



**UNIVERSIDADE DE SOROCABA  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA, EXTENSÃO E INOVAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Ludmilla Rodrigues Ribeiro Jorge**

**(Bio)2 - Sistema híbrido bioinspirado e biomimético  
à base de nanocelulose de origem microbiana e  
líquido iônico, para estabilização e entrega  
transdérmica de insulina.**

**Sorocaba/SP  
2019**

Ludmilla Rodrigues Ribeiro Jorge

**(Bio)2 - Sistema híbrido bioinspirado e biomimético  
à base de nanocelulose de origem microbiana e  
líquido iônico, para estabilização e entrega  
transdérmica de insulina.**

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para Exame de Defesa do Mestrado em Ciências Farmacêuticas.

**Orientador:** Prof. Doutor Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão  
**Coorientadora:** Prof<sup>a</sup> Doutora Marta Maria Duarte Carvalho Vila

**Sorocaba/SP  
2019**

### Ficha Catalográfica

J71b Jorge, Ludmilla Rodrigues Ribeiro  
(Bio)2 : sistema hídrico bioinspirado e biomimético à base de nanocelulose de origem microbiana e líquido iônico, para estabilização e entrega transdérmica de insulina / Ludmilla Rodrigues Ribeiro Jorge. – 2019.  
145 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão  
Coorientadora: Profa. Dra. Marta Maria Duarte Carvalho Vila  
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –  
Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2019.

1. Medicamentos – Formas farmacêuticas. 2. Sistema de distribuição de medicamentos. 3. Diabetes. 4. Insulina. 5. Tecnologia farmacêutica. I. Balcão, Victor Manuel Cardoso Figueiredo, orient. II. Vila, Marta Maria Duarte Carvalho, coorient. III. Universidade de Sorocaba. IV. Título.

Ludmilla Rodrigues Ribeiro Jorge

**(Bio)2 - Sistema híbrido bioinspirado e biomimético  
à base de nanocelulose de origem microbiana e  
líquido iônico, para estabilização e entrega  
transdérmica de insulina.**

Dissertação aprovada como requisito parcial para o Exame de Defesa no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba.

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Marta Maria Duarte Carvalho Vila  
Universidade de Sorocaba

Prof. Dr. Norberto Aranha  
Universidade de Sorocaba

Profa. Dra. Raquel de Mendonça Rosa Castro  
Universidade de Sorocaba

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais,  
Celma Rodrigues Lopes Silva e Ezequias Neto Silva.  
E ao meu avô, José Izaias Neto (*in memoria*).

## AGRADECIMENTOS

Toda honra e toda glória seja dada ao nosso soberano e eterno Deus, o doador da vida, o dono de toda sabedoria e poder... Não há palavras para expressar a gratidão por seu infinito amor, proporcionando-me esse presente que foi o Mestrado... À minha família e amigos, obrigado por todo o apoio, carinho, incentivo, paciência e compreensão por tantas ausências! Muito obrigada à minha irmã do coração, Débora Antunes Neto Moreno, você sempre foi o ombro amigo, o braço forte, que Deus retribua em ricas bençãos... E um obrigado mais que especial aos meus amados pais Celma e Ezequias, ao primo Efraim Marcato da Silva, ao esposo Carlos Alberto Ribeiro Jorge, à amiga Meire Aparecida Turino, ao querido amigo Álvaro Javier Gomez Henao, pois muito disso só foi possível pelo seu apoio.

Agradeço especialmente ao meu orientador, Prof. Dr. Victor Manuel C. F. Balcão e co-orientadora, Profa. Dra. Marta Maria D. C. Vila, por toda a paciência, atenção e suporte na realização deste trabalho... vocês são espetaculares!!!

À Thaisa B. Pickler (LAPETOX), Denicésar Baldo (LaBNUS), Rosenéia Aparecida Leite Tagliaferro (Lab. Química), e a todos os demais que ajudaram, direta ou indiretamente, na realização deste trabalho, mas que não foram nominalmente citados. Agradeço ainda ao Prof. Dr. José Martins de Oliveira Júnior, pela realização das análises de tomografia de raios-X. Muito obrigada à Prof. Dra. Renata de Lima, à Mariane Nunes, à Thaís G. da Costa e à Mariana Guilger, do LABITON (UNISO), pelo auxílio na realização dos ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade. Agradeço pela ajuda e amizade de meus queridos e amados amigos que o Mestrado me deu: Lilian Harada, Laura Favaro, Érica Silva, Welida Campos, Edson Yoshida. Obrigada pelas gargalhadas, incentivos e apoio.

À Universidade de Sorocaba, e a todos os professores do Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas.

Por último, mas não menos importante, agradeço à CAPES pela concessão de financiamento na forma de bolsa de estudo CAPES-PROSUP para a realização deste projeto de pesquisa.

“Uns confiam em carros e outros em cavalos, mas nós faremos menção do nome do Senhor nosso Deus”.

*Salmos 20:7*

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** Sistemas bioinspirados e biomiméticos à base de filmes biopoliméricos são interessantes para utilização farmacêutica em função de características como biocompatibilidade, biodegradabilidade, toxicidade quase nula e adequadas propriedades físico-químicas. A permeação tópica de fármacos pode ser otimizada através da incorporação de substâncias facilitadoras da permeação cutânea. Neste sentido, os líquidos iônicos são substâncias promissoras. A insulina é um hormônio que tem como função manter os níveis normais de glicose no sangue. A ausência ou produção parcial desse hormônio gera a hiperglicemia ou *Diabetes Mellitus* (DM), doença crônica com elevada prevalência. Para o tratamento da DM tipo 1 é imprescindível o uso de insulina, a qual é administrada por aplicações subcutâneas. **OBJETIVO:** Desenvolver e avaliar um filme polimérico base de nanocelulose de origem microbiana e goma xantana para entrega tópica de insulina, tendo um líquido iônico como facilitador da permeação cutânea. **MÉTODOS EXPERIMENTAIS:** A nanocelulose bacteriana foi produzida por fermentação da bactéria *Gluconacetobacter hansenii* ATCC®23769, incorporada com insulina e caracterizada por adsorção de insulina, FTIR, XRD, DSC e TGA, FESEM, resistência mecânica, citotoxicidade, genotoxicidade e ensaio de permeação transdérmica via célula de Franz. Realizou-se a síntese e caracterização dos líquidos iônicos por citotoxicidade, genotoxicidade, FTIR, TGA e DSC, teor de água, <sup>1</sup>HMRN. Seguiu-se a produção e caracterização dos biofilmes com nanocelulose e goma xantana, integrando insulina e geranto de colina. A caracterização dos filmes foi realizada pelos ensaios de resistência mecânica, TGA e DSC, XRT e DESEM. Por fim, avaliou-se a capacidade de permeação transdérmica da insulina pelo ensaio de permeação em células de Franz. **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** As biomembranas de nanocelulose produzidas mostraram-se seguras para a aplicação sobre a pele, com adequadas propriedades mecânicas. Foram obtidos líquidos iônicos com reduzida citotoxicidade e genotoxicidade nula. O filme biopolimérico desenvolvido apresentou adequadas propriedades físico-químicas e biológicas, com efetiva capacidade de permeação transdérmica da insulina. **CONCLUSÃO:** Obteve-se um bifilme polimérico com excelentes propriedades mecânicas, físico-químicas e biológicas, com capacidade de liberação e permeação transdérmica de insulina. Deste modo, o produto desenvolvido apresenta potencial para a entrega de insulina através da pele humana por permeação transdérmica.

**Palavras chave:** *Diabetes Mellitus*; Insulina humana; Líquidos iônicos; Matrizes biopoliméricas; Estabilização estrutural e funcional; Permeação transdérmica.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Bio-inspired and biomimetic systems based on biopolymer films are interesting for pharmaceutical use due to characteristics such as biocompatibility, biodegradability, almost zero toxicity and adequate physico-chemical properties. The topical permeation of drugs can be optimized through the incorporation of substances that facilitate skin permeation. In this sense, ionic liquids are promising substances. Insulin is a hormone whose function is to maintain normal blood glucose levels. The absence or partial production of this hormone generates hyperglycemia or Diabetes Mellitus (DM), a chronic disease with high prevalence. The use of insulin, which is administered by subcutaneous applications, is essential for the treatment of type 1 DM. **OBJECTIVE:** To develop and evaluate a nanocellulose based polymer film of microbial origin and xanthan gum for topical delivery of insulin, having an ionic liquid as a facilitator of skin permeation. **EXPERIMENTAL METHODS:** Bacterial nanocellulose was produced by fermentation of the bacterium *Gluconacetobacter hansenii* ATCC®23769, incorporated with insulin and characterized by adsorption of insulin, FTIR, XRD, DSC and TGA, FESEM, mechanical resistance, cytotoxicity, genotoxicity and transdermal permeation assay via cell of Franz. The synthesis and characterization of the ionic liquids by cytotoxicity, genotoxicity, FTIR, TGA and DSC, water content, <sup>1</sup>HNMR were performed. Production and characterization of the biofilms with nanocellulose and xanthan gum, integrating insulin and choline gerant. The characterization of the films was performed by the mechanical strength tests, TGA and DSC, XRT and DESEM. Finally, the transdermal permeability of insulin was assessed by the permeation assay in Franz cells. **RESULTS AND DISCUSSION:** The produced nanocellulose biomembranes proved to be safe for application to the skin, with adequate mechanical properties. Ionic liquids with reduced cytotoxicity and zero genotoxicity were obtained. The developed biopolymer film presented adequate physicochemical and biological properties, with effective transdermal permeability of the insulin. **CONCLUSION:** A polymeric bifilm with excellent mechanical, physicochemical and biological properties was obtained, with transdermal insulin release and permeability. Thus, the developed product has potential for the delivery of insulin through the human skin by transdermal permeation.

**Keywords:** *Diabetes Mellitus*; Human insulin; Ionic liquids; Biopolymer matrices; Structural and functional stabilization; Transdermal permeation.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Resumo gráfico do trabalho de pesquisa desenvolvido	23
<b>Figura 2.</b> Estrutura da insulina, formada por duas cadeias peptídicas unidas por pontes de dissulfeto	29
<b>Figura 3.</b> Estrutura geral da pele humana.	31
<b>Figura 4.</b> Formula estrutural da goma xantana.	40
<b>Figura 5.</b> Procedimento esquemático utilizado para produção das biomembranas de nanocelulose bacteriana por cultura de <i>Gluconacetobacter hansenii</i> ATCC 23769 em meio Hestrin-Schramm.	47
<b>Figura 6.</b> Fluxograma da preparação e avaliação dos filmes biopoliméricos simples de acordo com o planejamento fatorial experimental completo.	63
<b>Figura 7.</b> Fluxograma da preparação e caracterização da matriz biopolimérica otimizada, integrando líquido iônico e insulina.	65
<b>Figura 8.</b> Diagrama de sequências das várias etapas envolvidas no trabalho de pesquisa.	69
<b>Figura 9.</b> Evolução temporal da concentração de proteína (insulina) no sobrenadante, após adsorção nas biomembranas bacterianas de nanocelulose.	70
<b>Figura 10.</b> Espectro de FTIR de (a) insulina humana pura, (b) biomembrana de nanocelulose bacteriana simples e (c) biomembrana de nanocelulose bacteriana com insulina adsorvida.	72
<b>Figura 11.</b> Difratoogramas de raios X (XRD) de intensidade normalizada de (a) insulina humana pura (curva laranja), (b) biomembrana de nanocelulose bacteriana simples (curva azul) e (c) biomembrana de nanocelulose bacteriana com insulina adsorvida (curva rosa claro). Os difratogramas de raios-X foram coletados usando raios-X filtrados com alvo de Cu.	74
<b>Figura 12.</b> Termogramas de calorimetria exploratória diferencial das biomembranas de nanocelulose bacteriana simples (curva rosa claro) e contendo insulina adsorvida (curva azul).	75

- Figura 13.** Curva termogravimétrica (curva roxa) e 1ª derivada da curva de perda de peso (curva rosa claro) da biomembrana de nanocelulose bacteriana com insulina adsorvida. 78
- Figura 14.** Fotomicrografias de microscopia electrónica de varredura por emissão de campo (FESEM) da superfície da biomembrana de nanocelulose bacteriana simples, a várias ampliações (a: x2000; b: x8000; c: x16000; d: x30000). 79
- Figura 15.** Resultados obtidos dos testes de resistência mecânica realizados às biomembranas de nanocelulose bacteriana simples. Resiliência (curva azul), resistência à perfuração (curva rosa claro), relaxação (curva púrpura). 81
- Figura 16.** Efeito das biomembranas de nanocelulose bacteriana e sua água de armazenamento no índice mitótico obtido a partir de análises citogenéticas usando células HUVEC, com água ultrapura como negativo. O índice mitótico foi calculado como o número de células na mitose dividido pelo número total de células, enquanto o índice de danos foi calculado como o número de danos dividido pelo número total de divisões celulares. 83
- Figura 17.** Exemplos de fases mitóticas normais em células de *Allium cepa* (profase, metafase, anafase, telofase) e tipos de anomalias cromossômicas (profase com MN, metafase C, metafase com aderência cromossômica, metafase com perda cromossômica, profase com MN, anafase com perda cromossômica e anafase com pontes e quebras cromossomais) encontradas em células de *Allium cepa* expostas ao controle, biomembranas de nanocelulose bacteriana e amostras de água de armazenamento das biomembranas. 84
- Figura 18.** Resultados obtidos a partir de ensaios de permeação transdérmica de insulina, na forma de proteína permeada por área de pele, durante um período de ensaio de 24 horas. Os valores no gráfico são as médias de três experimentos (n=3), com desvios padrão associados. A linha sólida representa o ajuste não linear realizado aos dados, usando a função de Gompertz. 85
- Figura 19.** Espectros de FTIR de (a) bicarbonato de colina, (b) ácido oleico, (c) ácido gerânico, (d) oleato de colina 1:1, (e) oleato de colina 1:2, (f) geranato de colina 1:1, (g) geranato de colina 1:2, e (h) insulina humana (NOVOLIN® N). 87

**Figura 20.** Curvas termogravimétricas (a), 1ª derivada das curvas de perda de peso (b) e termogramas de calorimetria diferencial de varredura dos líquidos iônicos sintetizados e seus reagentes de partida (c). 89

**Figura 21.** Espectros  $^1\text{H}$  RMN do ácido oleico (a), ácido gerânico (b), e bicarbonato de colina (c). 93

**Figura 22.** Reações de esterificação entre (a) ácido oleico e cátion colina para produzir oleato de colina (os hidrogênios (b) e (d) são os mais afectados pelos espectros de RMN, quando o espectro  $^1\text{H}$  RMN do éster é comparado com o do ácido), e (b) ácido gerânico e cátion colina para produzir geranato de colina (os hidrigênios (a), (c), e (d) são os mais afectados pelos espectros de RMN, quando o espectro  $^1\text{H}$  RMN do éster é comparado com o do ácido). 94

**Figura 23.** Espectros de  $^1\text{H}$  RMN do oleato de colina e do seu material de partida ácido oleico (a), junto com uma expansão para destacar os deslocamentos de campo *upfield* de 2.34 para 2.21 ppm e de 1.63 para 1.57, quando estes sinais do éster são comparados com os respetivos sinais do ácido (b). 96

**Figura 24.** Espectros  $^1\text{H}$  RMN do geranato de colina e do seu material de partida, o ácido gerânico (a) e duas expansões, para destacar os deslocamentos de campo *upfield* de 2.18 para 2.02 ppm (b) e de 5.69 para 5.63 ppm (c), quando estes sinais do éster são comparados com os respetivos sinais do ácido. 97

**Figura 25.** Espectros de  $^1\text{H}$  RMN do bicarbonato de colina, oleato de colina, e geranato de colina, para destacar os deslocamentos de campo *downfield* quando os sinais do éster são comoarados com os respetivos sinais do bicarbonato de colina. 98

**Figura 26.** Resultados da análise de citotoxicidade realizada aos líquidos iônicos e seus respectivos solventes eutéticos profundos, através da metodologia de disco-difusão em ágar usando a linhagem celular 3T3: (a) controle negativo, (b) controle positivo, (c) geranato de colina 1:1, (d) geranato de colina 1:2, (e) oleato de colina 1:2, (f) oleato de colina 1:1, (g) ácido oleico, (h) ácido gerânico e (i) bicarbonato de colina. 99

**Figura 27.** Resultados das análises de citotoxicidade realizadas aos líquidos iônicos por meio to teste (ensaio MTT), utilizando a linhagem celular HaCaT: (a) geranato de colina e (b) oleato de colina. 101

**Figura 28.** Contagens médias de danos no DNA encontrados no teste Cometa™ 103 realizado aos líquidos iônicos usando células 3T3 (a), e índices relativos de danos ao DNA da linhagem celular 3T3 após exposição das células aos diferentes líquidos iônicos por 24 h (médias de seis determinações com desvio padrão associado: 3T3 (controle,  $1.000 \pm 0,104$ ; geranato de colina 1:1,  $0,196 \pm 0,005$ ; geranato de colina 1:2,  $0,210 \pm 0,008$ ; oleato de colina 1:1,  $0,315 \pm 0,033$ ; oleato de colina 1:2,  $0,070 \pm 0,024$ ) (b). As fotos inseridas representam as caudas de Cometa™ produzidas pelos diferentes tipos de danos celulares encontrados.

**Figura 29.** Resultados obtidos através dos testes de permeação transdérmica 105 usando líquidos iônicos simples como facilitadores de permeação, como concentração média de proteína (insulina NOVOLIN® N) permeada por área de pele. Os valores são as médias de três experimentos ( $n = 3$ ), com desvios padrão associados. As linhas sólidas representam ajustes não lineares realizados aos dados experimentais (função hiperbólica para oleato de colina 1:1 e função de Gompertz para os demais líquidos iônicos).

**Figura 30.** Resultados obtidos a partir dos testes de resistência mecânica 108 realizados aos filmes biopoliméricos resultantes do planejamento fatorial experimental.

**Figura 31.** Termograma de calorimetria diferencial exploratória do filme 110 biopolimérico integrando geranato de colina 1:2 e insulina NOVOLIN® N.

**Figura 32.** Espectros FTIR de (a) insulina humana NOVOLIN® N e (b) filme 111 biopolimérico integrando geranato de colina 1:2 e insulina NOVOLIN® N.

**Figura 33.** Resultados obtidos a partir dos testes de resistência mecânica 113 realizados ao filme biopolimérico produzido com geranato de colina 1:2 e insulina NOVOLIN® N, tendo como base os níveis (+1) de nanocelulose bacteriana e (+1) de goma xantana.

**Figura 34.** Resultados da análise de citotoxicidade realizada à membrana de 115 nanocelulose bacteriana simples, filme biopolimérico simples sem insulina NOVOLIN® N e sem geranato de colina 1:2, e filme biopolimérico integrando insulina NOVOLIN® N e geranato de colina 1:2, através da metodologia de disco-difusão em ágar usando a linhagem celular HaCaT: (a) controle positivo, (b) controle negativo, (c) nanocelulose bacteriana, (d) filme simples, (e) filme integrando insulina NOVOLIN® N e geranato de colina 1:2.

**Figura 35.** Fotomicrografias de EDMEV do filme biopolimérico carregado com insulina humana NOVOLIN® N e geranato de colina 1:2, a várias ampliações (superfície do filme, a: x250, b: x1000, c: x2500; fratura da seção reta do filme, d: x250, 3: x1500), obtidas usando a técnica de difração retroespalhada de elétrons (EBSD). 116

**Figura 36.** Imagens obtidas por análise tomográfica via transmissão de raios-X do filme biopolimérico carregado com insulina NOVOLIN® N e geranato de colina 1:2, sendo (a,b) imagens de perfil inclinado do filme, (c) imagem perpendicular à superfície do biofilme. As fatias de imagem tridimensionais foram coletadas usando uma tensão de operação regulada para 34 kV e corrente elétrica com 529  $\mu$ A. 117

**Figura 37.** Resultados obtidos através dos testes de permeação transdérmica, como concentração média de proteína (insulina NOVOLIN® N) permeada por unidade de área de pele, a partir do filme biopolimérico integrando insulina e geranato de colina 1:2, durante um período de ensaio de 24 h. Os valores são as médias de três experimentos ( $n = 3$ ), com desvios padrão associados. As linhas sólidas representam ajustes não lineares de uma função hiperbólica realizados aos dados experimentais. 120

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classificação etiológica da <i>Diabetes Mellitus</i>	27
<b>Tabela 2.</b> Planejamento fatorial experimental completo, fornecendo os valores dos níveis inferior (-1), central (0) e superior (+1) para cada variável.	62
<b>Tabela 3.</b> Composição dos biofilmes biopoliméricos simples (base: 10 g) para otimização das propriedades mecânicas.	62
<b>Tabela 4.</b> Composição dos biofilmes (otimizados) integrando líquido iônico e insulina humana.	64
<b>Tabela 5.</b> Resultados obtidos a partir de ajustes não lineares realizados à concentração média de proteína permeada por unidade de área de pele ( $\mu\text{g}_{\text{proteína}}/\text{mm}^2_{\text{pele}}$ ) em função do tempo de permeação, para misturas de insulina humana com líquido iônico, para os quatro líquidos iônicos em estudo.	104
<b>Tabela 6.</b> Resultados obtidos por análises tomográficas via transmissão de raios-X realizadas ao filme integrando líquido iônico (CG1:2) e insulina humana.	117
<b>Tabela 7.</b> Resultados obtidos a partir de ajustes não lineares realizados à concentração média de proteína permeada por unidade de área de pele ( $\mu\text{g}_{\text{proteína}}/\text{mm}^2_{\text{pele}}$ ) em função do tempo de permeação, para os filmes integrando insulina e líquido iônico (geranato de colina 1:2) e apenas insulina.	121

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ABS	Absorvância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
BNC	Nanocelulose Bacteriana
BSA	Albumina Sérica Bovina
cP	Centipoise
DES	Solvente Eutético Profundo
DM	Diabetes Melittus
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DSC	Calorimetria diferencial exploratória
FESEM	Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo
FTIR	Espectrofotometria de Infravermelho com Transformada de Fourier
G	Condutividade Elétrica
I	Corrente Elétrica
LI	Líquido Iônico
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide
pH	Potencial Hidrogeniônico
PVA	Álcool Polivinílico
R	Resistividade
rHI	Insulina Humana Recombinante
RI	Índice de Refração
DR	Densidade Relativa
RPM	Velocidade de Agitação (rotações por minuto)
SDS	Dodecilsulfato de Sódio
$\theta$	Theta
TGA	Análises Termogravimétricas
U	Tensão
UV-Vis	Ultravioleta - Visível
XRD	Difração de raios-X
XRF	Fluorescência de Raios-X
XRT	Tomografia de Raios-X

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>24</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>26</b>
2.1 Diabetes Mellitus .....	26
2.2 Insulina .....	28
2.3 Pele e Promotores de Permeação Transdérmica .....	30
2.3.1 Líquidos Iônicos .....	34
2.4 Sistemas Poliméricos para a Veiculação de Ativos na Pele .....	36
2.5 Nanocelulose Bacteriana .....	38
2.6 Goma Xantana .....	40
2.7 Estabilização Estrutural e Funcional de Entidades Proteicas .....	41
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>43</b>
3.1 Objetivo Geral .....	43
3.2 Objetivos Especificos .....	43
<b>4 METODOLOGIA EXPERIMENTAL .....</b>	<b>44</b>
4.1 Material .....	44
4.1.1 Reagentes e Consumíveis .....	44
4.1.2 Material Biológico .....	44
4.1.3 Equipamentos Analíticos e Outros .....	45
4.2 Procedimentos Experimentais .....	47
4.2.1 Produção de Biomembranas de Nanocelulose Bacteriana .....	47
4.2.1.1. Ensaio de Adsorção de Insulina nas Biomembranas de Nanocelulose Bacteriana (BNC)	48

4.2.1.2 Análise por Espectrofotometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) .....	49
4.2.1.3 Análises de Difração de Raios-X (DRX) .....	49
4.2.1.4 Análises Térmicas via Termogravimetria (TGA) e Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) .....	49
4.2.1.5 Análises de Microscopia Eletrônica de Varredura por Campo (FESEM) .....	50
4.2.1.6 Propriedades de Resistência Mecânica das Biomembranas BNC .....	51
4.2.1.7 Análise do Potencial de Indução de Aberrações Cromossômicas pelas Biomembranas BNC, através do Ensaio <i>Allium cepa</i> .....	51
4.2.2 Ensaio de Permeação Transdérmica .....	52
4.2.2.1 Quantificação do Teor de Proteína pelo Método de Bradford Modificado .....	53
4.2.3 Síntese de Líquidos Iônicos (LI) e seus Solventes Eutéticos Profundos (DES) .....	54
4.2.3.1 Caracterização Biológica dos Líquidos Iônicos .....	56
4.2.3.1.1 Potencial de Citotoxicidade pelo Método de Disco-Difusão em Ágar .....	56
4.2.3.1.2 Potencial de Citotoxicidade pelo Método da Atividade Mitocondrial (Ensaio MTT) .....	56
4.2.3.1.3 Avaliação do Potencial de Danos ao DNA (Genotoxicidade) através do Ensaio Cometa <sup>TM</sup> .....	57
4.2.3.2 Caracterização Físico-Química dos Líquidos Iônicos .....	60
4.2.3.2.1 Análises por FTIR .....	60
4.2.3.2.2 Análises Térmicas por TGA e DSC .....	60
4.2.3.2.3 Análises do Teor de Água por Titulação de Karl-Fischer .....	60

4.2.3.2.4 Análises por Ressonância Magnética Nuclear ( $^1\text{H}$ RMN) .....	60
4.2.4 Permeação Transdérmica de Insulina Humana Assistida por LIS .....	61
4.2.5 Preparação de Filme Biopolimérico Integrando Líquido Iônico e Insulina Humana .....	61
4.2.5.1 Planejamento Fatorial Experimental para Definição da Melhor Matriz Biopolimérica .....	61
4.2.5.2 Preparação do Filme Biopolimérico com Matriz Otimizada, Integrando Líquido Iônico e Insulina Humana .....	63
4.2.6 Caracterização Físico-Química e Biológica dos Filmes Biopoliméricos Integrando LI e Insulina Humana .....	65
4.2.6.1 Análises Térmicas por TGA e DSC .....	65
4.2.6.2 Análises por FTIR .....	66
4.2.6.3 Análise das Propriedades de Resistência Mecânica .....	66
4.2.6.4 Avaliação de Potencial de Citotoxicidade pelo Método de Disco-Fusão em Ágar .....	66
4.2.6.5 Análises Morfológicas por Tomografia de Raios-X .....	66
4.2.6.6 Análises Morfológicas por Microscopia Eletrônica de Varredura com Dispersão de Energia (DESEM) .....	67
4.2.7 Permeação Transdérmica de Insulina Humana a partir do Filme Biopolimérico, Assistida por Geranato de Colina (1:2) .....	68
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>69</b>
5.1 Adsorção de Proteínas nas Biomembranas de Nanocelulose Bacteriana .....	69
5.2 Análise das Membranas de BNC por FTIR .....	71
5.3 Análise das Membranas de BNC por DRX .....	74
5.4 Análise das Membranas de BNC por TGA e DSC .....	75

5.5 Análise Microestrutural das Biomembranas de Nanocelulose Bacteriana via FESEM .....	79
5.6 Avaliação das Propriedades Mecânicas das Biomembranas de Nanocelulose Bacteriana .....	80
5.7 Análise do Potencial de Genotoxicidade das Biomembranas de Nanocelulose Bacteriana via Ensaio <i>Allium cepa</i> .....	82
5.8 Ensaios Preliminares de Permeação Transdérmica de Insulina a partir das Biomembranas de Nanocelulose Bacteriana Contendo Insulina Adsorvida	85
5.9 Análise dos Líquidos Iônicos por FTIR .....	86
5.10 Análises Térmicas dos Líquidos Iônicos Sintetizados por TGA e DSC ....	88
5.11 Determinação do Teor de Água dos Líquidos Iônicos Sintetizados, por Titulação de Karl-Fischer .....	91
5.12 Análise dos Líquidos Iônicos Sintetizados por Ressonância Magnética Nuclear ( $^1\text{H}$ RMN) .....	92
5.13 Potencial de Citotoxicidade dos Líquidos Iônicos pelo Ensaio de Disco-Difusão em Ágar .....	100
5.14 Potencial de Citotoxicidade dos Líquidos Iônicos pelo Ensaio de Atividade Mitocondrial (MTT) .....	98
5.15 Potencial de Genotoxicidade dos Líquidos Iônicos pelo Ensaio Cometa <sup>TM</sup> .....	102
5.16 Permeação Transdérmica de Insulina Promovida pelos Líquidos Iônicos	104
5.17 Planejamento Fatorial Experimental para Otimização da Matriz Biopolimérica do Filme .....	107
5.18 Análises Térmicas por DSC do Filme Otimizado Estatisticamente com Líquido Iônico e Insulina .....	109
5.19 Análises por FTIR do Filme Otimizado Estatisticamente com Líquido Iônico e Insulina .....	111

5.20 Características de Resistência Mecânica do Filme Otimizado Estatisticamente com Líquido Iônico e Insulina .....	113
5.21 Potencial de Citotoxicidade do Filme Otimizado Estatisticamente com Líquido Iônico e Insulina .....	114
5.22 Análises Morfológicas de Superfície e de Zona de Fratura Transversal do Filme Otimizado Estatisticamente com Líquido Iônico e Insulina, por MEV ...	115
5.23 Análises Morfológicas do Filme Otimizado Estatisticamente com Líquido Iônico e Insulina, por XRT .....	116
5.24 Permeação Transdérmica de Insulina Assistida pelo Líquido Iônico Geranato de Colina 1:2 Integrada no Filme Otimizado Estatisticamente .....	120
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>123</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO</b>	<b>124</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>125</b>
Anexo A .....	138
Anexo B .....	140
Anexo C .....	142
Anexo D .....	144

## APRESENTAÇÃO

O trabalho de pesquisa intitulado "**(Bio)2 - Sistema híbrido bioinspirado e biomimético à base de nanocelulose de origem microbiana e líquido iônico, para estabilização e entrega transdérmica de insulina**", foi desenvolvido seguindo a linha de pesquisa "Avaliação de Substâncias Bioativas e Sistemas de Liberação de Farmacos". Esta pesquisa foi financiada pela Universidade de Sorocaba, com auxílio "Taxa Escolar" concedido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) à aluna Ludmilla Rodrigues Ribeiro Jorge, a qual foi orientada pelo Prof. Dr. Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão e coorientada pela profa. Dra. Marta Maria Duarte Carvalho Vila.

Cabe destacar ainda, que a caracterização dos líquidos iônicos foi feita em parceria com o Prof. Dr. Matthieu Tubino do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e como o Prof. Dr. Jorge F. B. Pereira da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho (Unesp).

Os resultados obtidos durante a realização desta dissertação foram parcialmente apresentados em formato de painel no 11<sup>th</sup> CIFARP - International Congress of Pharmaceutical Sciences (Ribeirão Preto/SP, de 15 a 18 de novembro de 2017) **(Anexo A)** e no ANM 2018 – International Conference on Advanced Nano Materials (Aveiro – Portugal, de 18 a 20 de Julho de 2018) **(Anexo B)**.

Adicionalmente, os resultados obtidos deram ainda origem à preparação de dois manuscritos científicos que se encontram atualmente em processo de submissão para publicação em revista científica internacional indexada com arbitragem por pares com alto fator de impacto (Ludmilla R. Jorge, Liliam K. Harada, Erica C. Silva, Welida F. Campos, Renata Lima, José M. Oliveira Jr., Marta M. D. C. Vila, Matthieu Tubino e Victor M. Balcão (2018) **Bacterial nanocellulose biomembrane as a suitable matrix for the structural and functional stabilization of human insulin, aiming at its tentative transdermal permeation (Anexo C)** e Ludmilla R. Jorge, Liliam K. Harada, Erica C. Silva, Welida F. Campos, Fernanda C. Moreli, Renata Lima, Gustavo Shimamoto, Jorge F. B. Pereira, José M. Oliveira Jr., Matthieu Tubino, Marta M. D. C.

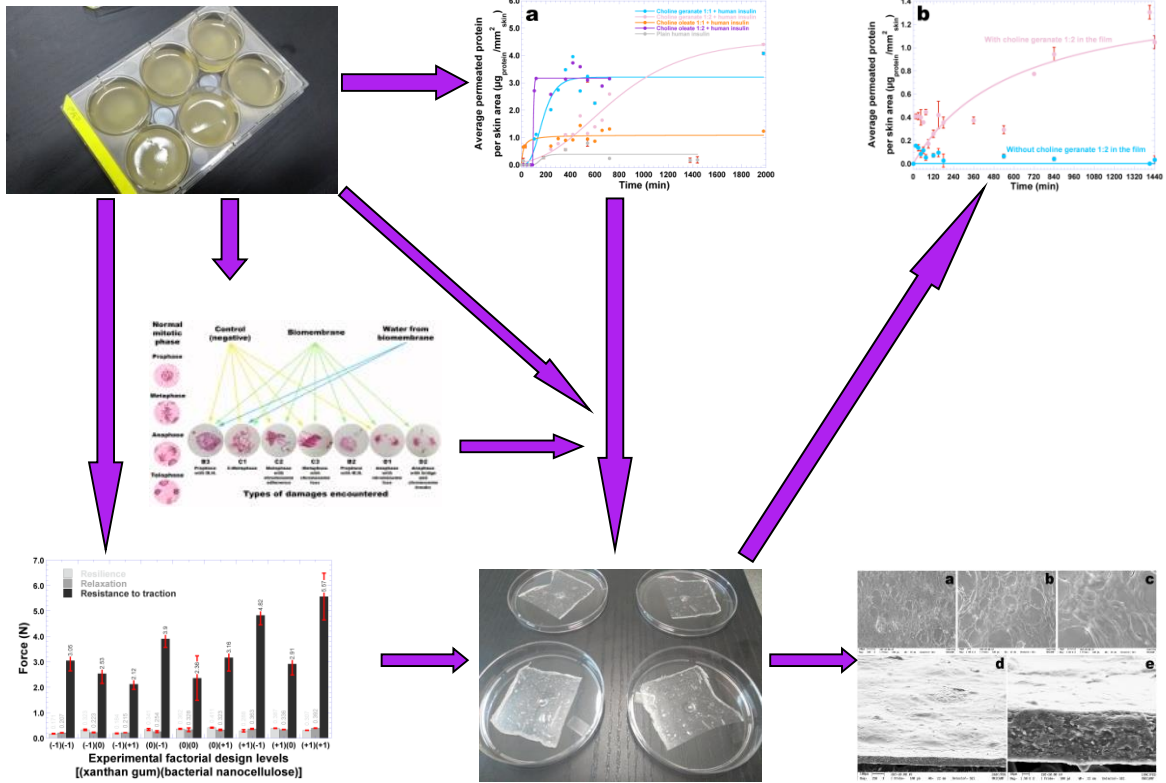
Vila e Victor M. Balcão (2018) **Non-invasive transdermal delivery of human insulin using ionic liquids: proof-of-concept (Anexo D).**

A *Diabetes Mellitus* configura-se como uma doença com características epidêmicas, destacando-se como uma importante causa de morbidade e mortalidade. A *Diabetes Mellitus* do tipo 1, caracteriza-se pela falta de secreção de insulina, sendo necessária a administração de insulina exógena para obter um estado normoglicêmico. A maioria dos tratamentos envolvendo insulina exigem a administração de injeções subcutâneas diárias. Assim, o desenvolvimento de novas formas de administração de ativos, como a insulina, é de vital importância. Neste sentido, a via transdérmica torna-se uma via alternativa interessante para administração de insulina, pois pode-se eliminar a possibilidade de degradação do fármaco no trato gastrointestinal e também favorecer a administração indolor do ativo. Para a veiculação de ativos, via derme, podem ser utilizados filmes biopoliméricos, utilizando polímeros naturais como gomas e nanocelulose bacteriana. No entanto, a pele é uma barreira a ser vencida, sendo necessário associar substâncias promotoras da permeação dérmica. Recentemente, alguns pesquisadores reportaram a eficiência de líquidos iônicos, como o geranato de colina, como facilitadores de permeação dérmica.

Considerando-se todas as informações supracitadas, a utilização de um biofilme à base de nanocelulose bacteriana e líquido iônico, mostrou-se como uma alternativa promissora para a permeação de insulina na pele humana, como o produto desenvolvido neste estudo.

Para tal, a pesquisa exigiu várias etapas de trabalho. Inicialmente foi produzida e caracterizada nanocelulose bacteriana; a seguir realizou-se a síntese e caracterização dos líquidos iônicos. Depois o foco incidiu na produção e caracterização de biofilmes integrando a insulina e o líquido iônico. Por fim, avaliou-se a eficácia do biofilme quanto à sua capacidade de promover a permeação transdérmica de insulina na pele. A Figura 1 apresenta um resumo gráfico do trabalho de pesquisa desenvolvido.

Figura 1. Resumo Gráfico do Trabalho de Pesquisa Desenvolvido.



## 1. INTRODUÇÃO

A biomimética centra-se na ciência básica, explorando fundamentalmente os princípios dos sistemas biológicos, enquanto a bioinspiração se concentra na engenharia aplicada através da implementação tecnológica dos princípios de funcionamento dos sistemas biológicos. Biomimética e bioinspiração, como estratégias complementares e intercambiáveis para a inovação sustentável e o desenvolvimento de tecnologias de membrana têm grandes implicações na exploração de materiais membranares e intensificação de processos com eles relacionados (ZHAO et al., 2014).

Ao imitar as composições, estruturas, formações e funções excepcionais de materiais biológicos, uma miríade de membranas biomiméticas e bioinspiradas foram concebidas e preparadas utilizando membranas de origem celular. Estas membranas mostraram propriedades fascinantes e desempenhos notáveis tais como interações múltiplas, organizações hierárquicas, mecanismos múltiplos seletivos de transporte, estabilidade, elevada resistência e adaptação distinta. As aplicações mais importantes de membranas biomiméticas e bioinspiradas são para uso em tratamento de água, energia limpa, captura de carbono e cuidados de saúde (ZHAO et al. 2014; ABDELRASOUL; DOAN; LOHI, 2017).

Para a obtenção de formulações farmacêuticas tradicionais ou inovadoras, como os filmes (ou membranas), hidrogéis e *scaffolds*, vários tipos de polímeros naturais e/ou sintéticos têm sido utilizados (VILLANOVA, 2010). Dentre os polímeros sintéticos pode-se destacar o PVA por ser não tóxico e biocompatível que possui excelentes propriedades de formação de filme, facilidade de processamento, resistências mecânicas, térmicas e químicas (LIU et al., 2009; HWANG et al., 2010; SONG; RANE; CHRISTMAN, 2012; GUPTA; VERMANI; GARG, 2002). Já entre os polímeros naturais a nanocelulose bacteriana tem sido utilizada em diversos produtos por possuir propriedades únicas, incluindo alta capacidade de absorção de água, elevada cristalinidade e boas propriedades mecânicas, quando comparada a outros biopolímeros, tais como colágeno, quitina e gelatina (FISCHER et al., 2017). As gomas também são bastante usadas, como as gomas xantana, carragena e logusta. A goma xantana é um polissacarídeo obtido por fermentação pela bactéria *Xanthomonas*

*campestres*, muito utilizada por ser um agente espessante e estabilizante (GARCIA-OCHOA et al., 2000).

A *Diabetes Mellitus* (DM) destaca-se, atualmente, como uma importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo. O envelhecimento da população, a crescente prevalência da obesidade e do sedentarismo, e os processos de urbanização são considerados os principais fatores responsáveis pelo aumento da incidência da Diabetes Mellitus (FLOR; CAMPOS, 2017). Para o tratamento da DM insulino-dependente se faz necessária a administração parentérica de insulina exógena, várias vezes ao longo do dia, para obter um bom controle glicêmico (REIS, 2008). Desenvolver uma forma de administração alternativa para a insulina suficientemente segura ou eficaz ainda é um desafio nos dias de hoje.

