

OBTENÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE E SUA APLICAÇÃO COMO BIOMATERIAL

ANANDA MORAIS BARBOSA¹; EDUARDO ROBLES²; JULIANA DA SILVA RIBEIRO³; RAFAEL GUERRA LUND⁴; JAEL LABIDI⁵; NEFTALI LENIN VILLARREAL CARREÑO⁶

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais (UFPel) – ananda.barbosa@ufpel.edu.br

²Programa de Doctorado en Ingeniería de Materiales Renovables (UPV/EHU) – jerobles001@ikasle.ehu.es

³Programa de Pós-Graduação em Odontologia (UFPel) – julianar.fo@ufpel.edu.br

⁴Programa de Pós-Graduação em Odontologia (UFPel) – rglund@ufpel.edu.br

⁵Programa de Doctorado en Ingeniería de Materiales Renovables (UPV/EHU) – jalel.labidi@ehu.es

⁶Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais (UFPel) – neftali@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A celulose é um dos polímeros naturais mais importantes, uma matéria-prima quase inesgotável. Fibras de celulose com tamanhos na ordem dos nanometros são materiais com características únicas e potencialmente úteis (KLEMM et al., 2011).

A celulose é abundante na natureza e pode ser obtida a partir de diversas fontes, tais como: madeira, algodão, cânhamo, linho, juta (ALILA et al., 2013) e também a partir de algas e bactérias (KLEMM et al., 2005). A celulose e seus derivados têm boa biocompatibilidade e, por isso, são utilizados em materiais para aplicações médicas (TOMMILA et al. 2013).

É crescente a necessidade por materiais funcionais. Neste sentido, a celulose, devido suas propriedades, vem sendo estudada para aplicações biomédicas tanto como sistema de entrega de fármacos e como sistema antimicrobiano (SAINI et al., 2015).

Neste trabalho foram obtidos nanocristais de celulose a partir de linho por meio de uma hidrólise ácida auxiliada por ultrassom. Nestes nanocristais em solução foram adicionados três concentrações de fármaco para posterior avaliação como biomaterial. O fármaco escolhido foi a clorexidina, um agente antimicrobiano com amplo espectro de atividade.

2. METODOLOGIA

2.1. Materiais

O linho (*Linus usitatisimum*) foi fornecido pela Artic Fiber Company Ltda. (Finland), o ácido sulfúrico foi adquirido da Panreac. Os outros reagentes empregados foram adquiridos da Sigma-Aldrich e utilizados sem purificações.

2.2 Obtenção dos Nanocristais de Celulose

A deslignificação do linho foi realizada como descrito previamente por ROBLES et al. (2015). Na hidrólise ácida da celulose branqueada foi utilizada uma solução de 10,2 M de ácido sulfúrico na proporção de uma grama de celulose para 20mL de solução. A hidrólise foi realizada em banho de ultrassom (Elmasonic Elma S 70 H) a temperatura de 50°C por 45 minutos. A reação foi interrompida com água destilada (1:3 v/v), sendo a fração não hidrolisada separada com funil de vidro e a fração filtrada centrifugada três vezes a 8000 rpm

durante 10 minutos. Posteriormente, os nanocristais passaram por diálise até pH neutro.

2.3 Obtenção da Membrana de Nanocristais de Celulose com Fármaco

Três concentrações diferentes de CHX foram usadas para produzir as membranas. A fração de CHX (0,015 g ou 0.0015g ou 0.00015g) foi dissolvida em DMSO e, em seguida, adicionou-se 10 mL de solução de nanocristais e manteve-se esta mistura em agitação e aquecimento (50°C) durante 3 horas. Então, a solução foi vertida em prato de alumínio e levada para estufa a 50°C durante 20 horas.

2.4 Caracterizações

Microscopia de Força Atômica

As imagens de microscopia de força atômica foram obtidas operando em modo de contato intermitente com um NanoScope IIIa, Multimode TM-AFM da Digital Instruments-Veeco. Para se obter resultados representativos, diferentes regiões das amostras foram verificadas.

Atividade Antimicrobiana

Para avaliar o efeito antimicrobiano foi realizado o teste de contato direto modificado de acordo com ZHANG et al. (2009). A estirpe bacteriana utilizada foi *Staphylococcus aureus* ATCC 19095 e após período de incubação, as unidades formadoras de colônias (CFU / ml) foram contadas.

