

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS  
CURSO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS

ANA LUISA MENEZES SANTOS

**FILMES DE CELULOSE BACTERIANA MODIFICADOS COMO  
CURATIVOS QUE LIBERAM ANTIBIÓTICO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

LONDRINA

2021

ANA LUISA MENEZES SANTOS

**FILMES DE CELULOSE BACTERIANA MODIFICADOS COMO  
CURATIVOS QUE LIBERAM ANTIBIÓTICO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado  
ao Departamento Acadêmico de Engenharia de  
Materiais da Universidade Tecnológica Federal do  
Paraná como requisito parcial para obtenção do título  
de Bacharel em Engenharia de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Renato Ribeiro Viana

LONDRINA

2021



---

## TERMO DE APROVAÇÃO

**ANA LUISA MENEZES SANTOS**

### **FILMES DE CELULOSE BACTERIANA MODIFICADOS COMO CURATIVOS QUE LIBERAM ANTIBIÓTICO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado no dia 18 de dezembro de 2020 como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Materiais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Londrina. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Delia Do Carmo Vieira  
(UTFPR – Departamento Acadêmico de Engenharia de Materiais)

---

Prof. Dr. Luis Fernando Cabeça  
(UTFPR – Departamento Acadêmico de Química)

---

Prof. Dr. Renato Marcio Ribeiro Viana  
(UTFPR – Departamento Acadêmico de Química) Orientador

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvia Midori Higa  
(UTFPR – Departamento Acadêmico de Engenharia de Materiais)  
Coordenadora do Curso de Engenharia de Materiais

“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso”.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus em primeiro lugar, por ter me dado força para superar os obstáculos que enfrentei durante toda a graduação.

Agradeço ao meu pai Paulo, pelo carinho, cuidado e suporte que me proporcionaram passar por essa etapa de uma forma muito mais leve.

Agradeço a minha mãe Rose, que sempre se fez presente mesmo de longe com suas sábias palavras de consolo e incentivo, além das inúmeras orações.

Agradeço a minha irmã Júlia, por tantas vezes ter assumido o papel de irmã mais velha e me fortalecido em meio as dúvidas e inseguranças.

Agradeço a minha avó Edésia, sempre tão generosa e amorosa e também a toda a minha família de Vitória da Conquista por todo o suporte.

Agradeço ao meu namorado Matheus, pelo amor, parceria e por despertar em mim a confiança que me fez chegar mais longe.

Ao meu orientador Professor Renato Viana, pelo grande suporte durante todo o desenvolvimento desse trabalho, pela paciência e por acreditar em meu potencial. Foi um grande privilégio ser sua orientanda.

Agradeço a todos meus amigos e colegas, em especial à Roberta, pelo apoio, parceria e todas as experiências que vivenciamos desde o início da faculdade.

Um agradecimento a todos os professores que fizeram parte da minha graduação, e a todos os técnicos, servidores e demais funcionários que fazem da UTFPR Londrina.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

## RESUMO

SANTOS, A. L. M. **Filmes de celulose bacteriana modificados como curativos que liberam antibiótico**. 2021. 37f. Exame de qualificação do trabalho de conclusão de curso – Departamento Acadêmico de Engenharia de Materiais, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2021.

A celulose bacteriana é um biomaterial que possui a mesma estrutura química da celulose vegetal, porém é morfologicamente diferente. Na área médica, é utilizada em enxertos, substitutos temporários de pele e como curativos no tratamento de lesões. Por si só, esse material não possui propriedades antimicrobianas para evitar o crescimento interno de infecções, sendo necessário modificações adicionais para incorporar atividade antimicrobiana. Esse trabalho apresentou a preparação de uma membrana de celulose modificada superficialmente para uso como biocurativo, bem como sua capacidade de absorção e liberação do fármaco oxacilina. O produto da modificação superficial foi confirmado por espectroscopia no infravermelho. O processo de quantificação da absorção do fármaco foi determinado por espectrofotometria no ultravioleta-visível. A membrana modificada apresentou 3,8% (m/m) do fármaco por massa de celulose, enquanto que a membrana nativa não apresentou absorção. A liberação do fármaco foi analisada por espectroscopia no ultravioleta, e indicou ser favorável à aplicação como curativo de feridas.

**Palavras-chave:** Biomaterial. Ferida infectada. Modificação química. Antimicrobiana.

## ABSTRACT

SANTOS, A L. M. **Bacterial cellulose films modified as antibiotic-releasing dressings**. 2021. 37s. Qualification Examination of the course completion work – Academic Department of Materials Engineering, Federal Technological University of Paraná. Londrina, 2021.

Bacterial cellulose is a biomaterial that has the same chemical structure as vegetable cellulose, but is morphologically different. In the medical field, it is used in grafts, healthy skin substitutes and as dressings to treat injuries. By itself, this material does not have antimicrobial properties to prevent the internal growth of generations, requiring additional modifications to incorporate antimicrobial activity. This work presented a preparation of a superficially modified cellulose membrane for use as a biocurative, as well as its capacity for absorption and release of the drug oxacillin. The product of the surface modification was confirmed by infrared spectroscopy. The process of quantifying the absorption of the drug was determined by ultraviolet-visible spectrophotometry. The modified membrane presented 3.8% (w/w) of the drug by cellulose mass, while the native membrane did not absorb absorption. The release of the drug was analyzed by ultraviolet spectroscopy, favorable to the application as a wound dressing.

**Keywords:** Biomaterial. Infected wound. Chemical modification. Antimicrobial.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da celulose bacteriana.	14
Figura 2 - Reações típicas da esterificação de Celulose.	18
Figura 3 - Representação do modo de ação antibacteriano de substâncias portadoras de grupo catiônico e levando à perturbação da membrana citoplasmática bacteriana.	19
Figura 4 - Membrana de celulose bacteriana.	21
Figura 5 - Fluxograma das etapas envolvidas.	22
Figura 6 - Síntese de colina succínico.	23
Figura 7 - Acoplamento de succinil colina à celulose bacteriana.	24
Figura 8 - Curva de calibração de solução tampão fosfato heptidratado e oxacilina.	26
Figura 9 - Síntese da succinil colina.	27
Figura 10 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, D <sub>2</sub> O) de succinil colina.	28
Figura 11 - Espectro de IV do acoplamento de colina succínico à celulose bacteriana.	29
Figura 12 - Interação da oxacilina com a membrana já modificada.	30
Figura 13 - À esquerda, membrana com antibiótico modificada superficialmente e, à direita, membrana com antibiótico sem modificação superficial.	31
Figura 14 - Espectro em ultravioleta da membrana nativa, a direita, e da membrana acoplada com a oxacilina, a esquerda.	31
Figura 15 - Concentração do fármaco liberado versus tempo (a) e porcentagem liberada do fármaco versus tempo (b).	33

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Comparativo das propriedades da celulose vegetal (CV) e da celulose bacteriana (CB). 15

Tabela 2 – Resultados obtidos através da análise de absorção em ultravioleta. 32



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2 OBJETIVO.....</b>	<b>12</b>
2.1 Objetivo geral	12
2.1.1 Objetivos específicos	12
<b>3 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>13</b>
<b>4. REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>14</b>
4.1 Celulose bacteriana	14
4.2 A celulose bacteriana como substituto temporário de pele	16
4.2.1 Inserção de atividade antimicrobiana por modificação superficial	17
4.2.2 O agente antimicrobiano	18
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
5.1 Materiais	21
5.2 Métodos	22
5.2.1 Síntese do sal quaternário de amônio	22
5.2.2 Acoplamento do sal quaternário de amônio via esterificação	23
5.2.3 Acoplamento do antibiótico no filme modificado	24
5.2.4 Curva de calibração padrão	25
5.2.5 Liberação do antibiótico	26
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>27</b>
6.1 Formação de succinil colina	27
6.2 Modificação covalente superficial dos filmes	28
6.3 Avaliação da incorporação do fármaco	29
6.4 Análise do perfil de liberação de antibiótico	32
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>35</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A celulose bacteriana (CB) é um biopolímero constituído pela união de unidades de anidroglicose unidas por ligações  $\beta$  (1-4) (Í. A. N. Donini et al., 2010). Possui a mesma estrutura química da celulose vegetal, porém é morfologicamente diferente. Pode ser sintetizada por várias fontes de carbono. Simplificadamente, a produção consiste na conversão de glicose em celulose por meio do metabolismo de bactérias. A membrana formada durante a síntese resulta em uma estrutura tridimensional constituindo um sistema de nanofibras orientadas uniaxialmente, o que não ocorre na celulose vegetal (Oliveira, Marielle De ; Carminatti, 2016).

