

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE  
MATERIAIS

KARINA ANDRESSA ALVES SEDANS

**MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE CELULOSE BACTERIANA VISANDO CURATIVO  
ANTIMICROBIANO**

DISSERTAÇÃO

LONDRINA

2022

KARINA ANDRESSA ALVES SEDANS

**MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE CELULOSE BACTERIANA VISANDO CURATIVO  
ANTIMICROBIANO**

**CHEMICAL MODIFICATION OF BACTERIAL CELLULOSE AIMING AN  
ANTIMICROBIAL DRESSING**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Renato Márcio Ribeiro Viana

LONDRINA  
2022



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite que outros remixem, adaptem e criem a partir do trabalho para fins não comerciais, desde que atribuam o devido crédito 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**  
**Campus Londrina**



KARINA ANDRESSA ALVES SEDANS

### **MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE CELULOSE BACTERIANA VISANDO CURATIVO ANTIMICROBIANO**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestra 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: 09 de Agosto de 2022

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

Dra. Gizilene Maria De Carvalho, Doutorado - Universidade Estadual de Londrina (Uel)

Dr. Luis Fernando Cabeca, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 09/08/2022.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais pelo apoio e incentivo para que seguisse com meus estudos e alcançasse o sucesso, não importando a dificuldade que o caminho apresentasse. À minha irmã por torcer por mim e acreditar, mesmo à distância.

Ao Ricardo Cardoso pelo apoio e compreensão durante os momentos difíceis. Por estar ao meu lado e me incentivar mesmo quando eu já não acreditava mais em mim.

Ao meu orientador Prof. Dr. Renato Márcio Ribeiro Viana pelos conhecimentos compartilhados, pela confiança em mim depositada; por ter contribuído com meu crescimento científico e também como pessoa.

Ao professor Dr. Luis Fernando Cabeça pelos ensinamentos compartilhados, principalmente em relação ao tema de lipossomas.

À professora Dr<sup>a</sup>. Anna Paola Butera pelas contribuições adicionadas na qualificação do trabalho.

Ao Laboratório de Multiusuários do câmpus Londrina – Labmult-LD pela estrutura disponibilizada, pelas análises realizadas e, em especial, à Talita e à Yasmin pelo apoio nas análises.

Aos colegas de laboratório pelo auxílio em análises, cálculos e pela companhia desde as restrições da pandemia.

Aos demais professores e servidores da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR pelo apoio e colaboração no desenvolvimento desse trabalho e em minha formação profissional.

A todas as pessoas que não foram mencionadas, mas que fizeram parte dessa caminhada e deixaram sua contribuição.

“Jamais desista de ser feliz, pois a vida é um espetáculo imperdível, ainda que se apresentem dezenas de fatores a demonstrarem o contrário”  
(Augusto Cury).

## RESUMO

SEDANS, K. A. A. **Modificação química de celulose bacteriana visando curativo antimicrobiano**. 2022. 60f. Dissertação – Programa de Pós Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2022.

Lesões cutâneas como as ocasionadas por queimaduras requerem atenção no seu tratamento a fim de evitar infecções e maiores complicações durante o processo de cicatrização. Uma importante característica a ser considerada nos materiais propostos como curativos é proporcionar um ambiente úmido e quente para promover melhor cicatrização. A celulose bacteriana é apresentada como ideal para esta aplicação pela sua biocompatibilidade, alta cristalinidade, capacidade de absorção de umidade e estabilidade térmica. Apesar de suas características promissoras, o material não possui propriedades antimicrobianas. Assim, este trabalho propõe a produção de um filme de celulose modificado que possua propriedade antimicrobiana. Tal modificação é proposta para que o curativo seja capaz de adsorver um antibiótico e liberar no local desejado. Esta propriedade foi adquirida por meio da reação de esterificação do ácido 6-piridino-hexanoico com o filme de celulose a fim de reter um fármaco aniônico (oxacilina). Além disso, também foram utilizados lipossomas aniônicos, com o fármaco encapsulado, adsorvidos no filme celulósico para que promova liberação mais lenta. Para tal, procedeu-se com a síntese da molécula do sal de piridínio e, posteriormente, seu acoplamento na membrana celulósica; seguido pela adsorção do fármaco. O filme modificado foi capaz de adsorver 14,2 % do fármaco presente em solução, quantidade essa que representa 6,81 % em relação à sua massa. O sistema lipossomal foi capaz de encapsular 20,1 % do fármaco. Assim, produziu-se também um filme com lipossomas adsorvidos contendo 16,5 % de oxacilina em relação à massa da celulose. Enquanto o primeiro filme liberou metade do fármaco adsorvido em 12 horas, o filme contendo lipossomas levou 4 dias para iniciar o processo de liberação e permaneceu liberando fármaco durante os 11 dias de estudo. Os filmes produzidos foram analisados por infravermelho (FT-IR), ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia no ultravioleta visível (UV-Vis), espalhamento de luz dinâmico (DLS), cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

**Palavras-chave:** Celulose bacteriana. Lipossoma. Oxacilina. Antimicrobiano.

## ABSTRACT

SEDANS, K. A. A. **Chemical modification of bacterial cellulose aiming an antimicrobial dressing**. 2022. 60p. Dissertation – Master in Material Science and Engineering, Federal University of Technology – Parana. Londrina, 2022.

Skin lesions from burns require attention in the treatment to avoid infections and significant complications during the healing process. An important characteristic to consider in the proposed dressings material is providing a moist and warm environment to improve healing. Bacterial cellulose is presented as ideal for this application due to its biocompatibility, high crystallinity, water absorption capability, and thermal stability. Although it has favorable characteristics, the material does not have antimicrobial properties. Therefore, we propose a modified bacterial cellulose film to have antimicrobial properties. The modification is proposed for the dressing to be able to adsorb an antibiotic and release it in the aimed site. This property was gained through the esterification reaction of 6-pyridinehexanoic acid and the cellulose film to retain an anionic drug (oxacillin). Besides, it used anionic liposomes, encapsulating the drug, and adsorbed to the cellulosic film for slower release. The pyridinium salt molecule was synthesized and connected to the bacterial cellulose, followed by adsorbing the drug. The modified film could adsorb 14,2% of the drug present in the medium, 6,8 1% related to its mass. The liposomes presented 20,1 % of encapsulation efficiency. Thus, we also produced a BC film with liposomes that could retain 16,5 % of oxacillin related to the cellulose mass. Meanwhile, the first film released half of the drug adsorbed in 12 hours, the film with liposomes took four days to start releasing and kept releasing for other 11 days. The produced films were analyzed by infrared (FTIR), nuclear magnetic resonance (NMR), UV-Vis spectroscopy, high-performance liquid chromatography (HPLC), and scanning electronic microscope (SEM).

**Keywords:** Bacterial Cellulose. Liposome. Oxacillin. Antimicrobial.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – (A) Estrutura molecular da celulose bacteriana hidratada; (B) Microscopia típica da morfologia do filme de celulose bacteriana. ....	16
Figura 2 - Esquema ilustrando as abordagens de enxertia na celulose: <i>graft-from</i> e <i>graft-to</i> . ....	18
Figura 3 - Reações de esterificação da celulose.....	19
Figura 4 - Esquema de um lipossoma, com ênfase na interação com fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos. ....	20
Figura 5 – Representação de um fosfolípido; em que R'' pode ser substituído, gerando as diferentes estruturas utilizadas. Abaixo: Fosfolípídios comumente utilizados em formulações lipossomais. (A) Fosfatidilcolina (B) Fosfatidilglicerol e (C) Fosfatidiletanolamina. ....	21
Figura 6 – Exemplos de lipídios carregados utilizados para modificar lipossomas. (A) DOPG (negativo) e (B) DOTAP (positivo). ....	22
Figura 7 – Métodos para encapsulação de fármacos hidrofílicos: formação de filmes finos seguidos de (A) ciclos de congelamento e descongelamento; (B) Desidratação-reidratação de vesículas vazias pré-formadas (DRV) e (C) Evaporação em fase reversa (REV). ....	24
Figura 8 – Fases da cicatrização: (a) Inflamação. (b) Proliferação (c) Remodelagem. ....	25
Figura 9 - Estratégia proposta para modificar o filme de celulose bacteriana afim de lhe conferir características antimicrobianas. ....	28
Figura 10 – Fluxograma de atividades. ....	29
Figura 11 – Celulose bacteriana produzida por fermentação. ....	30
Figura 12 – (a) Síntese do ácido 6-piridinohexanoico e (b) estrutura química da oxacilina. ....	39
Figura 13 – Espectro de RMN 1H do ácido 6-piridinohexanoico. Solvente: D2O.....	40
Figura 14 – Espectro de RMN 13C do ácido 6-piridinohexanoico. Solvente: D2O.....	41
Figura 15 – Acoplamento do ácido 6-piridinohexanoico.....	41
Figura 16 – Espectros de infravermelho da celulose nativa (superior) e do ácido 6-piridinohexanoico acoplado à celulose bacteriana (inferior). ....	43
Figura 17 – Curva de calibração padrão da solução de ácido 6-piridinohexanoico em NaOH. ....	44
Figura 18 – Curva de calibração padrão de solução de oxacilina em água destilada. ....	45
Figura 19 – À esquerda, membranas nativas de celulose, que estiveram em contato com a oxacilina; à direita, membranas modificadas, que absorveram oxacilina. ....	46
Figura 20 – Estruturas químicas dos compostos utilizados. A) SPC B) Colesterol C) DOPG. ....	47
Figura 21 – Tamanho médio de partícula e potencial zeta dos lipossomas controle e com fármaco. ....	48
Figura 22 – Curva de calibração padrão de solução de oxacilina no HPLC.....	50
Figura 23 – Cromatograma da solução restante da adsorção do lipossoma no filme ( <b>BC-3</b> ). ....	51
Figura 24 – Micrografia (MEV) dos filmes de celulose bacteriana modificados e não modificados, com aumento de 40000X. (a) Filme nativo. (b) Filme <b>BC-1</b> . (c) Filme <b>BC-2</b> . (d) Filme <b>BC-3</b> . ....	52



Figura 25 – Representação do aparato montado para os ensaios de permeação e liberação. .....	53
Figura 26 – Curva de calibração padrão de solução de oxacilina em solução tampão. ....	53
Figura 27 – Percentual de oxacilina permeado com o tempo.....	54
Figura 28 – Percentual de oxacilina liberado do filme <b>BC-2</b> com o tempo. ....	55
Figura 29 – Percentual de oxacilina liberado do filme <b>BC-3</b> com o tempo. ....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\delta$  *Deslocamento químico*

AGU *Unidade de Glicose Anidra (Anhydrous Glucose Unity)*

CB *Celulose bacteriana*

**CB-1** *Celulose bacteriana funcionalizada com ácido 6-piridinohexanoico*

**CB-2** *Celulose bacteriana funcionalizada e com oxacilina adsorvida na superfície*

**CB-3** *Celulose bacteriana funcionalizada e com lipossomas adsorvidos na superfície*

DIC *N,N'-Diisopropilcarbodiimida*

DMAP *Dimetilaminopiridina*

FTIR *Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier*

HPLC *Cromatografia líquida de alta eficiência*

MEV *Microscopia Eletrônica de Varredura*

RMN *Ressonância magnética nuclear*

UV-Vis *Ultravioleta-visível*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	13
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	15
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b>	15
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b>	15
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	16
<b>3.1</b>	<b>Celulose bacteriana (CB)</b>	16
<b>3.2</b>	<b>Lipossomas</b>	19
<b>3.3</b>	<b>Feridas e características necessárias para os curativos</b>	24
<b>3.4</b>	<b>Planejamento do trabalho</b>	27
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	29
<b>4.1</b>	<b>Materiais</b>	29
4.1.2	<i>Solventes e reagentes</i>	30
4.1.3	<i>Solução tampão</i>	30
<b>4.2</b>	<b>Métodos analíticos</b>	31
4.2.1	<i>Espectroscopia por absorção no infravermelho</i>	31
4.2.2	<i>Espectroscopia de absorção no ultravioleta</i>	31
4.2.3	<i>Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</i>	31
4.2.4	<i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)</i>	31
4.2.5	<i>Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)</i>	32
<b>4.3</b>	<b>Síntese do ácido 6-piridinohexanoico</b>	32
<b>4.4</b>	<b>Acoplamento do ácido 6-piridinohexanoico no filme de celulose bacteriana</b>	32
<b>4.5</b>	<b>Quantificação da funcionalização do filme de celulose bacteriana</b>	33
<b>4.6</b>	<b>Curva de calibração padrão de oxacilina</b>	34
<b>4.7</b>	<b>Adsorção de oxacilina pelas membranas modificadas</b>	34
<b>4.8</b>	<b>Preparo dos lipossomas</b>	35
4.8.1	<i>Análise por espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)</i>	35
4.8.2	<i>Análise da eficiência de encapsulação</i>	36
<b>4.9</b>	<b>Adsorção dos lipossomas ao filme modificado de celulose bacteriana</b>	36
4.9.1	<i>Análise da adsorção dos lipossomas</i>	36
<b>4.10</b>	<b>Análise de permeação de fármaco</b>	37
<b>4.11</b>	<b>Ensaio de liberação de fármaco</b>	37

<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	39
5.1	Formação do ácido 6-piridinohexanoico	39
5.2	Acoplamento do ácido 6-piridinohexanoico no filme celulósico	41
5.3	Quantificação da funcionalização do filme de celulose bacteriana	43
5.4	Avaliação da capacidade de adsorção de oxacilina no filme BC-2	44
5.5	Análise dos lipossomas	46
5.6	Avaliação da adsorção dos lipossomas ao filme	49
5.7	Imagens do MEV	51
5.8	Análise da permeação	52
5.9	Ensaio de liberação	54
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	56
	<b>REFERÊNCIAS</b>	57

## 1 INTRODUÇÃO

Há diferentes tipos de feridas e a depender do local e fator gerador, podem demandar cuidados e curativos diferentes. Com o avanço nos estudos sobre o comportamento das feridas e das propriedades dos materiais, alguns procedimentos clínicos chegaram a ser refutados. A exemplo da ideia de manter uma ferida seca: hoje é sabido que a existência de um ambiente quente e úmido é o ideal para uma melhor cicatrização (NICULESCU; GRUMEZESCU, 2022; RATNER et al., 2013; ROY et al., 2009; SULAEVA et al., 2015).

Se considerado o recorte das feridas na pele, um curativo ideal, além de manter o ambiente úmido, deve permitir a troca de oxigênio, adsorver exsudato, acelerar a reepitelização, reduzir dor e o tempo de cicatrização. Com características tão exigentes demandadas atualmente, não há um material que consiga cumpri-las sozinho. Feridas profundas na pele expõem o corpo ao risco de infecção e podem levar ao risco de morte (NICULESCU; GRUMEZESCU, 2022; PORTELA et al., 2019; SULAEVA et al., 2015).

A celulose bacteriana é apresentada como um material interessante para essa aplicação por ser um polímero natural e de relativo baixo custo considerando seu alto desempenho. Ademais, sem qualquer modificação, possui propriedades como biocompatibilidade, capacidade de absorção de umidade e alta estabilidade térmica. Mesmo com características ótimas para aplicação em sua forma pura, ainda há a possibilidade modifica-la para aumentar a biocompatibilidade, a absorção de água e, em especial, conferir características antimicrobianas, ausentes na celulose (RATNER et al., 2013; ROY et al., 2009; SULAEVA et al., 2015)

Como forma de aprimorar características num curativo também podem ser incluídos nanomateriais, que são os que possuem ao menos uma de suas dimensões em escala nanométrica. Nos últimos anos, os nanomateriais são foco de estudo como soluções promissoras para inúmeras aplicações. Dentre essas destacam-se sistemas de *drug delivery* e liberação controlada de fármacos. Esses materiais incluem nanotubos de carbono, dendrímeros, micelas, pontos quânticos e lipossomas (HOSSSEN et al., 2019).

Lipossomas são vesículas bilipídicas constituídas de moléculas que apresentam cadeia composta por cabeça hidrofílica e cauda hidrofóbica. Devido a essa característica, sistemas lipossomais podem carregar tanto compostos hidrofílicos

como hidrofóbicos. Enquanto moléculas hidrofílicas podem ser encapsuladas em seu interior, as hidrofóbicas são inseridas entre a bicamada da membrana. As vantagens da utilização desses sistemas incluem biocompatibilidade, habilidade de carregar grandes quantidades da substância desejada, além de propriedades físico-químicas que podem ser alteradas a fim de obter as características otimizadas (SERCOMBE et al., 2015).