A via transdérmica direcionada para uma ação sistema de ativos tem sido cada vez mais estudada. No entanto, o fármaco necessita permear o estrato córneo para chegar ao seu local de ação, uma vez que a pele é uma barreira natural a ser vencida. Várias estratégias têm sido elencadas, como o uso de promotores da permeação cutânea (MARTINS; VEIGA, 2002). Neste sentido, os líquidos iônicos emergiram como substâncias de elevado potencial como promotores da permeação transdérmica (ZAKREWSKY et al., 2014).

Considerando os fatos mencionados objetivou-se, nesta proposta de pesquisa, desenvolver um filme biopolimérico a partir da nanocelulose bacteriana e goma xantana para veiculação tópica de insulina, tendo o líquido iônico geranato de colina como agente promotor da permeação cutânea.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Diabetes Mellitus

A (DM) é uma doença crônica e metabólica que afeta milhões de pessoas em todo o mundo e é caracterizada por níveis elevados de glicose no sangue produzidos por uma deficiência absoluta de secreção de insulina ou em sua ação. Isso produz inúmeras complicações a longo prazo, como retinopatia, nefropatia e neuropatia, entre outros (BONDIA et al., 2010).

A (DM) é uma doença prevalente, classificada como uma epidemia pela Organização Mundial de Saúde (OMS), com incidência aumentando de modo alarmante nos países em desenvolvimento, tanto em adultos quanto em adolescentes (MARASCHIN et al., 2010). O Atlas Internacional da Federação Internacional de Diabetes (IDF) 2015 estimou que 415 milhões de pessoas em todo o mundo têm diabetes. Este número deverá aumentar para 642 milhões em 2040 (SABERZADEH-ARDESTANI et al., 2018).

A Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) compreende 5-10% de todas as causas de diabetes e é uma das doenças autoimunes mais frequentes no início da vida. A incidência da (DM1) está aumentando em todas as populações (SABERZADEH-ARDESTANI et al., 2018). A (DM1) é uma doença auto-imune que resulta da destruição das células beta em ilhotas pancreáticas. Embora possa ocorrer em qualquer idade, a (DM1) apresenta-se mais tipicamente na adolescência com início de pico em torno da puberdade (SABERZADEH-ARDESTANI et al., 2018). A (DM1) é uma doença crônica caracterizada pela destruição parcial ou total das células  $\beta$  das ilhotas de Langerhans pancreáticas, resultando na incapacidade progressiva de produzir insulina. Neste sentido, o tratamento pode ser realizado com a aplicação de múltiplas doses de insulina (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2014-2015).

A correta classificação do tipo da Diabetes Mellitus leva mais precocemente ao tratamento adequado, com maior índice de sucesso na obtenção de um bom controle glicêmico. E compreende quatro categorias: DM tipo 1; DM tipo 2; e Diabete Gestacional (MARASCHIN et al., 2010) descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Classificação etiológica da *Diabetes Mellitus*.

	<b>Tipo 1</b>	<b>Tipo 2</b>	<b>Gestacional</b>
<b>Características</b>	Início súbito; sede e fome acentuadas; micção frequente; fadiga; náuseas e vômitos; perda de peso	Início lento; sede acentuada; micção frequente; fadiga; cicatrização difícil de feridas; formigamento nas mãos ou nos pés; infecções frequentes; perda de peso	Sede acentuada; micção frequente; fadiga e outros sintomas semelhantes aos do tipo 2
<b>Idade de Início</b>	Em geral aos 20 anos ou na infância	Em geral aos 40 anos ou mais, embora o número de casos esteja aumentando entre jovens	Faixa etária reprodutiva
<b>Condição Física</b>	Em geral, pessoa magra ou de peso normal	Em geral, pessoa com excesso de peso	Gestante
<b>Causa</b>	O sistema imune destrói as células b do pâncreas que produzem insulina	Falta de exercício, alimentação inadequada e consequente obesidade; genética	Hormônios produzidos pela placenta impedem a ação da insulina
<b>Base do Tratamento</b>	Injeções de Insulina	Mudanças no estilo de vida, possivelmente complementadas por insulina e fármacos	Mudanças no estilo de vida, possivelmente complementadas com injeções de insulina

**Fonte:**

[https://www.google.com/search?q=tabelas+classifica%C3%A7%C3%A3o+diabetes+2018&rlz=1C1SQJL\\_ptBRBR793BR793&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwi7nqfEx5XfAhXCgJAKHS3ZBNoQ\\_AUIDygC&biw=1366&bih=657#imgdii=aXNJUi zKgiaPzM:&imgcr=1oLNcAH20JLLIM](https://www.google.com/search?q=tabelas+classifica%C3%A7%C3%A3o+diabetes+2018&rlz=1C1SQJL_ptBRBR793BR793&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwi7nqfEx5XfAhXCgJAKHS3ZBNoQ_AUIDygC&biw=1366&bih=657#imgdii=aXNJUi zKgiaPzM:&imgcr=1oLNcAH20JLLIM).

## 2.2. Insulina

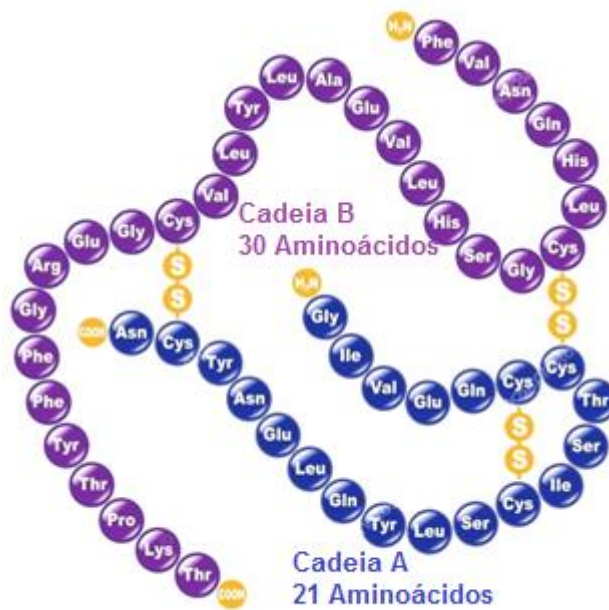
Além da redução da glicose no sangue, a insulina age no Sistema Nervoso Central (SNC) para regular o comportamento alimentar e o balanço de energia. Estudos em animais mostraram que a sinalização insulínica intracerebral interrompida causa aumento de peso e que a administração intracerebroventricular de insulina reduz a ingestão alimentar e o peso corporal (VAN GOLEN et al., 2014).

A terapia com insulina é usada no tratamento do Diabetes Mellitus, controlando a hiperglicemia em pacientes sofrendo de Diabetes tipo 1 (PANCHAL; SHAH; UPADHYAY, 2011). Para conseguir um controle metabólico junto aos portadores de diabetes, o tratamento com insulina exógena constitui-se em opção terapêutica eficiente, frente à deficiência parcial e/ou total da secreção de insulina pelo pâncreas (DE SOUZA; ZANETTI, 2000).

A insulina exerce um papel primordial na regulação da homeostase da glicose e atua de maneira coordenada em eventos celulares que regulam os efeitos metabólicos e de crescimento. A secreção de insulina é estimulada por substratos energéticos metabolizáveis pela célula B pancreática, sendo a glicose seu estímulo mais importante (HABER et al., 2002). As células B do pâncreas formando as ilhotas de Langerhans são responsáveis pela liberação de insulina. A insulina é um hormônio sendo constituída por duas cadeias peptídicas, sendo a cadeia A com 21 aminoácidos e a cadeia B com 30 aminoácidos unidas por duas pontes de dissulfeto (Figura 2).

A insulina não pode ser administrada por via oral, pois é degradado pelas enzimas digestivas e intestinais. Assim, a bioengenharia genética desenvolveu e passou a produzir quimicamente insulinas humanas sintetizadas por técnicas de recombinação de DNA, a partir de bactérias ou de células de outros tecidos, que se apresentam livres de impurezas e uma menor ação antigênica. Desta maneira, hoje temos insulinas de origem animal (suína, bovina ou mista) e humana disponíveis no mercado (DE SOUZA; ZANETTI, 2000).

**Figura 2.** Estrutura da insulina, formada por duas cadeias peptídicas unidas por pontes de dissulfeto.



**Fonte:**

[https://www.google.com/search?q=mol%C3%A9cula+da+insulina&rlz=1C1SQJL\\_ptBRBR793BR793&tbm=isch&tbo=u&source=univ&sa=X&ved=2ahUKEwjtcio7ZXfAhVCHpAKHTQ4A\\_gQsAR6BAgDEAE&biw=1366&bih=657#imgrc=elpd08Rh4rgAUM](https://www.google.com/search?q=mol%C3%A9cula+da+insulina&rlz=1C1SQJL_ptBRBR793BR793&tbm=isch&tbo=u&source=univ&sa=X&ved=2ahUKEwjtcio7ZXfAhVCHpAKHTQ4A_gQsAR6BAgDEAE&biw=1366&bih=657#imgrc=elpd08Rh4rgAUM)

Um controle glicêmico rígido é necessário para atenuar as complicações crônicas na Diabetes Mellitus tipo 1, pois requer frequentes injeções diárias de insulina administradas por injeção subcutânea de agulha, caneta de insulina e cateteres conectados a bombas de insulina. Esses métodos são inconvenientes e levam a uma baixa adesão ao tratamento, um fator importante que compromete a qualidade de vida dos pacientes diabéticos (HADEBE et al., 2014).

A necessidade de administrar insulina de forma eficiente e eficaz levou a estudos e pesquisas de sistemas de liberação, como as vias oral, nasal, bucal, pulmonar, retal, ocular e transdérmica. A pele que se tornou cada vez mais uma rota de entrega para diversos tipos de drogas gerou um grande interesse. A via transdérmica é uma alternativa atraente para a insulina, pois pode oferecer a adesão correta ao tratamento do paciente e liberação controlada ao longo do tempo, evitando a degradação no trato gastrointestinal ou efeitos hepáticos de primeira passagem (HADEBE et al., 2014).

### 2.3 Pele e Promotores de Permeação Transdérmica

A pele presente no corpo humano funciona como um revestimento externo do corpo e exercem variadas e importantes funções tais como: proteção e defesa de agentes externos (barreira microbiana, química, radiação, térmica) regulação térmica, percepção sensorial, secreção, regulação da pressão sanguínea, regulação hídrica, metabolismo e excreção e respostas imunológicas. Sendo a pele uma barreira por excelência, não é contudo um órgão isolado, e encontra-se associada a muitos sistemas de órgãos, nomeadamente o sistema músculo-esquelético, neurológico, circulatório, endócrino e imunitário. A pele é considerada o maior e o mais pesado sistema de órgãos e é idêntico em todos os grupos étnicos (RAFEIRO, 2013).

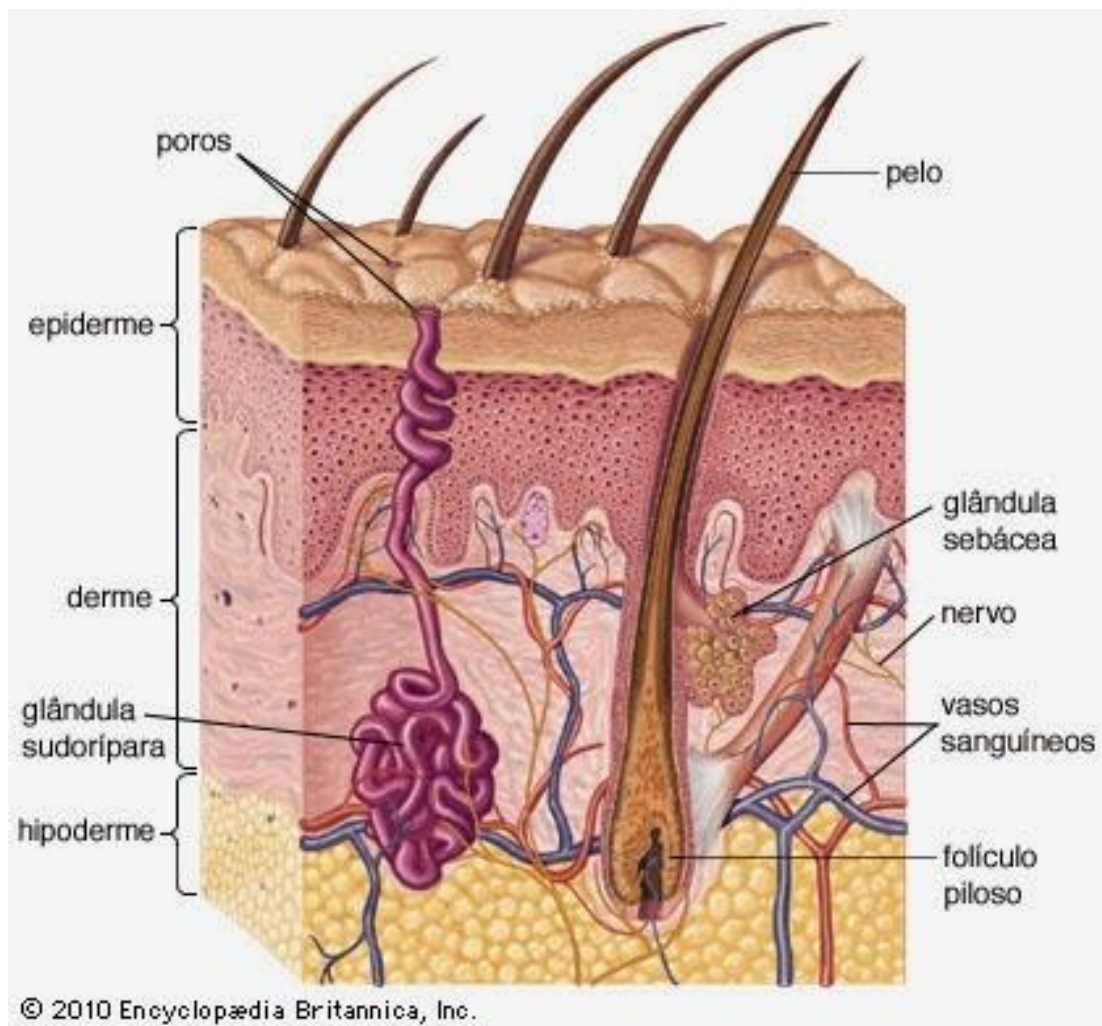
A pele tem importante função estética, é avaliada a aparência, o toque, a maciez, os odores exalados e a coloração. A pele também tem conotações de ordem social, racial e sexual, devido à sua função sensorial (HARRIS, 2009; AZULAY; AZULAY; AZULAY- ABULAFIA, 2008).

Recentemente surgiu o conceito da pele como barreira semipermeável, isso foi devido a avaliação do estrato córneo como a principal barreira difusional da epiderme. A permeabilidade da pele reside em dois aspetos fundamentais: a sua anatomia e a sua bioquímica (RAFEIRO, 2013).

A pele é considerada uma importante via de administração (tanto local quanto sistêmica) de fármacos. Muitas são as vantagens apresentadas por essa via de administração: melhor absorção e concentração plasmática adequada do fármaco, diminuição da toxicidade e aumento da adesão do paciente ao tratamento devido a uma menor frequência de administração de doses (CHORILLI et al., 2007). Geralmente, a administração cutânea é utilizada quando um efeito local é desejado, porém, pode alcançar-se um efeito sistêmico (RANG et al., 2007). Para que a permeação transdérmica de princípios ativos ocorra, é preciso levar em consideração dois pontos importantes: as substâncias que compõem o veículo que facilita a penetração do princípio ativo, e a natureza química do fármaco em questão (AZULAY; AZULAY; AZULAY- ABULAFIA, 2008).

A pele é composta por basicamente três camadas (Figura 3): a epiderme, que é a camada epitelial mais externa, a derme, que é a camada intermediária, e a hipoderme, que é a camada mais profunda e que é constituída de lóbulos de lipócitos. Exibe ainda os denominados anexos cutâneos, sendo eles o folículo pilossebáceo, o folículo piloso, as glândulas sebáceas e as glândulas sudoríparas (AZULAY; AZULAY; AZULAY- ABULAFIA, 2008).

**Figura 3.** Estrutura geral da pele humana.



**Fonte:**

[https://www.google.com.br/search?biw=1440&bih=789&tbm=isch&sa=1&ei=VA8DXNL9PIzCwATDzLCwCQ&q=estrutura+da+pele&oeq=estrutura+da+pele&gs\\_l=img.1.0.0i9i0i5i30.37887.50684..52905...0.0..4.149.3842.6j29.....2....1..qwszimg.....0..35i39j0i67i0i10i0i10i30i0i10i24.SRjVlttKQ5k#imgrc=52QAr7I3NOxgEM](https://www.google.com.br/search?biw=1440&bih=789&tbm=isch&sa=1&ei=VA8DXNL9PIzCwATDzLCwCQ&q=estrutura+da+pele&oeq=estrutura+da+pele&gs_l=img.1.0.0i9i0i5i30.37887.50684..52905...0.0..4.149.3842.6j29.....2....1..qwszimg.....0..35i39j0i67i0i10i0i10i30i0i10i24.SRjVlttKQ5k#imgrc=52QAr7I3NOxgEM)

Além disto, a composição da pele torna este órgão uma barreira de proteção eficaz, sendo impermeável a moléculas estranhas, especialmente moléculas de grande tamanho e hidrofílicas, tais como a insulina. O estrato córneo, a camada mais

externa da pele, é responsável por esta impermeabilidade, sendo constituído por uma associação entre queratinócitos e lípidos (LASSMANN-VAGUE; RACCAH, 2006; KHAFAGY et al., 2007). Com o intuito de ultrapassar este obstáculo, e permitir a absorção de insulina, vários métodos de enfraquecimento do estrato córneo têm sido testados ao longo do tempo, nomeadamente métodos que incluem promotores de absorção, iontoforese, sonoforese e micro-agulhas (LASSMANN-VAGUE; RACCAH, 2006; KHAFAGY et al., 2007).

Uma vez que a pele é o maior órgão do corpo humano, a via transdérmica torna-se uma via apelativa para administração de insulina. As suas principais vantagens são a sua complacência e a possibilidade de libertação controlada no tempo, a eliminação da possibilidade de degradação do fármaco no trato gastrointestinal e também a administração indolor (KHAFAGY et al., 2007).

Os sistemas de libertação transdérmicos permitem a passagem de doses terapêuticas de fármaco através da pele, com o objetivo de atingir a corrente sanguínea, para exercer os seus efeitos a nível sistémico. A tecnologia envolvida na libertação transdérmica de fármacos consiste na absorção percutânea ou transdérmica (RAFEIRO et al., 2013).

O desafio da obtenção de formas farmacêuticas capazes de permear ativos de forma eficaz é exatamente o de favorecer a absorção de princípios ativos nas camadas da pele que atuam como barreiras para esta permeação. Por este motivo, estratégias têm sido utilizadas como, por exemplo, o uso de nanotecnologia no desenvolvimento e produção de fármacos, capazes de promoverem a libertação através da pele, e disto surgem formas farmacêuticas como microemulsões, nanoemulsões e nanopartículas, com propriedades fisicoquímicas e farmacotécnicas apropriadas para o uso transdérmico (SILVA et al., 2010).

Apesar da atividade metabólica da pele, a sua função barreira tem sido um dos mais importantes objetos de estudo ao longo dos anos. A função barreira do estrato córneo pode ser modificada através de numerosas técnicas e pela aplicação de diversas substâncias. O aumento da permeabilidade da pele para diversos fármacos pode ser conseguido mediante a coadministração de promotores químicos de permeação ou pelo uso de promotores físicos de permeação (RAFEIRO et al., 2013).

Além disto, promotores de absorção podem incrementar a permeabilidade cutânea, aumentando o coeficiente de partição do fármaco administrado ou a ação termodinâmica do mesmo, e modificando a composição do estrato córneo, através da quebra da estrutura lipídica (LASSMANN-VAGUE;RACCAH, 2007; LI et al., 2008).

É inegável que a administração transdérmica é mais vantajosa do que a terapia oral, se considerada a possibilidade de obter uma entrega de ativo controlada e prolongada no sangue e evitar o metabolismo de primeira passagem no fígado, o que garante uma maior biodisponibilidade consistente de substâncias ativas. Além disso, a administração indolor, não invasiva e fácil de filmes, adesivos transdérmicos e formulações pode melhorar a aceitação do paciente (QUINTÃO et al., 2015).

A promoção de permeação de fármacos através da pele pode ter os seguintes resultados: a) melhoramento da liberação do fármaco a partir de preparações farmacêuticas transdérmicas; b) aumento do fluxo de fármaco através da pele ou retenção de fármaco nesta; c) aumento da liberação localizada, tópica ou dos tecidos alvo através da pele; d) combinação de todos os itens descrito (MARTINS; VEIGA, 2002).

Com o objetivo de, por um lado, ultrapassar os problemas devidos à impermeabilidade da pele e à variabilidade biológica e, por outro, de aumentar o número de fármacos candidatos ao desenvolvimento de medicamentos transdérmicos, vários métodos para remover, reversivelmente, a resistência desta barreira da pele têm sido investigados, entre os quais, a utilização de promotores de permeação (MARTINS; VEIGA, 2002).

Os promotores de permeação são compostos químicos, por si só, farmacologicamente inativos, mas que podem permear ou interagir com constituintes do estrato córneo, quando incorporados numa formulação transdérmica e, deste modo, diminuir a resistência da pele à difusão do fármaco. Um promotor de permeação deve potencializar a ação do fármaco, resultando no aumento do seu fluxo (MARTINS; VEIGA, 2002).

Outros métodos para aumentar a liberação de fármacos na pele baseiam-se na modificação físico-química de fármacos com capacidade de permeação fraca em pró-fármacos que permeiem a pele com facilidade, o uso de tensoativos, lipossomas e

pares iônicos, ou, mais recentemente, métodos elétricos, tais como a eletroporação e iontoforese, a aplicação de ultrassom (a sonoforese) e a terapia gênica (MARTINS; VEIGA, 2002).

No entanto, nos dias atuais, os promotores químicos representam a abordagem mais estudada para o aumento da permeação transdérmica. A utilização destes compostos é relativamente de baixo custo e fácil de formular, o que facilita a sua aplicação e permite liberdade de autoadministração (SOARES et al., 2015).

O promotor de permeação ideal será aquele que apresenta as seguintes características: farmacologicamente inerte, não-tóxico, de ação imediata, não-irritante, não alérgico, de ação reversível, química e fisicamente compatível com o fármaco e excipientes, aceitável cosmeticamente, inodoro, insípido, incolor, acessível e com boas propriedades solventes (MARTINS; VEIGA, 2002).

Recentemente, líquidos iônicos surgiram como substâncias “potencialmente” capazes de facilitar a permeação cutânea melhorando a entrega de agentes terapêuticos nas camadas mais profundas da pele. Estes compostos químicos podem ultrapassar as barreiras de proteção da camada córnea, permitindo a permeação de moléculas bioativas por eles carregadas (ZAKREWSKY et al., 2014).

### **2.3.1 Líquidos Iônicos**

Os líquidos iônicos são essencialmente sais em estado líquido que podem ser preparados a partir de materiais pouco dispendiosos e com *status* GRAS (*Generally Recognized As Safe*). Os líquidos iônicos são caracterizados por serem extremamente estáveis a altas temperaturas e pressões e, enquanto a força das ligações iônicas torna sólidos a maior parte dos sais, o tamanho elevado de certas moléculas reduz os pontos de fusão dos sais de tal forma que estes compostos são líquidos à temperatura ambiente exibindo, no entanto, alta viscosidade (GOINDI et al., 2014; GHANDI, 2014).

A expressão “líquido iônico” (LI) abrange duas formas de compreensão que poderiam ser consideradas. Uma delas, entende-se como uma solução contendo íons dissociados, como por exemplo uma solução de cloreto de sódio. Em outra, sais que foram submetidos a altas temperaturas até atingirem o ponto de fusão (geralmente acima de 700° C). Deste modo, qualquer composto que apresente uma estrutura

cristalina iônica-covalente que esteja em estado líquido, a princípio, poderia ser considerado um sal iônico, ou sal fundido. Contudo, há um consenso de que o termo “líquido iônico” se refere a compostos iônicos que apresentam ponto de fusão abaixo de 100 °C. Tipicamente, os líquidos iônicos são compostos com excelente estabilidade química e térmica, pressão de vapor desprezível, baixa viscosidade (relativa aos sais fundidos) e muitos deles, descritos como menos agressivos ao meio ambiente (PINTO, 2016).

Desde a descoberta dos LI, muitas aplicações têm sido relatadas em função de suas interessantes características em inúmeras áreas. Na área farmacêutica, os LI estão sendo empregados no preparo e na obtenção de microemulsões (ZHOU; LUO; FU, 2014), como agentes facilitadores de permeação cutânea e como antimicrobianos (ZAKREWSKY et al., 2014) e também em sistemas de administração oral para fármacos pouco solúveis em água (WILLIAMS et al., 2014).

Em seu trabalho, Zakrewsky e colaboradores (2014) reportaram líquidos iônicos polivalentes derivados do ácido gerânico (geranato de colina) e do ácido oléico (oleato de colina) que exibiram toxicidade mínima tanto para as células epiteliais, e melhoria efetiva da permeação transdérmica para a entrega de fármacos.

Provavelmente, e dependendo de sua estrutura química, os líquidos iônicos são capazes de solubilizar moléculas anfipáticas e, desta forma, atuar como solventes ideais para entrega tópica e transdérmica de fármacos. É provável que as moléculas líquidas iônicas deslizem através dos compostos graxos que compõem as células da pele, criando pequenas aberturas transitórias através das quais as moléculas bioativas (carregadas pelo líquido iônico) podem permear (ZAKREWSKY et al., 2014).

## **2.4 Sistemas Poliméricos para a Veiculação de Ativos na Pele**

Diferentes sistemas de transporte para a veiculação de ativos na pele têm permitido o uso de para uma variedade de princípios ativos. Para tal, uma grande gama de polímeros naturais pode ser utilizada para a preparação de sistemas poliméricos de transporte, dos quais se destacam os peptídeos, as proteínas e os polissacarídeos (SEVERINO et al., 2011; SOARES et al., 2015).

A liberação transdérmica de fármacos apresenta diversas vantagens terapêuticas, quando comparada com administração de fármacos por via oral ou parentérica, uma vez que:

- ❖ Evita dificuldades provocadas pelo pH gastrointestinal, por atividade enzimática; e por interações medicamentosas e alimentares;
- ❖ Substitui a administração oral quando esta via é inadequada, como nos casos de vômito e ou diarreia;
- ❖ Uma vez atingido o estado estacionário permite a administração contínua de ordem zero;
- ❖ Evita o efeito de primeira passagem, ou seja, não permite a passagem do fármaco pelo sistema porta, e pelos sistemas após a absorção gastrointestinal, não ocorrendo assim, a inativação do fármaco pelas enzimas hepáticas e digestivas;
- ❖ Evita os riscos e as inconveniências da administração parentérica, e da administração oral (absorção variável);
- ❖ Proporciona a administração de várias doses com uma única aplicação diária;
- ❖ Aumenta a atividade de fármacos com tempo de semi-vida curto, devido ao reservatório do sistema e às suas características de liberação controlada;
- ❖ Permite uma rápida interrupção da terapêutica, com a sua remoção (RAFEIRO et al., 2013).

As desvantagens destes sistemas transdérmicos em comparação com as suas vantagens, são muito reduzidas, o que torna este sistema bastante viável, sendo:

- ❖ A via transdérmica é inadequada para fármacos que provocam irritação ou sensibilização da pele;
- ❖ Apenas os fármacos relativamente potentes e com propriedades físico-químicas adequadas, é que são bons candidatos para a liberação transdérmica, devido à impermeabilidade cutânea (RAFEIRO et al., 2013).

Dentre diversos sistemas de entrega de ativos na pele, o sistema tipo “filme” é uma nova abordagem que pode ser usada como alternativa às formulações tópicas e transdérmicas convencionais. O filme pode ser um material polimérico que atua como matriz para libertação do fármaco na pele. Filmes biodegradáveis baseados em polímeros de origem natural têm sido amplamente investigados em vários estudos biomédicos aplicações, incluindo engenharia de tecidos, cicatrização de feridas, devido à biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades similares aos tecidos humanos (PEREIRA; MENDES; BARTOLO, 2013). Assim filmes preparados a partir de biomateriais representam uma alternativa aos sistemas convencionais e apresentam a vantagem de tornar o tratamento mais confortável e funcional, uma vez que são transparentes e impermeáveis a células bacterianas impedindo assim a contaminação microbiana do local afetado. Além disso, a capacidade de liberar de forma controlada ou prolongada o fármaco utilizado no tratamento diminui o número de vezes necessárias para troca do produto, promovendo o aumento da adesão do paciente ao tratamento (SOUZA et al., 2013; SCHOEDER et al., 2007). Os filmes de biopolissacarídeos são também de particular interesse no tratamento da pele danificada, devido à sua baixa toxicidade, potencial para liberação prolongada de fármacos e capacidade umectante (YAN; POCHAN, 2010; MURPHY et al., 2012; SONG; RANE; CHRISTMAN, 2012). Os filmes formados por biopolissacarídeos podem ser considerados sistemas de liberação controlada para fármacos de aplicação tópica, dependendo do tipo de formulação e aplicação em que são utilizados (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009; GANJI et al., 2010). A capacidade de interação com as entidades biológicas torna os biopolímeros ótimas escolhas para aplicações biomédicas (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2006).

Grande parte das moléculas de origem biológica (como os polissacarídeos e as proteínas) apresentam estrutura macromolecular, podendo ser denominadas de (bio)polímeros naturais. Estes compostos apresentam características particulares, que permitem diferenciá-los dos polímeros sintéticos. Entre tais características pode ser observada a existência de cadeias de mesmo tamanho e a elevada especificidade e organização molecular (ORÉFICE et al., 2006; (DEMIRCI; KHADEMHOSEINI, 2016). As moléculas de (polis)sacarídeos são basicamente constituídas de carbono, oxigênio e hidrogênio. Neste grupo de compostos estão inclusos açúcares simples, denominados monossacarídeos, e seus polímeros, denominados polissacarídeos. Os

monossacarídeos e os resíduos de polissacarídeos contêm muitos grupos hidroxilo, podendo ser portanto considerados como álcoois (MORAN et al., 2013).

Dentre os materiais amplamente utilizados para a obtenção de filmes de biopolissacarídeos encontram-se as gomas de origem natural, tais como as gomas de carragenana, xantana, gelana, alfarroba, colágeno, entre outras (ASSIS; DE BRITTO, 2014). A nanocelulose microbiana também tem surgido como uma alternativa promissora em função de suas interessantes características.

## 2.5 Nanocelulose Bacteriana

A nanocelulose bacteriana (BCN) é um polímero isento de lignina obtido a partir de culturas de *Gluconacetobacter xylinus* (HESTRIN; SCHRAMM, 1954; IGUCHI; YAMANAKA; BUDHIONO, 2000).

*G. xylinus* é uma bactéria Gram-negativa pertencente à família *Acetobacteriaceae*, aeróbia estrita que realiza a oxidação incompleta de diversos açúcares e álcoois, tendo como hábitat natural frutos e vegetais em processo de decomposição. A produção de nanocelulose bacteriana (BCN) por *G. xylinus* pode ser obtida em laboratório utilizando cultivos tanto em meios sólidos como líquidos (DOMINI et al., 2010).

Quando cultivada em condições adequadas, esta bactéria tem a capacidade de secretar feixes de cadeias de celulose como parte de seu metabolismo, na forma de um exopolissacarídeo e, portanto, permite a produção em larga escala dessas membranas, as quais podem variar em espessura dependendo da extensão temporal da cultura (KLEMM et al., 2005; CZAJA et al., 2006). As cadeias de celulose são formadas por  $\beta$ -D-glucopirranose, contendo três grupos hidroxila. Quando a nanocelulose bacteriana é produzida em condições estáticas, duas superfícies distintas são formadas. O lado que compreende a interface ar / líquido tem uma densidade mais elevada de fibra (superfície superior) e do lado oposto mostra uma menor densidade de fibras e uma superfície mais porosa (superfície inferior). A membrana de nanocelulose bacteriana é caracterizado por uma estrutura de rede fibrosa ultrafina 3D, contendo cerca de 99% de água (REIS, 2016). Como característica notável, a nanocelulose bacteriana apresenta uma grande rede

arquitetónica tridimensional aleatória composta de feixes de cadeias de celulose embaladas para formar fitas nanométricas (KLEMM et al., 2005).

Quando hidratada, a membrana de nanocelulose bacteriana apresenta grandes poros ao longo de toda a estrutura (KLEMM et al., 2005), resultando numa potencial e vasta interface para interações (YANO et al., 2005). A estrutura das membranas nanocelulose lhe confere propriedades únicas, como a capacidade de retenção de água, resistência mecânica, a porosidade e a biocompatibilidade (REIS, 2016). Devido às propriedades deste material a nanocelulose bacteriana tem sido extensivamente utilizada em aplicações da engenharia de tecidos (REIS, 2016). Muitos autores descreveram membranas de nanocelulose bacteriana como plataforma ideais para liberação de fármacos (REIS, 2016).

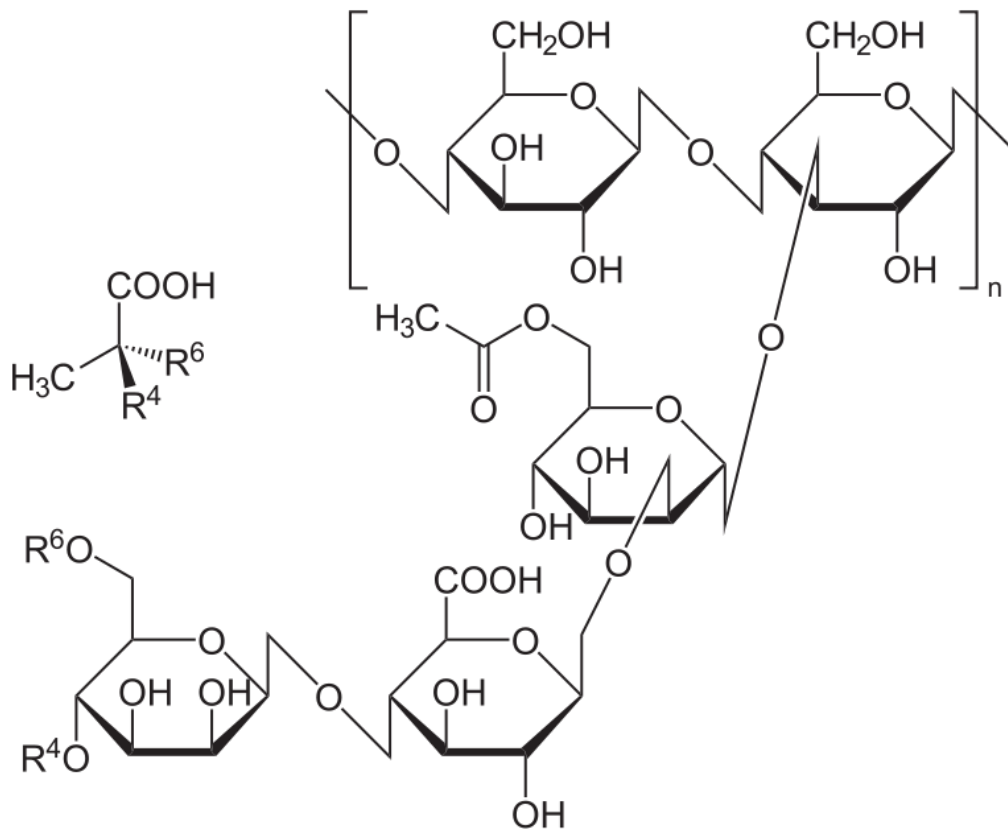
Segundo Barud et al. (2008), sob determinadas condições a nanocelulose bacteriana pode dar origem a sistemas híbridos completamente homogêneos. O polissacarídeo celulósico, obtido por síntese bacteriana constitui um biomaterial alternativo. Em estudos publicados na literatura da especialidade, a nanocelulose bacteriana mostrou ser um produto seguro, de baixa toxicidade (CASTRO et al., 2004), biocompatível (DE LUCENA et al., 2015), com a capacidade de estimular o crescimento e a diferenciação celular - característica promissora para a engenharia de tecidos (FRAGOSO et al., 2014). Estudos pré-clínicos e clínicos demonstraram que esse biomaterial foi funcional e eficaz tanto como barreira mecânica como adjuvante no tratamento de lesões ulcerativas (TEIXEIRA et al., 2014) e feridas cirúrgicas (MARTINS et al., 2013).

## **2.6 Goma Xantana**

A goma xantana, um heteropolissacarídeo obtido por fermentação de bactéria *Xanthomonas campestris*, é utilizada em indústrias farmacêuticas, de cosméticos e de alimentos como espessante, dispersante e emulsificante. É um polímero atóxico, estável em amplas faixas de pH e temperatura, capaz de formar gel elástico e com alta resistência de ruptura (VEIGA, 2009; LOPES et al., 2015).

A goma xantana é um exopolímero ácido de cadeia linear (1-4) -d-glicose, semelhante à glucose. Apresenta-se com uma estrutura primária composta de repetidas unidades pentassacarídicas, constituída de unidades de  $\beta$ -D glicose unidas por ligação 1-4, formando a cadeia principal celulósica como pode ser visualizada na Figura 4 (BORGES; VENDRUSCOLO, 2008).

**Figura 4.** Formula estrutural da goma xantana.



**Fonte:** [https://en.wikipedia.org/wiki/Xanthan\\_gum#/media/File:Xanthan.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Xanthan_gum#/media/File:Xanthan.svg).

A produção e comercialização de goma xantana como espessante e estabilizador tem aumentado progressivamente em uma taxa anual de 5-10%, devido a suas excelentes propriedades físico-químicas (LUVIELMO et al., 2016). Ultimamente, esta goma tem sido empregada na produção de filmes polímeros, hidrogéis e *scaffolds* para aplicações biomédicas e medicamentosas, obtendo-se produtos biodegradáveis, atóxicos, com adequadas propriedades funcionais (DISHA et al., 2016; LIU; YAO, 2015).

## 2.7 Estabilização Estrutural e Funcional de Entidades Proteicas

Por serem componentes do metabolismo de todos os seres vivos, os biopolímeros são materiais interessantes para aplicações biotecnológicas e industriais. Neste sentido, a estabilização estrutural e funcional de entidades proteicas torna-se muito importante, devido ao aumento de aplicações destes biomateriais em diversas áreas, mas com utilização mais expressiva nas áreas farmacêutica e biomédica (BALCÃO; VILA, 2015; IYER; ANANTHANARAYAN, 2008; VILLEGAS et al., 1996).

O processo de estabilização de entidades proteicas visa a preservação estrutural e funcional destes biocompostos. Este processo é adotado também para a estabilização de outras moléculas de natureza proteica, como enzimas, proteínas recombinantes, bacteriófagos, anticorpos monoclonais e peptídeos (BALCÃO; VILA, 2015).

Nas aplicações biofarmacêuticas em que se deseja utilizar proteínas, são encontrados três principais desafios para a estabilização das mesmas, sendo eles (IYER; ANANTHANARAYAN, 2008; MOZHAEV; MARTINEK, 1990; BALCÃO; VILA, 2015):

- ❖ **Estabilidade operacional** – capacidade da proteína para manter suas propriedades após os processos de produção;
- ❖ **Estabilidade termodinâmica** – capacidade de manter a conformação de enovelamento, para evitar sua desnaturação quando em contato com diferentes meios;
- ❖ **Estabilidade *in vivo*** – capacidade de se manter estável após penetrar na célula-alvo.

A estabilização estrutural e funcional de entidades proteicas baseia-se na redução dos movimentos moleculares e, assim, na eliminação das transições conformacionais enquanto a biomolécula ainda está em seu estado funcional (estado nativo). A estabilidade de proteínas multiméricas é dependente de sua concentração, pois por se tratar de uma estrutura (multimérica), resulta em baixa estabilidade térmica

devido a um mecanismo de dissociação das suas subunidades (BALCÃO; VILA, 2015; MATEO et al., 2006; LOPEZ-GALLEG et al., 2007).

