capacidade de formar filmes e géis translúcidos, conteúdo reduzido de metais de transição (presentes em argilas naturais), pequeno tamanho do cristalito, grande capacidade de troca catiônica. Vale ressaltar que a argila proposta para o presente projeto (Laponita XLG) possui um grau de pureza compatível com o uso pretendido (BYK ADDITIVES & INSTRUMENTS, 2014).

Além disso, a argila possui grupos silanóis ($\equiv\text{Si-OH}$) nas arestas das lamelas que podem ser funcionalizados com organosilanos (JABER; MIEHÉ-BRENDLÉ, 2009). Desta forma pela possibilidade de modificar quimicamente sua superfície, a laponita está sendo utilizada na produção de novos materiais funcionais com propriedades distinta dos seus componentes isolados (OLIVEIRA et al., 2015; PEROTTI et al., 2011; SILVA, Jhonatan Miguel, 2018).

Na área biomédica, a argila sintética tem sido utilizada em bioimageamento como veículo para corantes fosforescentes insolúveis em água e complexos luminescente de európio para monitoramento de proteínas (TOMÁS; ALVES; RODRIGUES, 2018). Também é reportado seu uso na produção de contrastes com íon gadolínio para imagens de ressonância magnética nuclear (TOMÁS; ALVES; RODRIGUES, 2018).

Em Medicina Regenerativa e na Engenharia de Tecidos, a laponita é utilizada como matriz de transporte para a liberação local e modificada de fatores bioquímicos que podem induzir respostas biológicas específicas, incluindo proliferação celular e diferenciação de células-tronco (TOMÁS; ALVES; RODRIGUES, 2018). É utilizada também na produção de biocerâmica para potencial aplicação em Engenharia de Tecidos Ósseos (AFEWERKI et al., 2019).

Tratando-se de liberação modificada de fármacos, a laponita, além de matriz de transporte para espécies bioativas pouco solúveis em água, serve também como meio de proteção contra a degradação do princípio ativo no ambiente fisiológico, uma vez que pode acomodar as espécies de interesse em seu espaço interlamelar. Desta forma, essa argila sintética tem sido utilizada como veículo de fármacos, por exemplo o antifúngico, pouco solúvel em água, intraconazol, que foi avaliado para uma rota de administração oral, simulando o meio gástrico humano (TOMÁS; ALVES; RODRIGUES, 2018) e o antibiótico trimetoprim (GONZÁLEZ et al., 2017).

Foi relatado também o uso da laponita no transporte do fármaco cloridrato de doxorrubicina para o tratamento de diversos tipos de câncer. Por possuir carga positiva, a doxorrubicina foi inserida no espaço interlamelar da argila por troca catiônica. Estudos *in vitro* demonstraram um comportamento de liberação dependentes do valor do pH do ambiente, que foi maior em valores de pH ácido (5,4) do que em pH fisiológico (7,4). Desta forma, avaliando o comportamento em células de carcinoma epitelial humano, relatou-se que um maior efeito de citotoxicidade foi obtido quando se utilizou a laponita como veículo de entrega de fármaco em relação ao uso do fármaco isolado (TOMÁS; ALVES; RODRIGUES, 2018).

1.2 - Compósitos orgânicos-inorgânicos em sistemas de liberação de fármacos e curativos

Sistemas de liberação de fármacos são descritos como processos pelo qual um princípio ativo, de interesse terapêutico, migra do interior de uma matriz para a superfície externa e é liberado no meio fisiológico com uma taxa controlada (FU; KAO, 2010; SHI et al., 2014).

Esse processo é governado por múltiplos fatores tais como: propriedades físico-químicas do soluto, características estruturais das matrizes, ambiente de liberação e possíveis interações entre esses fatores (FU; KAO, 2010). A Tabela 1, retirada e modificada do trabalho de Fu e Kao (FU; KAO, 2010), demonstra os principais fatores que controlam os sistemas de liberação de fármacos.

Tabela 1: Fatores de influência no processo de liberação de fármacos

Matriz	Meio de liberação	Características do fármaco
Composição	pH	Solubilidade
Estrutura	Temperatura	Estabilidade
Intumescimento	Forças iônicas	Cargas
Degradação	Enzimas	Interações com a matriz

Sendo assim, a matriz pode ser desenvolvida a fim de responder estímulos específicos do meio de liberação como: intumescimento “inteligente” ocasionado por diferentes valores de pH, força iônica, temperatura, entre outros (FU; KAO, 2010; PANDEY et al., 2013; SHI et al., 2014; ULLAH; SANTOS; KHAN, 2016).

Segundo o trabalho de Fu e Kao (FU; KAO, 2010), as matrizes poliméricas utilizadas em processos de liberação de fármacos podem ser classificadas em dois grupos, as matrizes degradáveis e não-degradáveis.

As matrizes degradáveis liberam fármacos pela decomposição de grupos passíveis a hidrólise ou degradação enzimática como os ésteres, amidas e grupos anidridos. O polímero pode sofrer uma degradação superficial e liberar os fármacos gradativamente ou pode ocorrer uma decomposição homogênea por todo material, ocasionando em diferentes perfis de liberação. A degradação é dependente da intrusão de água na matriz e é um fator crucial para o estudo cinético desse tipo de material.

Já os polímeros não-degradáveis, geralmente utilizados em implantes e em liberação transdérmica, devem ser materiais biocompatíveis, termo e quimicamente estáveis, com estrutura física e mecânica compatíveis ao tecido biológico circundante. São constituídos de materiais inertes, ou seja, que não reagem com os fármacos, no qual grupos funcionais controlam a liberação da espécie ativa. A cinética de liberação dos fármacos em polímeros não-degradáveis segue um modelo Fikiano no qual a liberação é regida pela difusão do solvente na matriz, a concentração do fármaco e o caminho de difusão (espessura dos filmes). Desta forma, a estrutura e composição da matriz é diretamente relacionada com o perfil de liberação do material (FU; KAO, 2010).

A celulose bacteriana se caracteriza como polímero não-degradável em sistemas de liberação de fármacos e possui propriedades interessante que facilitam seu uso para tal finalidade, como: a biocompatibilidade, grande porosidade, elevada área superficial e grande capacidade de retenção de água em sua estrutura (até 99%) (HU et al., 2014; QIU; NETRAVALI, 2014). Contudo, devido ao livre movimento de gases e solventes pela membrana a liberação de fármacos seguem um modelo de liberação rápida do princípio ativo (“burst release”). Apesar de ser utilizada em certas estratégias de administração de fármacos, os efeitos negativos desse modelo podem ser farmacologicamente perigosos (BADSHAH et al., 2018; HUANG; BRAZEL, 2001).

Uma estratégia para modificar o perfil de liberação da CB é a obtenção de compósitos utilizando argilas, como a montmorilonita (UL-ISLAM; KHAN; PARK, 2012), laponita (PEROTTI et al., 2011) e Paligorsquita (MENEGUIN et al., 2021) as quais desempenham papéis importantes no controle da liberação de fármacos, uma vez que podem modificar a estrutura dos filmes e influenciar em características como o intumescimento, por dificultar a passagem de solvente e vapores através da membrana, e pela interação direta com o fármaco, através das cargas superficiais (FONTES et al., 2018; MENEGUIN et al., 2021).

Os compósitos do tipo polímero-argila podem apresentar diferentes estruturas a depender da interação entre a matriz inorgânica e as fibras do polímero. Segundo Paiva, Morales e Guimarães (PAIVA; MORALES; GUIMARÃES, 2006), existem 3 formas estruturais dos compósitos (demonstrados na Figura 2) sendo eles:

“[...] estrutura de fase separada quando as cadeias poliméricas não intercalam as camadas de argila levando à obtenção de uma estrutura de propriedades similares às de um compósito convencional; estrutura intercalada quando as cadeias poliméricas são intercaladas entre as camadas de argila, formando uma estrutura multicamada bem ordenada, que apresenta propriedades superiores à de um compósito convencional; e estrutura esfoliada, onde a argila é completa e uniformemente dispersa em uma matriz polimérica, maximiza as interações polímero-argila e leva a significativas melhorias nas propriedades físicas e mecânicas.”

(PAIVA; MORALES; GUIMARÃES, 2006).

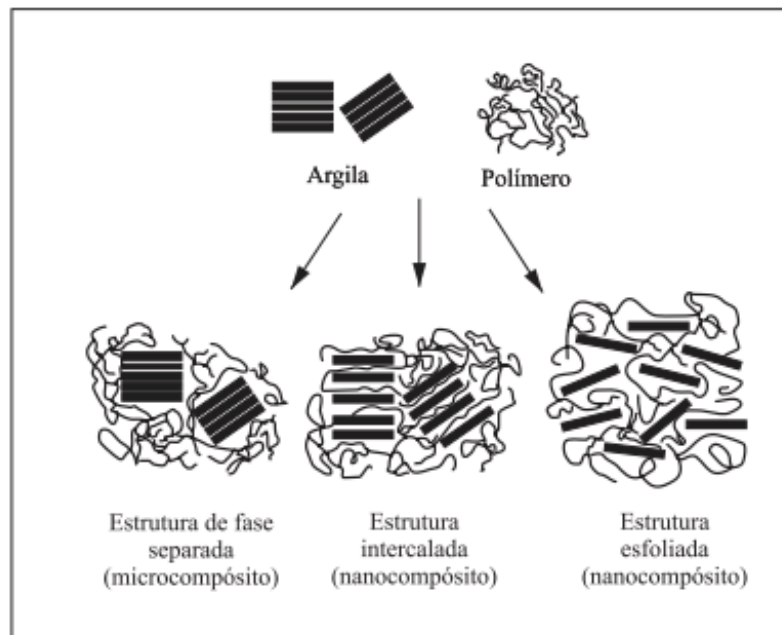


Figura 2: Diferentes tipos de compósitos polímero-argila (PAIVA; MORALES; GUIMARÃES, 2006)

Compósitos polímero-argila podem apresentar diversas vantagens em sistemas de liberação de fármacos. A junção das propriedades dos diferentes materiais pode ser bem interessante na obtenção de curativos multifuncionais com propriedade de liberação de fármacos, uma vez que os polímeros, em geral apresentam boa viabilidade e biocompatibilidade e formam filmes flexíveis, já as cargas inorgânicas são capazes de “encapsular” os fármacos no espaço interlamelar (denominado de Eficiência de Encapsulamento – EE), podendo tornar o princípio ativo mais estável em relação ao pH, ação química, enzimática ou temperatura. Além disso, os compósitos podem apresentar uma menor taxa de difusão e intumescimento ocasionado pelo caminho tortuoso que a presença da argila provoca, ocasionando em um processo de liberação mais gradual. Características ideais para a criação de novos curativos multifuncionais com capacidade de liberar fármacos que apresentem propriedades antibacterianas, como a ciprofloxacina.

1.3 – Ciprofloxacina

A ciprofloxacina, (1-Ciclopropil-6-fluoro-4-oxo-7-(piperazina-1-il)-1, ácido 4-dihidroquinolina-3-carboxílico), é um fármaco do grupo das fluorquinolonas que age inibindo a topoisomerase II (DNA girasse bacteriana), enzima que produz o superespiralamento negativa do DNA e que permite, assim, a transcrição ou replicação do mesmo (Rang et al., 2016, (SYED ABDULLAH et al., 2022). A Figura 3 demonstra a estrutura química do fármaco.

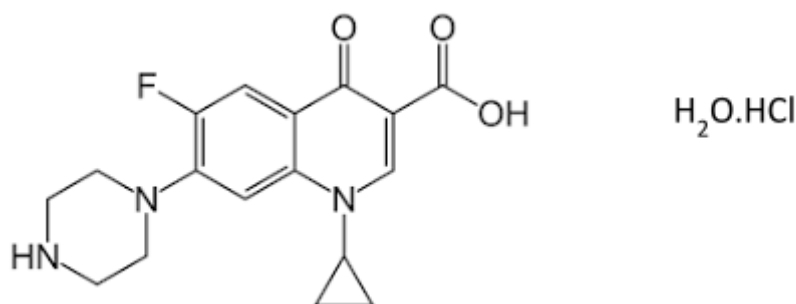


Figura 3: Estrutura química do fármaco Cloridrato de ciprofloxacina

O princípio ativo em questão tem amplo espectro bactericida, tanto contra microrganismos Gram-positivos, quanto contra Gram-negativos (incluindo bacilos entéricos), microrganismos resistentes a penicilina, cefalosporinas e aminoglicosídeos e, ainda, contra *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae* produtoras de penicilases, *Campylobacter spp.* e *pseudomonas*.

No caso dos microrganismos Gram-positivos, os estreptococos e os pneumococos são inibidos fracamente, havendo grande resistência aos estafilococos (Rang et al., 2016). É hidrossolúvel em pH ácidos, por isso comercializado na sua forma de cloridrato, e pode ser quantificado via técnicas utilizando UV-vis (FEREJA; SEIFU; MOLA, 2015)

Foi reportado o uso da Ciprofloxacina como antibiótico para curativo de feridas no trabalho de Li *et al* (LI et al., 2017), e foi capaz de inibir o crescimento das bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

No trabalho de Abdullah *et al* (SYED ABDULLAH et al., 2022), os autores obtiveram compósitos a base de celulose bacteriana e partículas de Ciprofloxacina *in situ*, para a produção de curativo antibacterianos. Os autores observaram a inibição de bactérias *Escherichia coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, comumente encontradas em feridas de pés diabéticos, demonstrando um potencial como curativo de feridas crônicas.

Sendo assim, a combinação de membranas de celulose bacteriana e laponita pode ocasionar em um sistema de liberação controlada do fármaco antibacteriano ciprofloxacina.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo principal

O principal objetivo deste capítulo concentrou-se na obtenção de compósitos a base de CB/laponita a ser testado em sistemas de liberação do fármaco cloridrato de ciprofloxacina.

2.2 – Objetivos específicos

- Caracterização térmica, física e morfológica dos compósitos obtidos;
- Estudos de adsorção e liberação modificada, *in vitro*, do fármaco ciprofloxacina;
- Testes de viabilidade celular e propriedade antibacteriana dos filmes a fim de verificar a citocompatibilidade e atividade frente a linhagens específicas de bactérias;

3– MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Materiais

Membranas de celulose bacteriana (CB) foram fornecidas pela empresa Biosmart Nano (<https://www.biosmartnano.com/>) e obtidas pelo micro-organismo *Komagataeibacter xylinus* em meio de cultura Hestrin-Scharamm (HS).

Para a produção do compósito utilizou-se Laponita XLG (Lap), da empresa Buntech, dispersa em água deionizada. O cloridrato de ciprofloxacina foi gentilmente cedida pelo laboratório de farmácia do curso de graduação da Uniara.

3.2 - Métodos

3.2.1 - Obtenção dos compósitos CB/Lap

Foram obtidos compósitos de CB e Lap com diferentes teores de massa de argila em relação à massa seca da CB (1, 3, 5, 10, 15, 30 e 50% m/m) onde, inicialmente, calculou-se o teor de massa seca das membranas de CB com o auxílio de uma balança medidora de umidade da marca Marte científica e modelo ID-200, o procedimento foi realizado em triplicata. Posteriormente, quantidades adequadas de laponita foram dispersas em 3 mL de água deionizada sob agitação mecânica por 240 minutos até a total dispersão da argila.

Os compósitos foram obtidos utilizando membranas úmidas de CB de 10 x 10 cm (espessuras variando de 0,2-0,4 cm) que foram parcialmente desidratadas por compressão, com o auxílio de papel filtro, e foram mantidas em contato, por ambos lados, com as dispersões de laponita até a total absorção do volume. Para caracterização físico-química, parte dos filmes foram secos em placas de petri de polietileno à temperatura ambiente por 3 dias, e denominados como CB/Lap 1, 3, 5, 10, 15, 30 e 50%.

3.2.2 – Caracterizações físico-químicas

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV): Microscopias eletrônicas de varredura foram obtidas da superfície e corte transversal das amostras em um microscópio eletrônico de varredura da marca JEOL, modelo JSM-7500F, com software de operação PC-SEM v 2,1,0,3. As análises foram realizadas com amostras de membranas secas de CB e CB/Lap 1-50%.

Difração de Raios-X (DRX): Os difratogramas de Raios-X foram obtidos em um equipamento da marca Rigaku, modelo MiniFlex II Desktop em 40kV e 30mA (1200W), empregando radiação filtrada Cu K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$). Varrendo o ângulo de obtenção 2θ entre 2-60° na com a taxa de 2°/min.

Utilizou-se o método de Segal (FRENCH, 2020; SEGAL et al., 1959) para calcular a cristalinidade relativas (Crl) dos materiais obtidos utilizando a Equação 1:

$$CrL = \frac{I_{110} - I_{am}}{I_{110}} \times 100 \quad (1)$$

Onde, I_{am} ($2\theta = 18^\circ$) refere-se à intensidade do vale da dispersão amorfa e I_{110} ($2\theta = 22.9^\circ$) refere-se ao pico do plano cristalino da CB.

Aplicando-se a Lei de Bragg é possível calcular a distância interlamelar da laponita em 001 nas amostras CB-Lap 15%, CB-Lap 30% e Lap, utilizando a Equação 2:

$$n\lambda = 2d \cdot \sin\theta \quad (2)$$

Onde: n é o múltiplo inteiro do comprimento de onda; λ é o comprimento de onda do feixe de raios-X incidente (Cu K-Alfa: 1,5418 Å); d é o espaçamento interlamelar; θ é o ângulo de difração.

Espectroscopia Vibracional no Infravermelho (FT-IR): Espectros de FT-IR, na região de 4000 a 400 cm^{-1} , por meio de reflexão total atenuada (cristal de diamante) com transformada de Fourier - VERTEX 70 da marca Bruker análises foram realizadas utilizando como amostras, as membranas secas de CB e dos nanocompósitos CB/Lap 1-50% e a argila laponita.

Ressonância Magnética Nuclear (RMN): As análises de RMN no Estado Sólido foram obtidos em um espectrômetro Bruker Avance III HD operado num campo de 7,05 T, utilizando uma sonda CPMAS de dois canais e rotores zircônia de 4 mm. Os espectros do núcleo de ^{13}C no foram obtidos a uma frequência de Larmor de 75,00 MHz, frequência de giro de 3000 Hz, com tempo de relaxação de 3,5 s e um pulso de 90° de 2,0 s utilizando giro-ao-ângulo mágico, e polarização cruzada com 4k de scans. Os deslocamentos químicos foram padronizados de forma indireta através de uma amostra de Glicina, com sinal referente a carbonila em 176,00 ppm em relação ao TMS com padrão primário.

Análise Termogravimétrica (TGA/DTG): As amostras que foram colocadas, uma a uma, em cadinho de alumina e caracterizadas utilizando o equipamento da TA Instruments modelo SDT Q600, em temperatura de 25-800°C, com taxa de aquecimento de 10°C por minuto, em fluxo de ar sintético a 100mL/min.

Permeabilidade ao Vapor de Água (PVA): Para os testes de permeabilidade ao vapor de água, utilizou-se seções circulares das amostras fixadas no topo de frascos de vidro contendo 10 mL de água (gradiente de 100% de umidade relativa a 25°C). O conjunto foi pesado com precisão e armazenado em um dessecador contendo sílica gel (0% de umidade relativa). As mudanças sobre o peso do frasco foram traçadas em função do tempo (0, 24, 48, 72 e 96h).

Posteriormente aos testes de permeabilidade ao vapor de água, PVA ($\text{g}\cdot\text{mm}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}$), foi calculado utilizando a Equação 3, também retirada do trabalho de Gennadios Weller e Gooding (GENNADIOS et al., 1994).

$$PVA = PVTRc \times L \cdot \Delta p \quad (3)$$

Onde: L é a espessura do filme, Δp é a diferença de pressão parcial de vapor de água em todo o filme.

Para o ensaio de viabilidade celular, utilizou-se células de fibroblastos humano HDFa (*Human Dermal Fibroblasts, adult*) adquiridas da empresa *Life Technologies* (Invitrogen, Cat. Nº. C-013-5C) e gentilmente cedidas pelo laboratório do Prof. Dr Andrei Moroz, Unesp/Araraquara.

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 atmosfera com 5% de CO₂. Após 2 repiques consecutivos, iniciou-se o ensaio de citotoxicidade, empregando uma concentração de 1×10^4 células/poço, incubadas em placa de 96 poços. A placa foi mantida por 24h em incubadora, respeitando os mesmos parâmetros de temperatura e porcentagem de CO₂ descritos anteriormente.

Paralelamente ao plaqueio das células, os meios de extração (tratamentos) derivados dos filmes de CB com diferentes porcentagens de laponita (1%-50%) e CB nativa (1 cm²) foram preparados de acordo com a ISO 10993-12. Para tal, os filmes foram irradiados por 30 minutos com radiação ultravioleta (UV) e posteriormente dispostos em *ependorfs* de 1,5 mL,

seguido da adição de DMEM + 10% de SFB (1mL/cada) para então serem deixados sob constante agitação por 24h.

Finalizado o período de agitação, os meios que ficaram em contato com os filmes foram filtrados em filtro de seringa 0,22 µm. Dessa maneira, utilizou-se 200 µL/poço para cada meio de extração e o contato destes com as células perdurou por 24h. Ao todo foram testadas 8 diferentes amostras, sendo elas: CB nativa, CB/Lap 1%, 3%, 5%, 10%, 15%, 30% e 50%. Após o término dos tratamentos, os meios de extração foram removidos dos poços, para seguirmos com a lavagem dos poços com *Phosphate Buffer Saline* (PBS).

Em seguida, 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. As placas foram novamente incubadas a 37°C, ao abrigo da luz, até a observação da formação dos cristais violeta de formazana (5 horas). Para a solubilização dos cristais de formazana, 100 µL de álcool isopropílico absoluto foram adicionados em cada poço e os valores de absorvância foram obtidos em espectrofotômetro de microplacas, com leitura em comprimento de onda a 570 nm. Como controle de morte celular (controle positivo), as células foram tratadas com DMSO (Dimetilsulfóxido) a 30% e como controle de sobrevivência (controle negativo), células foram tratadas com DMEM + 10% SFB. Os experimentos foram conduzidos em triplicata para cada amostra, em três ensaios independentes, incluindo os controles (MOSMANN *et al.*, 1983).

Com os valores de absorvância obtidos, calculou-se a média da porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle de sobrevivência (100%), conforme apresentado pela Equação 4 abaixo, norma ISO 10993-5, (INTERNATIONAL, 2009):

$$\frac{(\text{absorvância da amostra-branco})}{(\text{absorvância do controle de sobrevivência-branco})} \times 100 \quad (4)$$

Para avaliar atividade antibacteriana inicialmente realizou-se uma triagem primária da bioatividade dos materiais usando a técnica de difusão em ágar, seguindo as diretrizes do CLSI M2-A8 (NCCLS, 2003), com a exceção de que os discos de antibióticos foram substituídos pelos próprios materiais.

As amostras CB, CB/Lap 1-50% foram avaliados e utilizou-se disco de papel de filtro embebido em meio de cultura (C) e disco de papel de filtro embebido em solução de digluconato de clorexidina (CHX) a 0,12%, como controle negativo e positivo, respectivamente. Um cortador circular (\varnothing 16 mm) foi usado para preparar as amostras, garantindo diâmetro e espessura consistentes nos diferentes grupos de estudo.

Foram usadas as cepas de referência, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922), comumente encontradas em feridas cutâneas infectadas. As cepas foram obtidas da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e foram mantidas em caldo de tripton de soja (TSB) a -80 °C. A reativação das cepas foi realizada usando ágar TSB em condições aeróbicas a 37 °C. Um inóculo de cada microrganismo estudado foi preparado ajustando-se a leitura da densidade óptica a 630 nm para 0,08-0,10 (aproximadamente 1×10^8 células/mL).

O inóculo preparado foi espalhado uniformemente na superfície do ágar TSB e deixado em repouso em temperatura ambiente por 3 minutos. Em seguida, as amostras previamente rotuladas foram colocadas de forma equidistante no ágar e, após um intervalo de 15 minutos, as placas foram incubadas em uma incubadora bacteriológica a 37 °C por 18 h. Os experimentos foram realizados em duas ocasiões distintas ($n = 4/\text{grupo}$).

Após a triagem inicial, uma avaliação da atividade antibacteriana em biofilmes de espécies únicas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foi desenvolvida no fundo de placas de 24 poços pré-preparadas usando as condições de crescimento descritas anteriormente (FONTANA et al., 2009). Um volume de 150 μL de suspensões bacterianas foi adicionado a cada poço das placas. Simultaneamente, os espécimes de cada grupo experimental ($n = 4/\text{grupo}$) foram colocados individualmente nos poços da placa de 24 poços durante a formação do biofilme. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C com agitação orbital (75 rpm).

Após 24 horas de incubação, as amostras de cada grupo experimental foram removidas dos poços que continham biofilmes e analisadas por meio de métodos de análise bioquímica e microbiológica padrão. Esses métodos foram usados para determinar o peso seco do biofilme (biomassa) e a unidade formadora de colônias (UFC).

Os biofilmes aderidos às amostras foram dispersos em 2 mL de NaCl 0,89%. Um banho ultrassônico (42 kHz) foi usado em tubos de vidro por 10 minutos. Em seguida, os

biofilmes dispersos foram transferidos para novos tubos. Para garantir a transferência completa dos microrganismos dispersos, os tubos de vidro foram enxaguados com 3 mL de NaCl a 0,89%, que também foi adicionado aos biofilmes dispersos, resultando em um volume total de 5 mL da suspensão de biofilme.

A suspensão foi homogeneizada por 30 segundos a 7 W (modelo Q125 Sonicator, QSonica) e processada. Do volume de 5 mL, 0,1 mL foi usado para diluição em série e plaqueamento em ágar TSA, seguido de incubação por 24 h a 37°C para contagem de UFC. Para a determinação do peso seco, o volume restante (4,9 mL) foi centrifugado a 4000 rpm por 20 minutos (4 °C).

O sobrenadante foi descartado, e o pellet foi lavado duas vezes com 2 mL de água MilliQ® nas mesmas condições descritas (4000 rpm / 20 min / 4 °C). Após as lavagens, o pellet foi ressuspensionado em 1 mL de água, transferido para recipientes de papel-alumínio previamente pesados e seco a 100 °C por pelo menos 4 h. Após a secagem, os recipientes foram pesados novamente. O peso seco insolúvel foi calculado considerando a diferença de massa antes e depois da pesagem, multiplicado pelo volume da amostra e dividido pelo volume total.

Para as análises microbiológicas, foi realizada uma análise descritiva dos dados. Como o tamanho da amostra = 4, foi usado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn, e os dados e as imagens foram processados com o software GraphPad Prism 9. Todas as análises estatísticas foram realizadas em um nível de significância de $\alpha = 0,05$.

3.2.3 - Testes de adsorção

3.2.3.1 - Cinética de adsorção

Durante os testes de cinética de adsorção *in vitro*, imergiu-se 50 mg de filmes dos compósitos obtidos, previamente pesados, em uma solução de ciprofloxacina em água (10 mg/mL), e manteve-se o sistema sob agitação mecânica por 300 minutos. O sobrenadante foi analisado *in situ* utilizando um UV-Vis de sonda UV-Vis Agilent Cary 60, através do uso de uma sonda de 10 mm de caminho óptico, varrendo de 200 à 400 nm a cada 2 minutos. Após o tempo de contato, os filmes foram retirados da solução, secos e pesados.

As concentrações obtidas foram avaliadas, a fim de descobrir o tempo de saturação ou tempo ótimo (qt) através da Equação 5 descrita no trabalho de Gonzáles et al (GONZÁLEZ et al., 2017):

$$q_t = V \frac{(C_o - C_t)}{M} \quad (5)$$

Onde: Co é a concentração inicial do fármaco (mg/L), Ct é a concentração do fármaco no tempo t (mg/L), M é a massa do adsorvente (em g) e V é o volume de solução utilizada (em L).

Os testes cinéticos foram realizados no laboratório de química geral presente no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS – CNPEM), em Campinas – SP.

Para os testes de cinética de adsorção, modelos matemáticos serão utilizados a fim de elucidar os mecanismos envolvidos durante essa etapa. Desta forma, a equação de pseudo-primeira ordem, retirado do trabalho de Gonzáles *et al* (GONZÁLEZ et al., 2017), será empregada. A equação (Fórmula 6) é descrita como:

$$q_t = q_e \cdot [1 - \exp(-k \cdot t)] \quad (6)$$

Onde: qt e qe são as capacidades de adsorção no tempo ótimo (mg/g) e a capacidade máxima de adsorção no equilíbrio (mg/g), respectivamente. A taxa constante é representada por k (min⁻¹) e o t é o tempo (min) no ponto ótimo da cinética.

A equação de pseudo-segunda ordem, retirada do trabalho de Gonzáles *et al* (GONZÁLEZ et al., 2017), também será empregada. O modelo de segunda ordem é descrito como demonstrado na Fórmula 7:

$$q_t = \frac{k_2 \cdot q_e^2 \cdot t}{1 + k_2 \cdot q_e \cdot t} \quad (7)$$

Onde: q_e e q_t são as capacidades de adsorção no tempo ótimo (mg/g) e a capacidade máxima de adsorção no equilíbrio (mg/g), respectivamente. A taxa constante é representada por k_2 (g/(mg.min)) e o t é o tempo (min) no ponto ótimo da cinética.

3.2.3.2 - Equilíbrio de adsorção

Posteriormente, nos testes de equilíbrio de adsorção foi realizado por batelada no laboratório de Nanotecnologia (GNanoBio) na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP – USP), sob comando da Prof. Priscyla Marcato.

Para a realização desse teste, o tempo de contato entre os compósitos e as soluções do fármaco foram fixados com base no estudo cinético, tempo ótimo de 150 minutos. Desta forma, as concentrações do fármaco variaram de 10 a 100 mg/L, e 20 mg dos filmes dos compósitos, foram submersos nas soluções de 2 ml do fármaco e mantidos sob agitação durante o tempo pré-determinado.

Os sobrenadantes do fármaco foram analisados em UV-Vis a fim de descobrir a capacidade máxima de adsorção dos materiais (q_e), através da Fórmula 8 descrita no trabalho de González et al (2017):

$$q_e = \frac{(C_o - C_e)}{M}$$

(8)

Onde: C_o é a concentração inicial do fármaco (mg/L), C_e é a concentração final do fármaco (mg/L), M é a massa do adsorvente (em g) e V é o volume de solução utilizada (em L).

O equipamento utilizado neste teste foi o Lambda 365 UV-Vis da Perkin Elmer em comprimento de onda de 200 a 400 nm.