Diante do exposto, o presente trabalho propõe a produção de um curativo a partir da celulose bacteriana que seja capaz de liberar um agente antimicrobiano. Para o estudo, foi selecionada a oxacilina, que é um antibiótico da classe das penicilinas resistente a penicilases e utilizado no tratamento contra *Staphylococcus aureus*, patógeno crítico quando se tratam de feridas cutâneas (HODILLE et al., 2017). Como trata-se de um fármaco ionizável, com caráter aniônico propõe-se a modificação da superfície da celulose bacteriana através da reação de esterificação com ácido 6-piridinohexanoico, a fim de torná-la catiônica. A fim de promover a liberação controlada do fármaco e aumentar sua concentração no curativo, também é proposto um sistema lipossomal que interaja com a membrana modificada.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Preparar filmes de celulose bacteriana modificados capazes de liberar oxacilina.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Sintetizar e caracterizar o ácido contendo íon piridínio
- Funcionalizar e caracterizar filmes de celulose bacteriana com cargas positivas
- Produzir lipossomas aniônicos encapsulados com o fármaco oxacilina
- Caracterizar sistemas lipossomais através do tamanho de partícula, potencial zeta e polidispersividade
- Caracterizar e comparar as propriedades dos filmes (adsorção de fármaco e liberação dos mesmos)

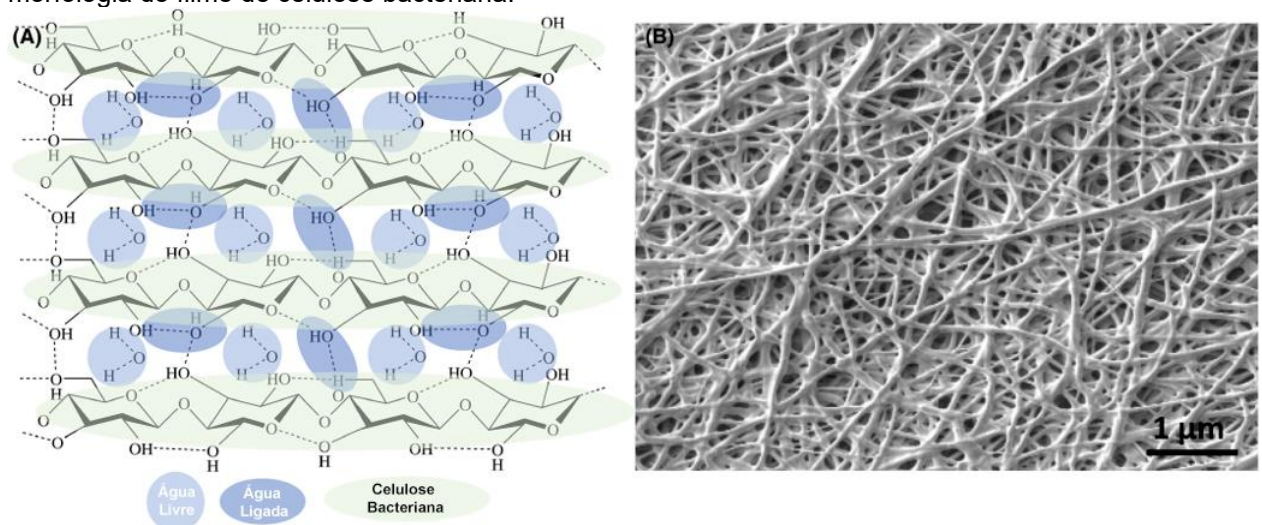
### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Celulose bacteriana (CB)

A celulose é um polissacarídeo linear e um dos polímeros mais abundantes no mundo. Ela é encontrada em todas as plantas, sendo o principal constituinte da parede celular dessas. Também pode ser secretada por algumas espécies de bactérias e procariontes, como acetobater, rhizobium e agrobacterium. Possui fórmula molecular  $(C_6H_{10}O_5)_n$  e é composta de centenas a milhares de unidades de glicose (AGRAWAL et al., 2019; CHERNG et al., 2021).

A celulose bacteriana é formada por uma estrutura tridimensional altamente pura de nanofibras estabilizadas por ligações de hidrogênio inter e intrafibrilares, conforme esquematizado na Figura 1. Sua biocompatibilidade é atribuída à nanoestrutura, cuja organização sustenta a proliferação de células. Possui a mesma estrutura química da originária de uma planta, com a vantagem de ser livre de outros polímeros presentes nesta - como lignina, hemiceluloses e pectina – e ser altamente cristalina. Sua morfologia resulta em propriedades ideais para biocurativos: estabilidade mecânica, transparência, biocompatibilidade, mínima toxicidade (CHERNG et al., 2021; SULAEVA et al., 2015).

Figura 1 – (A) Estrutura molecular da celulose bacteriana hidratada; (B) Microscopia típica da morfologia do filme de celulose bacteriana.



Fonte: Adaptado de PORTELA et al., 2019.



A biossíntese da celulose bacteriana pode ser conduzida em cultura estática ou agitada. A escolha do processo dependerá, entre outros fatores, de sua aplicação final; uma vez que o método interfere na morfologia e nas propriedades físicas e mecânicas do polímero formado. Por exemplo, a cultura agitada produz uma celulose de menor resistência mecânica se comparada com a produzida por cultura estática. Para a síntese, a glicose é transportada para o citoplasma da bactéria. Estudos anteriores mostram que a celulose bacteriana pode ser produzida a partir de diversas fontes de glicose (DONINI et al., 2010; JOZALA et al., 2016; TORGBO; SUKYAI, 2018).

Já há aplicações comerciais da celulose bacteriana na área médica, inclusive brasileiras, como BioFill® e Bioprocess®, utilizados no tratamento de queimaduras e úlceras; e Gengiflex, aplicado em doenças periodontais. Além de produtos ao redor do mundo: CelMat® Wound (Polônia), Bio-skinG (Taiwan) e XCell (Estados Unidos) (MARESTONI et al., 2021).

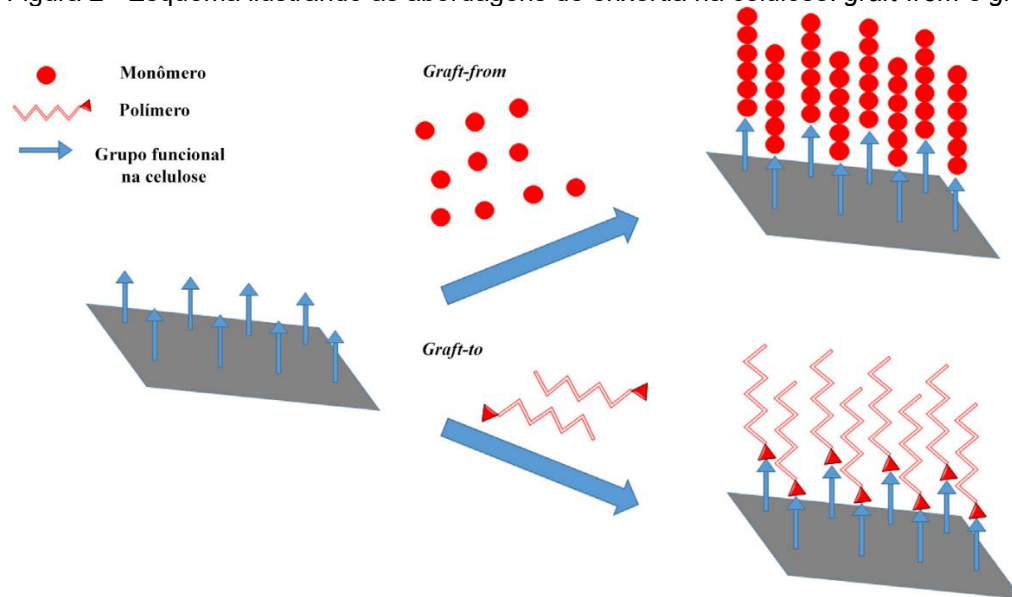
Embora seja altamente vantajosa como material para aplicação médica, a celulose bacteriana não apresenta atividade antimicrobiana – fator importante quando se tratam de feridas crônicas e/ou infectadas. Algumas modificações podem ser feitas no intuito de lhe conferir novas propriedades ou mesmo aprimorá-las, como é o caso da biocompatibilidade e da retenção de água. Há duas formas principais para modificar a celulose bacteriana: controlar suas propriedades durante a biossíntese ou modificar quimicamente no pós-síntese (SULAEVA et al., 2015, 2020).

Dentre as modificações pós síntese que podem ser feitas há vários métodos: irradiação, impregnação com moléculas biologicamente ativas ou metais, e tratamentos químicos. A reatividade da celulose se dá devido à presença das hidroxilas em sua estrutura. E uma das formas de modificá-la quimicamente é introduzir grupos funcionais em sua molécula, através de reações como esterificação, fosforilação, acetilação, entre outros (PETERSEN; GATENHOLM, 2011; ROY et al., 2009).

Para modificar um polímero, como a celulose bacteriana, podem ser feitas blendas, reações químicas para troca de grupo funcional ou mesmo a enxertia, e consequente polimerização, de outro monômero sobre o que se quer modificar. Enquanto uma blenda consiste na mistura física dos polímeros para obter as propriedades desejadas; no processo de enxertia, há duas formas de se ter um polímero como espaçador na estrutura da celulose: os monômeros ligam-se

covalentemente à cadeia polimérica (*graft-to*) ou a polimerização é realizada na própria celulose, a partir de um derivado (*graft-from*), conforme esquematizado na Figura 2. Essa ligação pode ocorrer via reação química, fotoquímica ou radiação (FARIA-TISCHER; RIBEIRO-VIANA; TISCHER, 2019; TOSH; ROUTRAY, 2014).

Figura 2 - Esquema ilustrando as abordagens de enxertia na celulose: *graft-from* e *graft-to*.



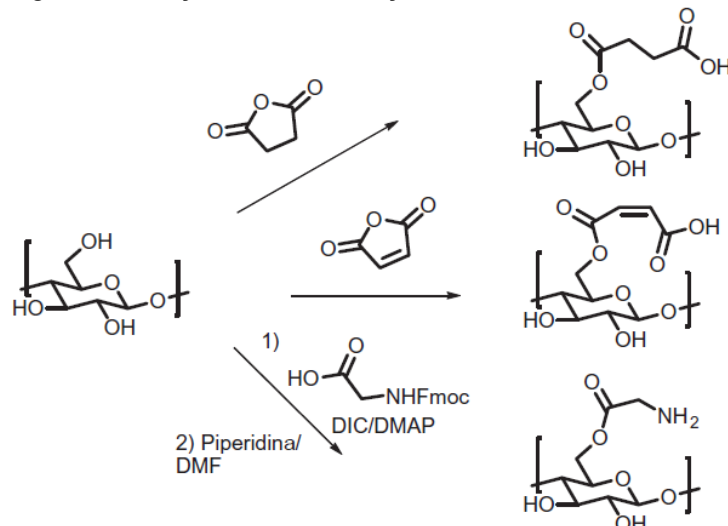
Fonte: Adaptado de FARIA-TISCHER; RIBEIRO-VIANA; TISCHER, 2019.

Em se tratando de reações químicas há algumas limitações envolvendo a da celulose com moléculas covalentes: sua solubilidade em solventes – sua estrutura dificulta a interação, mesmo com solventes polares –, a longa rede de ligação de hidrogênio e a baixa reatividade da hidroxila como nucleófilo. A dissolução da celulose facilita a reação química em fase homogênea; porém são perdidas suas características iniciais, como tamanho das fibras e fibrilas, cristalinidade e porosidade. A abordagem da reação em fase heterogênea pode ser um caminho. Nesse caso, os choques entre as moléculas necessários para que a reação ocorra acabam ocorrendo majoritariamente na superfície do material. (FARIA-TISCHER; RIBEIRO-VIANA; TISCHER, 2019).

Além disso, é necessário selecionar um grupo espaçador adequado, uma vez que a ligação covalente entre celulose e moléculas de interesse biomédico pode ser dificultada devido a incompatibilidade de grupos funcionais. A esterificação é uma das estratégias mais utilizadas para esse fim. Comumente, utiliza-se uma forma ativada de ácido carboxílico, a exemplo do cloreto de acila e anidrido. Exemplos de reações

típicas de esterificação da celulose bacteriana são trazidos na Figura 3 (FARIA-TISCHER; RIBEIRO-VIANA; TISCHER, 2019).

Figura 3 - Reações de esterificação da celulose



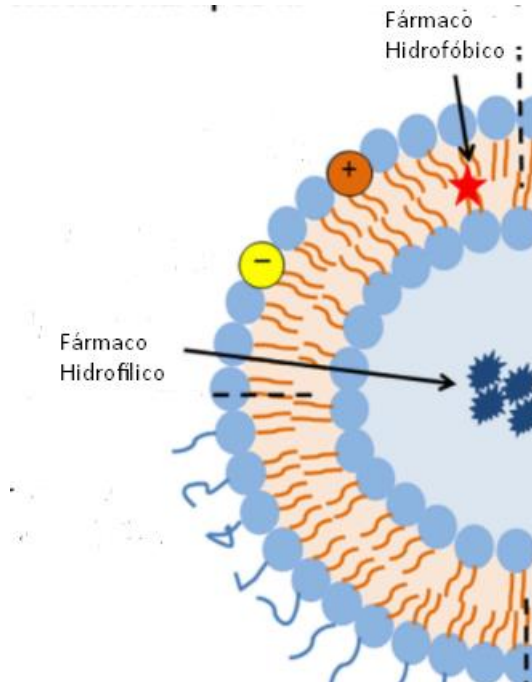
Fonte: Adaptado de FARIA-TISCHER; RIBEIRO-VIANA; TISCHER, 2019

### 3.2 Lipossomas

Sistemas convencionais de *drug delivery* – utilizados para entregar fármacos e outras moléculas em locais-alvo específicos – já são conhecidos e amplamente utilizados na prática. Estes podem ser administrados via oral ou injetados; porém carecem de algumas propriedades quando se trata de liberação e biodistribuição. Por exemplo, agentes quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer tradicionalmente não são distribuídos especificamente, isto é, para destruir somente as células doentes; assim, acabam danificando células saudáveis, o que resulta em baixa efetividade e alta toxicidade (AGUILAR-PÉREZ et al., 2020; DANG; GUAN, 2020).

Lipossomas são vesículas fosfolipídicas constituídas por uma ou mais camadas bilipídicas que concentram espaços aquosos em seu interior. Em meio aquoso, as vesículas fecham-se em torno de si mesmas, formando uma bicamada, ficando as regiões apolares protegidas da água e as polares em contato direto com essa. Portanto, substâncias insolúveis em água ficam na bicamada lipídica, em contato com a região apolar. Enquanto o núcleo aquoso formado pode encapsular substâncias solúveis (HOSSSEN et al., 2019; SERCOMBE et al., 2015). Como pode ser observado na Figura 4.

Figura 4 - Esquema de um lipossoma, com ênfase na interação com fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos.



Fonte: Adaptado de SERCOMBE et al., 2015.

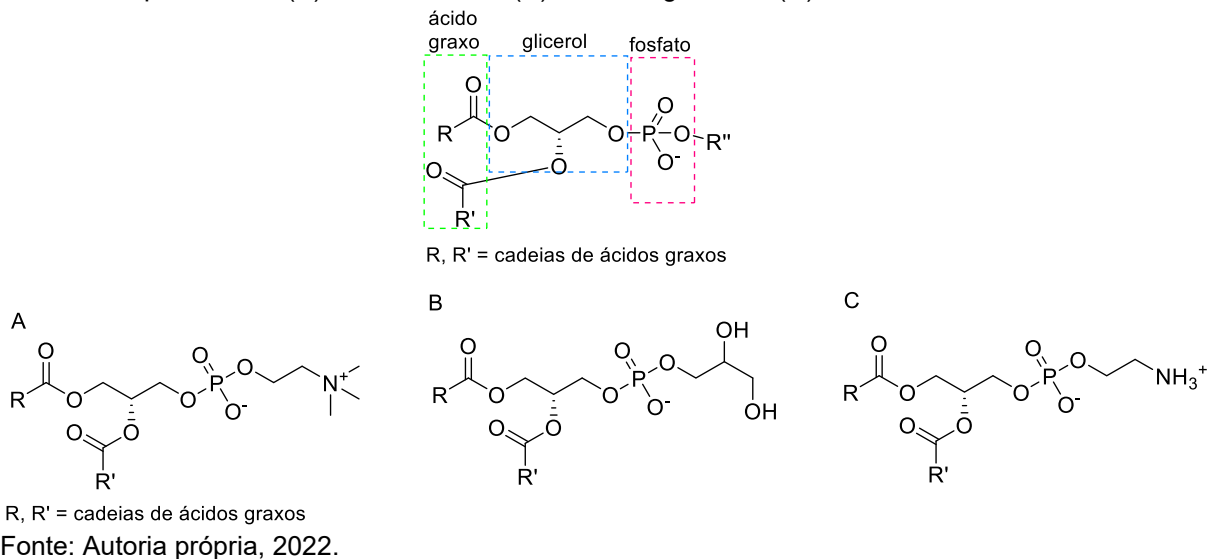
De forma geral, os lipossomas podem ser divididos em quatro tipos: convencionais, estabilizados estericamente, com ligantes de direcionamento e teranósticos. Este trabalho foca nos primeiros, que podem ser compostos por fosfolipídios catiônicos, aniônicos ou neutros, e colesterol, encapsulando um volume aquoso dentro da bicamada (SERCOMBE et al., 2015).

Polietileno glicol (PEG) é um dos polímeros mais utilizados na intenção de se obter lipossomas estericamente estabilizados. Estes são preparados na intenção de aumentar a estabilidade física, prevenindo a opsonização, e melhorar a circulação do lipossoma no sangue, a fim de reduzir efeitos colaterais. Já os lipossomas com ligantes de direcionamento são aplicados quando se utiliza fármacos específicos para um tipo de célula ou órgão. Para isso, inclui-se na composição ligantes como anticorpos, proteínas ou carboidratos. Por outro lado, os ditos lipossomas teranósticos envolvem um sistema constituído de: uma nanopartícula, um elemento de direcionamento, um elemento de imagem e um componente terapêutico (SERCOMBE et al., 2015).

