

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ (UTFPR)  
PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS  
MESTRADO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA

KATLYN BAZOLI DOS SANTOS

**FILMES DE CELULOSE BACTERIANA MODIFICADOS COMO CURATIVOS: FILMES  
LIPOFÍLICOS E DOADORES DE ÓXIDO NÍTRICO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LONDRINA

2020

KATLYN BAZOLI DOS SANTOS

**FILMES DE CELULOSE BACTERIANA MODIFICADOS COMO CURATIVOS: FILMES LIPOFÍLICOS E DOADORES DE OXIDO NÍTRICO**

**BACTERIAL CELLULOSE FILMS MODIFIED AS DRESSINGS: LIPOPHILIC FILMS AND NITRIC OXIDE DONORS**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção de título de Mestre em Ciências e Engenharia de Materiais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador: Prof. Dr. Renato M. Ribeiro-Viana.

Co-orientadora: Profa. Dra. Alessandra Stevanato

LONDRINA

2020



Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



Ministério da Educação  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Câmpus Londrina



KATLYN BAZOLI DOS SANTOS

**FILMES DE CELULOSE BACTERIANA MODIFICADOS COMO CURATIVOS: FILMES LIPOFÍLICOS E DOADORES DE ÓXIDO NÍTRICO**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia De Materiais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Materiais Para Aplicação Em Engenharia E Tecnologia.

Data de aprovação: 16 de Dezembro de 2020

Prof Renato Marcio Ribeiro Viana, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof Alexandre Orsato, Doutorado - Universidade Estadual de Londrina (UEL)

Prof Leonardo Cesar De Moraes Teixeira, Doutorado - Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 16/12/2020.

### **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus por tudo que permite em minha vida!

Aos meus pais Rosana e Jonathan por toda educação e apoio para que eu pudesse ter essa oportunidade de estudo. E principalmente pelo amor e carinho. A minha querida irmã Emanuelle, por sua dedicação em me ajudar sempre que preciso, pela sua amizade e por estar sempre presente nos momentos mais difíceis e alegres da minha vida. Ao meu amado esposo Wellington que não mede esforços para me ajudar a concluir o fim dessa etapa, sempre empenhado em ver o meu sucesso.

Ao meu grande professor e orientador Renato pela confiança depositada em mim para realização deste trabalho, por todo ensinamento e oportunidade, por me ajudar a não desistir quando eu tive que tomar uma decisão importante. Não tive só um professor e sim um exemplo de ser humano! Obrigada por toda paciência comigo e auxílio no meu crescimento científico.

A minha co-orientadora professora Alessandra porque além de todo ensinamento que me deu, sempre com paciência para me ensinar o que foi preciso e sempre colaborando com a otimização do processo da síntese. A senhora foi uma grande conselheira e também se dispôs a fazer o que muitos professores não fariam por um aluno.

Aos professores César, Janksyn e Alexei que nos disponibilizou, tempo, material e equipamentos para o desenvolvimento do trabalho.

E aos professores Alexandre e Leonardo por se disponibilizarem a ler e avaliar esse trabalho.

Agradeço a todos os colaboradores da UTFPR, ao laboratório Labmulti-Id aos técnicos de laboratório, em especial a técnica do laboratório Fernanda, obrigada por me ajudar e se colocar à disposição para me auxiliar em tudo.

Aos meus amigos Armando, Breno e Rosecler pela sua amizade, a ajuda e companheirismo.

Aos meus colegas do laboratório, em especial Bruna e Pedro por todo apoio e que de muitas formas cooperaram para a realização deste trabalho. E à todas as pessoas que, mesmo não mencionadas aqui, fizeram parte desta caminhada me apoiando sempre e torcendo por mim.

## RESUMO

SANTOS, Katlyn B. **Filmes de celulose bacteriana modificados como curativos: filmes lipofílicos e doadores de óxido nítrico. 2020. 53f.** Dissertação de Mestrado – Programa de Pós- Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2020.

A celulose de origem bacteriana é considerada um material quimicamente bem reconhecido e de interesse para área biomédica. Na sua forma pura pode submeter-se a modificações que podem dar-lhe propriedades para todos os requisitos essenciais para funcionar como um material de curativo. A sua elevada porosidade e área superficial permite elevado potencial para a introdução e liberação de agentes antimicrobianos, medicamentos e outros materiais biofuncionais. Na investigação de novos tipos de biocurativos, a inclusão de características antimicrobianas é de extrema importância, visto que pode melhorar consideravelmente a eficiência do material em relação a tratamentos de feridas crônicas ou susceptíveis à infecção microbiana. Algumas características antimicrobianas pouco exploradas em curativos são o uso de camadas hidrofóbicas e a presença de óxido nítrico (NO), que apresenta uma série de efeitos sobre células e também sobre bactérias. Deste modo o trabalho objetivou funcionalizar a membrana de celulose, modificando e caracterizando os filmes de celulose bacteriana com o intuito de melhorar suas aplicações e restaurações de feridas por melhorias na sua atividade antimicrobiana e biocompatibilidade. Para isso foi proposto à conjugação de moléculas hidrofóbicas em sua superfície e adicionalmente o preparo de filmes capazes de doar óxido nítrico (NO). Foram preparadas sínteses com compostos orgânicos lipofílicos e com cátion trimetilamônio para o acoplamento em filmes de celuloses bacteriana. Diferentes amostras do filme de celulose bacteriana foram caracterizadas a partir de medidas de ângulo de contato, espectroscopia de absorção na região de infravermelho, ressonância magnética nuclear, teste de crescimento de fibroblastos e ensaio antimicrobiano. Além disso, realizou-se a síntese do sal negro de Roussin e acoplamento do mesmo na membrana de celulose bacteriana. Comparativamente, as membranas modificadas com substâncias hidrofóbicas apresentam uma maior citocompatibilidade com fibroblastos quando o balanço hidrofílico/hidrofóbico das mesmas era diminuído. Para o acoplamento do sal negro de Roussin a membrana que não possui modificação não tem interação efetiva com solução do sal. Considerando-se então que a modificação da membrana e aumento de sua hidrofobicidade efetivam o processo de melhoria para a celulose bacteriana como um material antimicrobiano, os filmes lipofílicos apresentaram uma melhora na atividade antimicrobiana e na citocompatibilidade em comparação a celulose não modificada. Os filmes contendo os doadores de óxido nítrico foram preparados, caracterizados e serão analisados quanto sua capacidade de liberação de óxido nítrico.

Palavras chave: Atividade antimicrobiana, Biomaterial, Filmes de celulose bacteriana, Óxido nítrico.

## ABSTRACT

SANTOS, Katlyn. B. **Filmes de celulose bacteriana modificados como curativos: filmes lipofílicos e doadores de óxido nítrico. 2020. 53f.** Dissertação de Mestrado – Programa de Pós- Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2020.

Bacterial cellulose is considered a chemically well-recognized material of interest to the biomedical field. In its pure form it can undergo modifications that can give it properties for all the essential requirements to function as a dressing material. Its high porosity and surface area allow a high potential for the introduction and release of antimicrobial agents, drugs and other biofunctional materials. In the investigation of new types of biocuratives, the inclusion of antimicrobial characteristics is extremely important, since it can considerably improve the efficiency of the material in relation to treatments of chronic wounds or susceptible to microbial infection. Some antimicrobial characteristics little explored in dressings are the use of hydrophobic layers and the presence of nitric oxide (NO), which has a series of effects on cells and also on bacteria. In this way, in this work we aimed to functionalize the cellulose membrane, modifying and characterizing films in order to improve its applications and wound restorations by improving its antimicrobial and biocompatibility activity. For this purpose, conjugate hydrophobic molecules on its surface and additionally to prepare films capable of donating nitric oxide (NO) were proposed. Organic synthesis reactions were performed to prepare lipophilic organic compounds and trimethylammonium cation derivative for coupling on bacterial cellulose films. Different samples of the bacterial cellulose film were characterized from measurements of contact angle, absorption spectroscopy in the infrared region, nuclear magnetic resonance, fibroblast growth test and antimicrobial test. Comparatively, membranes modified with hydrophobic substances show greater cytocompatibility with fibroblasts when their hydrophilic / hydrophobic balance was decreased. In addition, Roussin's black salt was synthesized and coupled to the bacterial cellulose membrane. For the coupling of Roussin's black salt, the membrane that has no modification showed no effective interaction with the salt solution. Considering that the modification of the membrane and its hydrophobicity effect brought positive characteristics to these films, lipophilic films showed an improvement in antimicrobial activity and in cytocompatibility compared to unmodified cellulose. Films containing nitric oxide donors have been prepared, characterized and will be analyzed for their ability to release nitric oxide.

Keywords: Antimicrobial activity, Biomaterial, Bacterial cellulose films, Nitric oxide.

## Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura linear da celulose.....	12
Figura 2. Celulose bacteriana. ....	12
Figura 3. Exemplo de substância doadoras de NO [A] composto orgânico nitrosobenzeno e [B] composto de coordenação com centro metálico de ferro .....	14
Figura 4. Estrutura dos complexos de ferro-nitrosílico .....	23
Figura 5. Preparo do monoésteres succinil benzila e succinil octila para acoplamento em filme de celulose bacteriana .....	33
Figura 6. Espectro de <sup>1</sup> H RMN do monoéster succinil benzílico. <sup>1</sup> H RMN (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> , δ)- 7,35(s, 5H), 5,15(s,2H), 2,69(m,4H) .....	34
Figura 7. Espectro de <sup>1</sup> H RMN do monoéster succinil octila. - <sup>1</sup> H RMN (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> , δ)- 4,02(t, 2H), 2,65(t, J=24), 1,28(m,2H) 0,88(m, 2H).....	35
Figura 8. Espectro de absorção na região do infravermelho da membrana acoplado [a] succinil benzila e [b] succinil octila.....	36
Figura 9. Filmes de celulose bacteriana não modifica [a], com succinil octila [b] e succinil benzila [c] no ensaio de ângulo de contato. ....	37
Figura 10. Ensaio com os filmes de celulose bacteriana sem modificação (BC), filme de celulose comercial BC-L1 localizado na posição abaixo do (BC), filme de celulose modificados (BC-L1) localizado à esquerda e (BC-L2) localizado à direita da Figura.....	39
Figura 11. Preparação de filmes de celulose bacteriana funcionalizado com succinil colina e complexo [Fe <sub>4</sub> S <sub>3</sub> (NO) <sub>7</sub> ].....	40
Figura 12. Estrutura do composto conhecido como Roussin's Black Salt (RBS), um complexo aniônico [Fe <sub>4</sub> S <sub>3</sub> (NO) <sub>7</sub> ].....	41
Figura 13. Síntese da succinil colina e acoplamento de colina em filme de celulose bacteriana. ....	41
Figura 14. Espectro de RMN <sup>1</sup> H do succinil colina. <sup>1</sup> H RMN (400 MHz-, D <sub>2</sub> O, δ)- 4,5(m, 2H), 3,65(m, 2H), 3,12(s, 9H), 2,63(s, 4H) .....	42
Figura 15. Espectro no infravermelho da succinil colina acoplada ao filme de celulose bacteriana (BC-P1). ....	43
Figura 16. Produto final da síntese RBS. ....	44
Figura 17. Representação das possíveis coordenações do ligante nitrosil ao centro metálico: [a] M-N-O com geometria linear (retrodoligação metal-ligante) e [b] M-N-O com geometria angular .....	45
Figura 18. Espectros de absorção na região do IV do complexo [Fe <sub>4</sub> S <sub>3</sub> (NO) <sub>7</sub> ]-, obtidos em pastilhas de KBr, em micro-ondas, obtidos nos tempos: a) 0 s (após a adição do sulfato ferroso (FeSO <sub>4</sub> ) e hidróxido de amônio (NH <sub>4</sub> OH)), b) 30 s, c) 60 s, d) 90 s e e) 120 s. f).....	46
Figura 19. Solução de sal negro de roussin com a membrana sem modificação (a) e com a membrana com carga acoplada com a succinil colina (b) .....	47

### **Lista de Tabelas**

Tabela 1 - Curativos já desenvolvidos pelo mercado biotecnológico. ....	20
Tabela 2 - Valores da medida de ângulo de contato da membrana de celulose não modificada e membranas de celulose com os compostos acoplados.....	37
Tabela 3 - Dados de crescimento de fibroblastos. ....	38



### **Lista de Siglas e Abreviaturas**

Cloreto de diaquil carbamila (DACC)

Carboximetilcelulose (CMC)

Hidroxipropilcelulose (HPC)

Nitroprussiato de sódio (SNP)

Sal preto de Roussin (RBS)

Sal vermelho de Roussin (RRS)

Ésteres vermelhos de Roussin (RREs)

Diisopropilcarbodiimida (DIC)

Dimetilaminopiridina (DMAP)

Ressonância magnética nuclear (RMN)

Dimetilformiamida (DMF)

Diciclohexilcarbodiimida (DCC)

Filmes de celulose bacteriana sem modificação (BC)

Filme de celulose comercial (BC-L1)

Filme de celulose modificado com monoéster succil octila (BC-L1)

Filme de celulose modificado com monoéster succinil benzila (BC-L2)

## Sumário

1.	INTRODUÇÃO	11
2.	OBJETIVOS	15
2.1	Geral	15
2.2	Específicos	15
3.	REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1	Aspectos históricos no tratamento de feridas	16
3.2	Material Curativo	17
	Fase de hemostasia	17
	Fase Inflamatória	17
	Fase Proliferativa	17
3.3	Celulose Bacteriana	19
3.4	O papel da hidrofobicidade	21
3.5	Óxido nítrico (NO) como agente antimicrobiano	22
3.6	Comparação de doadores de NO para aplicações antimicrobianas	24
4.	PARTE EXPERIMENTAL	26
4.1	ateriais	M 26
4.2	Desenvolvimento do trabalho	26
4.2.1	Síntese de monoéster succinil octila	26
4.2.2	Síntese de monoéster succinil benzila	27
4.2.3	Metodologia geral para acoplamento dos monoésteres (octílico e benzílico) ao filme de celulose bacteriana	27
4.2.4	Síntese de succinil colina	28
4.2.5	Síntese do composto de coordenação <i>Sal Negro de Roussin</i>	28
4.2.6	Síntese do <i>Sal Negro de Roussin</i> via micro-ondas	29
4.2.7	Acoplamento de succinil colina ao filme de celulose bacteriana (BC-P1)	28
4.2.8	Acoplamento de NO proveniente do complexo de sal negro de Roussin na membrana de celulose Bacteriana	29
4.2.9	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho	30
4.2.10	Ressonância magnética nuclear (RMN)	30
4.2.12	Teste de crescimento de fibroblastos:	31
4.2.13	Avaliação da viabilidade celular	31
4.2.12	Atividade antibacteriana	31
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	33

5.1	Preparo de filmes lipofílicos	33
5.2	Avaliação antimicrobiana dos filmes lipofílicos	39
5.3	Filmes doadores de óxido nítrico (NO)	40
5.3.1	Preparo de filme de celulose bacteriana catiônico	41
5.3.2	Preparo do composto de coordenação de ferro	43
5.4	Acoplamento de NO na membrana de celulose Bacteriana	47
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	49
7	REFERÊNCIAS	50

## 1. INTRODUÇÃO

No corpo humano a pele é classificada como o maior órgão, equivalente a aproximadamente 15% da massa corpórea de um adulto. Ela é formada por duas camadas, a derme e a epiderme. A pele auxilia como parte do sistema imunológico, além de barreira física e química (LAI-CHEONG; MCGRATH, 2009).