Os avanços relacionados com a estabilização estrutural e funcional de entidades proteicas, além de estáveis e ativas as proteínas, permitem também sua incorporação em produtos aplicados a diversas áreas, inclusive produtos farmacêuticos, que necessitem garantir tais propriedades (BALCÃO; VILA, 2015).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Desenvolver e avaliar um sistema híbrido bioinspirado e biomimético à base de nanocelulose de origem microbiana e goma xantana, contendo geranato de colina incorporado, para estabilização/liberação de insulina.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- ❖ Produzir biomembranas de nanocelulose bacteriana por fermentação por *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769 (*Acetobacter xylinus* Yamada (ATCC® 23769™)), e proceder à sua caracterização, físico-química e biológica;
- ❖ Sintetizar líquidos iônicos e realizar sua caracterização físico-química e biológica;
- ❖ Desenvolver e avaliar um filme biopolimérico híbrido à base de nanocelulose bacteriana e xantana, com incorporação do geranato de colina, visando a estabilização estrutural e funcional de insulina, com a polimerização a ser realizada por PVA (98% hidrolisado) a 1,25% (m/v) como agente polimerizante e com a adição de glicerol a 2,5% (m/v) para a indução de efeito plastificante;
- ❖ Avaliar a integração de insulina no filme biopolissacarídico otimizado, utilizando insulina Novolin NPH Humana;
- ❖ Avaliar as características de liberação e permeação transdérmica da proteína bioativa a partir dos filmes biopoliméricos, assim como proceder à sua caracterização físico-química.

## 4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

### 4.1. Material

#### 4.1.1. Reagentes e Consumíveis

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e foram usados sem qualquer purificação adicional. A água utilizada foi purificada em um sistema Master System All (modelo MS2000, Gehaka, São Paulo/SP, Brasil) para uma resistividade final de cerca de 18,18 M $\Omega$ .cm e condutividade de 0,05  $\mu$ S.cm<sup>-1</sup>.

A insulina humana (Novolin® N - Insulina Humana NPH (100 UI/mL; 3,5 mg<sub>insulina</sub> / mL)) foi adquirida do Novo Nordisk A / S (Kalundborg, Dinamarca). Coomassie Brilliant Blue G250 (ref. Sigma-Aldrich 27815-25G-F), ácido orto-fosfórico (85%, v / v; ref. Sigma-Aldrich V000145-1L) e etanol UVASOL™ para espectroscopia (99,8%, v / v; ref. Sigma-Aldrich 32205-1L) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis MO, EUA).

O glicerol foi adquirido da Cinética (Jandira / SP, Brasil). O metanol de grau analítico para HPLC (LiChrosolv®, CAS-No: 67-56-1) foi adquirido da Merck (Darmstadt, Alemanha). O álcool polivinílico (PVA) com um grau de hidrólise de 98% (PVA98) foi adquirido da Neon Comercial Ltda. (Suzano/SP, Brasil).

A goma xantana (XANTURAL® 180) foi gentilmente doada pela CPKelco (Limeira/SP, Brasil). Para espectroscopia (99,8%, v/v; ref. SIGMA ALDRICH 32205-1L), ácido gerânico (85% estabilizado; ref. SIGMA-ALDRICH W412101-1KG-K) e o bicarbonato de colina (ref. SIGMA-ALDRICH C7519-500mL) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis MO, EUA). Ácido oleico (P.A.) foi adquirido da LABSYNTH - Produtos para Laboratório (Diadema SP, Brasil).

#### 4.1.2. Material Biológico

A linhagem bacteriana utilizada na produção de nanocelulose (BNC) foi a *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769, fornecida pela Coleção de Culturas Tropicais - Fundação André Tosello (Campinas/SP, Brasil). O meio de crescimento microbiológico utilizado foi o Hestrin-Schramm, preparado de acordo com o procedimento descrito por (Jozala et al., 2015). O meio de Hestrin-Schramm (HS)

continha glicose (20 g / L), peptona (5 g / L), extrato de levedura (5 g / L), fosfato de sódio anidro (2,7 g / L) e ácido cítrico monohidratado (1,15 g / L).

As sementes de cebola comuns (cultivar *Baía Periforme*) utilizadas nos ensaios de *Allium cepa* foram adquiridas da FELTRIN® (Farroupilha/RS, Brasil). As linhagens celulares HaCaT (queratinócitos humanos imortalizados) e 3T3 utilizadas nos ensaios de genotoxicidade (Cometa™) foram adquiridas da Sigma-Aldrich (ref. SIGMA S200-05N) (St. Louis MO, EUA). As células foram mantidas a 37 °C sob atmosfera úmida com 5% CO<sub>2</sub>, em meio de crescimento DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) contendo D-glucose (4,5 g/L), L-glutamina (584,0 mg/L), piruvato de sódio (100 mg/mL), bicarbonato de sódio (3,7 g/L) (Gibco Life Technologies, São Paulo/SP, Brasil), suplementado com 10% (m/m) de soro fetal bovino e 1% (m/m) de antibióticos (penicilina (100 UI/mL) e sulfato de estreptomicina (100 µL/mL)).

#### 4.1.3. Equipamentos Analíticos e Outros

A reativação da bactéria *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769 e a produção de nanocelulose bacteriana foram realizadas no Laboratório de Biofilmes e Bacteriófagos da UNISO (PhageLab-UNISO) onde foram utilizados os equipamentos: cabine de segurança biológica de classe II tipo B2 (modelo 4SP-SBIIB2-1266/4, SP-LABOR, Presidente Prudente/SP, Brasil), autoclave vertical (modelo AUTOCLAVE DIGITAL CS 50L, PRISMATEC, Manaus/AM, Brasil), estufa de incubação microbiológica (modelo 502, FANEM, São Paulo/SP, Brasil), geladeira da marca Electrolux (modelo DF80-553L, São Paulo/SP, Brasil). Para a preparação dos filmes biopoliméricos foram utilizados um agitador mecânico com aquecimento (modelo TE 0181, TECNAL, Piracicaba/SP, Brasil) e um banho de ultrason (modelo USC-3380A, UNIQUE, Indaiatuba/SP, Brasil).

A caracterização termogravimétrica das membranas de nanocelulose foi realizada por análise termogravimétrica enquanto as análises térmicas foram realizadas num calorímetro diferencial de varredura (DSC) também da TA Instruments (modelo MDSC 2910, New Castle, EUA), no Instituto de Química da UNICAMP (IQ-UNICAMP, Campinas/SP, Brasil).

Já as análises térmicas do biofilme contendo líquido iônico e insulina foram realizadas em um calorímetro diferencial de varredura (modelo DSC-60) da Shimadzu,

localizado no LaBNUS-UNISO (Parque Tecnológico de Sorocaba, Sorocaba/SP, Brasil).

As análises das membranas de nanocelulose e dos biofilmes contendo líquido iônico e insulina, foram realizadas em um microscópio eletrônico de varredura com emissão de campo (FESEM) da FEI (modelo QUANTA FEG 250, FEI Company, Hillsboro, EUA), no Instituto de Química da UNICAMP (IQ-UNICAMP, Campinas/SP, Brasil), enquanto as análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos biofilmes integrando líquido iônico e insulina, foram realizadas num microscópio eletrônico de varredura com energia dispersiva (DESEM) da LEO Electron Microscopy/Oxford (modelo Leo 440i, Cambridge, Inglaterra), equipado com um detector EDS da LEO Electron Microscopy/Oxford (modelo 6070, Cambridge, Inglaterra), no LRAC-FEQ (UNICAMP, Campinas/SP, Brasil).

Os espectros de infravermelho da nanocelulose bacteriana foram obtidos por espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) da AGILENT (modelo Cary 630, Santa Clara CA, E.U.A.) e os difratogramas de raios-X foram obtidos em um difratômetro de raios-X (DRX) da Shimadzu (modelo XRD7000, Kyoto, Japão), no IQ-UNICAMP (Campinas/SP, Brasil).

Os espectros do biofilme com líquido iônico e insulina foram obtidos através de um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) modelo IRAffinity da Shimadzu, localizado no LaBNUS-UNISO.

As análises de resistência à tração, resiliência e resistência à perfuração, dos filmes bio-origami, foram realizadas em um Texturômetro da Stabile Micro Systems (modelo TA-TX Plus, Godalming, Inglaterra), no LaBNUS-UNISO.

Todas as análises espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis da Agilent (modelo Cary 60 UV-Vis, Santa Clara CA, EUA) no PhageLab-UNISO (Sorocaba/SP, Brasil).

As análises de microscopia ótica para os ensaios Cometa™ foram realizadas em um microscópio ótico da Zeiss (modelo Axiovert-60, Carl-Zeiss, Göschwitzer Str., Jena, Alemanha), no LABITON-UNISO (Sorocaba/SP, Brasil).

## 4.2. Procedimentos Experimentais

### 4.2.1. Produção de Biomembranas de BNC

As biomembranas de nanocelulose bacteriana foram produzidas por cultura de *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769 em meio Hestrin-Schramm, seguindo o procedimento descrito por (Jozala et al., 2015), com modificações (Figura 5).

**Figura 5.** Procedimento esquemático utilizado para produção das biomembranas de nanocelulose bacteriana por cultura de *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769 em meio Hestrin-Schramm.



Fonte: Elaboração própria

Foi realizada cultura bacteriana estática em placas de cultura de 6 poços, por incubação de 1 mL de cultura bacteriana por poço (cerca de  $1 \times 10^6$  UFC) durante 4 dias a 27 °C. Após o crescimento bacteriano e produção do exopolissacarídeo, as biomembranas foram lavadas em solução aquosa de SDS (dodecilsulfato, 2%, m/m) (*overnight*), enxaguadas com água ultrapura até a completa remoção do SDS, e imersas em NaOH (1 mol) solução a 60 °C, com agitação magnética, durante 90 min. As biomembranas foram então esterilizadas em autoclave a 121 °C durante 15 min em água ultrapura e armazenadas a 4 °C até o uso.

#### **4.2.1.1. Ensaio de Adsorção de Insulina nas Biomembranas de Nanocelulose Bacteriana (BNC)**

As biomembranas de BNC (9,7468 g) foram imersas em solução salina (NaCl, 0,9% (m/m)) contendo insulina humana (NOVOLIN® N - Insulina Humana NPH do Novo Nordisk A / S (Kalundborg, Dinamarca)) (1 mg / mL), sob agitação magnética de aproximadamente 5 rpm, até que nenhuma proteína pudesse ser detectada no sobrenadante, visando sua incorporação nas matrizes de BNC. A mistura resultante foi mantida à temperatura ambiente, sob agitação magnética suave e, a intervalos de tempo pré-determinados, amostras de 500 µL da solução sobrenadante foram retiradas e analisadas quanto ao conteúdo proteico via método de Bradford modificado como descrito em Balcão; Vieira; Malcata (1996) e a mistura reacional adicionada com 500 µL de solução salina por forma a restabelecer o volume total. A experiência foi terminada quando um patamar foi alcançado (e mantido) na concentração de proteína adsorvida. Uma modificação do método de Bradford para quantificação de proteínas foi utilizada de acordo com o procedimento descrito por Robyt e White (1990) e Balcão et al. (1996): alíquotas de 500 µL das amostras de sobrenadante foram adicionadas a 4,5 mL da solução de trabalho de Coomassie Brilliant Blue G-250 (preparada de acordo com o procedimento descrito por (ROBYT; WHITE 1990; BALCÃO et al., 1996), incubadas à temperatura ambiente por 5 min e a absorbância medida a 595 nm utilizando cubetas de plástico descartáveis. Uma curva de calibração para proteína foi preparada usando soluções de albumina de soro bovino (BSA) em tampão fosfato (pH 7,4) em várias concentrações na faixa de 0-1000 µg/mL:  $Abs_{595nm} = 1,6554 \times C_{prot} / (0,1922 + C_{prot})$  ( $r = 0,99529$ ).

#### **4.2.1.2. Análise por Espectrofotometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).**

Os espectros de FTIR da insulina humana e de ambas as biomembranas BNC com e sem insulina adsorvida foram adquiridos, na faixa de números de onda de 4000  $\text{cm}^{-1}$  a 400  $\text{cm}^{-1}$ , com uma resolução de 2  $\text{cm}^{-1}$ , e usando apodização de Happ-Genzel, enquanto os espectros de FTIR dos filmes biopoliméricos contendo insulina e líquido iônico foram adquiridos, também na faixa de números de onda de 4000  $\text{cm}^{-1}$  a 400  $\text{cm}^{-1}$ , com uma resolução de 2  $\text{cm}^{-1}$ , e usando apodização de Happ-Genzel.

#### **4.2.1.3. Análises de Difração de Raios X (XRD).**

Difratogramas de raios X da insulina humana (NOVOLIN® N - Insulina Humana NPH da Novo Nordisk A / S (Kalundborg, Dinamarca)) e de ambas as biomembranas BNC com e sem insulina adsorvida foram coletadas, usando radiação de raios X de uma lâmpada de cobre com radiação  $K\alpha$  ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ) filtrada através de um alvo de Cu. A varredura de raios X foi realizada nos ângulos de difração de 2-Theta de 5° a 90°, com incrementos de 0,02 graus e taxa de 2° $\text{min}^{-1}$ , com uma tensão de 40 kV, intensidade de corrente elétrica de 30 mA, e potência de raios X de 3 kW.

#### **4.2.1.4. Análises Térmicas Via Termogravimetria (TGA) e Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).**

A caracterização termogravimétrica das biomembranas de BNC com insulina adsorvida foi realizada por análises de TGA, enquanto as análises térmicas às biomembranas de BNC com insulina adsorvida e aos filmes biopoliméricos contendo insulina e líquidos iônicos foram realizados por DSC.

As análises de TGA foram realizadas utilizando um termogravímetro da TA Instruments (modelo 2050, New Castle, E.U.A.), enquanto as análises de DSC foram realizadas por TA Instruments (modelo MDSC 2910, New Castle, E.U.A.).

A caracterização térmica das biomembranas de BNC integrando insulina humana foi realizada via TGA e DSC, seguindo o procedimento descrito por Rocha et al., (2017). Amostras (ensaios calorimétricos de DSC: cerca de 7,48 mg de biomembrana de BNC com insulina adsorvida e cerca de 13,42 mg de biomembrana

BNC simples; análises de TGA: cerca de 28,832 mg de biomembrana de BNC com insulina adsorvida) foram pesadas diretamente no interior de cadinhos de alumínio de alta pressão e devidamente selados por pressão. Um cadinho de alumínio de referência também foi preparado simplesmente por vedação de ar dentro de um cadinho vazio.

Para as análises de DSC, as amostras foram então submetidas a um aumento linear de temperatura de cerca 20 °C até 250 °C, a uma taxa de aquecimento constante de 10 °C min<sup>-1</sup>, sob uma atmosfera inerte mantida com um fluxo constante de nitrogênio de 50 mL min<sup>-1</sup>, durante o qual a quantidade de calor absorvida pelas amostras de BNC foi registrada, enquanto para as análises de TGA as amostras foram submetidas a um aumento de temperatura linear de cerca 10 °C até 600 °C, sob atmosfera inerte mantida com fluxo constante de argônio de 50 mL min<sup>-1</sup>. Durante as análises de DSC, os dados (absorção de calor) foram coletados a uma taxa de amostragem de 0,2 segundos por ponto de dados, enquanto que para as análises de TGA os dados foram coletados a uma taxa de amostragem de 2,0 segundos por ponto de dados.

#### **4.2.1.5. Análises de Microscopia Eletrônica de Varredura por Campo (FESEM).**

A superfície e a morfologia das biomembranas BNC e dos filmes biopoliméricos contendo insulina e líquido iônico foram analisadas em um microscópio eletrônico de varredura (FESEM) da FEI (modelo QUANTA FEG 250, Empresa FEI, Hillsboro, E.U.A.) equipado com uma fonte de emissão de campo. Amostras de biomembranas e dos filmes biopoliméricos foram congeladas a -196 °C com nitrogênio líquido, fraturadas e revestidas por pulverização catódica com um filme de Au / Pd (80% / 20%) em um suporte de carbono, utilizando um dispositivo de metalização da BAL-TEC (modelo BAL-TEC MED 020, BAL -TEC, Balzers, Liechtenstein). As fotomicrografias foram coletadas usando feixes de elétrons com energia de 10 keV.

#### **4.2.1.6. Propriedades de Resistência Mecânica das Biomembranas BNC**

As propriedades de resistência mecânica das biomembranas simples de BNC foram avaliadas usando um texturômetro da Stabile Micro Systems (modelo TA-TX Plus, Reino Unido). Especificamente, propriedades como resistência à perfuração (para avaliar a capacidade da biomembrana de resistir até à ruptura), relaxamento (para avaliar a interconexão da cadeia biopolimérica, que está relacionada às propriedades viscoelásticas da membrana de celulose bacteriana) e resiliência (para avaliar se a membrana acumularia energia quando deformada elasticamente, produzindo (ou não) uma deformação residual). Os parâmetros de determinação foram estabelecidos como distância de 5 mm para os testes de resistência à perfuração, distância de 2 mm para ambos os testes de resiliência e relaxamento, e uma força máxima de 5 kg para todos os testes. Todas as determinações foram realizadas em triplicata, com a água nas amostras sendo removida antes das determinações.

#### **4.2.1.7. Análise do Potencial de Indução de Aberrações Cromossômicas pelas Biomembranas BNC, através do Ensaio *Allium cepa*.**

O potencial de indução de aberrações cromossômicas pelas biomembranas de nanocelulose bacterianas, isto é, a sua potencial genotoxicidade, foi avaliado através do ensaio *Allium cepa*, utilizando-se sementes de cebola comum (cultivar *Baia Periforme*, Feltrin® (Farroupilha/RS, Brasil), permitindo observar alterações cromossômicas e nucleares nas células da ponta da raiz das sementes germinadas.

Para este teste, sementes de *Allium cepa* foram deixadas germinar em cima de papel de filtro (estéril) úmido dentro de placas de Petri. Após a germinação, as raízes foram coletadas no momento em que atingiram cerca de 20 mm de comprimento. As raízes foram então colocadas em contato com as biomembranas bacterianas de nanocelulose a serem testadas, por um período de 24 h. Água ultrapura foi usada como negativo. Também a água onde as membranas foram imersas foi testada, usando-se um volume mínimo desta água para cobrir as raízes.

Após este período, as raízes de *Allium cepa* foram removidas da biomembrana, do controle e da água onde as biomembranas a serem testadas foram imersas, lavadas com água ultrapura e adicionadas com solução fixadora (etanol absoluto:

ácido acético glacial, 3:1). Os frascos contendo as raízes foram então deixados à temperatura ambiente durante 6-8 h e armazenados sob condições de refrigeração.

Para preparação das lâminas de microscópio, as raízes de *Allium cepa* foram removidas da solução de fixação, devidamente lavadas três vezes com água ultrapura e submetidas a hidrólise ácida (1 mol/dm<sup>3</sup> HCl a 60 °C, durante 9 min). Após a etapa de hidrólise, as raízes foram lavadas três vezes com água ultrapura durante 5 min. O excesso de água foi então removido das raízes usando papel de filtro, e as raízes foram mergulhadas em reagente de Schiff (no escuro) por um período de 2 h.

Após esse período de tempo, as raízes foram removidas do reagente de Schiff e lavadas com água ultrapura até remoção do excesso de corante. A região meristemática das raízes (ponta corada) foi cortada sobre uma lâmina de vidro, adicionada de uma gota de Carmin acético (2%, m/v) (corante citoplasmático) e coberta com uma lamínula, e gentilmente batida com uma pinça para esmagamento das raízes e espalhando das células. As preparações foram então analisadas ao microscópio óptico (BATISTA-GALLEP et al., 2018).

#### **4.2.2. Ensaios de Permeação Transdérmica**

A permeação transdérmica da insulina adsorvida nas membranas de nanocelulose bacteriana e da insulina integrada nos filmes biopoliméricos contendo líquido iônico foi avaliada num sistema de permeação transdérmica de Franz da LOGAN INSTRUMENTS CORP. (modelo DHC-6T, Somerset NJ, E.U.A.). Para estes ensaios, discos de pele de orelha de porco (previamente preparada de acordo com o procedimento descrito por Salerno; Carlucci; Bregni (2010) foram cortados com 0,5 mm de espessura x 30 mm de diâmetro) e fixados entre as câmaras receptora e doadora (no topo do suporte) da célula de difusão de Franz (possuindo um orifício central com 15 mm de diâmetro, através do qual a solução receptora contacta com a membrana de orelha de porco). No topo desses discos de pele de orelha de porco, um disco de BNC contendo insulina adsorvida (ou um disco de filme biopolimérico contendo líquido iônico e insulina integrada) com o mesmo diâmetro externo (30 mm) foi cuidadosamente colocado eliminando-se a presença de quaisquer bolhas de ar, e 3 gotas de tampão fosfato (pH 7,4) foram adicionadas para hidratar a biomembrana BNC. No receptáculo de vidro inferior da célula de difusão de Franz (possuindo uma pequena barra magnética cilíndrica revestida com teflon), 8 mL de tampão fosfato

(desgaseificado) (pH 7,4) foram cuidadosamente injetados até tocar a superfície inferior do disco de pele de orelha de porco. Foi tomada precaução para assegurar que nenhuma bolha de ar residisse na câmara receptora, e a pele foi esticada para minimizar a presença de rugas e sulcos. Em intervalos de tempo pré-determinados (0, 15, 30, 60, 180, 360, 540, 720, 1380 e 1440 min), amostras de 2 mL da solução receptora sob o disco de pele de orelha de porco foram retiradas, e 2 mL de tampão fosfato fresco (pH 7,4) foram devidamente adicionados de modo a repor o volume. Cada amostra recolhida foi então analisada quanto ao teor de proteína através do método de Bradford modificado (Balcão, Vieira, Malcata, 1996), como descrito na seção 4.2.2.1.

#### **4.2.2.1. Quantificação do Teor de Proteína pelo Método de Bradford Modificado**

Utilizou-se uma modificação do método de Bradford para quantificação proteica de acordo com o procedimento descrito por Robyt e White, (1990) e Balcão; Vieira; Malcata (1996). Aliquotas de 500 µL da solução receptora foram adicionadas a 4,5 mL de solução de Coomassie Brilliant Blue G-250 (a solução de trabalho de Coomassie Brilliant Blue G-250 foi preparada de acordo com o procedimento descrito por Robyte e White (1990) e Balcão; Vieira; Malcata, (1996), incubadas à temperatura ambiente durante 5 min e a absorvância medida no comprimento de onda de 595 nm utilizando cubetas de plástico descartáveis.

Para construção da curva de calibração relacionando absorvância a 595 nm com concentração de proteína (mg/mL), preparou-se uma solução mãe de albumina sérica bovina (BSA) em água ultrapura, com a concentração de 1 mg/mL. A partir desta solução, prepararam-se diluições em água ultrapura com concentrações 0, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 µg/mL. A 500 µL de cada uma destas soluções, adicionou-se sequencialmente 4,5 mL de solução de Coomassie Brilliant Blue G-250, incubou-se à temperatura ambiente durante 5 min e a absorvância medida ao comprimento de onda de 595 nm utilizando cubetas de plástico descartáveis.

#### **4.2.3. Síntese de Líquidos Iônicos (LI) e seus Solventes Eutéticos Profundos (DES)**

As sínteses dos líquidos iônicos seguiram metodologias descritas por Zakrewsky et al (2014), sendo apresentadas abaixo:

**Síntese do líquido iônico geranato de colina (1:1):** uma proporção de bicarbonato de colina (cátion) para ácido gerânico (doador na ligação de hidrogênio) de 1: 1 foi usada para sintetizar um líquido iônico (LI) constituído apenas por pares de cátions e ânions. O LI foi preparado por neutralização com bicarbonato de colina. Em um balão de fundo redondo de 250 mL foram adicionados 20 mL de bicarbonato de colina a 80% (equivalente a 18,72 g ou 0,1113 mol de bicarbonato de colina puro). Na mesma proporção molar, ca. 23,12 mL de ácido gerânico a 85% foram adicionados, com um excesso de 1,88 mL (para garantir a máxima extensão da reação), resultando em um volume total de 25 mL de ácido gerânico a 85% (equivalente a 20,61 g ou 0,1220 mol de ácido gerânico puro). 20 mL de metanol foram então adicionados à mistura a fim de reduzir a viscosidade e melhorar a agitação (magnética) à temperatura ambiente, em um sistema aberto, durante a noite, até cessar a produção de CO<sub>2</sub>. O solvente foi removido subsequentemente usando um evaporador rotativo a 60 °C, durante 20 minutos. O LI resultante foi transferido para um tubo Falcon de 50 mL, o headspace preenchido com nitrogênio, e o tubo imediatamente tapado e selado com Parafilm™.

**Síntese de solvente eutéctico profundo geranato de colina (1:2):** uma proporção de bicarbonato de colina para ácido gerânico de 1:2 foi usado para sintetizar um solvente eutéctico profundo (DES) constituído apenas por pares de cátions e ânions. A um balão de fundo redondo de 250 mL foram adicionados 20 mL de bicarbonato de colina a 80% (equivalente a 18,72 g ou 0,1113 mol de bicarbonato de colina puro). Na sequência, 46,24 mL de ácido gerânico a 85% foram adicionados, com um excesso de 1,76 mL (para garantir uma extensão máxima da reação), resultando em um volume total de 48 mL de ácido gerânico a 85% (equivalente a 39,58 g ou 0,2350 mol de ácido gerânico puro). 20 mL de metanol foram então adicionados à mistura de modo a reduzir a viscosidade e melhorar a agitação (magnética) à temperatura ambiente, em sistema aberto, durante a noite, até cessar a produção de CO<sub>2</sub>. O solvente foi subsequentemente removido usando um evaporador rotativo, a 60° C, durante 20 minutos. O DES resultante foi transferido para um tubo Falcon com volume de 50 mL, o headspace preenchido com nitrogênio, e o tubo imediatamente tapado e devidamente selado com Parafilm™.

**Síntese do líquido iônico oleato de colina (1:1):** uma proporção de bicarbonato de colina (cátion) para ácido oleico (doador na ligação de hidrogênio) de 1:1 foi usada para sintetizar um líquido iônico (LI) constituído apenas por pares de cátions e ânions. O LI foi preparado por neutralização com bicarbonato de colina. Em um balão de fundo redondo de 250 mL foram adicionados 20 mL de bicarbonato de colina a 80% (equivalente a 18,72 g ou 0,1113 mol de bicarbonato de colina puro). Na mesma proporção molar, 35,95 mL de ácido oleico foram adicionados, com um excesso de 4,05 mL (para assegurar a máxima extensão da reação), resultando em um volume total de 40 mL de ácido oleico (equivalente a 35,6 g 0,1260 mol de ácido oleico puro); 20 mL de metanol foram então adicionados à mistura a fim de reduzir viscosidade e melhorar a agitação (magnética) à temperatura ambiente, de forma aberta, durante a noite, até cessar a produção de CO<sub>2</sub>. O solvente foi subsequentemente removido usando um evaporador rotativo, a 60 °C, durante 20 minutos. O LI resultante foi transferido para um tubo Falcon de 50 mL, o headspace preenchido com nitrogênio, e o tubo imediatamente fechado e devidamente selado com Parafilm™.

**Síntese de solvente eutético profundo de oleato de colina (1:2):** uma proporção de bicarbonato de colina para ácido oleico de 1:2 foi usada para sintetizar um solvente eutético profundo (DES) constituído apenas por pares de cátions e ânions. Em um balão de fundo redondo de 250 mL foram adicionados 8,75 mL de bicarbonato de colina a 80% (equivalente a 8,19 g ou 0,0496 mol de bicarbonato de colina puro). Na sequência, foram adicionados 31,42 mL de ácido oleico, com um excesso de 0,08 mL (para assegurar a máxima extensão da reação), resultando num volume total de 31,5 mL de ácido oleico (equivalente a 28,03 g ou 0,099 mol de ácido oleico puro); 20 mL de metanol foram então adicionados à mistura para reduzir a viscosidade e melhorar a agitação (magnética) à temperatura ambiente, de um modo aberto, durante a noite, até cessar a produção de CO<sub>2</sub>. O solvente foi subsequentemente removido usando um evaporador rotativo, a 60 °C, durante 20 minutos. O DES resultante foi transferido para um tubo Falcon de 50 mL, o headspace preenchido com nitrogênio e o tubo imediatamente tapado e devidamente selado com Parafilm™.

#### **4.2.3.1. Caracterização Biológica dos Líquidos Iônicos.**

##### **4.2.3.1.1. Potencial de Citotoxicidade pelo Método de Disco-Difusão em Ágar**

O potencial de citotoxicidade dos líquidos iônicos e seus respectivos solventes eutéticos profundos foi avaliado através da metodologia de disco difusão em ágar. A linhagem celular 3T3 foi plaqueada em placas de Petri de 50 mm, na concentração de  $1,5 \times 10^5$  células / mL utilizando meio de cultura DMEM suplementado com soro fetal bovino a 10% (m/m), por um período de 48 h a 37 °C, em uma câmara de incubação com 5% de CO<sub>2</sub> (g). Posteriormente, o meio líquido foi descartado e meio sólido "overlay" (meio Eagle 2x concentrado, ágar a 1,8% (m/m) contendo 0,01% (m/m) de vermelho neutro, foi adicionado. Após solidificação, as amostras (em disco de papel de filtro estéril) foram colocadas no centro da placa e estas incubadas por 24 horas a 37 °C, em ambiente com 5% de CO<sub>2</sub>. As leituras das placas inoculadas foram feitas macroscopicamente, onde a presença de citotoxicidade era observada pela formação de um halo claro em torno da amostra. correspondendo às células mortas, e microscopicamente, para as alterações morfológicas das células que circundam a amostra (PUSNIK et al, 2016).

#### **4.2.3.1.2. Potencial de Citotoxicidade pelo Método da Atividade Mitocondrial (Ensaio MTT)**

A avaliação do potencial de citotoxicidade dos líquidos iônicos foi também realizada em linhagem celular HaCaT (queratinócitos humanos imortalizados) utilizando-se MTT (4,5- de brometo de dimetiliazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio). Para proliferação celular, utilizaram-se frascos de cultura específicos para células, contendo meio de cultura DMEM suplementado com soro fetal bovino (10%, m/m) e antibiótico (100 UI penicilina / mL mais 100 µL de sulfato de estreptomicina) (1%, m/m), a pH 7,4, com incubação a 37 °C sob atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Ao atingir confluência, as células foram desaderidas usando tripsina. Nestes ensaios, o plaqueamento foi realizado inoculando aproximadamente  $1 \times 10^6$  células viáveis em cada poço de uma microplaca de 96 poços, utilizando um volume de suspensão celular de 240 µL, seguido de incubação por 48 h até atingir a semi-confluência. Após 24 h (tempo necessário para aderência e estabilidade celular) as células foram colocadas em contato com geranato de colina 1:1, geranato de colina 1:2, oleato de colina 1:1 e oleato de colina 1:2 (nas quantidades de 0,0, 0,1, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 e 3,5 mM para líquidos iônicos de geranato de colina e 0,0, 0,002, 0,01, 0,02, 0,03,

0,04, 0,05, 0,06 e 0,07 mM para líquidos iônicos de oleato de colina) por mais 24 h, seguido de centrifugação. Um controle negativo (meio DMEM) também foi preparado, sem adição de amostra de líquido iônico. As placas foram então mantidas durante 24 h numa câmara de incubação ajustada a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após esta etapa, as amostras foram lavadas duas vezes com tampão PBS estéril e as células expostas ao MTT (0,5 mg/mL, 100 µL). Após 3 h a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, o número de células viáveis foi determinado medindo-se a quantidade de MTT convertido em formazan (um composto púrpura) pelas desidrogenases mitocondriais. Para isso, a solução de MTT foi removida dos poços e 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados a cada poço e, após 5-10 minutos, as leituras de absorvância realizadas a 540 nm usando um Leitor de microplacas ELISA da Robonik India Private Ltd. (modelo Readwell PLATE, Maharashtra, Índia). Todos os testes foram realizados com seis amostras para cada concentração testada. A análise dos resultados foi realizada assumindo-se como 100% de viabilidade celular a média dos valores de absorvância obtidos para o controle não-tratado. Partindo-se deste pressuposto, cálculos de viabilidade celular (%) relativos ao controle negativo foram realizados para cada concentração de amostra (MORGAN, 1998).

#### **4.2.3.1.3. Avaliação do Potencial de Danos ao DNA (Genotoxicidade) através do Ensaio Cometa™**

A avaliação do potencial de danos ao DNA (genotoxicidade) dos líquidos iônicos foi realizada através do ensaio Cometa™. Células 3T3 foram colocadas em contato com as amostras (geranato de colina 1:1, geranato de colina 1:2, oleato de colina 1:1 e oleato de colina 1:2). Para oleato de colina 1:1 e oleato de colina 1:2, foram utilizados 2,5 g de líquido iônico diluídos em 250 mL de água ultrapura e, a partir da solução resultante, 300 µL foram utilizados para o teste.

Para geranato de colina 1:1 e geranato de colina 1:2, 250 µL de líquido iônico foram diluídos em 10 mL de água ultrapura e, a partir do solução resultante, 300 µL foram utilizados para o teste, com o negativo sendo meio DMEM simples em contato com as células 3T3) durante um período de 1 h. Para preparar as lâminas, cada grupo de tratamento (amostra de geranato de colina 1:1, amostra de geranato de colina 1:2, amostra de oleato de colina 1:1 e amostra de oleato de colina 1:2) envolveu 15 µL de células (3T3, após contato com as amostras) em 100 µL de agarose de baixo ponto

de fusão (0,8%, m/v), com as misturas sendo colocadas em lâminas de microscópio que foram pré-revestidas com agarose de ponto de fusão normal (1,5%, m/v).

Os testes foram realizados em triplicata para cada grupo. As lamínulas foram posicionadas sobre as amostras nas lâminas de microscópio, e as lâminas foram colocadas sob condições de refrigeração durante 10 min para a polimerização ocorrer.

Após a polimerização, as lamínulas foram cuidadosamente removidas, para não danificar o gel, e as lâminas foram tratadas em um recipiente com uma solução de lise a 4 °C (NaCl 2,5 mol dm<sup>-3</sup>, EDTA 0,1 mol dm<sup>-3</sup>, tris (hidroximetil) aminometano (Tris) 10 mmol dm<sup>-3</sup> e 1% de Triton X-100™, pH 10), completamente envolvido com folha de alumínio, durante 60 min.

Os grupos de tratamento foram então incubados em tampão de eletroforese (NaOH 0,3 mol dm<sup>-3</sup> e EDTA 1 mmol dm<sup>-3</sup>, pH 13) durante 20 min, seguido de análise eletroforética por 20 min a 22 V, 300 mA e 10 W, a 1,3 V / cm. Depois da eletroforese, as lâminas foram retiradas do recipiente de eletroforese e cobertas com uma solução neutralizadora (Tris 0,4 mol dm<sup>-3</sup>, pH 7,5) por 5 min, lavadas três vezes com água destilada e deixadas em repouso durante a noite à temperatura ambiente.

Antes da coloração, as lâminas secas foram deixadas em solução fixadora (ácido tricloroacético a 15% (m/v), sulfato de zinco a 5% (m/v) e glicerol a 5% (v/v)) por 10 min, tendo sido deixadas à temperatura ambiente por 1,5 h.

Após este período de tempo, foram reidratadas com água ultrapura e coradas durante aproximadamente 35 min com uma solução corante de prata que consiste em solução A (nitrato de amónio a 0,2% (m/v), nitrato de prata a 0,2% (m/v), ácido tungstosilícico a 0,5% (m/v), formaldeído a 0,15% (v/v) e carbonato de sódio a 5% (p/v)) e solução B (carbonato de sódio a 5% (p/v) (34:66, v/v)). Posteriormente, as lâminas foram banhadas em uma solução de paragem (ácido acético, 1% (v/v)) e depois lavadas com água ultrapura.

Finalmente, as lâminas foram novamente lavadas suavemente com água ultrapura e deixadas secar à temperatura ambiente. A coloração com prata é análoga à fluorescência, durante a qual a carga positiva dos cátions de prata permite que eles se liguem a fragmentos de DNA, produzindo a cor característica. Ao longo dos procedimentos envolvendo materiais celulares, tanto a luz natural como a luz de lâmpadas fluorescentes foram evitadas, de modo a prevenir uma possível influência sobre os resultados.

As análises foram realizadas utilizando um microscópio óptico da Carl-Zeiss (modelo Zeiss Axiovert-60, Göschwitzer Str., Jena, Alemanha), e pelo menos 100 células foram contadas em cada lâmina, com 3 lâminas para cada teste.

As análises foram realizadas em triplicata, totalizando 300 células para a análise de cada solução de amostra de líquido iônico testado.

Os resultados das análises do ensaio Cometa foram definidos atribuindo uma pontuação de 0 a 4 de acordo com a quantidade de DNA na cauda e o comprimento da cauda de arrastamento (espalhamento de DNA), da seguinte forma: pontuação 0, correspondendo a células intactas (sem dispersão alguma ou abaixo de 5% de dano); pontuação 1, correspondendo a células com danos mínimos (dispersão da luz, com uma cauda muito curta, 5-20% de dano); pontuação 2, correspondente às células com dano médio (dispersão leve e cauda grande, 20-40% de dano); pontuação 3, correspondente às células com danos graves (grande dispersão e cauda grande, 40-95% de dano); e pontuação 4, correspondente às células com dano máximo (núcleo mínimo, grande dispersão e grande cauda, mais de 95% de dano), (SEABRA et al., 2014).

Para este método visual, o número de células encontradas para cada pontuação foi multiplicado pelo valor da pontuação, e todos os valores foram somados no final da análise de cada lâmina. Porque a pontuação dependia do número de células observadas, um índice de dano na cauda (ou danos no DNA) foi criado normalizando a pontuação atribuída na lâmina pelo número de células analisadas.

#### **4.2.3.2. Caracterização Físico-Química dos Líquidos Iônicos**

##### **4.2.3.2.1. Análises por FTIR**

Os líquidos iônicos sintetizados foram analisados por espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), seguindo o procedimento descrito na seção 4.2.1.2.

#### **4.2.3.2.2. Análises Térmicas por TGA e DSC**

As análises térmicas por termogravimetria (TGA) e calorimetria diferencial de varredura (DSC) realizadas aos líquidos iônicos foram realizadas de acordo com o procedimento descrito na seção 4.2.1.4.

#### **4.2.3.2.3. Análises do Teor de Água por Titulação de Karl-Fischer**

A determinação do teor de água nos líquidos iônicos foi realizada por titulação de Karl-Fischer. O teor de umidade foi assim determinado por meio de titulação biamperométrica de quantidades de líquido iônico previamente pesadas e injetadas no vaso de reação de Karl-Fischer (684 KF Coulometer da Metrohm, Herisau, Suíça).

#### **4.2.3.2.4. Análises por Ressonância Magnética Nuclear (<sup>1</sup>H RMN)**

Os espectros <sup>1</sup>H RMN foram registrados num espectrômetro RMN Avance III 500 MHz (Bruker, Billerica MA, E.U.A.). Para obter os espectros, dissolveram-se cerca de 20 µL de amostra de líquido iônico em 600 µL de CDCl<sub>3</sub>, contendo tetrametilsilano (TMS) como referência interna (0,00 ppm), utilizando as seguintes condições experimentais: programa de pulso, zg30; largura espectral, de -4,00 a 16,00 ppm; tamanho espectral, 32768 pontos; pulso de 90°, 11,75 µs; atraso, 1s; e número de varreduras, 16.

#### **4.2.4. Permeação Transdérmica de Insulina Humana Assistida por LIs**

O fornecimento não invasivo de insulina assistido por líquido iônico foi avaliado através de estudos de permeação transdérmica num sistema transdérmico DHC-6T da LOGAN INSTRUMENTS CORP. (Somerset NJ, E.U.A.), seguindo o procedimento descrito na seção 4.2.2., com alterações: em cima dos discos de pele de orelha suína,

foram introduzidos 100  $\mu\text{L}$  de líquido iônico e 100  $\mu\text{L}$  de insulina. Seguindo o mesmo protocolo descrito na seção 4.2.2.1. a concentração de proteína (insulina) permeada foi avaliada segundo o método de Bradford modificado (BALCÃO, VIEIRA, MALCATA, 1996).