Fosfolipídios são os principais componentes da membrana celular; portanto, são cruciais na interação célula-membrana e na biocompatibilidade. Possuem uma cauda constituída por ácido graxo (apolar) e cabeça polar (fosfato), cuja representação pode ser observada na Figura 5. Uma variedade de fosfolipídios tem

vido utilizada na produção de lipossomas, sendo mais comum a fosfatidilcolina, tanto a com cadeia saturada de hidrocarbonetos (distearoil) como insaturada (dioleoil) (HASIRCI; HASIRCI, 2018; RATNER et al., 2013; VAN HOOGEVEST, 2017). Na Figura 5 também são apresentados alguns exemplos de estrutura utilizadas em formulações lipossomais.

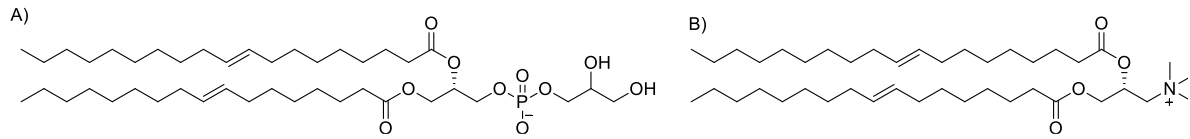
Figura 5 – Representação de um fosfolípídio; em que R'' pode ser substituído, gerando as diferentes estruturas utilizadas. Abaixo: Fosfolípídios comumente utilizados em formulações lipossomais. (A) Fosfatidilcolina (B) Fosfatidilglicerol e (C) Fosfatidiletanolamina.



Também compõe a estrutura do lipossoma aqui proposto, o colesterol, que aumenta o fator de empacotamento dos lipídios na bicamada e estabiliza a estrutura. Sem sua inclusão no lipossoma, o fármaco vazaria. A interação entre a molécula a ser encapsulada e a bicamada lipídica tem papel essencial na formação do lipossoma e na eficiência de encapsulação. Assim, a interação eletrostática pode ser um caminho para aumentar a encapsulação através do uso de lipídios carregados positiva ou negativamente. O mesmo pode ser pensado para otimizar interações do lipossoma com diferentes ligantes e células. (ELOY et al., 2014; RATNER et al., 2013).

Na Figura 6, são apresentados dois lipídios que podem ser utilizados para esse fim. O DOPG-Na (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-[fosfo-rac-(1-glicerol)]) também é um fosfolípídio, porém de carga negativa, que será utilizado na composição de modo a fornecer a interação entre filme e lipossoma.

Figura 6 – Exemplos de lipídios carregados utilizados para modificar lipossomas. (A) DOPG (negativo) e (B) DOTAP (positivo).



Fonte: Autoria própria, 2022.

Diante dos obstáculos apresentados nos sistemas convencionais, lipossomas são apresentados como uma solução; já que são biocompatíveis e biodegradáveis. Sua propriedade anfílica permite que carregue moléculas hidrofílicas e hidrofóbicas; ou mesmo ambas ao mesmo tempo. Graças à característica da bicamada, são compatíveis com a superfície da pele, o que permite aprimorar a penetração de compostos bioativos. Além disso, são vantajosos por serem produzidos com componentes naturais (AGUILAR-PÉREZ et al., 2020; SERCOMBE et al., 2015).

No campo médico, há estudos de lipossomas aplicados como sistemas de *delivery* de enzimas, fármacos e hormônios. Dentre os aprovados comercialmente, é possível citar: AmBisome®, um lipossoma unilamelar, contendo o fármaco hidrofóbico anfotericina B, utilizado para o tratamento de infecções fúngicas; Doxil® - o primeiro lipossoma aprovado nos Estados Unidos – funcionalizado com PEG e contendo doxorubicina encapsulada, para o tratamento de câncer de ovário. Ainda assim, potenciais áreas de desenvolvimento incluem *drug delivery*, tratamento de câncer e terapia de gene. Eles também podem encapsular agentes de contraste para o uso em diagnóstico por imagem, como raio-X e ressonância magnética nuclear (MAHERANI et al., 2011; RATNER et al., 2013).

Para sua aplicação como curativo, o fármaco precisa ser entregue pelos lipossomas no local desejado com alta concentração e, de preferência, com liberação lenta ou sustentada. Assim, uma formulação eficiente precisa conter o máximo de fármaco encapsulado no interior do lipossoma, limitado vazamento durante o armazenamento e circulação sistêmica, e liberação efetiva no local desejado (ELOY et al., 2014).

A metodologia mais comumente empregada no preparo de lipossomas é a hidratação de filmes finos, ou método Bangham (BANGHAM; STANDISH; WATKINS, 1965). Este envolve a dissolução dos lipídios, e demais componentes lipossolúveis, em fase orgânica; com subsequente remoção do solvente via evaporação. Ao final, o filme lipídico formado é hidratado com um meio aquoso. Desta forma, produz vesículas

multilamelares, na escala dos micrômetros, e são empregados passos adicionais para a redução de tamanho (AGUILAR-PÉREZ et al., 2020; ELOY et al., 2014; MAHERANI et al., 2011).

Apesar do método de filmes finos ser bastante empregado, com o uso do fármaco dissolvido em fase aquosa, este apresenta problemas quando se tratam de substâncias que possuem alta solubilidade em água. Lipossomas com fármacos hidrofílicos apresentam baixa eficiência de encapsulação, porque uma grande quantidade do material permanece no meio aquoso, externo ao lipossoma. Uma vez que estes fármacos possuem alta solubilidade no meio aquoso durante a preparação do lipossoma, a tendência é que boa parte continue no meio externo, pois seu volume é muito maior quando comparado ao volume aquoso encapsulado no interior do lipossoma (ELOY et al., 2014).

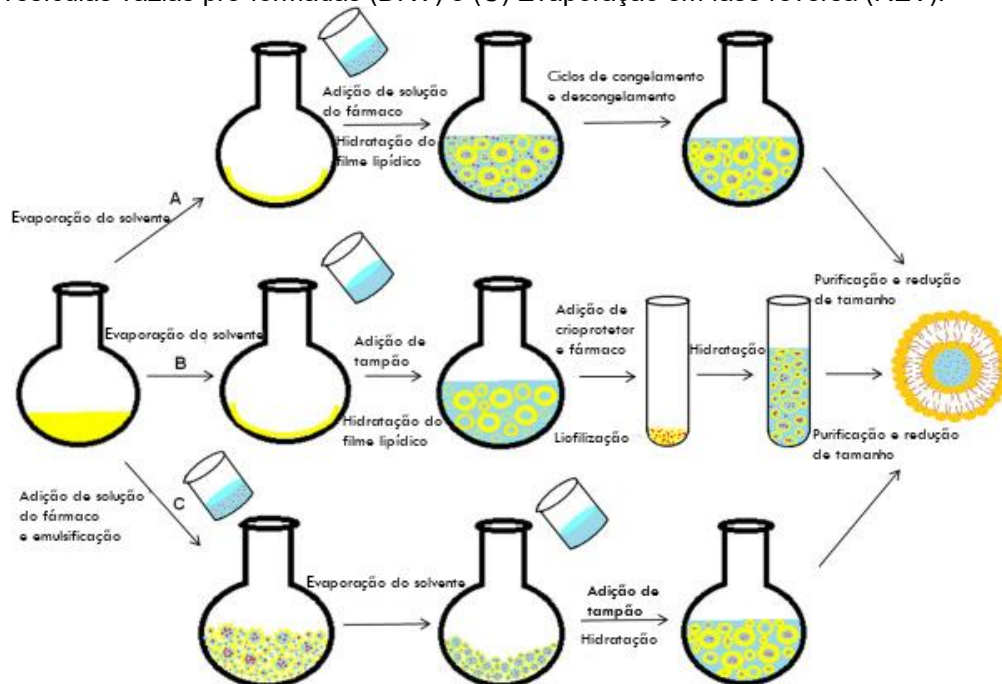
Na literatura são descritos outros métodos de produção de lipossomas para aumentar a eficiência de encapsulação, como ciclos de congelamento / descongelamento (*freeze-thaw*) (COSTA; XU; BURGESS, 2014; MAYER et al., 1985), evaporação de fase reversa (REV) (SZOKA; PAPAHAADJOPOULOS, 1978; ZHANG et al., 2012) e desidratação-reidratação de vesículas vazia pré-formadas (DRV) (ELOY et al., 2014; ZADI; GREGORIADIS, 2000).

Vários ciclos de congelamento e descongelamento causam a quebra da bicamada lipídica do lipossoma, através da formação de cristais durante o processo de congelamento; o que gera um aumento da razão entre soluto aquoso e lipídeo, aumentando a eficiência de encapsulação. Já no método REV, produz-se uma emulsão contendo fases orgânica e aquosa, com evaporação do solvente orgânico na sequência, hidratação e formação dos lipossomas. Por fim, os lipossomas preparados pelo método DRV são aqueles com alta razão fármaco/lipídeo, armazenados no estado liofilizado e reidratados antes do uso (ELOY et al., 2014). Essas três formas de encapsular substância hidrofílica estão resumidas graficamente na Figura 7.

Um parâmetro importante na avaliação da qualidade dos lipossomas formados é a polidispersividade. Conceitualmente, o termo descreve o grau de não uniformidade de uma distribuição de tamanho de partículas. Assim, o índice de polidispersividade é um parâmetro adimensional que pode ser menor que 0,05 para padrões altamente monodispersos. O tamanho de partícula e índice de polidispersividade do lipossoma são propriedades que podem afetar desempenho, processabilidade e estabilidade. Essas propriedades também estão relacionadas à eficiência de encapsulação e ao

perfil de liberação de fármaco. No que se refere à aplicação de agentes terapêuticos na pele, os mecanismos de carreamento de fármacos também dependem de fatores como composição química, carga superficial e número de lamelas (DANAELI et al., 2018).

Figura 7 – Métodos para encapsulação de fármacos hidrofílicos: formação de filmes finos seguidos de (A) ciclos de congelamento e descongelamento; (B) Desidratação-reidratação de vesículas vazias pré-formadas (DRV) e (C) Evaporação em fase reversa (REV).



Fonte: Adaptado de ELOY et al., 2014.

### 3.3 Feridas e características necessárias para os curativos

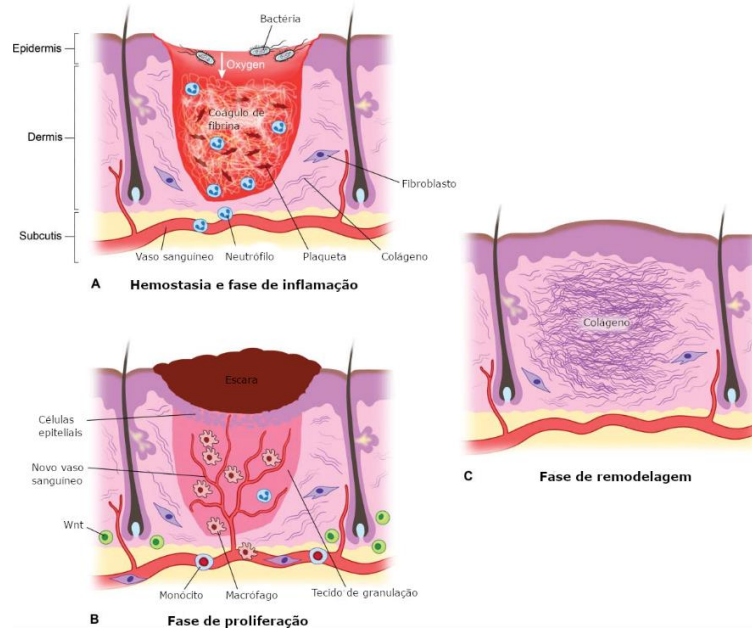
De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), queimaduras são um problema de saúde pública mundial devido a sua alta incidência e onerosidade que trazem ao sistema de saúde. Lesões na pele como estas podem levar à desfiguração em consequência do processo de cicatrização; além da dor e consequências emocionais (LIMA JUNIOR et al., 2008; (WHO), 2018).

O processo de cicatrização de feridas como as provocadas por queimaduras na pele é complexo; diferentes células são ativadas durante as fases que se sobrepõem: hemostasia e inflamação, proliferação e remodelagem. A inflamação é caracterizada pela grande quantidade de neutrófilos e macrófagos. Na proliferação, há grande concentração de fibroblastos para formação da nova matriz tecidual e síntese de colágeno. Por fim, na remodelagem, há a restauração do tônus do tecido e



da elasticidade (BRASSOLATTI et al., 2018; NICULESCU; GRUMEZESCU, 2022). Na Figura 8, estão ilustradas as fases da cicatrização.

Figura 8 – Fases da cicatrização: (a) Inflamação. (b) Proliferação (c) Remodelagem.



Fonte: Adaptado de (HOUSCHYAR et al., 2015).

Dentre as formas de classificação existentes, uma delas divide as feridas entre agudas e crônicas, dependendo do tempo e da natureza do processo de restauração. Enquanto uma ferida aguda pode ser curada completamente num período de 8 a 12 semanas, com mínima formação de cicatriz e sem auxílio externo, as crônicas falham nesse quesito, necessitando de um longo tempo de recuperação e podendo levar a restauração incompleta da função e da estrutura da pele. Essas necessitam de um cuidado especial, pois não curam espontaneamente; possuem potencial agravante que pode levar a amputação ou mesmo a óbito (NICULESCU; GRUMEZESCU, 2022).

Em feridas crônicas, podem existir complicações durante o processo de cicatrização. Com isso, ocorrem grandes mudanças fisiológicas que levam à produção excessiva de exsudatos e à contaminação do local. No caso dos pacientes com queimaduras este problema é crítico, devido a seu sistema imunológico já afetado e à complexidade do ferimento. Além disso, fármacos aplicados via oral tendem a gerar mais efeitos colaterais devido à disseminação pelos vários tecidos do corpo, com variação dos níveis concentração, ou à baixa adesão no intervalo de doses. O uso tópico da celulose bacteriana é conhecido para este fim; muitos estudos comprovam

sua eficácia na melhora da cicatrização de feridas crônicas e queimaduras (ALEXANDER et al., 2012; JORFI; FOSTER, 2015; SULAEVA et al., 2015).

Um fator que sofre alterações durante os processos de infecção e cicatrização da pele é o pH. A pele saudável e intacta apresenta pH ácido, variando de 4,0 a 6,0. Quando uma ferida ocorre, a barreira física promovida pela pele é rompida, chegando ao pH 7,4. Um pH básico é favorável para o crescimento epitelial, porém também favorece o crescimento microbiano e infecções. Mudanças fisiológicas como essas podem levar a contaminação por espécies bacterianas, induzindo respostas inflamatórias. Fato que ocorre principalmente em feridas crônicas. Como por exemplo, sabe-se que mais do que 50% das úlceras crônicas em diabéticos tornam-se infectadas (JONES; COCHRANE; PERCIVAL, 2015; SULAEVA et al., 2015).

Uma característica esperada em curativos é sua capacidade em remover exsudatos, tanto em sua aplicação como no momento de sua retirada. A fim de se evitar traumas devido a retirada de materiais que aderem à ferida, é essencial que o curativo proteja o local sem agarrar-se à pele. Característica essa presente na celulose bacteriana, o que a faz material potencial para aplicação no campo biomédico e cosmético (FU; ZHANG; YANG, 2013; SULAEVA et al., 2015).

Tendo em vista as necessidades explicitadas, os curativos podem ser categorizados de acordo com o tempo (temporário ou permanente) e em relação a natureza de ação: inertes, interativos ou bioativos. Os mais conhecidos tradicionalmente, como gaze e algodão, são considerados curativos inertes; pois funcionam apenas como barreira protetiva, não apresentando nenhuma interação com a ferida. Apesar de suas desvantagens, são os mais baratos e de fácil fabricação (NICULESCU; GRUMEZESCU, 2022).

Já os curativos interativos podem auxiliar nos estágios do processo de cicatrização e influenciar a regeneração da área danificada: promovendo o desbridamento, aumentando a granulação e reepitelização; bem como reduzindo os níveis de exsudatos e de colonização de bactérias. Entre esses, estão os hidrocoloides, alginatos, colágeno, hidrogéis e filmes semipermeáveis. Por fim, curativos são tidos como bioativos quando, além das características de um interativo, liberam moléculas encapsuladas a fim de aprimorar a cicatrização (ANDREU et al., 2015; NICULESCU; GRUMEZESCU, 2022).