Já no equilíbrio de adsorção, serão utilizadas isotermas de adsorção de Langmuir e Freundlich. Segundo o trabalho de González *et al* (GONZÁLEZ et al., 2017), a isoterma de Langmuir prevê o comportamento homogêneo de sítios ativos em uma monocamada pela

superfície do adsorvente, ou seja, sítios ativos energeticamente equivalentes. Ainda segundo o autor, o modelo tem sido aplicado em sistemas de adsorção de compostos orgânicos. A equação (Fórmula 9) que descreve o processo será descrita abaixo.

$$q_e = \frac{q_L \cdot k_L \cdot C_e}{1 + k_L \cdot C_e} \quad (9)$$

Onde: q_L (mg/g) e k_L (dm³/mg) são constantes relacionadas à capacidade da monocamada do modelo de Langmuir.

Já as isotermas de Freundlich prevê sistemas de adsorção com sítios ativos energeticamente heterogêneos, desta forma o modelo propõe uma adsorção em multicamadas. A equação do modelo, retirada do trabalho de Gonzáles *et al* (GONZÁLEZ et al., 2017), é descrita a seguir pela Fórmula 10.

$$q_e = k_F \cdot C_e^{\frac{1}{m_F}} \quad (10)$$

Onde: k_F (dm³/g) e m_F (adimensional) são parâmetros do modelo de Freundlich relacionados à extensão da adsorção e eficiência, respectivamente.

3.2.4 - Testes de Liberação

Os estudos de liberação *in vitro* foram realizados de acordo com a Diretriz OECD 428 (OECD, 2004) e Farmacopeia Americana (PHARMACOPEIAL FORUM 2009). Para avaliação do perfil de liberação, foi utilizado Célula Vertical de Difusão de Franz (Phoenix – Hanson Research/Teledyne, EUA) com área de difusão de 1,77 cm².

O compartimento receptor (14 mL) foi composto por solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol/L (pH 7,4 ± 0,2), mantido a 32°C (temperatura controlada) e agitação constante (400 rpm) durante todo o período de análise. No compartimento doador foram colocados filmes dos materiais CB, CB/Lap 10%, CB/Lap 15% e CB/Lap 30%, contendo (0,006, 0,013, 0,012 e 0,011 mg de fármaco, respectivamente) em estudo (n = 6). Após 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 12

e 24 horas, a solução receptora foi coletada (450 µL) e a quantidade de ativo liberada foi analisada pelo método analítico validado em Uv-Vis.

Este ensaio foi realizado sob condição Sink levando em consideração a solubilidade do fármaco no pH de análise. A solubilidade foi calculada variando o pH de uma solução contendo 1000 mg/L de ciprofloxacina até atingir o pH de 7,4. A solução foi mantida por agitação durante 30 minutos, o sobrenadante foi separado centrifugação e a concentração analisada utilizando Uv-vis.

Para entender os mecanismos do processo de liberação de fármacos, serão utilizados os modelos matemáticos (Zero Ordem, Primeira-Order, Higuchi e Peppas-Korsmeyer), cada modelo está descrito a seguir.

O modelo Zero Ordem, descrito pela Equação 11, é utilizado para avaliar sistemas de liberação de ativos com concentração constante no meio receptor durante o tempo de análise.

$$C_t = C_0 + K_0.t \quad (11)$$

Onde C_t é a quantidade de fármaco liberado em determinado tempo, C_0 é a concentração inicial no tempo zero e K_0 é a constante de velocidade. Desta forma, utiliza-se gráficos de concentração acumulada do ativo em função do tempo, sendo a regressão linear (R^2) utilizada para verificar a adequação ao modelo, onde o coeficiente angular corresponde a K_0 (BRUSH, M. L. 2015; RAMTEKE *et al*, 2014)

Já o modelo de Primeira Ordem pode ser obtido pelo gráfico de logaritmo da liberação resultante do fármaco pelo tempo e calculado pela seguinte equação (Fórmula 12):

$$\log \log C = \log C_0 - \frac{K_1 t}{2,303} \quad (12)$$

Onde C representa a porcentagem de fármaco no tempo (t), C_0 é a concentração inicial do fármaco e K_1 é a constante de velocidade do modelo. O valor de K_1 pode ser obtido pela

linearização do modelo obtendo-se o coeficiente angular da reta, que corresponde a $K_1.2,303^{-1}$ e o coeficiente linear corresponde a C_0 . A adequação ao modelo pode ser avaliada pelo coeficiente da reta (R^2) do gráfico obtido (RAMTEKE *et al*, 2014)

Já o modelo de Higuchi, é utilizado para avaliar sistemas regidos por fenômenos de difusão e dissolução. Descrito pela equação a seguir (Fórmula 13), pode ser avaliado em gráficos de porcentagem acumulada de fármaco pela raiz quadrada do tempo (t).

$$Q = K_H \sqrt{t} \quad (13)$$

Onde Q é a quantidade acumulada do fármaco no tempo (t) e K_H é a constante de Higuchi obtido pelo coeficiente angular da reta. A adequação do modelo é avaliada pelo fator de correlação (R^2) e a adequação ao modelo indica um modelo controlado por difusão (BRUSH, M. L. 2015)

Descrito inicialmente no trabalho de Korsmeyer – Peppas (SIEPMANN; PEPPAS, 2001). O modelo foi selecionado pois já existem relatos na literatura de seu uso no estudo de liberação de fármacos utilizando CB (LUO *et al.*, 2017; SHI *et al.*, 2014). A equação (Fórmula 14) do modelo está descrita a seguir.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K. t^n$$

(14)

Onde K é uma constante relacionada às características estruturais e geométricas do dispositivo, e n é o expoente de liberação, indicativo do mecanismo de liberação.

O valor de n está relacionado aos mecanismos de transporte de dos fármacos, onde $n < 0,45$ indica difusão fickiana, $n > 0,89$ significa difusão e transporte de ordem zero, e $0,45 < n < 0,89$ sugere difusão não fickiana ou anômala (LUO *et al.*, 2017; SHI *et al.*, 2014).

Por fim, utilizou-se também o modelo Hixon-Crowell, descrito pela Fórmula 15, e propõe-se que a área regular de um grupo de partículas é proporcional a raiz cubica de seu

volume e, portanto, pode ser avaliado utilizando gráficos da raiz cubica da liberação acumulada pelo tempo.

$$\sqrt[3]{W_0} = \sqrt[3]{W_t} + k_{HC}t \quad (15)$$

Onde W_0 é a quantidade inicial de fármaco e W_t é o valor restante no sistema no tempo (t). A constante de K_{HC} pode ser obtida pelo coeficiente angular, e é utilizado para relacionar superfície e volume em sistema de liberação, em geral, utilizando comprimidos ou sistemas particulados de liberação (BRUSH, M. L. 2015)

4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

Ao todo foram obtidos 8 diferentes materiais no presente trabalho, sendo eles CB, CB/Lap 1%, CB/Lap 3%, CB/Lap 5%, CB/Lap 10%, CB/Lap 15%, CB/Lap 30% e CB/Lap 50%, com espessura média de 0,035 mm. Todos os materiais obtidos são auto-suportados, possuem o aspecto semi-translucido, são flexíveis e são semelhantes a folhas de papel e estão representados na Figura 4.

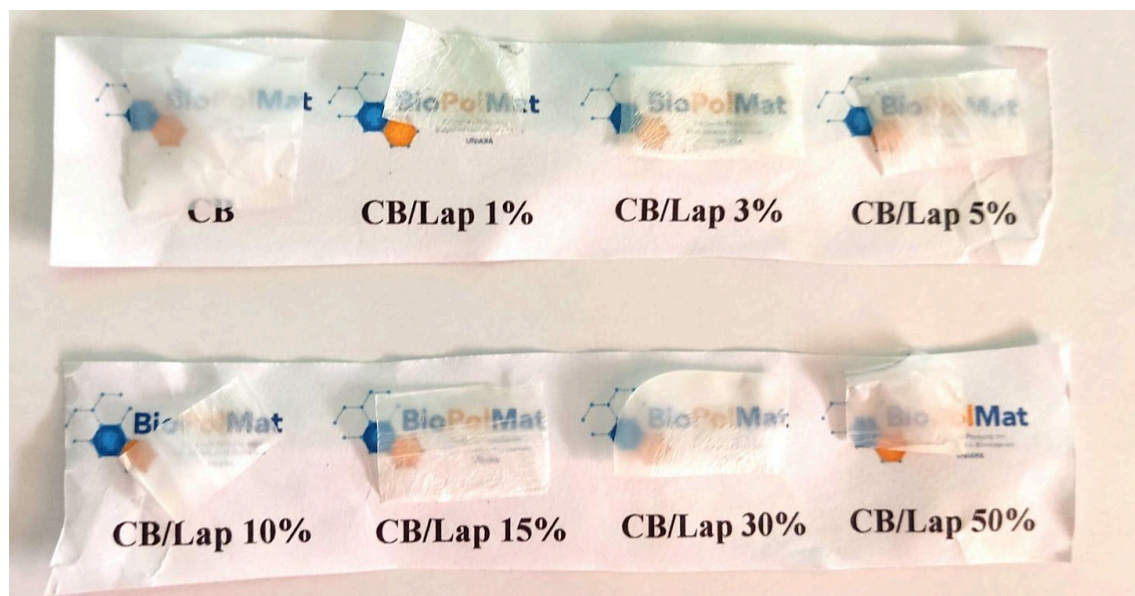


Figura 4: Filmes de CB e compósitos CB/Lap 1-50%.

4.1– Caracterizações

A Figura 5 demonstra as imagens de MEV da superfície e corte transversal dos materiais CB, CB/Lap 1-5%

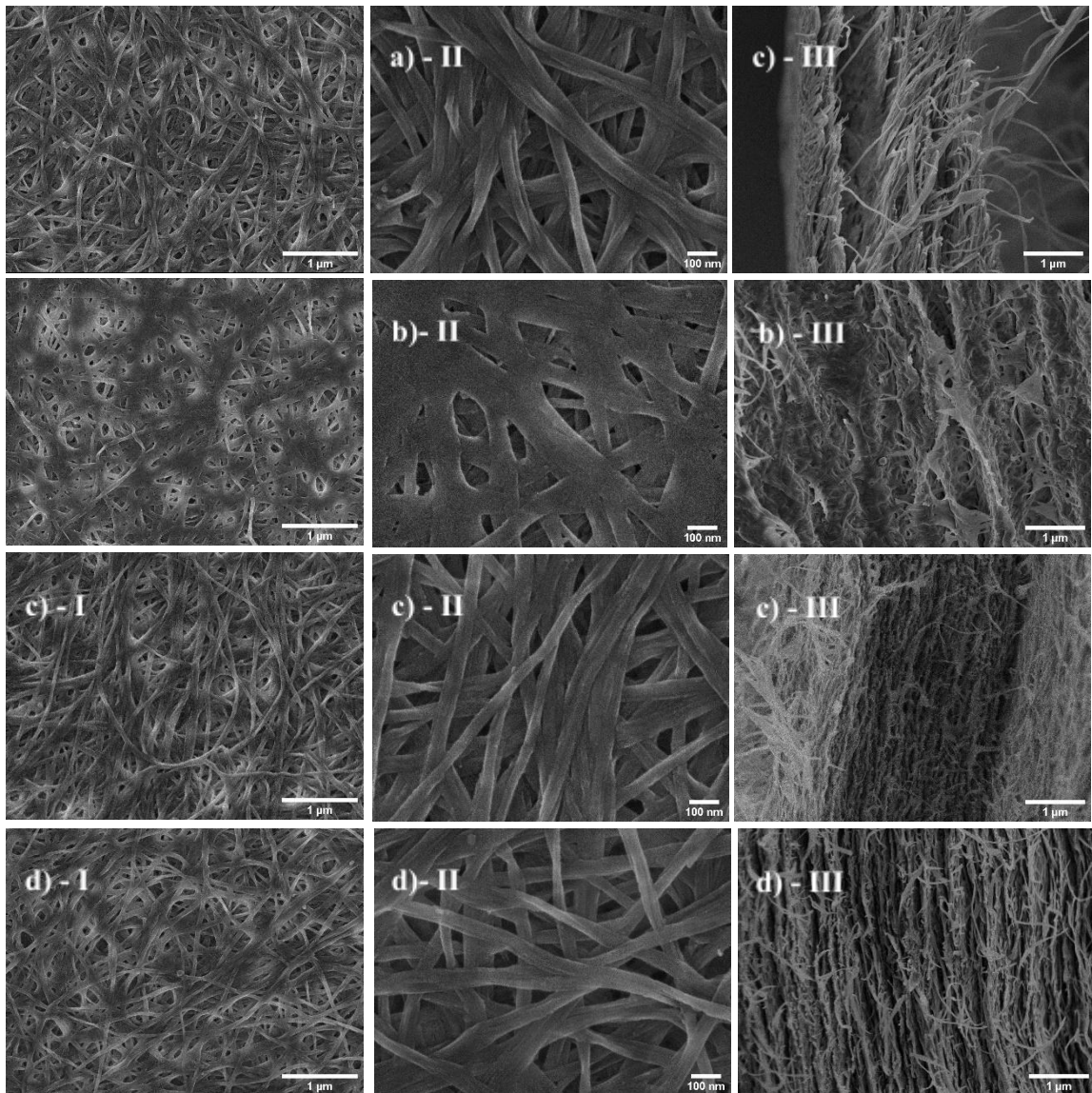


Figura 5: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da superfície, com aproximação de 25.000 vezes (nomeado como I), 100.000 vezes (nomeado como II) e corte transversal com aproximação de 20.000 vezes (nomeado como III), dos materiais CB (a), CB/Lap 1% (b), CB/Lap 3% (c) e CB/Lap 5% (d).

Observando as imagens de MEV dos materiais, nota-se que todos os filmes apresentam estruturas fibrosa em forma de rede nanométrica (com tamanhos aproximados de $59 \text{ nm} \pm 14$, $62 \text{ nm} \pm 19$, $54 \text{ nm} \pm 17$ e $60 \text{ nm} \pm 15$ para CB, CB/Lap 1%, CB/Lap 3% e CB/Lap 5%, respectivamente) com poros na superfície dos materiais. Além disso, apesar dos nanocompósitos CB/Lap 1-5% apresentarem a argila laponita em sua composição, não foi possível observar nenhum tipo de agregado, rugosidade ou textura em suas fibras, vide as figuras b)-II, c)-II e d)-II que apresentam aspectos muito semelhante às fibras de CB isolada (a – II). Indicando assim que, na ordem analisada, não houve mudança estrutural na rede de fibras do polímero. Ainda assim, é possível que a argila possa ter recoberto as fibras de celulose de forma homogênea o que não ocasionaria na formação de agregados.

Outra observação interessante é sobre as imagens relacionadas ao corte transversal a)-III, b)-III, c)-III e d)-III, dos materiais CB, CB/Lap 1-5%, respectivamente. É possível notar estruturas em forma de camadas, tanto na CB quanto nos compósitos. Tal formação demonstra a deposição da celulose em camadas pelas bactérias durante o processo de obtenção do biopolímero e evidencia a presença de uma estrutura de redes tridimensionalmente dispersas, o que pela porosidade observada pode ocasionar em canais pelo material.

Perotti *et al* (PEROTTI et al., 2011) obteve nanocompósitos a base de CB/laponita, semelhantes aos obtidos no presente trabalho, e observou que no material contendo 5% de argila não houve a formação de agregados e segundo os autores, é possível que a argila tenha recoberto a superfície das fibras de celulose. Contudo, nas imagens do corte transversal observou-se uma mesma estrutura em camadas, semelhante à CB, indicando que a argila não promoveu a agregação das fibras nesse sentido.

Conforme elucidado na introdução, vale ressaltar que a laponita é uma argila de fácil dispersão, esfoliação e possui diâmetro aproximado de 25-30 nm (LEZHNINA, M. M.; KYNAST, 2010; PEROTTI et al., 2011), desta forma pode facilmente penetrar pelos poros da CB e recobrir as fibras do polímero como proposto por Perotti *et al* (PEROTTI et al., 2011).

Já no trabalho de Abdullah *et al* (SYED ABDULLAH et al., 2022), que promoveu a absorção *in situ* de partículas do fármaco Ciprofloxacina em CB, os autores também observaram uma rede de fibras em escala nanométrica na superfície do polímero isolado. Já nos compósitos CB-Ciprofloxacina não-purificado, foi possível notar a presença de poucos agregados do fármaco, indicando um limite de penetração das partículas do ativo em meio às

fibras. Além disso, nota-se a presença de estruturas alongadas referentes às bactérias *Acetobacter Xylinus*. Nos compósitos CB-Ciprofloxacina purificados também se observou poucas partículas do fármaco agregados às fibras de CB. Os autores justificam a baixa presença de partículas dos fármacos pela diferença de tamanho dos poros da CB (20 μm) e as partículas do fármaco (50 μm), o que ocasionam em um impedimento físico durante a incorporação, mesmo *in situ*.

No trabalho de Meneguín *et al* (MENEGUÍN *et al.*, 2021), os autores obtiveram compósitos a base de CB e Paligorsquita (PLG) para liberação do fármaco Metronidazol, e verificaram fibras de CB variando entre 30 e 73 nm, semelhante ao observado neste trabalho. Já nos compósitos CB/PLG observou-se uma rede superficial mais densa com fibras e estruturas alongadas (tamanhos entre 20 e 90 nm) referentes a PLG. Apesar da presença da argila, ainda é possível distinguir as fibras de celulose nos compósitos, sendo um indício que a argila não promoveu a agregação das fibras.

Agora, para analisar os compósitos contendo maior quantidade de laponita em sua composição, a Figura 6 demonstra as imagens de MEV dos compósitos CB/Lap 10%, CB/Lap 15%, CB/Lap 30% e CB/Lap 50%.

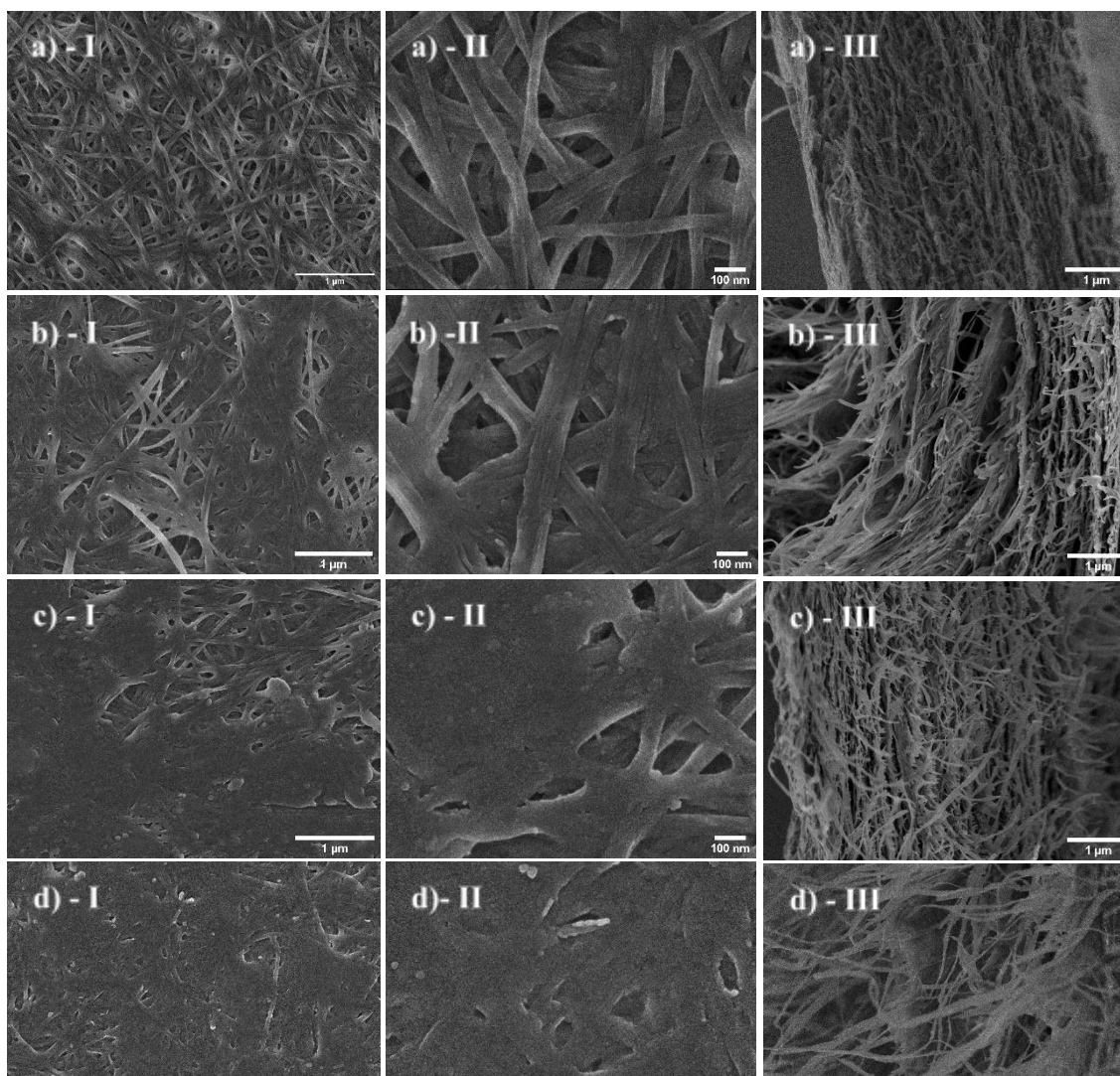


Figura 6: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da superfície, com aproximação de 25.000 vezes (nomeado como I), 100.000 vezes (nomeado como II) e corte transversal com aproximação de 20.000 vezes (nomeado como III), dos materiais CB/Lap 10% (a), CB/Lap 15% (b), CB/Lap 30% (c) e CB/Lap 50% (d).

Avaliando as imagens, apesar dos compósitos ainda apresentarem uma estrutura de fibras em redes nanométricas, semelhantes à CB, fica nítido que a presença da laponita acima de 10% ocasionou na formação de agregados na superfície das fibras (Figura 6 em b) – I e II, c) – I e II e d) – I e II, para CB/Lap 15-50%, respectivamente), onde nota-se fibras de celulose com grânulos aderidos na superfície, diferente do observado na CB (Figura 5 a) I e II). Além disso, é possível perceber uma certa junção das fibras e fechamento de poros, em especial nos compósitos CB/Lap 30 e 50%, nos quais vale ressaltar que em determinadas regiões não fica evidente as fibras de CB, indicando uma drástica mudança estrutural nos compósitos. Já nos cortes transversais ainda se observa que a estrutura em forma de camada se mantém, semelhante a CB, indicando assim que a estrutura tridimensional foi preservada.

Ainda analisando as fibras da superfície, foi possível notar um aumento no diâmetro médio das fibras nos nanocompósitos (63 nm \pm 15, 72 nm \pm 24, 80 nm \pm 23 e 85 nm \pm 27, para CB/Lap 10, CB/Lap 15%, CB/Lap 30% e CB/Lap 50%, respectivamente) em comparação com a CB. Contudo, considerando o desvio-padrão, não ocorreu um aumento significativo.

Comparando novamente com o trabalho de Perotti *et al* (PEROTTI *et al.*, 2011), nas imagens de MEV na superfície dos compósitos contendo 15% de laponita, os autores observaram uma mudança drástica na estrutura dos filmes, onde a argila promoveu a interação entre as fibras do polímero, ocasionando no fechamento de poros superficiais. Além disso, nos compósitos contendo 40% de argila, não foi possível distinguir as fibras na superfície da CB, evidenciando mais uma vez assim a interação a carga inorgânica e a celulose.

Ainda na análise morfológica dos materiais obtidos, os nanocompósitos foram investigados por difração de raios-x (DRX) e os difratogramas obtidos estão demonstrados na Figura 7.

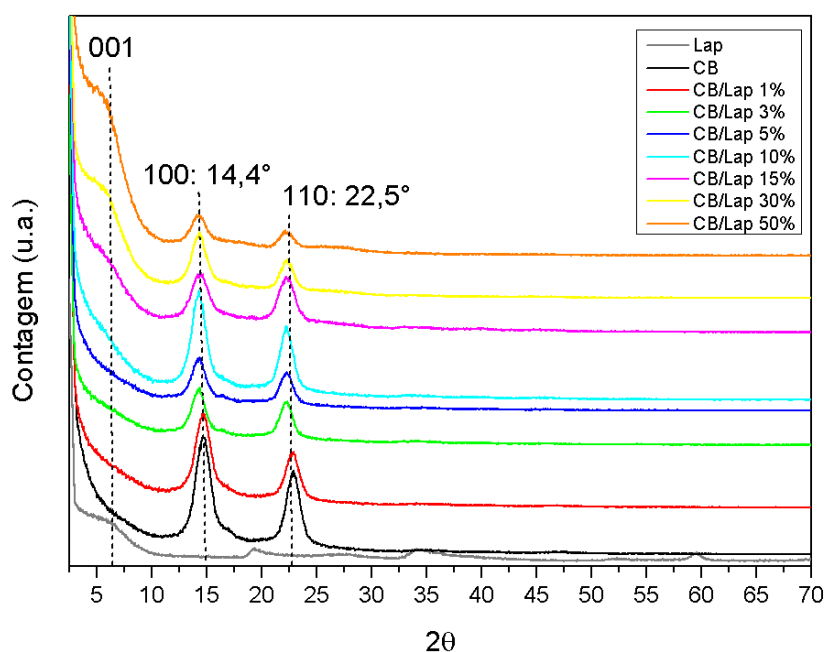


Figura 7: Difratogramas de Raios-X dos materiais Lap (Cinza), CB (Preto), CB/Lap 1% (Vermelho), CB/Lap 3% (Verde), CB/Lap 5%, (Azul) CB/Lap 10% (Ciano), CB/Lap 15% (Magenta), CB/Lap 30% (Amarelo) e CB/Lap 50% (Laranja).

Nos difratogramas obtidos, em todos os materiais contendo CB, é possível verificar dois picos aparentes em 2θ , sendo o primeiro em $14,4^\circ$ e o segundo em $22,5^\circ$, que correspondem aos planos 100 e 110, respectivamente, comumente encontrado na celulose do tipo I, sendo o segundo pico característico da região cristalina da celulose (BORBA et al., 2022; FRENCH, 2014, 2020). Além disso, tais picos são referenciados na literatura como sendo característicos da distância interplanar entre as fases 1_α e 1_β da celulose (BARUD, Hernane S. et al., 2008, 2011; BORBA et al., 2022; POURJAVAHER et al., 2017; SUKHTEZARI et al., 2017).

Através da intensidade do pico da região cristalina (110) e do vale amorfo (por volta de 18°) (BORBA et al., 2022; SEGAL et al., 1959), utilizando a fórmula de Segal *et al* (SEGAL et al., 1959) disponível na Eq. 1, foi possível calcular a cristalinidade relativa dos materiais (Crl). Os valores encontrados estão disponíveis na Tabela 1.

Tabela 1: Cristalinidade relativa (Crl) dos materiais CB e CB/Lap 1-50%, CB/Lap 15 and 30% e espaço interlamelar da laponita nos compósitos obtidos

A celulose bacteriana deste trabalho apresentou um valor de 81,7% de cristalinidade

Amostras	Crl (%)	Espaço interlamelar (Å)
Lap	-	14,5
CB	81,7	-
CB/Lap 1%	76,4	-
CB/Lap 3%	75,8	-
CB/Lap 5%	74,1	-
CB/Lap 10%	81,1	-
CB/Lap 15%	73,2	14,5
CB/Lap 30%	68,4	14,5
CB/Lap 50%	36,3	15,5

relativa. Em comparação com trabalhos presentes na literatura, Meneguín *et al* (MENEGUÍN et al., 2021) obteve filmes de CB com 70,6% de Crl. Já no trabalho de Abdullah *et al* (SYED ABDULLAH et al., 2022), a CB apresentou um valor de cristalinidade relativa de 74,76%. Zhou *et al* (ZHOU et al., 2022) verificou um valor de 74,4% de Crl para a CB. Por fim no trabalho de Sukhtezari *et al* (SUKHTEZARI et al., 2017) a CB apresentou Crl de 74,3%. Isso indica que o polímero utilizado no presente trabalho está na ordem e até com cristalinidade relativa superior aos trabalhos comparados.

Agora, avaliando a cristalinidade relativa dos os compósitos obtidos, é possível notar a diminuição da Crl com o aumento do teor de argila na amostra, passando de 81,7% na CB para 36,3% na CB/Lap 50%. Esse mesmo efeito foi observado por Abdullah *et al* (SYED ABDULLAH et al., 2022) na obtenção de compósitos *in situ* contendo CB e partículas de Ciprofloxacina, onde os compósitos obtidos com CB-Ciprofloxacina purificada e não purificada obtiveram valores de 40,6% e 49,3%, menores que a CB isolada (70,6%). Segundo os autores, essa diminuição ocorreu pela interação entre as partículas de ciprofloxacina e CB

durante o processo de obtenção do compósito, o que ocasionou no decréscimo da cristalinidade.

Outro trabalho com observações semelhantes é o publicado por Sukhtezari *et al* (SUKHTEZARI *et al.*, 2017), no qual verificou-se a diminuição da cristalinidade relativa da CB de 74,3% para 63,76%, após a incorporação do extrato de *Scrophularia striata Boiss.* O aumento da região amorfa, de acordo com os autores, ocorreu devido a quebra de ligações de hidrogênio intra- e intermoleculares pela incorporação do extrato.

No trabalho de Yuan *et al* (YUAN *et al.*, 2014), que obteve filmes de celulose vegetal com laponita, observou uma diminuição da intensidade do pico 200 (referente à região cristalina na celulose tipo II) quando incorporou laponita na amostra.

Contudo, na contramão do observado, Meneguín e colaboradores (MENEGUÍN *et al.*, 2021) verificaram um aumento na CrI dos compósitos CB e PLG com o aumento do teor da argila fibrosa na amostra, passando de 70,6% da CB para 84,7% no compósito contendo 15% de argila na composição. Relacionando com os resultados de MEV discutidos anteriormente utilizando esse mesmo trabalho, a presença da argila não causou a formação de agregados das fibras de celulose. Uma hipótese pode explicar tal interação é que muito provavelmente, apesar da interação entre a celulose e o PLG, não houve a junção das fibras de CB pelo tamanho do cristalito de PLG (forma alongada e diâmetro por volta de 90 nm), desta forma, a incorporação da argila fibrosa ocasionou em uma estrutura mais densa e a interação com a CB ocasionou em uma rede mais organizada aumentando a cristalinidade do material, isso explicaria o observado e discutido no MEV.

Sendo assim, é muito provável que as lamelas da laponita, que apresenta pequeno tamanho de cristalito (aproximadamente 30 nm) e elevada capacidade de dispersão (LEZHNINA, M. M.; KYNAST, 2010), interagiram com a superfície das fibras de CB e ocasionaram no rompimento de interações responsáveis pela organização do material, diminuindo assim a cristalinidade relativa. O efeito de agregação observado no MEV pode ser resultado do excesso de laponita na amostra, formando um filme na superfície dos materiais, ocluindo os poros e resultando nas imagens de microscopias analisadas.