A pele funciona criticamente na manutenção da homeostase interna enquanto protege do ambiente externo (MURPHREE, 2017). A epiderme é a camada mais externa da pele que fornece proteção contra o ambiente externo, sendo constituída por componentes celulares (plasmócitos, fibroblastos, células dendríticas, mastócitos) e componentes intersticiais (fibras colágenas, tecido elástico) (LAI-CHEONG; MCGRATH, 2009).

O desenvolvimento de lesões altera a estrutura e fisiologia da pele e estas podem ser geradas por diferentes fatores, tais como traumas físicos, cortes, queimaduras, entre outros. Após esses fatores, desencadeia-se o processo de cicatrização que compreende de uma complexa cascata de eventos fisiológicos de reparação (EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2014).

As lesões na pele, durante séculos, foram tratadas à base de gaze, que tinha a função de manter a ferida seca e funcionar como barreira física na prevenção de invasão bacteriana, tendo um papel fundamental na cicatrização de feridas (COIMBRA, 2015).

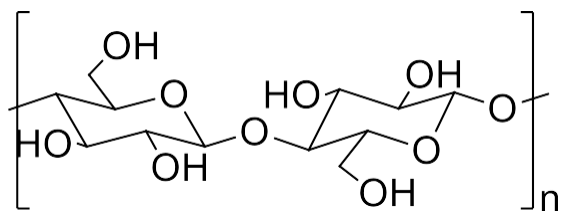
O desenvolvimento da cicatrização pode ser mais lento em algumas pessoas por inúmeras condições patológicas, de tal modo que o uso de biomateriais que operem como substituto da pele com o papel de agilizar o processo de restauração vem sendo estudado e empregado em várias áreas, entre elas, na engenharia de materiais (SENGUPTA; KUMAR SARKAR, 2015).

Em casos como de cicatrização o mercado global atualmente dispõe de diversos tipos de curativos incluindo polímeros naturais ou sintéticos, além de suas combinações, sendo implementadas de várias formas: filmes, espumas, hidrocoloides e hidrogéis. Também é possível conter fármacos, fatores de crescimento, peptídeos e outras substâncias bioativas que podem acelerar a recuperação (BOATENG; CATANZANO, 2015; SULAEVA et al., 2015).

Um arranjo polimérico que tem se destacado por suas amplas aplicações é a celulose (Figura 1) que é constituída na forma de polímero com estrutura linear e estabelece ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxilas presentes (SHEYKHNAZARI et al., 2011).

Entre os polímeros de celulose existentes, o de celulose vegetal é o mais abundante, porém, a celulose de origem bacteriana por possuir algumas características relevantes é considerada um material quimicamente bem reconhecido e de interesse para área biomédica (JOHAR; AHMAD; DUFRESNE, 2012; KLEMM et al., 2005).

Figura 1. Estrutura linear da celulose.



Fonte: A autoria própria.

Visto que é um dos materiais que mais se enquadra para ser usado como um curativo na reparação tecidual, pode ser considerado um dos materiais mais completos devido às suas qualidades (SULAEVA et al., 2015).

A celulose bacteriana (Figura 2), um polímero de glicose produzido por algumas estirpes bacterianas, tem a mesma estrutura das cadeias lineares de  $\beta$ -1,4-glucanos, como a celulose de origem vegetal (PICHETH et al., 2017).

Figura 2. Celulose bacteriana.



Fonte: A autoria própria.

A celulose bacteriana é um polímero produzido por algumas bactérias pertencentes aos gêneros *Acetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Salmonella*, *Escherichia* e *Sarcina* (COIMBRA, 2015). Seu uso como um

material de cicatrização de feridas é governado por suas características peculiares: tem elevada resistência à tração, flexibilidade e capacidade de retenção de água, uma permeabilidade pronunciada para gases e líquidos e uma grande compatibilidade com os tecidos vivos (CZAJA et al., 2006).

Na sua forma pura pode também submeter-se a modificações que podem dar-lhe propriedades para todos os requisitos essenciais para funcionar como um material de curativo. A sua elevada porosidade e área de superfície permite elevado potencial para a introdução e liberação de agentes antimicrobianos, medicamentos e outros materiais biofuncionais (PINTO, 2013).

A inclusão de outros compostos que podem acelerar a cicatrização de ferida, a preparação de compósitos com base em celulose bacteriana e a reatividade química da cadeia de polímero apresenta potencial para a formação de novos materiais com características melhoradas para o tratamento de qualquer tipo de ferida (HU et al., 2014; KLEMM et al., 2005).

Na investigação de novos tipos de biocurativos, a inclusão de características antimicrobianas é de extrema importância, visto que pode melhorar consideravelmente a eficiência do material em relação a tratamentos de feridas crônicas ou susceptíveis à infecção microbiana (SIGNER et al., 2012). O agente antimicrobiano ideal deve apresentar as seguintes características: baixo custo, não tóxico, não carcinogênico e não deve interferir no processo de cura (BUTCHER, 2012).

A presença de bactérias nas feridas é um fator que atrasa a cicatrização, assim muitos agentes ativos são usados para remover as bactérias das feridas. Outro método vem sendo estudado por pesquisadores para aumentar a capacidade de remover esses microrganismos dos ferimentos, o método consiste no aumento do efeito hidrofóbico do curativo que ocasionaria na remoção desses microrganismos por efeito de adsorção (BRAUNWARTH; BRILL, 2014).

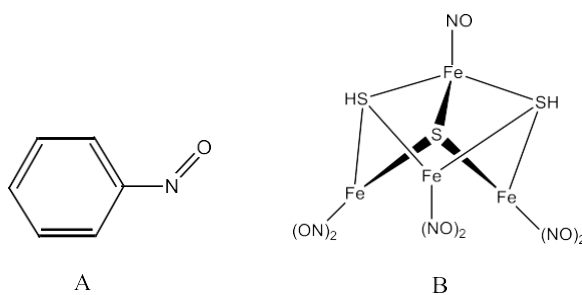
Normalmente esse aumento é ocasionado ao se funcionalizar o curativo com cloreto de dialquil carbamila (DACC), que já é comprovado ser um método efetivo para redução de bactérias, mas não há estudos que mostram se o mesmo resultado pode ser adquirido ao utilizarem-se outras substâncias. Entende-se que este mecanismo de ação, por não ser citotóxico às células microbianas, exerce, portanto, baixa pressão de seleção, o que é desejável a longo prazo do ponto de vista de saúde pública (BRAUNWARTH; BRILL, 2014). Como exemplo dessa abordagem, pode-se citar o curativo comercial CUTIMED®

SILTEC SORBACT®, que já está disponível no mercado brasileiro e apresenta uma camada hidrofóbica como mecanismo antimicrobiano.

Ainda no tema de adjuvantes pró-cicatrização e antimicrobiano, podemos citar a importância do óxido nítrico (NO). Ele é uma molécula inorgânica, gasosa radicalar, altamente reativo que atua como uma molécula mensageira para respostas fisiológicas distintas, utilizado como agente de sinalização de toxicidade (COLEMAN, 2001). A molécula de NO é tóxica para bactérias e produz um ambiente citotóxico de feridas; além de ser um vasodilatador potente, aumentando a permeabilidade vascular e a desagregação de plaquetas, participando do processo de cicatrização (ZOPPE et al., 2010).

Moléculas que são doadoras de NO tem chamado bastante a atenção dos pesquisadores da área biomédica devido ao seu amplo espectro de aplicações (SANT'ANA DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003; XU et al., 2014). Alguns exemplos podem ser citados como atividade antitumoral (TAN et al., 2017) e antimicrobiana (DE GROOTE; FANG, 1995; FRANK et al., 2002). Basicamente, existem dois tipos de doadores de NO: compostos orgânicos contendo grupo nitro e compostos de coordenação contendo o grupo nitrosil (Figura 3).

Figura 3. Exemplo de substância doadoras de NO [A] composto orgânico nitrosobenzeno e [B] composto de coordenação com centro metálico de ferro.



Fonte: (ZOPPE et al., 2010).

Com o intuito de funcionalizar a membrana de celulose, o presente trabalho propõe modificar e caracterizar filmes de celulose bacteriana com o papel de melhorar suas aplicações em restauração de feridas por melhorias na sua atividade antimicrobiana e biocompatibilidade. Para isso é proposto a conjugação de moléculas hidrofóbicas em sua superfície e adicionalmente preparar filmes capazes de doar NO oriundo do composto de coordenação por deposição eletrostática.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Preparar filmes de celulose bacteriana modificados covalentemente na superfície com moléculas hidrofóbicas e também potenciais filmes doadores de NO. Ambos serão avaliados quanto sua capacidade antimicrobiana e citocompatibilidade.

### 2.2 Específicos

- Sintetizar os ligantes hidrofóbicos;
- Funcionalizar celulose bacteriana com compostos orgânicos hidrofóbicos;
- Sintetizar composto de coordenação Sal Negro de Roussin  $[\text{Fe}_4\text{S}_3(\text{NO})_7]^-$ ;
- Preparar a celulose bacteriana modificada contendo o Sal Negro de Roussin  $[\text{Fe}_4\text{S}_3(\text{NO})_7]^-$ ;
- Avaliar atividade antimicrobiana dos filmes propostos;
- Avaliar citocompatibilidade dos filmes propostos.



### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Aspectos históricos no tratamento de feridas

Por séculos buscou-se melhora no processo de cicatrização e tratamento de feridas de pele. Esta é considerada como o intervalo de um tecido corpóreo, em qualquer tamanho, ocasionado por determinado tipo de trauma físico, químico, mecânico ou causado por uma enfermidade clínica, que demanda as frentes de defesa orgânica para o contra-ataque (NAUDE, 2010). Na Mesopotâmia já se tratavam feridas com leite, mel e resinas. No Egito, foi descoberto que com a ferida fechada o processo de cicatrização era mais rápido que a ferida exposta, por isso cobriam com panos para preservar a umidade nas bordas da lesão. Hipócrates propôs o tratamento da limpeza da ferida com água morna e que mantivesse a ferida limpa para que o risco de inflamação fosse reduzido. Ao longo da era, prescreveu a descoberta das feridas contaminadas. Enfim, em meados do século XVIII e XIX começaram a ser inseridos na limpeza de feridas compostos como iodo e cloro (BORGES, 2000).

O maior órgão do nosso corpo é a pele, no qual pode ser dividida em camadas: epiderme, derme e hipoderme, na qual a epiderme é a camada mais externa de revestimento da mesma. A sua permeabilidade é moderada à água e baixa em correlação aos lipídeos, possibilitando o uso de medicamentos de absorção. A derme é a camada intermediária e tem a função de vascularização cutânea, manutenção do potencial hidrogeniônico, proteção antifúngica e antimicrobiana. Possui em sua formação: fibras, terminações nervosas, contêm diferentes tipos de células, dentre elas fibroblastos, fibrócitos entre outros (PLIQUETT; PLIQUETT, 1996). Sendo os fibroblastos células alongadas em forma de fusiforme responsável pela síntese da matriz extracelular, contribuem para constituição da membrana basal, envolvimento na restauração tecidual entre outros (SHERRATT; MURRAY, 1990).

Por último, sendo a hipoderme chamada de tecido subcutâneo, é a responsável pela proteção contra lesão traumática, o isolamento térmico e promove reserva calorífica (LORENA et al., 2002). Sabe-se que nas perdas parciais da espessura da pele, gera-se um coágulo que seca para a proteção da lesão. Então o sistema de migração celular com a função de reparo tecidual se inicia, sendo conhecido como processo de cicatrização (CHERYL; LEITZEL; LIPTON, 1983).

### 3.2 Material Curativo

As etapas de cicatrização de feridas ocorrem de forma organizada e seguem quatro processos: hemostasia, inflamação, proliferação e maturação. Embora os estágios de cicatrização de feridas sejam lineares, as feridas podem progredir ou regredir, dependendo das condições internas e externas do paciente. Os quatro estágios da cicatrização de feridas são:

#### Fase de hemostasia

Hemostasia é o processo de fechamento da ferida por coagulação. A hemostasia começa quando o sangue vaza do corpo. A primeira etapa da hemostasia é quando os vasos sanguíneos se contraem para restringir o fluxo sanguíneo. Em seguida, as plaquetas se unem para selar a ruptura na parede do vaso sanguíneo. Finalmente, ocorre a coagulação e reforça o tampão plaquetário com fios de fibrina que são como um agente de ligação molecular. A fase de hemostasia da cicatrização de feridas ocorre muito rapidamente (PADRÃO et al., 2016)

#### Fase Inflamatória

A inflamação é o segundo estágio da cicatrização da ferida e começa logo após a lesão, quando os vasos sanguíneos lesados vazam transudato (feito de água, sal e proteína), causando inchaço localizado. A inflamação controla o sangramento e evita a infecção. O inchgurgitamento de fluido permite que as células de cura e reparo se movam para o local da ferida. Durante a fase inflamatória, células danificadas, patógenos e bactérias são removidos da área da ferida. Esses glóbulos brancos, fatores de crescimento, nutrientes e enzimas criam o inchaço, o calor, a dor e a vermelhidão comumente vistos durante este estágio de cicatrização. A inflamação é uma parte natural do processo de cicatrização de feridas e só é problemática se for prolongada ou excessiva (NAUDE, 2010).

#### Fase Proliferativa

A fase proliferativa da cicatrização da ferida é quando a ferida é reconstruída com novo tecido composto de colágeno e matriz extracelular. Na fase proliferativa, a ferida se contrai à medida que novos tecidos são formados. Além disso, uma nova rede de vasos sanguíneos deve ser construída para que o tecido de granulação possa ser saudável e receber

oxigênio e nutrientes suficientes. Em estágios saudáveis de cicatrização de feridas, o tecido de granulação é rosa ou vermelho e de textura irregular. Além disso, o tecido de granulação saudável não sangra facilmente. É importante lembrar que a epitelização ocorre mais rapidamente quando as feridas são mantidas úmidas e hidratadas (LIMA; COLTRO; JÚNIOR, 2017).