Propriedades mecânicas e físicas diferenciais exibidas pela celulose bacteriana como elevada cristalinidade e módulo de Young, alto grau de polimerização, potencial de absorção de água, uniformidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade torna esse material um importante produto biotecnológico tanto para área da saúde quanto para o setor industrial (Oliveira, Marielle De ; Carminatti, 2016; Sulaeva, Henniges, Rosenau, & Potthast, 2015).

Um dos grandes desafios da medicina é a criação e uso de órgãos e tecidos artificiais para o tratamento de doenças e lesões. A engenharia de tecidos é uma das aplicações da área médica onde são explorados o desenvolvimento de novos substitutos da pele e materiais para curativos com funcionalidades semelhantes a pele humana, possibilitando a cicatrização de feridas (Czaja, Krystynowicz, Bielecki, & Brown, 2006).

O interesse na utilização de nanoceluloses nesse setor foi estimulado pelos seus atributos de não-toxicidade, biocompatibilidade, nanoestrutura porosa, boas propriedades mecânicas, alta área superficial e potencial versatilidade em termos de modificação química, devido a sua extensa área superficial e presença de grupos hidroxila capazes de realizar interações intermoleculares e químicas. (Plackett, Letchford, Jackson, & Burt, 2014; Sulaeva et al., 2015)

Apesar das suas características intrínsecas, o curativo de celulose bacteriana, em seu estado natural, não apresenta propriedades antimicrobianas para evitar o desenvolvimento de uma infecção, sendo necessário modificações adicionais para incorporar tal atividade. A esterificação da celulose é uma das formas mais comuns de modificar ou inserir grupos espaçadores na estrutura polimérica, sendo o grau de substituição dessas reações dependente de fatores, como as concentrações de

reagente, solvente, tempo e temperatura.(Faria-Tischer, Ribeiro-Viana, & Tischer, 2019)

Esse trabalho teve como objetivo a modificação química superficial de um filme de celulose bacteriana para utilização como curativo. Os acoplamentos de substâncias antimicrobianas, como um antisséptico catiônico seguido de um antibiótico aniônico, proporcionaram uma cicatrização eficiente da ferida infectada. A oxacilina foi o antibiótico utilizado para investigar a etapa de liberação controlada.

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo geral**

O objetivo deste trabalho foi a preparação de filmes de celulose bacteriana modificados, capazes de armazenar antibióticos aniônico e libera-los em feridas. Além da caracterização química e da capacidade de retenção de antibiótico pelo material e seu perfil de liberação.

#### **2.1.1 Objetivos específicos**

O objetivo específico deste trabalho foi a modificação superficial da celulose bacteriana, deixando-a catiônica, possibilitando assim o posterior acoplamento de antibióticos aniônicos via interação iônica e o consequente aumento da capacidade de absorção e liberação do fármaco quando comprado a uma membrana nativa, que é neutra.

### 3 JUSTIFICATIVA

Um dos grandes desafios da medicina é a criação e uso de órgãos e tecidos artificiais para o tratamento de doenças e lesões. Devido à sua nanoestrutura e propriedades exclusivas, a celulose bacteriana é um material de grande aplicabilidade e interesse na área médica e de engenharia de tecidos. Características como adesão adequada à ferida, fácil manuseio, transparência e permeabilidade seletiva comprovam a eficácia desse material como curativo, em especial para queimaduras. (Í. Donini, 2011)

Filmes de celulose bacteriana já vem sendo utilizados atualmente como curativos para substituição temporária da pele. Entretanto, os curativos comercializados não possuem adição de outros componentes ou fármacos, apresentando limitação quando se diz respeito a aplicação direta em feridas contaminadas. Tal restrição se deve ao fato que a celulose bacteriana, em seu estado natural, não possui propriedades antimicrobianas para evitar o crescimento interno de infecção. (Faria-Tischer et al., 2019)

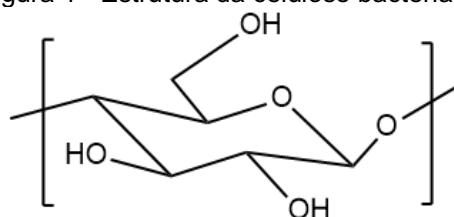
A realização de modificações adicionais em sua superfície capacitaria esse material para uso potencial como matriz para o acoplamento e liberação controlada de agentes antimicrobianos e antibióticos, otimizando sua aplicação como curativo ao reduzir o tempo de recuperação e melhorando a qualidade do tratamento (Plackett et al., 2014).

## 4. REFERENCIAL TEÓRICO

### 4.1 Celulose bacteriana

A celulose é um biopolímero linear constituído pela união de unidades de glicose ligadas por ligações  $\beta$  (1-4), sendo o polímero mais abundante no planeta. É encontrado principalmente na parede celular de plantas, contudo, também pode ser sintetizado por tunicados, algas e alguns gêneros de bactérias. Dentre esses, a celulose produzida por bactérias tem se destacado, devido a propriedades mecânicas e físicas diferenciais, qualificando-a como produto de interesse para uso, sobretudo, na biomedicina. (Carvalho, Guedes, Sousa, Freire, & Santos, 2019)

Figura 1 - Estrutura da celulose bacteriana.



Fonte: Autoria própria.

A celulose bacteriana (CB) gerada por microorganismos, principalmente do gênero *Gluconacetobacter xylinus*, através de rotas de biossíntese, possui a mesma estrutura química que a celulose vegetal, porém, é morfologicamente diferente (Í. A. N. Donini et al., 2010). Além do mais, é produzida na forma pura, livre de compostos presentes na polpa vegetal, como lignina e hemicelulose, o que permite sua aplicação direta (Portela, Leal, Almeida, & Sobral, 2019; Torgbo & Sukyai, 2018).

A produção da celulose bacteriana é realizada principalmente por dois métodos, estático ou agitado, que originam estruturas com morfologias diferentes. Através da cultura estática, é originada uma película, produzida na interface ar-líquido, cuja espessura é ampliada quanto maior o tempo de cultivo, até que haja deficiência de oxigênio. A cultura agitada, resulta em pelotas irregulares, esferas ou fibras em suspensão produzidos por dispersão no meio de cultura. Os rendimentos da cultura agitada, apesar de mais rápidos, são menores que os da estática, possuindo inclusive uma maior possibilidade de mutações das bactérias e propriedades inferiores. (Jozala et al., 2016; Torgbo & Sukyai, 2018)

O controle das condições de síntese permite o ajuste da composição e morfologia das fibras, assim como a forma, o grau de cristalinidade e o tamanho dos poros do produto final. Quando produzida na forma de uma membrana gelatinosa, consegue ser moldada em qualquer forma e tamanho durante a sua síntese. Ademais, é possível inserir diversos materiais durante a formação da membrana no próprio meio de cultura por meio da difusão dos mesmos no meio durante o cultivo da bactéria, obtendo compósitos à base de celulose bacteriana (Í. Donini, 2011; Sulaeva et al., 2015).

Durante a biossíntese, as macromoléculas se agrupam em unidades organizadas como um complexo, resultando em fitas torcidas de feixes microfibrilares. Os feixes por sua vez, formam fitas de celulose constituídas por cerca de 1000 cadeias poliglucanas. A trama contínua de fitas de celulose leva à formação de uma estrutura tridimensional constituída por nanofibras orientadas uniaxialmente e estabilizadas por ligações de hidrogênio inter e intra-fibrilares, resultando em um estado de hidrogel com alta resistência (Í. A. N. Donini et al., 2010; Fu, Zhang, & Yang, 2013; Oliveira, Marielle De ; Carminatti, 2016).

Comparado à celulose vegetal, a CB possui características como alta cristalinidade, resistência à tração, capacidade de absorção de água, boa permeabilidade, biocompatibilidade, resistência à degradação e baixa solubilidade (Jozala et al., 2016). Devido a sua estrutura de rede tridimensional peculiar, a CB também dispõe de atributos macroscópicos como não-toxicidade, biocompatibilidade, nanoestrutura porosa, boas propriedades mecânicas, alta área superficial e potencial versatilidade em termos de modificação química, devido à grande quantidade de grupos hidroxila reativos (Í. Donini, 2011; Plackett et al., 2014)

Tabela 1- Comparativo das propriedades da celulose vegetal (CV) e da celulose bacteriana (CB).

<b>Propriedades</b>	<b>CV</b>	<b>CB</b>
<b>Cristalinidade</b>	56-65%	65-79%
<b>Comprimento das fibras</b>	1,4-4,0x10 <sup>-2</sup> mm	70-80nm
<b>Módulo de Young</b>	5,5-12,6 GPa	15-30GPa
<b>Conteúdo de água</b>	60%	98,50%

Fonte: Adaptado de PECORARO *et al.*, 2009.