#### 4.2.5. Preparação de Filme Biopolimérico Integrando Líquido Iônico e Insulina Humana

##### 4.2.5.1. Planejamento Fatorial Experimental para Definição da Melhor Matriz Biopolimérica

Para preparação de um filme biopolimérico adequado em termos de propriedades mecânicas, foi desenhado um planejamento fatorial experimental para otimização da matriz biopolimérica. Assim, desenhou-se um planejamento fatorial completo  $3^2$  (englobando duas variáveis, cada uma definida em três níveis), exigindo um total de nove experimentos produzindo nove formulações, que foi aplicado para maximizar a eficiência experimental com um mínimo de experimentos. As duas variáveis diferentes (concentração de goma xantana e concentração de nanocelulose bacteriana) em três níveis cada, baixa (-1), média / central (0) e alta (+1), e sua influência sobre as propriedades mecânicas dos filmes biopoliméricos produzidos foram então devidamente estudadas. As variáveis independentes foram a concentração de goma xantana e a concentração de nanocelulose bacteriana, enquanto as variáveis dependentes sob escrutínio foram as propriedades mecânicas médias resistência à tração, resiliência e relaxamento. Para cada variável independente, os valores baixo, médio e alto dos níveis inferior, central e superior foram atribuídos a (-1), (0) e (+1), respectivamente (ver Tabela 2).

**Tabela 2.** Planejamento fatorial experimental completo, fornecendo os valores dos níveis inferior (-1), central (0) e superior (+1) para cada variável.

Variáveis independentes	Níveis		
	Nível Baixo	Nível Central	Nível Superior
	(-1)	(0)	(+1)

Nanocelulose Bacteriana (%, m/m)	0,050	0,100	0,150
Goma Xantana (% , m/m)	0,500	1,000	1,500

**Fonte:** Elaboração própria

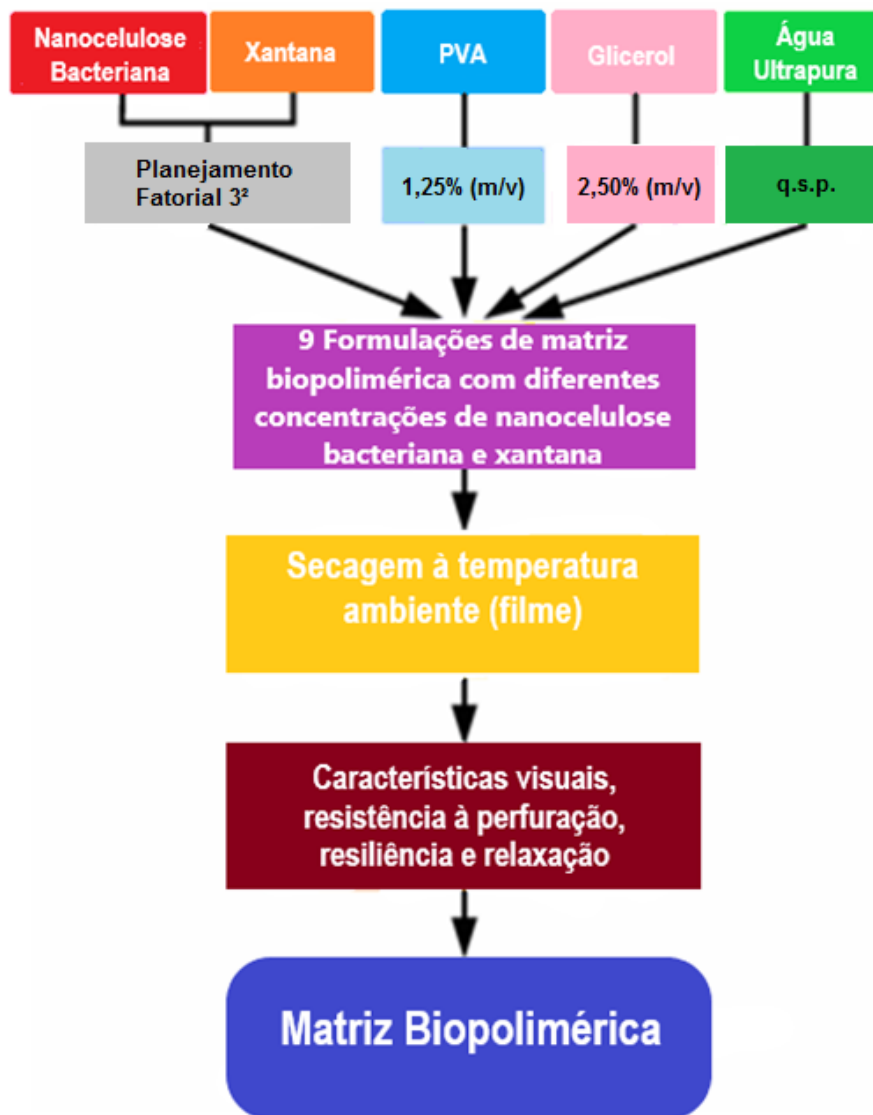
Todas as formulações foram produzidas de acordo com o planejamento fatorial experimental descrito na Tabela 2, integrando quantidades constantes de PVA (1,25% (m/m); para induzir polimerização), glicerol (2,50% (m/m); para induzir plasticidade) e metilparabeno (0,1% (m/m); para inibir o crescimento fúngico), produzindo nove formulações (simples) de filme biopolimérico (ver Tabela 3), tal como demonstrado na Figura 6.

**Tabela 3.** Composição dos biofilmes biopoliméricos simples (base: 10 g) para otimização das propriedades mecânicas.

Nível / Massa				PVA (g)	Glicer ol (g)	Metilparabe no (g)	Água ultrapura (g)
Nanocelulose Bacteriana (g)		Goma Xantana (g)					
(-1)	0,005	(-1)	0,050	0,125	0,250	0,010	9,860
(-1)	0,010	(0)	0,050	0,125	0,250	0,010	9,550
(-1)	0,015	(+1)	0,050	0,125	0,250	0,010	9,550
(0)	0,005	(-1)	0,100	0,125	0,250	0,010	9,510
(0)	0,010	(0)	0,100	0,125	0,250	0,010	9,500
(0)	0,015	(+1)	0,100	0,125	0,250	0,010	9,500
(+1)	0,005	(-1)	0,150	0,125	0,250	0,010	9,460
(+1)	0,010	(0)	0,150	0,125	0,250	0,010	9,450
(+1)	0,015	(+1)	0,150	0,125	0,250	0,010	9,450

**Fonte:** Elaboração própria

**Figura 6.** Fluxograma da preparação e avaliação dos filmes biopoliméricos simples de acordo com o planejamento fatorial experimental completo.



Fonte: Elaboração própria

#### 4.2.5.2. Preparação do Filme Biopolimérico com Matriz Otimizada, Integrando Líquido Iônico e Insulina Humana

Após determinação dos níveis ótimos para a composição do filme biopolimérico, levando a um filme adequado em termos de propriedades mecânicas (ou seja, máxima resistência à tração, relaxamento e resiliência), mantendo um bom nível de maleabilidade, este nível foi utilizado para produção de dois biofilmes, um integrando líquido iônico e insulina humana e outro integrando apenas a insulina humana de acordo com os dados incluídos na Tabela 4.

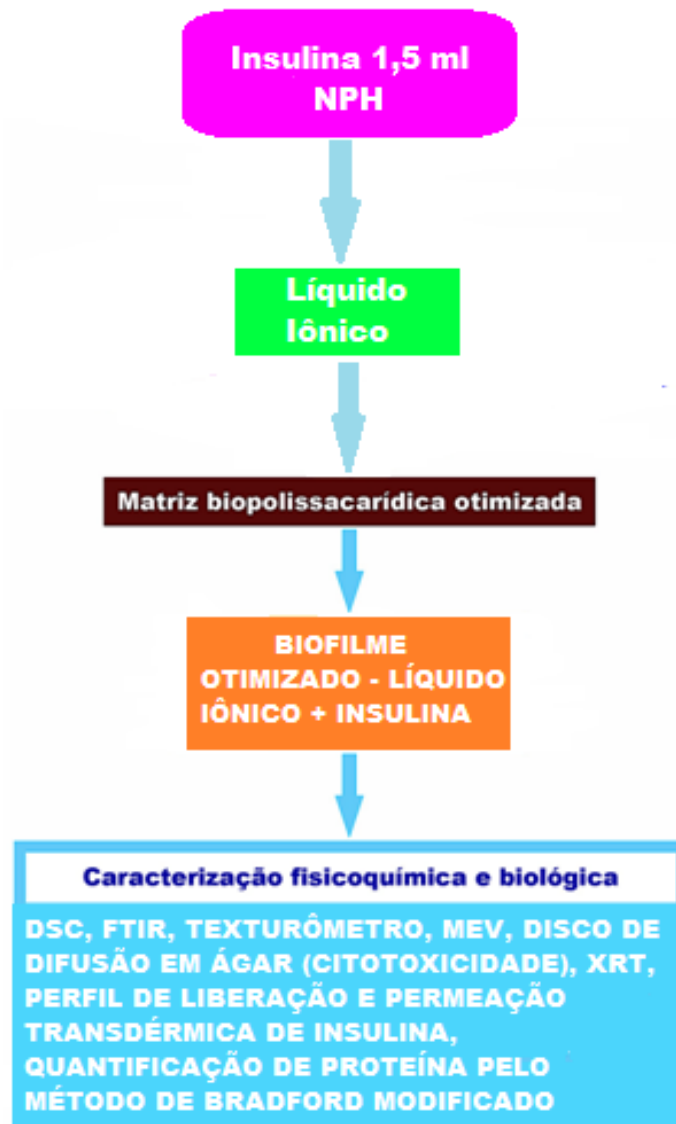
**Tabela 4.** Composição dos biofilmes (otimizados) integrando líquido iônico e insulina humana.

Biofilme	BNC (g)	Goma Xantana (g)	PVA (g)	Glicerol (g)	Metilparabeno (g)	Líquido iônico (GC 1:2, mL)	Insulina Novolin (mL)	Água ultrapura (g)
Biofilme 1	0,015	0,150	0,125	0,250	0,010	0,250	1,500	7,700
Biofilme 2	0,015	0,150	0,125	0,250	0,010	0,000	1,500	7,950

**Fonte:** Elaboração própria

Os filmes biopoliméricos foram depois caracterizados de acordo com o fluxograma exibido na Figura 7.

**Figura 7.** Fluxograma da preparação e caracterização da matriz biopolimérica otimizada, integrando líquido iônico e insulina.



Fonte: Elaboração própria

#### 4.2.6. Caracterização Físico-Química e Biológica dos Filmes Biopoliméricos Integrando LI e Insulina Humana

##### 4.2.6.1. Análises Térmicas por TGA e DSC

Os filmes integrando LI e insulina humana foram analisados por TGA e DSC seguindo o procedimento descrito na seção 4.2.1.4.

##### 4.2.6.2. Análises por FTIR

Os filmes integrando LI e insulina humana foram analisados por FTIR seguindo o procedimento descrito na seção 4.2.1.2.

#### **4.2.6.3. Análise das Propriedades de Resistência Mecânica**

As propriedades de resistência mecânica dos filmes biopoliméricos otimizados integrando LI e insulina humana foram avaliadas de acordo com o procedimento descrito na seção 4.2.1.6. Em particular, avaliaram-se parâmetros como resistência à tração, relaxamento e resiliência. Todas as determinações foram realizadas em triplicata, tendo-se utilizado nas análises amostras com dimensões de 2 cm x 5 cm para a resistência à tração e 2 cm x 2 cm para relaxamento e resiliência.

#### **4.2.6.4. Avaliação do Potencial de Citotoxicidade pelo Método de Disco-Difusão em Ágar**

O potencial de citotoxicidade dos filmes biopoliméricos simples e integrando LI e insulina humana foi avaliado pelo método de disco-difusão em ágar, como descrito na seção 4.2.3.1.1., mas usando linhagem celular HaCaT (queratinócitos humanos imortalizados).

#### **4.2.6.5. Análises Morfológicas por Tomografia de Raios-X**

A morfologia dos filmes biopoliméricos integrando insulina e LI foi analisada por tomografia via transmissão de raios X (XRT). As imagens tomográficas do filme biopolimérico integrando insulina e líquido iônico, foram coletadas usando um tomógrafo computadorizado de transmissão de raios X de 3ª geração (OLIVEIRA JUNIOR; MARTINS, 2009) da Bruker microCT (modelo SkyScan 1174, Kontich, Bélgica). As amostras de filme foram fixadas num suporte ôco e colocadas dentro da câmara tomográfica, e fatias digitais da amostra foram coletadas e reunidas utilizando as seguintes configurações do sistema tomográfico: tensão de operação ajustada em 34 kV e corrente elétrica com 529  $\mu$ A. A técnica utilizada para obter a imagem tomográfica envolveu a aquisição de um grande número de radiografias do objeto (cortes de imagem), obtidas pela medida da intensidade de raios-X transmitidos

através do biofilme, em diferentes posições angulares. As amostras de biofilme foram giradas 180°, com incrementos angulares de 0,8°, produzindo 225 radiografias (projeções) por imagem, cada uma contendo 1304×1304 pixels (largura x altura) com uma resolução espacial de 9,76 µm. O tempo de exposição por projeção foi de 3000 ms. Na saída da fonte de raios X utilizou-se um filtro de Al com 0,25 mm de espessura.

Algoritmos matemáticos apropriados foram então usados para reconstruir as imagens tomográficas tridimensionais (3D) das amostras de filme, através da composição adequada de imagens bidimensionais (2D). As imagens 3D possuíam 652×652×652 pixels e a mesma resolução espacial das imagens 2D, e assim o volume de dados gerados para cada amostra de biofilme é isotrópico em relação à resolução espacial. Tendo todas as projeções radiográficas (radiografias reunidas em cada posição angular), utilizou-se o software NRecon™ Bruker (versão 1.6.9.4, Kontich, Bélgica), que usa o algoritmo de (FELDKAMP et al., 1984) no processo de reconstrução das imagens tomográficas, e o software CTVox™ (versão 2.6.0 r908-64bit, Bruker microCT), CTan™ (versão 1.13.5.1-64bit, da Bruker microCT) e CTvol (versão 2.2.3.0- 64bit, da Bruker microCT) para processamento das imagens tomográficas.

#### **4.2.6.6. Análises Morfológicas por Microscopia Eletrônica de Varredura com Dispersão de Energia (DESEM)**

A superfície e a zona de fratura do filme biopolimérico integrando insulina e LI após crio-congelação foi analisada por Microscopia Eletrônica de Varredura com Dispersão de Energia (DESEM) num microscópio eletrônico de varredura da LEO Electron Microscopy / Oxford (modelo Leo 440i, Cambridge, Reino Unido), equipado com um detector EDS (modelo 6070, Cambridge, Reino Unido). Amostras do biofilme foram cortadas ou crio-fraturadas e revestidas por pulverização catódica com um filme de Au (espessura de 200 Å) sobre uma camada de carbono produzida por evaporação num dispositivo de metalização (Sputter Coater) da EMITECH (modelo K450, Kent, Reino Unido). Fotomicrografias foram então obtidas usando feixes de elétrons com velocidades de aceleração de 20 keV e corrente elétrica de 100 mA, via varredura aleatória (DEDAVID, GOMES, MACHADO, 2007).

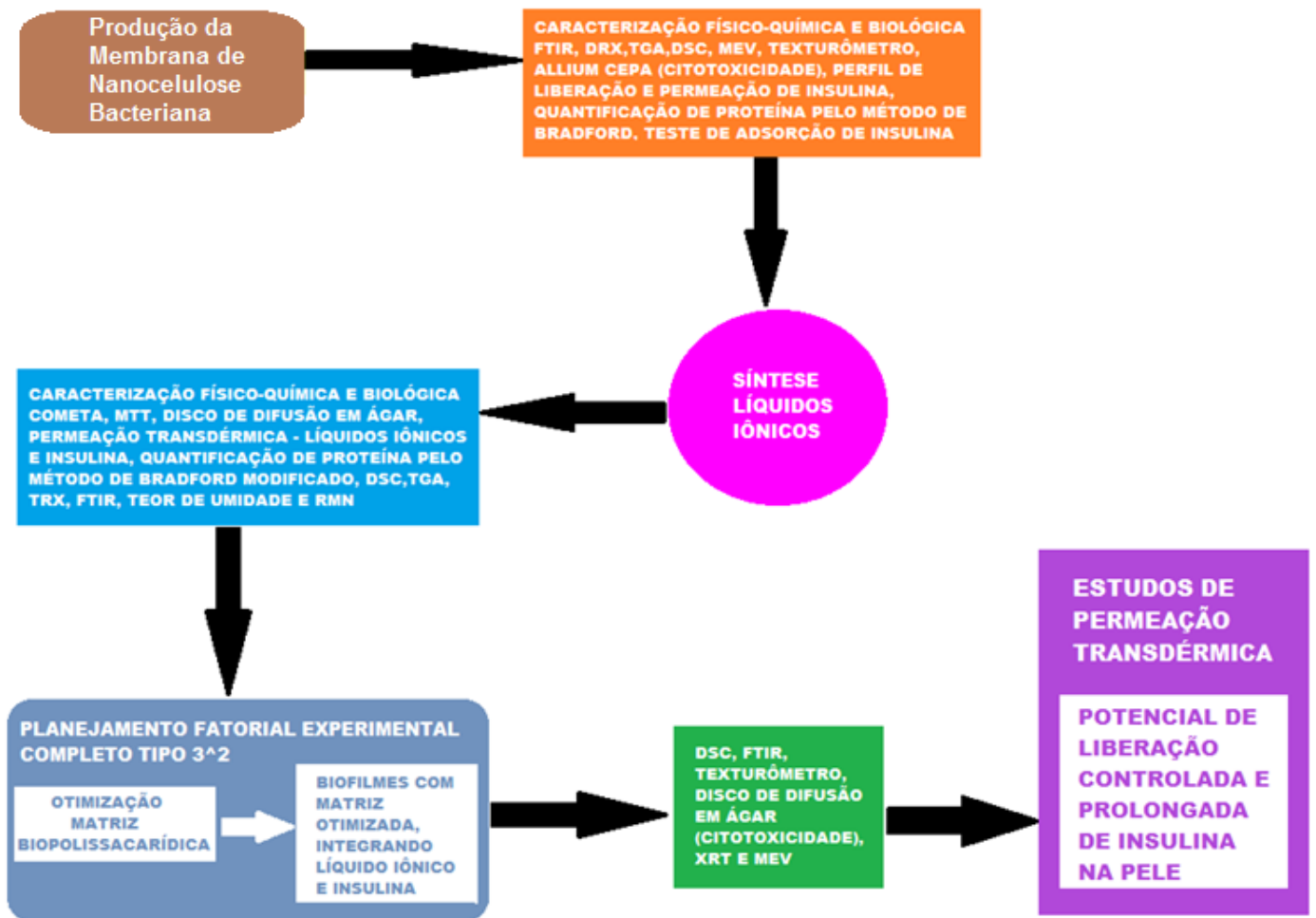
#### **4.2.7. Permeação Transdérmica de Insulina Humana a partir do Filme Biopolimérico, Assistida por Geranato de Colina (1:2)**

A permeação transdérmica de insulina assistida pelo solvente eutético profundo geranato de colina (1:2) foi avaliada de acordo com o procedimento descrito na seção 4.2.2., com modificações. Em particular, utilizou-se um disco de filme biopolimérico (30 mm) integrando geranato de colina 1:2 e insulina humana, tendo-se o cuidado de eliminar quaisquer bolhas de ar ao introduzir o disco de filme sobre o disco de orelha de porco. Seguindo o mesmo protocolo descrito na seção 4.2.2.1., a concentração de proteína (insulina) permeada foi avaliada segundo o método de Bradford modificado (BALCÃO, VIEIRA, MALCATA, 1996).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O trabalho de pesquisa envolveu a realização de diversas etapas que estão apresentadas resumidamente na Figura 8.

**Figura 8.** Diagrama de seqüências das várias etapas envolvidas no trabalho de pesquisa.



Fonte: Elaboração própria

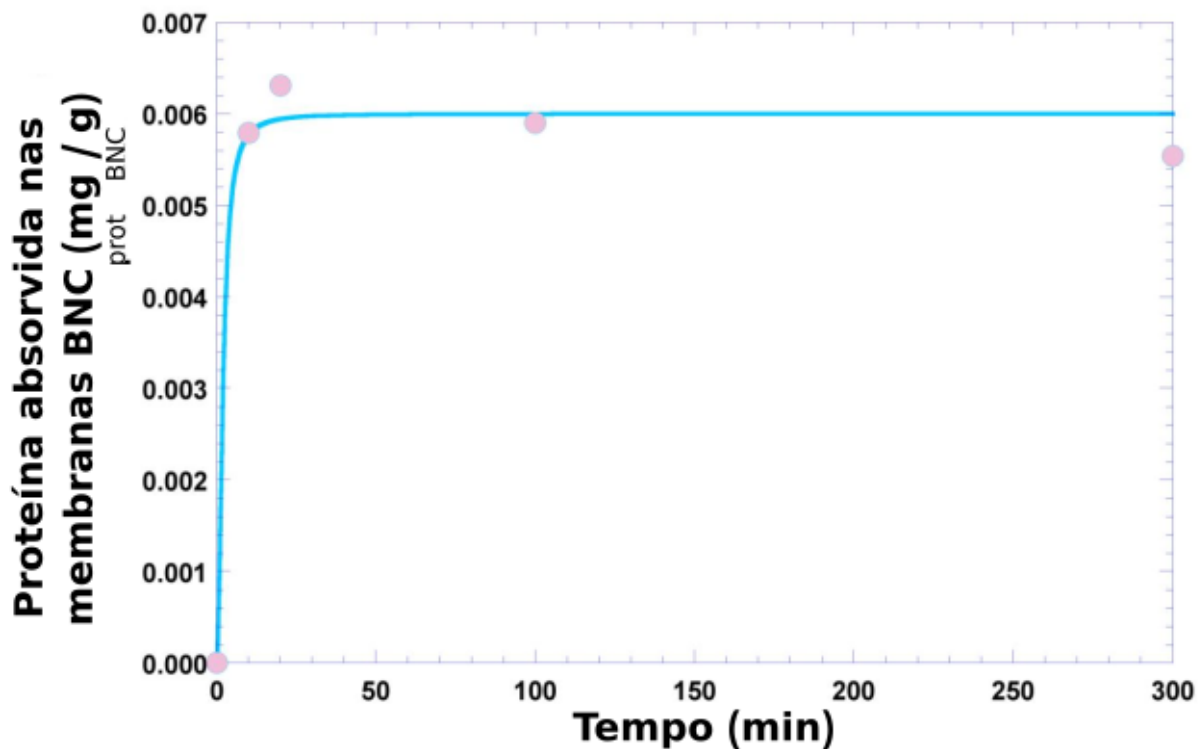
### 5.1. Adsorção de Proteínas nas Biomembranas de Nanocelulose Bacteriana

A adsorção de proteínas em biomoléculas tem um caráter complexo no que diz respeito às cargas e estrutura. A adsorção de proteínas pode ocorrer por meio de interações fortes de aminoácidos apolares ou aromáticos com a superfície dos polímeros, com exclusão de moléculas de água. Além disto, a conformação das proteínas pode variar, passando por certo grau de deformação ou mudança estrutural

(PEIXOTO, 2013). Assim, é importante verificar o quanto de adsorção da insulina ocorreu na biomembrana.

As biomembranas de BNC apresentaram uma morfologia de superfície homogênea, como será discutido mais adiante, e permitiram a adsorção de aproximadamente  $6 \pm 1 \mu\text{g}_{\text{insulina}} / \text{g}_{\text{BNC}}$  num período de tempo de 20 min (Figura 9), representando uma adsorção de um total de cerca de 0,012% da insulina oferecida na solução salina (isto é, 50 mg insulina em 50 mL de solução salina).

**Figura 9.** Evolução temporal da concentração de proteína (insulina) no sobrenadante, após adsorção nas biomembranas bacterianas de nanocelulose.



Fonte: Elaboração própria

Os resultados experimentais foram mais bem ajustados por uma função sigmoideal (modelo logístico de 4 parâmetros), onde  $y$  = resposta,  $m_1$  = resposta em  $t=\infty$ ,  $m_2$  = resposta em  $t=0$ ,  $m_3$  = ponto de inflexão  $((m_2 + m_1) / 2)$ ,  $m_4$  = declive que define a inclinação da curva, e  $x$  = tempo (min). O ajuste não linear do modelo aos dados produziu os seguintes valores para os parâmetros do modelo:  $m_1 = 0,006 \pm 0,001 \text{ mg}_{\text{prot}} / \text{g}_{\text{BNC}}$ ,  $m_2 = 0 \pm 0 \text{ mg}_{\text{prot}} / \text{g}_{\text{BNC}}$ ,  $m_3 = 2 \pm 1,37 \times 10^{-7} \text{ mg}_{\text{prot}} / \text{g}_{\text{BNC}}$ , e  $m_4 = 2 \pm 2,28 \times 10^{-7} \text{ mg}_{\text{prot}} / (\text{g}_{\text{BNC}} \cdot \text{min})$ , com um coeficiente de correlação do ajuste não linear igual a  $r = 0,99360$ . O ajuste não linear dos resultados exibidos na Figura 9 ao modelo

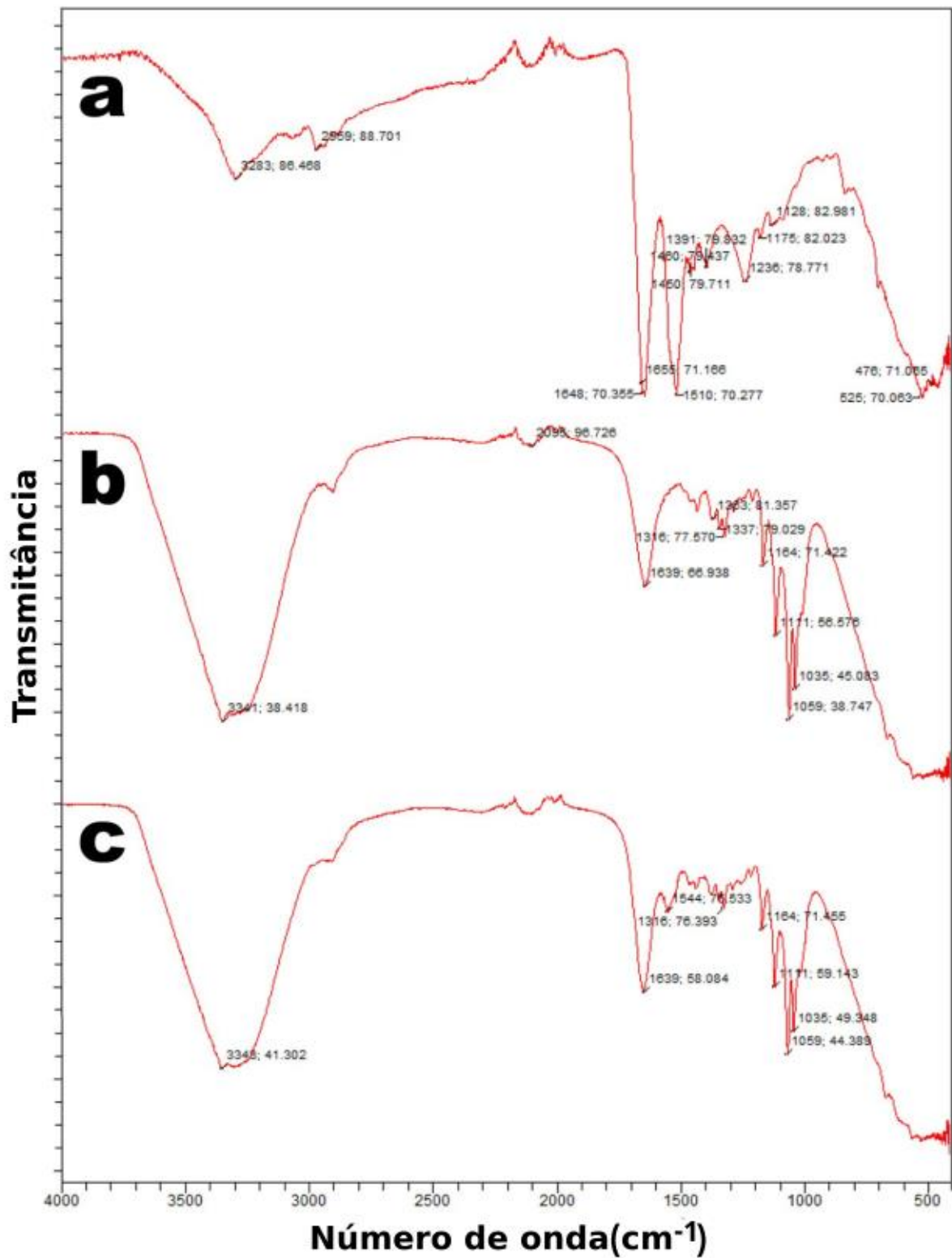
de regressão logística de quatro parâmetros foi realizado usando o software KaleidaGraph v. 4.5.2 para MacOS X.

## 5.2. Análise das Membranas de BNC por Espectrofotometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Um gráfico de intensidade *versus* frequência de radiação, conhecido como espectro de infravermelho, permite caracterizar os grupos funcionais presentes num dado material, fazendo com que a espectrofotometria FTIR seja amplamente utilizada na análise da estrutura de sistemas (bio) poliméricos. A espectrofotometria FTIR pode permitir esclarecer possíveis interações entre a proteína carregada e a matriz biopolimérica da biomembrana, através da análise dos grupos funcionais presentes nos diferentes constituintes envolvidos no processo. Os espectros de infravermelho de **(a)** insulina humana pura, **(b)** membrana de nanocelulose bacteriana simples e **(c)** membrana de nanocelulose bacteriana com insulina adsorvida, podem ser encontrados na Figura 10.

Dos espectros de FTIR, um pico característico entre  $1500\text{ cm}^{-1}$  e  $1600\text{ cm}^{-1}$  evidencia que a insulina humana não se envolveu em nenhum tipo de reação química com a biomembrana, após adsorção, o que pode permitir concluir que a BNC é adequada para a estabilização estrutural e funcional da referida proteína. Comparando o espectro da insulina pura com o espectro da biomembrana de nanocelulose bacteriana simples e o espectro da biomembrana de nanocelulose bacteriana com insulina adsorvida, o mesmo pico característico pode ser observado com apenas pequenas variações na intensidade do pico, em números de onda de  $1510\text{ cm}^{-1}$  e  $1544\text{ cm}^{-1}$ .

**Figura 10.** Espectro de FTIR de **(a)** insulina humana pura, **(b)** biomembrana de nanocelulose bacteriana simples e **(c)** biomembrana de nanocelulose bacteriana com insulina adsorvida.



Fonte: Elaboração própria.

Isto sugere claramente que o aspecto químico da insulina foi preservado durante a integração na biomembrana de nanocelulose bacteriana. Segundo (GUPTA;

AGRAWAL; RANGI, 2014), moléculas de proteína podem apresentar absorção de energia característica entre números de onda  $1650\text{ cm}^{-1}$  a  $1630\text{ cm}^{-1}$  para amidas primárias, entre números de onda  $1540\text{ cm}^{-1}$  a  $1520\text{ cm}^{-1}$  para amidas secundárias e entre números de onda  $1270\text{ cm}^{-1}$  a  $1230\text{ cm}^{-1}$  para amidas terciárias.

A partir da inspeção dos espectros de transmitância representados na Figura 10a, podem-se observar picos dentro da gama de números de ondas que provavelmente representam amidas primárias a aproximadamente  $1648\text{ cm}^{-1}$  devido ao alongamento do grupo carbonilo (C=O), amidas secundárias a aproximadamente  $1510\text{ cm}^{-1}$  e amidas terciárias na região de  $1236\text{ cm}^{-1}$  devido ao estiramento da ligação CN.

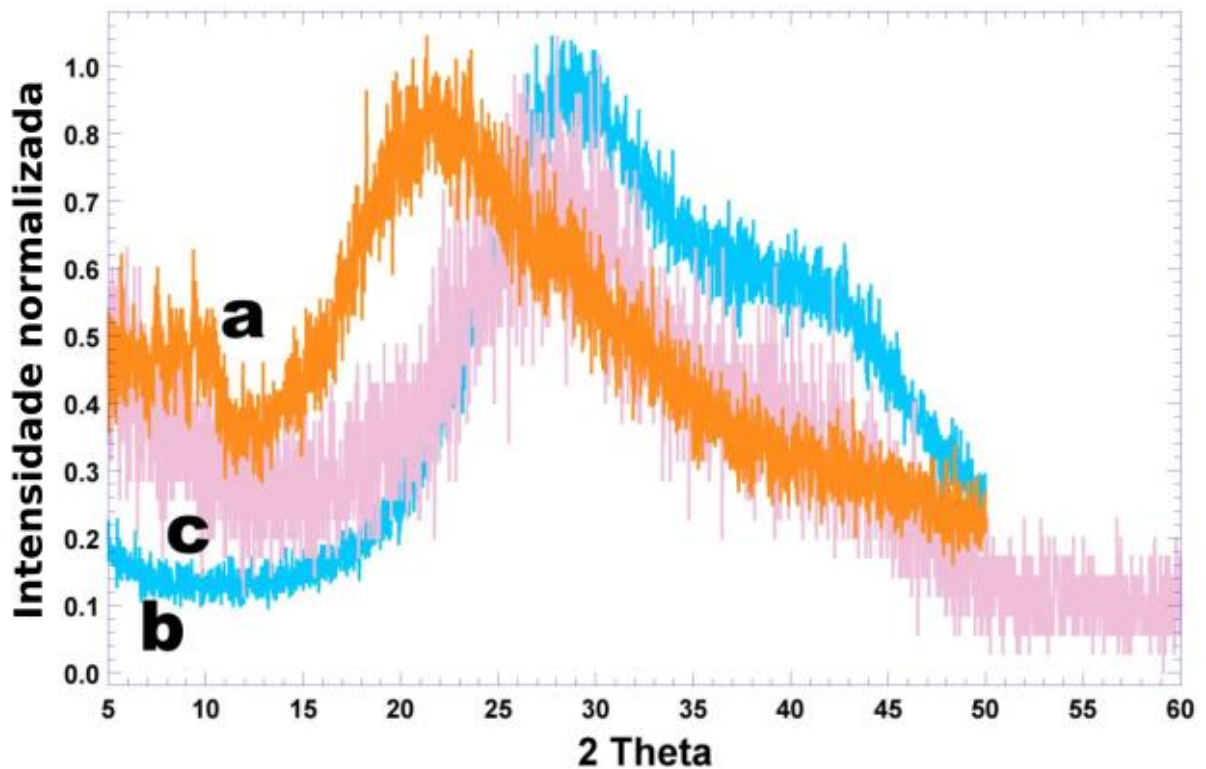
As biomembranas produziram espectros de infravermelhos muito semelhantes, independentemente da presença de proteína na biomembrana, com um pico principal produzido entre  $3341\text{ cm}^{-1}$  e  $3343\text{ cm}^{-1}$ , correspondendo aos grupos OH na água, picos característicos indicativos de proteína situam-se entre  $1390\text{ cm}^{-1}$  e  $1250\text{ cm}^{-1}$  para ligações CN, entre  $1640\text{ cm}^{-1}$  e  $1500\text{ cm}^{-1}$  para grupos NH e entre  $3500\text{ cm}^{-1}$  e  $3300\text{ cm}^{-1}$  correspondentes a grupos OH em água (MEHTA et al., 2013).

Os espectros de infravermelho mostrados na Figura 10 sugerem claramente que o aspecto químico da proteína foi preservado durante a adsorção na biomembrana de nanocelulose bacteriana, permitindo concluir que a proteína não se envolveu em nenhuma interação química com a biomembrana, sendo apenas transportado por ela, o que de outra forma poderia ter reduzido a sua bioatividade.

### 5.3. Análise das Membranas de BNC por DRX

Os resultados obtidos a partir das análises de difração de raios X (DRX) realizadas nas amostras de insulina humana e biomembranas de nanocelulose bacteriana simples e com insulina adsorvida, podem ser encontrados na Figura 11 na forma de difratogramas normalizados. Pode-se observar um comportamento amorfo generalizado para as duas biomembranas.

**Figura 11.** Difratogramas de raios X (XRD) de intensidade normalizada de **(a)** insulina humana pura (curva laranja), **(b)** biomembrana de nanocelulose bacteriana simples (curva azul) e **(c)** biomembrana de nanocelulose bacteriana com insulina adsorvida (curva rosa claro). Os difratogramas de raios-X foram coletados usando raios-X filtrados com alvo de Cu.



Fonte: Elaboração própria

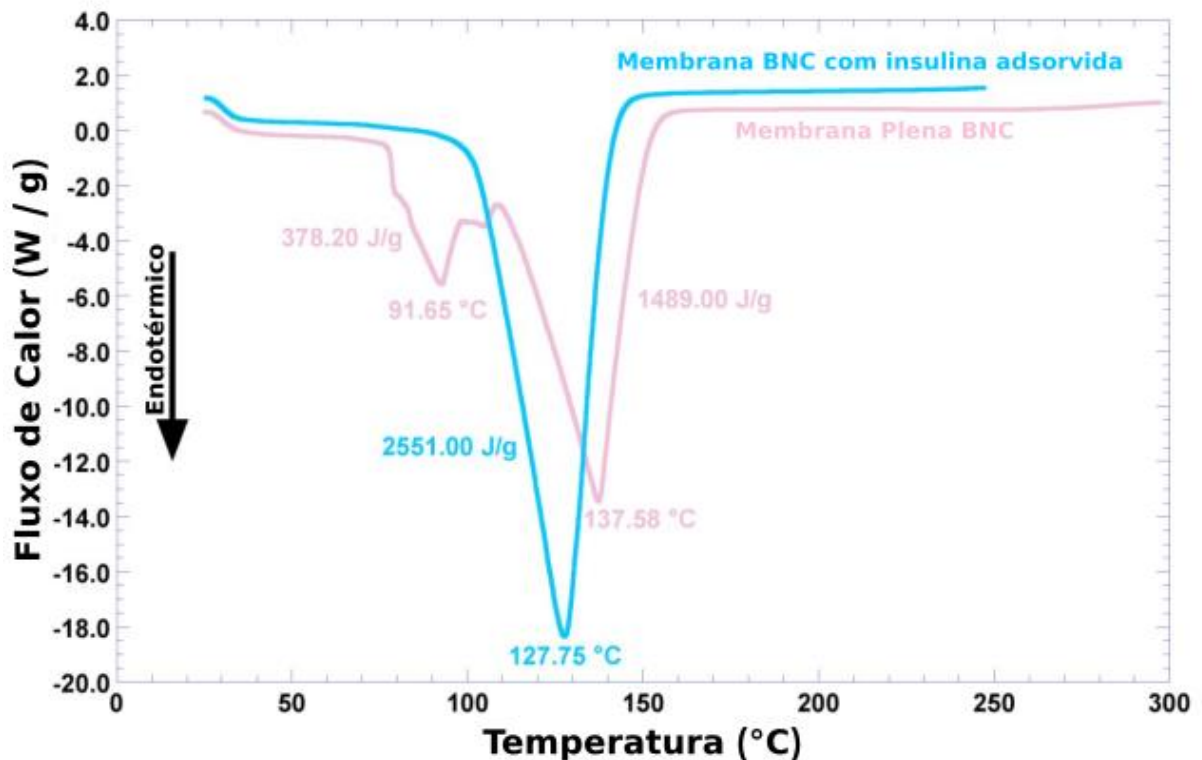
A normalização da intensidade em todos os difratogramas foi realizada dividindo-se os valores de intensidade pelo valor máximo da intensidade em cada difratograma (Figura 11), permitindo assim uma melhor comparação entre os difratogramas de raios-X da insulina pura e das duas biomembranas testadas. Os difratogramas das biomembranas nanocelulósicas bacterianas carregadas e não carregadas de insulina compartilharam uma característica comum, exibindo uma ampla faixa ruidosa (menos definida) entre  $15,00 \leq 2\theta \leq 50,00$  com um pico na região de  $22,00 \leq 2\theta \leq 33,00$ , indicando a dominância de material amorfo nas biomembranas (YOUNG, 2012;

EMAMI et al., 2009; BERNARDO; CALMANOVICI; MIRANDA, 2005). Ao comparar os difratogramas da biomembrana não carregada (curva azul na Figura 11) e da biomembrana carregada com insulina (curva rosa claro na Figura 11), ocorreu à amorfização do sistema promovida pela carga de insulina. Esses resultados corroboram os resultados obtidos pelas análises de FESEM, que indicaram a formação de uma biomembrana essencialmente amorfa.