Ainda na análise de DRX, os resultados obtidos também demonstram dados importantes sobre a laponita e sobre os compósitos obtidos.

O difratograma da laponita apresenta picos no eixo 2θ em torno de 6° , 20° , 27° e 35° , que correspondem aos planos (001), (100), (005) e (200) da argila, respectivamente (DANIEL; FROST; ZHU, 2008; PEROTTI et al., 2011; SILVA, et al., 2018). O pico 001 refere-se ao plano de empilhamento das lamelas da laponita e pode ser utilizado para calcular o espaço interlamelar da argila utilizando a fórmula de Braag (Equação 2). Tal pico também está presente de forma sutil no material CB/Lap 15% e mais evidente em CB/Lap 30% e CB/Lap 50%. Os valores encontrados estão disponíveis na Tabela 2.

Nota-se que a laponita e os nanocompósitos CB/Lap 30% e 50% apresentam o pico em 001, demonstrando assim a presença da estrutura de empilhamento das lamelas nos materiais. Desta forma, os valores dos espaços interlamelares foram calculados e se encontram na Tabela 1.

A laponita utilizada no presente trabalho possui um espaço basal de aproximadamente $14,5 \text{ \AA}$, já para os nanocompósitos encontrou-se os valores de $14,5 \text{ \AA}$, $14,5 \text{ \AA}$ e $15,5 \text{ \AA}$, dos filmes CB/Lap 15, 30 e 50%, respectivamente. Silva *et al* (SILVA, et al., 2018), que obteve híbridos luminescente de laponita intercalada com complexos de Eu^{3+} , verificou um tamanho de $14,4 \text{ \AA}$ no espaço interlamelar da laponita RD.

Conforme apresentado anteriormente, segundo Paiva, Morales e Guimarães (PAIVA; MORALES; GUIMARÃES, 2006), os compósitos polímero-argila podem apresentar três tipos diferentes de estruturas a depender da interação entre as lamelas das argilas e as fibras do polímero (vide figura 2).

Avaliando os nanocompósitos obtidos, verifica-se a ausência do pico 001 nos materiais CB/Lap 1-10%, sendo esse um indicio da obtenção de nanocompósitos de estrutura exfoliada. Além disso, relacionando com os resultados de MEV (Figura 5 e 6), os materiais não apresentaram agregados de argilas e nenhum tipo de obstrução de poros, indicando assim uma dispersão mais homogênea da argila pelo material, compatível com a estrutura exfoliada (LEBARON; WANG; PINNAVAIA, 1999; PAIVA; MORALES; GUIMARÃES, 2006).

Já nos compósitos CB/Lap 15-50%, foi possível notar o pico 001, indicando assim o empilhamento das lamelas da laponita nas amostras. Contudo, avaliando as distâncias do espaço basal nesses compósitos, verifica-se valores muito próximos ao da argila, indicando assim que não houve a intercalação/penetração das fibras nesse espaço. Portanto, tal resultado indica a obtenção de compósitos de fase separada, "microcompósitos" ou compósito

convencional (LEBARON; WANG; PINNAVAIA, 1999; PAIVA; MORALES; GUIMARÃES, 2006). Os resultados também são compatíveis com as imagens de microscopias obtidas (Figura 6), onde é possível verificar aglomerados de argilas e o recobrimento das fibras da CB.

Compósitos de fase exfoliada (ou nanocompósitos), como a CB/Lap 1-10%, em geral tendem a apresentar melhores propriedades de barreira, mecânicas e térmicas comparado aos compósitos de fase separada (microcompósitos) pela larga interação interfacial entre o material lamelar e o polímero (LEBARON; WANG; PINNAVAIA, 1999; PAIVA; MORALES; GUIMARÃES, 2006).

Ainda no rol das análises estruturais, as Figuras 8 e 9 representam a estrutura química do monômero da celulose com os respectivos carbonos numerados e os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{13}C dos materiais CB, CB/Lap 15,30 e 50%, respectivamente.

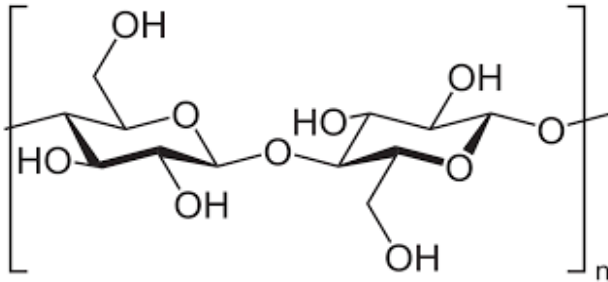


Figura 8: Estrutura química do monômero da cadeia de celulose

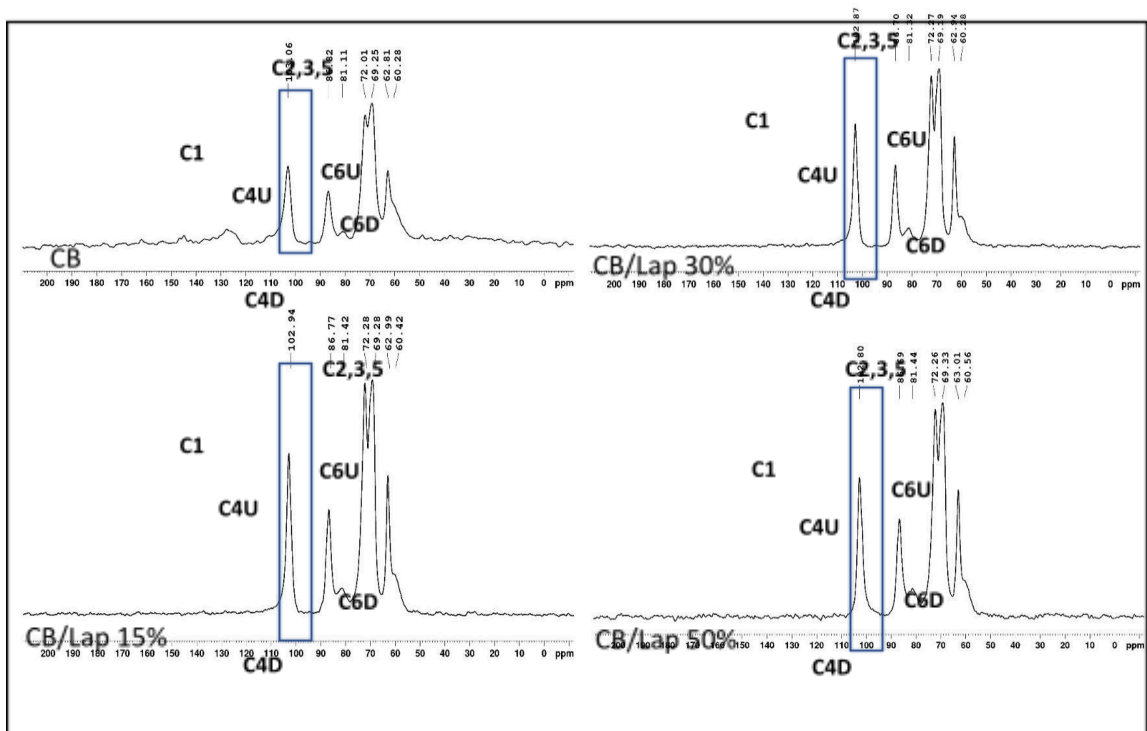


Figura 9: Espectros de RMN – ^{13}C dos filmes CB, CB-Lap 15, 30 e 50%.

Observando os espectros da Figura 9, é possível verificar linhas de ressonância por volta de 103,1, 86,7 e 81,4, 72,2 e 69,2, 63,0 e 60,5 ppm, que, relacionando com a Figura 8 podem ser atribuídas aos carbonos C1, C4, C2,3,5, e C6, respectivamente (MASUDA et al., 2003; MEZA-CONTRERAS et al., 2018; MUÑOZ-GARCÍA et al., 2019). De acordo com o trabalho de Muñoz-Garcia *et al* (MUÑOZ-GARCÍA et al., 2019), as regiões podem ser interpretadas pela contribuição dos carbonos na superfície (*s*) e interior (*i*) dos filmes, sendo atribuído à superfície os sinais em 81,4 e 60,5 ppm, referentes a *s*C4 e *s*C6, respectivamente.

Contudo, uma outra interpretação desses sinais é discutida no trabalho de Massuda *et al* (MASUDA et al., 2003), que avaliou fibras de CB dispersas em filmes de PVA e dividiu as em baixo campo (C4D e C6D, em 81,4 e 60,5 ppm) e regiões de alto campo (C4U e C6U, em 86,7 e 63,0 ppm) os quais correspondem à regiões cristalinas das formas *I α* e *I β* da celulose.

Se tratando de deslocamento químico, comparando com as regiões observadas na CB isolada, nota-se que não houve uma mudança significativa na posição dos sinais, indicando que a incorporação da argila possivelmente não modificou a estrutura química da celulose.

A Figura 10 demonstra os resultados de FTIR das amostras obtidas.

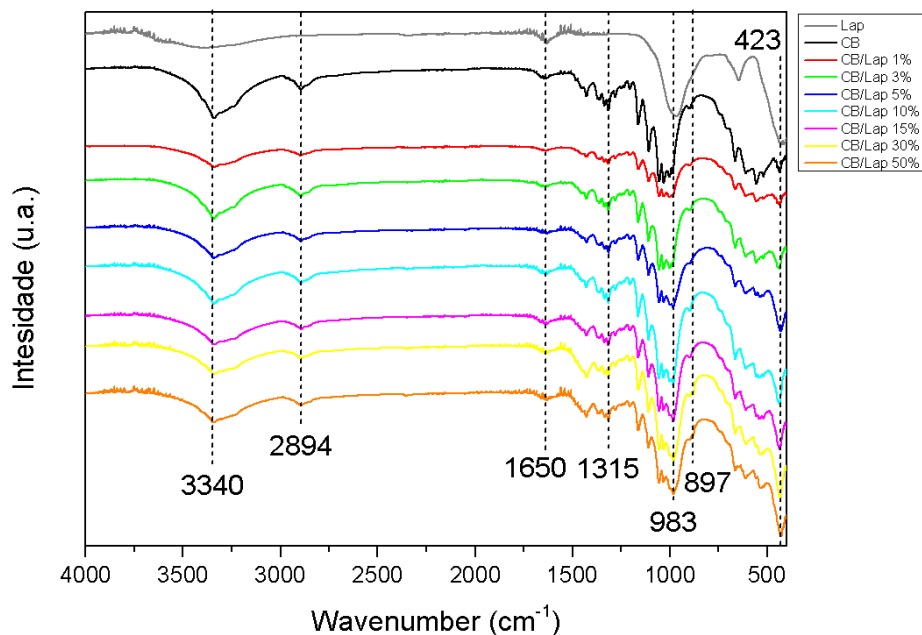


Figura 10: Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier da Lap (Cinza), CB (Preto), CB/Lap 1% (Vermelho), CB/Lap 3% (Verde), CB/Lap 5% (Azul), CB/Lap 10% (Ciano), CB/Lap 15% (Magenta), CB/Lap 30% (Amarelo) e CB/Lap 50% (Laranja).

Observando os espectros de infravermelho das amostras contendo CB, os materiais apresentam bandas entre 3700-3000 cm^{-1} , com máximo em 3340 cm^{-1} e bandas em 1650 cm^{-1} , que correspondem às vibrações de estiramento do grupo -OH e vibrações angulares do grupo H-O-H. Além disso, verifica-se bandas em 2894 cm^{-1} e 1315 cm^{-1} , que correspondem às vibrações de estiramento e angular do grupo -CH₂ presente na estrutura da celulose e em 983 e 897 cm^{-1} , características de vibrações dos grupos C-O-C do anel de piranose e C-O-C da ligação (1→4) β-glicosídica entre os anéis dos monômeros, as quais indicam que a estrutura da polimérica da celulose se manteve coesa durante o processo de obtenção dos filmes (MORAES et al., 2016; SILVA, Jhonatan Miguel, 2013; SYED ABDULLAH et al., 2022; YUAN et al., 2014; ZHOU et al., 2022).

Já a laponita apresenta bandas em 3300 cm^{-1} e 1640 cm^{-1} , referentes aos grupos -OH e H-O-H. Interessante ressaltar que, segundo trabalho de Selin *et al* (SELIM et al., 2019), cujo qual obteve membranas a base de PVA/GA/laponita, as bandas relacionadas aos grupos Mg-OH e Si-OH também aparecem nessa região. Já no trabalho de Daniel, Frost e Zhu (DANIEL; FROST; ZHU, 2008), no qual realizaram modificações superficiais na laponita por

funcionalização de silano, após tratamentos térmicos para remoção de umidade, observou-se bandas em 3655 cm^{-1} e 3730 cm^{-1} , correspondentes às vibrações dos grupos Mg-OH e Si-OH, respectivamente. Tais bandas podem ter sido suprimidas nos espectros obtidos pela presença de umidade nas amostras.

Já a banda em 423 cm^{-1} , refere-se a e deformação angular dos grupos Mg-O (GUIMARÃES; CIMINELLI; VASCONCELOS, 2007; SILVA, 2013) que está presente na laponita e fica mais evidente nos compósitos conforme ocorre o aumento do teor de argila nas amostras, indicando assim a presença da argila nos compósitos obtidos.

Com o objetivo de avaliar a estabilidade térmica e as perdas de massa dos materiais obtidos em relação a temperatura foram realizados testes de termogravimetria (TGA) e cálculo da derivada desses resultados. Desta forma, as Figuras 11 e 12 demonstram as análises de TGA e a derivada (DTG), respectivamente.

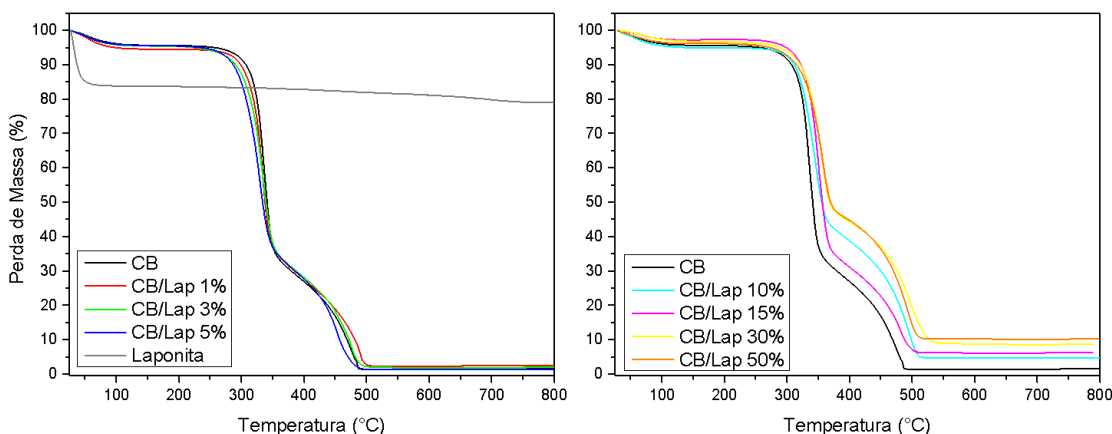


Figura 11: Gráficos de análise termogravimétrica (TG) dos materiais CB (Preto), Laponita (Cinza), CB/Lap 1% (Vermelho), CB/Lap 3% (Verde), CB/Lap 5% (Azul), CB/Lap 10% (Ciano), CB/Lap 15% (Magenta), CB/Lap 30% (Amarelo) e CB/Lap 50% (Laranja).

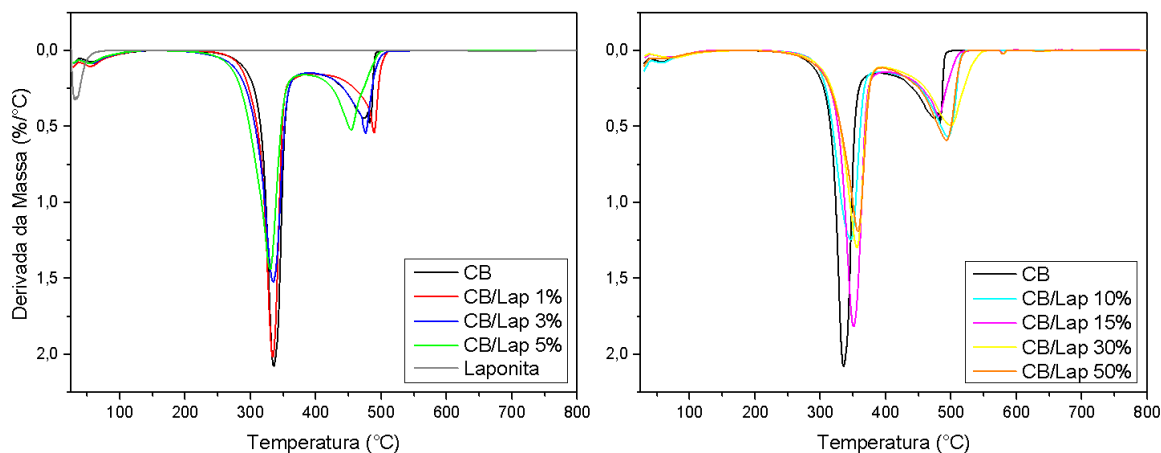


Figura 12: Gráficos da derivada da análise termogravimétrica (TG) dos materiais CB (Preto), Laponita (Cinza), CB/Lap 1% (Vermelho), CB/Lap 3% (Verde), CB/Lap 5% (Azul), CB/Lap 10% (Ciano), CB/Lap 15% (Magenta), CB/Lap 30% (Amarelo) e CB/Lap 50% (Laranja).

Analisando os resultados obtidos, é possível notar que todos os materiais contendo celulose (CB e os compósitos CB/Lap 1-50%), apresentaram 3 etapas de perda de massa. A primeira fase ocorreu entre 30-136°C e é referente a perda de água adsorvida, em geral, devido a umidade presente nos materiais (BORBA et al., 2022; MENEGUIN et al., 2021; PEROTTI et al., 2011; ZHOU et al., 2022). A laponita também apresenta etapa de perda de massa nessa região, também atribuída a saída de água adsorvida na amostra (DANIEL; FROST; ZHU, 2008; GUIMARÃES; CIMINELLI; VASCONCELOS, 2007). Os valores de perda em porcentagem encontram-se disponíveis na Tabela 2.

Tabela 2: Etapas de perdas de massa dos materiais CB e dos compósitos CB/Lap X% (X = 1, 3, 5, 7, 10, 15, 30 e 50%).

Sample	30-136 °C (%)	207-378°C (%)	207-394°C (%)	378-540°C (%)	394-540°C (%)	136-780°C (%)
Lap	16,2	-	-	-	-	4,8
CB	4,3	65,1	-	28,6	-	-
CB/Lap 1%	5,2	63,4	-	28,7	-	-
CB/Lap 3%	4,4	63,9	-	29,5	-	-
CB/Lap 5%	4,1	64,2	-	29,8	-	-
CB/Lap 10%	4,7	-	53,2	-	36,8	-

CB/Lap 15%	2,8	-	64,9	-	25,7	-
CB/Lap 30%	3,2	-	51,4	-	35,9	-
CB/Lap 50%	3,8	-	50,4	-	35,0	-

A segunda etapa de perda é comum a todos dos filmes, contudo, ocorreram em regiões térmicas diferentes a depender da amostra analisada. A CB e os compósitos CB/Lap 1-5%, apresentaram perda de massa entre 207-378°C com o máximo de perda em 337°C, 333°C, 334°C e 330°C, respectivamente. Já os filmes CB/Lap 10-50% ocorreram entre 207-394°C, com máximo de perda em 346°C, 352°C, 356°C e 357°C, respectivamente. Segundo trabalhos na literatura, tal região corresponde a degradação das cadeias da celulose (despolimerização) e formação de carvão residual (MENEGUIN et al., 2021; PEROTTI et al., 2011; ZHOU et al., 2022). Comparando com resultados na literatura, a degradação de CB no presente trabalho ocorreu em temperatura semelhante. No trabalho de Barud *et al* a CB degradou-se na temperatura máxima de 330°C. Já no trabalho de Perotti (PEROTTI et al., 2011) a CB degradou-se em 320°C.

Por ser um evento de perda de massa relacionado à despolimerização e degradação da celulose, o aumento na temperatura de degradação nesta etapa, em relação ao polímero isolado, marca melhoria na estabilidade térmica nos materiais. Sendo assim, é possível notar que os compósitos contendo abaixo de 10% de argila não demonstraram aumento na estabilidade térmica em relação à CB, inclusive apresentam valores de degradação em menores temperaturas, ainda que sutis. Contudo, os filmes CB/Lap 10%, CB/Lap 15%, CB/Lap 30% e CB/Lap 50% apresentaram um aumento de 9, 15, 19 e 20°C, respectivamente.

A presença da argila nas amostras pode agir como barreira de proteção contra da degradação térmica das cadeias de carbono, uma vez que, podem dificultar a chegada de oxigênio na amostra, retardando assim a condensação de grupos hidroxila e consequentemente a despolimerização (PEROTTI et al., 2011; SHEN; CHEN, 2007). Além disso, o recobrimento das fibras com cargas inorgânicas pode dificultar também o aumento da temperatura nas fibras, servindo como barreira de proteção térmica, melhorando assim a estabilidade.

Portanto, é de se esperar que os compósitos contendo maiores valores de argila e que promoveram um efeito de recobrimento das fibras, como observado e discutido anteriormente nos resultados de MEV, deslocasse a degradação térmica para maiores valores de temperatura, aumentando a estabilidade dos materiais (como é o caso dos compósitos CB/Lap 10-50%).

Por fim, a terceira etapa de perda de massa corresponde a oxidação do carvão residual gerado na segunda etapa e mais uma vez ocorre em diferentes regiões de temperatura a depender da amostra (SILVA, Jhonatan Miguel, 2013; ZHOU et al., 2022). Nos filmes CB e CB/Lap 1-5% essa etapa ocorre entre 378 – 540°C. Já nos materiais CB/Lap 10-50%, ocorre entre 394-540°C. Nesse evento, em todos os materiais contendo celulose, foi possível observar um deslocamento para maiores valores de temperatura com o aumento do teor da laponita na amostra. Tal efeito segue a mesma lógica de impedimento de acesso do oxigênio no carvão a ser oxidado.

A laponita possui um evento de perda de massa por volta de 730°C, caracterizado pela desidroxilação das lamelas da argila, e formação de óxidos (DANIEL; FROST; ZHU, 2008; GUIMARÃES; CIMINELLI; VASCONCELOS, 2007).

Tendo em vista que o experimento foi realizado em atmosfera oxidante (Ar sintético) e que toda matéria orgânica foi eliminada durante o processo. Utilizando os valores dos resíduos obtido no final do experimento e considerando as etapas de perda de massa da argila é possível definir qual a porcentagem real de argila nos compósitos.

Sendo assim, os valores reais de argila nas amostras são de 1,8%, 2,3%, 3,0%, 5,7%, 7,7%, 10,5% e 12,7%, para os materiais CB/Lap 1, 3, 5, 10, 15, 30 e 50%, respectivamente.

Outra informação importante a se considerar é o efeito de barreira da passagem do vapor de água causado pelo recobrimento das fibras de celulose com as lamelas da laponita. Sendo assim, para avaliar tal efeito a Figura 13 demonstra os resultados da permeabilidade ao vapor de água nos filmes obtidos.

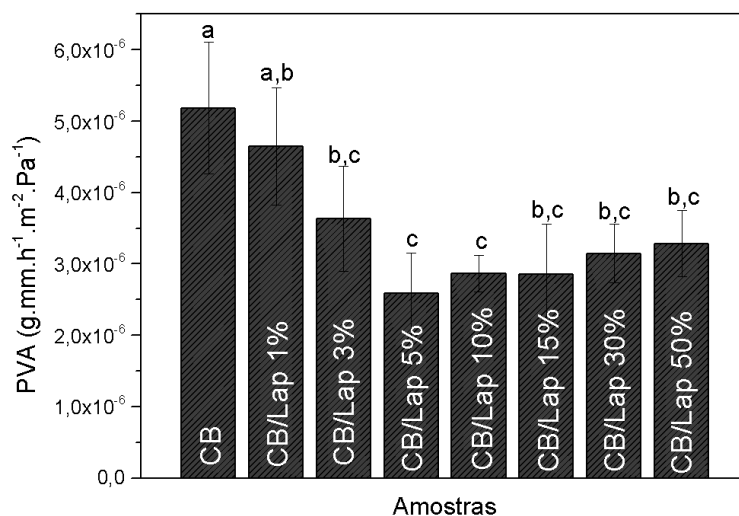


Figura 13: Permeabilidade ao Vapor de Água (PVA) dos filmes CB, CB/Lap 1, 3, 5, 10, 15, 30 e 50%. “a,b,c” significância com $p < 0.0339$ (ANOVA).

Ao analisar os dados obtidos, fica nítido que os materiais CB/Lap 3, 5, 10, 15, 30 e 50% apresentaram menores valores de permeabilidade comparado à CB ($5,18 \times 10^{-6}$ g.mm/h.m². Pa), de forma significativa. Isso significa que a laponita, mesmo em menores concentrações como 3 e 5% foram capazes de reduzir a passagem do vapor de água pela amostra, inclusive, os compósitos CB/Lap 5 e 10% obtiveram os menores valores de PVA dentre todas as amostras ($2,58 \times 10^{-6}$ e $2,86 \times 10^{-6}$ g.mm/h.m². Pa, respectivamente).

No trabalho de Meneguín *et al* (MENEGUÍN et al., 2021), a CB apresentou um valor de PVA de aproximadamente 5×10^{-6} g.mm/h.m². Pa, compatível com o observado no presente trabalho. Os autores observaram ainda um efeito na diminuição da permeabilidade nos compósitos, justificada pela estrutura densa observada nos testes de microscopia, que dificulta a passagem das moléculas de água pela amostra.

A diminuição da permeabilidade ao vapor de água nos compósitos ocorre pela ação das lamelas da argila como barreira física ao gerar um caminho tortuoso na passagem do vapor pelo material (LEBARON; WANG; PINNAVAIA, 1999; SHEN; CHEN, 2007). Sendo mais um indicio da presença da laponita na superfície das fibras e do recobrimento de poros da amostra, diminuindo a difusão de gases pelas amostras. Isso pode indicar também que o material possivelmente dificultará a passagem de solvente pela amostra e modificar assim a liberação de ativos pela membrana.

A manipulação de fluidos, seja pela manutenção da umidade local ou adsorção e evaporação de exsudatos são fatores importantes a se levar em consideração no desenvolvimento de novos curativos. Tal fator é controlado pela capacidade de difusão de umidade e gases pelos curativos (MENNINI et al., 2016; WHITE; HARTWELL; BROWN, 2007). Portanto, a modificação no padrão de permeabilidade pode ocasionar em curativos com diferentes ações frente a cicatrização de feridas cutâneas, sendo necessários teste *in vivo* para avaliar tal modificação.

E se tratando do uso dos compósitos obtidos como curativos tópicos é importante verificar se as amostras obtidas possuem boa viabilidade celular em linhagens de célula compatível com local de aplicação. Desta forma, a Figura 14 são os resultados da avaliação de citotoxicidade dos compósitos em linhagens de célula de fibroblastos humanos (HDFa).

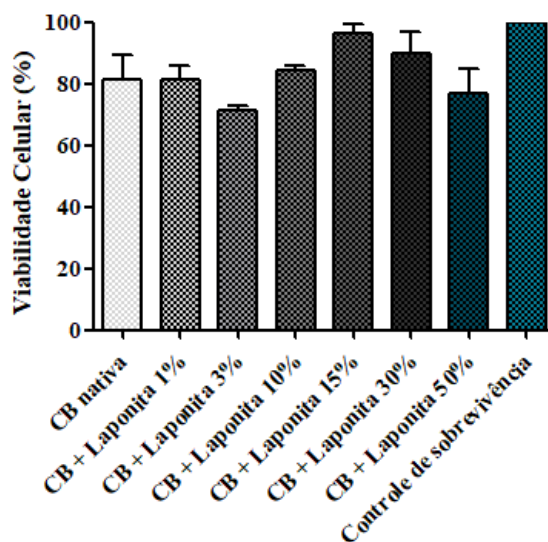


Figura 14: Avaliação da citotoxicidade dos materiais CB e CB/Lap 1-50% em células de fibroblastos humanos (HDFa). A viabilidade celular (%) foi determinado por teste colorimétrico utilizando MTT.

Todos os materiais no presente trabalho apresentaram valores de viabilidade celular acima de 70%. De acordo a ISO 1993-5 (INTERNATIONAL, 2009) para um material ser considerado citocompatível é necessário que ele apresente viabilidade acima de 70%. Isso demonstra que as amostras analisadas não foram citotóxicas em linhagens de HDFa.

É de se esperar que os materiais obtidos não demonstrassem citotoxicidade frente a aplicação como curativos tópicos, uma vez que a CB demonstra boa viabilidade celular em

trabalhos na literatura. Como no trabalho de Mohite *et al* (MOHITE; SURYAWANSHI; SATISH V. PATIL, 2014) que realizou estudos de CB para liberação de fármacos e avaliou a observou boa viabilidade celular na CB para linhagens de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs).

Já no trabalho de Padrão *et al* (PADRÃO et al., 2016), que obteve filmes de diferentes CB, um produzido em cultura estática de *G. Xylinus* (BC1) e nata de coco comercial (BC2), para a absorção e liberação de lactoferrina bovina (bLF), observou que os filmes BC1 + bFL e BC2 + bFL não apresentaram citotoxicidade em linhagens de células de fibroblastos embrionários de camundongos (3T3).

E se tratando da laponita, no presente trabalho optou-se pelo uso da Laponita XLG, que possui elevada pureza na fórmula e não é tóxica para células, como células-tronco mesenquimais humanas (hMSCs) (TOMÁS; ALVES; RODRIGUES, 2018) e é ideal no uso em aplicações que demandam interação com organismos vivos.

4.2 – Adsorção do fármaco Ciprofloxacina

Para avaliar a incorporação do fármaco ciprofloxacina nas amostras, optou-se por realizar testes de adsorção avaliando a cinética e o equilíbrio. A adsorção é um fenômeno dinâmico de transferência de massa que ocorre na superfície nos materiais. Nesse fenômeno, o princípio ativo em solução, denominado adsorvato, fica aderido na superfície dos materiais, denominados adsorventes, em locais energéticos denominados de sítios ativos (MELLO et al., 2011).

A adsorção pode acontecer por diferentes tipos de interação adsorvente/adsorvato seja por adsorção física (atração entre diferentes cargas elétricas dos materiais, interações eletrostáticas) e adsorção química (formação de ligações químicas), sendo a primeira um fenômeno reversível (MELLO et al., 2011).

Sendo assim, avaliou-se a cinética e equilíbrio de adsorção dos materiais frente a incorporação do fármaco ciprofloxacina nas amostras.