## 4.2 A celulose bacteriana como substituto temporário de pele

A pele é o maior órgão do corpo humano, sendo composta por três camadas, a epiderme, a derme e a camada de gordura. A epiderme, camada externa, tem a função de manter o equilíbrio interno do corpo além de protegê-lo do ambiente externo. Quando um indivíduo sofre graves danos em áreas da pele, como queimaduras, o sistema imunológico é interrompido, o que resulta em consequências como desidratação e suscetibilidade à infecção bacteriana. (Rowan et al., 2015)

Visto que a cicatrização de feridas é um processo geralmente lento e complexo, os principais objetivos de estudo são focados em encontrar meios de conduzir à melhoria da cicatrização. Dentro disso se encaixam elementos que podem acelerar a cicatrização e reduzir cicatrizes, além do desenvolvimento de novos substitutos da pele e a identificação de sinais que desencadeiam o processo de regeneração. (Czaja et al., 2006)

Um curativo ideal para o tratamento de feridas deve apresentar características como: não toxicidade, biocompatibilidade, capacidade de formar uma barreira contra infecção, reduzir a dor, manter um ambiente úmido, permitir introdução ou transferência de medicamentos para a ferida, conformabilidade, elasticidade e ser removido de forma fácil e indolor. (Czaja et al., 2006)

Em virtude de suas características intrínsecas, a celulose bacteriana tem sido amplamente explorada como substituto temporário da pele no tratamento de queimaduras e feridas de difícil cicatrização (Portela et al., 2019). Parte desses atributos são: adesão à ferida, devido a sua estrutura e dimensões que são compatíveis com segmentos do corpo humano, semitransparência, que facilita a inspeção da ferida e permeabilidade seletiva, proporcionando o equilíbrio de fluidos e a passagem de gases, além de agir como uma barreira contra micro-organismos (Shoda, Sugano, Petersen, & Gatenholm, 2011).

Alguns dos curativos convencionais utilizados para o reparo do tecido da pele são absorventes e permeáveis, como a gaze de algodão, podendo aderir a superfície da ferida dessecada, causando um grande desconforto no momento da remoção (Fu et al., 2013). Em contrapartida, a CB apresenta um melhor desempenho em termos de retenção de exsudato, redução da dor, aceleração da re-epitelização e cicatrização, redução das taxas de infecção da ferida e cicatrizes, além de não exigir um alto número de trocas durante o período de cicatrização, resultando em uma



redução de custos e maior conforto para o paciente (Czaja et al., 2006; Shoda et al., 2011).

#### **4.2.1 Inserção de atividade antimicrobiana por modificação superficial**

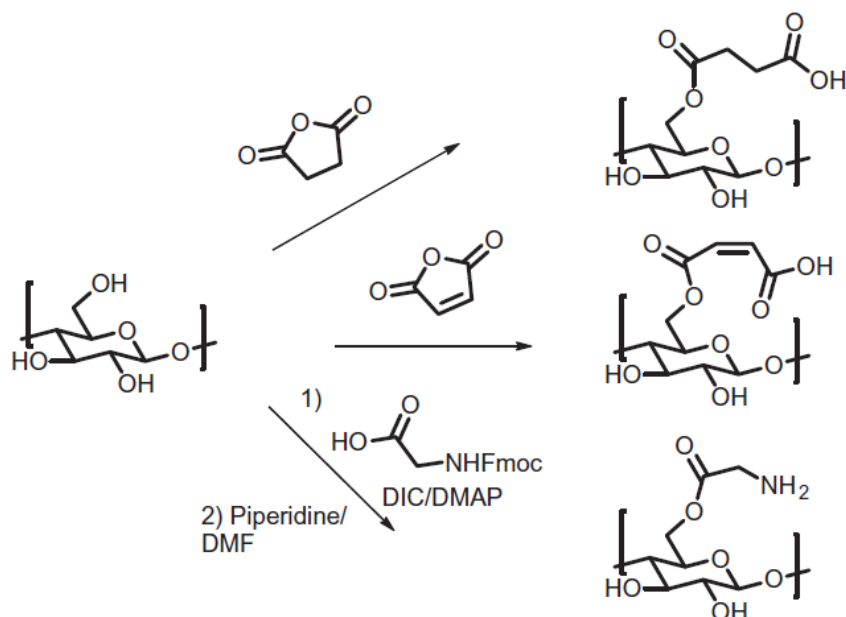
Como mencionado anteriormente, apesar das suas características, o curativo de celulose bacteriana, em seu estado natural, não apresenta propriedades antimicrobianas para evitar o crescimento interno de infecção, sendo necessário modificações adicionais para incorporar tal atividade.

Existem vários métodos para modificar a CB tais, como tratamentos químicos, irradiação e impregnação com moléculas ou metais biologicamente ativos. A modificação superficial do BC nativo é uma das opções empregadas para carregar compostos ativos e direcionar as interações para fins específicos, podendo apresentar atributos como liberação controlada e aumento de atividade. (Portela et al., 2019; Shoda et al., 2011)

A modificação superficial a partir da reação de esterificação é uma das formas mais comuns de modificar ou inserir grupos espaçadores na estrutura polimérica. Os principais locais ativos são os três grupos hidroxila das unidades monômero da glicose, capazes de realizar interações intermoleculares e químicas tanto com macromoléculas, como proteínas, quanto moléculas menores. O grau de substituição dessas reações vai depender de fatores como a concentração de reagente, solvente, tempo e temperatura. (Faria-Tischer et al., 2019) A Figura 2 apresenta algumas reações de esterificação que podem ocorrer na celulose.

Os produtos éster da reação de esterificação podem ser identificados por espectroscopia no infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear (RMN). A espectroscopia no infravermelho é mais vantajosa nesse caso devido à natureza da forte intensidade da banda de carbonila de éster e por ser acessível e rápida, principalmente se o equipamento possuir um modo com Reflectância Total Atenuada (ATR). Os ésteres proporcionam bandas fortes a 1710 a 1750  $cm^{-1}$ , uma região limpa no espectro da celulose. A análise por RMN é uma técnica que exige mais tempo e maiores quantidades de amostra por ser menos sensível que a espectroscopia no infravermelho.

Figura 2 - Reações típicas da esterificação de Celulose.



Fonte: Faria-Tischer *et al.*

Alguns fatores dificultam a modificação covalente da celulose. A grande extensão da ligação de hidrogênio dentro da estrutura prejudica a realização de outras interações com moléculas de solvente. Além disso, as hidroxilas possuem uma baixa reatividade como nucleófilo, devendo ser desprotonadas, geralmente por uma base forte. Outra forma seria utilizando um eletrófilo mais forte, como por exemplo, cloretos de acila. (Faria-Tischer *et al.*, 2019)

#### 4.2.2 O agente antimicrobiano

A escolha do agente antimicrobiano ideal é influenciada principalmente pela sua especificidade e eficácia contra possíveis contaminantes. 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)

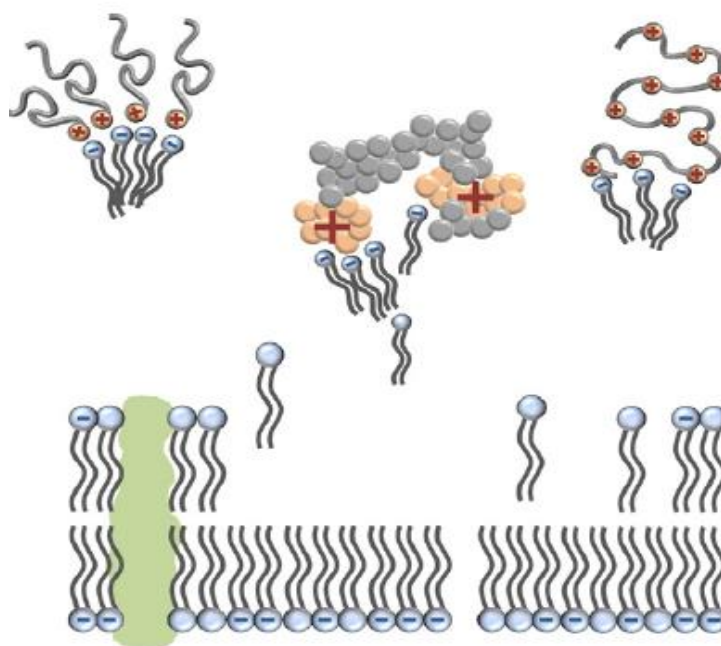
Antissépticos típicos utilizados para modificações da celulose bacteriana incluem polímeros biológicos e sintéticos com atividade antimicrobiana, peptídeos antimicrobianos, antissépticos catiônicos, antibióticos e compostos inorgânicos. A presença de grupos amino ao longo da cadeia polimérica confere a alguns biopolímeros uma atividade antimicrobiana natural, podendo ser reproduzida pela

introdução de grupos contendo nitrogênio na superfície da celulose bacteriana. (Sulaeva et al., 2015)

Compostos de amônio quaternário, polímeros catiônicos e peptídeos antimicrobianos possuem cargas positivas permanentes e desempenham um papel fundamental na perturbação da membrana citoplasmática das bactérias, carregadas negativamente. Esses grupos positivos são adsorvidos pela parede celular das bactérias, ocorrendo em seguida a desorganização da membrana citoplasmática e a degradação das proteínas, levando à lise celular, como demonstrado na Figura 3. (Sulaeva et al., 2015)

A modificação superficial da membrana de CB com sais de amônio, de carga positiva, possibilita a incorporação de antibióticos aniônicos a partir de uma interação iônica. Dessa forma, a capacidade de absorção do fármaco provavelmente se torna maior quando comparado a uma membrana nativa, que é neutra.