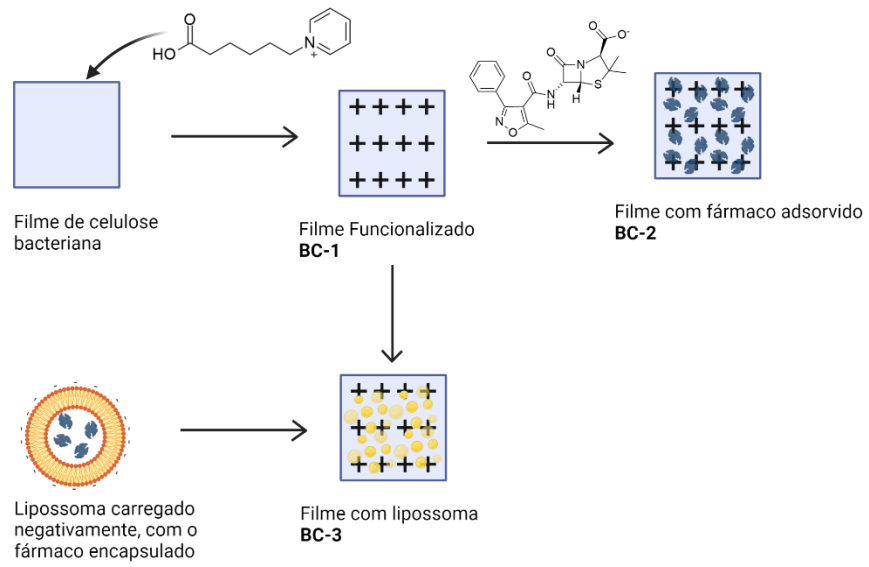
Atualmente, há uma grande variedade de curativos, aplicados tanto na forma seca como úmida. Os curativos secos mais comumente encontrados na literatura são:

Xeroform® (gaze impregnada com blenda de petrolato), Scarlet Red® e Jelonet® (curativo de tela de algodão parafinada). Enquanto os úmidos são representados por: Kaltostat® (curativo de alginato de cálcio e sódio), Opsite® (curativo formado por uma película de poliuretano coberta com adesivo acrílico), Duoderm® (curativo adesivo hidrocoloide), e Allevyn® (curativo hidrofílico a base de poliuretano). Por outro lado, a celulose bacteriana, bem como produtos a base do material, já são aplicados comercialmente como curativos. A exemplo dos produtos: Dermafill™, BASYC® e Gengiflex® - produto brasileiro (PLACKETT et al., 2014; PORTELA et al., 2019; VOINESKOS et al., 2009).

### 3.4 Planejamento do trabalho

Para tornar a celulose bacteriana um curativo com característica bioativa, pretende-se preparar um filme contendo o antibiótico oxacilina. No processo para que haja a complexação, adsorção da oxacilina, é necessária uma modificação na superfície da membrana. Uma vez que, a oxacilina é um antibiótico com carga negativa. Diante do exposto até aqui, foi selecionado o ácido 6-piridinohexanoico para promover a modificação química do filme de celulose bacteriana, através da esterificação, tornando sua superfície carregada positivamente (filme **BC-1**). Para melhorar processos de adsorção do fármaco aniônico no filme, duas formulações foram propostas: uma com a oxacilina adsorvida diretamente na celulose bacteriana (filme **BC-2**), e outra encapsulando a oxacilina em lipossomas (filme **BC-3**). Para tal, preparou-se uma formulação lipossomal composta de: colesterol, fosfatidilcolina e DOPG (responsável por lhe conferir carga negativa); contendo o fármaco hidrofílico encapsulado em seu interior. Um resumo da estratégia utilizada é apresentado na Figura 9.

Figura 9 - Estratégia proposta para modificar o filme de celulose bacteriana afim de lhe conferir características antimicrobianas.

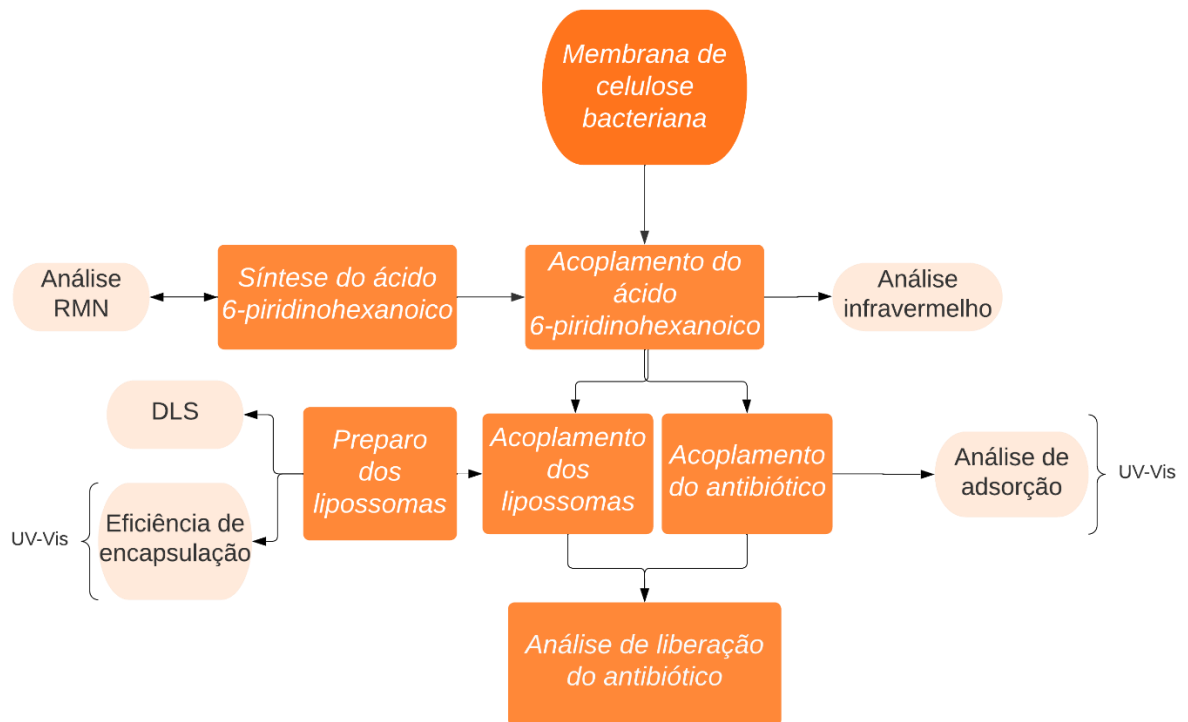


Fonte: Autoria própria, 2022.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

O fluxograma apresentado na Figura 10 resume os processos envolvidos no trabalho, que são detalhados na sequência.

Figura 10 – Fluxograma de atividades.



Fonte: Autoria própria, 2022.

### 4.1 Materiais

Para o desenvolvimento experimental, foi utilizada celulose bacteriana (Figura 11) produzida por fermentação da bactéria *Gluconacetobacter xylinus*, cedida pelo Dr. Cesar Augusto Tischer da Universidade Estadual de Londrina – UEL.

Figura 11 – Celulose bacteriana produzida por fermentação.



Fonte: Autoria própria, 2020.

#### 4.1.2 Solventes e reagentes

Para as sínteses e demais procedimentos experimentais foram utilizados os reagentes: ácido 6-bromohexanoico, dimetilaminopiridina (DMAP), diisopropilcarbodiimida (DIC) e oxacilina, adquiridos na empresa Sigma-Aldrich. Os solventes piridina (P.A.), acetato de etila (99,5%), hidróxido de sódio, clorofórmio (99,8%), etanol, diclorometano (99,5%) e dimetilformamida (DMF, 99,8%), na Synth. Enquanto os lipídios utilizados, na Lipoid. A dimetilformamida foi seca em peneiras moleculares (3 Å) por 48 horas conforme Williams & Lawton, 2010. A água destilada foi produzida por osmose reversa na UTFPR-Londrina.

#### 4.1.3 Solução tampão

A solução de tampão fosfato que foi utilizada em diversos experimentos tinha concentração de 0,05 mol/L e pH 7,4. Para tanto, foram adicionados 2,527 g de fosfato de sódio dibásico heptahidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) e 0,424 g fosfato de sódio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) em um béquer de 250 mL; juntamente com 200 mL de água destilada. Os reagentes foram solubilizados e o pH ajustado com solução de HCl (0,01 mol/L). Então o conteúdo foi transferido para um balão volumétrico de 250 mL, sendo o volume completado com água destilada.

## 4.2 Métodos analíticos

### 4.2.1 Espectroscopia por absorção no infravermelho

Os espectros vibracionais na região do infravermelho das amostras foram obtidos utilizando o equipamento da PerkinELMER®, modelo Spectrum II, acoplado com acessório de reflectância total atenuada (ATR/FTIR). As análises se procederam no intervalo de 4000  $\text{cm}^{-1}$  a 400  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

### 4.2.2 Espectroscopia de absorção no ultravioleta

As medidas de absorção foram conduzidas no espectrofotômetro UV-VIS Biochrom Libra S60 do laboratório de multiusuários da UTFPR (LabMult-LD), câmpus Londrina, com varredura espectral na faixa de 200 nm a 900 nm.

### 4.2.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros foram realizados no ASCEND 400 marca Bruker, operando a 100,6 MHz para carbono ( $^{13}\text{C}$ ) e 400 MHz para hidrogênio ( $^1\text{H}$ ), em solvente  $\text{D}_2\text{O}$ , usando uma sonda direta de 5 mm, BBo, a 25 °C. A análise foi expressa em ppm e calibrada de acordo com o sinal de solvente residual por deslocamentos químicos ( $\delta$ ).

### 4.2.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Os cromatogramas foram obtidos utilizando o equipamento UHPLC UltiMate 3000 (Thermo Scientific), *software* Chromeleon, do Departamento de Química da UTFPR, câmpus Londrina. Utilizou-se cromatográfica C18 Phenomenex de fase reversa, com dimensões de 250 x 4,6 mm. A injeção da amostra foi de 10  $\mu\text{L}$ , com fluxo de 400  $\mu\text{L}/\text{min}$ . O tempo total de análise foi de 15 minutos, por amostra. A fase móvel era composta por 50% de acetonitrila e 50% de água.

#### 4.2.5 Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

As micrografias foram obtidas utilizando o microscópio eletrônico de varredura (TESCAN, VEGA 4) do laboratório de multiusuários da UTFPR (LabMult-LD), câmpus Londrina. Operando no modo de resolução a 30 – kV, com distância de trabalho de 4,2  $\mu\text{m}$ . As amostras do filme seco foram colocadas no porta amostra com fita de carbono condutora.

#### 4.3 Síntese do ácido 6-piridinohexanoico

Em um balão volumétrico de 25 mL foram inseridos 1,73 g (8,89 mmol) de ácido 6-bromohexanoico e 1,8 mL de piridina. Os reagentes foram colocados em um banho de glicerol a 90 °C e deixados por 4 horas, sob agitação magnética, para formação do ácido 6-piridinohexanoico. Findo o tempo, o precipitado foi lavado com acetato de etila e filtrado a vácuo, com rendimento de quantitativo, na forma de um sólido amarelado.

RMN  $^1\text{H}$  (440 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  - 1,31 (m, 2H), 1,58 (m, 2H), 1,99 (m, 2H), 2,30 (t, 2H), 4,57 (t, 2H), 8,01 (t, 2H), 8,49 (t, 1H), 8,81 (d, 2H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  – 23,74, 24,68, 30,15, 33,88, 61,64, 128,22, 144,18, 145,55, 179,20.

#### 4.4 Acoplamento do ácido 6-piridinohexanoico no filme de celulose bacteriana

Nessa etapa utilizaram-se filmes de celulose bacteriana de, aproximadamente, 1,5 cm x 1,5 cm. Estes foram lavados por 5 min em mesa agitadora (60 rpm), realizando a troca de solventes, na sequência: 3 vezes em etanol e 2 vezes em diclorometano.

Os filmes previamente preparados, livres de água, foram dispostas num tubo de ensaio. Adicionaram-se ao tubo 75 mg de ácido 6-piridinohexanoico, juntamente com 17 mg de DMAP, 2 mL de DMF anidra e 43  $\mu\text{L}$  de DIC. Para que a reação ocorresse, o tubo de ensaio foi levado ao ultrassom, a 40 °C, por 2 horas.

Após a reação, os filmes (**BC-1**) foram lavados com DMF, sob agitação mecânica (60 rpm) durante cinco minutos. O processo foi repetido quatro vezes. Para finalizar, foi repetido o processo por uma vez com água destilada. A membrana foi



deixada para secar em um dessecador contendo sílica-gel como agente dessecante, e posteriormente guardada.

#### 4.5 Quantificação da funcionalização do filme de celulose bacteriana

Esta análise foi conduzida a fim de quantificar a extensão da funcionalização do filme **BC-1**. O filme foi hidrolisado e a quantificação se deu pela análise da concentração do sobrenadante, através do UV-Vis. Para tanto, 3,4 mg de ácido 6-piridinohexanoico foram dispostos num balão volumétrico de 25 mL, e seu conteúdo, completado com solução de NaOH (0,1 mol/L). Sendo essa a solução estoque.

A partir desta solução, foram preparadas outras soluções diluindo com a solução de NaOH num balão volumétrico de 5 mL. Foi construída uma curva de calibração utilizando as concentrações: 50 µmol/L, 40 µmol/L, 30 µmol/L, 20 µmol/L e 10 µmol/L.

Mediu-se a absorvância das soluções entre 200 nm e 500 nm, de forma a verificar o pico da absorvância da amostra. A curva foi montada com os valores de absorvância no UV-Vis em 260 nm, comprimento de onda no qual o ácido possui maior absorvância; sendo a solução de NaOH utilizada como branco para a análise.

Em um tubo de ensaio foi colocado um filme **BC-1**, de 7,0 mg, juntamente com 1 mL de solução de NaOH (0,1 mol/L). Levou-se ao ultrassom, onde permaneceu por duas horas. Após esse tempo, o filme foi retirado do tubo e a solução sobrenadante, diluída para análise no UV-Vis. Para a diluição utilizou-se 50 µL da solução em um balão volumétrico de 5 mL, completando o volume com solução de NaOH (0,1 mol/L). A concentração da solução foi verificada através da curva de calibração obtida.

Então o grau de substituição foi calculado usando a concentração de entrada do ácido na solução de hidrólise, de acordo com a Equação 1:

$$\text{Grau de substituição} = \frac{n_{\text{ácido}}}{n_{\text{AGU}}} \times 100 \quad (1)$$

Em que  $n_{\text{ácido}}$  representa a quantidade de matéria do ácido 6-piridinohexanoico existente na solução e  $n_{\text{AGU}}$ , a quantidade de matéria do filme analisado, expresso em unidades de glicose anidra (160 g/mol).

#### 4.6 Curva de calibração padrão de oxacilina

A fim de auxiliar nas análises de absorção e liberação da oxacilina, foram produzidas duas curvas de calibração padrão: uma em água destilada e outra em tampão fosfato.

Primeiro, preparou-se uma solução estoque de 10 mL, com concentração de 1 mmol/L de oxacilina. A partir desta, foram preparadas novas soluções com as respectivas concentrações, 10 $\mu$ mol/L, 40 $\mu$ mol/L, 70 $\mu$ mol/L, 110 $\mu$ mol/L e 150 $\mu$ mol/L. Os pontos da curva foram determinados a partir dos valores de absorbância no UV-Vis de cada concentração em 225 nm, comprimento de onda de máxima absorbância da oxacilina. O branco utilizado foi o próprio solvente de cada curva em questão: água destilada ou tampão fosfato.

#### 4.7 Adsorção de oxacilina pelas membranas modificadas

Para esta etapa foi preparada uma solução de 1 mmol/L de oxacilina (441,43 g/mol). Desta forma, 4,4 mg do fármaco foi disposto num balão volumétrico de 10 mL e o volume, completado com água destilada.

Os filmes (1,5 cm x 1,5 cm) do grupo controle foram lavados apenas em água destilada e imersos na solução de antibiótico, num béquer de 50 mL. Ambos béqueres foram vedados com Parafilm<sup>®</sup> e mantidos sob agitação mecânica (60 rpm), por 24h.

Após esse tempo, os filmes (**BC-2**) foram removidos das soluções e lavados com água destilada, de forma que o produto da lavagem caísse sobre a solução inicial. A soma solução e lavagem foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL, completando seu volume com água destilada.

Dessa solução, foram retirados 750  $\mu$ L e diluído com água destilada até completar 5 mL em balão volumétrico. Todo procedimento foi realizado para as duas soluções. E a análise de cada solução foi realizada em triplicata.

O antibiótico adsorvido foi determinado por absorção no UV-Vis, no comprimento de onda de 225 nm; sendo água destilada utilizada como branco. O percentual (m/m) foi calculado levando em consideração a massa de oxacilina adsorvida e a massa do filme seco utilizado, conforme Equação 2:

$$\text{Percentual (m/m)} = \frac{m_1}{m_2} \times 100 \quad (2)$$

Em que  $m_1$  é a massa do fármaco adsorvido e  $m_2$  é a massa total do filme seco.

#### 4.8 Preparo dos lipossomas

O método utilizado foi por filme lipídico seguido de ultrassonificação (CHENG et al., 2017; HAERI et al., 2013). Este foi produzido utilizando fosfatidilcolina de soja (SPC), sal de sódio 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-[fosfo-rac-(1-glicerol)] (DOPG-Na) e colesterol (6:2:2). Primeiro, montaram-se soluções estoque em clorofórmio dos componentes. Para SPC e DOPG, misturou-se 25 mg de composto com 0,5 mL de clorofórmio, formando soluções estoque de 64 e 63 mmol/L, respectivamente. A solução estoque de colesterol foi preparada com concentração de 10 mmol/L.

Em seguida foram misturados 18  $\mu$ L da solução de SPC, 6  $\mu$ L de DOPG e 40  $\mu$ L de colesterol (de forma a ter a proporção de concentração 6:2:2) em um balão volumétrico de 25 mL. O preparo foi realizado duas vezes, a fim de formar lipossomas com fármaco e sem, para controle. A solução foi levada ao evaporador rotativo (55 °C), por 5 minutos; de modo a formar o filme lipídico na parede do balão volumétrico.