4.2.1 – Cinética de adsorção

Com o objetivo de determinar o tempo necessário para que os adsorventes (CB e compósitos CB/Lap 1-50%) possam adsorver o princípio ativo do fármaco e entrar em

equilíbrio cinético, denominado tempo ótimo de adsorção (q_t), realizou-se o teste de cinética. O gráfico da figura 15 demonstra o teste de cinética obtido no presente trabalho.

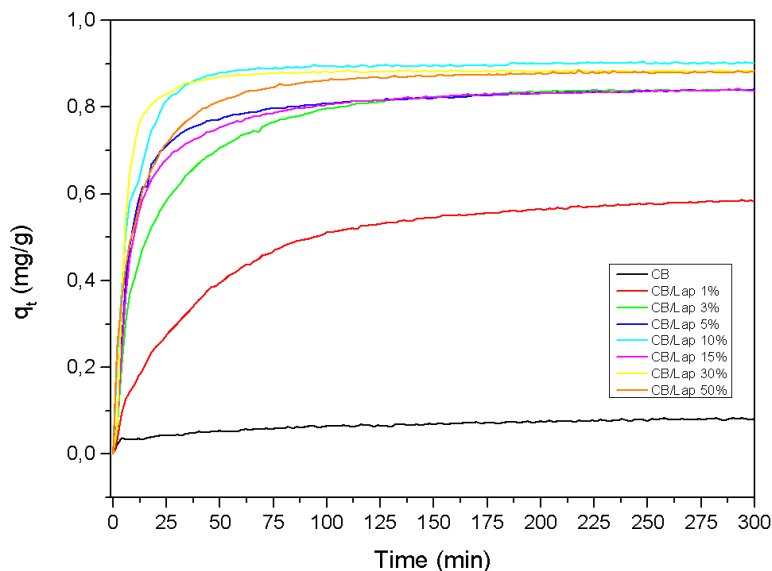


Figura 15: Cinética de adsorção do fármaco Ciprofloxacina nos materiais CB (Preto), Laponita (Cinza), CB/Lap 1% (Vermelho), CB/Lap 3% (Verde), CB/Lap 5% (Azul), CB/Lap 10% (Ciano), CB/Lap 15% (Magenta), CB/Lap 30% (Amarelo) e CB/Lap 50% (Laranja).

De início é possível constatar os compósitos obtidos possuem menor afinidade com fármaco ciprofloxacina quem a CB isolada, uma vez que apresentam valores de tempo ótimo (0,54, 0,82, 0,82, 0,89, 0,82, 0,88, 0,87 mg/g para os materiais CB/Lap 1-50%, respectivamente) de até 12 vezes maior que a CB (0,07 mg/g). É de se esperar uma maior afinidade do fármaco com os compósitos, uma vez que na forma de cloridrato de ciprofloxacina, o princípio ativo possui carga positiva e a argila lamelar laponita apresenta deficiência de carga positiva na superfície das lamelas (BYK ADDITIVES & INSTRUMENTS, 2014; TOMÁS; ALVES; RODRIGUES, 2018). Desta forma, o recobrimento da superfície dos materiais com a carga inorgânica ocasionou na formação de novos sítios ativos e maior afinidade com o fármaco.

Se tratando do tempo ótimo de adsorção, verificou-se que a partir de 150 minutos todos os adsorventes atingiram o platô, ou seja, o equilíbrio dinâmico de adsorção. Desta forma fixou-se esse tempo para todas as análises na etapa de equilíbrio de adsorção.

No trabalho de Ion *et al* (ION; PÂRVULESCU; DOBRE, 2015), que obteve híbridos a base de CB e nanopartículas de magnetita (M/BC), é possível observar que a CB e o M/BC obtiveram diferentes valores de adsorção a depender da temperatura de análise, e que em ambos materiais o equilíbrio dinâmico no processo de adsorção dos Isopropanol e n-Hexano ocorreu por volta de 200 minutos, semelhante ao observado nesse trabalho.

Já no trabalho de Zhang *et al* (ZHANG, Wen et al., 2019), obteve-se microesferas a base de colágeno e CB (denominado de COL/BC), o processo de adsorção foi estudado utilizando Abulmina de sêrum bovino (BSA) e observou um perfil de adsorção lento da proteína (por volta de 10 horas), muito diferente do observado no presente trabalho.

Desta forma, o presente trabalho entrou em equilíbrio cinético em tempo superior ao trabalho analisado, podendo justificar pelo acesso do fármaco aos sítios ativos do adsorvente.

Avaliando a adequação aos modelos matemáticos de pseudo-primeira ordem e pseudo-segunda ordem, a Tabela 4 demonstra os resultados dos materiais frente ao teste cinético de adsorção do fármaco ciprofloxacina

Tabela 4: Linearizações aos modelos matemáticos para avaliar a cinética de adsorção.

Amostras	Pseudo primeira ordem			Pseudo segunda ordem		
	R ²	q ₁ (mg.g ⁻¹)	K ₁ (min.g.mg ⁻¹)	R ²	q ₂ (mg.g ⁻¹)	K ₂ (g ² .mg ⁻²)
CB	-0,595	4,62	-5,50	0,996	3,968	-5,75x10 ⁻³
CB/Lap 1%	0,977	0,706	39,3	0,996	0,647	5,17x10 ⁻²
CB/Lap 3%	-0,854	1,233	-2,71	0,999	0,878	9,98x10 ⁻²
CB/Lap 5%	0,944	1,043	27,64	0,999	0,878	9,98x10 ⁻²
CB/Lap 10%	0,977	0,949	6,358	0,999	0,911	4,16x10 ⁻¹
CB/Lap 15%	0,996	1,004	20,63	0,999	0,619	3,10x10 ⁻¹
CB/Lap 30%	0,871	1,149	23,99	0,999	0,890	5,88x10 ⁻¹
CB/Lap 50%	0,994	0,898	5,666	0,999	0,898	2,17x10 ⁻¹

Observando os valores do fator de correlação dos materiais nos dois modelos matemáticos, observa-se uma adequação ao Pseudo-segunda ordem. O modelo de pseudo-segunda ordem propõe que a taxa de adsorção é depende do adsorbato e envolve processos de fisissorção e quimissorção, sendo a quimissorção a etapa limitadora da taxa (K₂). O processo de adsorção previsto no modelo compreende interações que envolvem forças de

valência com compartilhamento ou troca de elétrons entre o adsorvente e o adsorbato (ABRAMIAN; EL-RASSY, 2009; BAI et al., 2023).

Desta forma, observa-se, portanto, que com o aumento do teor de laponita nas amostras, especialmente CB/Lap 10 e 30%, houve um aumento na constante de equilíbrio (K_2), indicando que esses compósitos podem atingir o equilíbrio dinâmico mais rapidamente em comparação com a CB, diminuindo o tempo do processo de adsorção.

Além disso, comparando os valores da capacidade de adsorção no tempo de equilíbrio experimental (q_t) e teórico (q_2), é possível notar uma semelhança entre os resultados, com exceção da CB, em que o compósito com maior adsorção na cinética foi CB/Lap 10%.

No trabalho de Bai et al (BAI et al., 2023), os autores obtiveram compósitos à base de CB e vermiculita para adsorção do corante azul de metileno e do antibiótico sulfanilamida e se ajustaram ao modelo de Pseudo-Segunda Ordem, semelhante ao observado no presente trabalho.

4.2.2 – Equilíbrio de adsorção

Para verificar a quantidade máxima de adsorção (q_e), ou seja, a quantidade máxima de fármaco adsorvida nos materiais que preencha todos os sítios ativos das membranas, realizou-se o teste de equilíbrio de adsorção e os resultados estão presentes na figura 16.

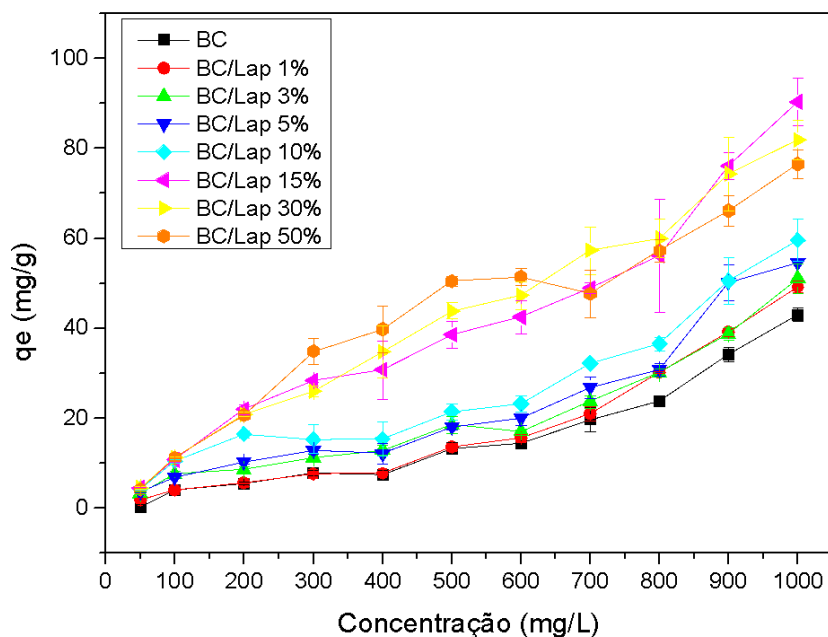


Figura 16: Equilíbrio de adsorção do fármaco Ciprofloxacina nos materiais CB (Preto), Laponita (Cinza), CB/Lap 1% (Vermelho), CB/Lap 3% (Verde), CB/Lap 5% (Azul), CB/Lap 10% (Ciano), CB/Lap 15% (Magenta), CB/Lap 30% (Amarelo) e CB/Lap 50% (Laranja).

Analisando os resultados obtidos, foi possível verificar que os compósitos apresentaram uma maior capacidade de adsorção do fármaco ciprofloxacina em relação a CB isolada (42 mg/g), sendo que os compósitos contendo maior quantidade de laponita na amostra CB/Lap 15, 30 e 50% apresentaram capacidade de adsorção de 90,3, 81,9 e 76,5 mg/g, respectivamente, variando entre 1,8 e 2,15 vezes maior que a CB.

Interessante notar também que o compósito CB/Lap 15% apresentou a maior capacidade e adsorção dentre os materiais, mesmo não apresentando o maior teor de argila. Tal efeito pode ser explicado pela agregação das argilas nos compósitos CB/Lap 30 e 50%, conforme observando nos resultados de MEV e DRX discutidos anteriormente. Sendo assim, é possível propor que no material em questão o recobrimento das fibras pela laponita ocasionou no aumento máximo de sítios ativos nos filmes e consequentemente em maior capacidade de adsorção.

De acordo com Giles *et al* (GILES; SMITH; HUITSON, 1974), as isotermas de adsorção podem ser classificadas de acordo com sua inclinação em 4 grupos sendo S (“sigmoidal”), L (“Langmuir”), H (“Alta Afinidade”) e C (“Constante de partição”), e

subgrupos 1, 2, 3, 4 ou máximo (MAX), referentes a camadas de sítios ativos preenchidas, como demonstrado na Figura 17, retirada do trabalho de Fagundes e Zuquette (FAGUNDES; ZUQUETTE, 2009).

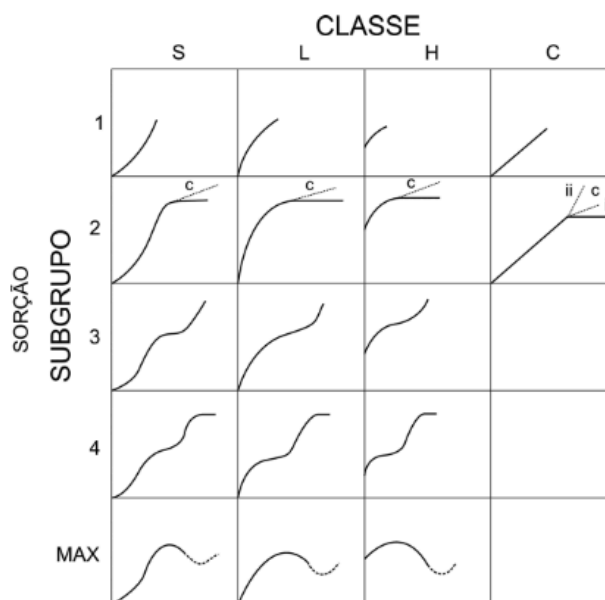


Figura 17: Isotermas de Giles. Retirado do trabalho (FAGUNDES; ZUQUETTE, 2009).

Todos os materiais analisados, com exceção do CB/Lap 50%, apresentaram isotermas do tipo S no subgrupo 1. As isotermas do tipo S (sigmoidal) sugerem que a energia de ativação dos sítios ativos depende da concentração do substrato no sistema, caracterizando um tipo de “adsorção cooperativa” e interação adsorbato-adsorbato. Já o subgrupo 1 é característico de isotermas que não atingiram a saturação dos sítios ativos nos materiais. Portanto, os materiais analisados apresentam sítios ativos vagos, podendo ser ocupados, aumentando assim a capacidade de adsorção. Além disso, a interação entre os fármacos adsorvidos nos materiais e os fármacos em solução geram novos sítios ativos, com diferentes energias, aumentando ainda mais a capacidade máxima de adsorção. Por isso, os materiais desse trabalho têm maior capacidade adsorptiva que a encontrada, sendo limitado pela solubilidade do fármaco no sistema.

Agora, a fim de avaliar a adequação aos modelos matemáticos de equilíbrio, a tabela 5 demonstra os parâmetros relacionados às isotermas de Freundlich e Langmuir para os materiais frente a adsorção do fármaco ciprofloxacina.

Tabela 5: Linearizações aos modelos matemáticos para avaliar o equilíbrio de adsorção.

Amostras	Freundlich			Langmuir			
	R ²	K _f (mg ^{1-(1/n)} L ^{1/n} g ⁻¹)	n	R ²	q _m (mg/g)	b	R _L
CB	0,935	5,93x10 ⁻²	0,787	0,920	27,78	2,03x10 ⁻³	0,34
CB/Lap 1%	0,959	8,03x10 ⁻²	0,816	0,927	30,30	1,76x10 ⁻³	0,38
CB/Lap 3%	0,963	3,51x10 ⁻²	0,996	0,944	101,01	3,75x10 ⁻⁴	0,75
CB/Lap 5%	0,936	6,82x10 ⁻²	1,720	0,950	21,74	1,52x10 ⁻²	0,075
CB/Lap 10%	0,906	2,78	2,580	0,966	13,70	8,50x10 ⁻²	0,014
CB/Lap 15%	0,956	6,34	2,680	0,974	48,54	1,11x10 ⁻¹	0,016
CB/Lap 30%	0,963	4,57	2,240	0,983	63,29	3,26x10 ⁻²	0,052
CB/Lap 50%	0,878	10,17	3,340	0,828	64,10	3,51X10 ⁻²	0,041

Analisando os fatores de correlação obtidos, observa-se que o processo de adsorção dos materiais se aproxima de ambos modelos, contudo, não se ajustam perfeitamente. Desta forma será discutido para os dois modelos.

No modelo de Freundlich assume-se que a superfície de adsorção é composta por camadas heterogêneas que apresentam sítios ativos com diferentes energias, onde "n" pode ser interpretado como o grau de heterogeneidade da superfície de Freundlich (LEAL et al., 2021). Os valores de "n", conhecido como parâmetro de Freundlich, também pode indicar se o processo de adsorção foi favorável ou não, sendo que n>1 geralmente indica processos de adsorção favoráveis (BAI et al., 2023; FAGUNDES; ZUQUETTE, 2009).

Desta forma, observando os valores de "n", nota-se que nos compósitos CB/Lap 5, 10, 30 e 50% a adsorção é favorável de acordo com o modelo de Freundlich. Além disso, ainda avaliando o parâmetro de Freundlich, com o aumento de laponita nas amostras, foi possível observar um aumento na heterogeneidade de energia dos filmes, o que faz sentido, uma vez que a argila tem uma deficiência de carga positiva em sua superfície e pode servir como um local de adsorção para o fármaco que tem uma carga oposta.

Já nos sistemas que se adequam aos modelos de Langmuir, a adsorção assume um modelo de monocamada com sítios ativos homogêneos. E pelo termo "R_L" é possível verificar

se o processo de adsorção de Langmuir foi favorável, onde $R_L > 1$ a adsorção é desfavorável e $0 < R_L < 1$ é favorável (OJAGH; VAHABZADEH; KARIMI, 2021). Assim, todos os processos de adsorção de Langmuir são favoráveis, sendo que os compósitos CB/Lap 5, 10, 15, 30 e 50% estão mais distantes de 1, indicando um aumento no processo de adsorção em relação ao CB.

Ainda assim, observando os valores obtidos, não foi possível notar nenhuma tendência que explique a adequação em ambos os modelos.

4.3 – Liberação do fármaco ciprofloxacina e atividade antibacteriana

A figura 18 apresenta os resultados obtidos no teste de liberação em células de Franz do fármaco ciprofloxacina adsorvidos nos filmes CB, CB/Lap 10, 15 e 30%.

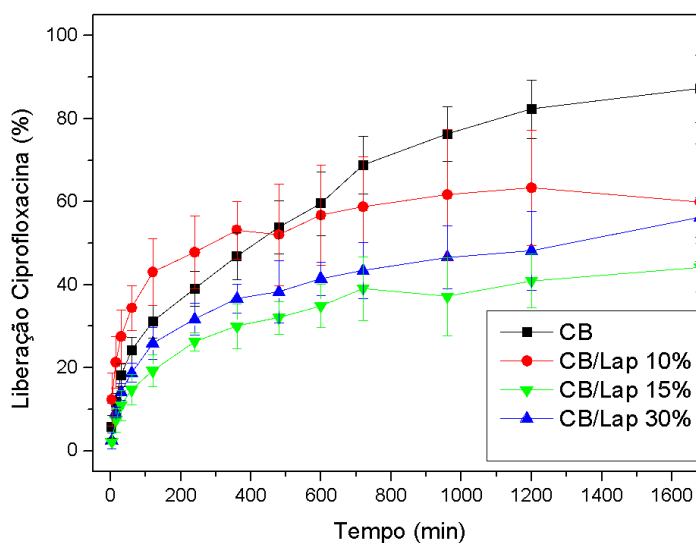


Figura 18: Liberação do fármaco Ciprofloxacina nos materiais CB (Preto), CB/Lap 10% (Vermelho), CB/Lap 15% (Verde) e CB/Lap 30% (Azul).

No teste realizado verificou-se que a CB foi capaz de liberar 87,2 % do fármaco em 24 horas. Ressaltamos ainda que a CB liberou 18,2% do princípio ativo em 30 minutos de análise e não foi possível observar uma liberação constante, ou platô, indicando assim que o material liberaria mais fármacos no decorrer do tempo.

Comparando com o trabalho de Meneguín *et al* (MENEGUÍN *et al.*, 2021), a CB apresentou um perfil de liberação rápida do princípio ativo metronidazol, liberando 62% do

fármaco em 30 minutos de análise. Segundo os autores, a liberação acelerada do fármaco está associada com a elevada porosidade e a livre difusão do solvente pela amostra. O mesmo efeito foi observado no trabalho de Fontes *et al* (DE LIMA FONTES *et al.*, 2018), que observou um comportamento de burst release (70-80% de liberação) em 15 minutos do fármaco metotrexato e no trabalho de Vismara *et al* (VISMARA *et al.*, 2019) que observou que liberação dos antibióticos Vancomicina e Ciprofloxacina atingiu um platô de liberação abaixo de 100 minutos.

Contudo, observou-se que a CB deste trabalho não apresentou o comportamento visto na literatura, uma vez que liberou cerca de 82% em 1200 minutos. É possível propor que devido ao modo de incorporação do fármaco na membrana, ou seja, por adsorção, foi capaz de promover um perfil mais gradual de liberação, uma vez que o fármaco está ancorado ao sítio ativo, e não livre (como uma incorporação por adsorção deixaria). Desta forma a simples difusão do solvente no processo de liberação não é suficiente para promover a dessorção do princípio ativo ancorado, sendo necessário outras formas de interação com o solvente obtendo um perfil mais gradua de liberação.

Além disso, o tipo de adsorção no modelo “S” prevê a formação de novos sítios ativos pela interação entre o fármaco adsorvido e o fármaco em solução, gerando sítios ativos com diferentes energias e com liberações em fases distintas. Provavelmente, se o teste prolongasse durante o tempo seria possível verificar diferentes etapas de liberação.

Já nos compósitos CB/Lap 10, 15 e 30%, em 24 horas eles liberaram cerca de 59,8, 44,2 e 56,2%, respectivamente, valores menores que a CB, indicando assim que os compósitos obtidos foram capazes de controlar ainda mais a liberação do ativo. Além disso, no compósito CB/Lap 15%, observou-se o início da formação de um platô, sendo mais uma vez o indício do controla da liberação do fármaco e a formação de uma liberação sustentada do fármaco.

Comparando com os resultados do trabalho de Meneguín *et al* (MENEGUÍN *et al.*, 2021), os autores observaram que o compósito contendo 15% de carga argilosa paligorskita conseguiu controlar a liberação do fármaco metronidazol que obteve o platô em 30 minutos. Desta forma, os compósitos obtidos no presente trabalho além de serem capazes adsorverem mais fármacos em sua estrutura controlaram a liberação da ciprofloxacina, liberado cerca de 44,2% em 24 horas, superior ao observado no trabalho de supracitado, o que demonstra um potencial desses materiais como sistemas de liberação e fármacos.

Para avaliar os modelos matemáticos de mecanismo de liberação do fármaco, os parâmetros obtidos nos modelos utilizados estão disponíveis na Tabela 6.

Tabela 6: Modelos matemáticos de liberação.

Modelos matemáticos	CB	CB/Lap 10%	CB/Lap 30%	CB/Lap 50%
Zero ordem	$r^2 - 0.938$	$r^2 - 0.581$	$r^2 - 0.886$	$r^2 - 0.873$
	$k_0 - 7.19 \times 10^{-5}$	$k_0 - 6.92 \times 10^{-5}$	$k_0 - 1.10 \times 10^{-4}$	$k_0 - 1.08 \times 10^{-4}$
Primeira ordem	$r^2 - 0.796$	$r^2 - 0.688$	$r^2 - 0.725$	$r^2 - 0,736$
	$k_1 - 6,63 \times 10^{-4}$	$k_1 - 1.08 \times 10^{-3}$	$k_1 - 2.49 \times 10^{-4}$	$k_1 - 1,30 \times 10^{-3}$
Higuchi	$r^2 - 0.916$	$r^2 - 0.840$	$r^2 - 0.829$	$r^2 - 0,845$
	$k_H - 2.55 \times 10^{-2}$	$k_H - 1.47 \times 10^{-2}$	$k_H - 2.49 \times 10^{-2}$	$k_H - 2.55 \times 10^{-2}$
Peppas- Korsmeyer	$r^2 - 0.997$	$r^2 - 0.981$	$r^2 - 0.973$	$r^2 - 0,981$
	$k_{PK} - 4.30 \times 10^{-1}$	$k_{PK} - 2.54 \times 10^{-1}$	$k_{PK} - 4.43 \times 10^{-1}$	$k_{PK} - 4.43 \times 10^{-1}$
	$n - 0,77$	$n - 0,82$	$n - 0,65$	$n - 0,62$
Hixon-Crowell	$r^2 - -0,910$	$r^2 - -0.816$	$r^2 - 0,917$	$r^2 - -0.893$
	$k - -9.05 \times 10^{-5}$	$k - -9.02 \times 10^{-5}$	$k - 9.02 \times 10^{-5}$	$k - 9.02 \times 10^{-5}$

O modelo matemático no qual os processos de liberação melhor se justaram foi o Peppas-Korsmeyer.

O modelo de Peppas-Korsmeyer foi desenvolvido especificamente para a liberação de fármacos em sistemas poliméricos e hidrogéis, como os obtidos no presente trabalho, e é um método semiempírico que estabelece uma relação exponencial entre a liberação e o tempo.

O parâmetro “ K_{PK} ” é a constante de incorporação de modificações estruturais e características geométricas do sistema (também considerada a constante de velocidade de liberação), e “ n ” é o expoente de liberação (relacionado ao mecanismo de liberação do fármaco) em função do tempo t (BRUSCHI, 2015; RITGER; PEPPAS, 1987) e ao avaliar o valor de “ n ”, é possível classificar a liberação de acordo com o mecanismo e a geometria envolvidos, onde para filmes finos valores de $n \leq 5$ correspondem a mecanismos regidos por difusão fikiana, valores entre 0,5 e 1,0 correspondem a mecanismos anômalos, ou seja,

transportes não fikianos, e $n \geq 1,0$ correspondem a transporte Caso-II (BRUSCHI, 2015; RITGER; PEPPAS, 1987).

Dessa forma, os materiais do presente trabalho apresentam valores de "n" (0,77, 0,82, 0,65 e 0,62, para CB, CB/Lap 10%, CB/Lap 30% e CB/Lap 50%, respectivamente) que correspondem à difusão em filmes finos e seguem um modelo de liberação anômala (ou não fikiana).

O modelo anômalo de transporte é um intermediário entre o modelo fikiano e do Caso-II, e prevê que as taxas de intumescimento e relaxamento do polímero são compatíveis, ou seja, durante o processo de intumescimento da matriz ocorre o relaxamento do polímero (GANJI; VASHEGHANI-FARAHANI; VASHEGHANI-FARAHANI, 2010). Isso pode explicar porque a CB apresenta liberação rápida do princípio ativo durante o processo de liberação, uma vez que apresenta elevada taxa de intumescimento e pode liberar o fármaco não ligado nos sítios ativos apenas pelo contato com o solvente. Pode explicar também como a afinidade com o meio receptor e, conseqüentemente, o modelo de incorporação do princípio ativo por adsorção podem interferir no processo de liberação do fármaco para o meio, gerando o comportamento observado para a CB e os compósitos obtidos no presente trabalho.

Além disso, pela compatibilidade entre a taxa de intumescimento e relaxamento dos filmes, o controle do intumescimento pode influenciar na liberação dos fármacos para o sistema. Sendo assim, a estrutura mais compacta dos compósitos observadas nas medidas de MEV resultaria em um controle da liberação do ativo, conforme observado.

Finalmente, com o objetivo de avaliar a atividade antibacteriana dos materiais obtidos incorporados com ciprofloxacina, realizou-se testes preliminares em halo de inibição que podem ser observados nas Figura 19.

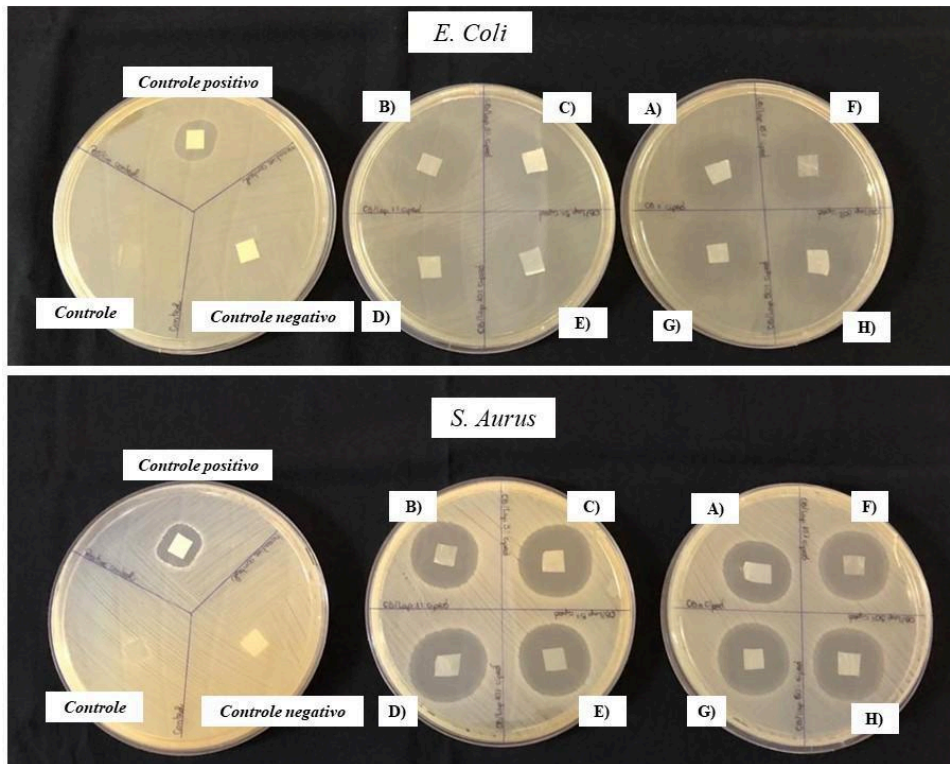


Figura 19: Testes de halo de inibição por difusão nas linhagens das bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, dos materiais CB (A), CB/Lap 1% (B), CB/Lap 3% (C), CB/Lap 5% (D), CB/Lap 10% (E), CB/Lap 15% (F), CB/Lap 30% (G) e CB/Lap 50% (H), incorporados com o fármaco ciprofloxacina por adsorção.

Observando as imagens de halo obtidas, é possível notar que todas as amostras testadas apresentam atividade frente a inibição das bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, comumente encontradas em feridas cutâneas infeccionadas. Vale ressaltar que os filmes incorporados com ciprofloxacina apresentaram halo de inibição visualmente maior (1,4 cm de diâmetro) que o controle positivo (0,5 cm), para ambas as linhagens, o que indica atividade antibacteriana. Entretanto, o método utilizado é qualitativo e serviu como teste preliminar para os testes de inibição de biofilme, demonstrados na Figura 20.