Figura 3 - Representação do modo de ação antibacteriano de substâncias portadoras de grupo catiônico e levando à perturbação da membrana citoplasmática bacteriana.



Fonte: Adaptado de Sulaeva *et al.*, 2015

A etapa de liberação do fármaco para o meio também ocorre por troca iônica, sendo favorecida em presença de solventes tamponados, ocorrendo uma troca forçada de contra íons entre a solução tampão e o fármaco. Exsudatos de feridas são

análogos às soluções descritas anteriormente, visto que também apresentam uma série de sais.

O antibiótico escolhido para a realização desse trabalho foi a oxacilina, uma penicilina de espectro mais amplo, indicada no tratamento de infecções por bactérias grampositivas que cobre parte das bactérias que causam infecções cutâneas, como a *staphylococcus aureus*.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção são apresentadas as atividades realizadas, assim como os materiais e métodos empregados para obtenção dos resultados.

### 5.1 Materiais

O material utilizado nesse trabalho é uma membrana de celulose bacteriana produzida por fermentação, usando-se a bactéria *Gluconacetobacter xylinus*, cedida pelo professor Cesar Tischer da Universidade Estadual de Londrina (UEL) (Birkheur et al., 2017).

Os reagentes foram adquiridos pela Sigma-Aldrich e foram utilizados sem purificação. A dimetilformamida (DMF) foi seco em peneiras moleculares (3 Å) por 48 h. As reações sob irradiação ultrassônica foram realizadas em uma lavadora ultrassônica modelo USC3300 (220 W, 40 KHz).

Foi preparada uma solução tampão fosfato de sódio heptahidratado (0,05mol/L) a fim de auxiliar algumas etapas. Para tal, pesou-se aproximadamente 3,35g de  $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$  (268,07 g/mol). Adicionou-se 250mL de água destilada e foi dissolvido em um béquer com ajuda de um bastão de vidro. O pH foi corrigido para 7,5 com HCl.

Figura 4 - Membrana de celulose bacteriana.

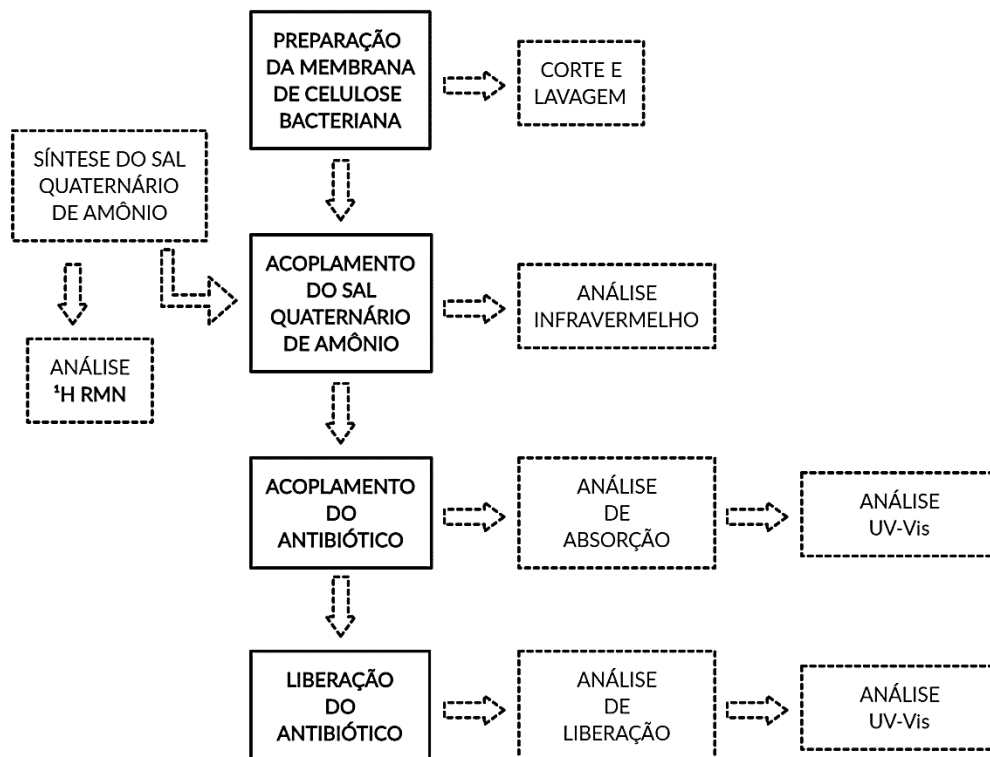


Fonte: Autoria própria.

## 5.2 Métodos

O fluxograma das atividades é mostrado na Figura 5. A seguir, cada etapa do processo é detalhada.

Figura 5 - Fluxograma das etapas envolvidas.

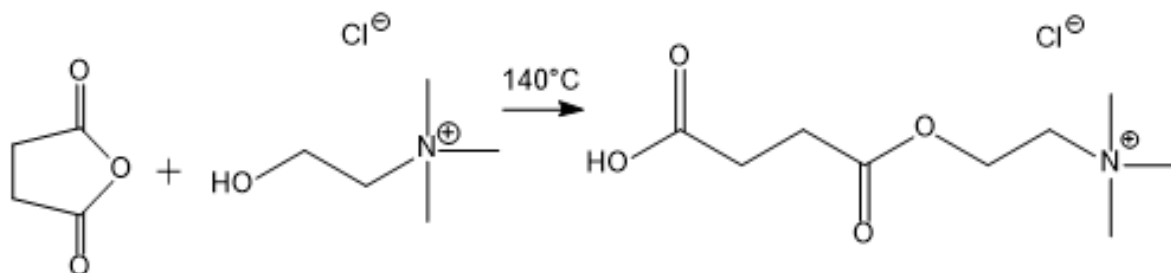


Fonte: Autoria própria.

### 5.2.1 Síntese do sal quaternário de amônio

Em uma balança analítica (ATY224 Shimadzu) foram pesados aproximadamente 2g de anidrido succínico e 0,42g de cloreto de colina. Após a pesagem, os reagentes transferidos para um béquer de 100 mL e disposto na estufa por 1:30 h na temperatura de 140°C a fim de fundirem. Esperou-se esfriar e o produto, sólido e opaco, foi disposto em um filtro, sendo lavado com acetona para possível remoção de água excedente (Phillips, 1953).

Figura 6 - Síntese de colina succínico.



Fonte: Autoria própria.

A fim de obter o composto puro e remover o excesso de ácido succínico, foi aplicado o método de extração por solvente. Para isso, dissolveu-se o produto em 5 mL de água, sendo inserido em seguida em um funil separador com 10 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi separada da fase aquosa. O experimento foi repetido dez vezes.

A caracterização da succinil colina foi obtida por ressonância magnética nuclear. Os espectros foram realizados no Laboratório Multiusuário de Ressonância Magnética Nuclear da UEL, no equipamento ASCEND 400 marca Bruker, operando a 100,6 MHz para carbono e 400 MHz para hidrogênio. As amostras foram dissolvidas em água deuterada para análise em fase líquida. Os deslocamentos químicos foram referenciados ao sinal de H-O-D.