#### 5.4. Análise das Membranas de BNC por TGA e DSC.

Os resultados das análises térmicas por DSC realizadas nas amostras de biomembranas de nanocelulose bacteriana simples e com insulina adsorvida, registradas sob aquecimento a uma taxa constante entre 25 °C e 250 °C podem ser encontrados na Figura 12.

**Figura 12.** Termogramas de calorimetria exploratória diferencial das biomembranas de nanocelulose bacteriana simples (curva rosa claro) e contendo insulina adsorvida (curva azul).



Fonte: Elaboração própria

O pico endotérmico observado a 91,65 °C (com uma entalpia de fusão de 378,20 J/g) é muito provavelmente devido à perda de água do biopolímero hidratado. Por

analogia com o trabalho de (DANDURAND et al., 2014), tal evento endotérmico é atribuível à evaporação de moléculas de água ligadas e presas na estrutura da matriz da biomembrana.

O segundo maior evento é o pico endotérmico a 137,58 °C (com uma entalpia de fusão associada de 1489,00 J/g), associado a transições ordem → desordem, o que pode ser considerado como uma assinatura térmica da degradação do biopolímero (ROCHA et al., 2017).

No caso da biomembrana com insulina adsorvida (curva azul na Figura 12), ocorreu apenas um evento endotérmico importante denotado pelo pico acentuado a 127,75 °C (com entalpia de fusão associada de 2551,00 J/g), associado transições ordem → desordem, que podem ser consideradas como assinaturas térmicas de desnaturação proteica (irreversível) e degradação de biopolímeros (ROCHA et al., 2017).

A técnica de análise por DSC mede a entalpia das amostras e pode indicar a temperatura de transição vítrea e os eventos endotérmicos e/ou exotérmicos nas amostras analisadas. Como as duas biomembranas diferiram apenas na presença ou não de proteína e água carregadas, os dados obtidos a partir das análises de DSC indicaram que as diferenças no comportamento térmico das duas biomembranas derivaram principalmente da proteína adicionada, e também que a incorporação de insulina não compromete a estabilidade da biomembrana para o uso pretendido.

A presença de proteína na biomembrana promoveu um deslocamento do evento endotérmico de 137,58 °C na biomembrana simples, de -9,83 °C na biomembrana carregada com insulina. A carga de insulina na biomembrana também levou a um aumento na entalpia de fusão, de +1062,00 J/g na biomembrana carregada com insulina, o que está em clara concordância com o aumento da quantidade de biopolímero (proteína e nanocelulose) na biomembrana.

Felizmente, a adsorção de insulina na biomembrana levou a um aumento na estabilidade térmica da biomembrana (o que pode ser concluído pela diminuição na temperatura do pico, associada ao grande aumento no valor da entalpia de fusão).

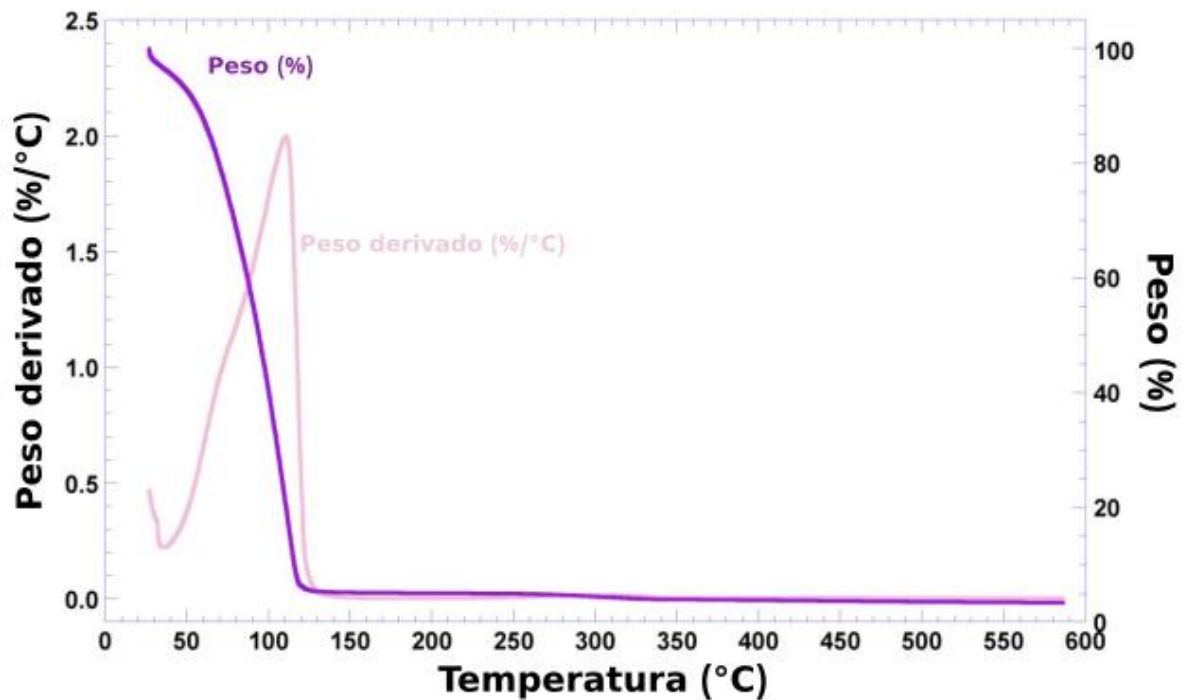
A diminuição da temperatura do pico de fusão verificado com a biomembrana contendo insulina adsorvida pode ser ainda devida à amorfização do sistema, como discutido anteriormente (Figura 11).

Os resultados obtidos a partir das análises térmicas de DSC realizadas às biomembranas de nanocelulose bacteriana simples e contendo insulina adsorvida

(Figura 12) estão em concordância com aqueles obtidos a partir de estudos de difração de raios X (Figura 11), já que como pode ser visto por inspeção dos termogramas de DSC. Notavelmente, os eventos térmicos representados na Figura 12 e os difratogramas de raios X representados na Figura 11 denotam uma transição da biomembrana simples (Figura 12, curva rosa claro) para uma correspondente (mais) amorfa (Figura 12, biomembrana carregada com insulina, curva azul).

Os decréscimos de massa durante o aquecimento foram avaliados a partir de curvas termogravimétricas, enquanto que a temperatura da taxa máxima de variação de massa ( $T_{\text{máx}}$ ) foi determinada a partir do máximo da 1ª derivada da curva de perda de peso. Segundo (DANDURAND et al., 2014), a tendência global da curva termogravimétrica representada em azul na Figura 12 (ou seja, biomembrana com insulina adsorvida) corresponde ao comportamento térmico clássico de uma proteína. A primeira fase, ocorrendo entre 25 °C e 110 °C (Figura 13), está geralmente ligada à evaporação da água adsorvida às porções proteicas e corresponde a cerca de 10% da massa proteica total. Como a grande maioria da biomembrana era de fato água, o segundo estágio, ocorrendo entre 150 °C e 400 °C (Figura 13) está associado à degradação das frações protéicas na amostra de biomembranas, ou seja, a desaminação progressiva, descarboxilação e despolimerização resultante da quebra de ligações (poli) peptídicas.

**Figura 13.** Curva termogravimétrica (curva roxa) e 1ª derivada da curva de perda de peso (curva rosa claro) da biomembrana de nanocelulose bacteriana com insulina adsorvida.



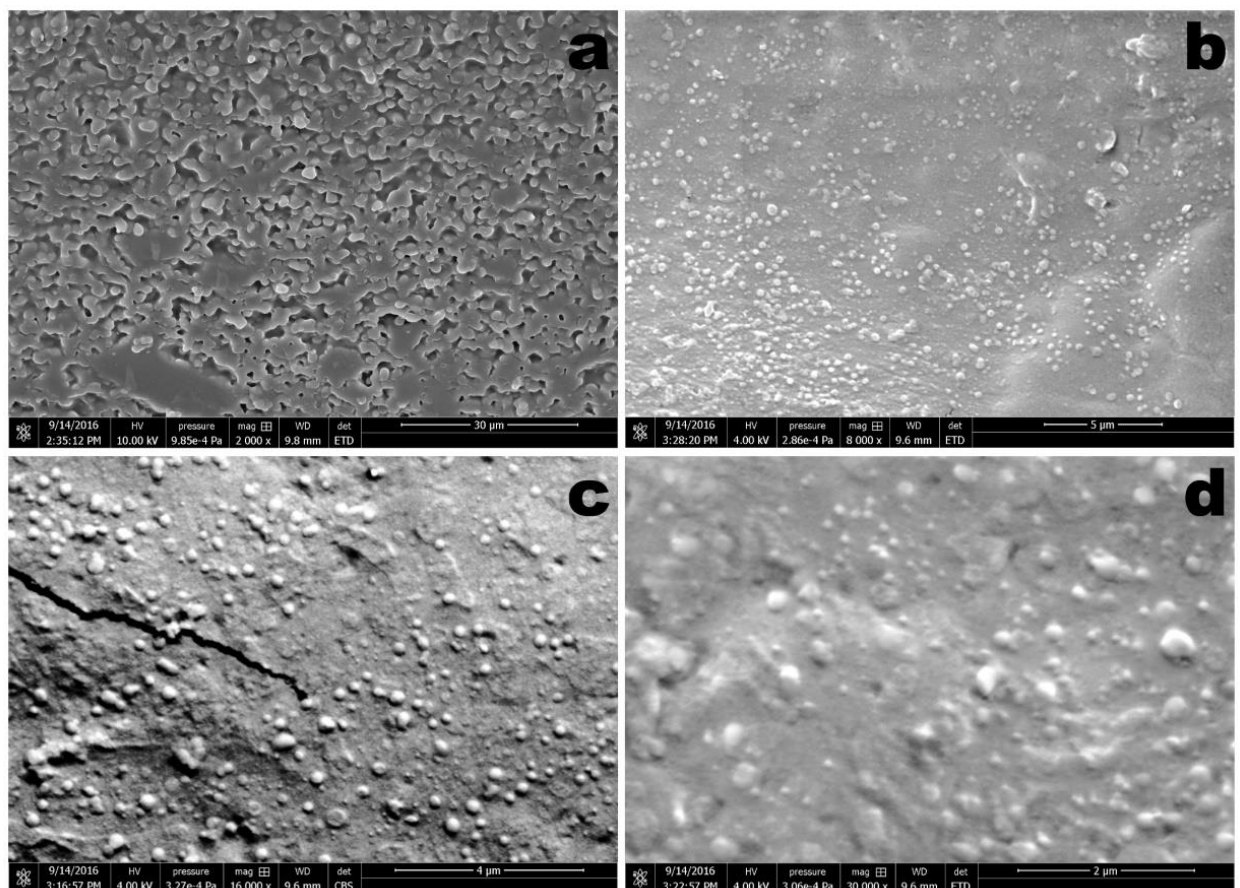
Fonte: Elaboração própria

A 1ª derivada da curva de perda de peso (isto é, a taxa de variação de massa, Figura 13) pode ser usada para indicar os pontos em que a perda de massa é mais aparente (pontos de inflexão), isto é, 110 °C. Em geral, as análises térmicas são ferramentas úteis no desenvolvimento de formulações, pois permitem avaliar a compatibilidade entre os componentes de uma formulação e a estabilidade e decomposição térmica de frações bioativas nela presente. Os dados obtidos por análise térmica estão diretamente relacionados com a qualidade final de um produto (bio) farmacêutico, permitindo inferir aspectos sobre a eficácia terapêutica do produto ou estabilidade do produto ao longo da vida de prateleira (ou prazo de validade). A análise termogravimétrica (TGA) acompanha a variação da massa da amostra em função de um aumento linear na temperatura durante um intervalo de tempo predeterminado, permitindo determinar o perfil térmico da biomembrana preparada contendo insulina adsorvida. Como pode ser observado a partir da inspeção das curvas na Figura 13, o comportamento térmico exibe uma pequena perda de massa em torno de 60 °C indicando perda de água. Entre 70 °C e 130 °C pode-se notar uma maior perda de massa, indicando uma perda maciça de água. Entre 200 °C e 400 °C, uma perda superficial de massa indicou degradação dos componentes do biopolissacarídeo na biomembrana.

### 5.5. Análise Microestrutural das Biomembranas de Nanocelulose Bacteriana Via FESEM.

As análises de microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FESEM) realizadas à superfície da biomembrana de nanocelulose bacteriana simples permitiram a observação de uma superfície algo rugosa com ausência generalizada de rachaduras (Figura 14). A biomembrana tem uma superfície compacta que permite que este material seja utilizado para diversos dispositivos médicos, seja como auxiliar na cura de lesões dérmicas ou na regeneração de tecidos (JOZALA, 2011).

**Figura 14.** Fotomicrografias (microscopia eletrônica de varredura) por emissão de campo (FESEM) da superfície da biomembrana de nanocelulose bacteriana simples, em várias ampliações (a: x2000; b: x8000; c: x16000; d: x30000).



Fonte: Elaboração própria

Provavelmente devido ao processo envolvido na preparação das amostras antes do revestimento por pulverização catódica com Au coloidal, a fixação das biomembranas nos suportes de carbono por estiramento poderia ter produzido a fenda

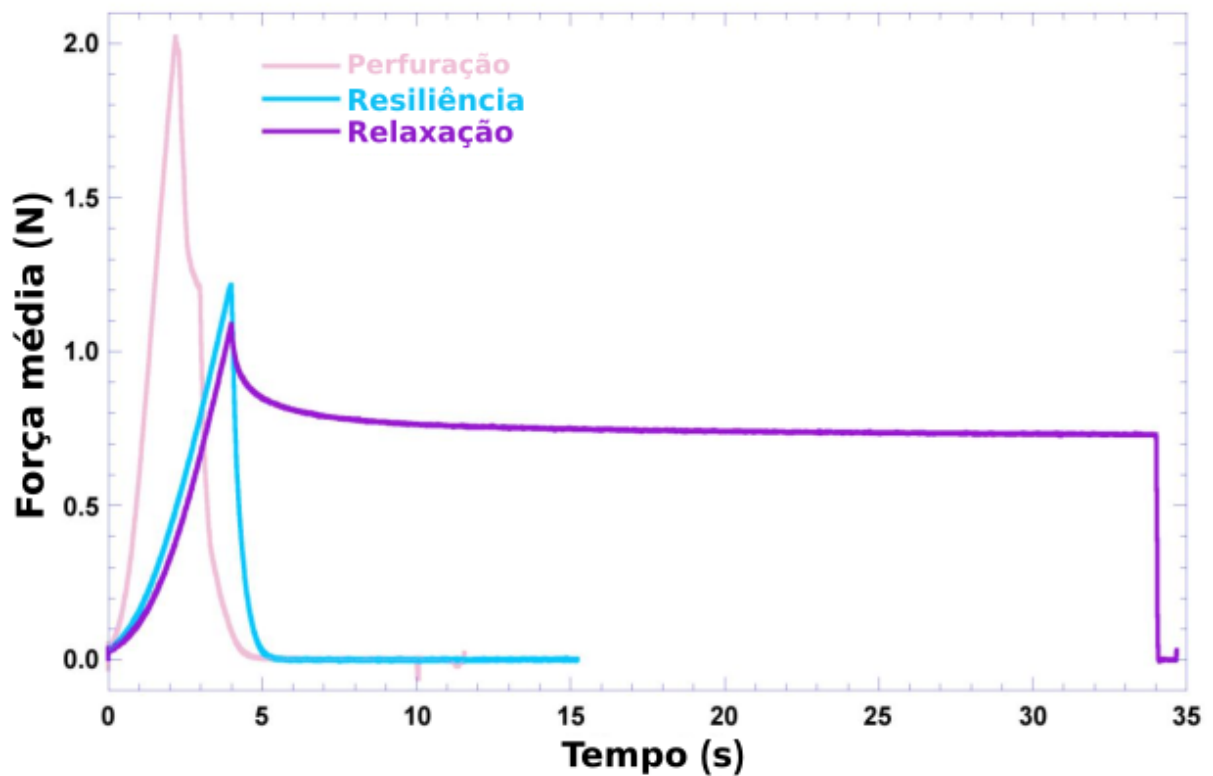
microscópica observável na fotomicrografia da Figura 14c, com uma ampliação de x16000. No entanto, a partir dos resultados obtidos nas análises de microscopia eletrônica de varredura realizadas na biomembrana de nanocelulose bacteriana simples, uma morfologia uniforme pôde ser observada, nas quatro ampliações estudadas (x2000, x8000, x16000 e x30000).

## **5.6. Avaliação das Propriedades Mecânicas das Biomembranas de Nanocelulose Bacteriana**

A avaliação das propriedades mecânicas da biomembrana bacteriana nanocelulósica produzida sem insulina adsorvida abrangeu a resistência à perfuração (para avaliar a capacidade da biomembrana de resistir até a ruptura), relaxação (para avaliar a interconexão da cadeia biopolimérica, que está relacionada às propriedades viscoelásticas da membrana de celulose bacteriana) e resiliência (para avaliar se a membrana acumularia energia quando deformada elasticamente, produzindo (ou não) uma deformação residual) (Figura 15).

A celulose bacteriana possui excelentes propriedades físicas e mecânicas. A estrutura nanofibular única transmite elevada resistência (CALDEIRA, 2013) e estabilidade mecânica, conforme observado nos experimentos realizados.

**Figura 15.** Resultados obtidos dos testes de resistência mecânica realizados às biomembranas de nanocelulose bacteriana simples. Resiliência (curva azul), resistência à perfuração (curva rosa claro), relaxação (curva púrpura).



Fonte: Elaboração própria

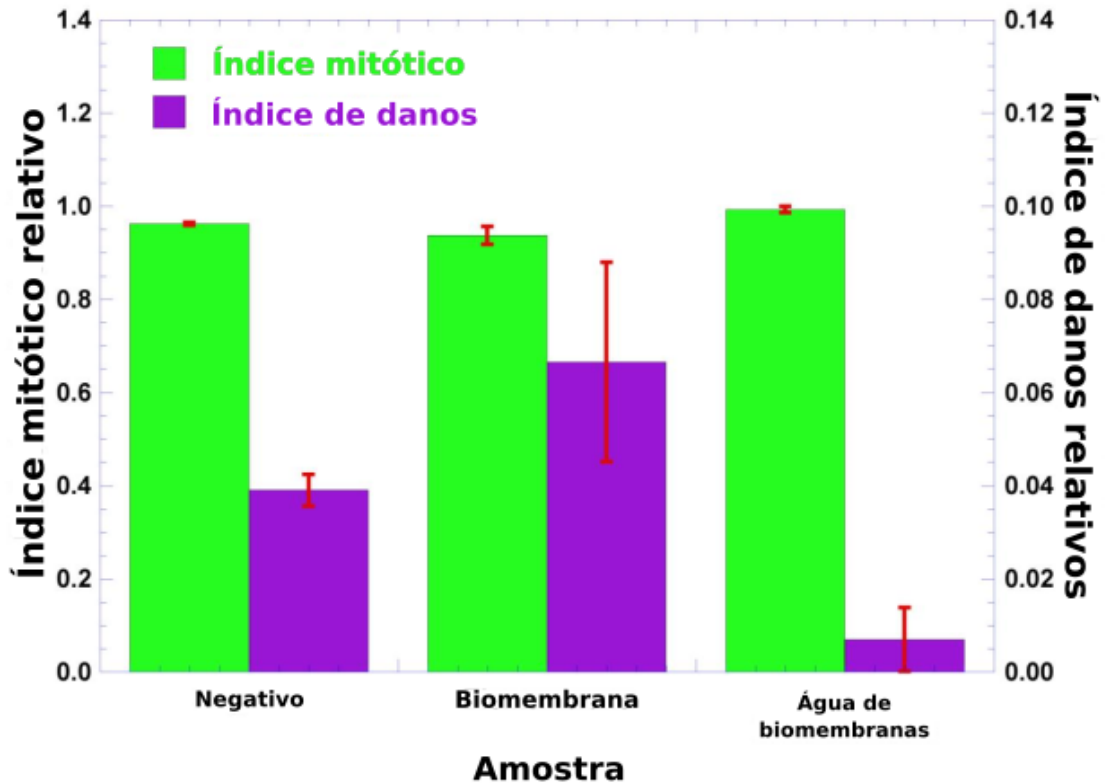
As propriedades mecânicas da biomembrana de nanocelulose bacteriana estão relacionadas principalmente com a capacidade do biopolímero de formar ligações em cadeias poliméricas, dificultando sua separação quando submetidas a forças mecânicas (YANG, 2012). A análise dos resultados considerou a totalidade das biomembranas (com espessura negligenciável) com um peso individual médio de  $75,40 \pm 17,23$  mg e uma área superficial de  $962,11$  mm<sup>2</sup> para os testes de resistência à perfuração, resiliência e relaxação. Os resultados obtidos durante a avaliação da resistência mecânica das biomembranas de nanocelulose bacteriana podem ser encontrados na Figura 15 (curva rosa claro: resistência à perfuração; curva azul: resiliência; curva púrpura: relaxação). As propriedades mecânicas macroscópicas da biomembrana de nanocelulose bacteriana têm uma forte ligação com a sua microestrutura (GONG; HONG, 2012).

### 5.7. Análise do Potencial de Genotoxicidade das Biomembranas de Nanocelulose Bacteriana Via Ensaio *Allium cepa*

A análise das variações do índice mitótico (obtidas como índice mitótico = número de células na mitose / número total de células) e das aberrações cromossômicas (obtidas como índice de dano = número de danos / número total de divisões celulares) foram realizadas para estabelecer os potenciais efeitos genotóxicos das biomembranas de nanocelulose bacteriana produzidas por fermentação por *Gluconacetobacter hansenii* ATCC®23769™. O teste *Allium cepa* é considerado uma ferramenta útil para a pesquisa básica do potencial genotóxico e citotóxico de diversas substâncias complexas, determinando-se a diminuição do índice mitótico e a formação de aberrações cromossômicas (CUCHIARA, BORGES, BOBROWSKI, 2012). Nenhum efeito mitodepressivo potencialmente induzido pelas biomembranas de nanocelulose bacteriana ou pela água ultrapura onde as biomembranas foram armazenadas foi observado (Figura 16), com todas as amostras testadas a estimularem a divisão celular.

Em comparação com o negativo (água ultrapura), apenas a biomembrana de nanocelulose bacteriana mostrou um índice de danos ligeiramente maior. Em contraste, a amostra de água ultrapura onde as biomembranas foram armazenadas conferiu danos mínimos às células, bem abaixo daquelas produzidas pelo negativo (ver Figura 16). A partir das análises estatísticas realizadas aos dados do índice mitótico, ao comparar as diferentes amostras de biomembranas de nanocelulose bacteriana e de armazenamento de água das biomembranas entre elas e mesmo quando comparadas com o negativo, não foram encontradas diferenças estatísticas significantes ao nível de significância de 5% (intervalo de confiança de 95%). Além disso, o contato das raízes de *Allium cepa* com as biomembranas e quando imersas na água de seu armazenamento, durante 24 h, promoveu atividade mitótica para as amostras testadas.

**Figura 16.** Efeito das biomembranas de nanocelulose bacteriana e sua água de armazenamento no índice mitótico obtido a partir de análises citogenéticas, com água ultrapura como negativo. O índice mitótico foi calculado como o número de células na mitose dividido pelo número total de células, enquanto o índice de danos foi calculado como o número de danos dividido pelo número total de divisões celulares.

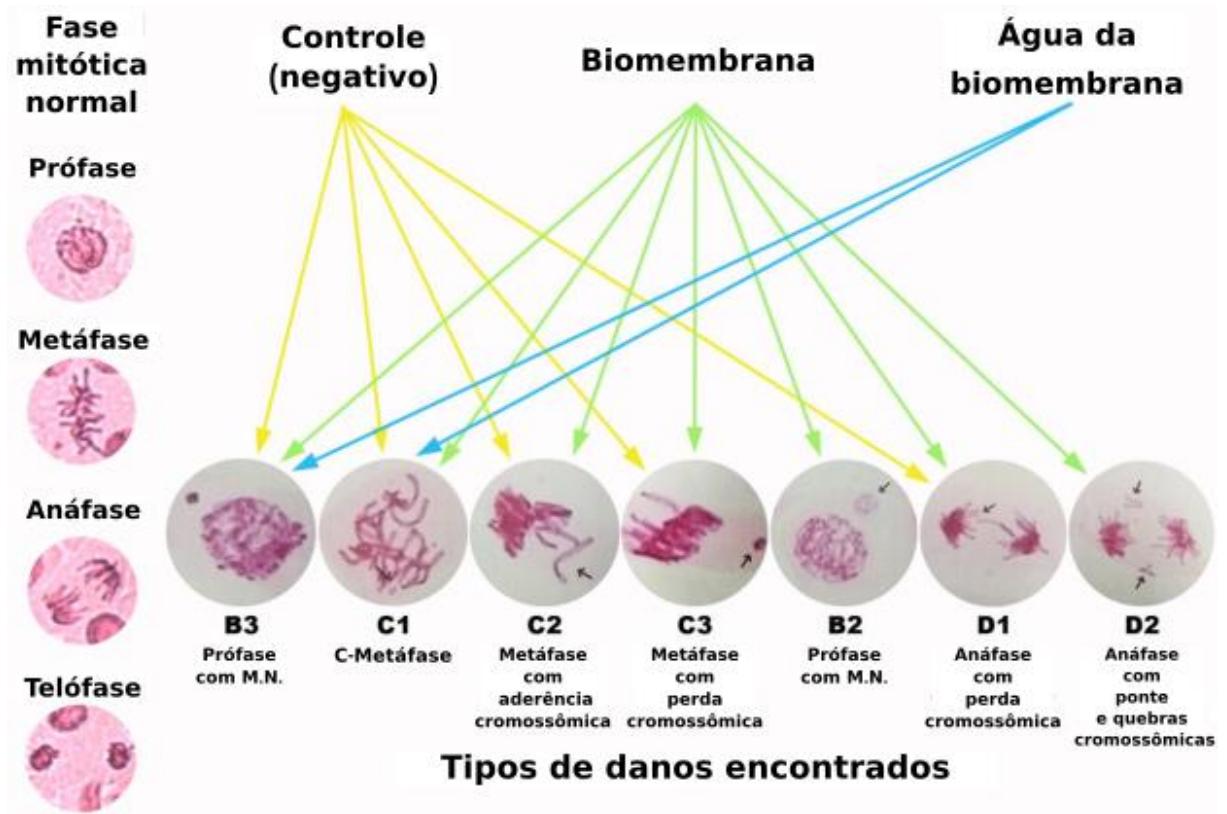


Fonte: Elaboração própria

Assim, nenhum estresse intracelular (incluindo danos ao DNA) pode ser observado, o que poderia impedir que as células entrassem na mitose (Figura 16). Os índices de dano muito baixos produzidos pelas biomembranas de nanocelulose bacteriana e pelas amostras de água de armazenamento biomembranar (Figura 16) estão diretamente relacionados a um número muito baixo de aberrações cromossômicas (embora diversas) nos cromossomas das células meristemáticas radiculares da ponta da raiz do *Allium cepa*, com uma baixa frequência de profases com micronúcleo (MN), metafases C, metáfases com adesão cromossômica, metáfases com perda cromossômica, anáfases com perda cromossômica e anáfases com ponte e anáfases com quebras cromossômicas (Figura 17).

**Figura 17.** Exemplos de fases mitóticas normais em células de *Allium cepa* (profase, metafase, anafase, telofase) e tipos de anomalias cromossômicas (profase com MN, metafase C, metafase com aderência cromossômica, metafase com perda cromossômica, profase com MN, anafase com perda

cromossômica e anáfase com pontes e quebras cromossomais) encontradas em células de *Allium cepa* expostas ao controle, biomembranas de nanocelulose bacteriana e amostras de água de armazenamento das biomembranas.



Fonte: Elaboração própria

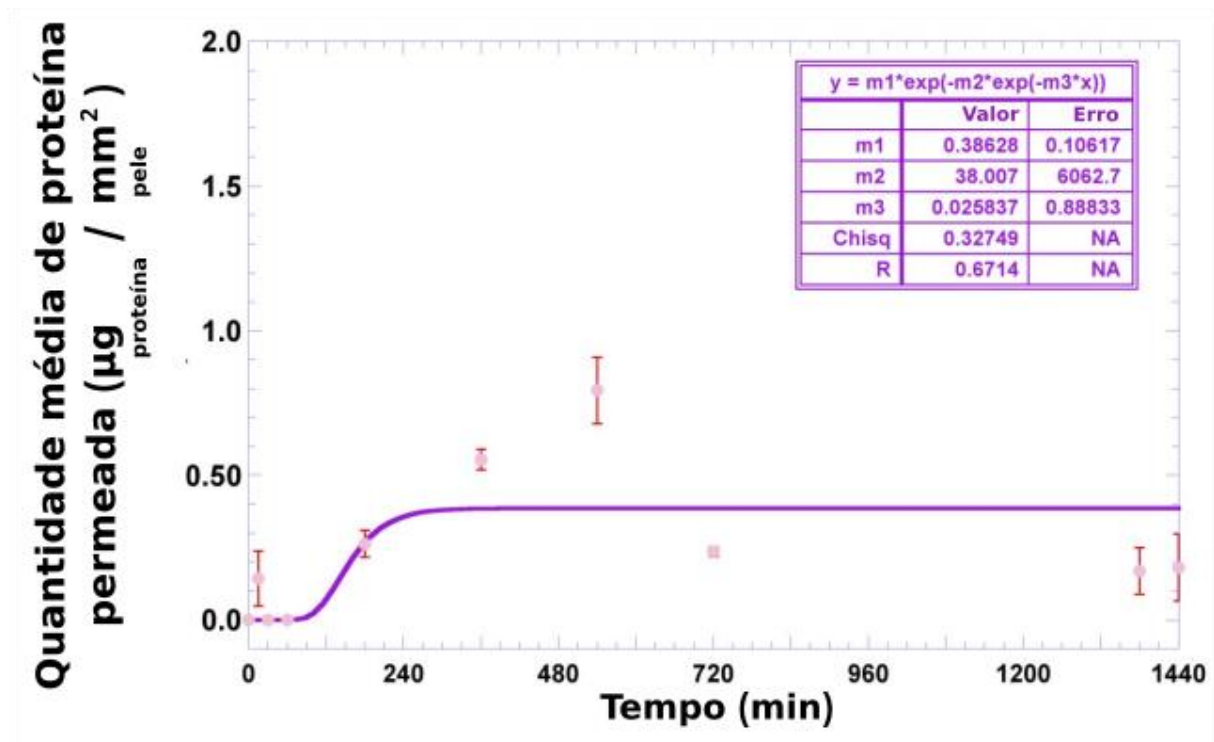
O índice mitótico é um parâmetro fiável para identificar a citotoxicidade e a genotoxicidade e, por conseguinte, os níveis de citotoxicidade de um determinado composto podem ser determinados por aumentos ou diminuições dos índices mitóticos. Índices mitóticos inferiores aos do controle negativo podem indicar que o crescimento e o desenvolvimento das células expostas foram afetados pelo composto testado, o que de fato não ocorreu no trabalho de pesquisa realizado e aqui descrito. Por outro lado, um aumento nos índices mitóticos é um resultado da indução da divisão celular e pode ser caracterizado como um evento prejudicial às células, levando à proliferação celular descontrolada e à formação de tumores (BOUMAZA et al., 2016). No entanto, os índices mitóticos observados no trabalho de pesquisa realizado e descrito aqui foram os mesmos do controle negativo, para as células tratadas tanto com as amostras de biomembrana de nanocelulose bacteriana quanto com a água do seu armazenamento. Estes resultados indicam que as amostras de

biomembrana de nanocelulose bacteriana não têm potencial para induzir aberrações cromossômicas.

### 5.8. Ensaio Preliminares de Permeação Transdérmica de Insulina Adsorvida nas Biomembranas de Nanocelulose Bacteriana.

Os resultados obtidos nos ensaios preliminares de permeação transdérmica de insulina humana realizados com a biomembrana de nanocelulose bacteriana contendo insulina adsorvida, podem ser encontrados na Figura 18.

**Figura 18.** Resultados obtidos a partir de ensaios de permeação transdérmica de insulina, na forma de proteína permeada por área de pele, durante um período de ensaio de 24 horas para n=3. A linha sólida representa o ajuste não linear realizado aos dados, usando a função de Gompertz.



Fonte: Elaboração própria

Os valores no gráfico são as médias de três experimentos (n=3), com desvios padrão associados.

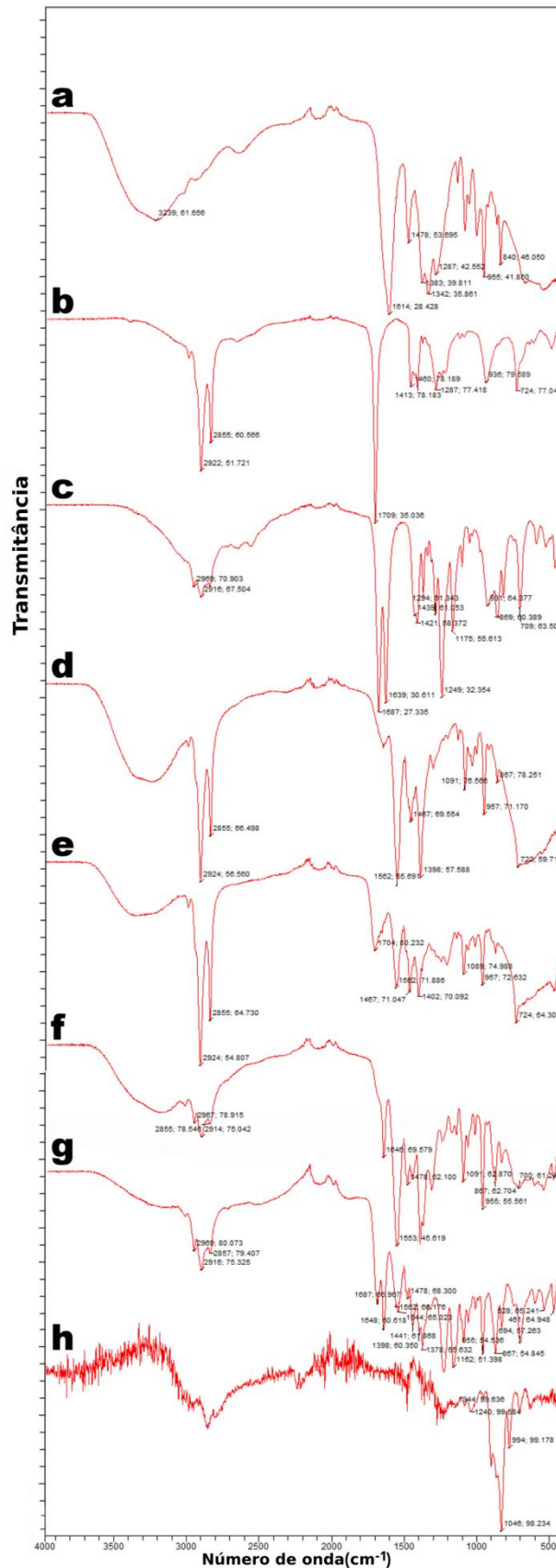
Como pode ser visto por inspeção da Figura 18, a permeação transdérmica de insulina humana NPH líquida (NovolinN, da Novo Nordisk) exibiu uma ligeira tendência sigmoideal dos dados de permeação de proteína, e foi melhor descrito por um ajuste

não linear da função de Gompertz (ver Figura 18), permitindo determinar o valor da assíntota ( $m_1$ , isto é, o máximo atingível,  $0,386 \mu\text{g}_{\text{proteína}}/\text{mm}^2_{\text{pele}}$ ), o deslocamento da tendência dos resultados ao longo do período de tempo estudado ( $m_2=38 \text{ min}$ ) e a taxa de crescimento dos dados ( $m_3=0,0258 \mu\text{g}_{\text{proteína}}/(\text{mm}^2_{\text{pele}}\cdot\text{min})$ ), com um fraco coeficiente de correlação ( $r=0,6714$ ). Os resultados demonstram que, isoladamente, a biomembrana de nanocelulose bacteriana contendo insulina adsorvida não promove a sua permeação transdérmica, sendo desejável a presença de um facilitador de permeação, como por exemplo um líquido iônico. Tal líquido peculiar e altamente viscoso é capaz de vencer as elaboradas defesas da pele (via desestabilização transiente do estrato córneo) e, desse modo, permitir que moléculas bioativas atinjam os locais pretendidos, aumentando efetivamente a permeação para a liberação transdérmica de (bio) fármacos. Uma vez aplicado à superfície da pele, as moléculas dos líquidos iônicos provavelmente deslizam através dos compostos graxos que compõem as células da pele, criando pequenas aberturas transientes através das quais as moléculas bioativas (carregadas pelo líquido iônico) podem permear. Esta hipótese foi estudada também neste trabalho de pesquisa, sendo objeto de análise mais à frente.

### **5.9. Análise dos Líquidos Iônicos por Espectrofotometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

Os espectros de infravermelho dos líquidos iônicos e da insulina humana podem ser encontrados na Figura 19. A partir dos espectros de FTIR representados na Figura 19, pode observar-se que os picos característicos dos reagentes (bicarbonato de colina (ver Figura 19a), ácido oleico (ver Figura 19b) e ácido gerânico (ver Figura 19c) foram preservados em certa medida nos respectivos líquidos iônicos.

**Figura 19.** Espectros de FTIR de **(a)** bicarbonato de colina, **(b)** ácido oleico, **(c)** ácido gerânico, **(d)** oleato de colina 1:1, **(e)** oleato de colina 1:2, **(f)** geranato de colina 1:1, **(g)** geranato de colina 1:2, e **(h)** insulina humana (NOVOLIN® N).