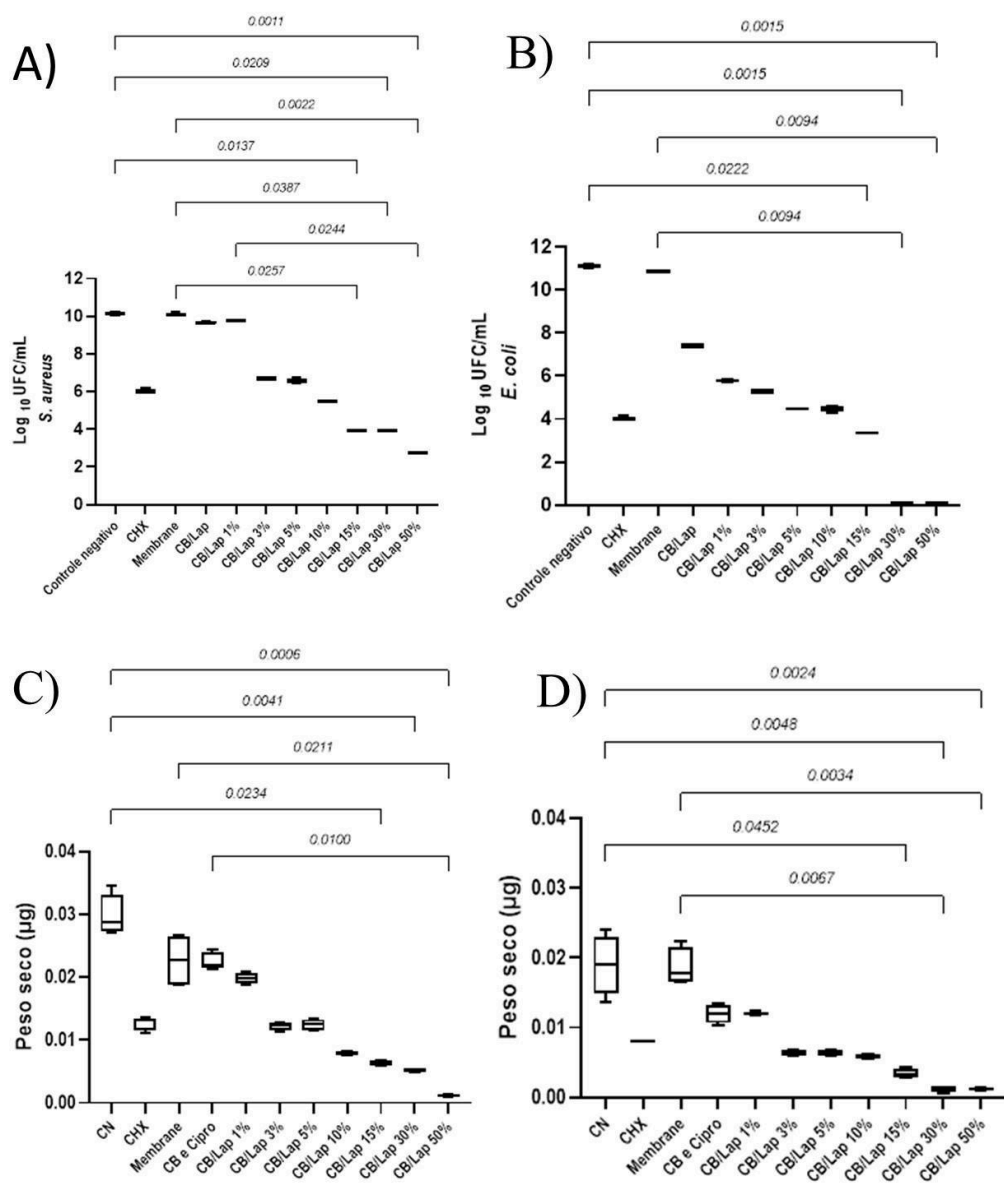


Figura 20: Gráfico de mediana com valores mínimo/máximo ilustrando os resultados significativos do teste de comparação múltipla de Dunn para log UFC/mL de: (a) *Staphylococcus aureus* e (b) *Escherichia coli*. Gráfico de mediana com valores mínimo/máximo ilustrando os resultados significativos do teste de comparação múltipla de Dunn para peso seco de: (c) biofilmes de *Staphylococcus aureus* e (d) de *Escherichia coli*.

Avaliando as linhagens de *Staphylococcus aureus*, a maior redução em CFU/mL foi encontrada no material CB/Lap50% que apresentou uma diferença estatisticamente significativa quando comparado a CB/Cipro, CB/Lap 1% e controle negativo (Figura 20).

Além da CB/Lap 50%, os materiais CB/Lap 30% e CB/Lap 15% também apresentaram uma redução significativa quando comparados ao controle negativo.

Em termos de peso seco (μg), o maior valor de redução foi encontrado no material CB/Lap 50%, que apresentou uma diferença estatisticamente significativa quando comparado com os grupos CB/Cipro e controle negativo (Figura 20). Materiais CB/Lap 30% e CB/Lap 15% apresentaram redução significativa nos valores de peso seco quando comparados ao grupo de controle negativo.

Já para *Escherichia coli*, os maiores valores de redução de UFC/mL foram encontrados nos compósitos CB/Lap 50% e CB/Lap 30% (Figura 20). Esses dois grupos são estatisticamente diferentes dos grupos de controle negativo e da CB/Cipro. Além disso, a CB/Lap 15% é estatisticamente diferente do grupo de controle negativo. Em relação ao peso seco (μg), as amostras CB/Lap 50% e CB/Lap 30% apresentaram reduções significativas quando comparados aos grupos de controle negativo e de membrana (Figura 20). E a CB/Lap 15% só apresentou uma redução significativa nos valores de peso seco quando comparado ao grupo de controle negativo.

Desta forma, nota-se que os compósitos CB/Lap 30 e 50%, incorporados com ciprofloxacina, apresentaram maior atividade antibacteriana na inibição de biofilmes que a CB com o mesmo ativo, indicando assim uma maior capacidade dos materiais obtidos.

5 – CONCLUSÃO DO CAPÍTULO 2

No presente capítulo obteve compósitos a base de celulose bacteriana e laponita para o desenvolvimento de novos curativos multifuncionais com propriedades de liberação do fármaco ciprofloxacina.

No trabalho verificou-se dois tipos de compósitos com estruturas diferentes, sendo nanocompósitos esfoliados (CB/Lap 1-10%) e microcompósitos (CB/Lap 15-50%), sendo que no segundo tipo observou-se a agregação de fibras e a oclusão de poros nos filmes. Tal estrutura ocasionou em materiais com maior estabilidade térmica e no caso da CB/Lap 15%, maior propriedade de adsorção e liberação controlada do fármaco ciprofloxacina, em comparação com a CB isolada. Além disso, os materiais obtidos apresentaram boa viabilidade celular e atividade antibacteriana, seja em testes com halo de inibição, seja em inibir o crescimento e formação de biofilmes em linhagens de *Escherichia coli* e

Staphylococcus aureus, sendo que os compósitos CB/Lap 30 e 50% apresentaram maior capacidade de inibição em comparação com os demais materiais

Portanto, conclui-se que os materiais obtidos são promissores para o uso como curativos tópicos, multifuncionais, com propriedade de liberação de antibiótico de forma controlada.

6 – REFERÊNCIAS

ABRAMIAN; EL-RASSY, Adsorption kinetics and thermodynamics of azo-dye Orange II onto highly porous titania aerogel, **Chemical Engineering Journal** 150 (2009) 403–410.

AFEWERKI, Samson et al. Bioprinting Laponite for Orthopedic Applications. **Advanced Healthcare Materials**, v. 1900158, p. 1–14, 2019.

BADSHAH, Munair *et al.* Surface modification and evaluation of bacterial cellulose for drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2018. , v. 113, p. 526–533Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.135>>.

BAI, X et al. An Eco-Friendly Adsorbent Based on Bacterial Cellulose and Vermiculite Composite for Efficient Removal of Methylene Blue and Sulfanilamide. **Polymers** 2023, 15, 2342. <https://doi.org/10.3390/polym15102342>

BARUD, Hernane S. et al. Bacterial cellulose/poly(3-hydroxybutyrate) composite membranes. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 3, p. 1279–1284, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.09.049>>.

BARUD, H. S; Self-supported silver nanoparticles containing bacterial cellulose membranes. **Materials Science and Engineering C**, v. 28, n. 4, p. 515–518, 2008.

BORBA, Pedro B. et al. Bacterial nanocellulose containing diethylditiocarbamate bio-curatives: physicochemical characterization and drug delivery evaluation. **Cellulose**, v. 29, n. 3, p. 1557–1565, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10570-021-04360-1>>.

BRUSCHI, M. L; Mathematical models of drug release, Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems, Woodhead Publishing, 2015, Pages 63-86,Disponível em <<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100092-2.00005-9>>

BYK ADDITIVES & INSTRUMENTS. Laponite : performance additives. 2014.

DANIEL, Lisa M; FROST, Ray L; ZHU, Huai Yong. Edge-modification of laponite with

dimethyl-octylmethoxysilane. Artigo utilizado na introdução para falar sobre a Laponita e para caracterizar os materiais com TG e DRX., v. 321, p. 302–309, 2008.

DE LIMA FONTES, Marina et al. Effect of in situ modification of bacterial cellulose with carboxymethylcellulose on its nano/microstructure and methotrexate release properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 179, p. 126–134, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.09.061>>.

FAGUNDES, Júnio René Toledo; ZUQUETTE, Lázaro Valentin. Capacidade de sorção de materiais inconsolidados residuais da Formação Botucatu, região de São Carlos (SP), Brasil. **Revista Brasileira de Geociências**, v. 39, n. 3, p. 494–506, 2009.

FRENCH, Alfred D. Idealized powder diffraction patterns for cellulose polymorphs. **Cellulose**, v. 21, n. 2, p. 885–896, 2014.

FRENCH, A. D; Increment in evolution of cellulose crystallinity analysis. **Cellulose**, v. 27, n. 10, p. 5445–5448, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10570-020-03172-z>>.

FONTANA, C.R.et al. The Antibacterial Effect of Photodynamic Therapy in Dental Plaque-Derived Biofilms. *J Periodontal Res* 2009, 44, 751–759.

FU, Yao; KAO, Weiyuan John. Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 7, n. 4, p. 429–444, 2010.

GANJI, F.; VASHEGHANI-FARAHANI, S.; VASHEGHANI-FARAHANI, E. Theoretical description of hydrogel swelling: A review. **Iranian Polymer Journal (English Edition)**, v. 19, n. 5, p. 375–398, 2010.

GILES, Charles H.; SMITH, David; HUITSON, Alan. A general treatment and classification of the solute adsorption isotherm. I. Theoretical. **Journal of Colloid And Interface Science**, v. 47, n. 3, p. 755–765, 1974.

GONZÁLEZ, B. et al. Laponite functionalized with biuret and melamine e Application to adsorption of antibiotic trimethoprim. v. 253, p. 112–122, 2017.

GUIMARÃES, A. M. et al. Surface modification of synthetic clay aimed at biomolecule adsorption: synthesis and characterization. **Materials Research**., v. 10, n. 1, p. 37–41, 2007.

HU, Weili et al. Functionalized bacterial cellulose derivatives and nanocomposites.

Carbohydrate Polymers, v.101, n. 1, p. 1043–1060, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.102>>.

HUANG, Xiao; BRAZEL, Christopher S. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 73, n. 2–3, p. 121–136, 2001.

INTERNATIONAL, STANDARD. Biological evaluation of medical devices. 2009, [S.l: s.n.], 2009. p. 984–989. Disponível em: <<https://nhiso.com/wp-content/uploads/2018/05/ISO-10993-5-2009.pdf>>.

ION, Violeta Alexandra; PÂRVULESCU, Oana Cristina; DOBRE, Tănase. Volatile organic compounds adsorption onto neat and hybrid bacterial cellulose. **Applied Surface Science**, v. 335, p. 137–146, 2015.

JABER, Maguy; MIEHÉ-BRENDELÉ, Jocelyne. Organoclays. Preparation, Properties and Applications. **Ordered Porous Solids**, p. 31–49, 2009.

LEAL, A. N. R. et al Removal of Remazol Black B dye using bacterial cellulose as an adsorbent. **Scientia Plena** 17, 034201 (2021)

LEBARON, Peter C.; WANG, Zhen; PINNAVAIA, Thomas J. Polymer-layered silicate nanocomposites: An overview. **Applied Clay Science**, v. 15, n. 1–2, p. 11–29, 1999.

LEZHNINA, M. M.; KYNAST, U. H. Optical properties of matrix confined species. **Optical Materials**, v. 33, n. 1, p. 4–13, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.optmat.2010.07.005>>.

LEZHNINA, Marina M. et al. Laponite blue: Dissolving the insoluble. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 51, n. 42, p. 10652–10655, 2012.

LI, Heyu et al. Thermosensitive nanofibers loaded with ciprofloxacin as antibacterial wound dressing materials. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 517, n. 1–2, p. 135–147, 2017.

LUO, H. et al. Bacterial cellulose/graphene oxide nanocomposite as a novel drug delivery system. **Current Applied Physics**, v. 17, n. 2, p. 249–254, 2017.

MASUDA, Kenji et al. Solid-state ¹³C and ¹H spin diffusion NMR analyses of the microfibril structure for bacterial cellulose. **Solid State Nuclear Magnetic Resonance**, v. 23,

n. 4, p. 198–212, 2003.

MELLO, Ivani Souza et al. Revisão sobre argilominerais e suas modificações estruturais com ênfase em aplicações tecnológicas e adsorção - Uma pesquisa inovadora em universidades. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, v. 9, n. 1, p. 141–152, 2011.

MENEGUIN, Andréia et al. Nanocellulose/palygorskite biocomposite membranes for controlled release of metronidazole. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 188, n. July, p. 689–695, 2021.

MENNINI, N. et al. Quality of wound dressings: A first step in establishing shared Criteria and objective procedures to evaluate their performance. **Journal of Wound Care**, v. 25, n. 8, p. 428–437, 2016.

MEZA-CONTRERAS, Juan C. et al. XRD and solid state ¹³C-NMR evaluation of the crystallinity enhancement of ¹³C-labeled bacterial cellulose biosynthesized by *Komagataeibacter xylinus* under different stimuli: A comparative strategy of analyses. **Carbohydrate Research**, v. 461, p. 51–59, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carres.2018.03.005>>.

MOHITE, BHAVANA V.; SURYAWANSHI, RAHUL K.; SATISH V. PATIL. Study on the Drug Loading and Release Potential of Bacterial Cellulose. **Cellulose**, v. i, n. 2, p. 37–46, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22227555>>.

MORAES, Paula Rodrigues Fontes De Sousa et al. Bacterial cellulose/collagen hydrogel for wound healing. **Materials Research**, v. 19, n. 1, p. 106–116, 2016.

MUÑOZ-GARCÍA, Juan C. et al. High Molecular Weight Mixed-Linkage Glucan as a Mechanical and Hydration Modulator of Bacterial Cellulose: Characterization by Advanced NMR Spectroscopy. **Biomacromolecules**, v. 20, n. 11, p. 4180–4190, 2019.

NCCLS, Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada – M2 – A8, Vol. 20 No. 1 Oitava Edição, 2003.

OJAGH, S. M. A. et al. Synthesis and characterization of bacterial cellulose-based composites for drug delivery. *Carbohydrate Polymers* 273 (2021) 118587

OLIVEIRA, Rafael Leite de et al. Transparent organic-inorganic nanocomposites membranes based on carboxymethylcellulose and synthetic clay. **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 415–423, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.02.015>>.

PADRÃO, Jorge et al. Bacterial cellulose-lactoferrin as an antimicrobial edible packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 58, p. 126–140, 2016.

PAIVA, Lucilene B. de; MORALES, Ana R.; GUIMARÃES, Thiago R. Propriedades mecânicas de nanocompósitos de polipropileno e montmorilonita organofílica. **Polímeros**, v. 16, n. 2, p. 136–140, 2006.

PANDEY, Manisha et al. Rapid synthesis of superabsorbent smart-swelling bacterial cellulose/acrylamide-based hydrogels for drug delivery. **International Journal of Polymer Science**, v. 2013, 2013.

PEROTTI, Gustavo F. et al. Bacterial cellulose-laponite clay nanocomposites. **Polymer**, v. 52, n. 1, p. 157–163, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.polymer.2010.10.062>>.

POLETO, Matheus; ORNAGHI JÚNIOR, Heitor L.; ZATTERA, Ademir J. Native cellulose: Structure, characterization and thermal properties. **Materials**, v. 7, n. 9, p. 6105–6119, 2014.

POURJAVAHER, Simin et al. Development of a colorimetric pH indicator based on bacterial cellulose nanofibers and red cabbage (*Brassica oleraceae*) extract. **Carbohydrate Polymers**, v. 156, p. 193–201, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.027>>.

QIU, Kaiyan; NETRAVALI, Anil N. A Review of Fabrication and Applications of Bacterial Cellulose Based Nanocomposites. **Polymer Reviews**, v. 54, n. 4, p. 598–626, 2 out. 2014. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15583724.2014.896018>>.

RAMTEKE K.H. et al, Mathematical Models of Drug Dissolution: A Review. *Sch. Acad. J. Pharm.*, 2014; 3(5): 388-396.

RITGER, P. L E PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *Journal of Controlled Release*, 5 (1987) 37-42

SEGAL, L. et al. An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. **Textile Research Journal**, v. 29, n. 10, p. 786–794, 1959.

SELIM, Asmaa et al. Preparation and characterization of PVA/GA/Laponite membranes to enhance pervaporation desalination performance. **Separation and Purification Technology**, v. 221, n. March, p. 201–210, 2019. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2019.03.084>>.

SHI, X. et al. PH- and electro-response characteristics of bacterial cellulose nanofiber/sodium alginate hybrid hydrogels for dual controlled drug delivery. **RSC Advances**, v. 4, n. 87, p. 47056–47065, 2014.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 2–3, p. 139–157, 2001.

SILVA, Jhonatan M. et al. New organic-inorganic hybrid composites based on cellulose nanofibers and modified Laponite. **Advanced Optical Technologies**, v. 7, n. 5, p. 327–334, 2018.

SILVA, Jhonatan Miguel. **NANOCOMPÓSITO DE NFC/LAPONITA® UTILIZADO COMO SUPORTE NA PRODUÇÃO DE FILMES LUMINESCENTES COM COMPLEXO Eu (III) – LIGANTE 2-THENOILTRIFLUOROACETONA (TTA)**. 2013. 2013.

SUKHTEZARI, Shokoofeh et al. **Development of bacterial cellulose based slow-release active films by incorporation of Scrophularia striata Boiss. extract**. [S.l.]: Elsevier Ltd., 2017. v. 156. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.058>>.

SYED ABDULLAH, Sharifah Sopliah et al. Development and evaluation of ciprofloxacin-bacterial cellulose composites produced through in situ incorporation method. **Biotechnology Reports**, v. 34, n. September 2021, p. e00726, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00726>>.

TOMÁS, Helena; ALVES, Carla S.; RODRIGUES, João. Laponite®: A key nanoplatform for biomedical applications? **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 14, n. 7, p. 2407–2420, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2017.04.016>>.

ULLAH, Hanif; SANTOS, Hélder A.; KHAN, Taous. Applications of bacterial cellulose in food, cosmetics and drug delivery. **Cellulose**, v. 23, n. 4, p. 2291–2314, 2016.

VISMARA, Elena et al. Bacterial nanocellulose and its surface modification by glycidyl methacrylate and ethylene glycol dimethacrylate. Incorporation of vancomycin and ciprofloxacin. **Nanomaterials**, v. 9, n. 12, 2019.

WAN, Yizao et al. Biofabrication of a novel bacteria/bacterial cellulose composite for

improved adsorption capacity. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, v. 125, n. April, p. 105560, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2019.105560>>.

WHITE, Richard; HARTWELL, Sam; BROWN, Sarah. Interim report on a study to assess the effectiveness and improved fluid uptake of new Allevyn. **Wounds UK**, v. 3, n. 4, p. 121–127, 2007.

YUAN, Zaiwu et al. Cross-linkage effect of cellulose/laponite hybrids in aqueous dispersions and solid films. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, n. 1, p. 431–437, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.11.051>>.

ZHANG, Wen et al. Drugs adsorption and release behavior of collagen/bacterial cellulose porous microspheres. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 140, p. 196–205, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.139>>.

ZHOU, Chen et al. De novo strategy with engineering a multifunctional bacterial cellulose-based dressing for rapid healing of infected wounds. **Bioactive Materials**, v. 13, n. August 2021, p. 212–222, 2022.

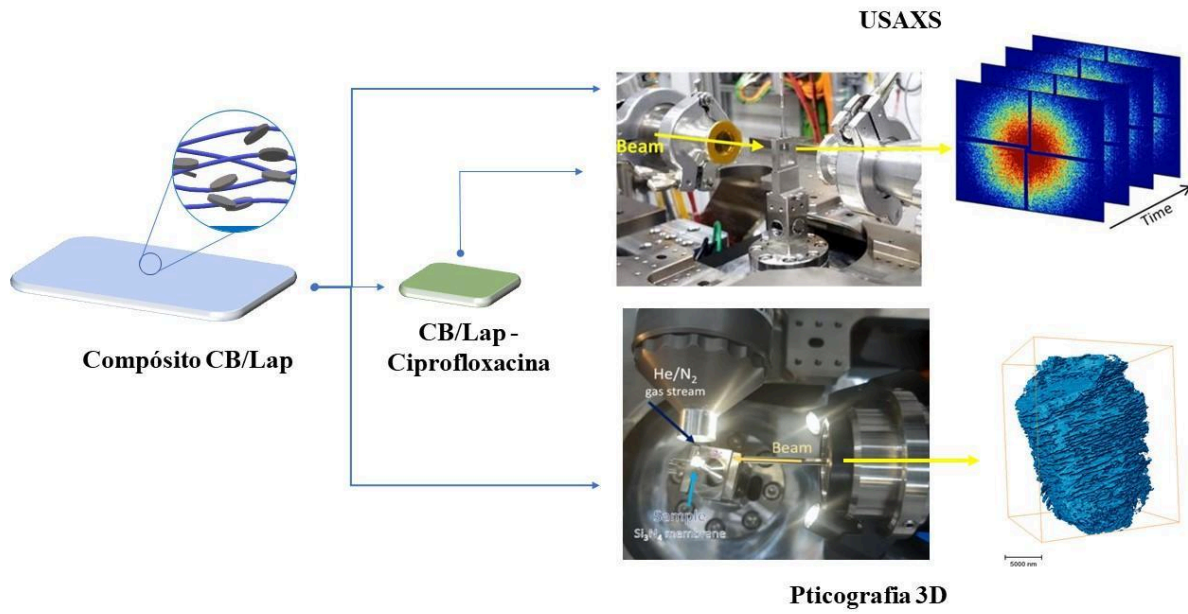
**CAPÍTULO 3 – CARACATERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPÓSITOS A BASE
DE CELULOSE E LAPONITA UTILIZANDO TÉCNICAS DE LUZ SÍNCROTRON**

RESUMO

As técnicas de análise de luz síncrotron, em comparação com as técnicas convencionais, apresentam enormes oportunidades para a investigação dos materiais e de suas aplicações, com grau de detalhe sem precedente, uma vez apresenta vantagem técnica pelo ao alto fluxo e elevado grau de coerência do feixe da luz, altamente intensos, que se traduz em maior brilho, e em uma faixa de energias mais ampla. intensidade e qualidade excepcionais da luz síncrotron possibilitam experimentos de alta resolução e sensibilidade nos quais é possível investigar a estrutura atômica de materiais, estudar a dinâmica sua estrutura e até mesmo analisar amostras biológicas sem destruí-la. Nesse sentido, o presente capítulo explora técnicas de luz síncrotron de quarta geração, mas especificamente técnicas de Espalhamento de Raios-X a Ultrabaixo Ângulo (USAXS/SAXS) e Tomografia Pticografica 3D, coletados na linha Cateretê/Sírius-LNLS (CNPEM-Campinas/SP), para avaliação da estrutura dos compósitos a base de celulose bacteriana e Laponita e correlação com o processo de liberação de fármacos. Nos dados de USAX obtidos, verificou-se que a presença da argila nas amostras ocasionou no aumento do diâmetro das fibras e modificação na rugosidade dos materiais, comprovando assim a deposição da Laponita na superfície das fibras. Além disso, nos testes de USAX avaliando a liberação *in situ* do fármaco ciprofloxacina, foi possível verificar modificações nas dimensões fractais no decorrer do tempo, correspondente ao relaxamento das fibras e possivelmente a liberação de fármaco. Por fim, nas técnicas de Pticografia 3D, verificou-se mais afundo a interação entre as fibras de CB e a Laponita, onde foi possível identificar uma diminuição nos canais e poros do material em decorrência da presença da argila, o que possivelmente provoca o efeito de diminuição da permeabilidade ao vapor de água e o controle da liberação de ciprofloxacina (discutido no Capítulo 2). Portanto, as técnicas utilizadas foram cruciais para compreender melhor as estruturas dos materiais obtidos e os mecanismos envolvidos no processo de liberação.

Palavras-Chave: Luz Síncrotron, espalhamento a baixo ângulo, Pticografia 3D, Compósitos, Sírius.

RESUMO GRÁFICO



1 – INTRODUÇÃO

No cenário científico e tecnológico atual análises utilizando luz síncrotron apresentam enormes oportunidades para a investigação dos materiais e de suas aplicações, com grau de detalhe sem precedente. Nesse contexto, o Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), situado em Campinas, São Paulo, Brasil, se destaca como uma referência internacional em excelência científica e instrumental (CNPEM, 2023; RAUEN, 2017). Entre suas conquistas, o acelerador de partículas Sirius, do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), inaugurado em 2018, representa um marco na pesquisa e tecnologia do Brasil (LNLS, 2023b).

O Sirius não é apenas uma façanha tecnológica, mas o resultado de uma visão audaciosa e do compromisso do Brasil com a desenvolvimento em pesquisa (LNLS, 2023b; RAUEN, 2017). Essa jornada começou a ser delineada com o Plano Nacional de Pós-Graduação (PNPG) de 2005, que propôs a construção de um acelerador de partículas de última geração no Brasil. A realização dessa visão culminou na inauguração do Sirius, estabelecendo-se como fonte de luz síncrotron de “quarta geração” no país (LNLS, 2023b).

Uma "fonte de quarta geração" representa uma evolução substancial na geração de luz síncrotron em comparação com as gerações anteriores. O termo "geração" refere-se às melhorias na qualidade e intensidade da luz síncrotron gerada por essas instalações. A principal vantagem técnica e científica das fontes de quarta geração, como o Sirius, está relacionada ao alto fluxo e elevado grau de coerência da luz síncrotron produzida. Essas fontes empregam tecnologias avançadas, como anéis de armazenamento ultrassincronizados e sistemas de inserção magnética, que permitem produzir feixes de luz síncrotron altamente intensos e coerentes. Isso se traduz em maior brilho, que é a quantidade de fótons por segundo e área, e em uma faixa de energias mais ampla (LNLS, 2023b).

Essa intensidade e qualidade excepcionais da luz síncrotron possibilitam a realização de experimentos de alta resolução e sensibilidade em diversas áreas, como ciência dos materiais, biologia estrutural, química e física. Os pesquisadores podem, por exemplo, investigar a estrutura atômica de materiais, estudar a dinâmica de proteínas e até mesmo analisar amostras biológicas sem destruí-las. Portanto, a vantagem técnica e científica das fontes de quarta geração, como o Sirius, reside na capacidade de impulsionar a pesquisa em diversas disciplinas, contribuindo para avanços significativos no conhecimento e nas aplicações práticas (LNLS, 2023b).

1.1 – Linha Cateretê – Sírius/LNLS - CNPEM

Dentro do ambiente proporcionado pelo laboratório Sírius/LNLS, vale destacar a linha Cateretê, na qual fornece para este capítulo três técnicas instrumentais de análise.

A linha Cateretê, inaugurada ao público em 2023, oferece soluções únicas em experimentos de imagem e dinâmica de materiais biológicos e de matéria condensada. A linha possui diversas técnicas como imageamento por difração de Raios-X coerentes (CXDI) e espectroscopia de correlação de Raios-X (XPCS), sendo essas as técnicas principais exploradas na linha. Contudo, também oferecem análises estruturais por espalhamento de Raios-X a baixo ângulo (SAXS) e ultrabaixo ângulo (USAXS), com resolução temporal (LNLS, 2023a).

1.2 - Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo e Ultrabaixo Ângulo (SAXS e USAX)

As técnicas de SAXS e USAXS são técnicas que permitem elucidar estruturas hierárquicas das amostras, que vão de ângström a vários micrômetros, por meio do registro dos ângulos de dispersão dos Raios-X espalhados pela amostra que oferecem informações sobre distâncias moleculares, raio de giro, tamanhos de poros, morfologia, estado de agregação, sendo essencial para a caracterização de materiais nessa escala (LNLS, 2023a).

As aplicações do SAXS abrangem diversas áreas, desde a pesquisa de nanoestruturas em polímeros (GUCCINI et al., 2018; KHANDELWAL; WINDLE, 2014) até a análise da organização tridimensional de macromoléculas em sistemas biológicos (SVERGUN; BARBERATO; KOCH, 1995). Na área de polímeros, a técnica é crucial para compreender informações como dimensão e distribuição das fibras, por exemplo (GUCCINI et al., 2018).

Para a caracterização de compósitos com estruturas mais complexas e dimensões maiores, a combinação de USAX/SAXS apresenta vantagens interessante pois permite abranger escalas que vão desde estruturas nanométricas até dimensões maiores, e uma compreensão completa da morfologia de compósitos complexos (LNLS, 2023a).

A aplicação das técnicas de espalhamento na caracterização de compósitos de celulose e laponita pode oferecer informações detalhadas sobre a distribuição e tamanhos de médio das fibras, e rugosidade superficial, informações importantes para uma compreensão mais abrangente da morfologia dos compósitos obtidos (GUCCINI et al., 2018).

1.3 – Imagem por Difração de Raios-X Coerentes – Pticografia 3D (CXDI).

A pticografia 3D é uma técnica de imagem por Raios-X, sem lente de alta resolução, em que uma imagem é obtida a partir do padrão de difração da radiação incidida na amostra. Para isso, a amostra é incidida com feixe de Raios-X coerentes e é gerado um padrão de difração dessa radiação, que é detectado no campo distante. Desta forma, o padrão de difração é recuperado por um algoritmo de fase e a imagem é obtida, tridimensionalmente, de acordo com o padrão de espalhamento da amostra (LNLS, 2023a; POLO et al., 2020).

Desta forma, a técnica é capaz de revelar a morfologia complexa dos materiais, em três dimensões, com alta resolução, capturando assim detalhes antes inacessíveis de uma ampla variedade de materiais cristalinos e não cristalino com resolução nanométrica (PERES, 2019; POLO et al., 2020).

A pticografia 3D encontra aplicação em diversas áreas, incluindo a investigação de estruturas biológicas complexas (PERES, 2019; POLO et al., 2020), materiais inorgânicos para catálise (SUZANA et al., 2019). Em polímeros, essa técnica permite visualizar as fases e estruturas internas (GÓRECKI et al., 2023), revelando informações essenciais sobre a morfologia desses materiais, como no trabalho de Olsson *et al* (OLSSON et al., 2023), que avaliou morfologicamente, via combinação de SAXS/WAXS e Pticografia 3D membranas de etilcelulose como sistema de liberação de fármacos.

Sendo assim, a técnica é importante para compreender melhor as estruturas internas dos compósitos de CB e Laponita obtidos, bem como entender a influência dessa estrutura nas propriedades físicas, de adsorção e liberação dos compósitos.

