

## OBTENÇÃO DE NANOCRISTAIS DE CELULOSE E SUA APLICAÇÃO COMO BIOMATERIAL

ANANDA MORAIS BARBOSA<sup>1</sup>; EDUARDO ROBLES<sup>2</sup>; JULIANA DA SILVA  
RIBEIRO<sup>3</sup>; RAFAEL GUERRA LUND<sup>4</sup>; JALEL LABIDI<sup>5</sup>; NEFTALI LENIN  
VILLARREAL CARREÑO<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais (UFPEL) –  
ananda.barbosa@ufpel.edu.br

<sup>2</sup>Programa de Doctorado en Ingenieria de Materiales Renovables (UPV/EHU) –  
jerobles001@ikasle.ehu.es

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Odontologia (UFPEL) – julianar.fo@ufpel.edu.br

<sup>4</sup>Programa de Pós-Graduação em Odontologia (UFPEL) – rglund@ufpel.edu.br

<sup>5</sup>Programa de Doctorado en Ingenieria de Materiales Renovables (UPV/EHU) –  
jalel.labidi@ehu.es

<sup>6</sup>Programa 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 nanômetros 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.

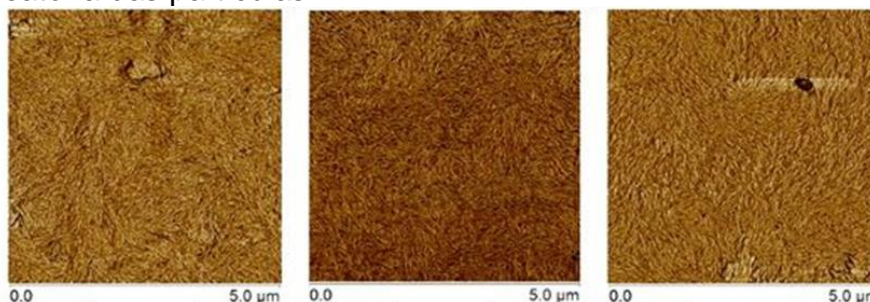


Figura 1. Imagens de microscopia de força atômica das membranas, da esquerda para direita: CNC+0,015g CHX, CNC+0,0015g CHX e CNC+0,00015g CHX.

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 25nm<sup>2</sup> 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.

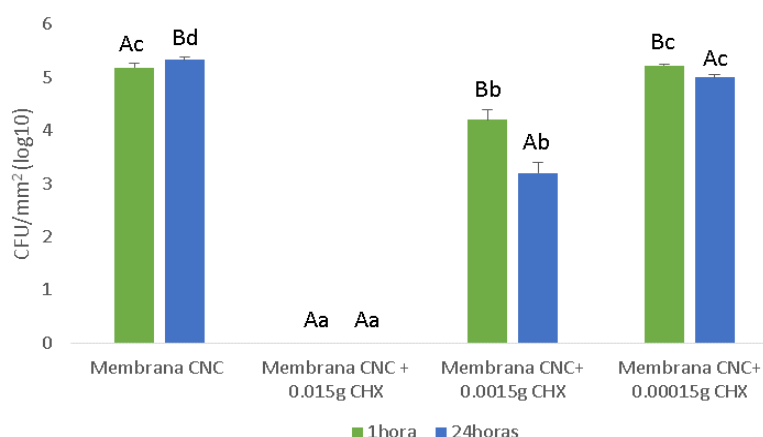


Figura 2. Sobrevivência de *S. aureus* ATCC 19095 depois do teste de contato direto modificado. Diferentes letras maiúsculas representam diferenças estatisticamente significativas no grupo e diferentes letras minúsculas representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ( $p < 0,05$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

### 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.

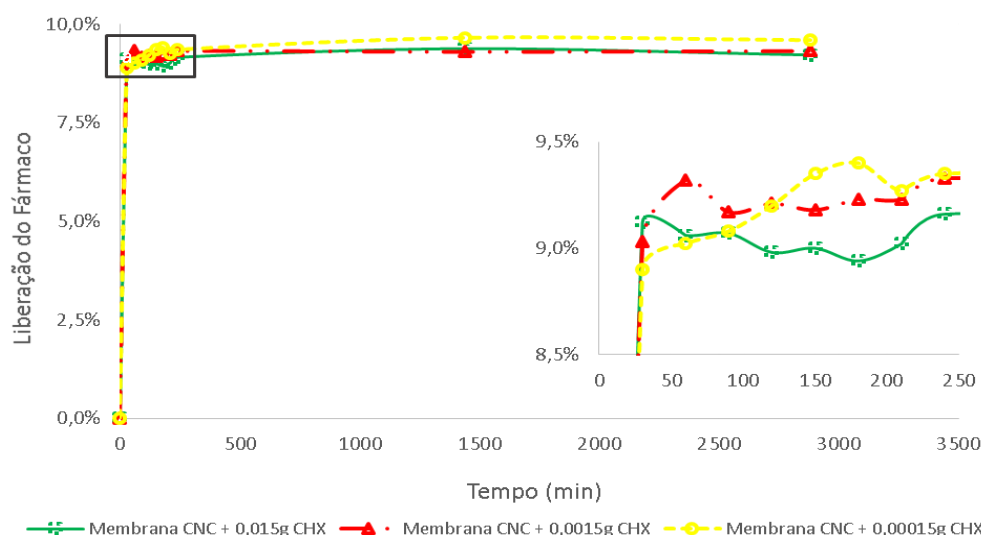


Figura 3. Perfil de liberação de 0 a 48hs e em destaque os primeiros 250 min.

#### 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.