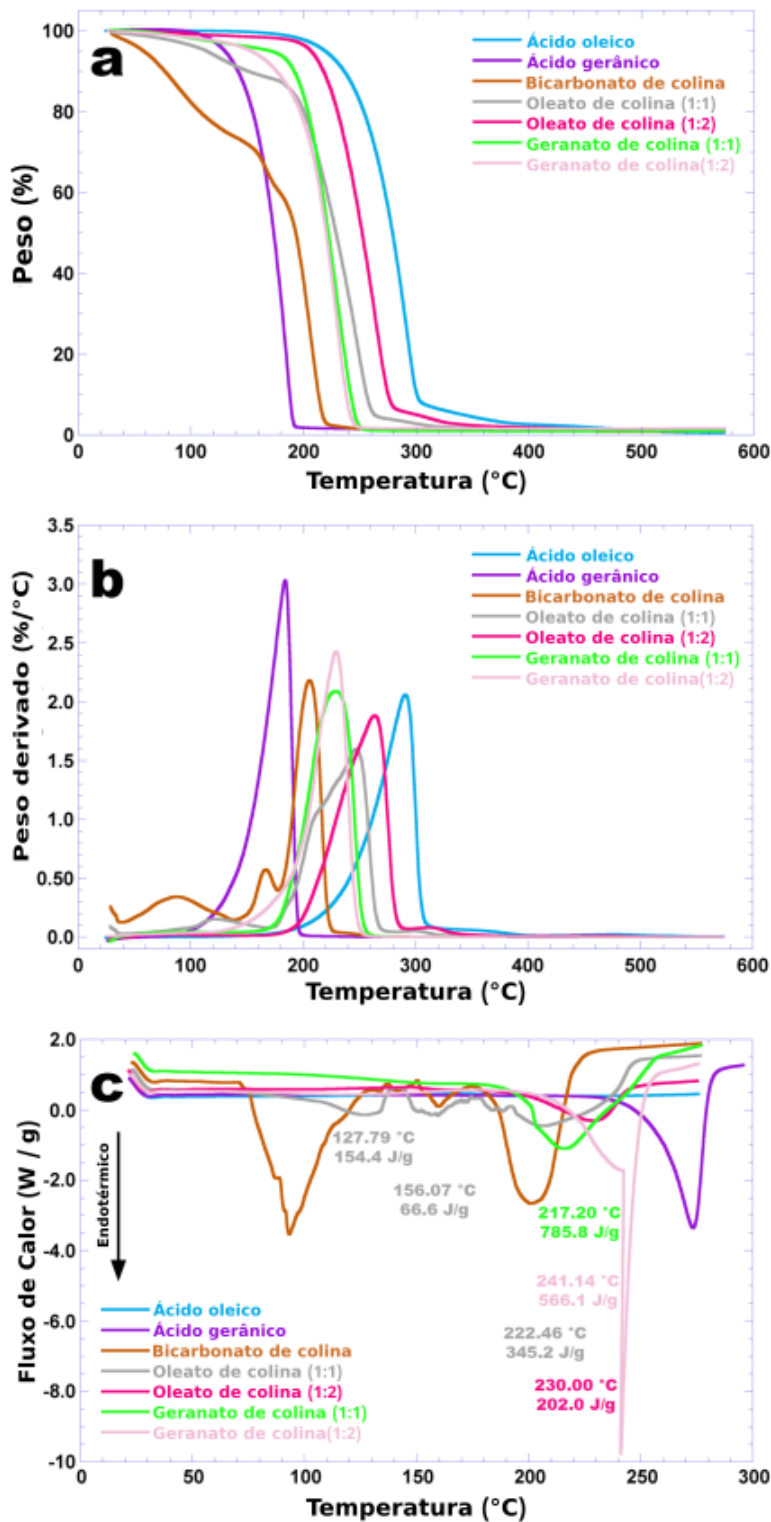
Fonte: Elaboração própria

Os picos característicos do bicarbonato de colina, aparecendo em  $1479\text{ cm}^{-1}$ ,  $1383\text{ cm}^{-1}$ ,  $955\text{ cm}^{-1}$  e  $840\text{ cm}^{-1}$  (ver Figura 19a) aparecem em certa medida nos quatro líquidos iônicos,  $1467\text{ cm}^{-1}$ ,  $1398\text{ cm}^{-1}$ ,  $957\text{ cm}^{-1}$ ,  $867\text{ cm}^{-1}$  e  $722\text{ cm}^{-1}$  para CO1:1,  $1467\text{ cm}^{-1}$ ,  $1402\text{ cm}^{-1}$ ,  $957\text{ cm}^{-1}$  e  $724\text{ cm}^{-1}$  para CO1:2,  $1478\text{ cm}^{-1}$ ,  $955\text{ cm}^{-1}$ ,  $867\text{ cm}^{-1}$  e  $700\text{ cm}^{-1}$  para CG1:1 e  $1478\text{ cm}^{-1}$ ,  $1378\text{ cm}^{-1}$ ,  $955\text{ cm}^{-1}$  e  $867\text{ cm}^{-1}$  para CG1:2. Da mesma forma, os picos característicos do ácido oleico e do ácido gerânico também aparecem nos líquidos iônicos correspondentes, isto é, na região de  $2922\text{ cm}^{-1}$  a  $2855\text{ cm}^{-1}$  para o ácido oleico, e na região de  $2960\text{ cm}^{-1}$  a  $2916\text{ cm}^{-1}$  para o ácido gerânico, o que pode permitir concluir que a reação entre o bicarbonato de colina e o ácido oleico (ver Figura 19d) e entre o bicarbonato de colina e o ácido gerânico (ver Figuras 19f, 19g) não alterou a estrutura dos reagentes em grande medida. Os picos em torno de  $2850\text{ cm}^{-1}$  correspondem muito provavelmente a estiramentos simétricos de  $\text{CH}_2$ .

## 5.10. Análises Térmicas dos Líquidos Iônicos Sintetizados por TGA e DSC

A combinação de dados de métodos analíticos avançados permite obter informações detalhadas sobre os processos de degradação dos líquidos iônicos (MATON; DE VOS; STEVENS, 2013; VILLANUEVA et al., 2013). Diminuições de massa de todos os líquidos iônicos durante o processo de aquecimento foram avaliadas a partir de curvas termogravimétricas (TGA), enquanto a temperatura da taxa máxima de variação de massa ( $T_{\text{max}}$ ) foi determinada a partir do máximo da 1ª derivada das curvas de perda de peso. Segundo Wang; Chang; Cai, (2018), a tendência global das curvas termogravimétricas apresentadas na Figura 20a corresponde ao comportamento térmico clássico dos líquidos iônicos. A análise termogravimétrica foi utilizada para caracterizar as estabilidades térmicas dos LIs sintetizados a uma taxa de aquecimento de  $10\text{ °C/min}$ , desde a temperatura ambiente até  $600\text{ °C}$ . A figura 20 mostra as curvas TGA dos vários líquidos iônicos sintetizados. As temperaturas iniciais de decomposição dos líquidos iônicos podem ser determinadas pela interseção da tangente com a linha de base na inclinação máxima das curvas TGA. O primeiro estágio, ocorrendo entre  $25\text{ °C}$  e  $100\text{ °C}$  (Figura 20a), está geralmente ligado à evaporação de moléculas de água adsorvidas aos líquidos iônicos. O segundo estágio, ocorrendo entre  $150\text{ °C}$  e  $300\text{ °C}$  (Figura 20a) está associado à degradação dos líquidos iônicos.

**Figura 20.** Curvas termogravimétricas (a), 1ª derivada das curvas de perda de peso (b) e termograms de calorimetria diferencial de varredura dos líquidos iônicos sintetizados e seus reagentes de partida (c).



Fonte: Elaboração própria

A degradação dos líquidos iônicos sintetizados consiste num passo bem marcado, como mostrado pelo máximo na 1ª derivada da curva de perda de peso

(Figura 20b) a  $T_{max}$  (temperatura máxima)  $\approx 250$  °C (oleato de colina 1:1),  $T_{max} \approx 260$  °C (oleato de colina 1:2),  $T_{max} \approx 230$  °C (geranato de colina 1:1) e  $T_{max} \approx 230$  °C (geranato de colina 1:2). O limite superior da gama líquida é geralmente limitado pela temperatura de decomposição térmica do líquido iônico, uma vez que a maioria dos líquidos iônicos são não voláteis (ABBAS; BINDER, 2010).

As análises termogravimétricas e de calorimetria diferencial de varredura foram usadas para investigar os limites de decomposição dos líquidos iônicos sintetizados. O geranato de colina 1:1 e o geranato de colina 1:2 possuem apenas um pico inicial de degradação, a cerca de 190 °C, mas o oleato de colina 1:1 e o oleato de colina 1:2 exibem temperaturas iniciais de degradação diferentes, 120 °C e 220 °C, respectivamente (Figura 20a). Estes resultados estão de acordo com os resultados publicados por ABBAS; BINDER, (2010), referentes à análise termogravimétrica do cloreto de colina.

A 1ª derivada da curva de perda de massa (ou seja, a taxa de variação de massa, figura 20b) pode ser usada para indicar os pontos nos quais a perda de massa é mais aparente (pontos de inflexão), 90 °C, 165 °C e 210 °C para o bicarbonato de colina, 250 °C para o oleato de colina 1:1, 260 °C para o oleato de colina 1:2 e 230 °C para ambos o geranato de colina 1:1 e o geranato de colina 1:2.

Em geral, as análises térmicas permitem avaliar a compatibilidade entre os componentes de uma formulação e a estabilidade e decomposição térmica de entidades bioativas. A análise termogravimétrica (TGA) acompanha a variação na massa da amostra em função de um aumento linear de temperatura durante um intervalo de tempo predeterminado, permitindo determinar o perfil térmico dos líquidos iônicos sintetizados. Como pode ser observado a partir da inspeção das curvas na Figura 20b, o comportamento térmico é bastante semelhante para todos os quatro líquidos iônicos.

Os resultados das análises de DSC de todas as amostras de líquido iônico, registradas sob modo de aquecimento entre 25 °C e 300 °C podem ser encontrados na forma de termogramas na Figura 20c.

Os líquidos iônicos sintetizados neste trabalho de pesquisa são todos líquidos à temperatura ambiente e, portanto, são líquidos iônicos à temperatura ambiente (LlSTA). Todos os LlSTA têm ampla faixa de temperaturas na qual são líquidos, juntamente com alta estabilidade térmica.

Os líquidos iônicos são sistemas densos, com a densidade a exibir dependências bem definidas na temperatura. Segundo Ohno e Wiley (2011), a densidade diminui linearmente com o aumento da temperatura, independentemente das estruturas dos líquidos iônicos. Os valores do ponto de fusão ( $T_m$ ) são importantes para determinar o limite inferior da faixa de operação onde o líquido iônico é líquido, e a  $T_{início}$  pode ser considerado como o limite superior de operação uma vez que os líquidos iônicos não evaporam.

As capacidades térmicas podem ser importantes para avaliar líquidos iônicos em aplicações de transferência de calor e armazenamento térmico.

A partir da inspeção dos termogramas na Figura 20c, os líquidos iônicos sintetizados exibem picos endotérmicos a 127,79 °C (com entalpia de fusão associada igual a 154,4 J/g), 156,07 °C (com entalpia de fusão associada igual a 66,6 J/g) e 222,46 °C (com entalpia de fusão associada igual a 345,2 J/g) para oleato de colina 1:1, 217,20 °C (com entalpia de fusão associada igual a 785,8 J/g) para geranato de colina 1:1, 241,14 °C (com entalpia de fusão associada igual a 566,1 J/g) para geranato de colina 1:2, e 230,00 °C (com entalpia de fusão associada igual a 202,0 J/g) para oleato de colina 1:2.

A técnica de análise por DSC mede a entalpia das amostras e pode indicar a temperatura de transição vítrea e eventos endotérmicos e/ou exotérmicos nas amostras sob escrutínio. Como é evidente a partir da inspeção dos resultados na Figura 20c, todos os líquidos iônicos apresentam altas temperaturas de fusão, sendo por isso estáveis para aplicações envolvendo temperaturas fisiológicas.

### **5.11. Determinação do Teor de Água dos Líquidos Iônicos Sintetizados, por Titulação de Karl-Fischer**

Conhecer o teor de água presente nos líquidos iônicos é um fator importante do ponto de vista prático para avaliar propostas de aplicação, bem como avaliar os procedimentos corretos para a manipulação destes compostos (CASTAÑEDA UGARTEBURU, 2015).

O teor de umidade do bicarbonato de colina foi de cerca de  $(22,12 \pm 0,12)$  % (m/m), do ácido oleico foi de cerca de  $(0,55 \pm 0,01)$  % (m/m), do ácido gerânico foi de cerca de  $(1,30 \pm 0,06)$  % (m/m), e dos líquidos iônicos foi de cerca de  $(10,32 \pm 0,02)$

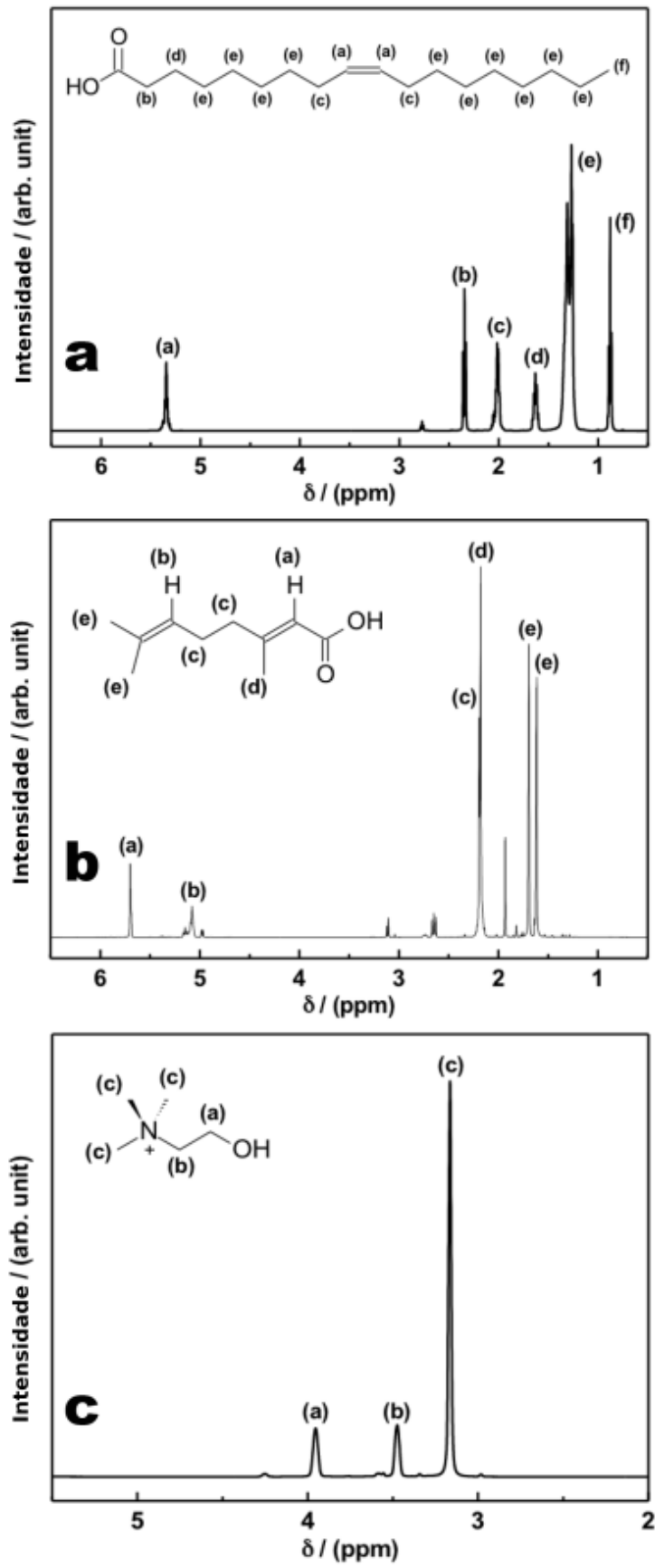
% (m/m) para o oleato de colina (1:1), cerca de  $(6,17 \pm 0,15)$  % (m/m) para o oleato de colina (1:2), cerca de  $(7,76 \pm 0,37)$  % (m/m) para o geranato de colina (1:1), e cerca de  $(2,24 \pm 0,09)$  % (m/m) para o geranato de colina (1:2). Estes resultados são consistentes com os resultados das análises termogravimétricas exibidos na Figura 20a.

O teor de água do Geranato de Colina (1:2) foi o menor dentre os líquidos iônicos estudados, sendo mais um fator para a utilização desta substância como promotor de permeação cutânea.

### **5.12. Análise dos Líquidos Iônicos Sintetizados por Ressonância Magnética Nuclear ( $^1\text{H}$ RMN)**

A Figura 21 mostra a atribuição de sinais  $^1\text{H}$  RMN para os materiais de partida: ácido oleico (Figura 21a), ácido gerânico (Figura 21b), e bicarbonato de colina (Figura 21c), respectivamente.

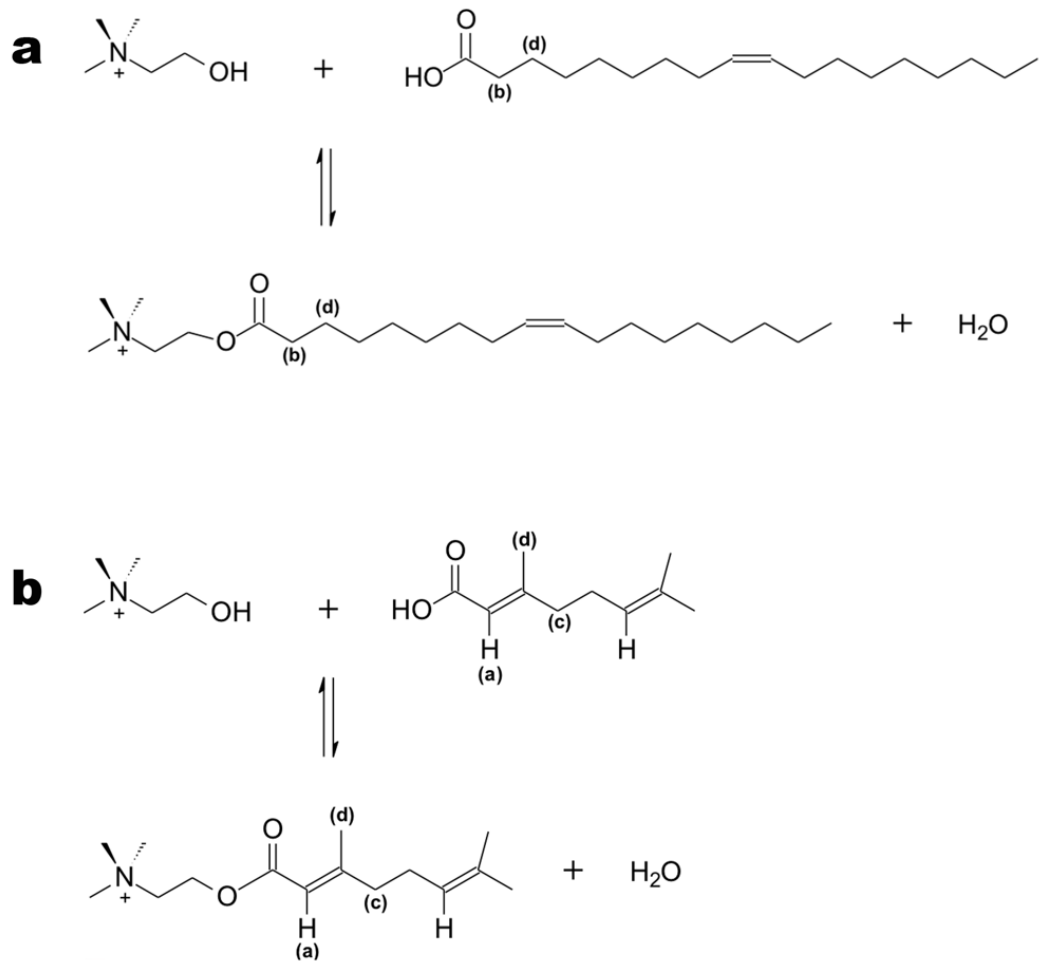
**Figura 21.** Espectros  $^1\text{H}$  RMN do ácido oleico (**a**), ácido gerânico (**b**), e bicarbonato de colina (**c**).



Fonte: Elaboração própria

Ésteres são produzidos quando ácidos carboxílicos são aquecidos com álcoois na presença de um catalizador ácido. Assim, é esperada a formação de oleato de colina e geranato de colina, quando o bicarbonato de colina reage com ácido oleico e ácido gerânico, respectivamente. A Figura 22 mostra a reação de esterificação entre o ácido oleico e o cátion colina para produzir oleato de colina. A transformação do ácido num éster altera o ambiente químico dos hidrogênios próximos ao grupo carbonilo. Na Figura 22, os hidrogênios (b) e (d), do ácido oleico, são os mais afectados pelos espectros de RMN, quando o espectro  $^1\text{H}$  RMN do éster é comparado com o do ácido.

**Figura 22.** Reações de esterificação entre **(a)** ácido oleico e cátion colina para produzir oleato de colina (os hidrogênios (b) e (d) são os mais afectados pelos espectros de RMN, quando o espectro  $^1\text{H}$  RMN do éster é comparado com o do ácido), e **(b)** ácido gerânico e cátion colina para produzir geranato de colina (os hidrogênios (a), (c), e (d) são os mais afectados pelos espectros de RMN, quando o espectro  $^1\text{H}$  RMN do éster é comparado com o do ácido).

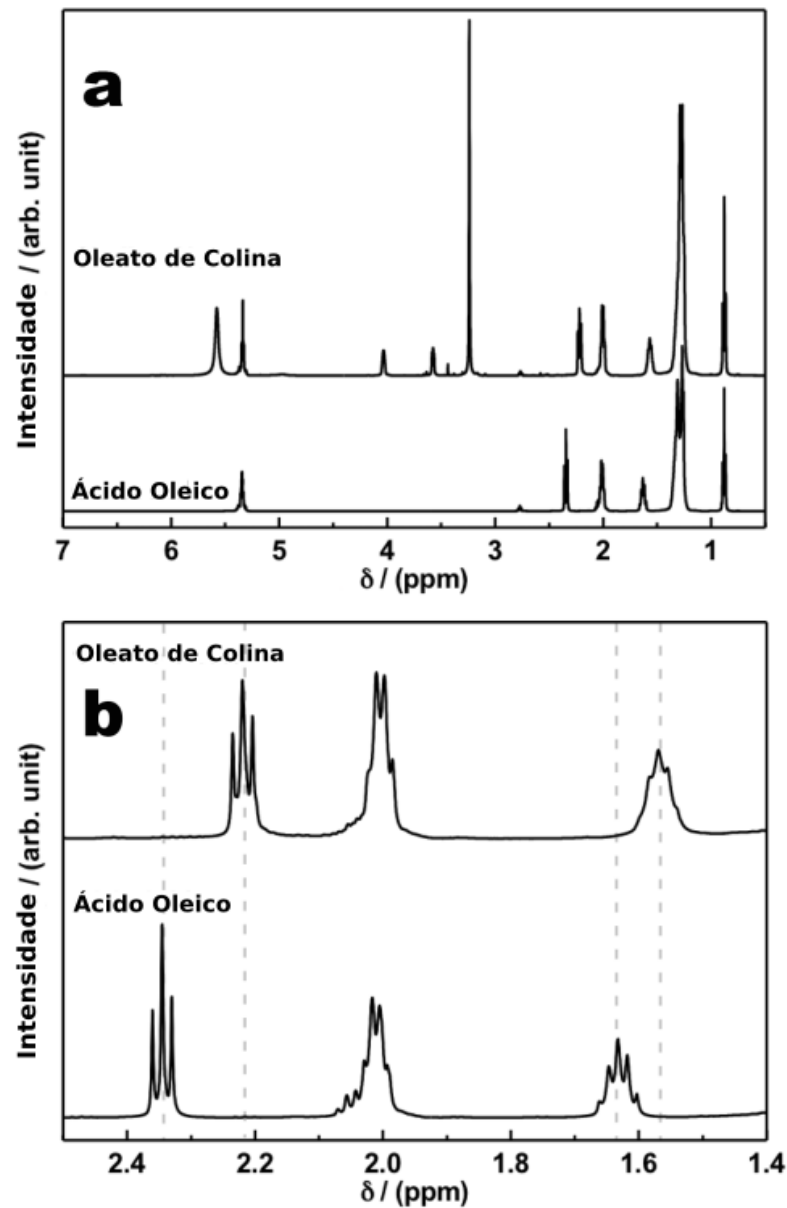


Fonte: Elaboração própria

A Figura 22a mostra os espectros de  $^1\text{H}$  RMN do oleato de colina e do seu material de partida, ácido oleico. Adicionalmente, na Figura 22b pode ser encontrada uma expansão para destacar os deslocamentos de campo *upfield* de 2,34 para 2,21 ppm, relacionados aos hidrogênios alpha para o carbonilo, e de 1,63 para 1,57, relacionados aos hidrogênios beta para o carbonilo, quando estes sinais do éster são comparados com os respectivos sinais do ácido.

A Figura 23b mostra a reação de esterificação entre o ácido gerânico e o cátion colina, para produzir geranato de colina. A transformação do ácido num éster altera o ambiente químico dos hidrogênios próximos ao grupo carbonilo. Na Figura 23b, os hidrogênios (a), (c), e (d), do ácido gerânico, são os mais afectados pelos espectros de RMN, quando o espectro  $^1\text{H}$  RMN do éster é comparado com o do ácido. A Figura 23a mostra os espectros  $^1\text{H}$  RMN do geranato de colina e do seu material de partida, o ácido gerânico. Adicionalmente, As Figuras 23b e 23c são duas expansões para destacar os deslocamentos de campo *upfield* de 2,18 para 2,02 ppm, relacionados aos hidrogênios (c) e (d), e de 5,69 para 5,63 ppm, relacionados ao hidrogênio (a), quando estes sinais do éster são comparados com os respectivos sinais do ácido. Na Figura 23b, pode ser também observada uma melhor separação dos sinais dos hidrogênios (c) e (d) no espectro do éster, quando comparado com o espectro do ácido.

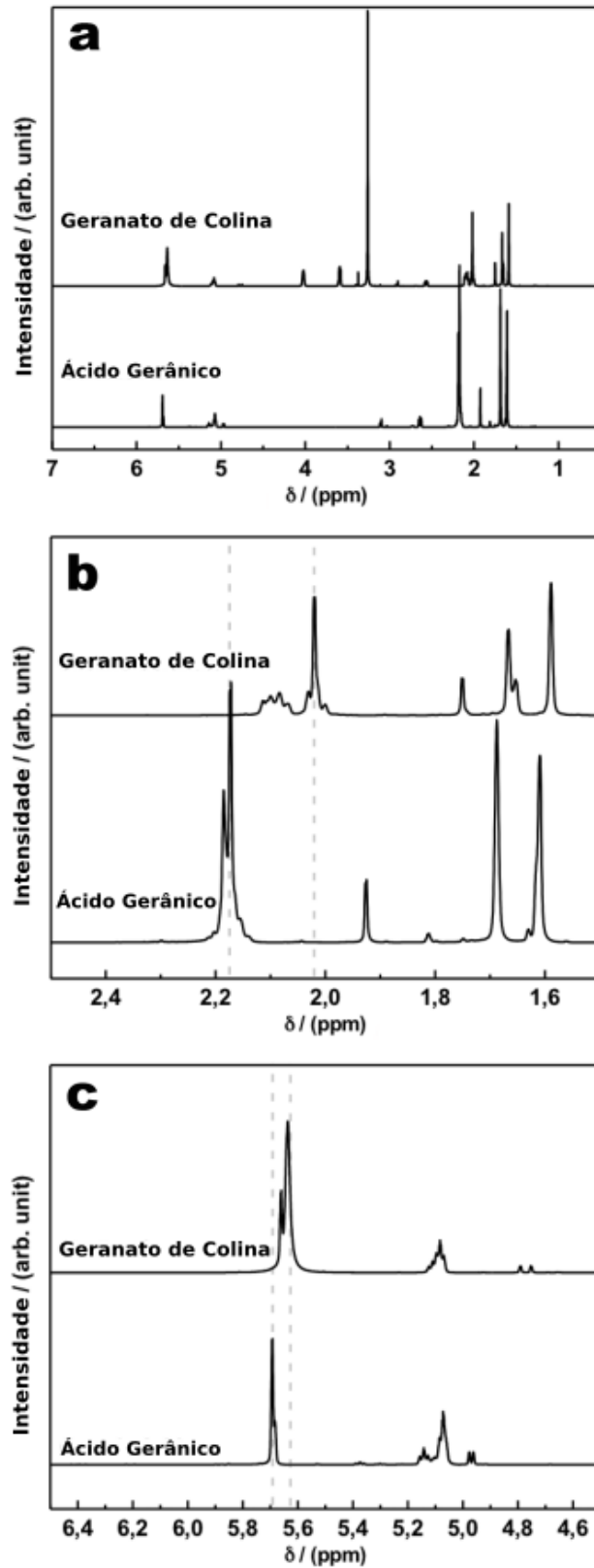
**Figura 23.** Espectros de  $^1\text{H}$  RMN do oleato de colina e do seu material de partida ácido oleico **(a)**, junto com uma expansão para destacar os deslocamentos de campo *upfield* de 2,34 para 2,21 ppm e de 1,63 para 1,57, quando estes sinais do éster são comparados com os respectivos sinais do ácido **(b)**.



Fonte: Elaboração própria

**Figura 24.** Espectros  $^1\text{H}$  RMN do geranato de colina e do seu material de partida, o ácido gerânico **(a)** e duas expansões, para destacar os deslocamentos de campo *upfield* de 2,18 para 2,02 ppm **(b)** e de

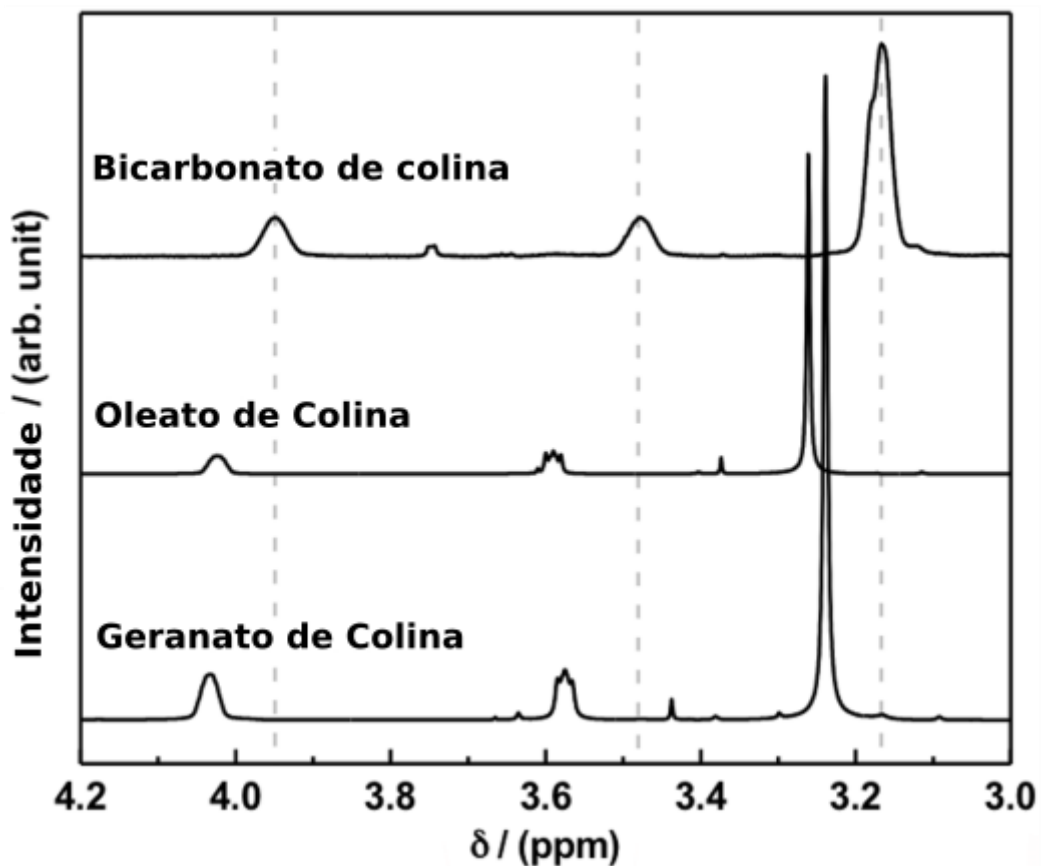
5,69 para 5,63 ppm **(c)**, quando estes sinais do éster são comparados com os respectivos sinais do ácido.



Fonte: Elaboração própria

Em adição às diferenças mencionadas, em ambas as Figuras 22 e 25 podem observar-se os sinais da estrutura do cátion colina. A Figura 25 mostra as diferenças observadas nos sinais relacionados com a estrutura do cátion colina nos espectros do bicarbonato de colina, oleato de colina, e geranato de colina.

**Figura 25.** Espectros de  $^1\text{H}$  RMN do bicarbonato de colina, oleato de colina, e geranato de colina, para destacar os deslocamentos de campo *downfield* quando os sinais do éster são comoarados com os respetivos sinais do bicarbonato de colina.



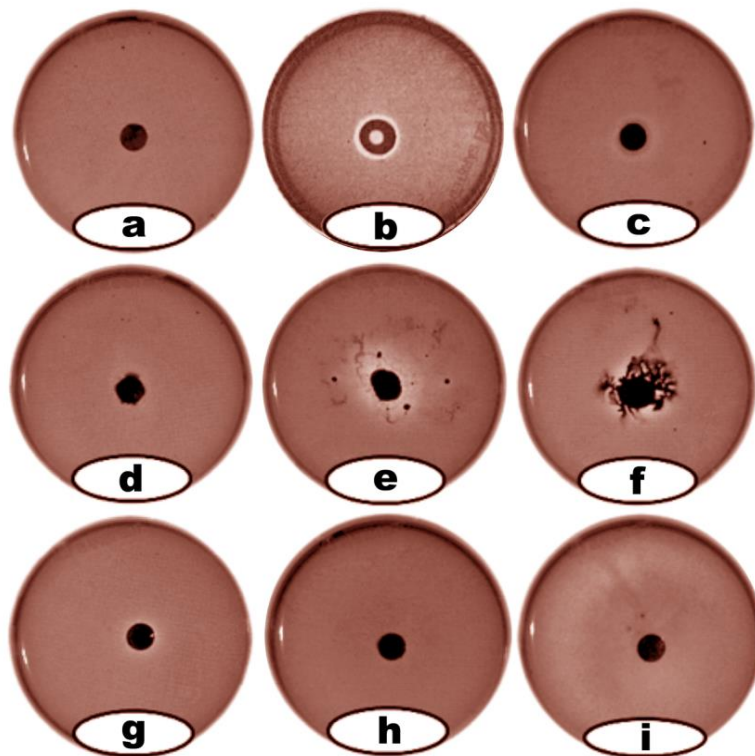
Fonte: Elaboração própria

### 5.13. Potencial de Citotoxicidade dos Líquidos Iônicos pelo Ensaio de Disco-Difusão em Ágar

A potencial citotoxicidade dos líquidos iônicos sintetizados assim como dos seus respectivos solventes eutéticos profundos, foi avaliada através da metodologia de disco-difusão em ágar utilizando a linhagem celular 3T3 (Figura 26).

Conforme ZAKREWSKY et al. (2014) os líquidos iônicos são substâncias com uma ínfima toxicidade para células epiteliais e promovem uma efetiva permeação de fármacos. Os resultados obtidos indicaram uma citotoxicidade mínima para o geranato de colina o que esta de acordo com o trabalho de ZAKREWSKY et al. (2014), onde o geranato de colina alcançou as camadas profundas do tecido cutâneo, sem induzir a irritação da pele.

**Figura 26.** Resultados da análise de citotoxicidade realizada aos líquidos iônicos e seus respectivos solventes eutéticos profundos, através da metodologia de disco-difusão em ágar usando a linhagem celular 3T3: **(a)** controle negativo, **(b)** controle positivo, **(c)** geranato de colina 1:1, **(d)** geranato de colina 1:2, **(e)** oleato de colina 1:2, **(f)** oleato de colina 1:1, **(g)** ácido oleico, **(h)** ácido gerânico e **(i)** bicarbonato de colina.



Fonte: Elaboração Própria

Os resultados obtidos mostraram que não houve morte celular causada pelo contato com o ácido gerânico (Figura 26h), com as células apresentando integridade sob análise microscópica. Pelo contrário, após contato com o geranato de colina 1:1 (Figura 26c), geranato de colina 1:2 (Figura 26d), oleato de colina 1:2 (Figura 26e), oleato de colina 1:1 (Figura 26f), ácido oleico (Figura 26g) e bicarbonato de colina (Figura 26i), foi observada uma ligeira citotoxicidade, apresentada pelo desenvolvimento de um halo mais claro em torno da amostra do material. As amostras

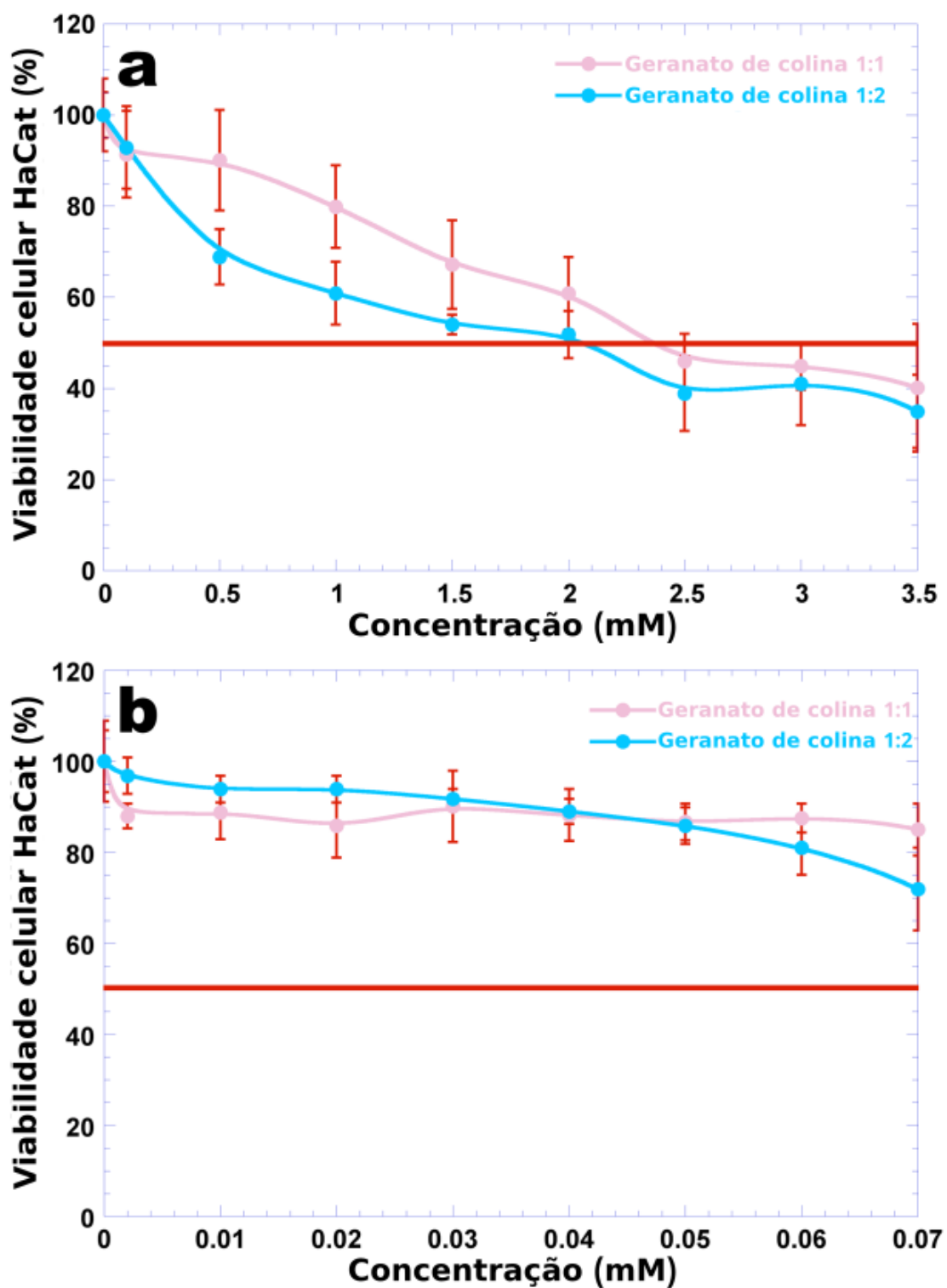
contendo oleato de colina foram as mais tóxicas para as células observadas na Figura 26 (e); 26(f).

#### **5.14. Potencial de Citotoxicidade dos Líquidos Iônicos pelo Ensaio de Atividade Mitocondrial (MTT)**

A avaliação do potencial de citotoxicidade foi também realizada pelo ensaio de atividade mitocondrial (MTT), utilizando células HaCaT (queratinócitos humanos imortalizados), (Figura 27). A metade da concentração inibitória máxima ( $IC_{50}$ , uma medida da eficácia de uma substância na inibição de uma função biológica ou bioquímica específica, que determina a concentração de produto necessária para matar 50% das células) não foi atingida para todos os líquidos iônicos analisados (linha vermelha na Figura 27). Por isso, tais medidas quantitativas indicam quanto de uma determinada substância é necessária para inibir um determinado processo biológico pela metade. Esses resultados estão de acordo com a pesquisa de Couteiro (2017) onde os resultados obtidos, juntamente com a incapacidade de determinar vários valores de  $IC_{50}$  sugerem que nenhum dos LI apresenta uma maior citotoxicidade para as células.

As análises realizadas com geranato de colina mostraram uma ligeira perda de viabilidade celular tanto para geranato de colina 1:1 como para geranato de colina 1:2 (Figura 27a), sendo o  $IC_{50}$  determinado através da curva Probit (um tipo de regressão onde a variável dependente pode tomar apenas dois valores, sendo, portanto uma especificação popular para um modelo de resposta ordinal ou binário) e produzindo os valores  $IC_{50} = 2,45$  mM e 2,01 mM para o geranato de colina 1:1 e geranato de colina 1:2, respectivamente (Figura 27a). Os resultados mostraram que, após 24h, a viabilidade celular após a exposição de células HaCaT a oleato de colina 1:1 e oleato de colina 1:2 foi maior do que 70% (Figura 27b) e, desta forma, nas concentrações testadas não foi possível determinar os valores de  $IC_{50}$  para o oleato de colina.