### 5.2.2 Acoplamento do sal quaternário de amônio via esterificação

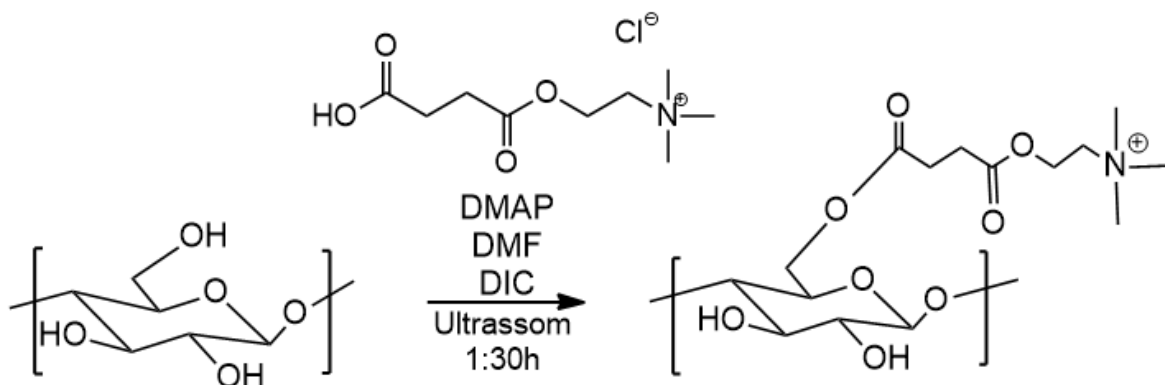
Para dar início ao processo de modificação superficial, a membrana foi previamente preparada. Foi realizado o corte nas dimensões de 1,5cmx1,5cm, seguido de lavagem. Para tal, a membrana foi imersa em metanol e agitada por três minutos com o auxílio de um agitador (XH-D VORTEX). O solvente foi descartado, sendo o processo repetido mais duas vezes. Logo após, o mesmo procedimento foi realizado com a membrana imersa em diclorometano.

Para o sucesso da reação de esterificação, as moléculas de água devem ser removidas ao máximo afim de que não ocorra hidrólise. Portanto, a reação deve ser realizada utilizando solventes apróticos secos.(Faria-Tischer et al., 2019)

Para o procedimento, foi pesado 87 mg de succinil colina (0,36 mmol) e 22 mg de 4-Dimetilaminopiridina (0,18 mmol) (DMAP), sendo dispostos em um tubo de ensaio. Adicionou-se 3 mL de dimetilformamida (DMF) anidra com uma seringa, 56

$\mu\text{L}$  de diisopropil-carbodiimida (DIC) com o auxílio de uma pipeta e por fim, a membrana. O tubo de ensaio contendo a solução foi submetido à irradiação de ultrassom por 1:30 h na temperatura de  $40^{\circ}\text{C}$ .

Figura 7 - Acoplamento de succinil colina à celulose bacteriana.



Fonte: Autoria própria.

Após esse período, a solução foi descartada e lavou-se a membrana sequencialmente com DMF e água destilada por cinco vezes durante cinco minutos cada. Após a lavagem, a membrana permaneceu em um dessecador.

A caracterização desse acoplamento foi realizada por espectroscopia de absorção no infravermelho, realizadas em um Espectrofotômetro FT-IR PerkinElmer diretamente no filme usando módulo ATR, na faixa de  $4000$  a  $400\text{ cm}^{-1}$  com uma resolução de  $1\text{ cm}^{-1}$ .

### 5.2.3 Acoplamento do antibiótico no filme modificado

Para a etapa de acoplamento do antibiótico, as membranas de celulose bacteriana modificadas foram inseridas em solução de oxacilina. Para o preparo de  $10\text{ mL}$  de uma solução de  $1\text{ mmol/L}$  de oxacilina ( $441,43\text{g/mol}$ ), foram pesados  $0,0041\text{g}$  de oxacilina, sendo disposto em um balão volumétrico de  $10\text{ mL}$ . O volume foi completado com água destilada. Logo após, a solução foi disposta em um béquer juntamente com a membrana já modificada, vedado com parafilme e mantido em temperatura ambiente por  $24\text{ h}$  em uma mesa agitadora orbital (AGITADOR ORBITAL SHAKER AGOS-210-15). Após essa etapa, a membrana foi retirada da solução e lavada com água destilada abundante. A água de lavagem e da solução de oxacilina foram agrupadas. O filme de celulose lavado foi secado em dessecador à temperatura ambiente.



Simultaneamente, como grupo controle, uma membrana não modificada lavada apenas com água destilada foi também imersa em 10 mL de uma solução de 1 mmol/L de oxacilina e mantido em temperatura ambiente por 24 h em uma mesa agitadora orbital. Após essa etapa, a membrana foi lavada com água abundante e mantidas no dessecador. A solução de antibiótico no qual a membrana foi inserida e a água da lavagem foram reservados para análise da concentração de oxacilina restante na solução.

Para o preparo das amostras a serem analisadas, a água da lavagem e a solução inicial de oxacilina foram inseridas em um balão de fundo redondo e evaporadas logo em seguida. Após essa etapa, a oxacilina retida no fundo do balão foi solubilizada em solução tampão fosfato, sendo transferida para um balão volumétrico de 5mL com o auxílio de uma pipeta (denominada solução stock 1). Foram retirados 138µL da solução stock 1, transferidos para um balão volumétrico de 5 ml e completado o volume com solução tampão. Esse procedimento foi realizado igualmente para a membrana modificada e não modificada para análise de absorção. O antibiótico absorvido foi determinado por espectrofotometria no ultravioleta-visível pela diferença da quantidade que restou no sobrenadante pela quantidade teórica que existia na solução inicialmente. A  $\%(m/m)$  foi calculada pela fórmula  $\% \frac{m}{m} = \frac{m_1}{m_2} \times 100$ , onde  $m_1$  = massa de oxacilina absorvida e  $m_2$  = massa total da celulose seca usada. (Yan & Tsujii, 2005)

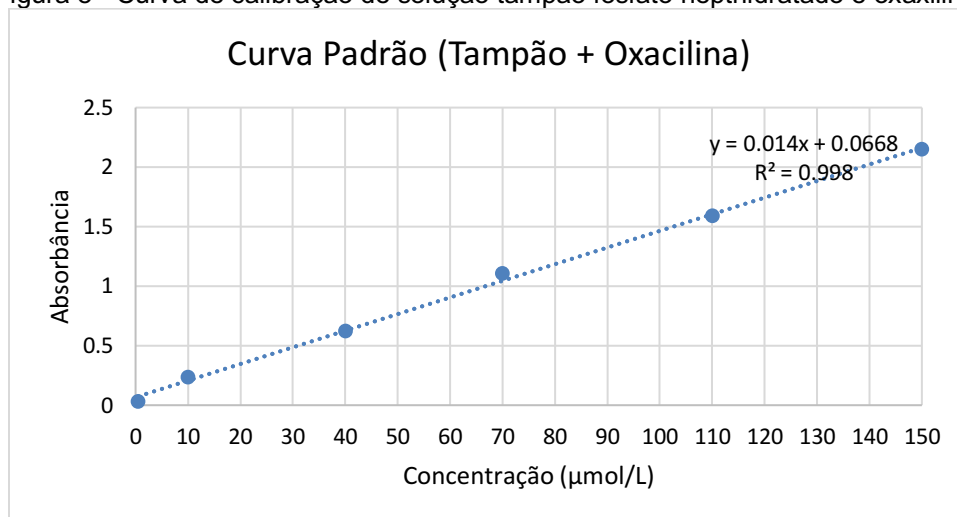
#### **5.2.4 Curva de calibração padrão**

Para auxiliar na quantificação da absorção do antibiótico e no perfil de liberação, foi montada uma curva de calibração padrão com solução tampão de fosfato de sódio heptahidratado e solução aquosa de oxacilina 1 mmol/L. Foi preparada 10 mL de uma solução de 1 mmol/L de oxacilina (441,43g/mol) como solução stock.

Para a construção da curva, foram preparadas novas concentrações de solução de oxacilina com tampão a partir da solução stock. As novas concentrações foram 10µmol/L, 40µmol/L, 70µmol/L, 110µmol/L e 150µmol/L. Os valores de absorção para cada concentração foram determinados por espectroscopia de absorção no ultravioleta em 225nm. O branco utilizado foi a solução tampão fosfato.

O gráfico foi montado a partir das concentrações e dos valores de absorvância no comprimento de onda de 225 nm, onde a oxacilina absorve. Observou-se que os pontos referentes às concentrações acima de 150  $\mu\text{mol/L}$  perdiam a linearidade em relação aos anteriores e, portanto, não foram usados.

Figura 8 - Curva de calibração de solução tampão fosfato heptahidratado e oxacilina.



Fonte: Autoria própria.

### 5.2.5 Liberação do antibiótico

Para essa etapa, cada teste de liberação foi realizado utilizando 1/4 de uma das membranas acopladas com antibiótico. Cada pedaço a ser utilizado foi pesado. O teste foi realizado em duplicata.

Em um vial de 10 mL, foram adicionados 1,5ml de solução tampão fosfato heptahidratado e 1/4 da membrana. A cada intervalo de tempo determinado, uma alíquota dessa amostra era transferida para cubeta, uma leitura em 225 nm era realizada e depois o volume era retornado ao vial contendo o filme. O branco utilizado foi a solução tampão fosfato.