2 – OBJETIVOS

O objetivo deste capítulo centrou-se na caracterização morfológica e estrutural dos compósitos a base de celulose bacteriana e Laponita, apresentados no Capítulo 2, utilizando técnicas de Espalhamento de Raios-X a Ultrabaixo Ângulo (USAX) e Pticografia 3D (CXDI), a fim de elucidar mais detalhadamente a estrutura dos materiais obtidos em menores escalas e correlacionar estrutura da matriz e a liberação do fármaco ciprofloxacina.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Materiais

Os filmes de celulose bacteriana e os compósitos CB/Lap utilizados nesta etapa do trabalho foram obtidos no Capítulo 2 desta tese. Desta forma, a metodologia de obtenção dos

compósitos, bem como os materiais utilizados para a obtenção estão descritos no item 3 do capítulo anterior.

3.2 – Métodos

Medidas de espalhamento de raios X a ultra baixo ângulo (USAXS) foram realizadas na linha Cateretê (Sirius) na energia de 10 keV com feixe pink (1% largura de banda). Os fótons espalhados foram detectados usando um detector PiMega540D a uma distância amostra-detector de 10 m para as amostras secas e 6 m para as amostras úmidas, cobrindo uma faixa q de 0,005-0,58 nm⁻¹.

Os materiais foram testados secos e durante os processos de processos de adsorção e liberação do fármaco ciprofloxacina, *in situ*. Para isso, utilizou-se tiras finamente cortadas dos filmes CB e CB/Lap 5, 10, 15 e 30%, que foram introduzidos em capilares de quartzo de 1,5 mm de diâmetro para análise do material seco. Posteriormente a coleta da primeira leitura, o capilar foi preenchido com uma solução contendo 1000 mg.L⁻¹ do fármaco ciprofloxacina, para avaliar o intumescimento e possíveis mudanças estruturais das matrizes frente a adsorção do fármaco.

Já os testes de USAXS avaliando a liberação da ciprofloxacina pelos filmes foram obtidos utilizando membranas já contendo o fármaco, carregado durante o processo de adsorção. Os filmes CB, CB/Lap 5, 10, 15 e 30% contendo ciprofloxacina foram finamente cortados e colocados em capilares de quartzo, semelhante ao realizado anteriormente. Foi realizado uma leitura com a amostra seca e o capilar foi preenchido com solução tampão fosfato (pH 7,2), o mesmo utilizado com o meio receptor utilizado no processo de liberação (Vide Capítulo 2).

A integração azimutal dos dados de USAXS foram realizadas usando o PyFAI (KIEFFER; KARKOULIS, 2013) e a análise de modelos e ajuste Guinier, foram realizadas usando o software SasView.

Para o imageamento das amostras, foram realizadas medidas de Pticografia (CXDI por varredura) em 2D e 3D utilizando feixe de Raios-X a 6 keV. As amostras CB, CB/Lap 10 e 50% foram incorporadas em meio congelante PolyFreeze (Polysciences, Inc.) e cortadas com o criostato Leica CM1950 a -10°C para obtenção de tiras de aproximadamente 15 µm de espessura. As tirar foram coletadas em lâminas de vidro e lavadas com água deionizada. Para obtenção de um espécime isolado para as medidas de pticografia as tirar foram recortadas com um microscópio de microdissecção a laser (Leica LMD7) para obtenção de espécimes

com aproximadamente 20 μm de altura. As amostras foram transferidas para membranas de nitreto de silício de 100 nm de espessura. As membranas de silício foram transferidas para a cabana experimental da linha Cateretê e alinhadas com o auxílio de um microscópio óptico. Os padrões de difração foram coletados usando um detector PiMega540D a uma distância amostra-detector de 20 m. A iluminação na amostra foi definida com um pinhole de 10 micrômetros de diâmetro. As trajetórias de posição para cada varredura 2D foram definidas usando uma grade com um tamanho médio de passo de 2 μm . O campo de visão coberto para cada projeção foi de 40 μm^2 para as amostras CB e CB/Lap 10% e 28 μm^2 para a amostra CB/Lap 50%. Para a tomografia a cobertura angular total 153° com passo angular de 0,48°, resultando em 750 projeções. As reconstruções pticográficas em 2D e 3D foram realizadas com o auxílio de um código desenvolvido pelo grupo de computação científica (GCC) do Sirius. A segmentação para separação entre a matriz de celulose e a estrutura porosa foi realizada usando o software Avizo (Thermo Scientific™). As imagens foram segmentadas usando threshold baseado me nível de valores de cinza.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 – Espalhamento de Raios-X a Ultra Baixo Ângulo (USAXS)

Os resultados da morfologia em nanoescala dos materiais CB e CB/Lap 5, 10, 15 e 30% foi investigada por espalhamento de Raios-X a Ultra Baixo Ângulo (USAXS) e podem ser observados na Figura 1.

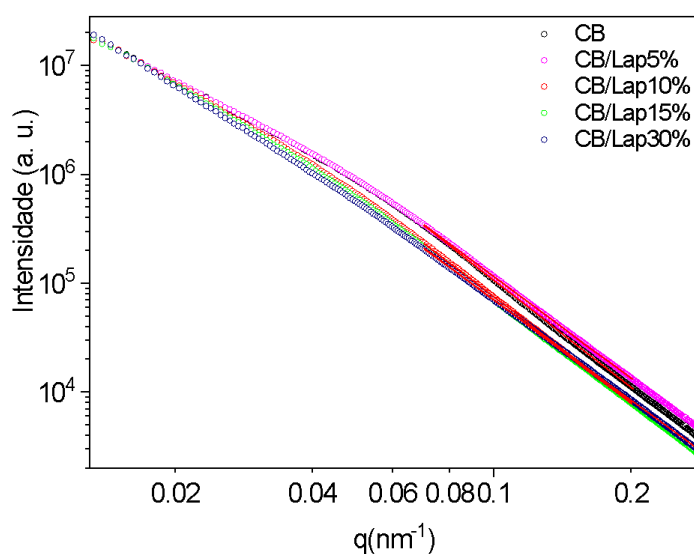


Figura 1: Curvas USAXS para as amostras CB e CB/Lap com diferentes teores de argila.

Considerando o comprimento longo das fibras de celulose observados anteriormente nas imagens de MEV, presentes no Capítulo 2, a dispersão de USAXS observada será útil para verificar dados de seção transversal das estruturas e a interfaces entre as fibrilas e os feixes de fibrilas, que pode trazer informações estruturais em várias escalas (KHANDELWAL; WINDLE, 2014).

As curvas de USAXS podem ser divididas em duas regiões: região de alto q ($0,07 \text{ nm}^{-1} < q < 0,2 \text{ nm}^{-1}$) que corresponde a escala de tamanho de aproximadamente 31 a 89 nm representando dispersão da matriz de fibras polimérica (que apresentam valores entre 59 e 85 nm, vide Capítulo 2) e região de baixo q ($0,02 \text{ nm}^{-1} < q < 0,07 \text{ nm}^{-1}$ (89 a 314 nm)) representando as cavidades e estruturas sub-micrométricas que formam a porosidade (CHEN et al., 2022).

Avaliando os dados apresentados na Figura 1, é possível obter informações sobre a seção transversal dos feixes de fibrilas utilizando a aproximação de Guinier, considerando espalhamento para bastonetes longos (KHANDELWAL; WINDLE, 2014). Assim, o raio crítico do elemento de espalhamento foi obtido a partir da inclinação do gráfico de $\ln(qI(q)) \times q^2$ em baixo valor de q . Desta forma, verifica-se valores de diâmetros correspondentes à 57, 57, 60, 63 e 66 nm para CB, CB/Lap 5%, CB/Lap 10%, CB/Lap 15% e CB/Lap 30%, respectivamente, o que indica um aumento do diâmetro das fibras com o aumento da quantidade de argila nas amostras. Vale pontuar que nas imagens de microscopia eletrônica de varredura dos materiais, presentes no Capítulo 2 desta tese (na Fig 2 e 3), o mesmo efeito foi observado, indicando uma deposição da argila na superfície das fibras de celulose.

Agora, informações sobre as mudanças na interface poro-sólido com a adição de laponita foram obtidas através da inclinação na região de Porod, e podem ser observados na Figura 2.

A região de alto valor de q ($0,07 \text{ nm}^{-1} < q < 0,2 \text{ nm}^{-1}$) observada é caracterizada por uma tendência linear, o que satisfaz a lei Porod, expressa pela equação a seguir (Fórmula 1)

$$I(q) \propto q^{-\alpha} \quad (1)$$

Em sistemas tridimensionais com estrutura fractal o expoente α é igual a dimensionalidade fractal ($\alpha = D$). As estruturas fractais podem ser fractais de massa ou de superfície, que apresentam como potências a $\alpha \leq 3$ e $3 < \alpha < 4$, respectivamente.

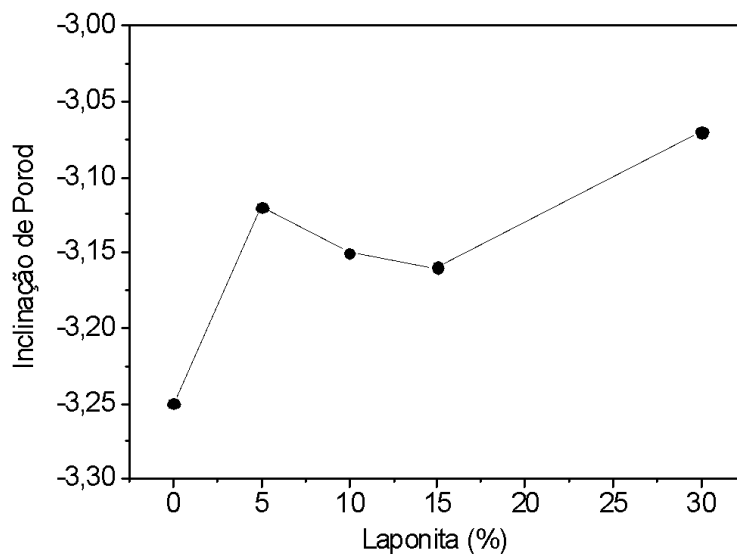


Figura 2: Inclinação de Porod em função do teor de laponita.

Observado as inclinações do Porod entre 3 e 4 das membranas seca, é possível verificar o espalhamento de superfícies rugosas sendo que, as inclinações do Porod diminuem de com o aumento de argila na amostra, onde observa-se valores de 3,25, 3,12, 3,15, 3,16 e 3,05, para CB, CB/Lap 5%, CB/Lap 10%, CB/Lap 15% e CB/Lap 30%, respectivamente. A mudança para menores valores de inclinação nessa região sugere que as interfaces poro-sólido tornaram-se cada vez mais rugosas com a presença da argila, sendo esse mais um indício da deposição da argila na superfície das fibras.

Agora, avaliando o padrão de espalhamento da amostra durante o processo de adsorção do fármaco ciprofloxacina, presente na Figura 3, não foi possível observar nenhuma orientação preferencial das estruturas, sugerindo a orientação isotrópica da matriz polimérica.

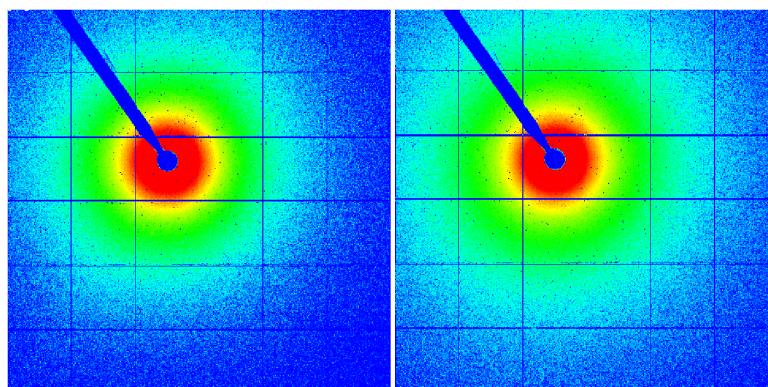


Figura 3. Padrão 2D do espalhamento de raios X em ultra baixo ângulo da amostra (a) CB e (b) CB/Lap 10%.

Nos testes realizados durante o processo de adsorção, presentes na Figura 4, as estruturas fractais das amostras apresentam expoente de Porod $\alpha \leq 3$, correspondente a estruturas fractais de massa e não de superfície como observado nas amostras secas.

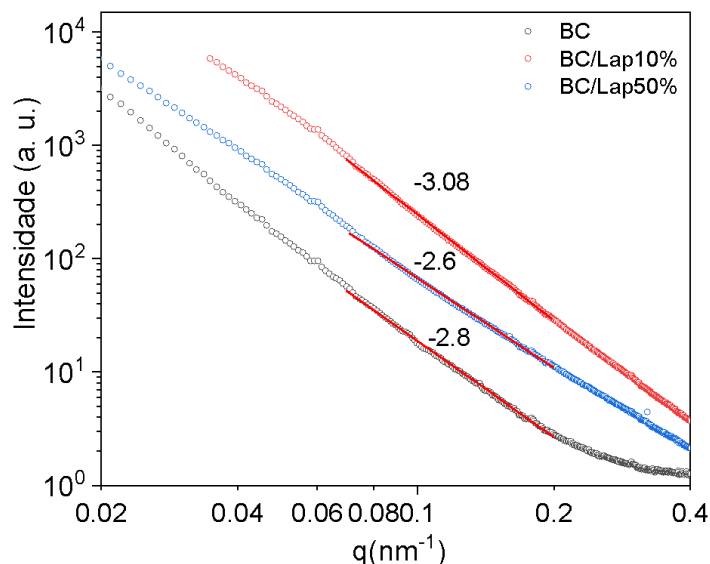


Figura 4. Curvas USAXS para as amostras CB e CB/Lap em solução de Ciprofloxacina

As estruturas fractais de massa na celulose podem ser interpretada como a dimensão fractal de estrutura mais aberta ou ramificada que corresponde as fibrilas que formam a fibra de celulose (PENTTILÄ et al., 2010). Para uma estrutura de nanofibras fractais de massa, quanto maior a dimensão fractal, mais complexa a ramificação (GUCCINI et al., 2018). A maior dimensão fractal observada foi de 3,08 para a amostra CB/Lap 10%, indicando que a incorporação do fármaco nesse compósito leva a formação de uma estrutura de nanofibras mais compactas, o que indica um processo de transferência de massa para a superfície das fibras.

Com o aumento do teor de argila na amostra, como a CB/Lap 50%, ainda se observa a diminuição da ramificação durante o processo de adsorção, contudo, em menor intensidade comparado com a CB/Lap 10%.

De fato, a presença da argila nas amostras ocasionou em um efeito de “compactação” dos materiais, conforme observado nas figuras de MEV do Capítulo 2. A laponita, conforme mencionado anteriormente, apresenta carga superficial negativa devido a troca isomórfica de íons de Mg^{2+} por Li^+ , ocasionando em uma deficiência de carga positiva, que é contrabalanceada por cátions interlamelares (no caso Na^+) (LEZHNINA et al., 2012). Desta

forma, a deposição superficial das argilas no processo de obtenção dos compósitos, conforme discutido no Capítulo 2, pode provocar um aumento do diâmetro das fibras, como discutido acima, e um processo de “compactamento” do material, seja pela oclusão dos poros, devido a presença da laponita, ou devido as interações eletrostáticas que podem ocorrer entre as fibras recobertas com o material lamelar.

Interessante ressaltar que o compósito CB/Lap 10% apresentou características de compósitos esfoliados pela ausência do pico 001, conforme discutido no DRX do Capítulo 2, e, portanto, as lamelas (com deficiência de carga positiva) estariam mais uniformemente distribuídas na superfície das fibras. Sendo assim, a presença de espécies carregadas positivamente (como a ciprofloxacina), poderia provocar um efeito de atração eletrostática entre as fibras, compactando ainda mais o material e ocasionando no efeito de maior dimensão fractal observado. Contudo, ressaltamos que não foi encontrado precedentes discutindo esse fenômeno na literatura, o que deixa essa discussão no campo hipotético.

Agora, avaliando os resultados *in situ* envolvendo a liberação do fármaco, a Figura 5 demonstra o padrão de espalhamento das amostras ainda secas de CB e CB/Lap 10% contendo ciprofloxacina.

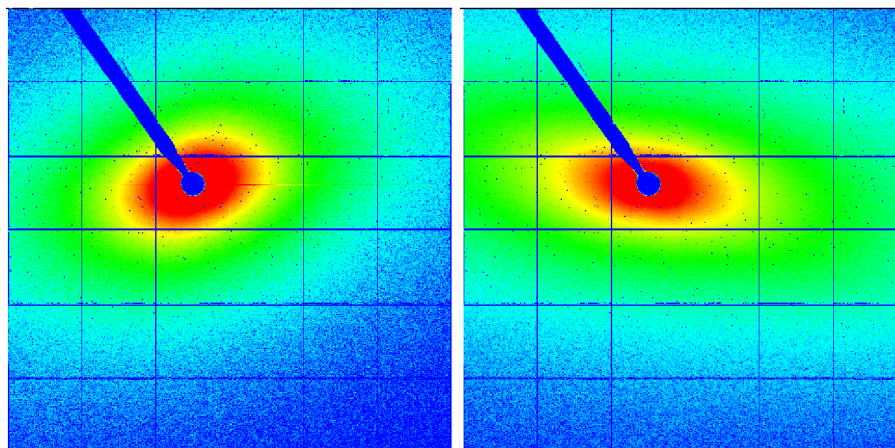


Figura 5. Padrão 2D do espalhamento de raios X em ultra baixo ângulo da amostra CB (a) e CB/Lap10% (b) com ciprofloxacina.

Observando as imagens de espalhamento, após a introdução de ciprofloxacina na celulose é possível notar a ocorrência de uma mudança significativa na orientação das fibras. Comparando com a Figura 3, nota-se que o espalhamento da radiação observado se torna anisotrópico (CHEN et al., 2022; WEI et al., 2019), característico de fibras alinhadas, indicando que há uma reorganização das fibras após a entrada do medicamento na amostra.

Esse efeito é mais pronunciado na amostra CB/Lap10% apresentando um ligeiro aumento na anisotropia comparado a amostra CB. Desta forma, é possível propor que a presença do fármaco nas amostras provoca uma mudança estrutural, sendo mais pronunciada no compósito CB/Lap 10%, o que corrobora com a hipótese levantada anteriormente.

Já durante o estudo *in situ* do processo de liberação do fármaco, apresentado na Figura 6, nota-se que a amostra CB/Lap 10% apresenta uma evolução da anisotropia com de acordo com o tempo de contato com o meio receptor.

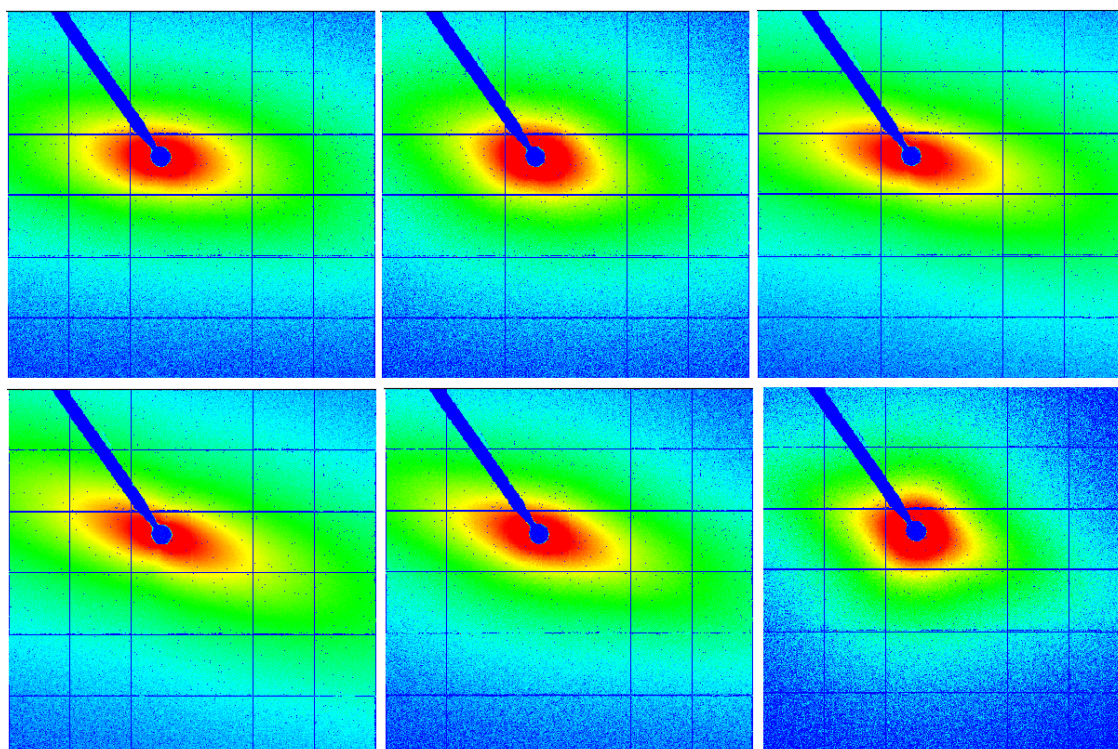


Figura 6. Padrão 2D do espalhamento de raios X em ultra baixo ângulo da amostra CB/Lap 10% em diferentes tempos durante a liberação da ciprofloxacina.

É interessante notar que há um progressivo aumento da anisotropia até 70 min, indicando o crescente alinhamento das fibras. Após esse período a anisotropia diminui e após 2h de liberação as fibras retornam a um estado de menor orientação do que o estado inicial da liberação da ciprofloxacina. Essa tendência também é observada para a amostra CB em menor intensidade, conforme demonstrado na Figura 7.

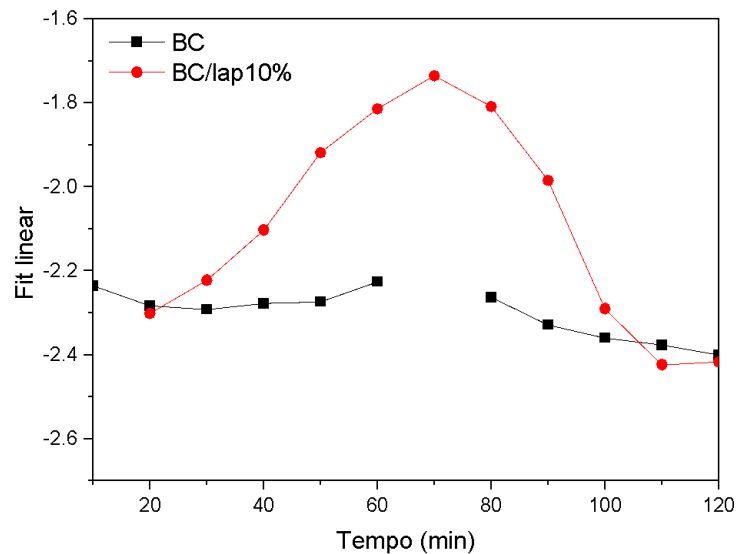


Figura 7: Inclinação de Porod durante a liberação do fármaco para CB e CB/Lap10%.

A evolução da orientação das fibras de celulose também pode ser observada na inclinação de Porod. Nas amostras úmidas o expoente de Porod $\alpha \leq 3$, corresponde a dimensão fractal das fibrilas de celulose e quanto maior a dimensão fractal mais ramificado o sistema (VALENCIA et al., 2019). Após 20 min de liberação o expoente observado apresenta um valor de 2,3 para a amostra CB/Lap 10%, já com o aumento do tempo observamos a diminuição do expoente sendo 1,73 em 70 min.

Essa diminuição indica uma menor ramificação da estrutura devido ao crescente alinhamento das fibras, observado nos padrões 2D de USAXS (Figura 6). Após 70 min ocorre novamente um aumento da ramificação da estrutura, com máximo em 120 min (expoente 2,42), indicando que ao final da liberação da ciprofloxacina a estrutura volta a um estado mais ramificado.

Desta forma, comparando com o mecanismo de liberação observado no Capítulo 2, verificou-se um comportamento de liberação anômalo, onde a taxa de intumescimento e relaxamento dos filmes são correspondentes. Sendo assim, é possível propor que nesse processo observado, conforme ocorre o intumescimento dos filmes, ocorre também o processo de relaxação e liberação do fármaco no meio receptor. Desta forma, a mudança da dimensão fractal pode corresponder a saída do fármaco da amostra durante o processo de intumescimento, indicando assim a descompactação do material e o reaparecimento da estrutura ramificada.

Vale notar que o efeito também é perceptível na CB, contudo em menor intensidade que no compósito, indicando que a presença da argila pode causar grande influência no processo de relaxamento das fibras e consequentemente influencia no processo de liberação.

4.2 – Pticografia 3D (CXDI)

As Figuras 8 e 9 correspondem às reconstruções de fase tomográfica da amostra de CB e do corte do material para visualização interna.

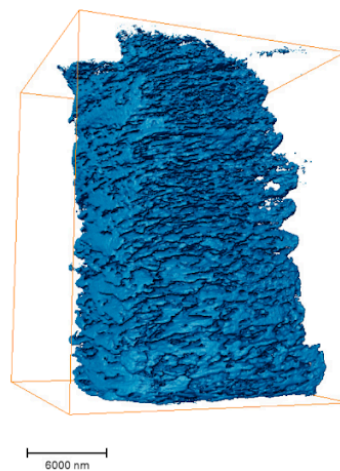


Figura 8: Imagem de tomografia Pticográfica da estrutura tridimensional da CB.

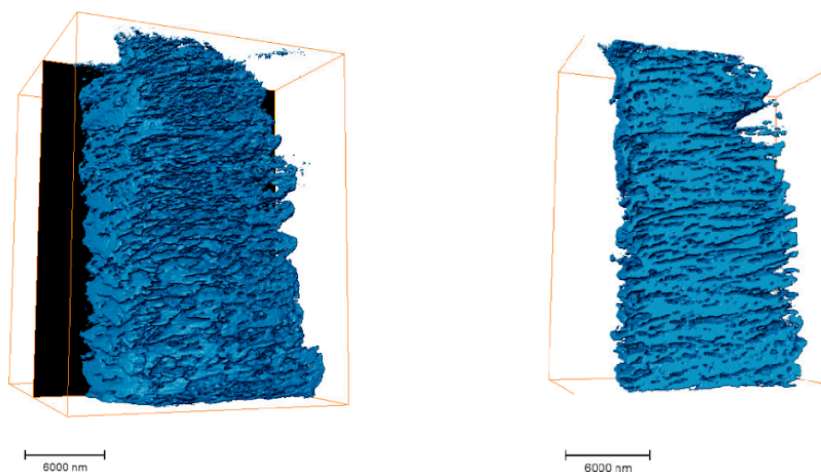


Figura 9: Imagem de Pticografia do plano de corte (esquerda) e do corte transversal (direita) da CB, reconstituída via software.

Observando as imagens obtidas, é possível identificar claramente que a CB apresenta uma estrutura porosa tridimensional, onde se verifica certo empilhamento de fibras e formação de cavidades e canais. Correlacionando com as imagens de MEV do corte transversal da amostra, observadas no Capítulo 2, nota-se a mesma estrutura de empilhamento vista anteriormente. Contudo, com o auxílio da pticografia é possível compreender melhor a formação dos canais e a distribuição dos poros em três dimensões na amostra, podendo verificar um material altamente poroso e com canais de difusão por todo o material.

Através da segmentação é possível distinguir as fibras e os poros da amostra. A Figura 10 representa a visão interna da porosidade e estrutura das fibras da CB.

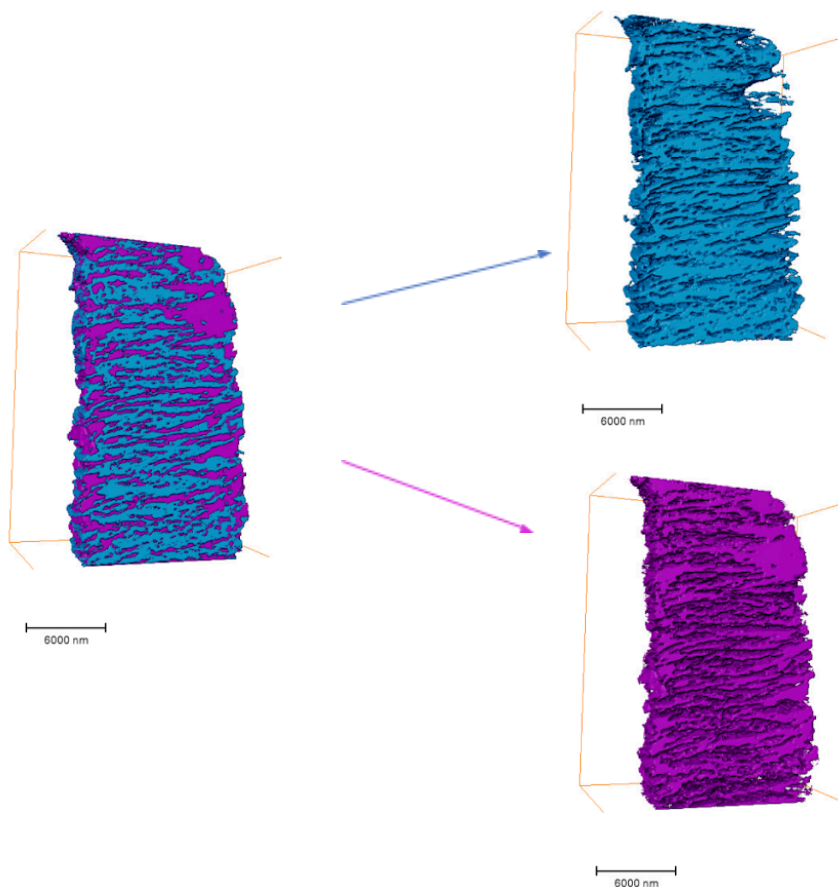


Figura 10: Visão interna do corte transversal da CB demonstrando as fibras (azul) e a cavidade ou poros (rosa) da estrutura tridimensional.

Desta forma, é possível verificar que a CB apresenta um conjunto de canais interligados por toda a amostra. Esses canais facilitam a passagem de solvente e vapor, o que

pode explicar o comportamento observado nos testes de permeabilidade ao vapor de água (Capítulo 2), onde a CB em comparação com os compósitos apresentou maior permeabilidade, e a liberação mais acelerada do fármaco no polímero, visto que facilita o transporte do meio receptor pela amostra.

Penttilä *et al* (PENTTILÄ *et al.*, 2010), observou estrutura tridimensional fibrosa, semelhante ao presente trabalho, em análises de microtomografia 3D de Celulose Microcristalina (MCC). Interessante notar que pela técnica aplicada foi possível verificar mudanças nas partículas em microescala ocasionadas pela hidrólise da celulose durante a obtenção das MCC.

Agora, comparando com as imagens tridimensionais, e seus respectivos cortes transversais, dos compósitos CB/Lap 10% e CB/Lap 50%, demonstrados nas Figuras 11 e 12 e Figuras 13 e 14, respectivamente é possível observar claramente a interferência da argila na estrutura do material.