**Figura 27.** Resultados das análises de citotoxicidade realizadas aos líquidos iônicos por meio do teste (ensaio MTT), utilizando a linhagem celular HaCaT: **(a)** geranato de colina e **(b)** oleato de colina.



Fonte: Elaboração própria

### 5.15. Potencial de Genotoxicidade dos Líquidos Iônicos pelo Ensaio Cometa™

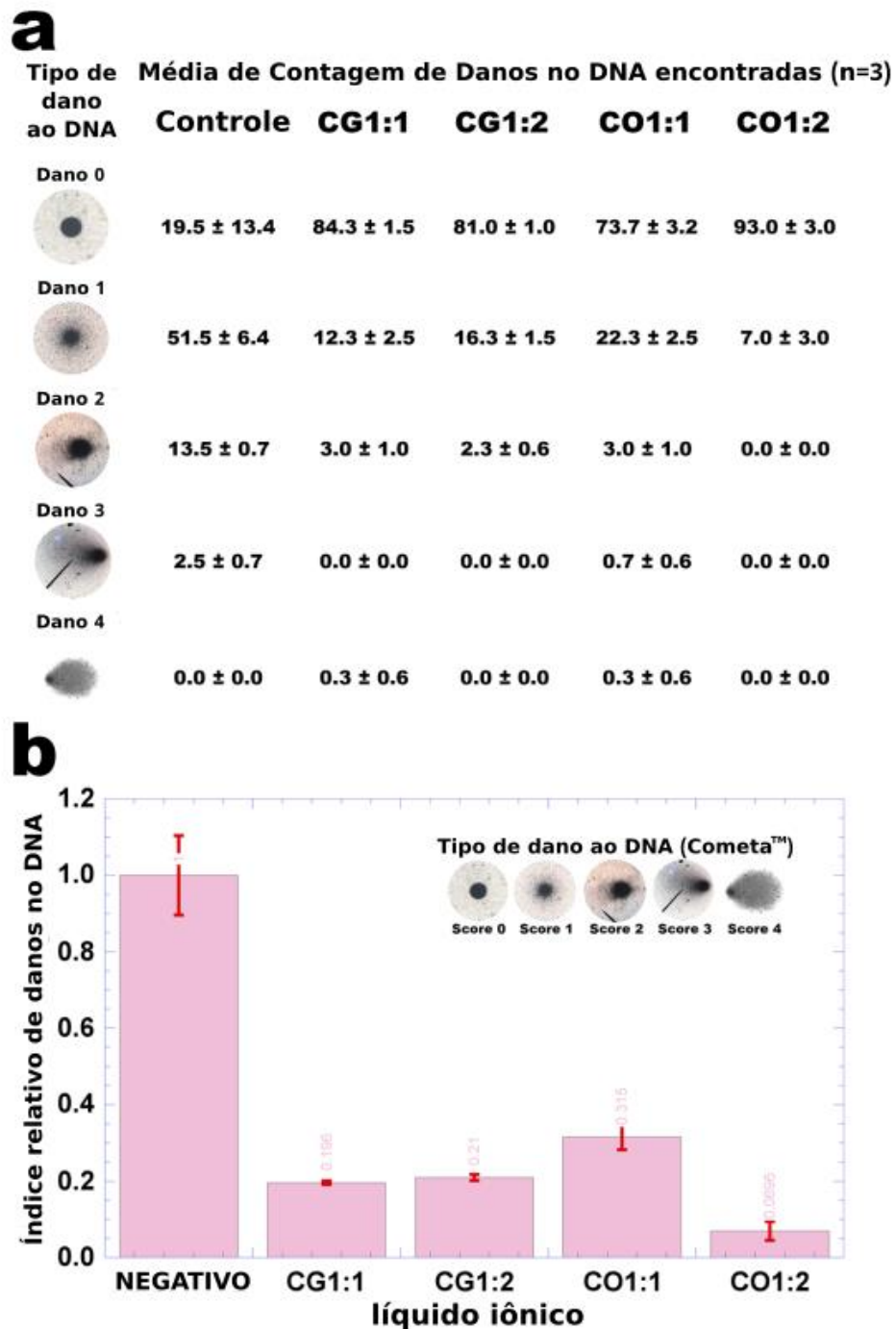
A extensão de qualquer potencial dano ao DNA (efeitos genotóxicos) promovido pelos líquidos iônicos sintetizados, oleato de colina 1:1 (CO1:1) e 1:2 (CO1:2), e geranato de colina 1:1 (CG1:1) e 1:2 (CG1:2) em células 3T3, foi avaliada pelo ensaio Cometa™, que detecta quebras na fita de DNA após dano direto induzido pelas amostras ou danos indiretos ligados ao processo de reparação do DNA. O ensaio Cometa™ é capaz de detectar quantitativamente os danos no DNA causados por agentes alquilantes ou oxidantes e intercalantes. Os índices de danos no DNA foram calculados de acordo com os tamanhos das caudas produzidas nas células. As caudas foram seriadas de acordo com cinco níveis (0, 1, 2, 3 e 4), onde zero e quatro representam a menor e a maior cauda de cometa, respectivamente, com o índice de danos ao DNA (DI) calculado como  $DI = \{(0 \times \Sigma \text{ células com pontuação } 0) + (1 \times \Sigma \text{ células com pontuação } 1) + (2 \times \Sigma \text{ células com pontuação } 2) + (3 \times \Sigma \text{ células com pontuação } 3) + (4 \times \Sigma \text{ células com pontuação } 4)\} / \text{número total de células}$ .

As lâminas foram analisadas por meio de uma revisão cega única para minimizar a variabilidade. Para avaliar quaisquer possíveis danos genéticos promovidos nas células pelas amostras CO1:1, CO1:2, CG1:1 e CG1:2, o teste Cometa™ foi realizado com a linhagem celular 3T3, permitindo observar diferenças significativas controle e a linhagem celular 3T3 que foi exposta às amostras CO1:1, CO1:2, CG1:1 e CG1:2 (Figura 28).

A análise estatística realizada aos dados recolhidos a partir deste teste foi realizada utilizando o software GraphPad Prism v.7.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla CA, E.U.A.). Em relação à análise realizada para comparar entre as amostras (incluindo o controle), não foram encontrados resultados estatisticamente diferentes entre as amostras, mas a diferença estatística entre as amostras e o controle negativo foi significativa (Figura 28b). Obteve-se uma diferença estatisticamente significativa entre o controle e as amostras de CO1:1, CO1:2, CG1:1 e CG1:2, o que significa que um possível (embora em pequena extensão) efeito genotóxico pode ser atribuído ao controle, mas não às amostras de líquidos iônicos. O alto índice relativo de danos ao DNA transmitido pelo controle (Figura 28a, b) foi devido a uma alta contagem de células com danos do tipo 1, 2 e 3.

**Figura 28.** Contagens médias de danos no DNA encontrados no teste Cometa™ realizado aos líquidos iônicos usando células 3T3 (a), e índices relativos de danos ao DNA da linhagem celular 3T3 após

exposição das células aos diferentes líquidos iônicos por 24 h (médias de seis determinações com desvio padrão associado: 3T3 (controle,  $1.000 \pm 0,104$ ; geranato de colina 1:1,  $0,196 \pm 0,005$ ; geranato de colina 1:2,  $0,210 \pm 0,008$ ; oleato de colina 1:1,  $0,315 \pm 0,033$ ; oleato de colina 1:2,  $0,070 \pm 0,024$ )) (b). As fotos inseridas representam as caudas de Cometa™ produzidas pelos diferentes tipos de danos celulares encontrados.



Fonte: Elaboração própria

Não houve danos do tipo 4 encontrados para as células 3T3 tratadas tanto com o controle como com qualquer uma das amostras de líquidos iônicos testadas.

Todas as amostras de líquidos iônicos promoveram um nível intermediário de danos do tipo 1, independentemente do tipo de líquido iônico (Figura 28a).

Baixos níveis de danos do tipo 3 foram produzidos por todas as amostras de líquidos iônico. Isso significa que as amostras de líquido iônico testadas não possuem características que promovam lesões no DNA em grande extensão, como é evidente a partir da ausência de contagens de células com níveis de danos do tipo 3 (Figura 28a). No entanto, a avaliação de genotoxicidade pelo teste Cometa™ é realizada com uma exposição celular de 1 h, porque é um procedimento de pré-teste sem a necessidade de quaisquer divisões celulares. A figura 28b representa os efeitos genotóxicos (índice relativo de danos ao DNA) à linhagem celular 3T3 incubada com meio de cultura DMEM simples (negativo) e com amostras de CO1:1, CO1:2, CG1:1 e CG1:2. Para as células 3T3, as amostras de líquido iônico testadas não apresentaram quaisquer efeitos genotóxicos significativos.

Estes resultados estão em clara concordância com os valores muito baixos de IC<sub>50</sub> encontrados para os líquidos iônicos (Figura 28). Assim, a falta de efeitos citotóxicos extensos está em linha com a falta de extensos danos no DNA, o que por sua vez está em clara concordância com os resultados publicados por Seabra et al., (2014).

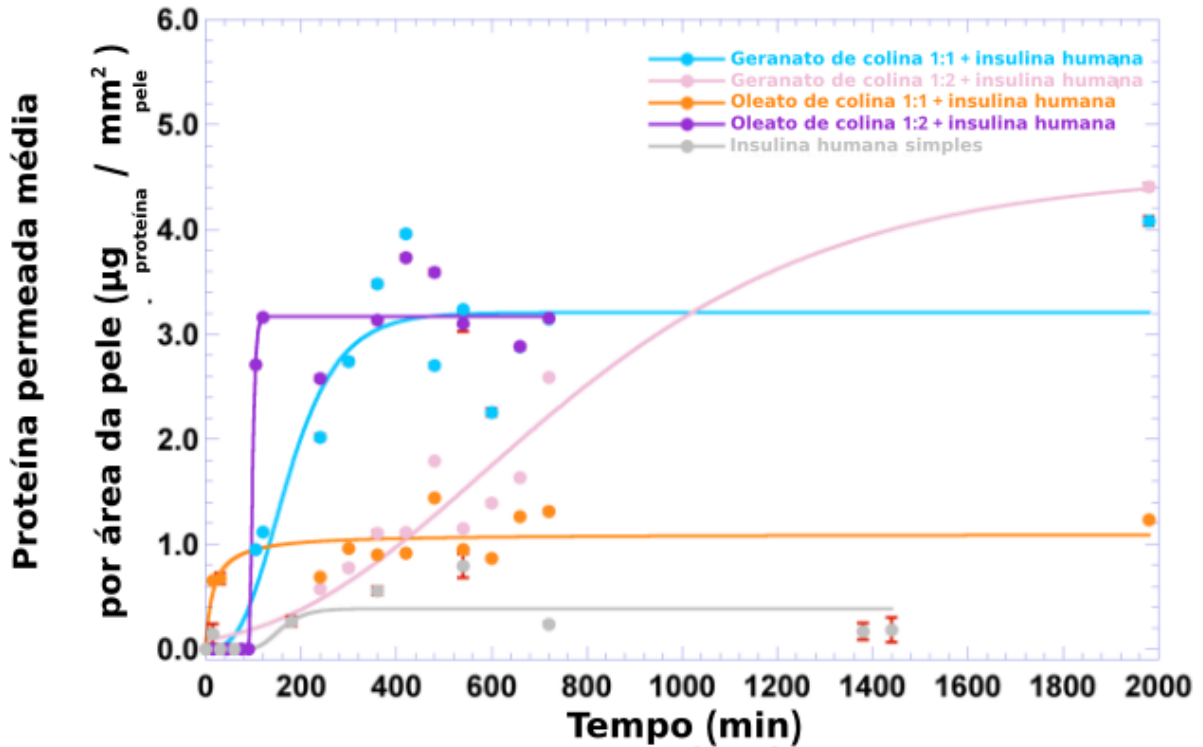
#### **5.16. Permeação Transdérmica de Insulina Promovida pelos Líquidos Iônicos**

Os resultados obtidos nos testes de permeação transdérmica de insulina auxiliada pelos líquidos iônicos simples, podem ser encontrados na Figura 29.

Como pode ser observado por inspeção da Figura 29, a presença de qualquer um dos líquidos iônicos sintetizados levou a um aumento da concentração de proteína permeada por unidade de área de pele, contrariamente ao que aconteceu no ensaio de permeação com insulina simples, sem presença de líquido iônico (curva cinzenta na Figura 29).

**Figura 29.** Resultados obtidos através dos testes de permeação transdérmica usando líquidos iônicos simples como facilitadores de permeação, como concentração média de proteína (insulina

NOVOLIN® N) permeada por área de pele. Os valores são as médias de três experimentos ( $n = 3$ ), com desvios padrão associados. As linhas sólidas representam ajustes não lineares realizados aos dados experimentais (função hiperbólica para oleato de colina 1:1 e função de Gompertz para os demais líquidos iônicos).



Fonte: Elaboração própria

Estes resultados estão de acordo com a pesquisa de SANTOS DE ALMEIDA et al. (2017) sobre o efeito positivo de LIs na penetração estar relacionado ao seu caráter iônico e sua propriedade de atuar como surfactantes catiônicos. Os agentes tensoactivos iônicos podem penetrar na membrana do estrato córneo e, extraíndo os lípidos do estrato córneo, rompem o enchimento da bicamada lipídica dentro do tecido. Como resultado, outras substâncias podem penetrar mais facilmente na pele; no entanto, o aumento da penetração é ainda dependente do caráter químico da substância medicamentosa.

Os resultados através de ajuste não linear (hiperbólico,  $y = (m_1 \cdot x) / (m_2 + x)$ ) aos resultados obtidos de concentração de proteína permeada facilitada pelo oleato de colina 1:1 (Tabela 5 e Figura 29, curva laranja) e de ajuste não-linear sigmoidal (função de Gompertz,  $y = m_3 \cdot \exp(-m_4 \cdot \exp(-m_5 \cdot x))$ ) aos resultados obtidos a partir da permeação transdérmica de proteína facilitada pelos outros líquidos iônicos (Tabela 5 e Figura 29), podem ser encontrados na Tabela 5 e Figura 29.

**Tabela 5.** Resultados obtidos a partir de ajustes não lineares realizados à concentração média de proteína permeada por unidade de área de pele ( $\mu\text{g}_{\text{proteína}}/\text{mm}^2_{\text{pele}}$ ) em função do tempo de permeação, para misturas de insulina humana com líquido iônico, para os quatro líquidos iônicos em estudo.

Amostra	Função hiperbólica: $y = (m_1 \cdot x)/(m_2 + x)$		Função de Gompertz: $y = m_3 \cdot \exp(-m_4 \cdot \exp(-m_5 \cdot x))$			r
	m1	m2	m3	m4	m5	
Geranato de colina simples 1: 1 + Insulina humana	-----	-----	3,2065	7,2967	0,01372	0,95855
Geranato de colina simples 1:2 + Insulina humana	-----	-----	4,5423	4,0200	0,00239 6	0,97723
Oleato de colina simples 1:1 + Insulina humana	1,0934	15,849	-----	-----	-----	0,83923
Oleato de colina simples 1:2 + Insulina humana	-----	-----	3,1699	4,1891x109	0,2286	0,98815
Insulina humana simples	-----	-----	0,3865	67,6410	0,02888	0,67167

Os ajustes não lineares realizados permitiram obter, para a permeação transdérmica facilitada pelo líquido iônico oleato de colina 1:1, a concentração máxima de proteína média permeada por unidade de área de pele (parâmetro  $m_1$ , Tabela 5) e o tempo necessário para atingir metade da concentração máxima de proteína permeada por unidade de área de pele (parâmetro  $m_2$ , Tabela 5), com excelente coeficiente de correlação.

Quanto aos resultados da permeação transdérmica utilizando os restantes líquidos iônicos como facilitadores de permeação, as tendências sigmoidais dos resultados de permeação transdérmica de proteína foram melhores descritas por um

ajuste da função de Gompertz ( $y = m_3 \cdot \exp(-m_4 \cdot \exp(-m_5 \cdot x))$ ), Figura 29a e Tabela 5), permitindo obter o valor da assíntota ( $m_3$ , isto é, a concentração máxima atingível de proteína permeada por unidade de área de pele, Tabela 5), o deslocamento da tendência de dados ao longo do período de tempo estudado ( $m_4$ , Tabela 5) e a taxa de crescimento de dados ( $m_5$ , Tabela 5), com excelentes coeficientes de correlação, à exceção do ajuste realizado aos dados de permeação de insulina sem facilitador de permeação.

A função de Gompertz é uma função sigmoide, onde o crescimento é mais lento no início (onde a concentração de proteína era inicialmente alta, logo a tomada pela pele foi lenta) e no final (devido ao abrandamento da permeação de proteína em função da saturação da pele) de um determinado período de tempo.

Como pode ser observado por inspeção da Figura 29, o líquido iônico geranato de colina 1:2 foi o que promoveu a maior quantidade de proteína permeada de acordo com o comportamento mais adequado de liberação por permeação intermediária, e por esta razão foi eleito para integrar o filme biopolimérico contendo insulina, para aplicações tópicas.

### **5.17. Planejamento Fatorial Experimental para Otimização da Matriz Biopolimérica do Filme**

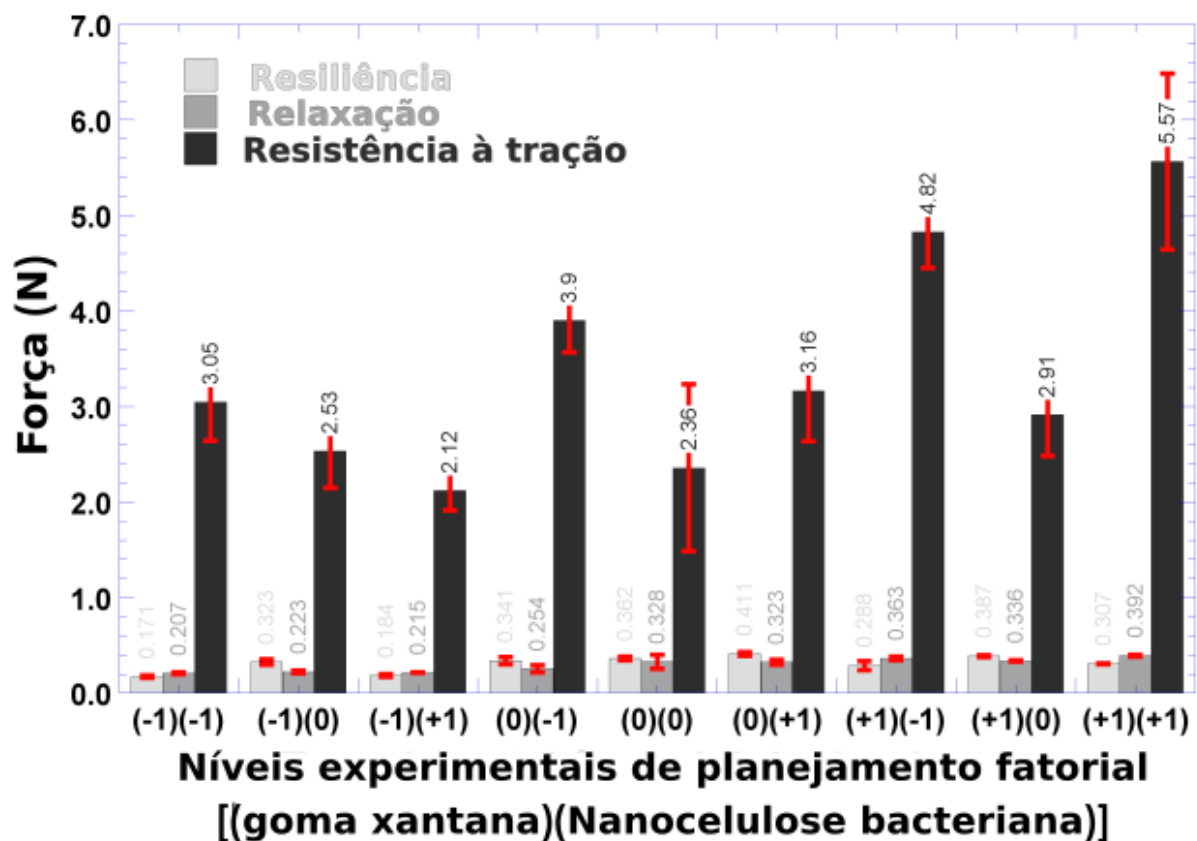
O planejamento fatorial experimental (Tabelas 2 e 3) desenhado para definir a melhor composição biopolimérica e propriedades mecânicas associadas para o filme polimérico produziu como melhor composição aquela dos níveis (+1)(+1) [(nanocelulose bacteriana)(goma xantana)] (linha sombreada na Tabela 3).

A nanocelulose bacteriana foi escolhida como um dos biopolímeros para integrar o filme biopolimérico devido às suas características únicas, como a capacidade de retenção de água, resistência mecânica, a porosidade e a biocompatibilidade (REIS, 2016), para aplicação em dispositivos biomédicos (RAJWADE et al., 2015; PETERSEN; GATENHOLM, 2011). Partindo desta composição (ótima) conduzindo a um biofilme com os mais elevados valores de resistência à tração e relaxação (ver figura 29), foram produzidos dois filmes biopoliméricos (Tabela 4) integrando os mesmos níveis fatoriais de nanocelulose bacteriana e goma xantana, isto é, (+1)(+1) e insulina humana (1,5ml), e integrando ou não líquido iônico (geranato de colina 1:2).

Em um artigo de revisão por BAKER et al. (2012), aqueles pesquisadores afirmam que é possível produzir hidrogéis flexíveis com cerca de 10% (m/m) de PVA e hidrogéis rígidos com cerca de 50% a 60% (m/m) de PVA.

A produção do filme biopolimérico otimizado dotado de maleabilidade e plasticidade, ainda que com certo grau de resistência à tração, almejou sua utilização em aplicações tópicas na entrega transdérmica de insulina. A avaliação das propriedades mecânicas dos filmes biopoliméricos produzidos sem insulina, de acordo com o planejamento fatorial apresentado na Tabela 2 e composição exibida na Tabela 3, englobou a resistência à tração, relaxação e resiliência (Figura 30).

**Figura 30.** Resultados obtidos a partir dos testes de resistência mecânica realizados aos filmes biopoliméricos resultantes do planejamento fatorial experimental.



Fonte: Elaboração própria

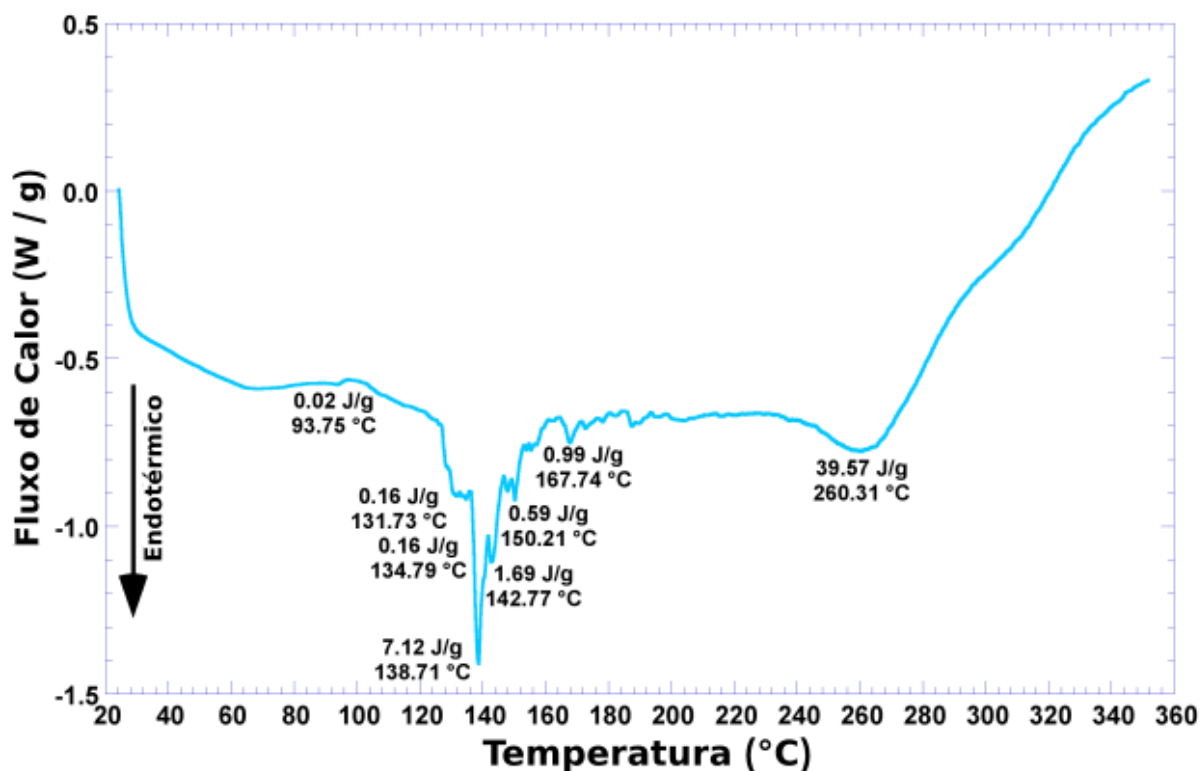
De acordo com os resultados exibidos na Figura 30, os melhores resultados produzidos em termos de resistência à tração, relaxação e resiliência foram obtidos para os níveis (+1) de nanocelulose bacteriana e (+1) de goma xantana. A capacidade do filme para voltar à forma após deformação causada por um esforço foi um atributo especialmente importante, uma vez que a sua elasticidade (isto é, a sua resiliência) é

uma característica importante para aplicações na pele. Assim, este conjunto de níveis de biopolissacarídeo foi seguido para a produção de biofilmes carregados com insulina humana (ver Tabela 4). As propriedades mecânicas dos biofilmes estão relacionadas principalmente com a capacidade do biopolímero de formar ligações em cadeias poliméricas, dificultando sua separação quando sujeitas a forças mecânicas (YANG, 2012). O plastificante utilizado (glicerol, neste caso) também tem influência sobre essas propriedades (BOURTOOM, 2008).

#### **5.18. Análises Térmicas por DSC do Filme Otimizado Estatisticamente com Líquido Iônico e Insulina**

Os resultados da análise por DSC de uma amostra do biofilme integrando insulina humana e geranato de colina 1:2, registrados em modo de aquecimento entre 20 °C e 350 °C, podem ser encontrados na Figura 31. O pico endotérmico observado a 93,75 °C (resíduo de insulina humana, com entalpia de fusão associada de 0,020 J/g) pode ser considerado como a transição de primeira ordem comumente observada numa ampla classe de biopolímeros hidratados, tais como as proteínas. Por analogia com o trabalho de (DANDURAND et al., 2014), este evento endotérmico é atribuível à evaporação de moléculas de água ligadas. Esse evento endotérmico está associado a transições de ordem -> desordem, que podem ser consideradas como assinaturas térmicas de desnaturação proteica (irreversível) (ROCHA et al., 2017).

**Figura 31.** Termograma de calorimetria diferencial exploratória do filme biopolimérico integrando geranato de colina 1:2 e insulina NOVOLIN® N.



Fonte: Elaboração própria

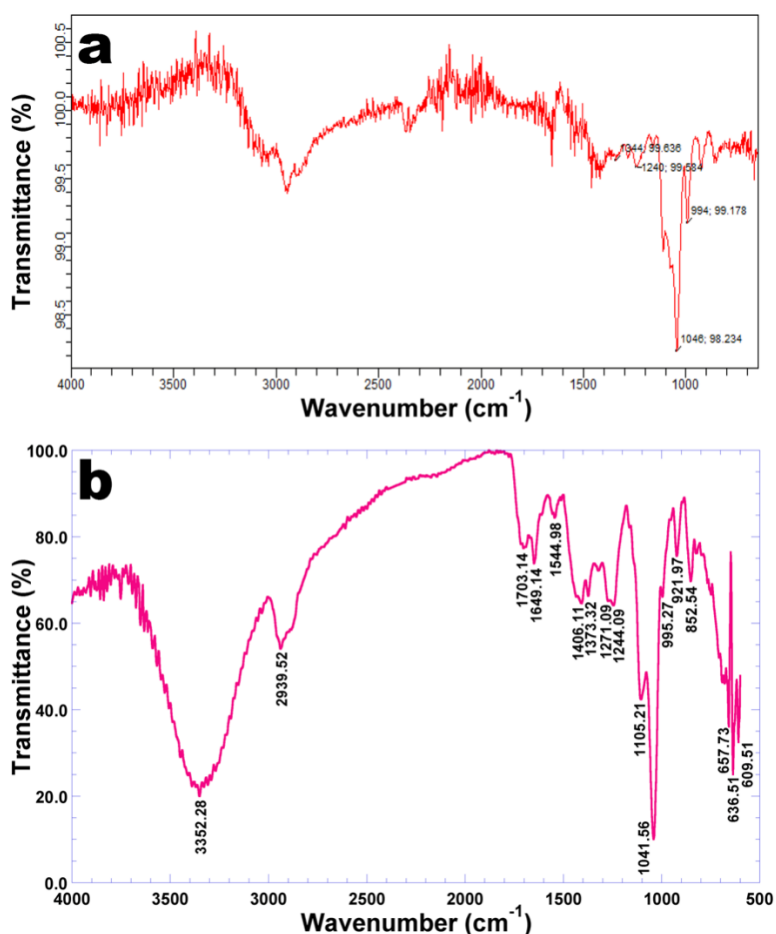
A técnica de análise por DSC mede a entalpia das amostras e pode indicar a temperatura de transição vítrea e eventos endotérmicos e/ou exotérmicos nas amostras sob escrutínio. O filme produzido seguindo o planejamento fatorial experimental e integrando insulina humana e geranato de colina 1:2, possuía em sua composição 1,25% (m/m) de PVA com grau de hidrólise de 98%, 2,50% (m/m) de glicerol, e 0,1% (m/m) de metilparabeno. O termograma obtido (ver Figura 31) apresentou um grande evento endotérmico a 138,71 °C (com entalpia de fusão associada de 7,12 J/g), provavelmente associado à carbonização da proteína e perda de água do filme. E teve outro grande evento endotérmico a 260,31 °C (com entalpia de fusão associada de 39,57 J/g), provavelmente relacionada à carbonização da matriz biopolimérica que constitui o filme. Como o filme biopolimérico integrou insulina humana e água adicionada, juntamente com uma pequena quantidade de líquido iônico (geranato de colina 1:2), os resultados obtidos da análise por DSC indicaram que os níveis utilizados não comprometeram a estabilidade do filme para o uso pretendido.

### 5.19. Análises por FTIR do Filme Otimizado Estatisticamente com Líquido Iônico e Insulina

Um gráfico de intensidade *versus* frequência de radiação, conhecido como espectro de infravermelho, permite a caracterização dos grupos funcionais num dado material, fazendo com que a espectrofotometria FTIR seja amplamente utilizada na análise da estrutura de sistemas (bio) poliméricos.

A espectrofotometria de FTIR pode permitir esclarecer possíveis interações entre a proteína carregada (insulina humana) e a matriz biopolimérica, via análise dos grupos funcionais presentes nos diferentes constituintes envolvidos no processo. Os espectros de infravermelho de **(a)** insulina humana líquida (NOVOLIN® N) e **(b)** filme integrando insulina humana NOVOLIN® N e geranato de colina 1:2, podem ser encontrados na Figura 32.

**Figura 32.** Espectros FTIR de **(a)** insulina humana NOVOLIN® N e **(b)** filme biopolimérico integrando geranato de colina 1:2 e insulina NOVOLIN® N.



Fonte: Elaboração própria

Comparando o espectro da insulina humana simples NOVOLIN® N (Figura 32a) com o espectro do filme biopolimérico integrando insulina humana NOVOLIN® N e

geranato de colina 1:2, os mesmos picos característicos podem ser observados apenas com pequenas variações na intensidade do pico, nos números de onda  $1244\text{ cm}^{-1}$ ,  $1105\text{ cm}^{-1}$ ,  $1042\text{ cm}^{-1}$  e  $995\text{ cm}^{-1}$ . Isto sugere claramente que o aspecto químico da insulina foi preservado durante a integração no filme biopolimérico.

Segundo (GUPTA et al., 2014), moléculas de proteína podem apresentar absorção de energia característica entre os números de onda  $1650\text{ cm}^{-1}$  a  $1630\text{ cm}^{-1}$  para amidas primárias, entre os números de onda  $1540\text{ cm}^{-1}$  a  $1520\text{ cm}^{-1}$  para amidas secundárias e entre os números de onda  $1270\text{ cm}^{-1}$  a  $1230\text{ cm}^{-1}$  para amidas terciárias.

A partir da inspeção dos espectros de transmitância representados na Figura 32a, podem-se observar picos dentro da gama de número de onda que provavelmente representam amidas primárias a aproximadamente  $1620\text{ cm}^{-1}$  devido ao estiramento do grupo carbonilo (C=O), amidas secundárias a aproximadamente  $1519\text{ cm}^{-1}$  e amidas terciárias na região de  $1238\text{ cm}^{-1}$  devido ao estiramento da ligação C-N. Além disso, as posições desses picos confirmam a proteína, tais como  $1650\text{ cm}^{-1}$  (espiral aleatória) e  $1613\text{ cm}^{-1}$  (folha beta), para amida primária,  $1540\text{ cm}^{-1}$  (espiral aleatória) e  $1520\text{ cm}^{-1}$  (folha beta) para amida secundária e  $1270\text{ cm}^{-1}$  (folha beta) e  $1230\text{ cm}^{-1}$  (espiral aleatória) para a amida terciária (GUPTA et al., 2014).

O filme (Figura 32b) produziu um espectro de infravermelho muito semelhante, com um pico principal produzido em torno de  $3352\text{ cm}^{-1}$  correspondente a grupos OH da água, e outro pico principal em  $1649\text{ cm}^{-1}$  (Figura 32b) correspondente a um estiramento do grupo C=O de amidas primárias, muito provavelmente devido ao forte caráter hidrofílico das amidas primárias. As vibrações de estiramento observadas na região de número de onda de  $3352\text{ cm}^{-1}$  (REIS et al., 2006), responsáveis pelo grande pico observado, são muito provavelmente explicadas por grupos hidroxila de moléculas de água presentes no filme.

Picos característicos indicativos de proteína situam-se entre  $1390\text{ cm}^{-1}$  a  $1250\text{ cm}^{-1}$  para ligações C-N e entre  $1640\text{ cm}^{-1}$  e  $1500\text{ cm}^{-1}$  para agrupamentos N-H (MEHTA et al., 2013).

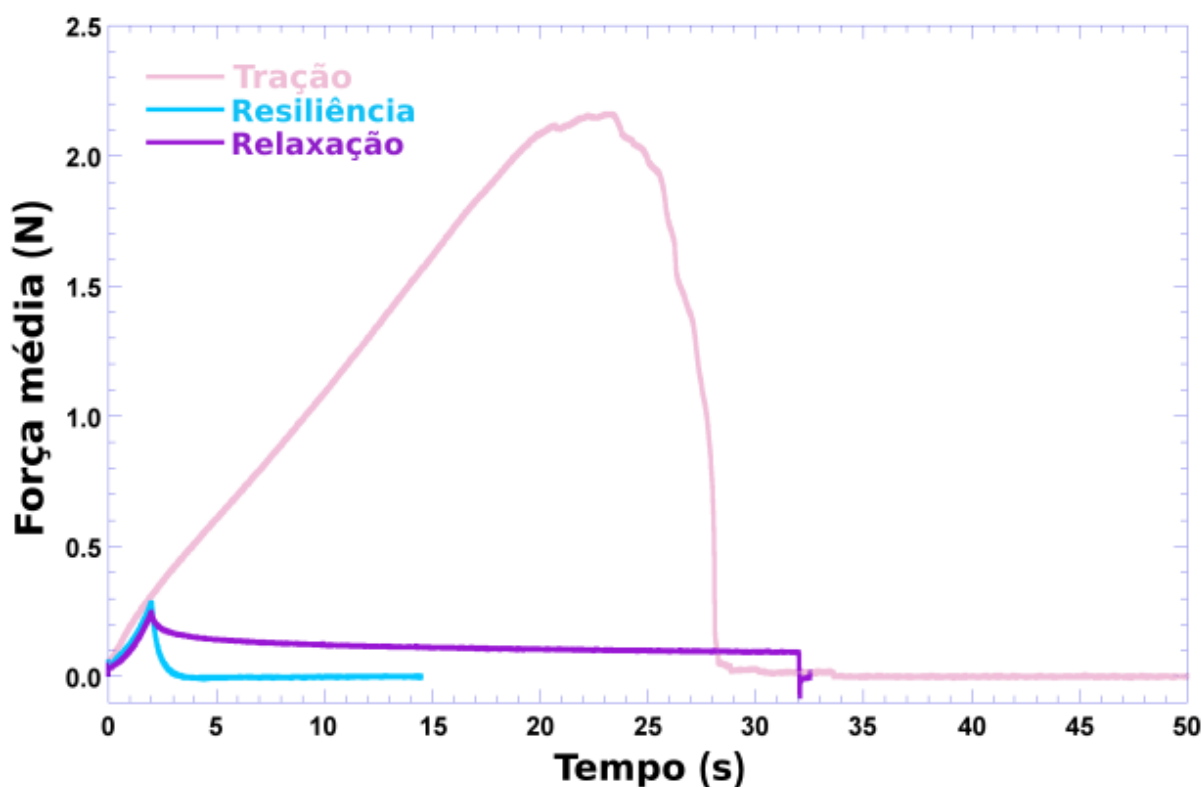
Os espectros de infravermelho exibidos na Figura 32 sugerem claramente que o aspecto químico da entidade proteica foi preservado durante a produção do filme, permitindo concluir que a proteína insulina não se envolveu em nenhuma interação

química com os componentes do filme, sendo apenas carregado pelo filme, o que de outra forma poderia ter reduzido a sua bioatividade.

## 5.20. Características de Resistência Mecânica do Filme Otimizado Estatisticamente com Líquido Iônico e Insulina

Os resultados produzidos durante a avaliação da resistência mecânica do filme biopolimérico integrando insulina e líquido iônico, com relação à resistência à tração, relaxação e resiliência, podem ser encontrados na Figura 33.

**Figura 33.** Resultados obtidos a partir dos testes de resistência mecânica realizados ao filme biopolimérico produzido com geranato de colina 1:2 e insulina NOVOLIN® N, tendo como base os níveis (+1) de nanocelulose bacteriana e (+1) de goma xantana.



Fonte: Elaboração própria

“A partir da inspeção dos resultados mostrados na Figura 33, os níveis de biopolímero selecionados produziram maior resistência à tração e relaxação do filme resultante. Observou-se que os níveis de biopolímero selecionados melhoraram as características viscoelásticas de deformação e relaxação molecular (ou seja, retorno do biofilme de condições tensas de volta ao equilíbrio),” (GONG; HONG, 2012). O

Filme biopolimérico deve permitir a liberação de insulina e a sua permeação transdérmica assim como a fácil remoção do filme gasto da pele. Assim, resistência à tração, relaxação e resiliência foram os parâmetros de resistência mecânicas avaliadas, para a produção do biofilme otimizado. O filme também se destina a ajudar a manter um microclima adequado na superfície da pele, de extrema importância para as reações biossintéticas necessárias às atividades celulares (BOATENG et al., 2008). O filme desenvolvido possui PVC na sua composição, que é um polímero hidrofóbico com baixa energia livre de superfície (ASADINEZHAD et al., 2012) que não favorece a atração das moléculas de água presentes na dispersão contendo os biopolímeros. Como consequência, isso promove uma aderência não forte do filme à pele.