O filme seco foi hidratado com 2 mL de solução correspondente: solução de oxacilina em água destilada (1 mmol/L) e solução tampão, para os lipossomas controle. Levou-se ao ultrassom por 1 min, e foram adicionadas gotas de solução de HCl (0,1 M) para acidificar a solução (até pH 3,0).

Os lipossomas obtidos foram então levados ao homogeneizador ultrassônico (QSonica, Q500), durante o processo de sonificação foi utilizado uma frequência de 20 kHz a 500W e com 30 % de amplitude. Foram realizados 10 ciclos de 1 min de agitação com 1 min de descanso sob banho de gelo.

##### 4.8.1 Análise por espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

O tamanho médio e potencial zeta dos lipossomas formulados foram analisados por espalhamento dinâmico de luz (DLS), no analisador de tamanho de partículas Litesizer 500, ANTON PAAR, a temperatura ambiente; do Laboratório Multiusuários do câmpus Londrina (LabMult-LD). Para as medidas utilizou-se 0,5 mL de amostra e

0,5 mL de água ultrapura, a fim de atingir ao menos 60 % de transmitância. Todas as análises foram feitas em triplicata.

#### 4.8.2 Análise da eficiência de encapsulação

O teste de eficiência de encapsulação do fármaco pelos lipossomas foi realizado pela técnica de ultrafiltração/ultracentrifugação. Uma alíquota de 400 µL da amostra foi transferida para uma unidade de filtro e foi submetida a uma ultracentrifugação, a 13000 rpm, por 1 hora. A quantidade de amostra que permeou o filtro foi quantificada utilizando espectrofotometria de UV-Vis em 225 nm. Na qual, utilizou-se água destilada como branco.

A concentração analisada foi medida com auxílio da curva de calibração. O cálculo de eficiência foi realizado através da Equação 3:

$$\% \text{ encapsulada} = \frac{C_i - C_x}{C_i} \times 100 \quad (3)$$

Em que  $C_i$  e  $C_x$  representam, respectivamente, as concentrações iniciais e a analisada.

### 4.9 Adsorção dos lipossomas ao filme modificado de celulose bacteriana

Um filme de celulose bacteriana modificado com ácido 6-piridinohexanoico foi imerso em 4,5 mL de solução contendo os lipossomas, num vial bem vedado. Este foi mantido sob agitação mecânica (60 rpm), por 24 h.

Após esse tempo, o filme (**BC-3**) foi removido da solução e guardado num dessecador. Da solução restante, pegou-se 0,25 mL e diluiu-se para 5 mL com água destilada; para ser analisada no HPLC. Os cálculos foram feitos de acordo com a curva de calibração.

#### 4.9.1 Análise da adsorção dos lipossomas

Uma vez que a solução restante da adsorção dos lipossomas na amostra (filme **BC-3**) possuía lipídeos, não foi possível quantificá-la no UV-Vis. Esta análise foi

realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), num equipamento com UV-Vis acoplado.

A curva de calibração foi construída a partir da diluição da solução de oxacilina em água destilada (1 mmol/L). Foram utilizadas concentrações de: 125  $\mu\text{mol/L}$ , 62,5  $\mu\text{mol/L}$ , 31,25  $\mu\text{mol/L}$ , 15,625  $\mu\text{mol/L}$  e 7,8125  $\mu\text{mol/L}$ . Sendo caracterizada pelo espectro de absorção no ultravioleta, no comprimento de 225 nm. O percentual de antibiótico adsorvido foi calculado da mesma forma que descrito na seção 4.7.

#### **4.10 Análise de permeação de fármaco**

Para a análise de permeação do fármaco por uma membrana de porosidade conhecida foi montado um aparato que consiste em um cilindro de 1 mL de capacidade, com uma das extremidades aberta, cuja área de permeação é de, aproximadamente 1,13  $\text{cm}^2$ .

Colocou-se 1 mL de solução de oxacilina (1 mmol/L) em tampão fosfato (pH 7,4 0,05 M) no cilindro, sendo preso à extremidade uma membrana recortada a partir de um saco de diálise (Spectrapore®, 1000 Da ou 1,3 nm de tamanho de poros para exclusão molecular). O cilindro com a membrana para permeação foi submerso em 15 mL de solução tampão, num béquer de 25 mL; tomando o cuidado para a face com a membrana de diálise ficasse voltada para baixo, de modo a propiciar a permeação. A análise foi mantida sob agitação magnética.

Com o auxílio de uma seringa, foram retiradas alíquotas de 1 mL do compartimento receptor nos intervalos de tempo de: 5, 15, 30 minutos; 1, 2, 3, 4, 5, 6 horas. Essas eram levadas à análise e retornadas ao sistema logo em seguida. As alíquotas retiradas foram analisadas no UV-Vis (em 225 nm). O ensaio foi realizado em triplicata.

#### **4.11 Ensaio de liberação de fármaco**

O mesmo aparato descrito na sessão 3.9 também foi utilizado para avaliar a liberação do fármaco contido nas membranas **BC-2** e **BC-3**. Para tal, foi selecionado um filme de cada amostra e dividido em três, de modo a realizar a análise em triplicata. Analisou-se uma amostra por vez.

Aferiu-se a massa do filme a ser utilizado a fim de calcular a quantidade de fármaco existente, de acordo com o percentual adsorvido.

Assim, o filme fracionado foi colocado dentro do cilindro e o volume, preenchido com solução tampão. A extremidade do cilindro foi vedada com a membrana retirada do saco de diálise e este foi submerso em 15 mL de solução tampão.

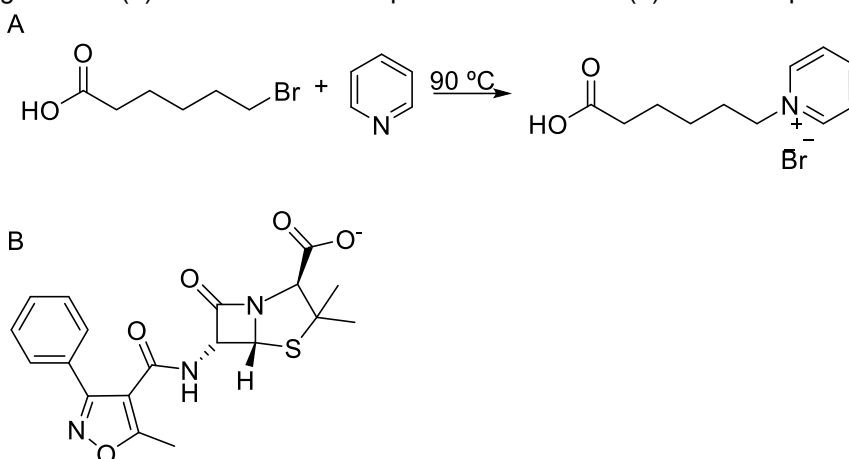
Com o auxílio de uma seringa, foram retiradas alíquotas de 1 mL do compartimento receptor nos intervalos de tempo de: 5, 15, 30 minutos; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24, 30, 49 e 54 horas. Essas eram levadas à análise e retornadas ao sistema logo em seguida. As alíquotas retiradas foram analisadas no UV-Vis (em 225 nm). Uma vez que o lipossoma é uma estratégia de liberação controlada, para a análise do filme **BC-3**, fez-se necessário o uso de análises em intervalos de tempo maiores: 5, 15, 30 minutos; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24, 30, 102, 126, 150 e 174 horas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Formação do ácido 6-piridinohexanoico

O caminho escolhido para conferir propriedades antimicrobianas à celulose bacteriana foi a adsorção de antibiótico em sua superfície. Para isso, considerando que o antibiótico utilizado é uma molécula aniônica – oxacilina (Figura 12.b), faz-se necessário modificar a superfície da celulose com cargas positivas. A formação do ácido 6-piridinohexanoico foi possível através da reação de substituição nucleofílica do bromo na molécula do ácido 6-bromoexanoico pelo nitrogênio da piridina, na qual os reagentes foram aquecidos a 90 °C. Conforme esquematizado na Figura 12.a.

Figura 12 – (a) Síntese do ácido 6-piridinohexanoico e (b) estrutura química da oxacilina.



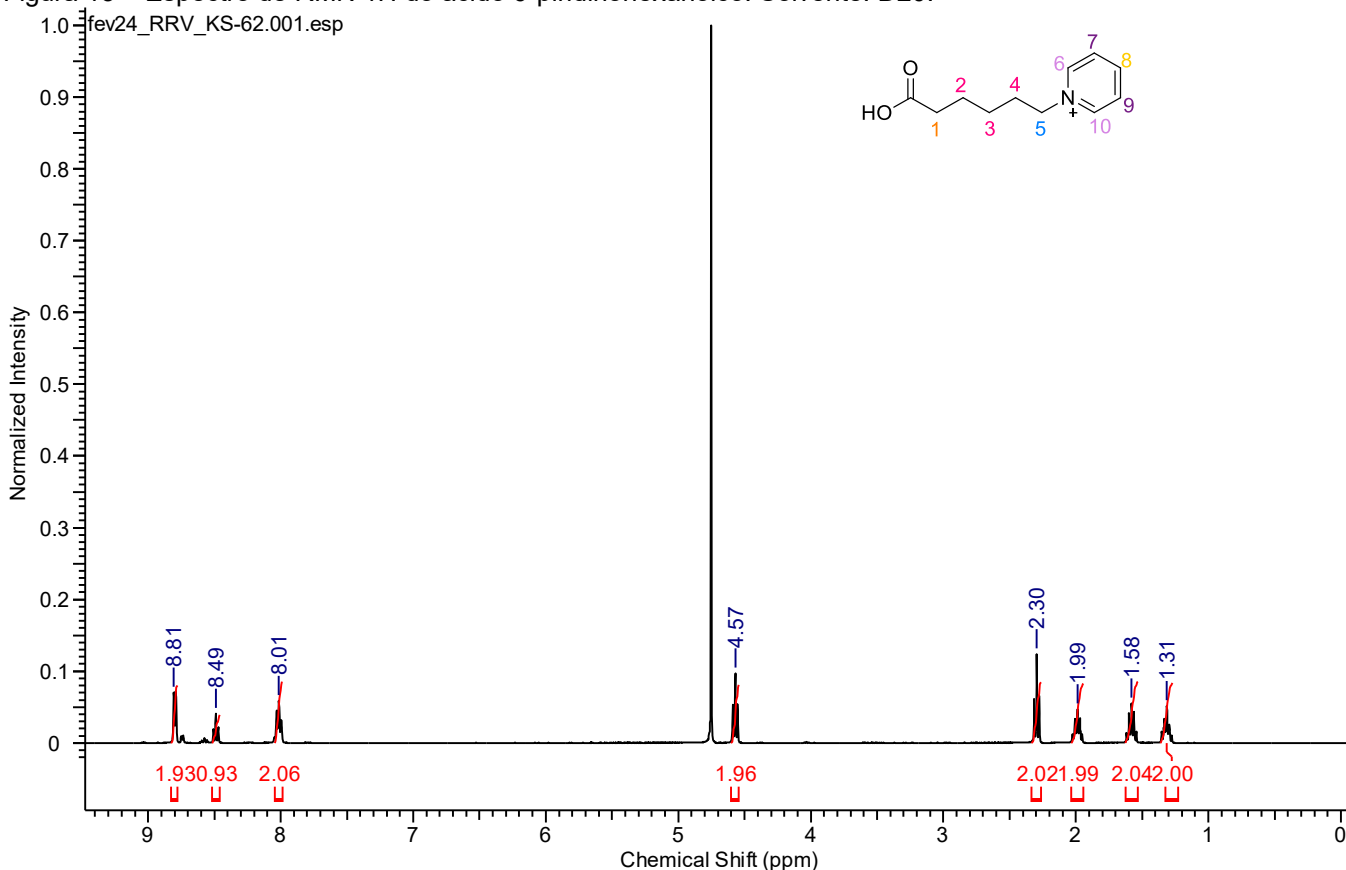
Fonte: Autoria própria, 2021.

Após o período de reação e resfriamento da mistura reagente, o produto foi lavado com acetato de etila e filtrado a vácuo. A formação da molécula foi confirmada por análise em RMN de  $^1\text{H}$ . Na Figura 13 é apresentado o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do ácido 6-piridinohexanoico.

Pelo espectro, notam-se três multipletos entre 1,31 ppm e 1,99 ppm, com integrais igual a dois hidrogênios, referentes aos três metilenos centrais da cadeia de carbono (H-3, H-2 e H-4, respectivamente). Em 2,30 ppm há um tripleto, integrando para 2 hidrogênios, referente ao metileno vizinho à carboxila (H-1). O tripleto existente em 4,57 ppm está relacionado aos dois hidrogênios do grupo metila vizinho ao nitrogênio (H-5). O tripleto em 8,01 ppm, com integral igual a dois, relaciona-se aos dois hidrogênios *meta* do anel aromático (H-7, H-9). Enquanto o tripleto em 8,49, com

integral igual a um, está relacionado ao hidrogênio *para* do anel (H-8). Por fim, o duplete em 8,81 ppm, que possui integral igual a dois, é relacionado aos dois hidrogênios *orto* do anel piridínico (H-6, H-10). Confirmando, assim, a formação do sal de amônio quaternário derivado do ácido hexanoico.

Figura 13 – Espectro de RMN 1H do ácido 6-piridinohexanoico. Solvente: D2O.

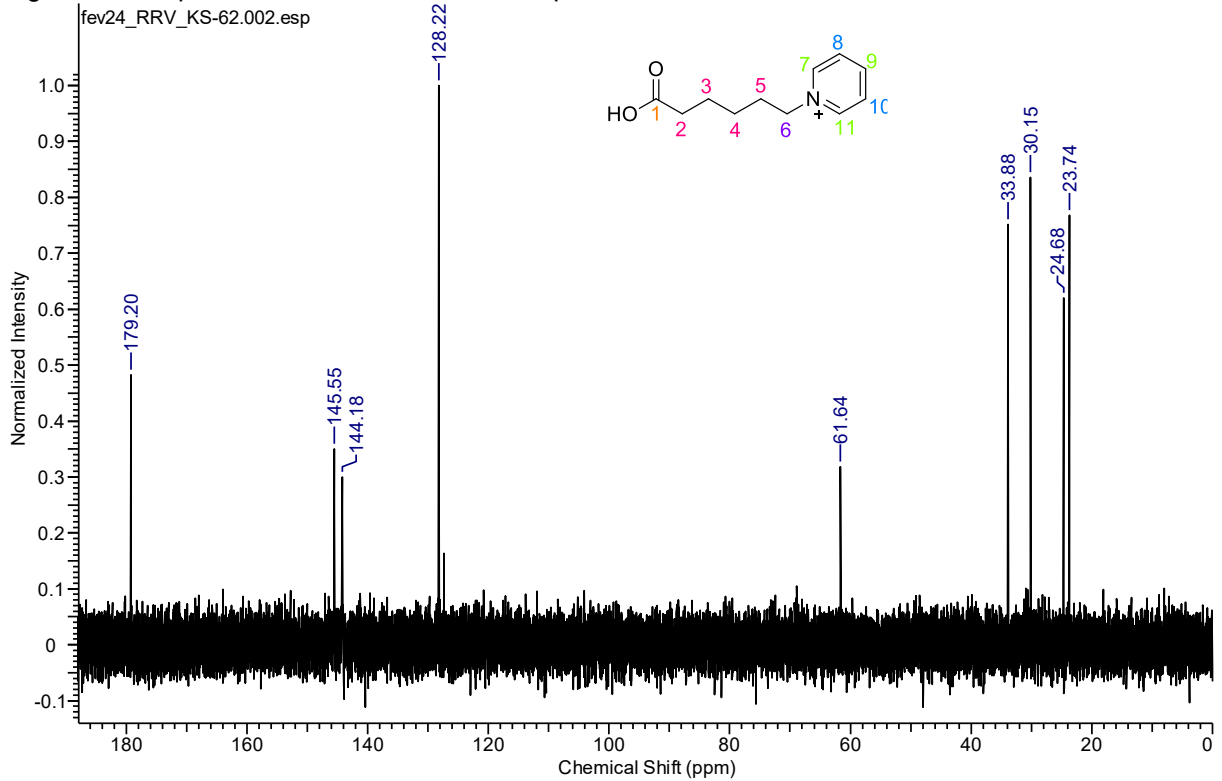


Fonte: Autoria própria, 2022.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , apresentado na Figura 14, corrobora com o sucesso da reação. Pelo espectro é possível observar os picos entre 23,74 ppm e 33,88 ppm são referentes aos carbonos centrais da cadeia, sendo a sequência: C-3, C-4, C-5 e C-2. Em 61,64 ppm tem-se o carbono mais próximo ao hidrogênio (C-6). Na sequência, há os picos do anel piridínico, sendo o pico em 128,22 ppm referente aos carbonos *meta* (C-8, C-10). Os picos em 144,18 ppm e 145,55 ppm referem-se aos demais carbonos do anel (C-7, C-9, C-11). Já o pico em 179,20 é referente ao carbono da carboxila (C-1).



Figura 14 – Espectro de RMN 13C do ácido 6-piridinohexanoico. Solvente: D2O.