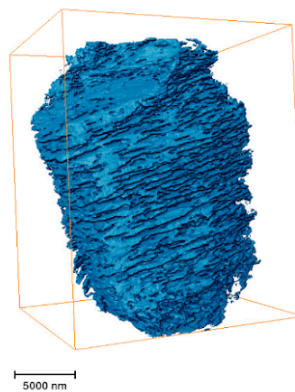


Figura 11: Imagem de tomografia Pticrográfica da estrutura tridimensional da CB/Lap 10%.

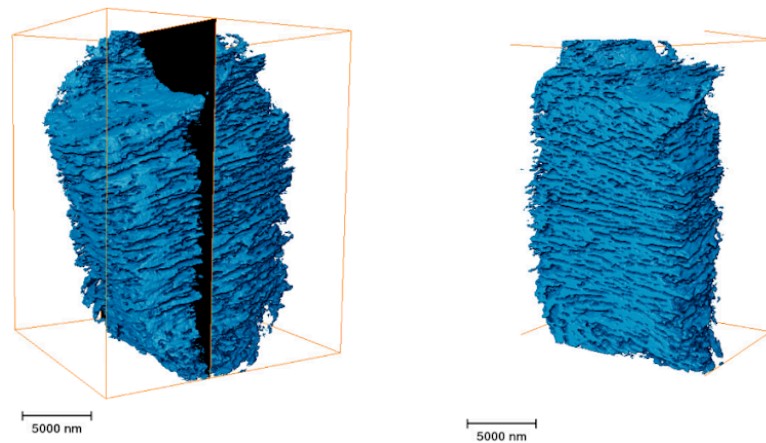


Figura 12: Imagem de tomografia Pticográfica do plano de corte (esquerda) e do corte trasnsversal (direita) da CB/Lap 10%.

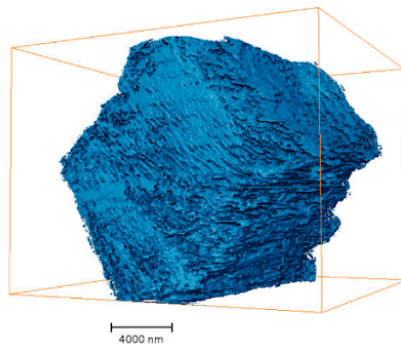


Figura 13: Imagem de tomografia Pticográfica da estrutura tridimensional da CB/Lap 50%.

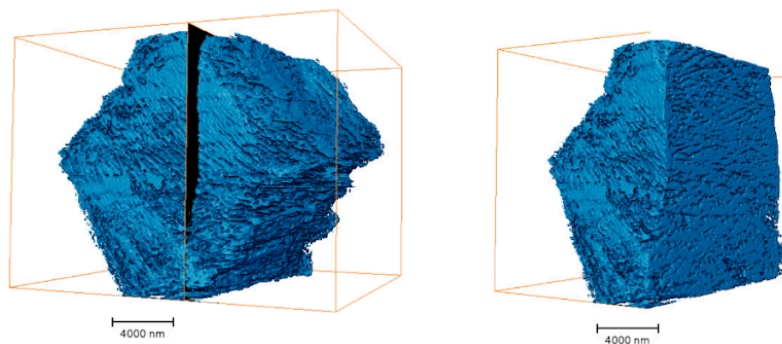


Figura 14: Imagem de tomografia Pticográfica do plano de corte (esquerda) e do corte trasnsversal (direita) da CB/Lap 10%.

Pelas imagens tridimensionais dos compósitos nota-se que os materiais ainda apresentam estrutura porosa e com fibras empilhadas, semelhante a CB. Contudo, com o aumento do teor de argila, é possível ver o empacotamento progressivo da estrutura, o que condiz com os dados observados nas imagens de MEV (Capítulo 2) e com os resultados de USAXS discutidos anteriormente.

Agora, verificando as fibras e as cavidades dos materiais CB/Lap 10% e 50%, Figura 15, nota-se grande influência das argilas na diminuição do volume dos canais e poros dos materiais.

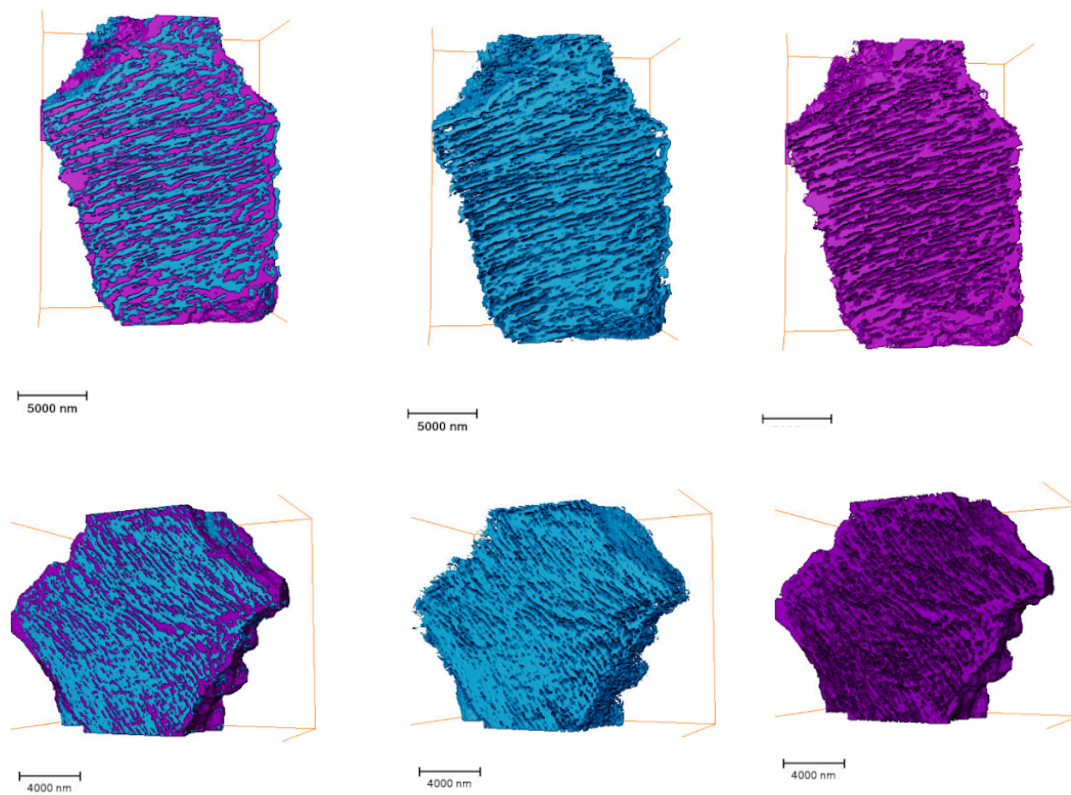


Figura 15: Visão interna do corte transversal da CB/Lap 10% (a) e CB/Lap 50% (b) demonstrando as fibras (azul) e a cavidade ou poros (rosa) da estrutura tridimensional.

Observando as estruturas tridimensionais obtidas, fica mais nítido o efeito de compactação que a presença da argila provoca nos compósitos, e com o aumento do teor da laponita esse efeito tende a aumentar, corroborando para as hipóteses de interação eletrostática e deposição superficial da argila nas fibras.

Vale ressaltar também que a diminuição do volume dos canais e poros dos materiais compósitos, em comparação com a CB, provoca o efeito da diminuição na permeabilidade ao vapor de água observado no Capítulo 2.

Além disso, estabelecendo um paralelo com o processo de liberação da ciprofloxacina nos materiais compósitos, o compactamento da amostra e diminuição dos canais de difusão pode provocar uma dificuldade no transporte do solvente pela amostra, o que explicaria o controle da liberação observados no Capítulo 2. E como no processo de liberação anômalo, a taxa de difusão e relaxamento são compatíveis, fica claro o motivo dos compósitos apresentam maior controle da liberação do fármaco.

5 – CONCLUSÃO DO CAPÍTULO 3

No presente capítulo explorou-se técnicas de luz síncrotron, mais especificamente USAXS e Pticografia 3D para caracterização estrutural mais aprofundada dos compósitos CB/Lap, obtidos no Capítulo 2. Os resultados apresentados demonstram que a argila se deposita na superfície das fibrilas, o que provoca um aumento no diâmetro e rugosidade das estruturas fibrosas. Além disso, pelas imagens tridimensionais obtidas fica claro o efeito de compactação do material e conseqüentemente a diminuição do tamanho dos poros e canais de difusão em decorrência do aumento do teor de argila no material, justificando assim os resultados de diminuição da permeabilidade e controle da liberação do fármaco na amostra (como discutido no Capítulo 2). Sendo assim, conclui-se que as técnicas utilizadas foram cruciais para compreender melhor as estruturas dos materiais obtidos e os mecanismos envolvidos no processo de liberação.

6 – REFERÊNCIAS

CHEN, Q. et al. Cellulose-Reinforced Programmable and Stretch-Healable Actuators for Smart Packaging. **Advanced Functional Materials**, v. 32, n. 49, 3 dez. 2022.

CNPEM, C. NACIONAL DE PESQUISA EM E. E M. **Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM)**. Disponível em: <<http://www.cnpem.br/>>. Acesso em: 30 jan. 2024.

GÓRECKI, R. et al. Ptychographic X-ray computed tomography of porous membranes with nanoscale resolution. **Communications Materials**, v. 4, n. 1, p. 68, 2 set. 2023.

GUCCINI, V. et al. Inducing nematic ordering of cellulose nanofibers using osmotic dehydration. **Nanoscale**, v. 10, n. 48, p. 23157–23163, 2018.

KHANDELWAL, M.; WINDLE, A. H. Small angle X-ray study of cellulose macromolecules produced by tunicates and bacteria. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 68, p. 215–217, 2014.

KIEFFER, J.; KARKOULIS, D. PyFAI, a versatile library for azimuthal regrouping. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 425, n. PART 20, 2013.

LEZHNINA, M. M. et al. Laponite blue: Dissolving the insoluble. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 51, n. 42, p. 10652–10655, 2012.

LNLS. **LINHA DE LUZ CATERETÊ**. Disponível em: <<https://lnls.cnpem.br/facilities/caterete/>>.

LNLS. **Laboratório Nacional de Luz Síncrotron - SIRIUS (CNPEM)**. Disponível em: <<http://www.lnls.cnpem.br/>>.

OLSSON, M. et al. Multiscale X-ray imaging and characterisation of pharmaceutical dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 642, n. May, 2023.

PENTTILÄ, P. A. et al. Changes in Submicrometer Structure of Enzymatically Hydrolyzed Microcrystalline Cellulose. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 4, p. 1111–1117, 2010.

PERES, L. M. C. (USP/SÃO C. **3D X-ray imaging of Precambrian microfossils: evaluating biogenicity at the nanoscale with ptychographic X-ray computed tomography**. [s.l.] USP, 2019.

POLO, C. C. et al. Correlations between lignin content and structural robustness in plants revealed by X-ray ptychography. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2020.

RAUEN, C. V. O Projeto Sirius e as encomendas tecnológicas para a construção da nova fonte de luz Síncrotron brasileira. **Políticas de inovação pelo lado da demanda no Brasil**, p. 229–371, 2017.

SUZANA, A. F. et al. In situ three-dimensional imaging of strain in gold nanocrystals during catalytic oxidation. **Nanoscale Advances**, v. 1, n. 8, p. 3009–3014, 2019.

SVERGUN, D.; BARBERATO, C.; KOCH, M. H. CRY SOL - A program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. **Journal of Applied Crystallography**, v. 28, n. 6, p. 768–773, 1995.

VALENCIA, L. et al. Nanocellulose/graphene oxide layered membranes: Elucidating their behaviour during filtration of water and metal ions in real time. **Nanoscale**, v. 11, n. 46, p. 22413–22422, 2019.

WEI, P. et al. Unique Stress Whitening and High-Toughness Double-Cross-Linked Cellulose Films. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 7, n. 1, p. 1707–1717, 2019.

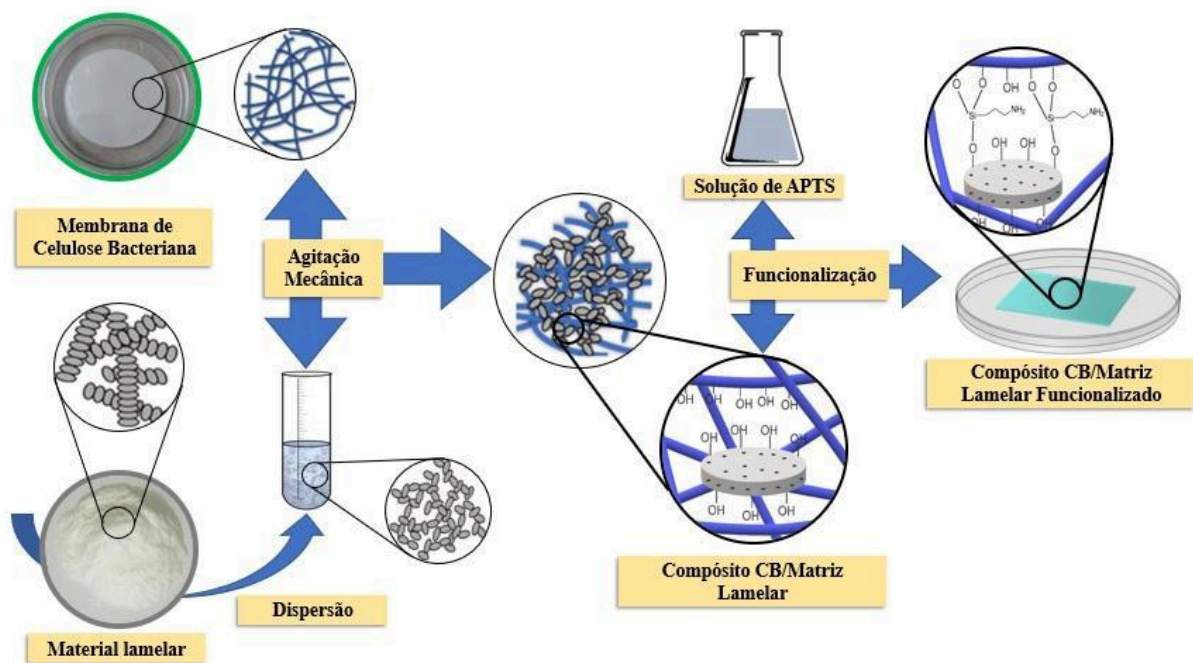
**CAPÍTULO 4 – PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPÓSITOS A BASE DE
CELULOSE BACTERIANA E LAPONITA ORGANOFUNCIONALIZADOS COM
GRUPOS AMINO VISANDO APLICAÇÕES MÉDICO-FARMACEUTICAS**

RESUMO

Neste último capítulo iniciou-se o desenvolvimento de um novo material compósito, organomodificado. Recapitulado algumas informações para contextualizar esse desenvolvimento, a CB em comparação com os curativos tradicionais apresenta características interessantes no tratamento de lesões cutâneas como: o alívio imediato da dor, a manutenção da umidade local, a ação como barreira física de proteção, e a adsorção de exsudatos durante a fase inflamatória; contudo, não possuem propriedade antibacteriana intrínseca. Nesse sentido, esta etapa final do trabalho teve como objetivo a obtenção de compósitos à base de CB e a argila Laponita organofuncionalizados com (3-Aminopropil)trimetoxisilano (APTS) para o desenvolvimento de um novo material visando aplicações médico-farmacêuticas como precursor de curativos multifuncionais com ação antibacteriana e possível sistema de liberação de fármacos pH dependente. Os espectros de infravermelho obtidos dos materiais organofuncionalizados demonstram bandas referentes aos grupos $-NH_2$ e $Si-O$, da estrutura do silano e da argila—na amostra CB, APTS-CB, APTS-CB/Lap 15, 30 e 50%, indicando a presença dos materiais nos filmes. As análises de difração de Raios -x mostraram mudanças nos picos característicos da CB provocados pelo APTS, sendo esse mais um indício de modificação da estrutura da CB. Nos dados de microscopia eletrônica de varredura, observa-se estruturas superficiais em forma de fibras nanométricas, com diâmetro médio de $59,8 \pm 14,0$, $59,8 \pm 26,2$, $69,7 \pm 26,5$ e $75,6 \pm 18,3$, para as amostras CB, APTS-CB, APTS-CB/Lap 15, 30 e 50%, respectivamente. Observa-se também a redução na estabilidade térmica de APS-CB em relação a CB, mas melhorada pela presença de Laponita. Espectros de Raman indicam a interação do silano com CB. E por fim, a redução na permeação ao vapor de água (PVA) é observada com a presença crescente de Laponita. Dados indicam o potencial destes polímeros para aplicação como curativos ou para liberação de fármacos.

Palavras-Chave: Celulose Bacteriana, Laponita, Funcionalização, Curativos, Liberação de fármacos.

RESUMO GRÁFICO



1- INTRODUÇÃO

Recapitulando pontos importantes para a discussão deste capítulo, se tratando de feridas cutâneas com perda de pele, a infecção por patógenos é uma das principais complicações na cicatrização e cura de feridas, uma vez que a área comprometida perde a função de barreira de proteção e fica mais suscetível à contaminação por micro-organismos. Além disso, acabam prolongando o tratamento o que gera não apenas um aumento nos custos do tratamento como também eleva o sofrimento dos pacientes e familiares (BRASIL, 2018a).

Curativos à base de celulose bacteriana (CB) apresentam melhores resultados comparado aos curativos convencionais, tanto no tempo de cicatrização de feridas e administração eficiente de medicamentos, quanto no custo benefício (BRASIL, 2018a). O polímero age como barreira física de proteção que diminui a taxa de contaminação externa, a adsorção de exsudatos durante a fase inflamatória, entre outras características que aceleram o processo de cura e encurtam o tempo de tratamento da lesão (BRASIL, 2018b; HSU et al., 2022; MUANGMAN et al., 2011; ULLAH et al., 2016). Entretanto, membranas pristinas de CB são limitadas por não possuírem ação antibacteriana, servindo apenas de barreira contra micro-organismos (OLIVEIRA BARUD et al., 2015).

A celulose bacteriana apresenta diversos grupos hidroxila (-OH) em sua estrutura, conforme amplamente demonstrado no Capítulo 2, que podem sofrer condensação em processo de funcionalização com organosilanos (também conhecido como reação sol-gel), promovendo modificação superficial do material. Desta forma, essa é uma rota interessante para inserção de grupos funcionais de interesse na superfície do polímero, o que podendo fornecer assim propriedades antibacterianas ao polímero (FERNANDES et al., 2013).

Agora, se tratando da modificação superficial de compósitos, os materiais obtidos no Capítulo 2, a base de CB e laponita, também podem sofrer modificação superficial via silanização, uma vez que, assim como a CB, a argila possui hidroxila em sua estrutura, mais especificamente grupos silanóis ($\equiv\text{Si-OH}$), nas arestas das lamelas que também podem ser funcionalizados com organosilanos (JABER; MIEHÉ-BRENDLÉ, 2009), e possivelmente também obter característica antibacteriana.

1.1 – Processo sol-gel e funcionalização de materiais

O processo sol-gel é uma rota já bastante conhecida e explorada para modificação e produção de materiais, em especial polímeros, cerâmicas e vidros (SILVA; SANTOS, 2022).

A técnica baseada na hidrólise e condensação de alcoóxidos, apresenta essa nomenclatura pois possui fases bem características, a primeira, denominada “Sol”, é atribuída a suspensão coloidal onde partículas do ativo estão dispersas em uma fase líquida. Já o termo “Gel” deve-se a característica gelatinosa representada por uma rede sólida e porosa rodeada de uma fase líquida que ocorre pela agregação das partículas em suspensão (SILVA; SANTOS, 2022).

O processo de baseia-se nas reações de hidrólise-condensação que ocorre com os alcoóxidos (Si-OR), onde os silanos em contato com água liberam sua ramificação e formam silanois (Si-OH). Posteriormente, os precursores formados podem reagir com cadeias de alcóóxido ainda não hidrolisados, liberando álcoois, ou com grupos hidroxila liberando água, formando ligações do tipo -Si-O-Si. A Figura 1, adaptada do trabalho de Silva e Santos (SILVA; SANTOS, 2022) demonstra sucintamente os processos reacionais do método sol-gel.

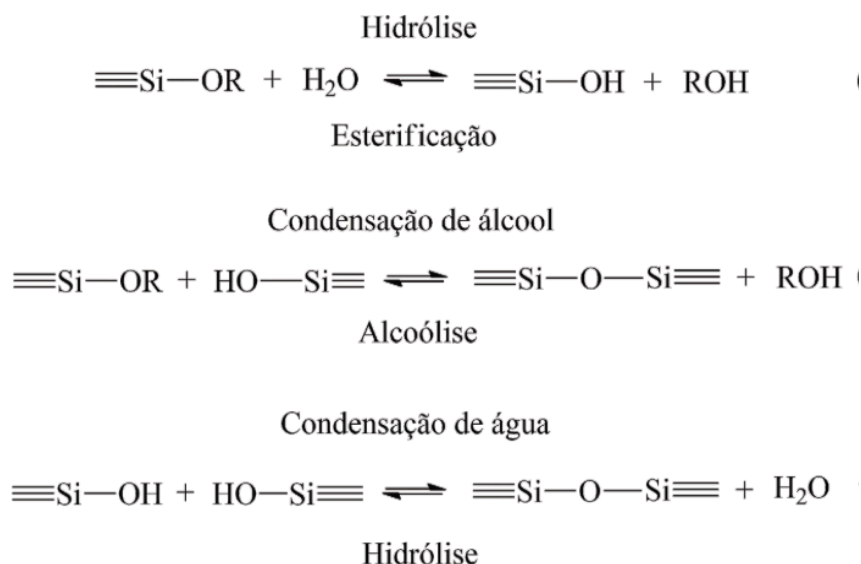


Figura 1: Etapas reacionais envolvidas no processo sol-gel baseado em hidrólise de alcoóxidos. Fonte (SILVA; SANTOS, 2022).

Desta forma, o processo sol-gel é amplamente utilizado para a produção de híbridos orgânicos-inorgânicos, uma vez que o meio reacional brando mantém a integridade dos compostos orgânicos possibilita a formação blocos orgânicos-inorgânicos com a formação de sílica, decorrente do processo. E se tratando de polímeros orgânicos, as redes orgânica e inorgânica (rede de sílica) poderão apresentar interpenetrações, sem necessariamente possuir ligações covalentes entre os materiais, ocasionando na formação de compósitos (SILVA; SANTOS, 2022).

Além disso, o método sol-gel também é utilizado para funcionalização de grupos orgânicos de interesse pelo uso dos chamados organoalcoxilano (ou simplificando como organosilanos), onde um grupo orgânico (R') substitui pelo menos um dos grupo -OR. Desta forma, como a ligação -Si-C-R' se mantém estável durante o processo de hidrólise, o grupo funcional orgânico fica retido na estrutura final do processo (SILVA; SANTOS, 2022).

Diversos trabalhos na literatura utilizam organosilanos para funcionalização da celulose bacteriana (CB) aproveitando grupos C-OH presentes na estrutura do material nas reações de condensação. Como no trabalho de Fernandes *et al* (FERNANDES et al., 2013) onde a CB foi quimicamente modificada por 3-aminopropiltrimetoxissilano (APTS), que possui um grupo nitrogenado, a fim de conferir propriedades antibacterianas semelhante às da quitosana e observou-se que o material obteve a ação antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e não demonstrou ser tóxico para células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano (ADSCs).

E tratando-se de argilas, é comum trabalhos utilizando organosilanos para incorporação de grupos funcionais nos materiais inorgânicos através das reações com Si-OH presentes nos materiais inorgânicos. Como no trabalho de Gilberto *et al* (GILBERTO et al., 2015) que obteve híbridos a base de bentonita e diferentes organosilanos, (3-aminopropil) trietoxissilano (APTES), N1-(3-trimetoxissililpropil)dietilenotriamina (TMPT) e N-[3-(trimetoxissilil)propil]etilenodiamina (TMPO), para incorporação de grupos amino com objetivo de retirar Cr³⁺ da água.

Desta forma, semelhante ao realizado no trabalho de Fernandes et al (FERNANDES et al., 2013), é possível carregar grupos funcionais na superfície dos compósitos CB/Lap e obter materiais com propriedades antibacterianas intrínseca ao material. Além disso, a funcionalização com APTS equipará os compósitos com grupos amino (R-NH₂), podem interagir com os fármacos por forças intermoleculares e podem modificar o perfil de liberação dos fármacos comparados aos compósitos não funcionalizados. E pela possível protonação do grupamento devido ao par de elétrons não ligantes presentes na nuvem eletrônica do nitrogênio (GINSBURG, 1967), o material poderá demonstrar um comportamento de liberação dependente do pH.

2 – OBJETIVOS

O principal objetivo do presente capítulo concentrou-se na funcionalização dos compósitos CB/Lap (descritos no Capítulo 2) com o organossilano 3-aminopropiltrimetoxissilano (APTS) para ancoragem de grupamento amino e posterior caracterização térmica, física e morfológica, visando aplicações médico-farmacêuticas.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Materiais

A obtenção dos compósitos utilizando para funcionalização, bem como a origem da CB, já foram descritos no Capítulo 2. O APTS foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich e a acetona utilizada como solvente é da marca Synth.

3.2 - Métodos

Baseado no trabalho de Fernandes et al. (FERNANDES et al., 2013), os compósitos foram organofuncionalizados submergindo os filmes de CB carregadas com Laponita (15, 30 e 50% m/m) em 100 mL de soluções de acetona contendo 10% de 3-aminopropiltrimetoxissilano (APTS) (v/v), sob agitação mecânica a 25°C por 6 h. Posteriormente, os materiais foram lavados com acetona para remoção do silano sobressalente, em seguida o material foi lavado com água destilada, secos em temperatura ambiente para posterior caracterização físico-química. Os compósitos foram denominados de APTS-CB e APTS-CB/Lap 15, 30 e 50%.

Os materiais foram caracterizados por Microscopia Eletrônica de Varredura obtidos da superfície e corte transversal das amostras em um microscópio eletrônico de varredura da marca JEOL, modelo JSM-7500F, com software de operação PC-SEM v 2,1,0,3, equipado com detectores de elétrons secundário, retro espalhados e análise química (energy dispersive spectroscopy - EDS) da marca Thermo Scientific, modelo Ultra Dry.

Foram realizados difratogramas de raios-X (DRX) obtidos em um equipamento Rigaku, modelo MiniFlex II Desktop operando em 40 kV e 30 mA (1200 W), empregando radiação filtrada Cu K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), entre (2θ) 2-60° com a taxa de 2°/min. Utilizou-se o

método de Segal (FRENCH, 2020; SEGAL et al., 1959) para calcular a cristalinidade (Vide capítulo 2)

Foram obtidos espectros de infravermelho com transformada de Fourier (IV) e espectros Raman, em equipamento Brukeras, na região de 4000 a 400 cm^{-1} , por meio de reflexão total atenuada (cristal de diamante) e no equipamento Bruker Multiram FT-Raman com um detector de diodo Ge resfriado a nitrogênio e laser Nd/YAG de comprimento de onda 1064 nm, coletados em uma faixa de 4000 a 100 cm^{-1} , resolução de 2 cm^{-1} e 256 varreduras, respectivamente.

Para análise térmica dos materiais, curvas TG foram obtidas em equipamento da TA Instruments modelo SDT Q600, entre 25-800 °C, utilizando cadinho de alumina, com razão de aquecimento de 10 °C/min, em fluxo de ar sintético de 100 mL/min.

Já nos testes de permeabilidade ao vapor de água, utilizou-se seções circulares dos filmes fixados no topo de frascos de vidro contendo 10 mL de água (gradiente de 100% de umidade relativa a 25°C), sendo que o foi pesado e armazenado em um dessecador contendo sílica gel (0% de umidade relativa). As mudanças de massa do frasco foram traçadas em função do tempo (0, 24, 48, 72 e 96 h).

O valor de permeabilidade ao vapor de água, (PVA em $\text{g}\cdot\text{mm}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}$) foi calculado utilizando a equação de (GENNADIOS et al., 1994), vide capítulo 2.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Figura 2 demonstra as imagens de MEV da superfície e corte transversal dos materiais APTS-CB e APTS-CB/Lap 15, 30 e 50%.

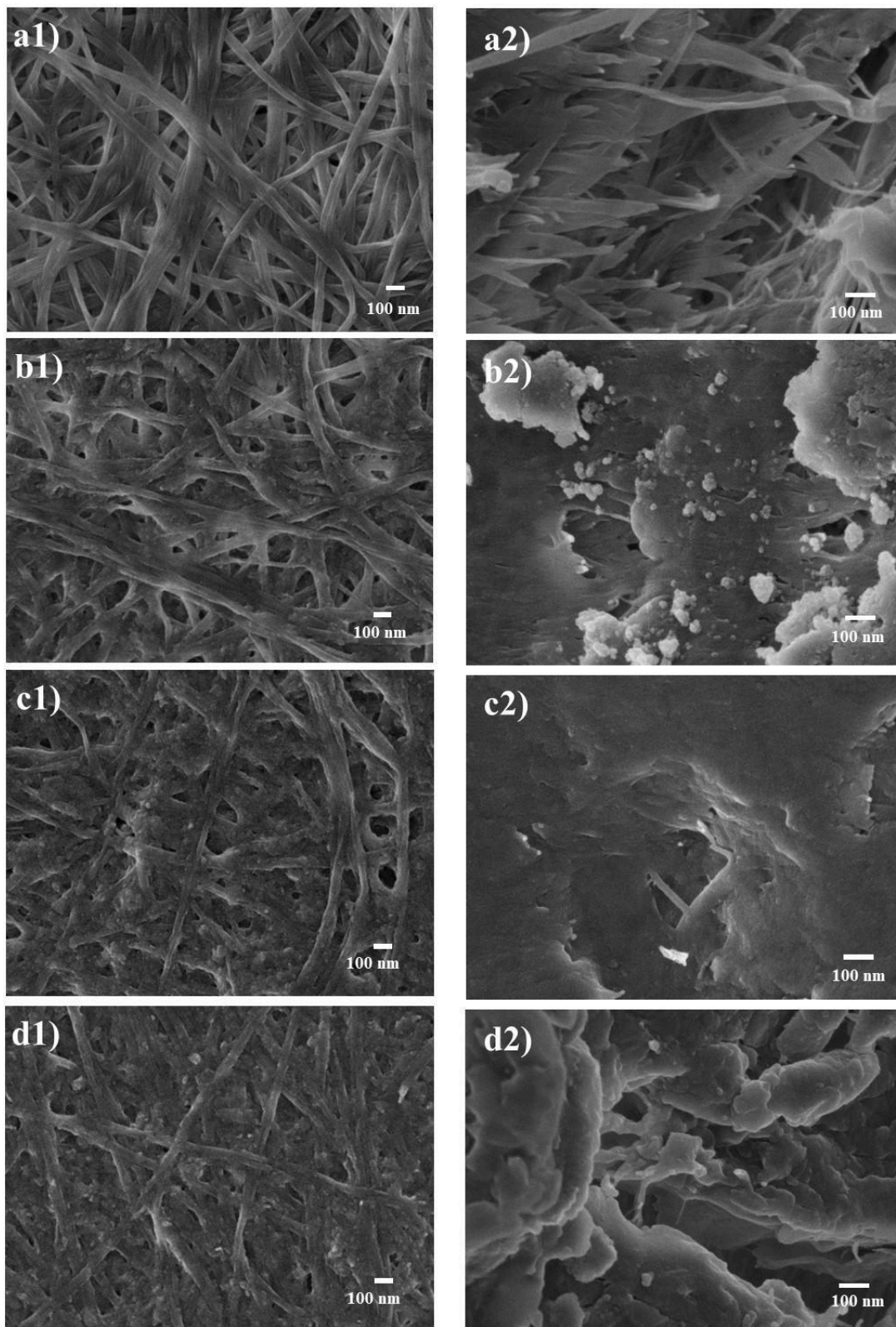


Figura 2 – Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da superfície (1) e dos cortes transversais (2) dos materiais CB (a), APTS-CB (b), APTS-CB/Lap 15% (c), APTS-CB/Lap 30%(d) e APTS-CB/Lap 50% (e). Número de fibras avaliadas em relação ao diâmetro: 50.