A primeira medida da absorção foi obtida com 5 minutos a partir do momento que a membrana foi inserida na solução tampão. Em seguida, foi coletada uma medida com um intervalo de 15min e 30min após o início do experimento. Posteriormente, foram coletadas 6 medidas em intervalos de 1 h em 1 h desde o início do experimento. Foram realizadas 12 medidas no total, sendo as duas últimas realizadas no dia seguinte, 24h e 28h aproximadamente após o início do experimento.

Para o cálculo da concentração, foi utilizado a equação da reta obtida a partir da curva padrão de solução tampão e oxacilina.

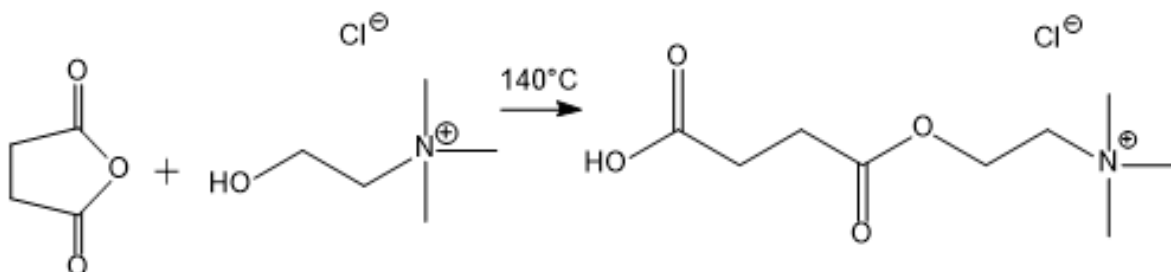
## 6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 6.1 Formação de succinil colina

A modificação superficial da membrana de celulose é uma opção proposta para carregar compostos ativos e direcionar interações específicas como, por exemplo, uma liberação controlada. Dessa forma, a fim de possibilitar a incorporação do antibiótico aniônico nos filmes de celulose, propôs-se tal modificação utilizando estruturas químicas catiônicas. Para tal, a síntese de succinil colina foi realizada inicialmente com a reação do cloreto de colina e anidrido succínico a temperatura de 140°C, em ausência de solvente. Nestas condições funde-se o anidrido succínico e a colina é capaz de reagir com o mesmo, formando-se o produto desejado. Por fim, o método de extração por solvente foi aplicado a fim de obter o composto puro, removendo o excesso de ácido succínico eventualmente formado.

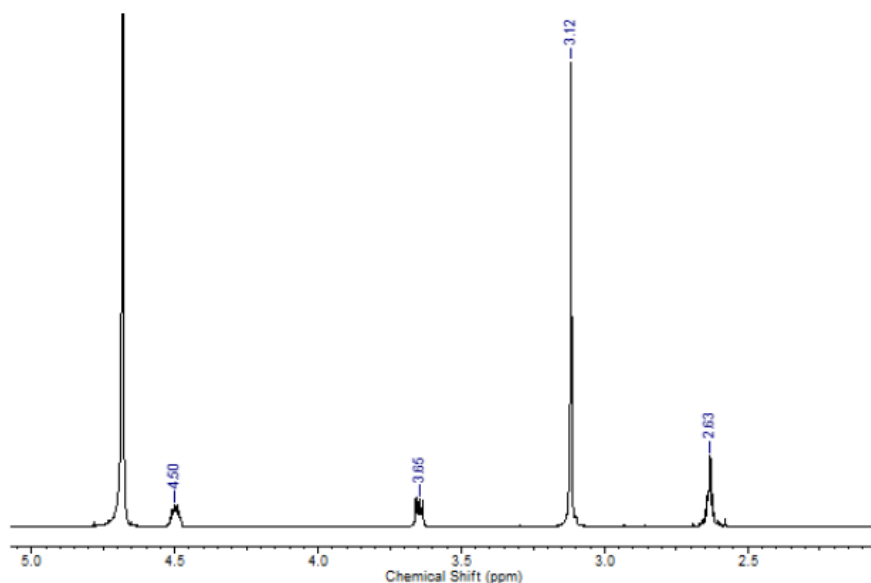
A succinil colina utilizada na modificação foi analisada por RMN para confirmar sua estrutura.

Figura 9 - Síntese da succinil colina.



Fonte: Autoria própria.

Figura 10 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, D $_2\text{O}$ ) de succinil colina.



Fonte: Autoria própria.

Pela análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  observa-se um multipeto em  $\delta$  2,63, integrando para 4 hidrogênios referente aos grupos metilenos do monoéster succínico. Em  $\delta$  3,12, nota-se um simpleto, integrando para 9 hidrogênios, referente aos grupos metila ligados ao nitrogênio. Já em  $\delta$  3,65, nota-se um multipeto, integrando para 2 hidrogênios, referente ao grupo metila vizinho ao nitrogênio. Em  $\delta$  4,50, nota-se também um multipeto, integrando para 2 hidrogênios, referente ao grupo metila vizinho ao oxigênio. Portanto, confirma-se o sucesso da síntese de succinil colina.

## 6.2 Modificação covalente superficial dos filmes

O acoplamento da succinil colina com a celulose ocorre por meio da reação de esterificação, sendo o produto identificado através do espectro no infravermelho. A modificação superficial a partir da reação de esterificação é uma das formas mais comuns de modificar ou inserir grupos espaçadores na estrutura polimérica.

Simplificadamente, o mecanismo clássico se resume na reação de um ácido carboxílico e um álcool produzindo éster e água. Os principais locais ativos da celulose são os três grupos hidroxila das unidades monômero da glicose, capazes de realizar interações intermoleculares e químicas.

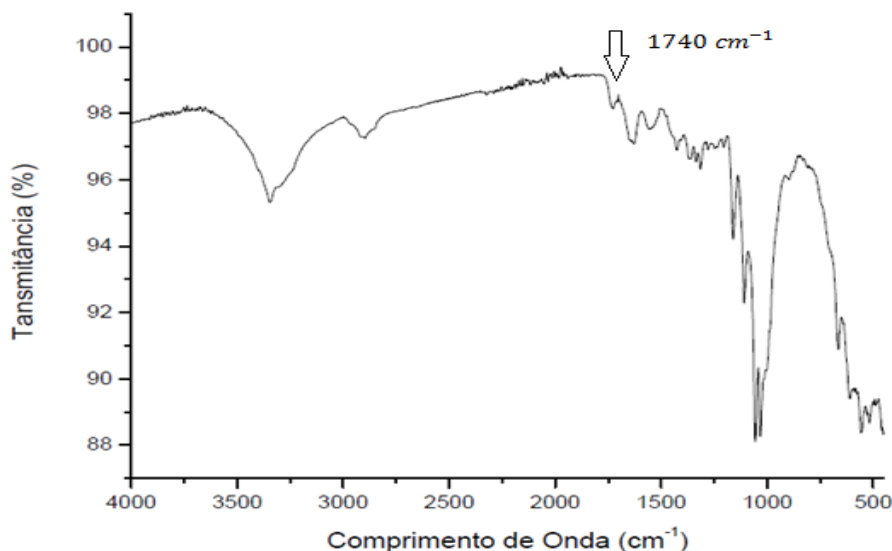
Para o sucesso da reação de esterificação, as moléculas de água devem ser removidas ao máximo afim de que não ocorra hidrólise e competição dessa como

nucleófilo frente ao álcool utilizado. Portanto, a reação deve ser realizada utilizando solventes apróticos secos, como a dimetilformamida (DMF) anidra. Nessa reação também foi adicionado a 4-Dimetilaminopiridina (DMAP), como catalisador nucleofílico, e o diisopropil-carbodiimida (DIC) como ativador da carbonila de ácido carboxílico. Afim de aumentar a efetividade, a reação foi submetida ao processo de cavitação quando exposta à irradiação de ultrassom.

A cavitação produzida por radiação ultrassônica promove a ativação da reação por meio da criação de bolhas que colapsam na superfície da membrana, criando um jato potente que força um choque entre os elementos. (Mason, 1997)

O sucesso do acoplamento foi confirmado por espectroscopia molecular na região do infravermelho pela banda em  $1740\text{ cm}^{-1}$ , típico do grupo carbonila de éster (C=O), como representado na Figura 10. Semelhantemente, pode-se notar as bandas características da celulose bacteriana, como a banda 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.

Figura 11 - Espectro de IV do acoplamento de colina succínico à celulose bacteriana.



Fonte: Autoria própria.