A cicatrização compreende como alguns processos que englobam vários cofatores: a idade, no qual pode ser relacionada com alterações metabólicas, uma vez que a idade avançada faz com que a resposta inflamatória seja ínfima, já que o tecido colagenoso está menos maleável. (LORENA et al., 2002).

A adiposidade dificulta o ganho adequado de nutrientes e elementos que são necessários para cicatrização, elevando o risco de infecção (PADRÃO et al., 2016). No estado nutricional, as proteínas são essenciais em todo o procedimento de cicatrização, na proliferação epidérmica entre outros.

E por fim, as comorbidades em diabéticos, a cicatrização de feridas ocorre de forma demorada por mecanismos anormais. Enquanto que se os níveis de glicose estão regulados, nota-se melhora na cicatrização (HASHIM; FERNEINI, 2017).

Quando lesionado, o tecido cutâneo precisa ser reparado, visto que se faz porta de fácil acesso para entrada para microrganismos. A carga bacteriana nas feridas é um fator crítico considerável para o tratamento, e este pode ser controlado por curativos que apresentam funções como barreira física e liberação de antimicrobianos (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).

Entre uma vasta diversidade de biopolímeros que podem ter a finalidade de curativos, a celulose bacteriana e a quitosana são amplamente analisadas e usadas. A celulose bacteriana apresenta propriedades que a qualifica como um distinto biomaterial para ser usado como um biocurativo.

Todavia, a celulose bacteriana não apresenta propriedades antimicrobianas para prevenir possíveis infecções quando utilizadas para o tratamento de feridas. Alguns esforços têm sido feitos para sanar essa questão, dentre eles, utilizando-a com moléculas ou polímeros antimicrobianos (LIN et al., 2013).

### 3.3 Celulose Bacteriana

Existem diferentes estratégias para reconstruir tecidos, mas muitas vezes um biomaterial com função de suporte está envolvido. Esse biomaterial tem a função de imitar a matriz extracelular nativa e guiar as células no processo de formação do tecido ((BUTCHER, 2012).

Os biomateriais são usados para diferentes tecidos, como possibilidade para modificar as propriedades da superfície, porosidade e capacidade de projetar e moldar estruturas tridimensionais. O requisito mais óbvio é a biocompatibilidade, ou seja toxicidade. A definição de biocompatibilidade, de acordo com Williams, é “a capacidade de um material para executar com uma resposta apropriada do hospedeiro em uma aplicação (WILLIAMS, 1987).

A celulose é um polímero linear natural de glicose. É insolúvel em água e degradável em natureza por enzimas microbianas e fúngicas. A degradação da celulose em tecidos animais e humanos é considerado limitado, se é que ocorre, devido à ausência de glicosidases que atacam especificamente ligações em carbono anomérico de configuração  $\beta$  (BAE; SHODA, 2005). Transformações físicas de estruturas de ordem superior de celulose pode, no entanto, modular sua degradação bem como sua resposta do tecido (BERLIN et al., 2003).

A celulose bacteriana é um polímero natural cujas propriedades são semelhantes a dos hidrogéis produzidos a partir de polímeros sintéticos. Ela é sintetizada extracelularmente como fibrilas nanométricas pela bactéria *Acetobacter xilinum*, reclassificada mais tarde (1997) como *Glucanacetobacter xylinus* (BAE; SHODA, 2005).

Ligações de hidrogênio dos grupos hidroxila, segurando as cadeias de celulose juntas, respondem pelo alto grau de cristalinidade, baixa solubilidade e pobre degradação da celulose *in vivo*. As redes de nanofibrilas da celulose constituem um biomaterial com alta resistência mecânica, enorme retenção de água (98-99%), boa sorção de líquidos, não é alergênico e pode ser esterilizado com segurança sem qualquer alteração em suas características (PINTO, 2013). Por possuir propriedades similares que a pele a celulose bacteriana pode ser aplicada no tratamento de queimaduras extensas (PORTELA et al., 2019).

A celulose bacteriana teve como primeira utilização com função de biomaterial no tratamento de feridas pela empresa Johnson & Johnson na década de 80. Posteriormente a esse período, novas empresas de produtos biotecnológicos (Tabela 1) desenvolveram curativo para tratamento de feridas de cicatrizações difíceis que contemplam os requisitos de um ideal curativo.

<b>Empresa</b>	<b>Aplicação</b>	<b>Referências</b>
Biofill®	Membranas desidratadas como curativo de baixo custo para feridas de difíceis cicatrização.	BIO FILL PRODUTOS BIOTECNOLOGICOS (BRASIL). L. F. X. Farah. <b>Process for the preparation of cellulose film, cellulose film produced thereby artificial skin graft and its use.</b> US 4912049, 30 Sept. 1990, 10 June 1986.
Gengiflex®	Membranas para reconstrução de doenças periodontais	JONAS, R.; FARAHA, L. F. Production and application of microbial cellulose. <b>Polymer Degradation Stability</b> , v. 59, p. 101-106, 1998.
XCell®, Xylos Corporation	Membranas hidratadas de biocelulose para o tratamento de feridas crônicas	XYLOS CORPORATION.COM. <b>Biomaterials for Life.</b> Disponível em :< <a href="https://www.pharmaceuticalonline.com/doc/xylos-corporation-awarded-us-grant-0001">https://www.pharmaceuticalonline.com/doc/xylos-corporation-awarded-us-grant-0001</a> . Acesso em: 08 jul. de 2020.
BASYC® Bacterial Synthetised Cellulose	Lentes de contato terapêuticas para regeneração da córnea;	TRIGGER PESQUISA & DESENVOLVIMENTOS BIOTECNOLOGICOS LTDA (Brasil). Y. Messaddeq; S. J. L. Ribeiro; W. Thomazini. <b>Contact lens for therapy in cases of regeneration of cornea, has bacterial cellulose base.</b> BR 200603704-A, 22 Ago. 2006, 08 Abr. 2008.
Cellumed®	Medicina veterinária: aproveitando as vantagens da celulose bacteriana, desenvolvido para terapias em úlceras em cavalo.	CHAVEZ-PACHECO, J. L.; MARTINEZ-YEE, S.; CONTRERAS-ZENTELA, M.; ESCAMILLA-MARVAN, E. Celulosa bacteriana en <i>Gluconacetobacter xylinum</i> : biossíntese y aplicaciones. <b>Revista Especializada em Ciências Químico-Biológicas</b> , v. 7, p. 18-25, 2004.

Tabela 1 - Curativos já desenvolvidos pelo mercado biotecnológico.

Fonte: (BUTCHER, 2012)

Embora não seja um biopolímero que contemple a característica de ser solúvel em solventes comuns, a modificação química da celulose bacteriana pode ser feita usando a reatividade dos grupos hidroxila existentes nas unidades de glicose ligado ao hidrogênio (do inglês, *anhydrous glucose unit*- AGU), por meio das reações de derivação, que constitui da inserção de alguns grupos funcionais como ésteres e éteres (BERLIN et al., 2003).

Os derivados que são mais utilizados e que dispõem bons valores agregados são: acetato de celulose, carboximetilcelulose (CMC), metilcelulose, hidroxipropilcelulose (HPC), entre outros (JONAS; FARAH, 1998).

### 3.4 O papel da hidrofobicidade

As infecções causadas por bactérias patogênicas representam uma tremenda ameaça à sociedade. Embora o uso de antibióticos ainda seja o uso padrão no tratamento de infecções bacterianas, bactérias continuam a crescer, se adaptar e desenvolver mecanismos que tornam esses tratamentos ineficazes (SENGUPTA; KUMAR SARKAR, 2015).

O desenvolvimento de agentes antimicrobianos sintéticos é uma necessidade emergente devido à resistência aos antibióticos de bactérias que causam doenças infecciosas fatais, que ameaçam significativamente a saúde pública em regiões globais. A resistência das bactérias foi encontrada inicialmente em hospitais, no entanto, as cepas resistentes aos medicamentos se espalharam rapidamente para outros locais públicos, bem como comunidades em todos os países (YIN, 2012).

Novos agentes antimicrobianos são necessários, o que requer novos conceitos de design e abordagens para combater bactérias. Considerando a ampla utilização de agentes como medicamentos e em produtos de consumo, seria ideal criar antimicrobianos que atendessem aos seguintes critérios: toxicidade seletiva para bactérias versus células humanas e baixa suscetibilidade ao desenvolvimento de resistência em bactérias (HURST et al., 2016).

Considerando o papel de um material que seja capaz de auxiliar na atividade antimicrobiana destaca-se o estudo sobre materiais de caráter anfífilos ou hidrofóbicos para que possa ser inferido a sua capacidade como material antimicrobiano e investigados como parâmetros estruturais afetam a atividade do polímero (HURST et al., 2016). Kuroda afirma que a atividade antimicrobiana dos copolímeros dependia criticamente em seu conteúdo hidrofóbico e comprimento de polímero. A capacidade de melhoria na atividade antimicrobiana é devido à hidrofobicidade do polímero (DERIVATIVES et al., 2009).

Levando em consideração o papel da hidrofobicidade buscou-se modificar a celulose bacteriana, destaca-se para este trabalho o monoésteres succinil benzílico e succinil octílico,

escolhido por não estarem descritos na literatura com a finalidade de ser acoplado na membrana de celulose bacteriana e possuir caráter hidrofóbico.

### 3.5 Óxido nítrico (NO) como agente antimicrobiano

O interesse médico e científico pelo NO cresceu exponencialmente desde 1992 e devido a isso seus impactos fisiológicos documentados estão sempre em expansão. Até 1987, o NO era conhecido apenas como um poluente atmosférico perigoso gerado por processos industriais e motores automotivos e como um potencial cancerígeno. Porém, no final de 1987, a descoberta da síntese de NO em células de mamíferos revelou que essa molécula exerce efeitos fisiológicos, muitos dos quais ainda não foram completamente caracterizados (LIANG et al., 2015).

O NO é hoje conhecido como um dos mais importantes mediadores dos processos intra e extracelulares e é um dos principais alvos da indústria farmacêutica em processos importantes, como neurotransmissão, comunicação neuronal, adesão plaquetária, trombose, vasodilatação, inflamação e cicatrização de feridas (DE GROOTE; FANG, 1995).

Nas últimas duas décadas, inúmeras pesquisas foram realizadas para desenvolver o gerador de NO mais eficaz e materiais de liberação de NO para clínicas de terapias. Um grande número de compostos sintéticos, por exemplo, N-diazeniumdiolatos, S-nitrosotióis (R-SNO), nitrosohidroxilaminas e nitrosil complexos, foram desenvolvidos para estabilizar quimicamente e liberar NO de forma controlada, sendo explorados em muitas aplicações biomédicas (HOLANDA, 2006)

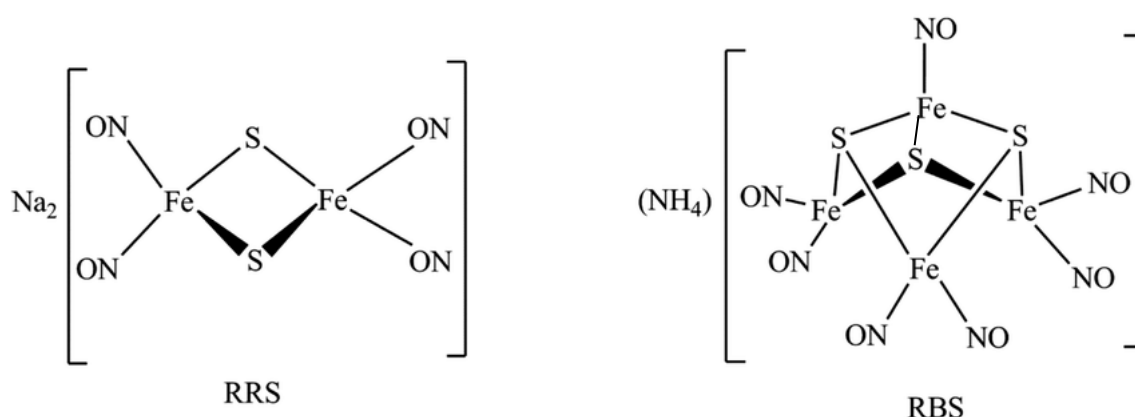
#### Nitrosilos metálicos

Nitrosilos metálicos são uma família de compostos de coordenação contendo ligantes NO. O NO frequentemente se liga a íons metálicos e a energia de ligação e o caráter do vínculo são determinantes para a extensão da liberação de NO. A literatura tem mostrado que certos metais (por exemplo, Fe, Ru, Mn e Cr) são mais adequados como complexos de liberação de NO pois tendem a reagir mais rapidamente (PRIVETT et al., 2012). A ligação existente entre o metal e o NO é estável devido a uma doação dos elétrons dos orbitais  $\sigma$  do NO para o metal. Além da ligação  $\sigma$ , há uma doação da densidade eletrônica dos orbitais d do metal para o orbital  $\pi^*$

do NO, este processo é denominado retrodoação ou retroligação (KENNOVIN; BUTLER, 1996) (FORD, 2001; KENNOVIN; BUTLER, 1996).

Complexos de nitrosilo contendo ferro são amplamente usados como base de metal doadores de nitrosil (NO) como por exemplo, nitroprussiato de sódio (SNP;  $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$ ), usado clinicamente para aliviar a hipertensão (SIRI et al., 2003). Complexos de ferro-nitrosílico, como sal preto de Roussin (RBS), sal vermelho de Roussin (RRS) e ésteres vermelhos de Roussin (RREs), (Figura 4), também mostraram utilidade como doadores de NO. Em geral, estes compostos mimetizam complexos encontrados na natureza, como aqueles em enzimas e outras metaloproteínas (BOURASSA et al., 1997).

Figura 4. Estrutura dos complexos de ferro-nitrosílico.



Fonte: (BOURASSA et al., 1997).

A síntese de complexos de ferro-nitrosílicos são baseadas em reações entre compostos nitrosilos de ferro e sais de sulfeto ou tióis (por exemplo, glutathiona (GSH) e l-cisteína) (KARAKI et al., 2012).

Embora enzimas e/ou reações químicas com tióis, proteínas ou ácido ascórbico em meios biológicos foram relatados para iniciar a liberação de NO dos complexos de ferro-nitrosílicos, estes são suscetíveis a estímulos químicos para promover a liberação de NO, sendo a luz o gatilho mais comum (PRIVETT et al., 2012).