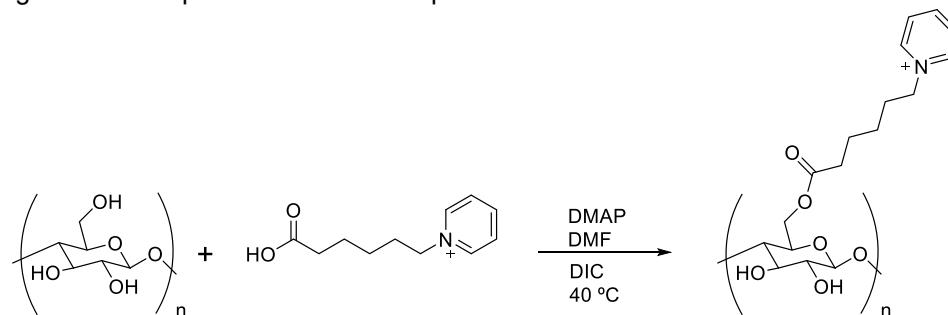


Fonte: Autoria própria, 2022.

## 5.2 Acoplamento do ácido 6-piridinohexanoico no filme celulósico

A modificação superficial da membrana deu-se através da reação de esterificação (Figura 15). Por ser realizada em fase heterogênea, é importante o uso do ultrassom, a fim de aumentar o contato efetivo entre as duas fases e garantir o sucesso da reação química. Bolhas de cavitação formadas próximas ou na superfície sólida colapsam, formando um jato de alta pressão, que força o contato entre os elementos (MASON, 1997; RIBEIRO-VIANA; FARIA-TISCHER; TISCHER, 2016).

Figura 15 – Acoplamento do ácido 6-piridinohexanoico.



Fonte: Autoria própria, 2021.

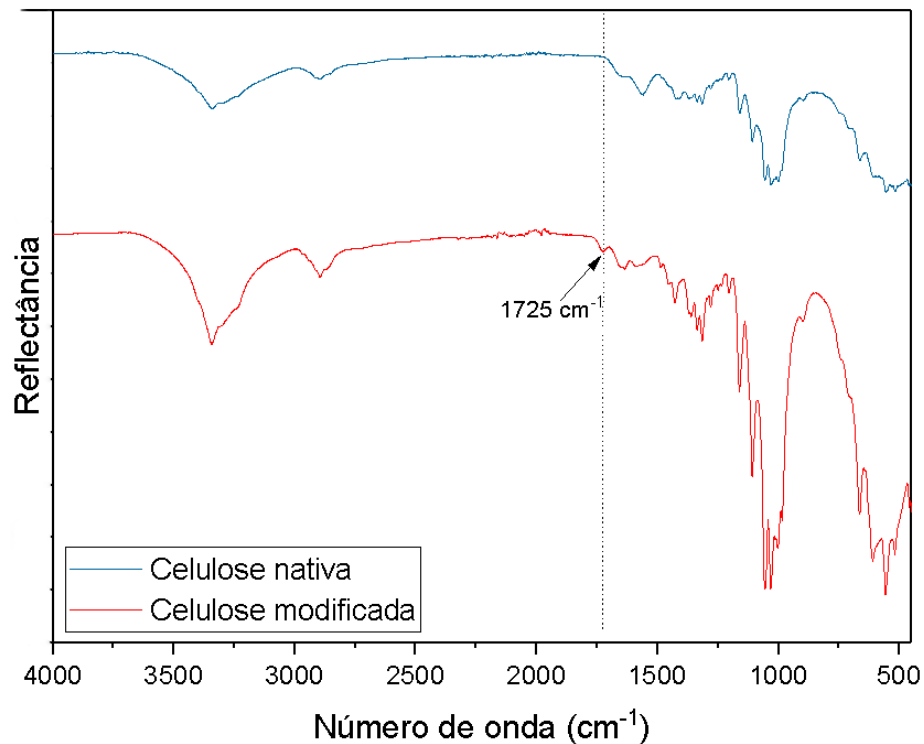
A escolha do solvente em reações orgânicas também é um fator que requer atenção. O processo de interação da celulose com solventes apróticos tende a ser mais simples se comparado com próticos, porque o solvente age como acceptor da ligação de hidrogênio. É importante que o solvente seja capaz de dissolver o sal em questão, sem atacar a carbonila ativada, entrando em competição com a reação (FARIA-TISCHER; RIBEIRO-VIANA; TISCHER, 2019; FIDALE et al., 2008).

A própria hidroxila da celulose representa um desafio para que a reação ocorra. Muitas vezes é utilizada uma base forte ou um eletrófilo mais forte. Além disso, ressalta-se a importância do uso de solvente anidro e da ausência de água na reação; pois essa pode hidrolisar o reagente, prevenindo a esterificação da celulose. Nessa reação, utilizou-se como solvente DMF anidra, por ser um solvente polar e aprótico; DIC foi utilizado como ativador da carbonila e DMAP como catalizador nucleofílico/base (FARIA-TISCHER; RIBEIRO-VIANA; TISCHER, 2019).

O acoplamento do ácido foi confirmado pela análise de espectroscopia no infravermelho, com espectro mostrado na Figura 16. A presença da banda em  $1725\text{ cm}^{-1}$ , típica da carbonila de éster ( $\text{C}=\text{O}$ ), confirma o sucesso da reação de esterificação com o ácido 6-piridinohexanoico, na superfície do filme celulósico. A banda em  $3345\text{ cm}^{-1}$  indica a presença de hidroxilas, enquanto a banda em  $2895\text{ cm}^{-1}$ , a presença de grupos alcanos alifáticos. Já a banda em  $1031\text{ cm}^{-1}$  deve-se a presença de C-O.

Ressalta-se que o filme foi analisado após a lavagem e, portanto, na ausência do agente de acoplamento DIC. Dessa forma, a banda de C-O observada não indica a molécula simplesmente adsorvida.

Figura 16 – Espectros de infravermelho da celulose nativa (superior) e do ácido 6-piridinohexanoico acoplado à celulose bacteriana (inferior).



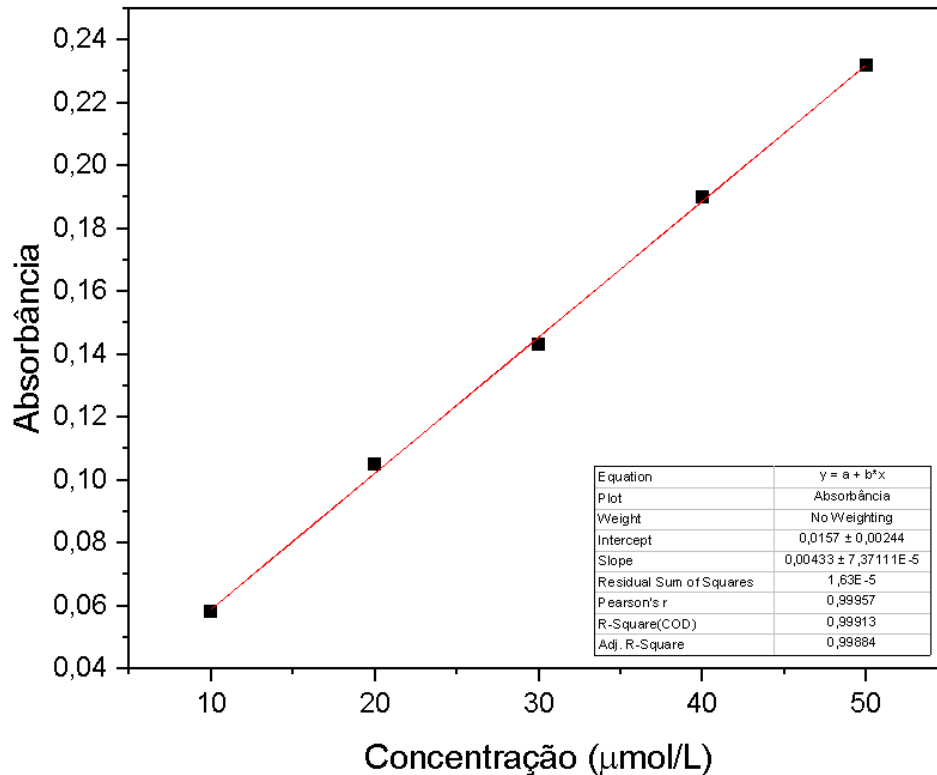
Fonte: Autoria própria, 2022.

### 5.3 Quantificação da funcionalização do filme de celulose bacteriana

A quantificação da extensão da funcionalização do filme foi calculada tendo como base a concentração molar de ácido 6-piridinohexanoico existente na solução alcalina obtida da hidrólise do grupo éster. Empregou-se a curva de calibração da Figura 17 como referência, cuja equação é  $y = 0,0157 + 0,00433x$  e linearidade  $R^2 = 0,99957$ . Utilizaram-se soluções entre 10  $\mu\text{mol/L}$  e 50  $\mu\text{mol/L}$  e seus valores de absorvância em 260 nm.

A análise da concentração da solução obtida a partir da hidrólise de **BC-1** foi feita a partir curva de calibração. A média de concentração da solução foi 530  $\mu\text{mol/L}$ , o que corresponde a 0,53  $\mu\text{mol}$  de ácido 6-piridinohexanoico obtidos da hidrólise das ligações éster presentes no filme. Como este possuía 43,75 mmol de unidades de glicose anidra (AGU), isso corresponde a funcionalização de 1,21% em relação ao número de mols de AGU ou duas moléculas de ácido a cada 100 unidades de glicose.

Figura 17 – Curva de calibração padrão da solução de ácido 6-piridinohexanoico em NaOH.



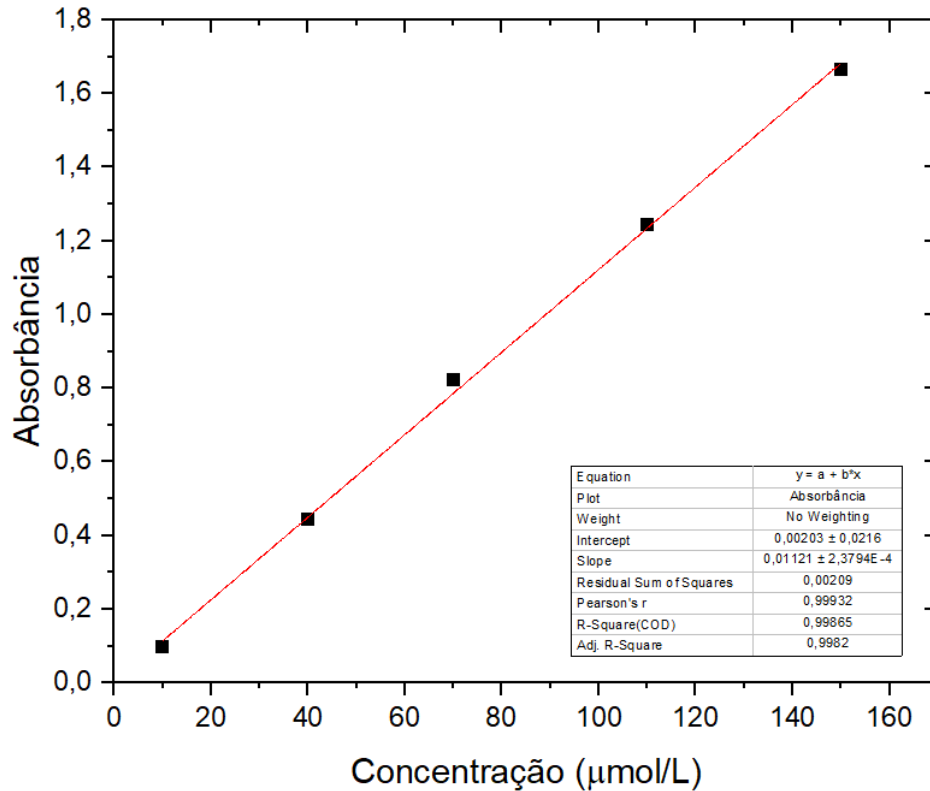
Fonte: Autoria própria, 2021.

#### 5.4 Avaliação da capacidade de adsorção de oxacilina no filme BC-2

A quantificação de adsorção do fármaco baseou-se na diferença entre a quantidade restante do antibiótico no sobrenadante e a quantidade teórica existente, analisada por espectrofotometria no ultravioleta visível quando um filme modificado era submerso em uma solução de oxacilina (**BC-2**). Para tal, construiu-se uma curva de calibração padrão de oxacilina em água destilada, utilizando 5 concentrações diferentes.

Assim, montou-se a Figura 18, baseada nas concentrações e seus valores de absorbância em 225 nm, tendo como branco da análise, água destilada.

Figura 18 – Curva de calibração padrão de solução de oxacilina em água destilada.



Fonte: Autoria própria, 2021.

Os dados comparativos entre o filme de celulose bacteriana natural e o modificado (**BC-2**) estão resumidos na Tabela 1. Após tempo de adsorção, o fármaco existente no sobrenadante foi quantificado tendo como base o valor da absorbância em 225 nm e a curva de calibração.

Tabela 1 – Resultados da análise de absorção no UV-Vis do sobrenadante.

	Filme BC-2	Filme controle
Média da absorbância em 225 nm	1,614	1,880
Desvio padrão	0,0644	0,00529
Concentração da solução	143,77 µmol/L	167,53 µmol/L
Percentual de oxacilina adsorvido	14,2 %	0 %
Quantidade de oxacilina presente no filme (média)	6,81 % (m/m) / 702 µg	0 % (m/m) / 0 g
Desvio padrão	0,018 / 0,0019	-

Fonte: Autoria própria, 2021.

Ao analisar a razão entre a concentração de fármaco existente na solução contendo a membrana modificada e o teórico, tem-se 85,8 %. Ou seja, as membranas absorveram 14,2 % do fármaco presente no meio.

Considerando a massa do filme seco (10,3 mg), tem-se a absorção de 6,81 % (m/m), ou 702 µg. Por outro lado, confirmando a hipótese da importância da

modificação superficial para adsorção iônica da oxacilina, identificaram-se que os filmes naturais não absorveram fármaco. Como pode ser observado na Figura 19, o filme com fármaco (**BC-2**) se apresenta mais esbranquiçado do que a amostra nativa.

Figura 19 – À esquerda, membranas nativas de celulose, que estiveram em contato com a oxacilina; à direita, membranas modificadas, que absorveram oxacilina.

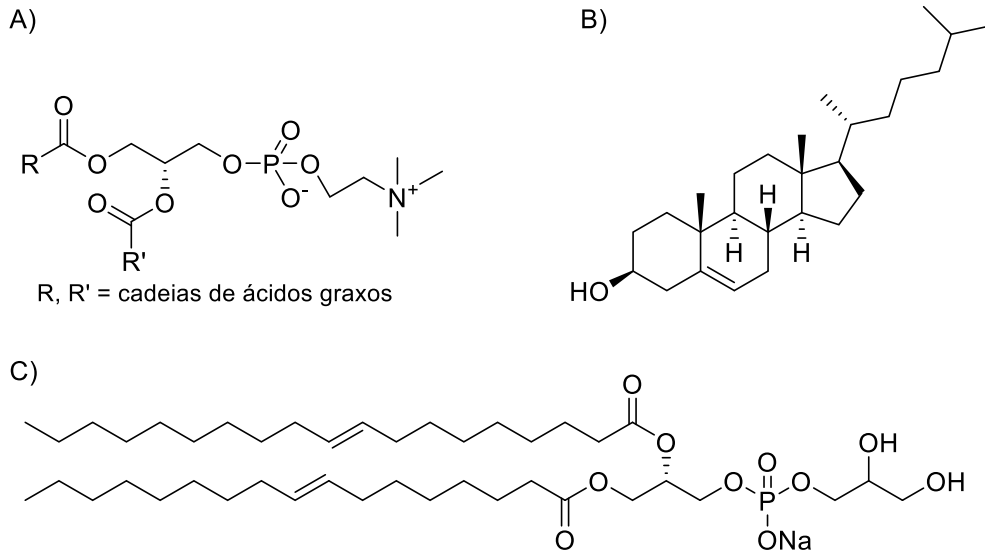


Fonte: Autoria própria, 2021.

## 5.5 Análise dos lipossomas

Produziram-se lipossomas contendo SPC, DOPG e colesterol (cujas estruturas químicas estão esquematizadas na Figura 20), na proporção de 6:2:2, na presença e ausência de fármaco. O colesterol é inserido na formulação para aumentar a estabilidade e minimizar trocas entre os fosfolipídios; assim como a troca entre moléculas biológicas (células sanguíneas e proteínas) (SERCOMBE et al., 2015). Os lipossomas foram preparados com DOPG para que apresentem carga negativa e interajam com o filme modificado (**BC-1**, catiônico).

Figura 20 – Estruturas químicas dos compostos utilizados. A) SPC B) Colesterol C) DOPG.



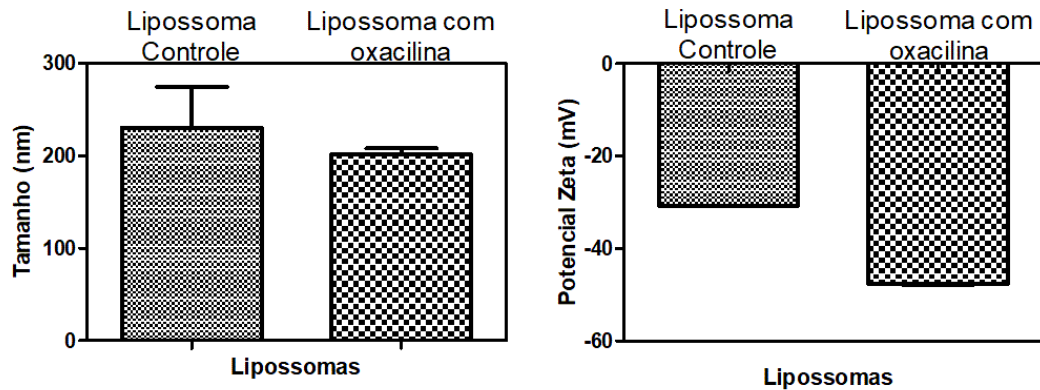
Fonte: Autoria própria, 2021.