Determinação do perfil de liberação in vitro da clorexidina

A absorvância foi medida usando um espectrofotômetro UV-vis V-630 (Jasco Inc.). Um varrimento inicial foi realizado para determinar o comprimento de onda em que as leituras seriam realizadas e comprimento de onda de 360 nm foi selecionado. Em seguida, foram realizadas várias diluições, obtendo diferentes concentrações. Estas soluções de diferentes concentrações foram então levadas para o espectrofotômetro a 360nm de comprimento de onda. Foi conhecido, em seguida, a absorvância das soluções de concentrações variadas e então desenvolvida a curva de calibração. As membranas foram pesados (0.0030g para cada amostra) e colocadas num recipiente de vidro contendo 10 mL de solução tampão PBS (pH 7). As leituras foram realizadas a cada meia hora durante quatro horas e, em seguida, as leituras foram feitas em 24 e 48 horas. Os experimentos foram realizados em duplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Microscopia de Força Atômica

Na figura 1 observam-se as superfícies das membranas de nanocristais de celulose com clorexidina (membranas CNC-CHX). A homogeneidade das membranas é observada nas diferentes concentrações de clorexidina, além da orientação aleatória das partículas.

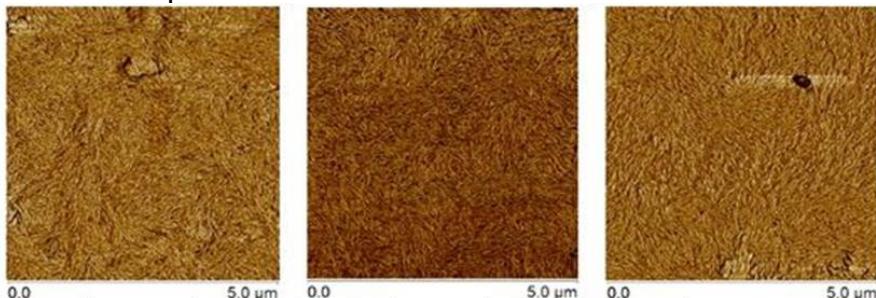


Figura 1. Imagens de microscopia de força atômica das membranas, da esquerda para direita: CNC+0,015g CHX, CNC+0,0015g CHX e CNC+0,00015g CHX.

Também foi realizada a determinação da rugosidade superficial das membranas. O comportamento observado quanto a rugosidade foi o esperado, à medida que a quantidade de droga adicionada diminui, os valores de rugosidade também diminuem. Os valores de rugosidade estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Rugosidades superficiais das membranas.

| Amostra | Rugosidade* |
|---------------------|-------------|
| CNC + 0.015 g CHX | 44,85 |
| CNC + 0.0015 g CHX | 28 |
| CNC + 0.00015 g CHX | 5,87 |

*A rugosidade (RMS) das membranas foi avaliada em uma área de 25nm² em diferentes locais da amostra.

3.2 Atividade Antimicrobiana

A capacidade das membranas CNC-CHX em inibir o crescimento das bactérias foi avaliado para *Staphylococcus aureus*. A membrana CNC sem droga foi usada como controle. Os resultados de inibição de crescimento do *Staphylococcus aureus* ATCC 19095 são apresentadas na figura 2. A membrana CNC + CHX 0,015 g inibiu totalmente o crescimento bacteriano em 1 hora e 24 horas. Além disso, houve uma diminuição na inibição do crescimento de bactérias de acordo com a diminuição da concentração de fármaco utilizada.

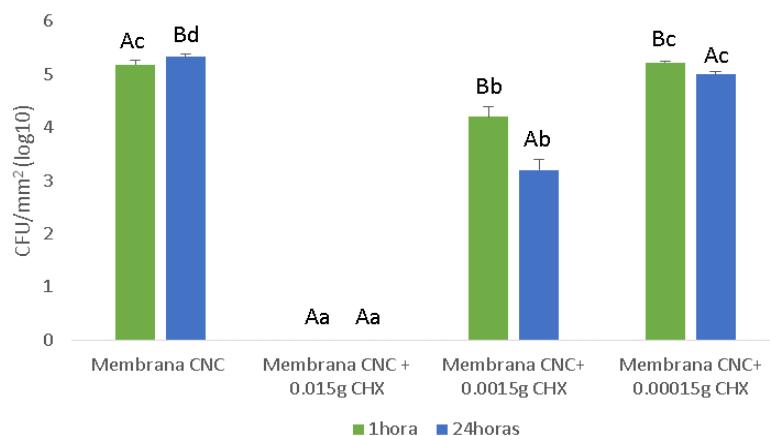


Figura 2. Sobrevida de *S. aureus* ATCC 19095 depois do teste de contato direto modificado. Diferentes letras maiúsculas representam diferenças estatisticamente significativas no grupo e diferentes letras minúsculas representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p<0,05$).