As propriedades de liberação de NO podem ser alteradas pela intensidade, comprimento de onda e duração da luz incidente. Doadores de NO são sensíveis à luz, sendo possível ocorrer a liberação mesmo sob irradiação de baixa intensidade de luz visível. A



capacidade de usar um único gatilho para iniciar a liberação de NO torna esses doadores relativamente únicos entre os demais doadores de NO (JAWORSKA; STASICKA, 2006).

### 3.6 Comparação de doadores de NO para aplicações antimicrobianas

Embora cada classe de doadores de NO apresente certas vantagens para o armazenamento e liberação de NO, é importante avaliar sua utilidade geral no contexto do tratamento de infecções bacterianas. Alguns dos nitratos são talvez os mais limitados dos doadores de NO para aplicações antibacterianas, pois sua liberação de NO é mediada principalmente por enzimas que estão ausentes nas bactérias. A liberação de NO também é suscetível à desativação pelo tecido circundante onde tais enzimas estão presentes (HAMBLIN, 2008).

Sensível à luz, os complexos nitrosílicos permitem um perfil de liberação de NO, mas apenas com o uso de um gatilho de luz externa. Além disso, a luz ultravioleta ou luz visível é geralmente necessária, apresentando dificuldades potenciais no tratamento de infecções internas onde a penetração do tecido por estes comprimentos de onda é limitado (HAMILTON-BREHM; SCHUT; ADAMS, 2009; YANG et al., 2018).

Os centros metálicos e ligantes também podem apresentar problemas de toxicidade (por exemplo, ligantes de cianeto em nitroprussiato de sódio). Embora os múltiplos mecanismos associados à decomposição do *S*-nitrosotiol apresentem certos desafios (por exemplo, estabilidade de armazenamento), sua capacidade de liberar NO espontaneamente no meio biológico elimina a necessidade de gatilhos externos (HURST et al., 2016).

Devido à geração homolítica de radicais NO e tiocompostos, *S*-nitrosotióis terem maior probabilidade de exercer ação bactericida por meio da transnitrosilação de proteínas tioladas em relação a outros doadores de NO. Os di-diíolatos de *N*-diazênio também são capazes de liberar NO espontaneamente em condições biológicas. O mecanismo de decomposição mediado por prótons garante estabilidade de armazenamento em ambientes livres de umidade (BRUCH-GERHARZ; RUZICKA; KOLB-BACHOFEN, 1998; KENNOVIN; BUTLER, 1996).

Os *N*-diazoniolatos são os doadores de NO mais amplamente utilizados para estudar a biologia mediada por NO devido à sua estabilidade, versatilidade e modulação (HOLANDA, 2006; SANT'ANA DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003).

Embora seja um doador conhecido por sua capacidade de modificação, escolheu-se o nitrito de centro metálico, conferindo-se a vantagem de tal modificação e a cinética da síntese. Permitindo em curto tempo a realização da modificação entre a celulose bacteriana e NO.

## 4. PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 Materiais

Os reagentes adquiridos foram da Sigma-Aldrich e utilizados sem purificação.

Os filmes de celulose bacteriana nativo foram produzidos e cedidos pelo Prof. César Tischer da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

Para as modificações da membrana e síntese química foram utilizados os seguintes reagentes: ácido succínico, cloreto de colina, diisopropilcarbodiimida (DIC), dimetilaminopiridina (DMAP), dimetilformamida anidra, sulfato de ferro (II), nitrito de sódio, hidróxido de amônia e sulfeto de amônio. A dimetilformamida foi seca em peneiras moleculares (3 Å) por 48 h.

### 4.2 Desenvolvimento do trabalho

Como o intuito de realizar a modificação das membranas de celulose bacteriana, partiu-se das seguintes ordens: síntese do anidrido succínico para posteriormente o preparo da succinil colina.

Em primeiro momento fez-se a modificação da membrana com os monoésteres de caráter hidrofílicos, succinil benzila e succinil octila.

Em segundo momento para acoplar ao filme já modificado com succinil colina fez-se a síntese do composto de coordenação Sal Negro de Roussin.

#### 4.2.1 Síntese de monoéster succinil octila

Para síntese do monoéster succinil octíla, em um balão de fundo redondo de 25 mL foram adicionados 0,45 g de anidrido succínico (4,5 mmol), 0,391 g de octanol (3 mmol), 0,168 g de DMAP (3 mmol) e 6 mL de diclorometano anidro, por 2 horas sob agitação constante, em temperatura ambiente. Após esse período a mistura foi evaporada e lavada com diclorometano, para então ser separada em duas fases em extração líquido-líquido, uma fase aquosa e uma fase orgânica.

A fase orgânica passou por uma lavagem com HCl 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, nessa lavagem é separada novamente em uma fase aquosa e uma orgânica, a fase orgânica segue para uma lavagem com água destilada até que seu pH fique próximo do neutro, a última etapa após essa lavagem com água foi a realização da evaporação da fase orgânica com produto final na forma oleosa (0,56 g) com rendimento de 82%.

#### 4.2.2 Síntese de monoéster succinil benzila

Para síntese de monoéster succinil benzila foram adicionadas em um balão de fundo redondo de 25 mL, 0,5 g de anidrido succínico (5 mmol), 0,541 g de álcool benzílico (5 mmol), 0,61 g DMAP (5 mmol) e 6 mL de diclorometano anidro. A mistura ficou sob agitação constante em temperatura ambiente por 2 h. Após esse período, fez-se a mesma lavagem descrita no item acima, com diclorometano. A fase orgânica passa por uma lavagem com HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, nessa lavagem é separado novamente em uma fase aquosa e uma orgânica, no qual mede-se o pH na fase aquosa e guarda-se a fase orgânica, sendo que o primeiro valor do pH é de caráter neutro e adicionou-se ácido até mudar para pH próximo a 2.

Posteriormente segue novamente a fase orgânica para o funil de separação para uma lavagem com água destilada até que seu pH fique ácido e novamente repete-se a lavagem da fase orgânica com a fase aquosa até atingir pH próximo a 5. A última etapa foi fazer a secagem do material na fase orgânica com sulfato de sódio anidro, para então evaporar o material obtendo-se um sólido como produto final (0,87 g) com rendimento de 83%.

#### 4.2.3 Metodologia geral para acoplamento dos derivados de monoésteres ao filme de celulose bacteriana

Primeiramente fez-se a lavagem das membranas com etanol e diclorometano e para o acoplamento dos monoésteres do ácido succínico. Foram adicionados à um tubo de vidro fechado com tampa uma membrana de celulose bacteriana (0,030 g; 0,174 mmol em AGU), monoéster do ácido succínico (0,348 mmol), 0,0439 g de DIC (0,348 mmol), 0,011 g DMAP

(0,0087 mmol) e 2 mL de diclorometano anidro. Os tubos com as substâncias adicionadas foram colocados sob irradiação do ultrassom a temperatura de 40 °C por 1 h e 30 min. Após serem submetidos ao ultrassom, as membranas foram lavadas utilizando um vórtex, três vezes com etanol, sendo cada lavagem de três minutos e depois repetiu-se a lavagem mais três vezes com água destilada. Os filmes foram secos em dessecador.

#### 4.2.4 Síntese de succinil colina

Para o preparo da succinil colina misturou-se em um béquer de 50 mL, 2,00 g de anidrido succínico (20 mmol) e 0,5 g de cloreto de colina (4,80 mmol). A mistura foi levada para estufa e fundida por 1h 30min na temperatura de 140°C. Após o resfriamento, lavou-se o material sólido com acetato de etila e fez-se a extração líquido-líquido do produto, no qual o produto ficou na fase aquosa e por fim se evaporou-se o solvente, obtendo-se um sólido branco (0,43 g) com rendimento de 87% (PHILIPS, 1953).

#### 4.2.5 Acoplamento de succinil colina ao filme de celulose bacteriana (BC-P1)

Antes de realizar os procedimentos de acoplamento, as membranas foram lavadas com metanol em um tubo de ensaio, com auxílio do vórtex, essa lavagem foi repetida três vezes, sendo cada lavagem com uma duração de três minutos, em seguida foi feito o mesmo procedimento de lavagem das membranas utilizando o diclorometano, no mesmo intervalo de tempo (três minutos). Em um tubo de ensaio, adicionou-se 87 mg de colina succínico (0,36 mmol), 22 mg de DMAP (0,18 mmol), 3 mL de DMF anidra, 75 mg de DCC (0,36 mmol) e por fim, 30 mg da membrana. O tubo de ensaio contendo a solução foi submetido à irradiação de ultrassom por 1h 30 min em temperatura de 40 °C. Após a irradiação, lavou-se a membrana sequencialmente com DMF e água e logo após a lavagem, a membrana permaneceu em um dessecador.

#### 4.2.6 Síntese do composto de coordenação *Sal Negro de Roussin*

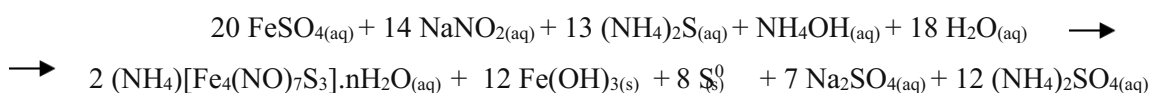
A síntese do sal negro de Roussin foi realizada sob refluxo, a temperatura de aproximadamente 90 °C e ocorreu através da reação entre 3,6 g nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>)

(0,052 mmol) e 4,6 mL de sulfeto de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S) em meio aquoso. Nesta etapa, houve alteração de cor de amarelo para vermelho após aproximadamente 3h30min de reação. Em seguida, foram adicionados 8,0 g sulfato de ferro(II) (FeSO<sub>4</sub>) (0,029 mol) também em solução aquosa, havendo mudança de coloração para preto e imediatamente após esta alteração de cor, foram adicionados 10 mL de NH<sub>4</sub>OH 22%. Esta solução foi mantida sob agitação constante e aquecimento por 10 min. Ao término da reação, filtrou-se o produto final ainda quente. O tempo total de reação foi de aproximadamente 4h. Com o intuito de otimizar a síntese, este procedimento foi otimizado utilizando por micro-ondas convencional.

#### 4.2.7 Síntese do *Sal Negro de Roussin* via micro-ondas

Fez-se a síntese em micro-ondas convencional, na potência de 542 W, ocorrendo a adição dos reagentes por etapas. Inicialmente foram pesadas 3,6 g nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>) (0,052 mmol) dissolvidos em 16 mL de água destilada, após 30 segundos no micro-ondas adicionou-se 4,6 mL sulfeto de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S) em 12 mL de água destilada. Após 90 segundos, houve alteração da cor de amarelo para castanho. Em seguida, adicionou-se simultaneamente 8,0 g sulfato de ferro(II) (FeSO<sub>4</sub>) (0,029 mol) em 64 mL de água destilada e 7,6 mL de NH<sub>4</sub>OH 28%. Havendo a formação de um composto de coloração preta. Após toda a adição dos reagentes tirou-se alíquotas do produto final após 30 segundos de aquecimento, 60 segundos de aquecimento até o total de 120 segundos de aquecimento, com o intuito de verificar o tempo de decomposição do complexo.

A reação de formação do sal negro de Roussin está ilustrada abaixo:



#### 4.2.8 Acoplamento de NO proveniente do complexo de sal negro de Roussin na membrana de celulose Bacteriana

Para o acoplamento do grupo nitrosil à membrana, pesou-se 5,3 mg de sal negro de roussin em um béquer de 100 mL, adicionou-se 25 mL de água destilada, escolheu a água por ser o solvente menos agressivo para o material. Adicionou-se a membrana com o contra-íon já acoplado a também a membrana sem modificação, em temperatura ambiente e deixou-se sob agitação no tempo de 24 horas no escuro.

#### 4.2.9 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

Os espectros vibracionais na região do infravermelho para as amostras foram obtidos no espectrofotômetro FT-IR Spectrometer Spectrum Two, Perkin Elmer, acoplado ao acessório de reflectância total atenuada (ATR/FTIR) sendo as medidas feitas no intervalo de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 4.2.10 Ressonância magnética nuclear (RMN)

A análise de RMN foi registrada num espectrômetro Bruker Avance III, 400 MHz operado a uma frequência de 400,6 MHz para  $^1\text{H}$  e a 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ , usando uma sonda direta de 5 mm, BBo, a 25 °C. Os espectros são expressos em ppm e calibrado de acordo com o sinal de solvente residual por deslocamentos químicos ( $\delta$ ).

#### Forno de micro-ondas

A síntese do sal negro de Roussin assistida por micro-ondas, foi realizada em um micro-ondas convencional, da marca Brastemp, com 1200 W de potência total e operado a 542 W de potência efetiva.

#### 4.2.11 Medida de ângulo de contato

Medidas de contato foram realizadas depositando 1  $\mu\text{L}$  de água deionizada sobre a superfície dos filmes, colados em uma fita dupla face, e seu comportamento foi capturado de modo contínuo, usando um microscópio ótico digital (UC500X). O ângulo de contato foi estimado retirando-se uma imagem estática após 10 segundos de contato entre a gota de água e a superfície dos filmes e esta foi tratada digitalmente para tons de cinza (GIMP). Finalmente, as estimativas foram realizadas manualmente por meio de traçados de contorno em cada imagem capturada e os ângulos foram determinados pelo software ImageJ. Todas as medidas foram realizadas à temperatura ambiente (25 °C) em triplicata.

#### 4.2.12 Teste de crescimento de fibroblastos:

##### Cultivo celular

Células de fibroblastos (L929) (ATCC® CCL1TM) foram cultivadas com meio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), suplementado com 10% soro fetal bovino, 100 IU.mL<sup>-1</sup> penicilina e 100 µg.mL<sup>-1</sup> streptomomicina (Sigma-USA) a 37 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Fibroblastos foram desagregados por tripsinização com 0,05% Tripsina/0,02% EDTA (Gibco, Grand Island, NY, USA).

#### 4.2.13 Avaliação da viabilidade celular

Para a avaliação da viabilidade celular o método colorimétrico de MTT (brometo de 3-(4,5- dimetiltiazol- 2-il)-2,5-difenil tetrazol) foi empregado de acordo com Mosmann (1983). Após 24 h de incubação das células de Fibroblastos L929 a uma densidade de 5,10<sup>5</sup> células/mL sobre as membranas, 100 µL de MTT (5 mg.mL<sup>-1</sup>) foram adicionados, permitido incubação por mais 2h. Em seguida, o MTT foi aspirado e 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados e a absorbância foi medida no comprimento de onda de 595 nm, usando um leitor de microplacas (Molecular Devices, Spectra Max 190, USA). A viabilidade celular foi calculada como porcentagem de células sobreviventes em relação ao controle negativo DMSO.