Ambas formulações foram analisadas por espalhamento dinâmico de luz (DLS), a fim de verificar o tamanho e potencial zeta dos lipossomas. Na Figura 21, estão os valores médios de cada análise bem como sua variação.

As formulações apresentaram lipossomas com tamanhos próximos: 230,4 nm para os lipossomas controle e 201,7 nm para os contendo oxacilina; sendo que os lipossomas controle apresentaram maior variação entre as medidas. Já o potencial zeta médio resultante foi de -30,7 mV para a formulação controle e -47,6 mV para os contendo oxacilina; isso porque o fármaco em questão também é aniônico, o que fez com que aumentasse o valor negativo.

Os valores negativos do potencial zeta confirmam que foram preparados lipossomas com carga negativa conforme desejado. Isso é necessário para promover a interação dos lipossomas com o filme quimicamente modificado, que agora possui carga positiva; garantindo assim sua adsorção na superfície do filme.

Figura 21 – Tamanho médio de partícula e potencial zeta dos lipossomas controle e com fármaco.



Fonte: Autoria própria, 2021.

A primeira tentativa de preparar os lipossomas foi pelo método de filmes finos, com evaporação a temperatura ambiente e utilizando extrusão para diminuir o tamanho dos lipossomas formados. Como a oxacilina é um fármaco hidrofílico, somado ao fato de ambos (lipossoma e fármaco) serem aniônicos, foi mais difícil encapsulá-la. Essa tentativa resultou numa eficiência de encapsulação de 4,56 %.

A fim de aumentar a eficiência de encapsulação da oxacilina nos lipossomas, tentou-se colocar um passo a mais no procedimento: após 1 minuto de Vortex, a suspensão foi levada ao ultrassom por 30 minutos, e seguiu-se com o procedimento de extrusão. Isso resultou em lipossomas com 1,21 % de encapsulação.

Outras metodologias de produção de lipossomas também foram testadas, como os ciclos de congelamento/descongelamento (*freeze-thaw*) e evaporação de fase reversa (REV) (ELOY et al., 2014). Ainda assim, em nenhuma atingiu-se eficiência de encapsulação maior do que 5 %. O resultado satisfatório foi alcançado com a metodologia descrita na seção 4, envolvendo a acidificação da solução e ultrassonificação, que é descrito em maiores detalhes na sequência.

Ao acidificar a solução a um valor próximo ao do pKa do ácido carboxílico da molécula, aumenta a concentração sua forma protonada na solução. Com isso, há um aumento no valor do logP da molécula. Moléculas com valores maiores de logP tendem a ficar na fase orgânica e, no caso, serem incorporadas pelo lipossoma. Para a oxacilina, o valor do logP é de 2,35. Dessa forma, a metodologia acionada por pH mostra-se como uma solução para o caso de encapsular moléculas hidrofílicas (CHENG et al., 2017; DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2014).



A curva de calibração padrão do fármaco solubilizado em água serviu como base para a análise da eficiência de encapsulação do lipossoma. Uma alíquota de 400  $\mu\text{L}$  do lipossoma contendo oxacilina foi colocada num eppendorf com filtro e centrifugada por uma hora. Pegou-se 300  $\mu\text{L}$  do filtrado diluiu-se para 5 mL, com água destilada para analisar sua absorvância no UV-Vis em 225 nm.

O resultado da absorvância da formulação diluída foi de 0,603. Através do cálculo das diluições, têm-se o valor da concentração analisada ( $C_x$ ): 893  $\mu\text{mol/L}$ . Também foi medida a absorvância da solução inicial ( $C_i$ ): 1118  $\mu\text{mol/L}$ . Assim, com a Equação 3, calculou-se a eficiência de encapsulação, como 20,1 %.

## 5.6 Avaliação da adsorção dos lipossomas ao filme

Diferente das análises anteriores, a solução resultante após retirada do filme continha mais componentes do que apenas a oxacilina. Como o comprimento de onda de maior absorvância do fármaco (225 nm) é inespecífico, os demais componentes dos lipossomas não adsorvido poderiam afetar na medida, resultando em uma absorvância maior que a real. Assim, estaria sendo calculada a quantidade total de componentes, em vez do total de oxacilina.

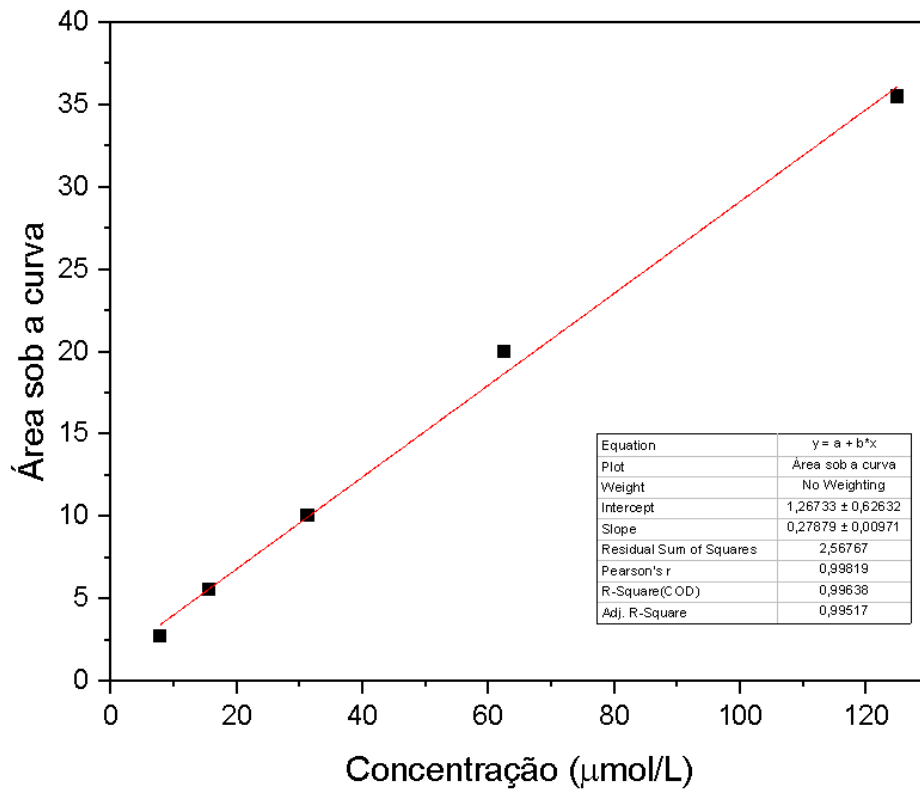
Dessa forma, não foi possível analisar diretamente a absorvância da solução por UV-vis. A estratégia utilizada então foi quantificar o fármaco através da cromatografia líquida de alta performance (HPLC), já que por esse método é possível separar as diferentes moléculas, uma vez que cada uma é detectada num tempo diferente durante a análise.

Para o cálculo da curva de calibração do padrão analítico de oxacilina utilizou-se as concentrações de: 125  $\mu\text{mol/L}$ , 62,5  $\mu\text{mol/L}$ , 31,25  $\mu\text{mol/L}$ , 15,625  $\mu\text{mol/L}$  e 7,8125  $\mu\text{mol/L}$ . O resultado foi a curva apresentada na Figura 22, cuja equação é  $y = 1,26733 + 0,27879x$  e  $R^2 = 0,99638$ . A concentração da solução resultante da análise de adsorção foi calculada a partir da área do pico no cromatograma (Figura 23). Para a análise pegou-se 150  $\mu\text{L}$  da solução e diluiu-se para 5 mL.

De acordo com a curva de calibração, a concentração da solução restante foi de 825,33  $\mu\text{mol/L}$ . Considerando a concentração da solução inicial como 1118  $\mu\text{mol/L}$ , o filme absorveu 26,2%. Como a massa do filme seco era de 3,6 mg tem-se 16,5% (m/m), ou 595,3  $\mu\text{g}$  de oxacilina.

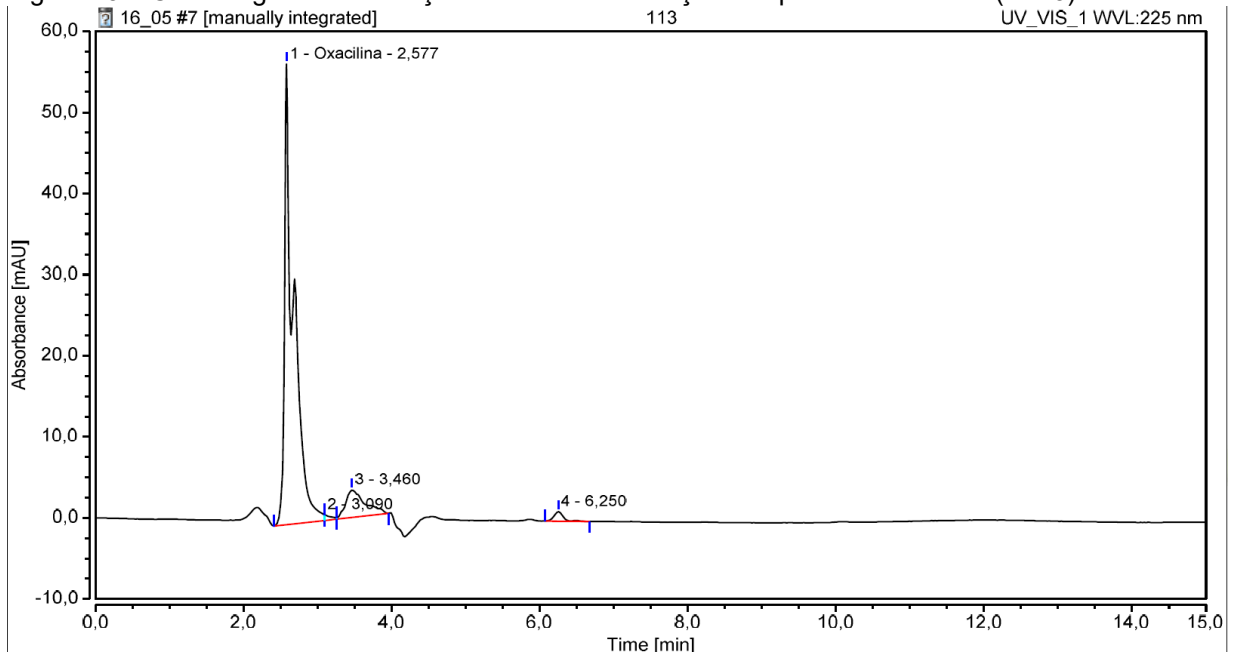
Dessa forma, ao comparar a adsorção direta do fármaco sobre o filme com a adsorção dos lipossomas com fármaco encapsulado, fica evidente o aumento da quantidade de oxacilina presente. É importante destacar que a solução lipossomal utilizada também possuía fármaco no meio externo aos lipossomas. De modo que o filme **BC-3**, possui tanto fármaco adsorvido diretamente em sua superfície como no interior dos lipossomas adsorvidos.

Figura 22 – Curva de calibração padrão de solução de oxacilina no HPLC.



Fonte: Autoria própria, 2022.

Figura 23 – Cromatograma da solução restante da adsorção do lipossoma no filme (BC-3).



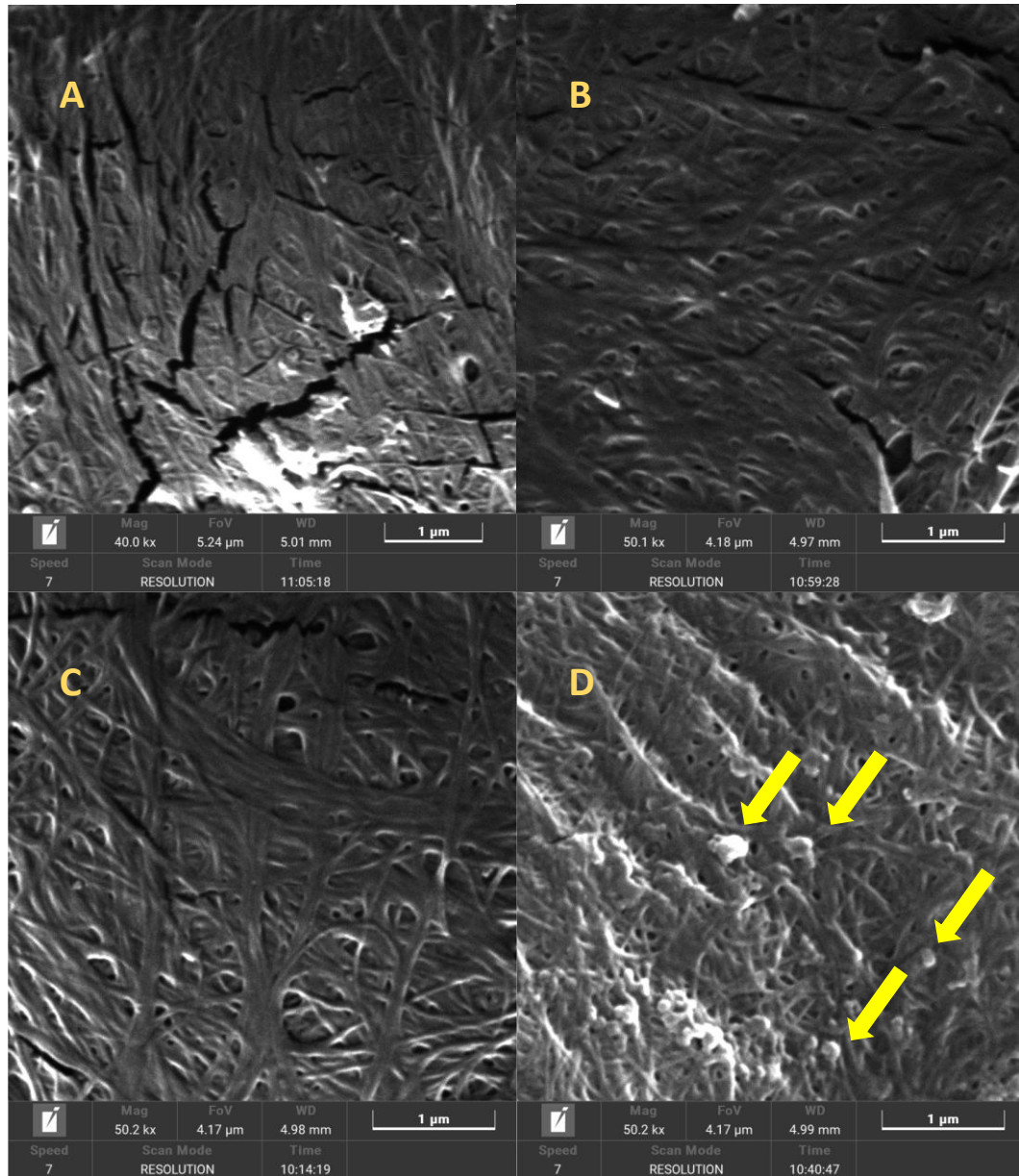
Fonte: Autoria própria, 2022.

## 5.7 Imagens do MEV

As imagens obtidas do MEV para cada um dos filmes estão reunidas na Figura 28, todas com aumento de 40000X. Nelas é possível observar as microfibrilas típicas da celulose bacteriana e que as reações de adsorção não provocam alterações na superfície da amostra (Figura 24-B). A relação de aspecto observada das microfibrilas de todas amostras mostraram-se muito semelhantes indicando a pouca alteração das mesmas.

Além disso, se observa na imagem de microscopia dos filmes contendo lipossomas (Figura 24 – D) a presença de pequenas vesículas brancas (indicadas por setas amarelas). Estas tiveram seus tamanhos medidos e forneceram valores entre 167 a 298 nm, com uma média de 226 nm, próximas aos valores medidos pela técnica de DLS, assim também confirmando sua incorporação no filme modificado.

Figura 24 – Micrografia (MEV) dos filmes de celulose bacteriana modificados e não modificados, com aumento de 40000X. (a) Filme nativo. (b) Filme **BC-1**. (c) Filme **BC-2**. (d) Filme **BC-3**.

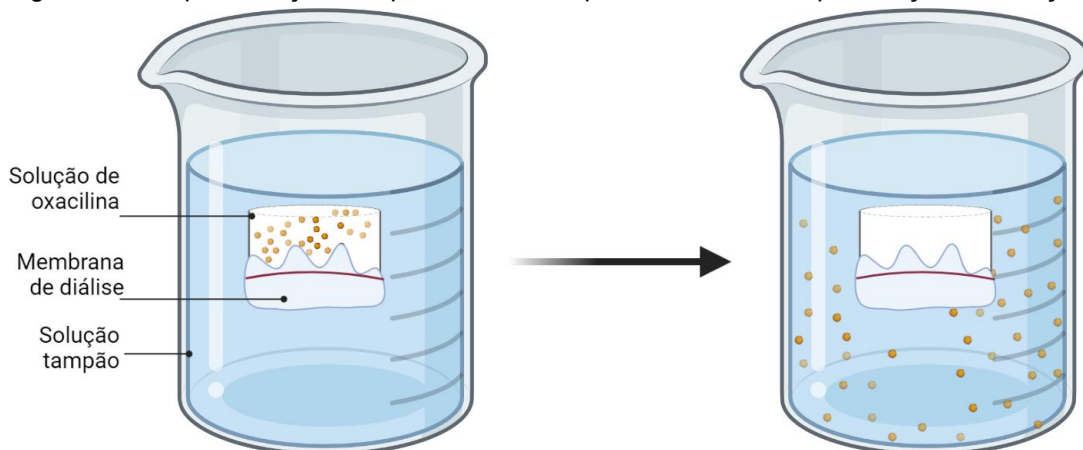


Fonte: Autoria própria, 2022.