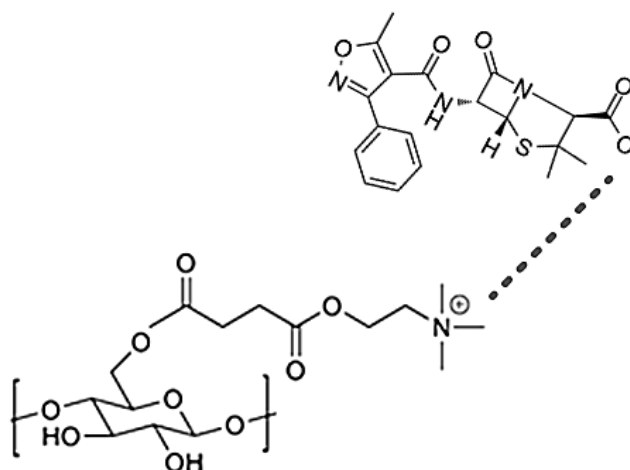
### 6.3 Avaliação da incorporação do fármaco

Como já mencionado, a extensa área superficial e a presença de grupos hidroxila capazes de realizar interações intermoleculares e químicas fornecem à

celulose bacteriana uma grande capacidade de adsorção de outras moléculas (SULAEVA et al., 2015). Dessa forma, para a etapa de acoplamento do antibiótico aniônico, as membranas de celulose bacteriana, agora carregadas positivamente, foram inseridas em solução de oxacilina e mantida sob agitação em temperatura ambiente por 24h.

Para a análise da absorção do fármaco, diferenças visuais foram primeiramente observadas nos filmes nativos e modificados imersos em oxacilina. Após essa etapa, a oxacilina incorporada foi quantificada baseado na análise por espectrofotometria no ultravioleta-visível pela diferença da quantidade que restou no sobrenadante pela quantidade teórica que existia na solução inicialmente.

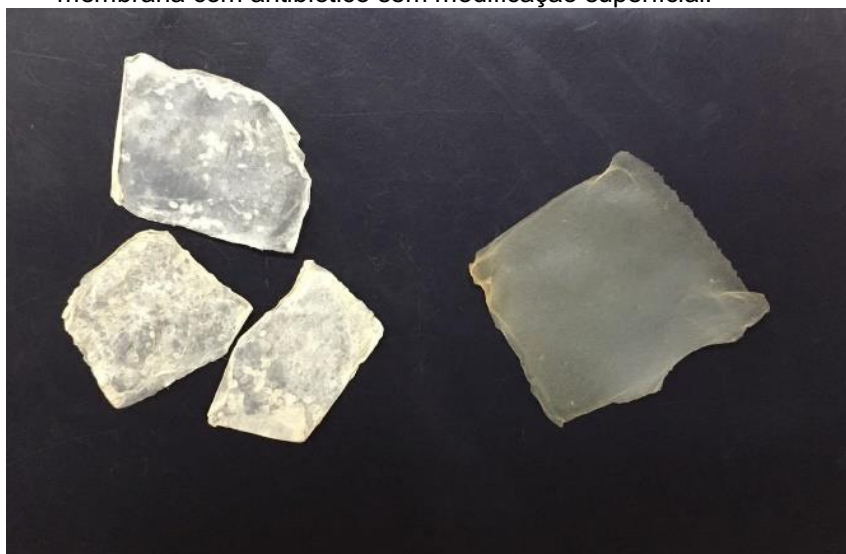
Figura 12 - Interação da oxacilina com a membrana já modificada.



Fonte: Autoria própria.

Como resultado da análise visual, observou-se que a membrana modificada apresentava uma coloração esbranquiçada indicando uma provável adsorção do antibiótico quando em comparação com a não modificada, que permaneceu transparente. Para confirmar essa hipótese, foram realizadas algumas análises na região do ultravioleta.

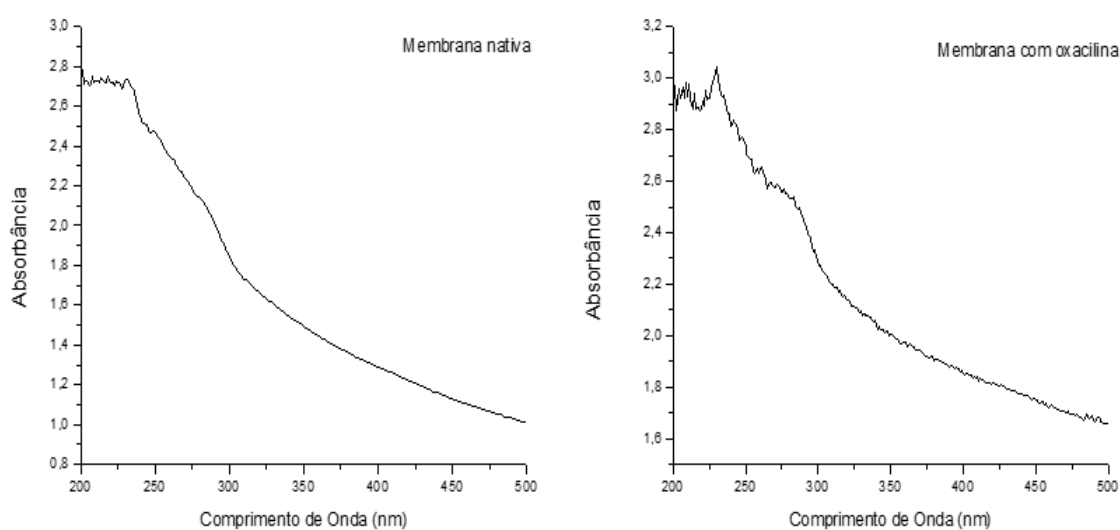
Figura 13 - À esquerda, membrana com antibiótico modificada superficialmente e, à direita, membrana com antibiótico sem modificação superficial.



Fonte: Autoria própria.

Inicialmente, as membranas foram analisadas diretamente em um espectrofotômetro ultravioleta-visível, obtendo-se um espectro na faixa de 200nm a 500nm. A oxacilina é uma substância orgânica que tem pouca absorção em ultravioleta na faixa esperada de 225 nm, portanto, não foi possível identificar a absorção apenas por esta análise, sendo necessária uma análise quantitativa com o auxílio da curva padrão.

Figura 14 - Espectro em ultravioleta da membrana nativa, a direita, e da membrana acoplada com a oxacilina, a esquerda.



Fonte: Autoria própria.

O processo de quantificação foi determinado por espectrofotometria no ultravioleta pela diferença da quantidade de oxacilina que restou no sobrenadante. A partir da análise da absorção, observa-se que a solução da membrana já modificada absorveu menos no comprimento de onda da oxacilina, indicando uma menor concentração desta na solução em comparação com a solução da membrana não modificada. Com isso, deduz-se que parte do antibiótico foi acoplado na própria membrana.

Tabela 2 – Resultados obtidos através da análise de absorção em ultravioleta.

	<i>Membrana modificada</i>	<i>Membrana não modificada</i>
<i>Média da absorção em 225nm</i>	0,697	0,858
<i>Desvio padrão</i>	0,037	0,037
<i>Concentração da solução medida</i>	44,97 umol/L	55,2 umol/L
<i>Quantidade oxalilina absorvida da solução</i>	18,5 %	0 %
<i>Quantidade oxalilina presente no filme (% e massa)</i>	3,8%; 760 ug	0% e 0 g

Fonte: Autoria própria.

Utilizou-se a equação da reta da curva padrão a fim de descobrir qual a concentração de oxacilina restante na solução. A partir deste valor, calculou-se a razão entre a concentração encontrada na solução e a concentração teórica, dando o valor de 81,5%, o que significa que o filme modificado foi capaz de absorver 18,5% da quantidade do antibiótico no meio. A partir deste valor, calculou-se quanto ele representava, em massa, considerando a quantidade de oxacilina utilizada para se fazer a solução inicial, fornecendo o valor de 760 ug ou 3,8% m/m de oxacilina no filme, considerando a massa do filme seco igual a 0,020g.