O resultado foi expresso em média e desvio padrão e foi aplicado ANOVA one-way seguida de teste pos-hoc de Tukey, diferenças consideradas com p<0,005.

#### 4.2.12 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana das amostras de celulose bacteriana foi avaliada pelo método de difusão em disco de ágar com determinação das zonas de inibição (CLSI, 2018). A bactéria patogênica gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 foi incubada em meio Luria-Bertani (LB) a 200 rpm, 37 °C por 20 h. Os filmes (BC-L1, BC-L2, BC e Curativo comercial Cutimed®Siltec Sorbact – somente área hidrofóbica) foram preparados em forma



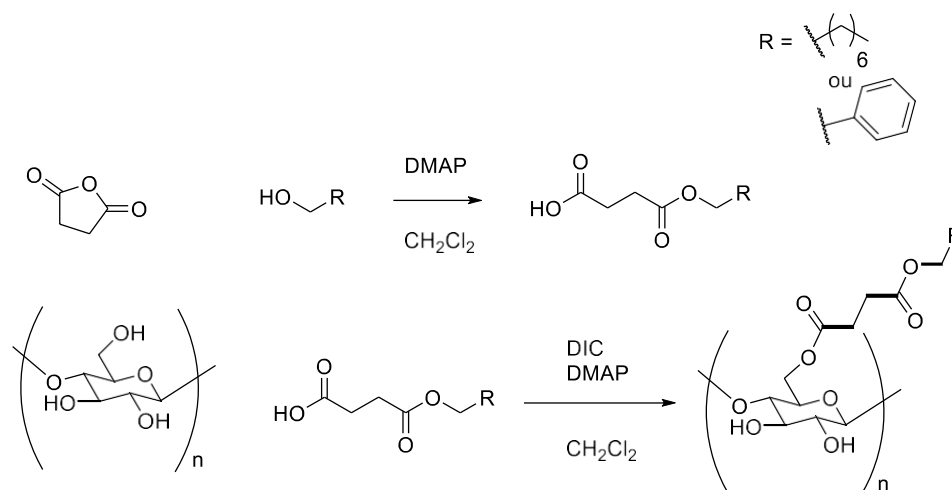
de um disco redondo com 10 mm de diâmetro, esterilizados sob luz ultravioleta por 10 minutos, cuidadosamente colocadas na superfície de ágar Mueller-Hinton (MH) e posteriormente incubadas a 37 °C por 24 h. Após esse tempo, os filmes foram retirados, lavados com água destilada (1 mL) e o número de bactérias é contado em câmara de Neubauer em microscópio ótico.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Preparo de filmes lipofílicos

Para o preparo de filmes de celulose bacteriana com monoéster succinil benzila e para monoéster succinil octila se propôs o esquema a seguir (Figura 5). A proposta foi baseada na reação entre anidrido succínico, e álcool octílico e álcool benzílico em excesso com DMAP anidro, seguido de acoplamento do mesmo à estrutura da celulose bacteriana.

Figura 5 - Preparo do monoésteres succinil benzila e succinil octila para acoplamento em filme de celulose bacteriana.



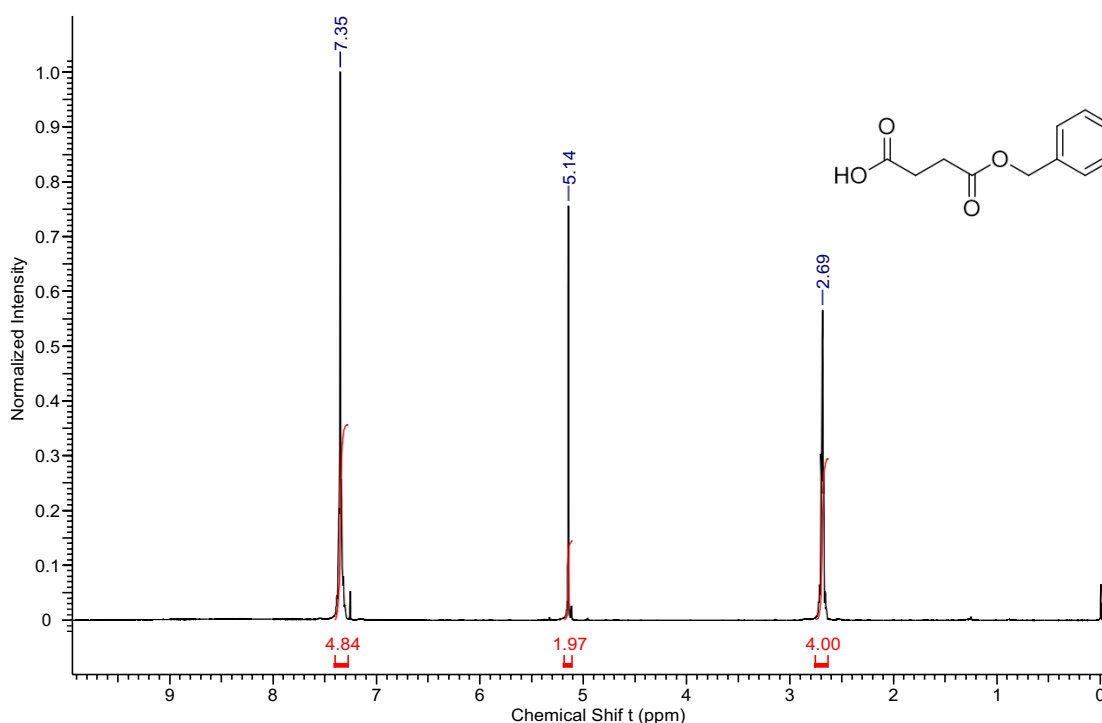
Fonte: Autoria própria.

Como mostra a figura acima, nessa primeira etapa foi feita a abertura do anel em diclorometano anidro em presença de DMAP. Nessa reação o DMAP funcionou como um catalisador nucleofílico, visto que ocorre a abertura do anel mais facilmente com esse do que com o álcool e por ser um bom grupo abandonador na etapa seguinte do mecanismo de reação, assim ele é deslocado pelo álcool facilmente.

Após se verificar o consumo do álcool de partida por análise de cromatografia em camada delgada, fez-se a extração líquido-líquido e por fim evaporou-se a fase orgânica e como produto final no monoéster succinil benzila foi obtido 0,87 g de um sólido com rendimento de 83%. Para o monoéster succinil octila, processo semelhante foi realizado e foi obtido como produto final 0,56 g de óleo com rendimento de 82%.

A Figura 6 mostra o espectro de  $^1\text{H}$  RMN no qual foi possível a confirmação da síntese do monoéster succinil benzila no qual apresenta em 7,35 ppm integral com cinco hidrogênios, em 5,15 ppm apresenta uma integral referente a dois hidrogênios e finalmente em 2,69 uma integral apresentando quatro hidrogênios referente aos hidrogênios metilênicos.

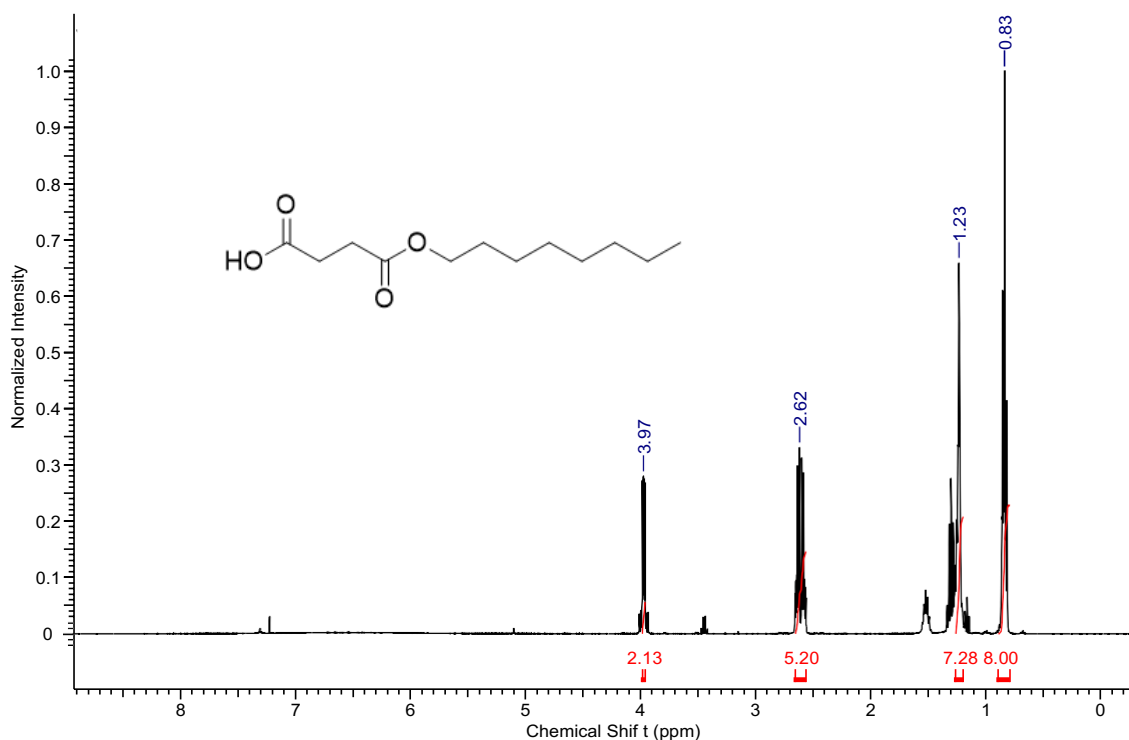
Figura 6. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do monoéster succinil benzílico.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ )-7,35(s, 5H), 5,15(s,2H), 2,69(m,4H).



Fonte: Autoria própria.

Na Figura 7 encontra-se o espectro de  $^1\text{H}$  RMN no qual foi possível a confirmação da síntese do monoéster succinil octila. Pode-se observar os sinais em 4,02 ppm, um tripleto com integral igual a dois hidrogênios referente aos hidrogênios metilênicos ligados ao oxigênio, um multipletto entre 2,71-2,60 ppm com integral igual a quatro hidrogênios, referentes aos dois metilenos do grupo succínico e em 1,28 ppm e em 0,88 ppm dois multipletos referentes aos demais hidrogênios da cadeia do grupo octila.

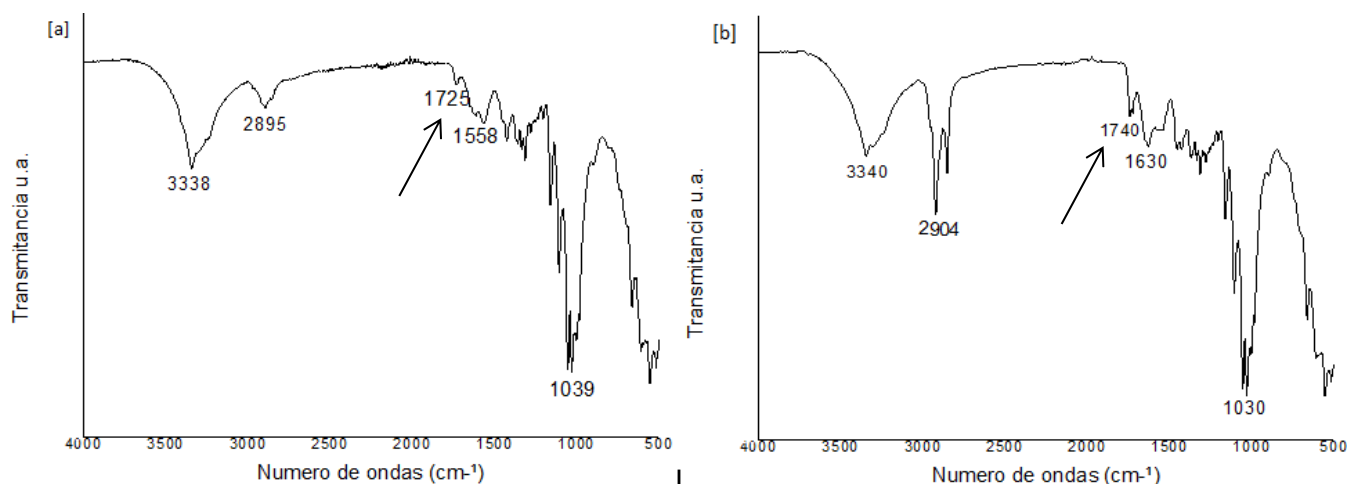
Figura 7 - Espectro de  $^1\text{H}$  RMN do monoéster succinil octila. -  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ )- 4,02(t, 2H), 2,65(t, J=24), 1,28(m,2H) 0,88(m, 2H).



Fonte: Autoria própria.

Os monoésteres succínico tem como característica ter um ácido carboxílico livre que pode ser conjugado a outros grupos funcionais, como as hidroxilas da celulose. Portanto, a segunda etapa foi o acoplamento entre os derivados succínico benzílico e succínico octílico com a celulose em solvente anidro e sob irradiação de ultrassom. Nosso grupo já desenvolveu uma técnica para realizar reações em fase heterogênea de forma suave, sem comprometer a estrutura morfológica da celulose, aproveitando-se do aumento de choques efetivos que ocorrem na interface de fases sob irradiação de ultrassom (Birkheur et. A., 2020). Após 1 h e 30 min de irradiação no ultrassom, os filmes foram lavados, secados e submetidos, inicialmente a análise no infravermelho (Figura 8), como critério de sucesso de reação.

Figura 8 - Espectro de absorção na região do infravermelho da membrana acoplado [a] succinil benzila e [b] succinil octila.



Fonte: Autoria própria.

Nos espectros da Figura 8, foram observados estiramentos assimétricos na região de 3340 cm<sup>-1</sup>, tanto para o monoéster succinil benzila quanto para o monoéster succinil octila, indicando a presença de grupos hidroxilas (ν<sub>OH</sub>). Na região de 2900 cm<sup>-1</sup> há a presença de bandas de grupos C-H alifáticos. Observaram-se bandas em 1725 cm<sup>-1</sup> em (a) e 1730 cm<sup>-1</sup> em (b), referentes ao estiramento (ν<sub>C=O</sub>) de éster. A presença de bandas na região de 1730 cm<sup>-1</sup>, é atribuída ao estiramento (ν<sub>C=O</sub>), confirmando a formação de monoésteres.