As imagens de MEV mostram que os materiais obtidos apresentam estrutura superficial em forma de fibras nanométricas com diâmetro médio de 59,8 ($\pm 14,0$), 59,8 ($\pm 26,2$), 69,7 ($\pm 26,5$) e 75,6 ($\pm 18,3$), para as amostras APTS-CB, APTS-CB/Lap 15, 30 e 50%, respectivamente. É possível notar superfícies rugosa nos materiais contendo Laponita (Fig.2-b, c, d) e presença de grânulos superficiais, que estavam ausentes nos filmes CB (vide Capítulo 2) e APTS-CB (1a). Conforme ocorre o aumento do teor de argila na amostra, é possível notar superfícies mais granuladas e a aparente oclusão de poros superficiais.

A presença de grânulos na superfície das fibras é um indício de deposição da argila Laponita, já vez que nos filmes APTS-CB não foi possível verificar tais estruturas, podendo concluir que não houve um efeito de agregação do silano durante a etapa de funcionalização dos materiais.

Em relação à mudança superficial em decorrência do processo de funcionalização, Fernandes *et al.* (FERNANDES *et al.*, 2013) observou um aumento no diâmetro das fibras em decorrência da formação de pontes Si-O-Si pela funcionalização com APTES. Contudo, o mesmo efeito não foi observado no presente trabalho, pois o diâmetro das fibras de CB (59 nm \pm 14, 62) não sofreu alteração após o processo, APTS-CB (59,8 \pm 14,0 nm).

Agora, verificando os cortes transversais das amostras, o material APTS-CB apresenta camadas de nanofibras empilhadas, muito semelhante ao observados nos cortes transversais da CB (Capítulo 2 – Figura 5 a-III), indicando que a estrutura tridimensional não sofreu alteração em decorrência da organofuncionalização. Já nos materiais APTS-CB/Lap 15, 30 e 50%, (b-II, c -II e d-II, respectivamente) foi possível notar estruturas granuladas por todo o material, muito provavelmente pela deposição da argila no material, e não é visível a estrutura de empilhamento dos filmes. Vale notar que nas imagens de MEV do corte transversal dos compósitos CB/Lap 15, 30 e 50% (Capítulo 2 – Figura 6 b-III, c-III e d-III, respectivamente) esse efeito não foi observado, indicando assim uma mudança em decorrência do processo de funcionalização.

Já os dados de DRX das amostras podem ser observados na Figura 3.

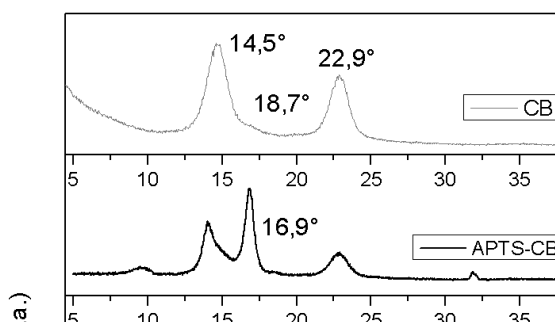


Figura 3: Difratoogramas de raios-X das amostras CB (Cinza), APTS-CB (Preto), APTS-CB/Lap 15% (Vermelho), APTS-CB/Lap 30% (Azul) e APTS-CB/Lap 50% (Verde).

Nos difratogramas obtidos, nota-se picos de difração em $14,5^\circ$ e $22,9^\circ$ para as amostras contendo celulose, que estão associados às fases cristalinas $I\alpha$ e $I\beta$ presentes na CB (BARUD et al., 2013; DOMENEGUETTI et al., 2023; MENEGUIN et al., 2021; PEROTTI et al., 2011). Os picos também estão associados aos planos (100) e (110), respectivamente, característicos da celulose do tipo I e a região cristalina da celulose (BARUD et al., 2013; BORBA et al., 2022; FRENCH, 2014, 2020; MENEGUIN et al., 2021; PEROTTI et al., 2011).

Já os filmes APTS-CB e APTS-CB/Lap 15, 30 e 50% apresentaram um pico em $16,9^\circ$ referente ao plano 010 da célula unitária triclinica da região $I\alpha$ (FRENCH, 2014). Nos filmes de CB, a ausência do pico em 010, comumente encontrado em celulose do tipo $I\alpha$, ocorre pela orientação preferencial dos cristalitos quando a amostra é analisada em filmes (BORBA et al., 2022; FRENCH, 2014, 2020; FRONE et al., 2018). A presença desse pico na celulose organofuncionalizada pode ser um indício de interferência do silano nessa orientação preferencial.

Avaliando a cristalinidade relativa, as amostras apresentaram os valores de 81,7, 67,3, 72,3, 61,4 e 54,2%, para os filmes CB, APTS-CB e APTS-CB/Lap 15, 30 e 50%,

respectivamente. Nota-se uma diminuição da cristalinidade dos filmes funcionalizados com APTS em relação à CB pristina, possivelmente ocasionado pela interferência nas ligações de hidrogênio dos grupos na região cristalina da celulose pela presença do silano, semelhante ao observado por Frone e Silva (FRONE et al., 2018; SILVA et al., 2017). Também é possível notar uma diminuição da cristalinidade relativa com o aumento do teor de laponita na amostra, semelhante ao observado no Capítulo 2, indicando que a presença da argila por interferir nas regiões cristalinas da amostra.

Agora, os dados FTIR dos materiais, disponíveis na Figura 4, demonstram os espectrogramas dos materiais CB, APTS-CB/Lap 15, 30 e 50%.

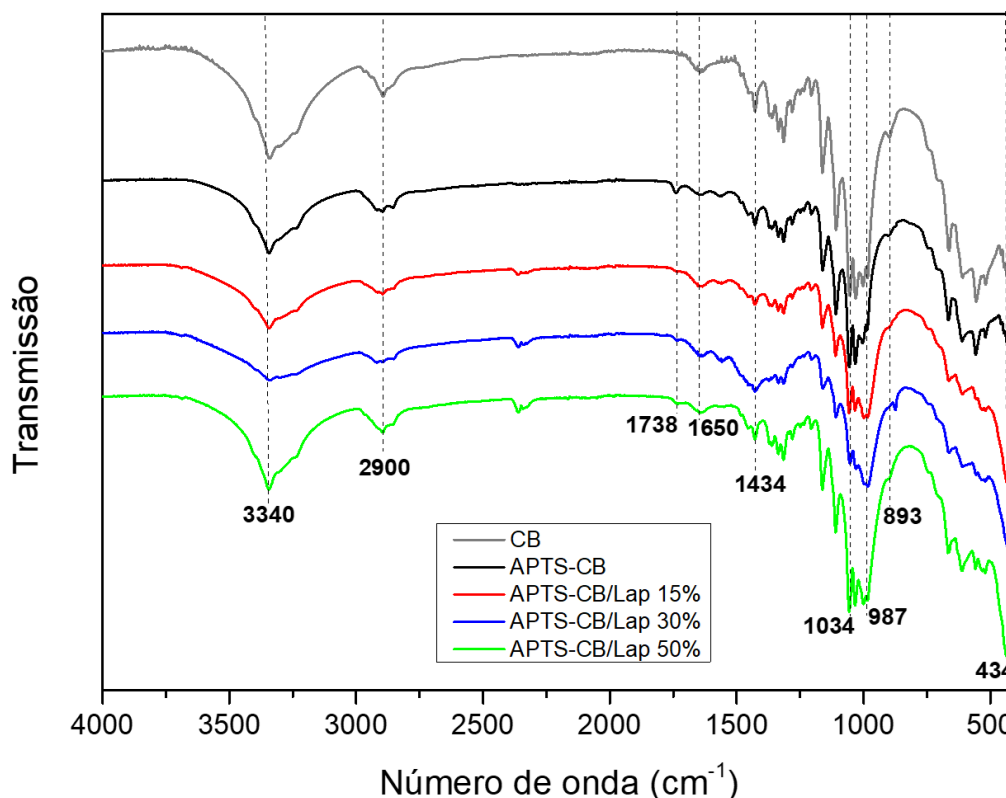


Figura 4: Espectros FT-IR das amostras CB (cinza), APTS-CB (preto), APTS-CB/Lap 15% (vermelho), APTS-CB/Lap 30% (azul) e APTS-CB/Lap 50% (verde).

Os materiais analisados apresentam bandas em 3340 cm^{-1} , referentes a deformação de estiramento da ligação O-H. Em 1650 cm^{-1} ocorre a deformação angular da ligação -OH e pode ser atribuído a água presente na estrutura. Já as bandas em 2900 e 1434 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento e deformação angular de grupos de $-\text{CH}_2$, respectivamente, e as

bandas em 1034 e 893 cm^{-1} são atribuídas aos grupos C-O-C da ligação glicosídica e do anel de piranose, presentes em todos os filmes (BARUD et al., 2013, 2011; DOMENEGUETTI et al., 2023; FERNANDES et al., 2013; HETTEGGER et al., 2015; SILVA et al., 2019).

Nas amostras APTS-CB/Lap 15, 30 e 50% observa-se bandas em 987 e 434 cm^{-1} , atribuídas à vibração de flexão O-Si-O, presentes na estrutura da argila, semelhante ao observado no Capítulo 2 (Figura 10) para os compósitos contendo Laponita, indicando a presença do material na amostra (GHADIRI et al., 2013; SILVA et al., 2019).

No material APTS-CB, nota-se uma banda em 1738 cm^{-1} , que pode ser atribuída à deformação angular dos grupos NH_2 , sendo um indício da presença do silano APTS na amostra (FERNANDES et al., 2013; LUCIA et al., 2020). A mesma banda pôde ser observada nos materiais APTS-CB/Lap 30 e 50%, contudo em menor intensidade, sendo esse um indício da presença do silano nos materiais.

Já avaliando os resultados de Raman, presentes na Figura 5, verifica-se bandas em 381, 438 e 519 cm^{-1} que correspondem a ligações do tipo C-O, C-C-C, C-O-C e C-C-O, presentes na estrutura da celulose (DE SALVI et al., 2012; SASKA et al., 2012).

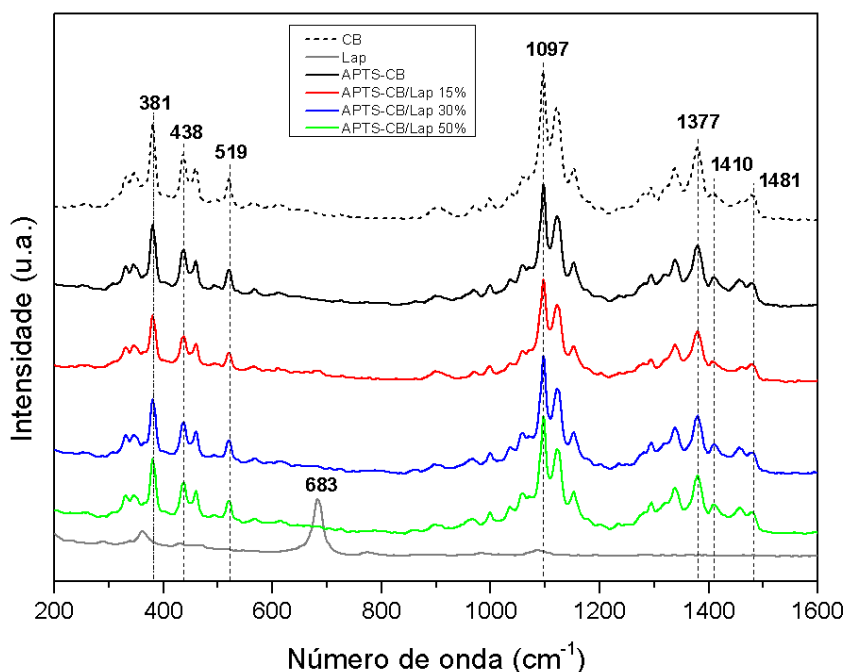


Figura 5: Espectros FT-Raman das amostras CB (Preto pontilhado), Laponita (Cinza), APTS-CB (Preto), APTS-CB/Lap 15% (Vermelho), APTS-CB/Lap 30% (Azul) e APTS-CB/Lap 50% (Verde).

Além disso, observa-se bandas em 381, 438 e 519 cm^{-1} que correspondem a ligações do tipo C-O, C-C-C, C-O-C e C-C-O, presentes na estrutura da celulose (DE SALVI et al., 2012; SASKA et al., 2012). Já as bandas em 1097 e 1377 cm^{-1} correspondem a vibrações C-C e C-O, C-C-H, O-C-H e H-C-H, respectivamente. Os espectros apresentaram bandas semelhantes às da CB, indicando que a obtenção do compósito e a funcionalização não compromete significativamente a estrutura da celulose.

É possível verificar também uma banda em 1481 cm^{-1} corresponde a vibrações do grupo C-O-H, presente na CB, e nota-se o aparecimento de uma banda em 1450 cm^{-1} , indicativo da interação do silano com o polímero (DE SALVI et al., 2012).

No trabalho de Domenegueti *et al* argila (DOMENEGUETTI et al., 2023), que obteve espectros de Raman de compósitos CB e laponita, obtidos *in situ*, e a argila apresenta uma banda intensa em 683 cm^{-1} referente ao grupo $[\text{SiO}_4]$ presente na estrutura do material. Entretanto, tal banda não foi percebida nos espectros deste trabalho, sugerindo que as bandas da CB são dominantes.

As análises de termogravimetria dos materiais demonstram três eventos principais de perda de massa, e podem ser encontrados na Figura 6.

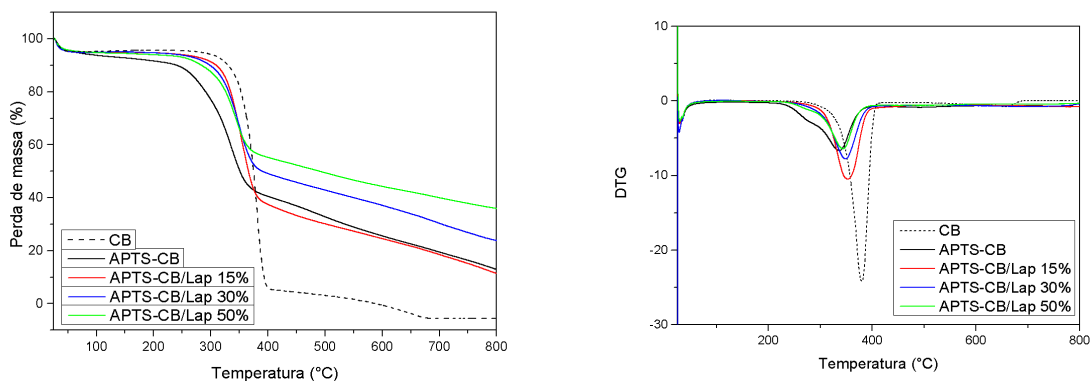


Figura 6 – Curvas TG-e DTG das amostras CB (preto pontilhado), APTS-CB (Preto), APTS-CB/Lap 15% (Vermelho), APTS-CB/Lap 30% (Azul) e APTS-CB/Lap 50% (Verde).

A primeira etapa de perda de massa ocorreu por volta de 50-80° C (8% em massa) para todas as amostras e pode ser atribuída à perda de água e solvente residual da lavagem do material.

Já a segunda etapa de perda pode ser atribuída à decomposição térmica da celulose e formação de resíduo carbonáceo que se decompõe completamente numa terceira etapa para CB (BARUD et al., 2011; DOMENEGUETTI et al., 2023; MENEGUIN et al., 2021; PEROTTI et al., 2011). Para compósitos APTS-CB/Lap 15, 30 e 50%, após a segunda etapa ocorre perda lenta de massa até 800 °C com resíduo entre 15 e 40% dependendo da amostra.

No material APTS-CB, essa etapa de decomposição ocorre com o máximo de perda na temperatura de 336°C, inferior a CB pura (383°C, como discutido no Capítulo 2) enquanto que para APTS-CB/Lap 15, 30 e 50%, esta temperatura de decomposição foi superior, sendo 354, 348 e 343°C, respectivamente, mas ainda inferior comparados à CB pristina.

A maior estabilidade dos compósitos APTS-CB/Lap 15, 30 e 50%, em relação ao material APTS-CB indica que a presença da argila pode ter protegido as fibras do polímero, contudo, ainda apresentaram menor resistência térmica que a CB. Além disso, no segundo evento térmico, a amostra APTS-CB ainda apresenta uma etapa extra de perda de material orgânico, provavelmente decorrente do silano (FERNANDES et al., 2013).

Já o terceiro evento de perda de massa, referente à queima do resíduo carbonáceo, ocorre entre 400-700 °C para CB e 400-800°C para APTS-CB e APTS-CB/Lap 15, 30 e 50%. A CB pristina não gera resíduo após 700 °C diferentemente dos materiais funcionalizados, gerando resíduos decorrentes da formação de óxidos inorgânicos provenientes do silano e da degradação da Laponita com 13,2%, 11,5%, 24,2% e 36,2%, para os materiais APTS-CB e APTS-CB/Lap 15, 30 e 50%, respectivamente (BARUD et al., 2011; DOMENEGUETTI et al., 2023; FERNANDES et al., 2013; PEROTTI et al., 2011).

Já na Figura 7, estão representados os valores de PVA para os materiais obtidos nesse capítulo.

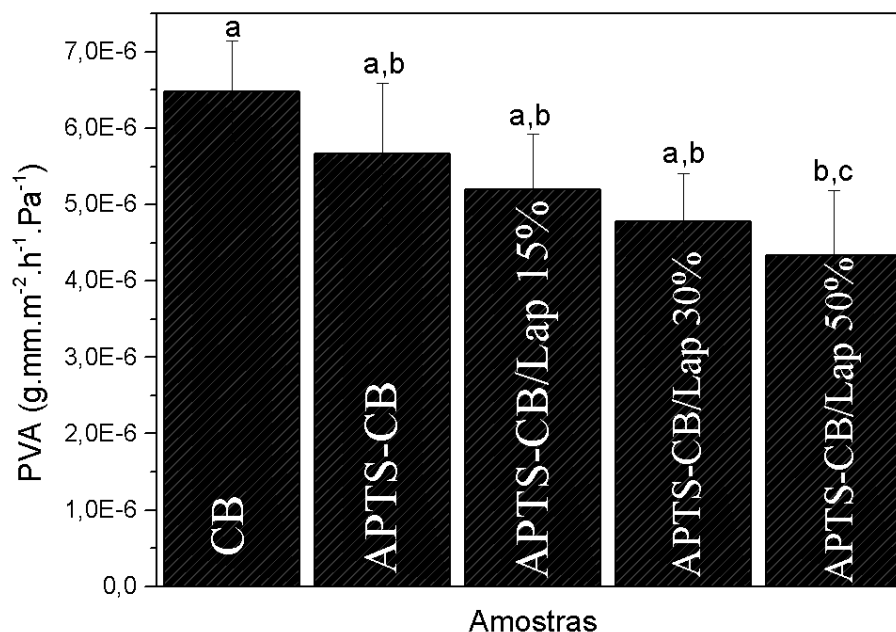


Figura 7: Permeabilidade ao vapor de água (PVA) das membranas CB, APTS-CB, APTS-CB/Lap 15%, APTS-CB/Lap 30% e APTS-CB/Lap 50%. “a,b,c” diferenças significativas em $p < 0.208$ (ANOVA).

Comparando a PVA dos materiais, verifica-se que a presença da argila reduz a permeabilidade dos filmes e é decrescente com a porcentagem de Laponita nas amostras, muito semelhante ao observado no capítulo 2 para os compósitos CB/Lap, e provavelmente a presença da argila provoca a redução da permeabilidade ao vapor de água nos compósitos pela ação das lamelas da argila que agem como barreira física gerando um caminho tortuoso para o vapor passar pelo material (LEBARON; WANG; PINNAVAIA, 1999; SHEN; CHEN, 2007).

Contudo, vale ressaltar que os materiais modificados com APTS apresentam maior valores de permeabilidade ($5,19 \times 10^{-6}$, $4,77 \times 10^{-6}$ e $4,33 \times 10^{-6}$, para os materiais APTS-CB/Lap 15, 30 e 50%, respectivamente) em comparação aos compósitos sem modificação, ou seja, CB/Lap 15, 30 e 50% ($2,85 \times 10^{-6}$, $3,14 \times 10^{-6}$ e $3,28 \times 10^{-6}$, respectivamente), apresentados no Capítulo 2, indicando que a presença do APTS pode interferir na propriedade de barreira da argila, possivelmente pelo efeito de formação de agregados, o que diminui a distribuição

uniforme da Laponita pela amostra e, conseqüentemente, pode aumentar a permeação ao vapor de água dos filmes.

5 – CONCLUSÃO DO CAPÍTULO 4

No presente capítulo, foram apresentados os resultados obtidos da produção e caracterização de novos compósitos a base de CB/Lap organofuncionalizados com APTS. E verificou-se através do FTIR, bandas características de grupos $-NH_2$ e Si-O, presentes na estrutura do silano e da argila, respectivamente, indicando a presença destes materiais na amostra. Além disso, a modificação da celulose provocou mudanças estruturais dos grupos cristalinos da CB com o aparecimento do pico em $16,9^\circ$ (010) e diminuição da cristalinidade relativa nos materiais organofuncionalizados. Já nas imagens de MEV foi possível notar a presença de grânulos superficiais nas fibras dos compósitos funcionalizados, provocado pela agregação da argila. Observou-se também a redução da estabilidade térmica e mudança na permeação ao vapor de água, comparados com a CB, caracterizando a modificação do polímero por APTS e Laponita. Portanto, conclui-se que a organofuncionalização provocou modificações estruturais e na composição dos materiais, sendo esse um indício do sucesso da incorporação de grupos amino nas amostras. Em trabalhos futuros pretende-se avaliar comportamento dos filmes frente a adsorção de fármacos, viabilidade celular e atividade antibacteriana para verificar o potencial para sistemas de liberação de fármacos e para uso como curativos multifuncionais.

6 – REFERÊNCIAS

- BARUD, H. D. S. et al. Antimicrobial Brazilian propolis (EPP-AF) containing biocellulose membranes as promising biomaterial for skin wound healing. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.
- BARUD, H. S. et al. Bacterial cellulose/poly(3-hydroxybutyrate) composite membranes. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 3, p. 1279–1284, 2011.
- BORBA, P. B. et al. Bacterial nanocellulose containing diethylditiocarbamate bio-curatives: physicochemical characterization and drug delivery evaluation. **Cellulose**, v. 29, n. 3, p.

1557–1565, 2022.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE CIÊNCIA, T. E I. E. Membrana de Biocelulose no tratamento de: lesões cutâneas com perda de pele, úlceras venosas e arteriais, lesões por pressão, queimaduras de segundo grau e áreas doadoras de enxerto TT - Biocellulose membrane, non-treatment of: lesoes cutaneous lesion, v. 2018a.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE CIÊNCIA, T. E I. E. **Membrana de Biocelulose no tratamento de: lesões cutâneas com perda de pele, úlceras venosas e arteriais, lesões por pressão, queimaduras de segundo grau e áreas doadoras de enxerto TT - Biocellulose membrane, non-treatment of: lesoes cutaneous lesion**, v. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2018/Relatorio_CurativoBiocelulose.pdf>.

DE SALVI, D. T. B. et al. Self-supported bacterial cellulose/boehmite organic-inorganic hybrid films. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 63, n. 2, p. 211–218, 2012.

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. May 2022, p. 106851, 2023.

FERNANDES, S. C. M. et al. Bioinspired antimicrobial and biocompatible bacterial cellulose membranes obtained by surface functionalization with aminoalkyl groups. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 5, n. 8, p. 3290–3297, 2013.

FRENCH, A. D. Idealized powder diffraction patterns for cellulose polymorphs. **Cellulose**, v. 21, n. 2, p. 885–896, 2014.

FRENCH, A. D. Increment in evolution of cellulose crystallinity analysis. **Cellulose**, v. 27, n. 10, p. 5445–5448, 11 jul. 2020.

FRONE, A. N. et al. Surface treatment of bacterial cellulose in mild, eco-friendly conditions. **Coatings**, v. 8, n. 6, 2018.

GHADIRI, M. et al. Laponite clay as a carrier for in situ delivery of tetracycline. **RSC Advances**, v. 3, n. 43, p. 20193–20201, 2013.

GILBERTO, T. J. et al. Hybrid Materials Based on Bentonite Functionalized with Amine Groups via the Hydrolytic Sol-Gel Method. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 5, p. 933–940, 2015.

GINSBURG, D. BASICITY OF AMINES. In: **Concerning Amines**. [s.l.] Elsevier, 1967. p. 2–6.

HETTEGGER, H. et al. Synthesis, characterization and photo-bactericidal activity of silanized xanthene-modified bacterial cellulose membranes. **Cellulose**, v. 22, n. 5, p. 3291–3304, 2015.

HSU, C. Y. et al. The Antimicrobial Effects of Bacterial Cellulose Produced by *Komagataeibacter intermedius* in Promoting Wound Healing in Diabetic Mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 10, 2022.

JABER, M.; MIEHÉ-BRENDLÉ, J. Organoclays. Preparation, Properties and Applications. **Ordered Porous Solids**, p. 31–49, 2009.

LEBARON, P. C.; WANG, Z.; PINNAVAIA, T. J. Polymer-layered silicate nanocomposites: An overview. **Applied Clay Science**, v. 15, n. 1–2, p. 11–29, 1999.

LUCIA, A. et al. A direct silanization protocol for dialdehyde cellulose. **Molecules**, v. 25, n. 10, 2020.

MENEGUIN, A. et al. Nanocellulose/palygorskite biocomposite membranes for controlled release of metronidazole. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 188, n. July, p. 689–695, 2021.

MUANGMAN, P. et al. Efficiency of microbial cellulose dressing in partial-thickness burn wounds. **Journal of the American College of Certified Wound Specialists**, v. 3, n. 1, p. 16–19, 2011.

OLIVEIRA BARUD, H. G. et al. Preparation and characterization of a bacterial cellulose/silk fibroin sponge scaffold for tissue regeneration. **Carbohydrate Polymers**, v. 128, p. 41–51, 2015.

PEROTTI, G. F. et al. Bacterial cellulose-laponite clay nanocomposites. **Polymer**, v. 52, n. 1, p. 157–163, 2011.

SASKA, S. et al. Characterization and in vitro evaluation of bacterial cellulose membranes functionalized with osteogenic growth peptide for bone tissue engineering. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 23, n. 9, p. 2253–2266, 2012.

SEGAL, L. et al. An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native

Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. **Textile Research Journal**, v. 29, n. 10, p. 786–794, 1959.

SHEN, L.; CHEN, Z. Critical review of the impact of tortuosity on diffusion. **Chemical Engineering Science**, v. 62, n. 14, p. 3748–3755, 2007.

SILVA, A. DOS S. DA; SANTOS, J. H. Z. DOS. **Nanotecnologia Aplicada a Polímeros**, p. 459–496, 2022.

SILVA, J. M. et al. Inorganic-organic bio-nanocomposite films based on Laponite and Cellulose Nanofibers (CNF). **Applied Clay Science**, v. 168, n. September 2018, p. 428–435, 2019.

SILVA, R. R. et al. Multifunctional organic–inorganic hybrids based on cellulose acetate and 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 81, n. 1, p. 114–126, 2017.

ULLAH, H. et al. **Advances in biomedical and pharmaceutical applications of functional bacterial cellulose-based nanocomposites**. [s.l.] Elsevier Ltd., 2016. v. 150

CONCLUSÃO DA TESE

No presente trabalho realizou-se uma prospecção tecnológica para avaliação do cenário científico e mercadológico de CB e argilas para uso como curativos e sistemas de liberação de fármacos. Nesse sentido, visto o cenário problema sobre feridas com perda de pele, a necessidade de novos curativos e a potencialidade do uso de CB e argilas como curativos e sistemas de liberação de fármacos, respectivamente, ficou evidente o caráter inovador no desenvolvimento de compósitos a base de CB/argilas para como potenciais curativos multifuncionais. Desta forma, no presente trabalho, realizou-se a produção, caracterização e testes de adsorção, liberação e viabilidade celular em (HDFa) dos compósitos a base de celulose bacteriana e laponita e verificou-se um aumento na estabilidade térmica,

boa viabilidade celular, aumento da capacidade de adsorção do fármaco ciprofloxacina e um controle da liberação do fármaco comparado com a CB isolada. Além disso, os materiais obtidos apresentaram atividade antibacteriana nas linhagens de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* o que demonstraram ser promissores para o uso como curativo multifuncional. E com o objetivo de compreender melhor a estrutura dos compósitos e correlacionar com a liberação do ativo, realizou-se testes utilizando técnicas de luz síncrotron de quarta geração, que possibilitaram entender melhor a deposição superficial das argilas nas fibras, o processo de liberação e a estrutura tridimensional de todos os materiais, compreendendo assim os resultados de diminuição da permeabilidade ao vapor de água e a modificação no sistema de liberação. Por fim, com o objetivo de avançar no desenvolvimento, os compósitos foram organomodificados por silanização para incorporação com grupos amino (-NH₂) visando propriedades antibacterianas intrínsecas e liberação de fármacos pH dependente. Os compósitos funcionalizados sofreram mudanças estruturais e químicas que comprovam a modificação do material, possibilitando uma nova gama de análises e estratégias para desenvolvimento de materiais multifuncionais.

Portanto, a tese em questão contribui para a criação e estudo de novos materiais como possíveis curativos multifuncionais e servirá também como base para novas pesquisas envolvendo compósitos CB/Lap organomodificados e seu potencial como curativos e liberação de fármacos.