## 5.8 Análise da permeação

Inicialmente, o ensaio foi realizado apenas com solução de oxacilina em tampão fosfato para avaliar seu tempo de permeação através de uma membrana de porosidade conhecida. Utilizou-se uma solução com concentração de 1 mmol/L, que foi inserida no cilindro, conforme aparato esquematizado na Figura 25.

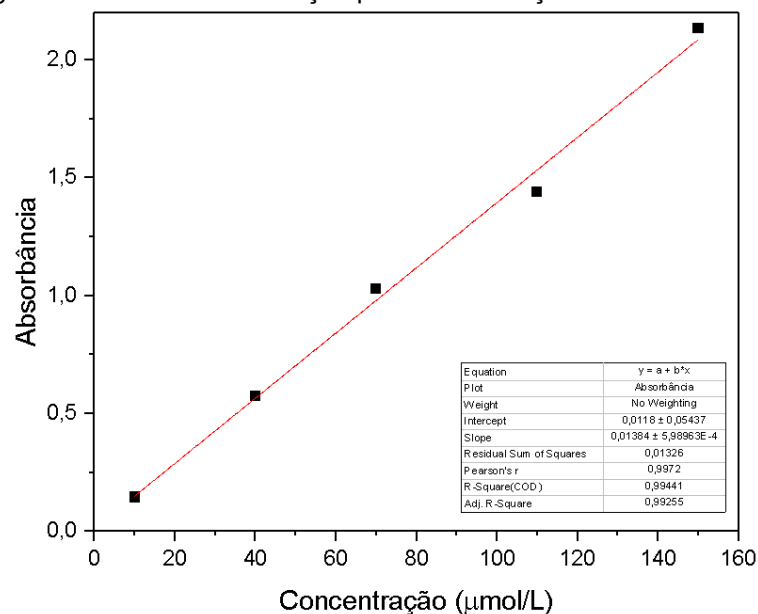
Figura 25 – Representação do aparato montado para os ensaios de permeação e liberação.



Fonte: Autoria própria, 2022.

A permeação do fármaco foi quantificada utilizando a absorbância no UV-Vis. (225 nm) de cada alíquota e a curva de calibração da oxacilina em solução tampão. Para o cálculo da concentração da alíquota, utilizou-se a curva padrão da Figura 26 cuja equação é  $y = 0,0118 + 0,01384x$  e  $R^2 = 0,9972$ .

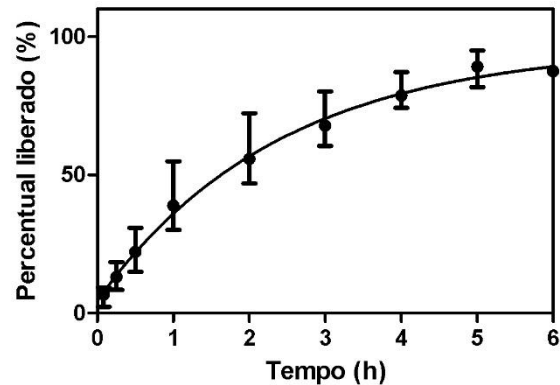
Figura 26 – Curva de calibração padrão de solução de oxacilina em solução tampão.



Fonte: Autoria própria, 2021.

O valor da concentração foi convertido para o percentual em relação a solução inicial e a curva com o percentual permeado em relação ao tempo de ensaio é apresentada na Figura 27. Através dela, observa-se que metade da concentração inicial atravessa a membrana em cerca de duas horas, levando seis horas para que se atinja a totalidade.

Figura 27 – Percentual de oxacilina permeado com o tempo.



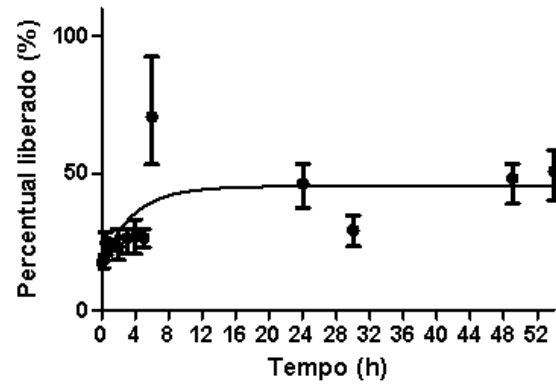
Fonte: Autoria própria, 2022.

### 5.9 Ensaio de liberação

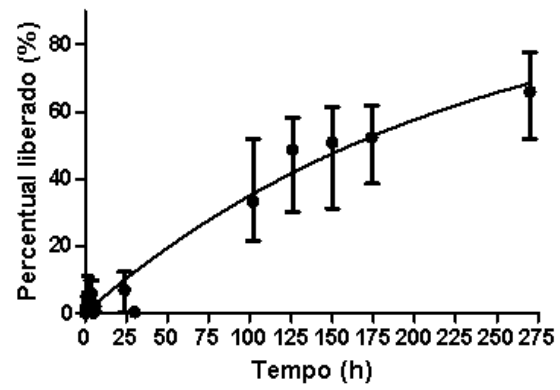
O ensaio de liberação do fármaco contido nos filmes **BC-2** e **BC-3** foi realizado no mesmo aparato apresentado para a permeação. Assim como procedeu-se com os cálculos para montar as curvas. Ambos ensaios foram feitos com um filme dividido em três partes, para triplicata. A curva do percentual de fármaco liberado *versus* o tempo para o filme **BC-2** é apresentada na Figura 28, enquanto para o **BC-3**, na Figura 29.

A liberação do filme **BC-2** começa com um aumento linear até que atinge o platô em 12 horas. Se comparado à permeação da solução de oxacilina pura, é possível observar uma liberação mais lenta, uma vez que a solução pura permeia a membrana de análise em pouco tempo.

Já o filme **BC-3** não liberou fármaco nas primeiras 24 horas. Sendo visto sinal de liberação apenas quatro dias após o início do ensaio, alíquota de 102 horas. O filme permaneceu liberando fármaco lentamente por todo o período de 11 dias do ensaio. A média da máxima liberação atingida foi de 66%.

Figura 28 – Percentual de oxacilina liberado do filme **BC-2** com o tempo.

Fonte: Autoria própria, 2022.

Figura 29 – Percentual de oxacilina liberado do filme **BC-3** com o tempo.

Fonte: Autoria própria, 2022.

## 6 CONCLUSÃO

A modificação química dos filmes de celulose bacteriana permitiu que esses adsorvessem o antibiótico em sua estrutura e que este fosse liberado posteriormente, conferindo-lhe característica antimicrobiana desejada. O uso em conjunto do sistema lipossoma/antibiótico permitiu que essa liberação fosse mais lenta, na ordem de dias.

O filme foi esterificado com ácido 6-piridinohexanoico, apresentando substituição de 1,21 %. Produziram-se formulações lipossomais com tamanho de partícula adequado à sua aplicação e potencial zeta negativo, como desejado. Estas apresentaram eficiência de encapsulação satisfatória (20,1%).

Foram testadas duas formulações de filme: uma com adsorção direta do fármaco no filme (**BC-2**) e outra com adsorção de lipossomas contendo o fármaco encapsulado (**BC-3**). O filme **BC-2** adsorveu 6,81 % de oxacilina em relação a sua massa, enquanto o filme **BC-3**, adsorveu 16,5%.

Em relação à liberação do fármaco, o filme **BC-2** apresentou perfil exponencial, e mais lento que a permeação do fármaco livre. Por outro lado, o filme **BC-3** não liberou fármaco nas primeiras 24 horas, tendo liberação lenta a partir de então. E permaneceu liberando durante os 11 dias de ensaio, o que confirma o perfil de liberação controlada desejado.



## REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, C. M. et al. Natural biomaterials. **Introduction to Biomaterials**, p. 198–232, 11 fev. 2019.
- AGUILAR-PÉREZ, K. M. et al. Insight Into Nanoliposomes as Smart Nanocarriers for Greening the Twenty-First Century Biomedical Settings. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 1441, 15 dez. 2020.
- ALEXANDER, A. et al. **Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery**. **Journal of Controlled Release**, 28 nov. 2012. . Acesso em: 21 jun. 2020
- ANDREU, V. et al. Smart Dressings Based on Nanostructured Fibers Containing Natural Origin Antimicrobial, Anti-Inflammatory, and Regenerative Compounds. **Materials 2015, Vol. 8, Pages 5154-5193**, v. 8, n. 8, p. 5154–5193, 11 ago. 2015.
- BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **Journal of Molecular Biology**, v. 13, n. 1, p. 238-271, 1 ago. 1965.
- BRASSOLATTI, P. et al. Photobiomodulation and bacterial cellulose membrane in the treatment of third-degree burns in rats. **Journal of Tissue Viability**, v. 27, n. 4, p. 249–256, 1 nov. 2018.
- CHENG, C. et al. Improved bioavailability of curcumin in liposomes prepared using a pH-driven, organic solvent-free, easily scalable process. **RSC Advances**, v. 7, n. 42, p. 25978–25986, 15 maio 2017.
- CHERNG, J. H. et al. Bacterial Cellulose as a Potential Bio-Scaffold for Effective Re-Epithelialization Therapy. **Pharmaceutics 2021, Vol. 13, Page 1592**, v. 13, n. 10, p. 1592, 30 set. 2021.
- COSTA, A. P.; XU, X.; BURGESS, D. J. Freeze-anneal-thaw cycling of unilamellar liposomes: Effect on encapsulation efficiency. **Pharmaceutical Research**, v. 31, n. 1, p. 97–103, jan. 2014.
- DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. ILOGP: A simple, robust, and efficient description of n-octanol/water partition coefficient for drug design using the GB/SA approach. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 54, n. 12, p. 3284–3301, 22 dez. 2014.
- DANAEI, M. et al. **Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems**. **Pharmaceutics** MDPI AG, , 18 maio 2018. Disponível em: <[www.mdpi.com/journal/pharmaceutics](http://www.mdpi.com/journal/pharmaceutics)>. Acesso em: 25 maio. 2021
- DANG, Y.; GUAN, J. Nanoparticle-based drug delivery systems for cancer therapy. **Smart Materials in Medicine**, v. 1, p. 10–19, 1 jan. 2020.

- DONINI, Í. A. N. et al. Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Eclética Química**, v. 35, n. 4, p. 165–178, 2010.
- ELOY, J. O. et al. Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: Strategies to enhance encapsulation and delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 123, p. 345–363, 1 nov. 2014.
- FARIA-TISCHER, P. C. S.; RIBEIRO-VIANA, R. M.; TISCHER, C. A. Bio-based nanocomposites. Em: **Materials for Biomedical Engineering**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 205–244.
- FIDALE, L. C. et al. Cellulose swelling by aprotic and protic solvents: What are the similarities and differences? **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 209, n. 12, p. 1240–1254, 19 jun. 2008.
- FU, L.; ZHANG, J.; YANG, G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1432–1442, 15 fev. 2013.
- HAERI, A. et al. Sirolimus-loaded stealth colloidal systems attenuate neointimal hyperplasia after balloon injury: A comparison of phospholipid micelles and liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 455, n. 1–2, p. 320–330, 15 out. 2013.
- HASIRCI, V.; HASIRCI, N. Building Blocks of the Human Body. Em: **Fundamentals of Biomaterials**. New York, NY: Springer New York, 2018. p. 95–115.
- HODILLE, E. et al. The role of antibiotics in modulating virulence in staphylococcus aureus. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 4, p. 887–917, 1 out. 2017.
- HOSSEN, S. et al. Smart nanocarrier-based drug delivery systems for cancer therapy and toxicity studies: A review. **Journal of Advanced Research**, v. 15, p. 1–18, 1 jan. 2019.
- JONES, E. M.; COCHRANE, C. A.; PERCIVAL, S. L. The Effect of pH on the Extracellular Matrix and Biofilms. **Advances in Wound Care**, v. 4, n. 7, p. 431–439, jul. 2015.
- JORFI, M.; FOSTER, E. J. Recent advances in nanocellulose for biomedical applications. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 14, p. n/a-n/a, 10 abr. 2015.
- JOZALA, A. F. et al. Bacterial nanocellulose production and application: a 10-year overview. **Applied Microbiology and Biotechnology 2016 100:5**, v. 100, n. 5, p. 2063–2072, 8 jan. 2016.
- LIMA JUNIOR, E. M. et al. **Tratado de queimaduras no paciente agudo**. 2. ed. [s.l.] ATHENEU EDITORA, 2008.
- MAHERANI, B. et al. Liposomes: A Review of Manufacturing Techniques and Targeting Strategies. **Current Nanoscience**, v. 7, n. 3, p. 436–452, 2 maio 2011.
- MARESTONI, L. D. et al. Commercial and potential applications of bacterial cellulose in Brazil: ten years review. **Polímeros**, v. 30, n. 4, 23 abr. 2021.

- MASON, T. J. Ultrasound in synthetic organic chemistry. **Chemical Society Reviews**, v. 26, n. 6, p. 443–451, 1 jan. 1997.
- MAYER, L. D. et al. Solute distributions and trapping efficiencies observed in freeze-thawed multilamellar vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 817, n. 1, p. 193–196, 11 jul. 1985.
- NICULESCU, A. G.; GRUMEZESCU, A. M. An Up-to-Date Review of Biomaterials Application in Wound Management. **Polymers**, v. 14, n. 3, p. 1–24, 2022.
- PETERSEN, N.; GATENHOLM, P. Bacterial cellulose-based materials and medical devices: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology** 2011 91:5, v. 91, n. 5, p. 1277–1286, 9 jul. 2011.
- PLACKETT, D. et al. A review of nanocellulose as a novel vehicle for drug delivery. **Nordic Pulp & Paper Research Journal**, v. 29, n. 1, p. 105–118, 1 jan. 2014.
- PORTELA, R. et al. **Bacterial cellulose: a versatile biopolymer for wound dressing applications**. **Microbial Biotechnology** Microb Biotechnol, , 1 jul. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30838788/>>. Acesso em: 1 ago. 2021
- RATNER, B. D. et al. **Biomaterials Science**. [s.l.] Elsevier, 2013.
- RIBEIRO-VIANA, R. M.; FARIA-TISCHER, P. C. S.; TISCHER, C. A. Preparation of succinylated cellulose membranes for functionalization purposes. **Carbohydrate Polymers**, v. 148, p. 21–28, 5 set. 2016.
- ROY, D. et al. Cellulose modification by polymer grafting: A review. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 7, p. 2046–2064, 23 jun. 2009.
- SERCOMBE, L. et al. **Advances and challenges of liposome assisted drug delivery**. **Frontiers in Pharmacology** Frontiers, , 2015. . Acesso em: 18 jul. 2021
- SULAEVA, I. et al. **Bacterial cellulose as a material for wound treatment: Properties and modifications: A review**. **Biotechnology Advances** Elsevier Inc., , 1 dez. 2015. . Acesso em: 21 maio. 2020
- SULAEVA, I. et al. Fabrication of bacterial cellulose-based wound dressings with improved performance by impregnation with alginate. **Materials Science and Engineering: C**, v. 110, p. 110619, 1 maio 2020.
- SZOKA, F.; PAPAHAADJOPOULOS, D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 75, n. 9, p. 4194–4198, 1 set. 1978.
- TORGBO, S.; SUKYAI, P. Bacterial cellulose-based scaffold materials for bone tissue engineering. **Applied Materials Today**, v. 11, p. 34–49, 1 jun. 2018.
- TOSH, B.; ROUTRAY, C. R. Grafting of cellulose based materials: a review. **Chem Sci Rev Lett**, v. 3, n. 10, p. 74–92, 2014.

VAN HOOGEVEST, P. Review – An update on the use of oral phospholipid excipients. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 108, p. 1–12, 15 out. 2017.

VOINESKOS, S. H. et al. Systematic review of skin graft donor-site dressings. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 124, n. 1, p. 298–306, jul. 2009.

(WHO), W. H. O. **Facts about injuries: Burns**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/burns>>. Acesso em: 24 maio. 2020.

WILLIAMS, D. B. G.; LAWTON, M. Drying of organic solvents: Quantitative evaluation of the efficiency of several desiccants. **Journal of Organic Chemistry**, v. 75, n. 24, p. 8351–8354, 17 dez. 2010.

ZADI, B.; GREGORIADIS, G. A novel method for high-yield entrapment of solutes into small liposomes. **Journal of Liposome Research**, v. 10, n. 1, p. 73–80, 2000.

ZHANG, L. et al. The use of PEGylated liposomes to prolong the circulation lifetime of salvianolic acid B. **Fitoterapia**, v. 83, n. 4, p. 678–689, 1 jun. 2012.