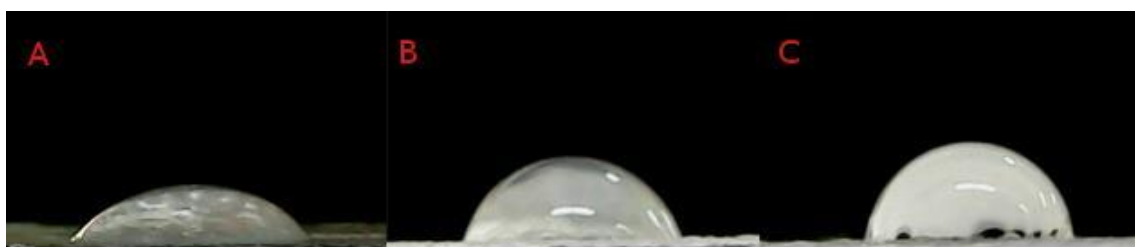
Para se medir que tal modificação química foi relevante na alteração do balanço hidrofílico/hidrofóbico do material, fez-se um ensaio de molhabilidade (Figura 9) do mesmo frente à água como solvente e mediu-se o ângulo de contato. Retirando-se uma imagem estática após 10 segundos de contato entre a gota de água e a superfície, os ângulos foram determinados, e assim fez-se a média das medidas e em comparação com a membrana pura, como apresentado pela Tabela 2.

Amostra	Ângulo de contato Média	Desvio médio	Natureza do filme
Membrana de celulose (CB)	52,7 °	2,1	Hidrofilica
Membrana de celulose bacteriana com succínico octílico (CB-L1)	66,5°	4,5	Hidrofilica
Membrana de celulose bacteriana com succínico benzílico (CB-L2)	81,2°	3,2	Hidrofilica

Tabela 2 - Valores da medida de ângulo de contato da membrana de celulose não modificada e membranas de celulose com os compostos acoplados.

Fonte: A autoria própria.

Figura 9 - Filmes de celulose bacteriana não modifica [a], com succinil octila [b] e succinil benzila [c] no ensaio de ângulo de contato.



Fonte: A autoria própria.

Formalmente, considera-se como materiais hidrofóbicos quando gotas de água em sua superfície apresentam ângulos de contato maiores que 90°. Conforme a Tabela 2, verificou-se que os grupos introduzidos aumentaram a hidrofobicidade do meio quando comparados ao ângulo de contato observado para celulose não modificada. Portanto, entende-se que estas modificações diminuíram o caráter hidrofóbico das mesmas, porém ainda são consideradas hidrofílicas.

Estes filmes foram levados para ensaio de crescimento celular de fibroblastos para se verificar crescimento e citotoxicidade dos mesmos (Tabela 3).

<b>Nome</b>	<b>Ângulo de contato (°)</b>	<b>Ensaio crescimento fibroblasto</b>
Membrana de celulose sem modificação	<b>52,7</b>	Confluência 60-80% Viabilidade 83,07%
Membrana modificada com monoéster Succinil octílico (BC-L1)	<b>66,5</b>	Confluência 60-80% Viabilidade 97,51%
Membrana modificada com monoéster succinil benzílico (BC-L2)	<b>81,2</b>	Confluência 60-80% Viabilidade 90,58%

Tabela 3 - Dados de crescimento de fibroblastos.

Fonte: Autoria própria.

De acordo com os dados do experimento, observou-se que a confluência, ou seja, o crescimento das células sobre a superfície dos filmes foi semelhante entre todos os filmes. Entende-se que as modificações realizadas não alteraram como as células cresceram sobre as membranas. Entretanto, nos filmes modificados houve um aumento significativo da viabilidade das células, o que indica que o balanço hidrofílico/hidrofóbico quando ainda hidrofílico e deslocado para valores próximos do limite hidrofóbico apresenta melhor citocompatibilidade. É válido ressaltar que estes filmes hidrofóbicos apresentaram os melhores resultados de citocompatibilidade do grupo até o momento. Eles não só apresentam dados superiores ao dos filmes não modificados, como são melhores que os filmes de celulose modificados com motivos químicos como arilmanosídeos (BIRKHEUR et al., 2017) e colágeno (RIBEIRO-VIANA et al., 2019) que são ambos mais citocompatíveis que os filmes comerciais.

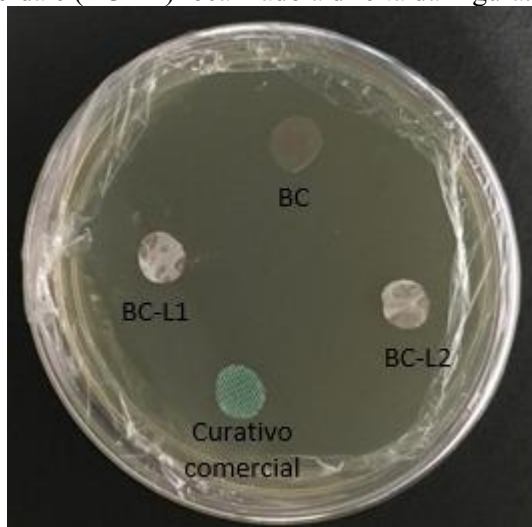
## 5.2 Avaliação antimicrobiana dos filmes lipofílicos

No modelo de inspeção de atividade antimicrobiana utilizado, dois parâmetros foram observados: halo de inibição e quantidade de bactérias na superfície dos filmes.

Para nenhuma das amostras foi observado halo de inibição para o crescimento celular das bactérias. Este resultado vai ao encontro do esperado, visto que com as modificações químicas realizadas nos filmes, não se esperava que ocorresse liberação de qualquer tipo de substância no meio.

Em relação à contagem do número de bactérias presentes nos filmes, observaram-se os seguintes valores:  $8 \times 10^3$  células/mL para celulose bacteriana não modificada,  $15 \times 10^3$  células/mL para curativo comercial,  $6 \times 10^3$  células/mL para filme BC-L1 e  $2 \times 10^3$  células/mL para filme BC-L2 (Figura 10).

Figura 10 - Ensaio com os filmes de celulose bacteriana sem modificação (BC), filme de celulose comercial localizado na posição abaixo do (BC), filme de celulose modificados (BC-L1) localizado à esquerda e (BC-L2) localizado à direita da Figura.



Fonte: Autoria própria.

Considerando a celulose bacteriana não modificada como referência nesse ensaio, os filmes modificados apresentaram quantidade inferior de células presentes em sua superfície,



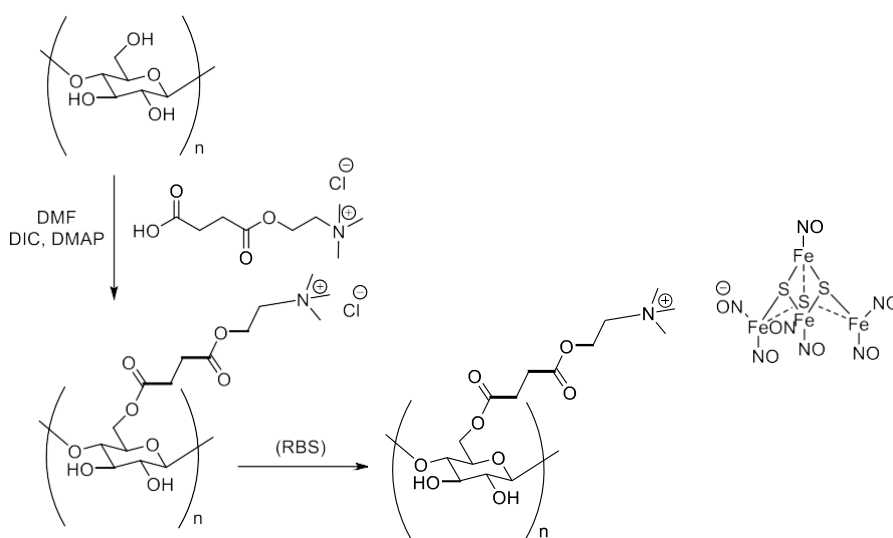
enquanto o curativo comercial apresentou quantidade superior de células. Os filmes modificados não apresentaram capacidade aumentada de reter bactérias em sua superfície, porém pode-se entender esse resultado como uma ação antimicrobiana, inibindo o crescimento celular em sua superfície, o que também é desejável para aplicação final destes curativos.

Por outro lado, devido ao modelo experimental, tão pouco é possível fazer muitas afirmações sobre o curativo comercial quanto sua capacidade de remoção de células. A camada hidrofóbica do curativo comercial é feita de uma trama quadriculada contendo espaços vazios, que acaba sendo permeada por líquido do meio onde ela se encontra. Ao se retirar o filme deste curativo da placa, é possível observar acúmulo de líquido na sua trama. Este fato pode justificar o aumento de retenção de bactérias em sua superfície, indicando, neste experimento, um efeito de ordem macromolecular, retenção de meio líquido contendo bactérias, e não um efeito de retirada de células por efeito de interações intermoleculares.

### 5.3 Filmes doadores de óxido nítrico (NO)

Para preparação de filmes doadores de óxido nítrico, estabeleceu-se a seguinte estratégia conforme a Figura 11.

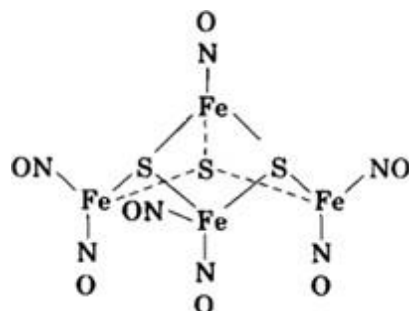
Figura 11 - Preparação de filmes de celulose bacteriana funcionalizado com succinil colina e complexo  $[Fe_4S_3(NO)_7]^-$ .



Fonte: Autoria própria.

Esta estratégia foi baseada no fato de que o *sal negro de Roussin* (RBS) (Figura 12), agente doador de NO em presença de luz visível, é um composto de coordenação metálico aniônico e, portanto passível de ser adsorvido por um filme contendo cargas positivas por interação eletrostática (SEYFERTH; GALLAGHER; COWIE, 1986).

Figura 12 - Estrutura do composto conhecido como Roussin's Black Salt (RBS), um complexo aniônico  $[\text{Fe}_4\text{S}_3(\text{NO})_7]^-$ .

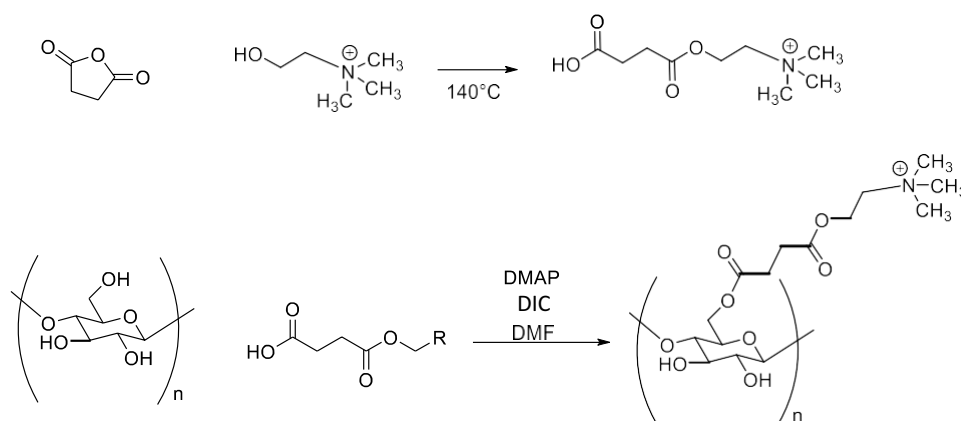


Fonte: (SEYFERTH; GALLAGHER; COWIE, 1986)

### 5.3.1 Preparo de filme de celulose bacteriana catiônico

Para o preparo de filmes de celulose bacteriana com cloreto de colina, foi proposto um esquema de reações (Figura 13). A proposta foi baseada na síntese do derivado de succinil colina por abertura do anidrido succínico em presença de DMAP em meio anidro descrita por (PHILLIPS, 1953).

Figura 13 - Síntese da succinil colina e acoplamento de colina em filme de celulose bacteriana.



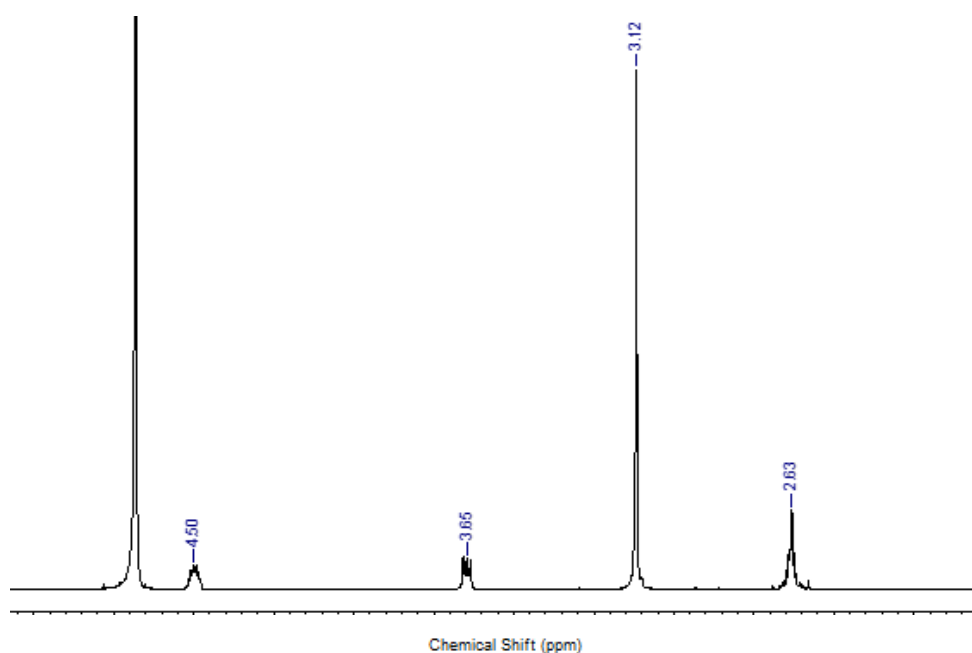
Fonte: Autoria própria

Este derivado de celulose bacteriana contendo succinil colina ligada covalentemente foi preparada para adsorver o sal de Roussin por interação iônica.

A esterificação da colina se fez em meio em ausência de solvente, fundindo-se os reagentes a 140 °C. Após o termino da reação, fez-se a extração do produto e por fim evaporou-se o material e foi um sólido com rendimento de 87%.

Na Figura 14 encontra-se o espectro  $^1\text{H}$  RMN para confirmação da síntese. Pode-se observar pela análise do espectro de  $^1\text{H}$  RMN, um multipletto em 4,5 ppm com integral igual a dois hidrogênios e em 3,65 ppm outro multipletto com integral igual a dois referentes aos metilenos da colina, um ligado ao nitrogênio quaternário e o outro ao oxigênio, respectivamente. Em 3,12 ppm encontra-se um singletto com integral igual a nove, referente aos três grupos metilas. Em 2,63 ppm há um singletto com integral igual a quatro hidrogênios, referente aos metilenos succínico.