3.3 Determinação do perfil de liberação in vitro da clorexidina

Na figura 3 observa-se a liberação do fármaco em função do tempo. Um comportamento similar ocorreu na liberação das três concentrações de fármaco testadas. A liberação é mantida durante as 48 horas avaliadas, mesmo nas menores quantidades de fármaco.

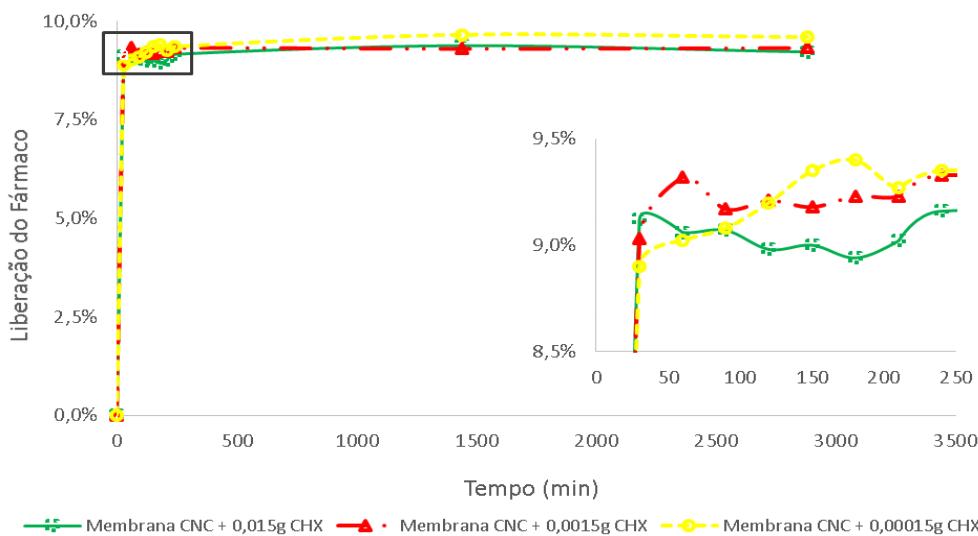


Figura 3. Perfil de liberação de 0 a 48hs e em destaque os primeiros 250 min.

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho, nanocristais de celulose obtidos por hidrólise auxiliada por ultrassom foram avaliados como biomaterial através da inserção de diferentes quantidades de droga. A metodologia de obtenção das membranas se mostrou simples e eficiente. A inserção de 0,015g de clorexidina na membrana de nanocristais de celulose inibiu totalmente o crescimento bacteriano (*Staphylococcus aureus*). O ensaio de liberação do fármaco demonstrou que a entrega da clorexidina ao meio avaliado é gradativa.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALILA, S.; BESBES, I.; VILAR, M.R.; MUTJÉ, P.; BOUFI, S. Mon-woody plants as raw materials for production of microfibrillated cellulose (MFC): A comparative study. **Industrial Crops and Products**, v.41, p.250-259, 2013.
- KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H. P.; F.; BOHN, A. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v.44, n.22, p.3358 – 3393, 2005.
- KLEMM, D.; KRAMER, F.; MORITZ, S.; LINDSTROM, T.; ANKERFORS, M.; GRAY, D.; DORRIS, A. Nanocelluloses: A New Family of Nature-Based Materials. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v.50, n.24, p.5438–5466, 2011.
- ROBLES, E.; URRUZOLA, I.; LABIDI, J.; SERRANO, L. Surface modified nano-cellulose as reinforcement in poly(lactic acid) to conform new composites. **Industrial Crops and Products**, v.71, p.44-53, 2015.
- SAINI, S.; BELGACEM, N.; MENDES, J.; ELEGIR, G.; BRAS, J. Contact Antimicrobial Surface Obtained by Chemical Grafting of Microfibrillated Cellulose in Aqueous Solution Limiting Antibiotic Release. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v.7, n.32, p. 18076–18085, 2015.
- TOMMILA, M.; JOKILAMMI, A.; PENTTINEN R.; EKHOLM E. Cellulose - A Biomaterial with Cell-Guiding Property. In: VAN DE VEN, T.; GODBOUT, L. **Cellulose - Medical, Pharmaceutical and Electronic Applications**. InTech Open Access Publisher, 2013. Cap.5.
- ZHANG, H.; SHEN, Y.; RUSE, N.D.; HAAPASALO, M. Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against *Enterococcus faecalis*. **Journal of Endodontics**, v.35, n.7, p.1051-1055, 2009.