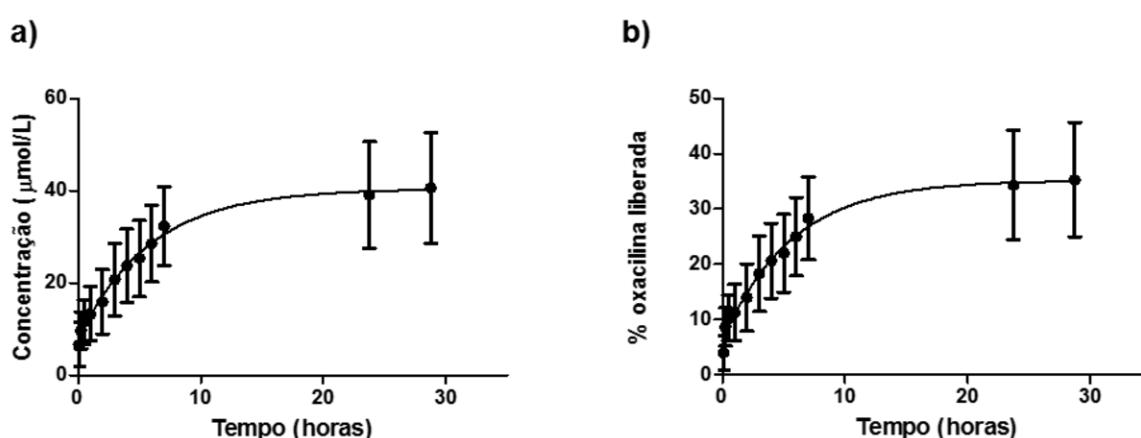
#### **6.4 Análise do perfil de liberação de antibiótico**

A liberação do fármaco foi quantificada usando-se espectrofotometria no UV-Vis. A cada determinado tempo, uma alíquota da solução era colocada em um cubeta,



sua absorbância era medida e esta era devolvida a mistura contendo a membrana. Para cada determinado tempo, uma concentração foi calculada usando-se a curva padrão de referência para oxacilina. Este tipo de modelo é interessante visto que, embora tenha algumas limitações experimentais, ele é mais semelhante à de uma ferida contendo pequeno volume de exsudato e onde não existe diluição do mesmo. Usando-se estes dados, foram montados gráficos de concentração do fármaco liberado versus tempo e um de porcentagem do mesmo versus tempo.

Figura 15 - Concentração do fármaco liberado versus tempo (a) e porcentagem liberada do fármaco versus tempo (b).



Fonte: Autoria própria.

Observa-se uma liberação na forma de exponencial com um plateau de concentração do fármaco no solvente, com uma resposta de liberação de 50 % do total de antibiótico liberado com 4 horas. Observa-se que o sistema liberou no máximo 35% da oxacilina presente na membrana. Pelo modelo utilizado, em que não se acrescenta mais solvente ao meio, isto indica que o equilíbrio entre fármaco dissociado/associado foi atingido para concentrações próximas a 40  $\mu\text{mol/L}$ . Por outro lado, mesmo com uma liberação baixa do fármaco no meio, entende-se que estas concentrações são mais que suficientes para uso clínico, considerando que as concentrações inibitórias mínimas para bactérias destes antibióticos estão na faixa do nanomolar.

Essas condições de liberação favorecem a aplicação como curativo, pois fornecem um rápido aumento da concentração do fármaco na ferida, atingindo valores terapêuticos relevantes, seguidos de uma liberação mais lenta para manter o nível do fármaco (Wilhelms et al., 2007).

## 7 CONCLUSÃO

No presente trabalho, a oxacilina foi incorporada em uma membrana de celulose bacteriana a partir da modificação prévia da sua superfície a fim de ser utilizada no tratamento de queimaduras e feridas infectadas.

A combinação do antisséptico e antibiótico inseridos no filme de CB resultou em um material com propriedades de cicatrização e controle de infecções, o que o torna apto a ser utilizado como curativo em feridas infectadas.

O resultado de liberação do antibiótico mostrou primeiramente uma liberação rápida, atingindo o equilíbrio por volta de 20h após o início do experimento, apresentando um perfil condizente com as condições requeridas para uma cicatrização adequada.

## 8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho, como sugestões para dar continuidade ao estudo, tem-se:

1. Realizar ensaios antimicrobianos;
2. Repetir os testes em condições similares às do corpo humano (pH próximo a 5 e temperatura de 37°C);
3. Realizar testes para comprovar a eficácia de outros agentes modificadores;
4. Repetir ensaio de liberação de fármaco se utilizando experimento com troca de solvente para se observar porcentagens de liberação maior do fármaco.

## REFERÊNCIAS

- BIRKHEUR, S., FARIA-TISCHER, P. C. DE S., TISCHER, C. A., PIMENTEL, E. F., FRONZA, M., ENDRINGER, D. C., ... RIBEIRO-VIANA, R. M. (2017). **Enhancement of fibroblast growing on the mannosylated surface of cellulose membranes.** *Materials Science and Engineering: C*, 77, 672–679. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.04.006>
- BUTCHER, M. (2012). **in Wound Bioburden Management.** *British Journal of Nursing*, 21(12), 16–21.
- CARVALHO, T., GUEDES, G., SOUSA, F. L., FREIRE, C. S. R., & SANTOS, H. A. (2019). **Latest Advances on Bacterial Cellulose-Based Materials for Wound Healing , Delivery Systems , and Tissue Engineering**, 1900059, 1–19. <https://doi.org/10.1002/biot.201900059>
- CZAJA, W., KRZYSTYNOWICZ, A., BIELECKI, S., & BROWN, R. M. (2006). **Microbial cellulose - The natural power to heal wounds.** *Biomaterials*, 27(2), 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.07.035>
- DONINI, Í. (2011). **Desenvolvimento de métodos de cultivo de Gluconacetobacter xylinus para obtenção de compósitos à base de celulose bacteriana e colágeno tipo I adicionado in situ.** Aleph.
- DONINI, Í. A. N., DE SALVI, D. T. B., FUKUMOTO, F. K., LUSTRI, W. R., BARUD, H. S., MARCHETTO, R., ... RIBEIRO, S. J. L. (2010). **Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana.** *Eletica Quimica*, 35(4), 165–178. <https://doi.org/10.1590/S0100-46702010000400021>
- FARIA-TISCHER, P. C. S., RIBEIRO-VIANA, R. M., & TISCHER, C. A. (2019). **Chapter 7 - Bio-based nanocomposites: Strategies for cellulose functionalization and tissue affinity studies.** In V. Grumezescu & A. M. Grumezescu (Eds.), *Materials for Biomedical Engineering* (pp. 205–244). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816872-1.00007-8>
- FU, L., ZHANG, J., & YANG, G. (2013). **Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair.** *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 1432–1442. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.071>
- JOZALA, A. F., LENCASTRE-NOVAES, L. C. DE, LOPES, A. M., SANTOS-EBINUMA, V. D. C., MAZZOLA, P. G., & PESSOA-JR, A. (2016). **Bacterial nanocellulose production and application: a 10-year overview**, 2063–2072. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7243-4>
- MASON, T. J. (1997). **Ultrasound in synthetic organic chemistry.** *Chemical Society Reviews*, 26(6), 443–451. <https://doi.org/10.2174/1574087054582923>
- OLIVEIRA, MARIELLE DE ; CARMINATTI, C. A. (2016). **Production of Bacterial Cellulose in a Static Culture using Different Carbon Sources**, 1–16.

PHILLIPS, A. P. (1953). **Preparation of the Monocholine Ester of Succinic Acid and Some Related Derivatives**. *Journal of the American Chemical Society*, 75(19), 4725–4727. <https://doi.org/10.1021/ja01115a032>

PLACKETT, D., LETCHFORD, K., JACKSON, J., & BURT, H. (2014). **A review of nanocellulose as a novel vehicle for drug delivery**. *Nordic Pulp & Paper Research Journal*, 29(1), 105–118. <https://doi.org/10.3183/npprj-2014-29-01-p105-118>

PORTELA, R., LEAL, C. R., ALMEIDA, P. L., & SOBRAL, R. G. (2019). **Bacterial cellulose: a versatile biopolymer for wound dressing applications**. *Microbial Biotechnology*, 12(4), 586–610. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13392>

ROWAN, M. P., CANCIO, L. C., ELSTER, E. A., BURMEISTER, D. M., ROSE, L. F., NATESAN, S., ... CHUNG, K. K. (2015). **Burn wound healing and treatment : review and advancements**. *Critical Care*, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13054-015-0961-2>

SHODA, M., SUGANO, Y., PETERSEN, N., & GATENHOLM, P. (2011). **Bacterial cellulose-based materials and medical devices: Current state and perspectives**. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(5), 1277–1286. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3432-y>

SULAEVA, I., HENNIGES, U., ROSENAU, T., & POTTHAST, A. (2015). **Bacterial cellulose as a material for wound treatment: Properties and modifications: A review**. *Biotechnology Advances*, 33(8), 1547–1571. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.009>

TORGBO, S., & SUKYAI, P. (2018). **Bacterial cellulose-based scaffold materials for bone tissue engineering**. *Applied Materials Today*, 11, 34–49. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2018.01.004>

WILHELMS, T., SCHULZE, D., ALUPEI, I. C., ROHRER, C., ABEL, M., WIEGAND, C., & HIPLER, U. C. (2007). **Release of Polyhexamethylene biguanidine hydrochloride ( PHMB ) from a Hydrobalanced cellulose wound dressing with PHMB \***, (May), 2007.

YAN, H., & TSUJII, K. (2005). **Potential application of poly(N-isopropylacrylamide) gel containing polymeric micelles to drug delivery systems**. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 46(3), 142–146. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.10.007>