Figura 14 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do succinil colina.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz-, D<sub>2</sub>O,  $\delta$ )- 4,5(m, 2H), 3,65(m, 2H), 3,12(s, 9H), 2,63(s, 4H).

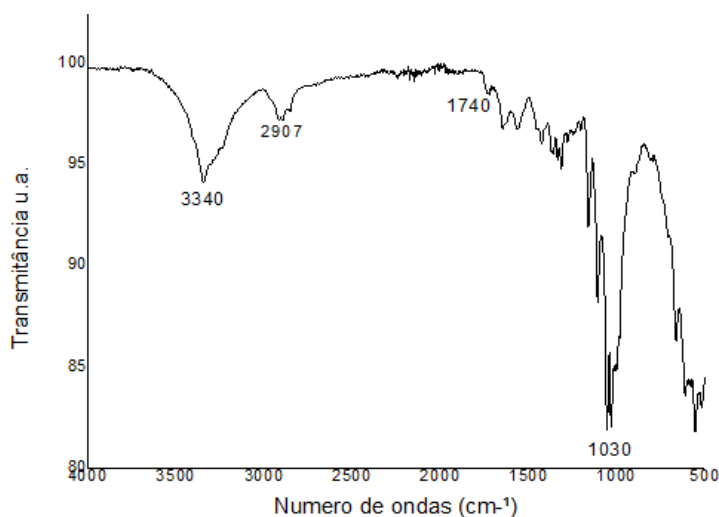


Fonte: Autoria própria.

Após a comprovação da formação da succinil colina, iniciou-se o processo de acoplamento desse composto à membrana de celulose. Nesta reação, foram utilizados DCC/DMAP como ativador de ácido carboxílico e DMF anidro, como solvente. A reação foi

submetida à irradiação de ultrassom por 1h e 30 min. A cavitação produzida pelo ultrassom cria bolhas que colapsam na interface das membranas, criando um jato potente que força o choque das substâncias que estão em fase líquida na fase sólida. (Mason, 1997). Por fim, a membrana foi lavada, seca e analisada por espectroscopia no infravermelho (Figura 15).

Figura 15 - Espectro no infravermelho da succinil colina acoplada ao filme de celulose bacteriana (BC-P1).



Fonte: Autoria própria.

No espectro no infravermelho, pode-se notar as bandas características da celulose bacteriana, como em  $3340\text{ cm}^{-1}$  que indica a presença de grupos hidroxilas. A banda de absorção em  $2900\text{ cm}^{-1}$  apresenta-se com baixa intensidade, indicando a presença de grupos alcanos alifáticos. A banda de  $1031\text{ cm}^{-1}$  é atribuída pela presença de C-O. O sucesso do acoplamento pode ser confirmado pela banda em  $1740\text{ cm}^{-1}$ , típico do grupo carbonila de éster (C=O).

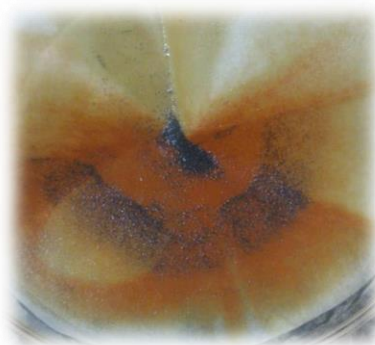
### 5.3.2 Preparo do composto de coordenação sal negro de Roussin $[\text{Fe}_4\text{S}_3(\text{NO})_7]^-$ .

Para síntese do complexo que contém óxido nítrico, inicialmente utilizou-se uma técnica convencional na qual a reação acontece por refluxo à temperatura de  $100\text{ }^\circ\text{C}$ . Após um período de 4 horas, obteve-se massa de 0,0046 g do composto sólido de coloração preta (Figura 16). Como se identificou que a reação era lenta e de baixo rendimento, fez-se um pequeno estudo de busca de condições reacionais mais robustas.

Para tanto, a síntese de formação do complexo de ferro(II) foi refeita sob irradiação de micro-ondas. Inicialmente foram realizados testes em diferentes tempos de reação. De

imediatamente, foi possível observar uma melhora substancial no tempo reacional e que o produto obtido foi o mesmo que o obtido pela metodologia convencional (síntese sob refluxo por 4h). Para otimizar o processo, a síntese foi repetida nos tempos de 30, 60, 90, 120 e 240 segundos, na potência de 452 W. Verificou-se que com o tempo de 120 segundos de reação, houve a formação do produto. No entanto, no tempo de 240 segundos, observou-se a degradação do composto de coordenação, sal negro de Roussin.

Figura 16 - Produto final da síntese RBS.



Fonte: Autoria própria.

Com o intuito de analisar os compostos de coordenação sintetizados, a espectroscopia vibracional na região do infravermelho é uma importante ferramenta para verificar se o  $\text{NO}^+$  coordenou-se ao centro metálico de ferro(II).

#### Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

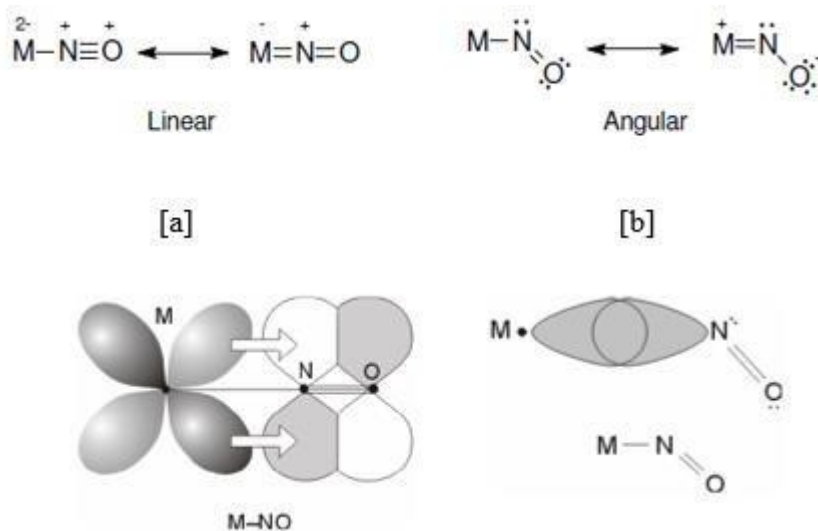
Os compostos químicos podem absorver radiação nas regiões do ultravioleta, visível e infravermelho, na faixa de 200 a  $4000\text{ cm}^{-1}$ , do espectro eletromagnético. A radiação infravermelha é responsável por provocar diferentes modos de vibração e rotação da molécula. O infravermelho pode ser usado tanto para espécies orgânicas quanto inorgânicas, como por exemplo, na análise de compostos de coordenação, possibilitando identificar grupos funcionais dos mesmos, além de deslocamentos das bandas oriundos da coordenação com diversos centros metálicos.

Um aspecto relevante na análise de espectroscopia na região do infravermelho, relaciona-se a coordenação de ligantes do grupo nitrosil (NO) ao centro metálico, como no caso da análise do sal negro de Roussin.

Há duas formas da molécula de NO se ligar em um centro metálico, sendo elas por via átomo de oxigênio (M-ON) ou via átomo de nitrogênio (M-NO), formando nitrosilos complexos. Geralmente, a ligação da molécula de NO com o centro metálico ocorre pela coordenação via átomo de N (M-NO) (MELSON; STOTZ, 1971). O ligante nitrosil coordenado de modo terminal pode assumir as geometrias linear ( $\text{NO}^+$ ) e angular ( $\text{NO}^0$ ), como mostra a Figura 17.

A propriedade física mais característica do ligante óxido nítrico, é o valor da frequência de estiramento  $\nu(\text{NO})$  no infravermelho, mas essa banda não pode ser usada como uma forma totalmente segura para distinguir os grupos terminais linear e angular (NO). Entretanto, as frequências de estiramento  $\nu(\text{NO})$  de grupos M-NO na forma angular são geralmente menores que aqueles grupos M-NO na forma linear, porque essas frequências refletem a variação do grau do efeito  $\pi$  backbonding (JANCZYK et al., 2004; MELSON; STOTZ, 1971; SIRI et al., 2003).

Figura 17 - Representação das possíveis coordenações do ligante nitrosil ao centro metálico: [a] M-N-O com geometria linear (retroligação metal-ligante) e [b] M-N-O com geometria angular.



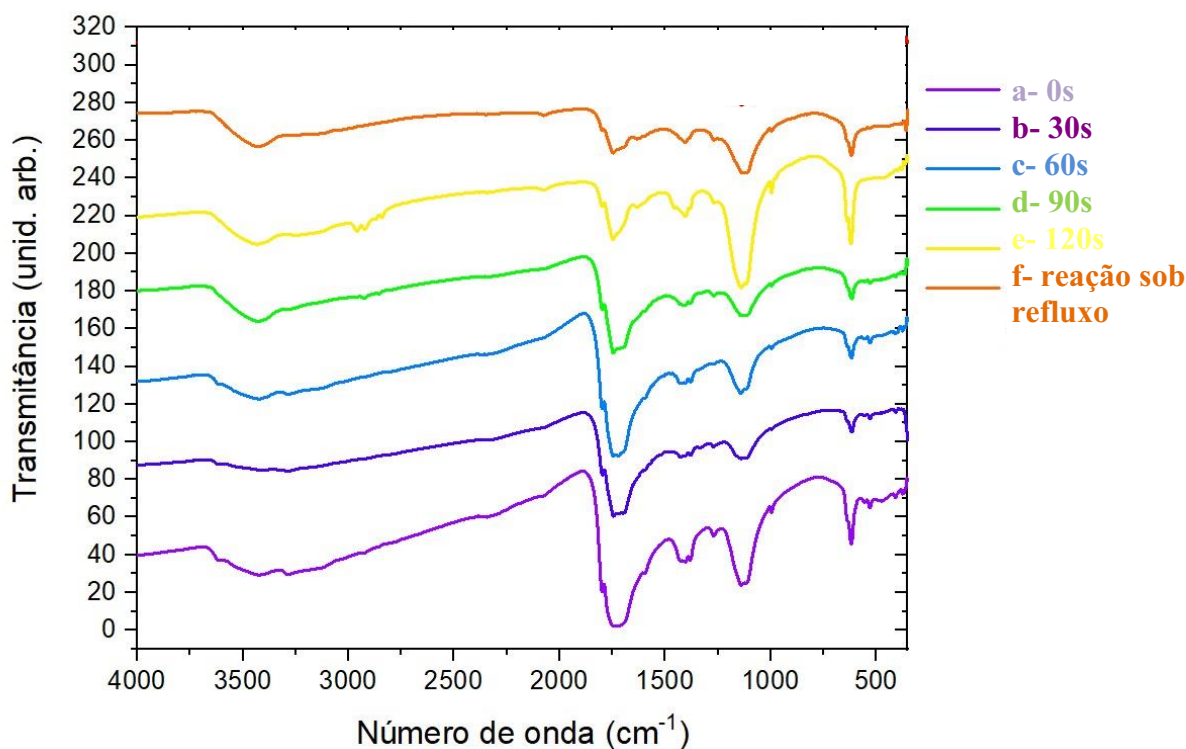
Fonte: (HOLANDA, 2006).

Na Figura 18 estão representados os espectros na região do infravermelho, obtidos para o composto de coordenação, o sal negro de Roussin, para as duas técnicas de síntese: sob refluxo (Figura 18F) e em micro-ondas (Figura 18A-E).

Complexos nitrosilos de ferro(II) são normalmente caracterizados na região do IV por meio da banda de estiramento  $\nu\text{NO}$ , que geralmente apresenta banda intensa na região de 1970 a 1800  $\text{cm}^{-1}$ . As bandas observadas quando a coordenação ocorre pelo átomo de nitrogênio, são as bandas de estiramento assimétrico ( $\nu_{\text{ass}}\text{NO}$ ) e estiramento simétrico ( $\nu_{\text{s}}\text{NO}$ ), cuja atribuição ocorre na região de 1340  $\text{cm}^{-1}$  e 1270  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente (NAKAMOTO, 1986). Em aproximadamente 1800  $\text{cm}^{-1}$ , observou-se uma banda de estiramento NO ( $\nu\text{NO}$ ) para o composto nitrosilo, sendo em 1750  $\text{cm}^{-1}$  possível inferir a coordenação do NO ao átomo de Fe(II).

A existência de bandas em 1330  $\text{cm}^{-1}$  e 1280  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 18), possibilitou inferir a coordenação via átomo de nitrogênio do ligante nitrosil ao centro metálico de íon ferro<sup>2+</sup>.

Figura 18 - Espectros de absorção na região do IV do complexo  $[\text{Fe}_4\text{S}_3(\text{NO})_7]^-$ , obtidos em pastilhas de KBr, em micro-ondas, obtidos nos tempos: a) 0 s (após a adição do sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ) e hidróxido de amônio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ )), b) 30 s, c) 60 s, d) 90 s e e) 120 s. f) reação sob refluxo em único tempo,



Fonte: Autoria própria.

A química de coordenação do NO demonstra que essa molécula pode formar dois modos distintos de ligação terminal. Um fator que pode variar a coordenação é M-NO (coordenado pelo átomo de N) ou M-ON (coordenado pelo átomo de O) e com geometria linear ou angular. Em complexos nitrosilos com metais de transição as bandas estão entre 1950-1450  $\text{cm}^{-1}$  (M-NO) linear e entre 1720-1400  $\text{cm}^{-1}$  (M-NO) angular (NAKAMOTO,

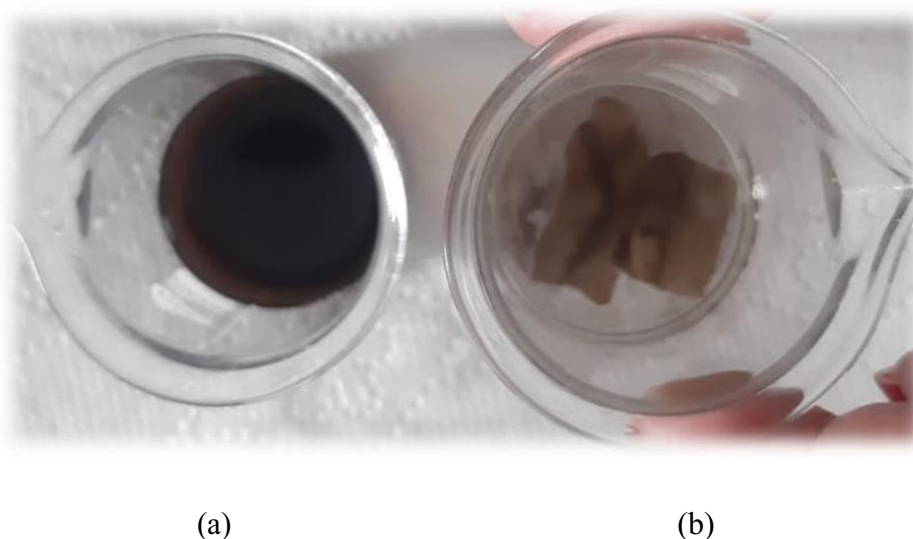
1986) sendo assim, para os complexos sintetizados foi inferida a geometria angular, visto que observou-se nos espectros de complexos de nitrosil-ferro, que houve semelhanças nas bandas de estiramento abaixo de  $1750\text{ cm}^{-1}$  (Figura 18).

Com base nestes dados e na descrição do mesmo na literatura, pôde-se inferir que houve a formação do *sal negro de Roussin*.

#### 5.4 Acoplamento de NO na membrana de celulose Bacteriana

Para se inserir o sal negro de Roussin na membrana de celulose modificada, imergiram-se filmes de celulose bacteriana modificados com succinil colina e não modificados em uma solução do composto de coordenação. Estas soluções foram agitadas por 24 horas e se pode observar mudança visual nas misturas contidas nos frascos, conforme Figura 19.

Figura 19 - Solução de sal negro de roussin com a membrana sem modificação (a) e com a membrana com carga acoplada com a succinil colina (b).



Fonte: Autoria própria.

Como mostra a Figura 19 percebe-se que a membrana de coloração “branca turva” (b) ficou com a coloração do complexo metálico e a solução do complexo metálico que era preta ficou amarelo incolor. Por outro lado, a solução que continha os filmes não modificados manteve uma cor escura, típica do sal de Roussin em solução (a). Este dado qualitativo ilustrou a



interação entre as cargas positivas nos filmes modificados é de grande importância para reter o composto de coordenação (cargas negativas) por interação eletrostática, conforme esperado.

## 6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Este trabalho resultou na formação de filmes de celulose bacteriana modificados na superfície com motivos hidrofóbicos e catiônicos. As membranas modificadas com motivos hidrofóbicos foram caracterizadas e pôde-se observar uma maior citocompatibilidade dos fibroblastos quando o balanço hidrofílico/hidrofóbico das mesmas era diminuído. Houve uma melhora na atividade antimicrobiana em comparação à celulose não modificada, embora não seja por um mecanismo de retirada passiva de carga bacteriana. Tampouco foi possível fazer maiores comparações com curativo comercial e sua eficácia, devido a uma limitação do modelo experimental. Além disso, conseguiu-se sintetizar o composto de coordenação de ferro contendo grupos nitrosilas, determinar sua formação por análise por espectroscopia no infravermelho e agilizar sua síntese se utilizando irradiação no micro-ondas, passando de uma reação de horas para minutos.

Percebeu-se que comparando as membranas de celulose bacteriana, o filme que contem a carga positiva referente a molécula da succinil colina foi capaz de adsorver o sal negro de Roussin, enquanto os filmes não modificados não foram bem sucedidos, demonstrando a importância da carga positiva para retenção do composto de coordenação.

As próximas etapas deste trabalho será quantificar a absorção da mesma e determinar a liberação de NO destes filmes usando-se voltametria cíclica para detecção da formação deste gás sob irradiação na luz visível. Além disso, estes filmes serão submetidos a ensaios de crescimento de fibroblastos e queratinócitos sensíveis a NO, além de atividade antimicrobiana.

Finalmente, entendemos que as modificações químicas realizadas neste trabalho já se mostraram importantes para melhora do desempenho destes filmes para aplicações como curativos, em modelo *in vitro*, para os filmes hidrofobizados. Além disso, as reações implementadas neste trabalho foram essenciais para o correto desenvolvimento do material contendo doador de NO, bem como foi desenvolvido uma variação ao método de síntese do sal de Roussin que possibilitou uma otimização do mesmo.

## 7 REFERÊNCIAS

- BAE, S. O.; SHODA, M. Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* BPR2001 using molasses medium in a jar fermentor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 1, p. 45–51, 2005.
- BERLIN, P. et al. Film-forming aminocellulose derivatives as enzyme-compatible support matrices for biosensor developments. **Cellulose**, v. 10, n. 4, p. 343–367, 2003.
- BIRKHEUR, S. et al. Enhancement of fibroblast growing on the mannosylated surface of cellulose membranes. **Materials Science & Engineering C**, v. 77, p. 672–679, 2017.
- BOATENG, J.; CATANZANO, O. Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing - A Review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. 11, p. 3653–3680, 2015.
- BORGES, E. L. Tratamento de feridas: avaliação de um protocolo. p. 159, 2000.
- BOURASSA, J. et al. Photochemistry of Roussin's Red Salt,  $\text{Na}_2[\text{Fe}_2\text{S}_2(\text{NO})_4]$ , and of Roussin's Black Salt,  $\text{NH}_4[\text{Fe}_4\text{S}_3(\text{NO})_7]$ . In Situ Nitric Oxide Generation To Sensitize  $\gamma$ -Radiation Induced Cell Death 1. v. 2, n. April 1995, p. 2853–2860, 1997.
- BRAUNWARTH, H.; BRILL, F. H. H. Antimicrobial efficacy of modern wound dressings: Oligodynamic bactericidal versus hydrophobic adsorption effect. **Wound Medicine**, v. 5, p. 16–20, 2014.
- BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The basic science of wound healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, n. 7 SUPPL., p. 12–34, 2006.
- BRUCH-GERHARZ, D.; RUZICKA, T.; KOLB-BACHOFEN, V. Nitric Oxide in Human Skin: Current Status and Future Prospects. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 110, n. 1, p. 1–7, 1998.
- BUTCHER, M. in Wound Bioburden Management. **British Journal of Nursing**, v. 21, n. 12, p. 16–21, 2012.
- CHERYL, C. A. N.; LEITZEL, K. I. M.; LIPTON, A. Inhibition of Wound Healing by Topical Steroids. **The Journal of Dermatologic Surgery and Oncology**, v. 9, n. 10, p. 819–821, 1983.
- COIMBRA, C. G. DE O. **Produção de celulose bacteriana por *Gluconacetobacter xylinus* e elaboração de filmes comestíveis**. [s.l.] Universidade Federal de Pernambuco, 2015.
- COLEMAN, J. W. Nitric oxide in immunity and inflammation. **International Immunopharmacology**, v. 1, n. 8, p. 1397–1406, 2001.

- CZAJA, W. et al. Microbial cellulose - The natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v. 27, n. 2, p. 145–151, 2006.
- DE GROOTE, M. A.; FANG, F. C. NO inhibitions: Antimicrobial properties of nitric oxide. **Clinical Infectious Diseases**, v. 21, p. 17–20, 1995.
- DERIVATIVES, P. et al. The Role of Hydrophobicity in the Antimicrobial and Hemolytic Activities of. p. 1123–1133, 2009.
- EMING, S. A.; MARTIN, P.; TOMIC-CANIC, M. Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. **Science Translational Medicine**, v. 6, n. 265, 2014.
- FORD, P. C. Photochemical reactions of metal nitrosyl complexes. Mechanisms of NO reactions with biologically relevant metal centers. **International Journal of Photoenergy**, v. 3, n. 3, p. 161–169, 2001.
- FRANK, S. et al. Nitric oxide drives skin repair: Novel functions of an established mediator. **Kidney International**, v. 61, n. 3, p. 882–888, 2002.
- HAMBLIN, M. R. The Role of Nitric Oxide in Low Level Light Therapy. v. 6846, p. 1–14, 2008.
- HAMILTON-BREHM, S. D.; SCHUT, G. J.; ADAMS, M. W. W. Antimicrobial Activity of the Iron-Sulfur Nitroso Compound Roussin's Black Salt  $[\text{Fe}_4\text{S}_3(\text{NO})_7]$  on the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 7, p. 1820–1825, 2009.
- HASHIM, P. W.; FERNEINI, A. M. Complications in Maxillofacial Cosmetic Surgery: Strategies for Prevention and Management. **Wound healing**, v. 20, n. 1, p. 37–45, 2017.
- HOLANDA, A. K. M. **Síntese, caracterização e estudo da liberação fotoquímica de óxido nítrico por nitrosilo complexos de Ru e Fe e pelo composto [cyclam(NO)4]**. [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2006.
- HU, Y. et al. Engineering of porous bacterial cellulose toward human fibroblasts ingrowth for tissue engineering. **Journal of Materials Research**, v. 29, n. 22, p. 2683–2693, 2014.
- HURST, R. D. et al. Photobiological Sciences. **Carbohydrate Polymers**, v. 501, p. 146–150, 2016.
- JAWORSKA, M.; STASICKA, Z. Structure and UV – vis spectroscopy of roussin black salt  $[\text{Fe}_4\text{S}_3(\text{NO})_7]$  K. **Journal of Molecular Structure**, v. 785, n. 1–3, p. 68–75, 2006.
- JOHAR, N.; AHMAD, I.; DUFRESNE, A. Extraction, preparation and characterization of cellulose fibres and nanocrystals from rice husk. **Industrial Crops and Products**, v. 37, n. 1, p. 93–99, 2012.

- JONAS, R.; FARAH, L. F. Production and application of microbial cellulose. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, n. 1–3, p. 101–106, jan. 1998.
- KARAKI, F. et al. Visible-Light-Triggered Release of Nitric Oxide from N-Pyramidal Nitrosamines. **Chemistry – A European Journal**, v. 18, n. 4, p. 1127–1141, 2012.
- KENNOVIN, G. D.; BUTLER, A. R. oxygen-dependent, photochemical. p. 1549–1557, 1996.
- KLEMM, D. et al. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 44, n. 22, p. 3358–3393, 2005.
- LAI-CHEONG, J. E.; MCGRATH, J. A. Structure and function of skin, hair and nails. **Medicine**, v. 37, n. 5, p. 223–226, 2009.
- LIANG, H. et al. Nitric oxide generating/releasing materials. **Future science OA**, v. 1, n. 1, 2015.
- LIMA, R. V. K. S.; COLTRO, P. S.; JÚNIOR, J. A. F. Terapia por pressão negativa no tratamento de feridas complexas. **Revista do Colegio Brasileiro de Cirurgioes**, v. 44, n. 1, p. 81–93, 2017.
- LIN, W. C. et al. Bacterial cellulose and bacterial cellulose-chitosan membranes for wound dressing applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 603–611, 2013.
- LORENA, D. et al. Normal scarring: Importance of myofibroblasts. **Wound Repair and Regeneration**, v. 10, n. 2, p. 86–92, 2002.
- MELSON, G. A.; STOTZ, R. W. The coordination chemistry of scandium. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 7, n. 2, p. 133–160, 1971.
- MURPHREE, R. W. Impairments in Skin Integrity. **Nursing Clinics of North America**, v. 52, n. 3, p. 405–417, 2017.
- NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds**. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, 1986.
- NAUDE, L. The practice and science of wound healing: history and physiology of wound healing. **Professional Nursing Today**, v. 14, p. 17–21, 2010.
- PADRÃO, J. et al. Bacterial cellulose-lactoferrin as an antimicrobial edible packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 58, p. 126–140, 2016.
- PICHETH, G. F. et al. Bacterial cellulose in biomedical applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 97–106, 2017.
- PINTO, A. M. C. **Modificação in situ e ex situ de celulose bacteriana: efeito da composição do meio de cultura no seu rendimento e propriedades**. [s.l.] Universidade do

Minho, 2013.

PLIQUETT, F.; PLIQUETT, U. Passive electrical properties of human stratum corneum in vitro depending on time after separation. **Biophysical Chemistry**, v. 58, n. 1–2, p. 205–210, 1996.

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

PRIVETT, B. J. et al. Nitric Oxide Examination of bacterial resistance to exogenous nitric oxide. **Nitric Oxide**, v. 26, n. 3, p. 169–173, 2012.

RIBEIRO-VIANA, R. M. et al. **Processo de preparação de filmes de celulose bacteriana compatíveis com fibroblastos e com superfície quimicamente modificada com manosilados, succinilados e colágeno, produtos obtidos e sua aplicação como cicatrizante**, Titular: Universidade Tecnológica Federal do Paraná, BR 10 2019 016368 2. Depósito: 07/08/2019, 2019.

SANT'ANA DUSSE, L. M.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. DAS G. Revisão sobre óxido nítrico Nitric oxide revision. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 343–350, 2003.

SENGUPTA, A.; KUMAR SARKAR, C. **Introduction to nano : basics to nanoscience and nanotechnolo**. 2015a. ed. [s.l.] Springer, 2015.

SEYFERTH, D.; GALLAGHER, M. K.; COWIE, M. The Bridging Sulfide Anion Reactivity of Roussin's Red Salt. **Organometallics**, v. 5, n. 3, p. 539–548, 1986.

SHERRATT, J. A.; MURRAY, J. D. Models of epidermal wound healing. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 241, n. 1300, p. 29–36, 1990.

SHEYKHNAZARI, S. et al. Bacterial synthesized cellulose nanofibers; Effects of growth times and culture mediums on the structural characteristics. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 3, p. 1187–1191, 2011.

SIGNER, M. et al. Comparison of PHMB-containing dressing and silver dressings in patients with critically colonised or locally infected wounds. **Journal of Wound Care**, v. 21, p. 9–13, 2012.

SIRI, O. et al. Iron complexes acting as nitric oxide carriers. **Inorganica Chimica Acta**, v. 350, p. 633–640, 2003.

SULAEVA, I. et al. Bacterial cellulose as a material for wound treatment: Properties and modifications: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1547–1571, 2015.

TAN, L. et al. Acta Biomaterialia Controllable release of nitric oxide and doxorubicin from

engineered nanospheres for synergistic tumor therapy. **Acta Biomaterialia**, v. 57, p. 498–510, 2017.

XU, C. et al. Bacterial Cellulose Membranes Used as Artificial Substitutes for Dural Defection in Rabbits. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 6, p. 10855–10867, 2014.

YANG, L. et al. Nitric Oxide – Releasing Macromolecular Scaffolds for Antibacterial Applications. **Advanced Healthcare Materials**, v. 7, n. 13, p. 1–18, 2018.

ZOPPE, J. O. et al. Poly(N -isopropylacrylamide) brushes grafted from cellulose nanocrystals via surface-initiated single-electron transfer living radical polymerization. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 10, p. 2683–2691, 2010.