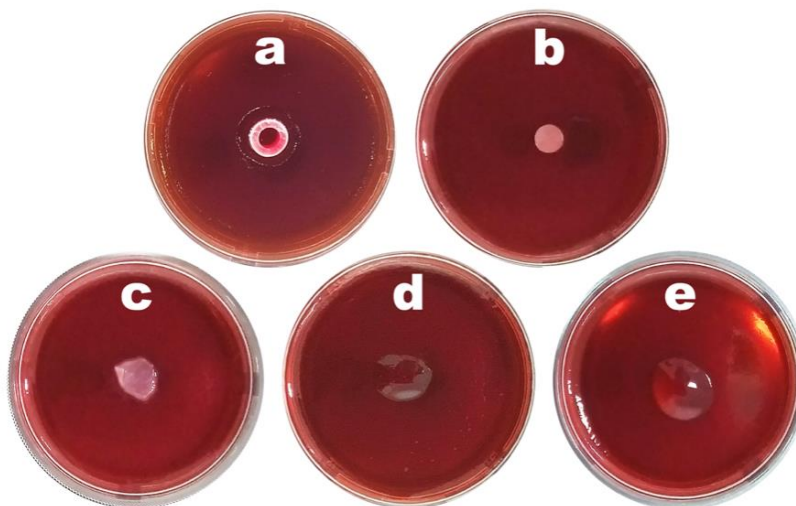
### **5.21. Potencial de Citotoxicidade do Filme Otimizado Estatisticamente com Líquido Iônico e Insulina**

O potencial de citotoxicidade da nanocelulose bacteriana, do biofilme simples (sem insulina humana e sem geranato de colina 1:2) e do filme integrando tanto geranato de colina 1:2 como insulina humana, juntamente com um controle positivo e um controle negativo, foi avaliado através da metodologia de disco-difusão em ágar, usando a linhagem celular HaCaT (Figura 34).

Os resultados obtidos mostraram que não houve morte celular causada pelo contato com a biomembrana de nanocelulose bacteriana (Figura 34c) ou com o filme biopolimérico produzido sem insulina e sem líquido iônico (Figura 34d) ou com o filme que integra tanto o líquido iônico quanto a insulina humana (ver Figura 34e), como é evidente pela ausência de quaisquer halos mais claros em torno das amostras de material. As leituras das placas inoculadas foram feitas macroscopicamente, onde a ausência de citotoxicidade foi observada pela falta de formação de um halo claro em torno da amostra (que de outra forma corresponderia às células mortas), e microscopicamente, para quaisquer alterações morfológicas das células circundantes à amostra. Assim, o filme produzido e integrando tanto o líquido iônico quanto insulina humana não foi citotóxico e, portanto, pode ser considerado seguro para aplicação sobre a pele.

**Figura 34.** Resultados da análise de citotoxicidade realizada à membrana de nanocelulose bacteriana simples, filme biopolimérico simples sem insulina NOVOLIN® N e sem geranato de colina 1:2, e filme

biopolimérico integrando insulina NOVOLIN® N e geranato de colina 1:2, através da metodologia de disco-difusão em ágar usando a linhagem celular HaCaT: **(a)** controle positivo, **(b)** controle negativo, **(c)** nanocelulose bacteriana, **(d)** filme simples, **(e)** filme integrando insulina NOVOLIN® N e geranato de colina 1:2.



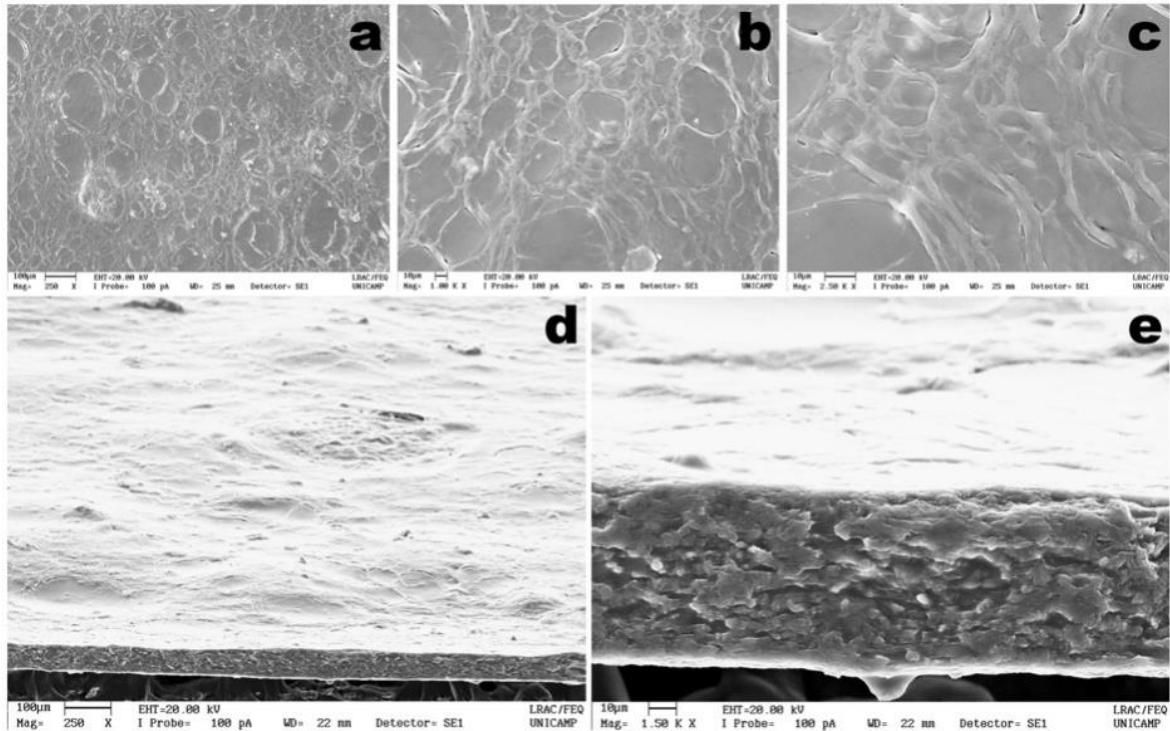
Fonte: Elaboração própria

## 5.22. Análises Morfológicas de Superfície e de Zona de Fratura Transversal do Filme Otimizado Estatisticamente com Líquido Iônico e Insulina, por MEV

As imagens de microscopia eletrônica de varredura com energia dispersiva (EDMEV) tanto da superfície como da zona de fratura transversal do filme biopolimérico carregado com insulina humana e geranato de colina 1:2 permite observar uma superfície suave com ausência generalizada de rachaduras (Figura 35).

A partir dos resultados obtidos nas análises de microscopia eletrônica de varredura realizada no filme otimizado, pode ser observada uma morfologia uniforme a três grandes ampliações (x250 (Figura 35a), x1000 (Figura 35b), x2500 (Figura 35c)). A seção transversal fraturada do filme exibe uma matriz altamente homogênea da estrutura biopolimérica (Figura 35e), o que provavelmente facilita a liberação de insulina no contato do filme com a pele (úmida). Pode observar-se que a topografia na bioestrutura do filme exibida na Figura 35(d), (e) é altamente uniforme.

**Figura 35.** Fotomicrografias de EDMEV do filme biopolimérico carregado com insulina humana NOVOLIN® N e geranato de colina 1:2, a várias ampliações (superfície do filme, **a**: x250, **b**: x1000, **c**: x2500; fratura da seção reta do filme, **d**: x250, **e**: x1500), obtidas usando a técnica de difração retroespalhada de elétrons (EBSD).

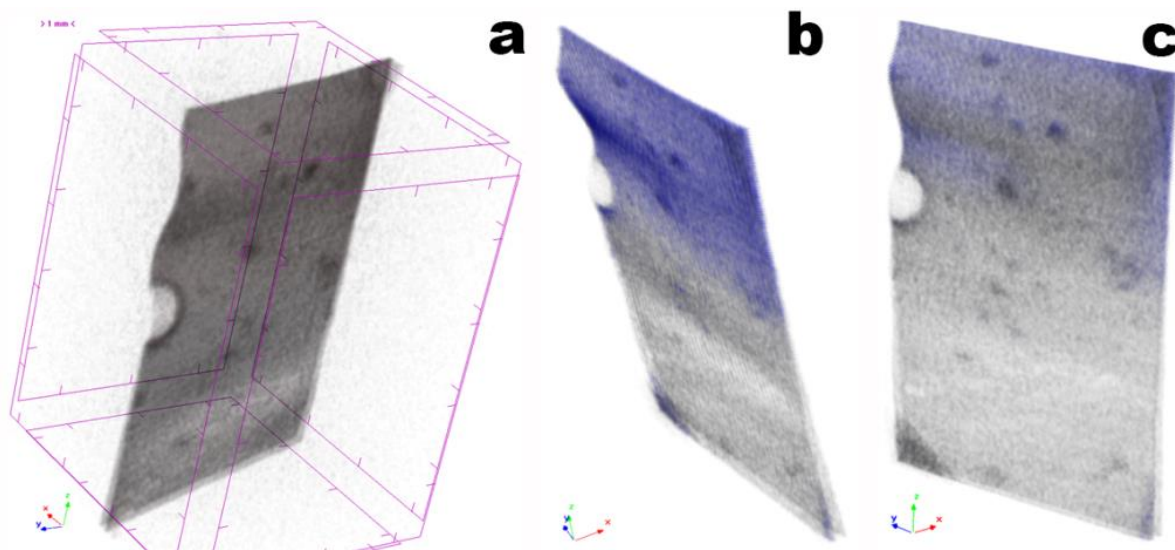


Fonte: Elaboração própria

### 5.23. Análises Morfológicas do Filme Otimizado Estatisticamente com Líquido Iônico e Insulina, por XRT

O filme otimizado desenvolvido pode ser considerado um compósito polimérico natural exibindo uma microestrutura porosa muito especial que permite que o filme possua excelentes propriedades mecânicas (como concluído a partir da inspeção e análise dos resultados mostrados na Figura 36). A partir das análises tomográficas via transmissão de raios-X realizadas a uma seção retangular do filme carregado com insulina e geranato de colina 1:2 (Figura 36), pode ser observada uma superfície homogênea.

**Figura 36.** Imagens obtidas por análise tomográfica via transmissão de raios-X do filme biopolimérico carregado com insulina NOVOLIN® N e geranato de colina 1:2, sendo **(a,b)** imagens de perfil inclinado do filme, **(c)** imagem perpendicular à superfície do biofilme. As fatias de imagem tridimensionais foram coletadas usando uma tensão de operação regulada para 34 kV e corrente elétrica com 529  $\mu$ A.



**Fonte:** Elaboração própria

Devido à absorção de mais radiação, por causa da sua maior densidade atômica, a rede da matriz biopolimérica (em cinza e azul na Figura 36) está em maior evidência, enquanto os espaços vazios aparecem marcados a preto em toda a imagem tridimensional reconstituída do filme (Figura 36). Estes resultados estão em estreita concordância com aqueles obtidos por espectrofotometria de infravermelho com transformada de Fourier (Figura 36b), que indicaram que a insulina provavelmente não se envolveu em nenhuma ligação química com a matriz biopolimérica. Este é claramente um dado importante e positivo, uma vez que, por não se envolver em nenhuma ligação química com a matriz biopolimérica, a insulina se torna prontamente disponível e mantém sua bioatividade. Uma análise comparativa da porosidade do filme que integra insulina e geranato de colina 1:2 pode ser encontrada na Tabela 6, resultante de análises morfológicas 2D e 3D.

**Tabela 6.** Resultados obtidos por análises tomográficas via transmissão de raios-X realizadas ao filme integrando líquido iônico (CG1:2) e insulina humana.

**Parâmetro**

**Filme biopolimérico integrando geranato de colina 1:2 e 1.500 mL de insulina humana (NOVOLIN® N)**

	<b>Análise morfológica bi-dimensional (2D)</b>	<b>Análise morfológica tri-dimensional (3D)</b>
Número de camadas	-----	101,000
Tamanho de pixel ( $\mu\text{m}$ )	9,80	9,7610
VOI total (volume de interesse), TV ( $\text{mm}^3$ )	0,07991	0,07860
Volume do objeto, Obj.V ( $\text{mm}^3$ )	0,05263	0,05043
Volume percentual do objeto, Obj.V/TV (%)	65,8696	64,1641
Superfície VOI total, TS ( $\text{mm}^2$ )	4,6433	4,19547
Superfície do objeto, Obj.S ( $\text{mm}^2$ )	6,0601	5,36646
Superfície de interseção, i.S ( $\text{mm}^2$ )	1,6320	1,45215
Superfície de objeto / volume, Obj.S/Obj.V ( $\text{mm}^{-1}$ )	115,1370	106,4041
Espessura de seção reta, Cs.Th (mm)	0,02341	-----
Densidade de superfície do objeto, Obj.S/TV ( $\text{mm}^{-1}$ )	-----	68,2733
Grau de anisotropia, DA	-----	6,56898 (0,84777)
<i>Eigenvalue 1</i>	-----	0,10124
<i>Eigenvalue 2</i>	-----	0,15189
<i>Eigenvalue 3</i>	-----	0,66505
Número de poros fechados, Po.N(cl)	-----	63,0000
Volume de poros fechados, Po.V(cl) ( $\text{mm}^3$ )	-----	0,00006
Superfície de poros fechados, Po.S(cl) ( $\text{mm}^2$ )	-----	0,03219
Porosidade fechada (%), Po(cl) (%)	0,25474	0,11783
Índice médio de fragmentação, Fr.I ( $\text{mm}^{-1}$ )	-9,24357	-12,5258
Dimensão fractal média, FD	1,26605	2,18725
Volume de espaços porosos abertos, Po.V(op) ( $\text{mm}^3$ )	-----	0,02811
Porosidade aberta (%), Po(op) (%)	-----	35,76013
Volume total de espaço de poros, Po.V(tot) ( $\text{mm}^3$ )	-----	0,02817
Porosidade total (%), Po(tot) (%)	-----	35,83582
Número de Euler, Eu.N	-----	-426,0000
Conectividade, Conn	-----	546,0000
Densidade de conectividade, Conn.Dn ( $\text{mm}^{-3}$ )	-----	6946,337

**Fonte:** Elaboração própria

A anisotropia é a propriedade de ser direcionalmente dependente, ao contrário da isotropia, que implica propriedades idênticas em todas as direções. A anisotropia

pode ser definida como uma diferença, quando medida ao longo de diferentes eixos, nas propriedades mecânicas ou físicas de um material.

O grau de anisotropia, calculado como  $\text{Grau de anisotropia} = 1 - \frac{\{\text{Eigenvalue}_{\min}\}}{\{\text{Eigenvalue}_{\max}\}}$ , é 0 para isotropia total e 1 para anisotropia total. Assim, como pode ser visto a partir da inspeção dos dados na Tabela 6, o grau de anisotropia é de 0,84777 para o filme carregado com insulina humana e geranato de colina 1:2, um valor mais próximo da anisotropia do que da isotropia na escala supracitada.

Sendo o filme carregado com insulina um biomaterial de engenharia com uma estrutura tecida em rede, este resultado é facilmente compreensível à luz das imagens EDMEV exibidas na Figura 36.

Ao analisar a estrutura do filme carregado com insulina e geranato de colina 1:2, pode ver-se que este tem uma porosidade aberta de 35,76% e um valor quase igual de porosidade total (Tabela 6). Além disso, o índice médio de fragmentação (Tabela 6) fornece um índice de conectividade e calcula um índice de convexidade ou concavidade relativa da superfície total do objeto em análise, segundo o princípio de que concavidade indica conectividade (e a presença de “nodos”) e convexidade indica estruturas isoladas desconectadas (“*struts*”).

Baixos índices de fragmentação significam melhores redes conectadas, enquanto índices de fragmentação mais altos significam uma estrutura mais desconectada.

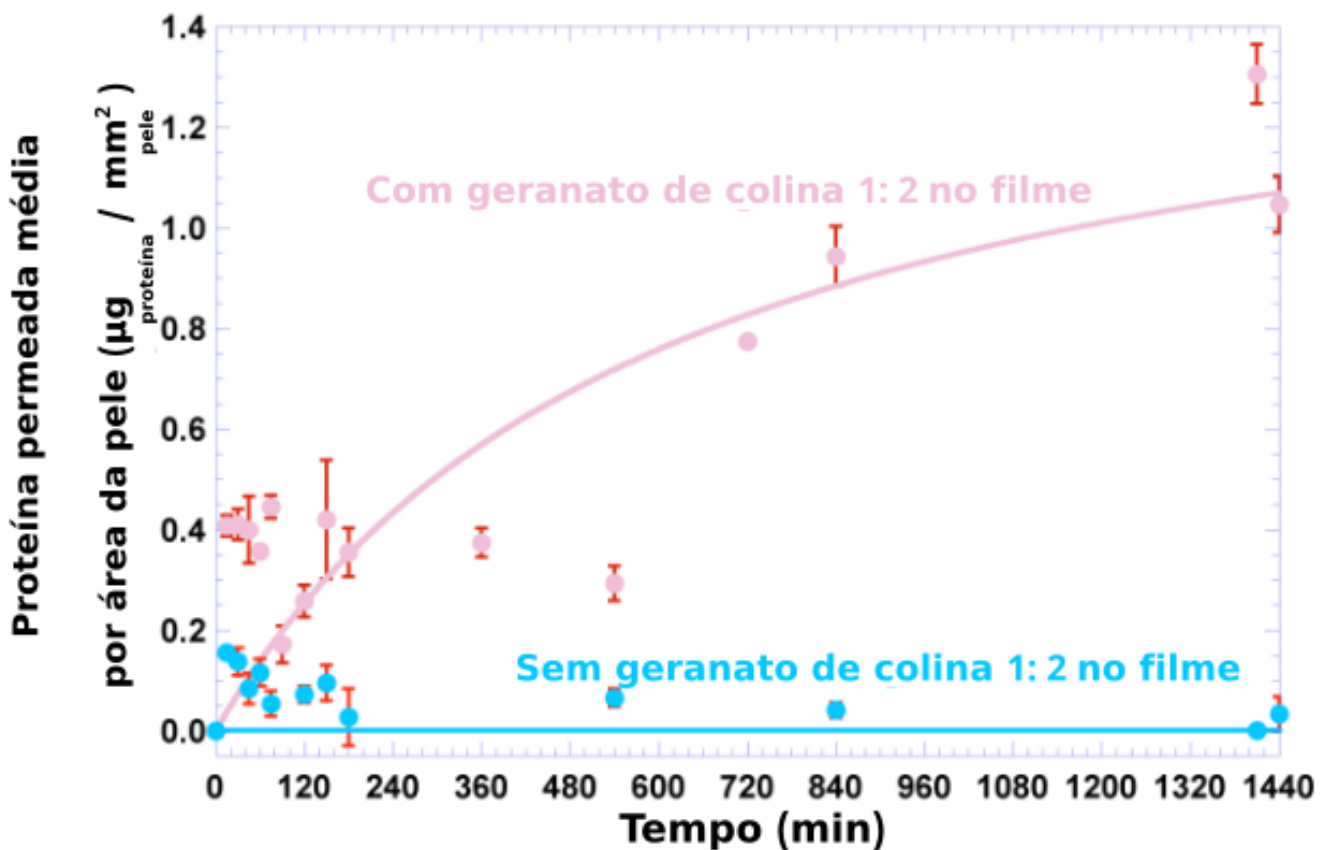
Cavidades fechadas abundantes e superfícies côncavas podem empurrar o índice de fragmentação para valores (muito) negativos, o que foi de fato determinado nas análises realizadas (Tabela 6).

Estes resultados são bastante importantes, uma vez que, devido ao fato de a insulina ter sido dispersa homogêaneamente por toda a estrutura biopolimérica do filme durante o processo de polimerização, o filme pode ser aplicado com qualquer uma das suas superfícies voltadas para a pele.

#### **5.24. Permeação Transdérmica de Insulina Assistida pelo Líquido Iônico Geranato de Colina 1:2 Integrado no Filme Otimizado Estatisticamente**

Os resultados obtidos nos testes de permeação transdérmica de insulina facilitada pelo geranato de colina 1:2 a partir do filme biopolimérico, podem ser encontrados na Figura 37.

**Figura 37.** Resultados obtidos através dos testes de permeação transdérmica, como concentração média de proteína (insulina NOVOLIN® N) permeada por unidade de área de pele, a partir do filme biopolimérico integrando insulina e geranato de colina 1:2, durante um período de ensaio de 24 h. Os valores são as médias de três experimentos ( $n = 3$ ), com desvios padrão associados. As linhas sólidas representam ajustes não lineares de uma função hiperbólica realizados aos dados experimentais.



Fonte: Elaboração própria

Como pode ser observado por inspeção da Figura 37, a presença de líquido iônico no filme biopolimérico integrando insulina levou a um aumento considerável na quantidade de proteína permeada por unidade de área de pele (curva rosa na Figura 37), ao contrário do que sucedeu quando o mesmo filme integrou insulina, mas não líquido iônico (curva azul na Figura 37). Isto corrobora com a afirmação de Rafeiro et al., (2013), que alega que o aumento da permeabilidade da pele para diversos

fármacos pode ser conseguido mediante a coadmninistração de promotores químicos, neste estudo em particular os líquidos iônicos.

Realizando um ajuste não linear (hiperbólico) aos resultados obtidos da permeação transdérmica de proteína a partir do filme integrando insulina e geranato de colina 1:2 (Tabela 5 e Figura 37, curva rosa claro), obteve-se a concentração máxima média de proteína permeada por unidade de área de pele (parâmetro  $m_1$ , Tabela 5) e o tempo necessário para atingir metade da concentração máxima média de proteína permeada por unidade de área de pele (parâmetro  $m_2$ , Tabela 5), com excelente coeficiente de correlação. Com relação aos resultados da permeação transdérmica de insulina utilizando o filme simples sem geranato de colina 1:2, a tendência ligeiramente sigmoidal foi melhor descrita através do ajuste não-linear da função de Gompertz (Figura 37 e Tabela 7), permitindo obter o valor da assíntota ( $m_3$ , isto é, a concentração máxima atingível de proteína permeada por unidade de área de pele, Tabela 7), o deslocamento da tendência de dados ao longo do período de tempo estudado ( $m_4$ , Tabela 7) e a taxa de crescimento de dados ( $m_5$ , Tabela 7), com excelente coeficiente de correlação, permitindo concluir que a ausência de geranato de colina 1:2 no filme biopolimérico (Figura 36 e Tabela 7) não levou a qualquer permeação visível de insulina a partir do filme.

**Tabela 7.** Resultados obtidos a partir de ajustes não lineares realizados à concentração média de proteína permeada por unidade de área de pele ( $\mu\text{g}_{\text{proteína}}/\text{mm}^2_{\text{pele}}$ ) em função do tempo de permeação, para os filmes integrando insulina e líquido iônico (geranato de colina 1:2) e apenas insulina.

Amostra	Função hiperbólica: $y = (m_1 \cdot x)/(m_2 + x)$		Função de Gompertz: $y = m_3 \cdot \exp(-m_4 \cdot \exp(-m_5 \cdot x))$			r
	m1	m2	m3	m4	m5	
Filme com geranato de colina 1:2 e insulina humana	1,5138	596,48	-----	-----	-----	0,75531
Filme simples com insulina humana	-----	-----	0,001654	-0,8695	1,6417	1,00000

**Fonte:** Elaboração própria

Como pode ser observado por inspeção da Figura 37 e dos dados na Tabela 7, o filme integrando insulina e geranato de colina 1:2 (o líquido iônico que teve a melhor desempenho em termos de ausência de citotoxicidade (Figuras 27 e 34a), genotoxicidade (ver Figura 28a,b) e potenciação da permeação de proteína (Figura 37, curva rosa claro) permitiu uma concentração média de proteína permeada por unidade de área de pele de  $1,05 \mu\text{g}_{\text{proteína}}/\text{mm}^2_{\text{pele}}$ .

## 6. CONCLUSÃO

No trabalho de pesquisa desenvolvido e aqui descrito, procedeu-se à produção e caracterização de nanocelulose bacteriana como biopolímero integrante do filme biopolimérico otimizado estatisticamente e integrando insulina humana (com concomitante estabilização da sua estrutura e função) e geranato de colina 1:2, almejando a entrega (ou liberação) de insulina por permeação transdérmica.

Pode-se concluir que a nanocelulose bacteriana produzida neste trabalho não tem potencial para induzir aberrações cromossômicas nem qualquer citotoxicidade, demonstrando ser segura para inclusão na formulação de filmes biopoliméricos visando aplicações dérmicas. Estudos de permeação transdérmica de insulina adsorvida em biomembranas de nanocelulose bacteriana provaram não ser possível a permeação transdérmica da proteína adsorvida, sendo desejável a presença de um facilitador de permeação (como por exemplo um líquido iônico).

A síntese e caracterização (tanto físico-química como biológica) de líquidos iônicos e seus solventes eutéticos profundos foi um dos objetivos do trabalho de pesquisa desenvolvido, visando a sua potencial utilização como facilitadores de permeação transdérmica de insulina. O solvente eutético profundo geranato de colina 1:2 foi escolhido para ser incorporado no filme biopolimérico, em função de suas características não citotóxicas e não genotóxicas, associadas a uma superior promoção da permeação transdérmica de insulina.

O filme biopolimérico desenvolvido tendo por base dois biopolímeros de origem microbiana: nanocelulose e goma xantana, apresentaram excelentes características mecânicas em termos de resistência à tração, resiliência e relaxação, assim como promoveu a liberação de insulina e sua permeação transdérmica facilitada pelo geranato de colina 1:2.

Assim, o filme integrando geranato de colina 1:2 e insulina NOVOLIN® N foi considerado adequado para aplicações biofarmacêuticas, nomeadamente na administração de insulina através de permeação transdérmica, uma conclusão totalmente apoiada pelos resultados obtidos a partir da extensa caracterização físico-química e biológica realizada neste trabalho de pesquisa.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO

Ainda que o trabalho de pesquisa desenvolvido tenha seguido uma evolução natural (e sequencial), permitindo retirar algumas importantes conclusões, uma visão mais profunda deve ser adquirida em relação à caracterização e seleção do produto final desenvolvido, isto é, o filme biopolimérico. Este capítulo apresenta uma série de áreas potencialmente promissoras para pesquisa num futuro próximo, dando continuidade ao trabalho desenvolvido e abrangendo estudos que vão mais além e que partem daqueles apresentados até agora nesta dissertação.

A avaliação das alterações histológicas que ocorrem no estrato córneo da pele, promovidas pela presença de geranato de colina 1:2, acrescentaria mais valor ao trabalho de pesquisa aqui apresentado, revelando-se fundamental para uma melhor compreensão do fenômeno envolvido na permeação de proteína auxiliada pelo líquido iônico.

Também, a permeação transdérmica com diferentes tipos e concentrações de insulina, visando analisar a estabilidade das mesmas no filme e avaliar qual o tipo de insulina que teria melhor permeação transdérmica ao longo do tempo, acrescentaria mais valia ao trabalho já desenvolvido.

Adicionalmente, a avaliação da permeação transdérmica *in vivo* usando modelos animais para aferir a eficácia do produto desenvolvido, seria um passo importante para complementar o trabalho desenvolvido.

Adicionalmente, e porque o filme biopolimérico desenvolvido integra insulina, outras entidades proteicas hidrofílicas tais como partículas bacteriofágicas e enzimas terapêuticas poderiam igualmente ser integradas na matriz biopolimérica, avaliando-se assim o potencial de aprisionamento e estabilização estrutural e funcional de tais entidades proteicas, visando a sua potencial permeação transdérmica em aplicações biofarmacêuticas.

Finalmente, a avaliação da estabilidade do filme biopolimérico contendo geranato de colina 1:2 e insulina para armazenamento à temperatura ambiente agregaria valor ao trabalho desenvolvido até ao momento.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, Q.; BINDER, L. Synthesis and characterization of choline chloride based binary mixtures. **ECS transactions**, v. 33, n. 7, p. 49-59, 2010.

ABDELRASOUL, A.; DOAN, H.; LOHI, A.. Fabrication of Biomimetic and Bioinspired Membranes. In: Biomimetic and Bioinspired Membranes for New Frontiers in Sustainable Water Treatment Technology, **InTech Open**. 2017.

ANDREWS, G. P.; LAVERTY, T. P.; JONES, D. S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 3, p. 505-518, 2009.

ASADINEZHAD, A. et al. Recent progress in surface modification of polyvinyl chloride. **Materials**, v. 5, n. 12, p. 2937-2959, 2012.

ASSIS, O. B. G.; DE BRITTO, D.. Revisão: coberturas comestíveis protetoras em frutas: fundamentos e aplicações/Review: edible protective coatings for fruits: fundamentals and applications. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, n. 2, p. 87, 2014.

AZULAY, R. D.; AZULAY, D. R.; AZULAY-ABULAFIA, L. Dermatologia. 5. ed., rev. atual. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, p. 1014, 2008.

BALCÃO, V. M.; VILA, M. M. D. C. Structural and functional stabilization of protein entities: state-of-the-art. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 93, p. 25-41, 2015.

BALCÃO, V. M.; VIEIRA, M. C.; MALCATA, F. X. Adsorption of protein from several commercial lipase preparations onto a hollow-fiber membrane module. **Biotechnology Progress**, v. 12, n. 2, p. 164-172, 1996.

BAKER, M. I. et al. A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 100, n. 5, p. 1451-1457, 2012.

BARUD, H. S. et al. Bacterial cellulose-silica organic-inorganic hybrids. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 46, n. 3, p. 363-367, 2008.

BATISTA-GALLEP, T. B. et al. Effects of Commercial Nanoparticles of Iron Oxide (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>): Cytotoxicity, Genotoxicity and Oxidative Stress. **Química Nova**, v. 41, n. 9, p. 974-981, 2018.

BERNARDO, A.; CALMANOVICI, C. E.; MIRANDA, E. A. Observance of Polymorphic Behaviour During Dissolution of Insulin and Lysozyme. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.22, n. 03, p. 331-339,2005.

BOATENG, J. S. et al. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 8, p. 2892-2923, 2008.

BONDIA, J. et al. El páncreas artificial: control automático de infusión de insulina en *Diabetes mellitus* tipo 1. **Revista Iberoamericana de Automática e Informática Industrial RIAI**, v. 7, n. 2, p. 5-20, 2010.

BORGES, C. D.; VENDRUSCOLO, C.T. Goma Xantana: características e condições operacionais de produção. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 29, n. 2, p. 171-188, 2008.

BOUMAZA, A. et al. Assessment of Cytotoxic and Genotoxic Effects of Clodinafop-propargyl Commercial Formulation on *Allium cepa* L. **Journal of Materials and Environmental Science**, v. 7, n.4, p.1245-1251, 2016.

BOURTOOM, T. Plasticizer effect on the properties of biodegradable blend film from rice starch chitosan, **Songklanakarin Journal Science Technology**, v. 30, n.1, p.149-165, 2008.

CALDEIRA, M. S. **Produção de nanocompósito utilizando diferentes fontes de celulose como reforço**, Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP, 2013.

CASTAÑEDA UGARTEBURU, M. et al. **Assessment of the water content in several ionic liquids using the coulometric Karl Fischer technique**, Trabajo Fin de Grado en Ingeniería Química, Universidad de Cantabria, Espanha, 2015.

CASTRO, C. M. M. B. et al. Sugar cane biopolymer cytotoxicity. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco**, v. 49, n. 2, p. 119-123, 2004.

CHORILLI, M. et al. Aspectos gerais em sistemas transdérmicos de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, n. 1, p. 7-13, 2007.

COUTEIRO, Maria de Fátima Martins. **Estudo da atividade antitumoral de líquidos iônicos com base em antibióticos beta-lactâmicos e em fluoroquinolonas**, Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Saúde do Porto, 2017.

CUCHIARA, C. C.; BORGES, C.S. de; BOBROWSKI, V. L. Sistema teste de Allium cepa como bioindicador da citogenotoxicidade de cursos d'água. **Tecnologia & Ciências Agropecuária**, João Pessoa, v. 6, n. 1, p. 33-38, 2012.

CZAJA, W. et al. Microbial cellulose - the natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v. 27, n. 2, p. 145-151, 2006.

DANDURAND, J. et al. Conformational and thermal characterization of a synthetic peptidic fragment inspired from human tropoelastin: Signature of the amyloid fibers. **Pathologie Biologie**, v. 62, n. 2, p. 100-107, 2014.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**, Porto Alegre: EdiPUCRS, p. 58, 2007.

DE LUCENA, M. T. et al. Biocompatibility and cutaneous reactivity of cellulosic polysaccharide film in induced skin wounds in rats. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 26, n. 2, p.1-6, 2015.

DE SOUZA, C. R.; ZANETTI, M. L. Administração de insulina: uma abordagem fundamental na educação em diabetes. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 34, n. 3, p. 264-270, 2000.

DERMIRCI, U.; KHADEMHOSEINI, A. Gels Handbook: fundamentals, properties and application. New Jersey: **World Scientific**, v. 3, 2016.

DISHA, J.S. et al. Preparation and characterization of xanthan gum-based biodegradable polysaccharide hydrogels. **Research Journal of Material Sciences**, v. 4, n.4, p. 13-18, 2016.

DOMINI, I. A. N. et al. Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Eclética Química**, v.35, n.4, p.165-178, 2010.

EMAMI, J. et al. A Novel Approach to Prepare Insulin-Loaded Poly (Lactic-Co-Glycolic Acid) Microcapsules and the Protein Stability Study. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 5, p. 1712–1731, 2009.

FELDKAMP, L. A.; DAVIS, L. C.; KRESS, J. W. Practical cone-beam algorithm. **Journal of the Optical Society of America**, v. 1, n. 6, p. 612-619, 1984.

FISCHER, M. R. et al. Biosynthesis and characterization of bacterial nanocellulose for tissue engineering. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 22, 2017.

FLOR, L. S.; CAMPOS, M. R. Prevalência de diabetes mellitus e fatores associados na população adulta brasileira: evidências de um inquérito de base populacional. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.20, n.1, p. 16-29, 2017.

FRAGOSO, A. S. et al. Dielectric study of the adhesion of mesenchymal stem cells from human umbilical cord on a sugarcane biopolymer. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 25, n. 1, p. 229-237, 2014.

GANJI, F.; VASHEGHANI-FARAHANI, S.; VASHEGHANI-FARAHANI, E. Theoretical description of hydrogel swelling: a review. **Iranian Polymer Journal**, v. 19, n. 5, p. 375-398, 2010.

GARCIA-OCHOA, F. et al. Xanthan gum: production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 7, p. 549-579, 2000.

GHANDI, K. A review of ionic liquids, their limits and applications. **Green and Sustainable Chemistry**, v. 4, n. 01, p. 44, 2014.

GOINDI, S. et al. Development of novel ionic liquid-based microemulsion formulation for dermal delivery of 5-fluorouracil. **AAPS PharmSciTech**, v. 15, n. 4, p. 810-821, 2014.

GONG, J. P.; HONG, W., Mechanics and physics of hydrogels. **Soft Matter** **8**, p.8006-8007, 2012.

GUPTA, D.; AGRAWAL, A.; RANGI, A. L. Extraction and characterization of silk sericin. **Indian Journal of Fibre & Textile Research (IJFTR)**, v. 39, n. 4, p. 364-372, 2014.

GUPTA, P.; VERMANI, K.; GARG, S. Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. **Drug Discovery Today**, v. 7, n. 10, p. 569-579, 2002.

HABER, E.P. Secreção da Insulina: Efeito autócrino da Insulina e modulação por ácidos graxos. **Arquivos Brasileiros Endocrinologia e Metabologia**, v.45, n.3, p.219-227, 2002.

HADEBE, S. I. et al. Transdermal delivery of insulin by amidated pectin hydrogel matrix patch in streptozotocin-induced diabetic rats: effects on some selected metabolic parameters. **PLOS ONE**, v. 9, n. 7, p. e101461, 2014.

HARRIS, M. I. N. C. **Pele-estrutura, propriedades e envelhecimento**, Senac, 2009.

HESTRIN, S.; SCHRAMM, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. **Biochemical Journal**, v. 58, n. 2, p. 345, 1954.

HWANG, Ma-Ro et al. Gentamicin-loaded wound dressing with polyvinyl alcohol/dextran hydrogel: gel characterization and in vivo healing evaluation. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 3, p. 1092-1103, 2010.

IGUCHI, M.; YAMANAKA, S.; BUDHIONO, A. Bacterial cellulose - a masterpiece of nature's arts. **Journal of Materials Science**, v. 35, n. 2, p. 261-270, 2000.

IYER, P. V.; ANANTHANARAYAN, L. Enzyme stability and stabilization—aqueous and non-aqueous environment. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 10, p. 1019-1032, 2008.

JOZALA, Angela Faustino et al. Produção de Celulose Bacteriana: Uma Nova Tendência. **Microbiologia in foco**, v. 14, p. 14-17, 2011.

JOZALA, A. F. et al. Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* by employing alternative culture media. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 3, p. 1181-1190, 2015.

KHAFAGY E. S. et al. Current challenges in non-invasive insulin delivery systems: a comparative review. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n.15, p.1521-1546, 2007.

KLEMM, D. et al. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, n. 22, p. 3358-3393, 2005.

LASSMANN-VAGUE, V.; RACCAH, D. Alternatives routes of insulin delivery. **Diabetes & metabolism**, v. 32, n. 5, p. 513-522, 2006.

LI, Y. et al. Transdermal delivery of insulin using trypsin as a biochemical enhancer. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 8, p. 1574-1579, 2008.

LIU, Y. et al. Physically crosslinked composite hydrogels of PVA with natural macromolecules: structure, mechanical properties, and endothelial cell compatibility. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 90, n. 2, p. 492-502, 2009.

LIU, Z.; YAO, P. Injectable thermo-responsive hydrogel composed of xanthan gum and methylcellulose double networks with shear-thinning property. **Carbohydrate Polymers**, v. 132, p. 490–498, 2015.

LOPES, B. M. et al. Xanthan gum: properties, production conditions, quality and economic perspective. **Journal of Food and Nutrition Research**, v.54, n. 3. p. 185–194, 2015.

LOPEZ-GALLEGO, F. et al. Stabilization of different alcohol oxidases via immobilization and post immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 2, p. 278-284, 2007.

LUVIELMO M. M. et al. Structure of xanthan gum and cell ultrastructure at different times of alkali stress. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.4 n. 7, p. 102–109, 2016.

MARASCHIN, J. F. et al. Diabetes mellitus classification. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 95, n. 2, p. 40-46, 2010.

MARTINS, A. G. S. et al. A wet dressing for hypospadias surgery. **International Brazilian Journal of Urology**, v. 39, n. 3, p. 408-413, 2013.

MARTINS, M. R. F. M.; VEIGA, Francisco. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, p. 33-54, 2002.

MATEO, C. et al. Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and further cross-linking with aldehyde-dextran. **Immobilization of Enzymes and Cells**, p. 129-141, 2006.

MATON, C.; DE VOS, N.; STEVENS, C. V. Ionic liquid thermal stabilities: decomposition mechanisms and analysis tools. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 13, p. 5963-5977, 2013.

MEHTA, P. et al. Design, development and evaluation of lipid based topical formulations of silver sulfadiazine for treatment of burns and wounds. **Innovare Journal of Life Science**, v. 1, p. 38-44, 2013.

MORAN, L. A. et al. **Bioquímica**, São Paulo: Pearson Education do Brasil, 2013.

MORGAN, D. M. Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity. **Methods in molecular biology (Clifton, NJ)**, v. 79, p. 179-183, 1998.

MOZHAEV, V. V.; MARTINEK, K. Structure-stability relationships in proteins: a guide to approaches to stabilizing enzymes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 4, n. 3, p. 387-419, 1990.

MURPHY, D. J. et al. Physical characterisation and component release of poly (vinyl alcohol)–tetrahydroxyborate hydrogels and their applicability as potential topical drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, n. 2, p. 326-334, 2012.

OHNO, H.; WILEY, J. Ionic liquids for diffusion studies and ionic transport behavior, Chapter 5.5, In: *Electrochemical aspects of ionic liquids*, **Hoboken NJ**, U.S.A, 2011.

OLIVEIRA JUNIOR, J. M.; MARTINS, A. C. G. Construction and test of low cost X-ray tomography scanner for physical, chemical analysis and nondestructive inspections, **AIP Conference Proceedings**, 1139, p.102-105, 2009.

ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. *Biomateriais: fundamentos e aplicações*, Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006.

PANCHAL, A.; SHAH, V.; UPADHYAY, U.M. Sistemas de entrega de medicamentos com insulina: Uma revisão internacional. **Journal Research in Pharmacy e Science**, v. 2, n. 4, p. 484-492, 2011.

PEIXOTO, A. C. B. **Funcionalização de nanopartículas poliméricas para liberação de medicamentos sítio-dirigida**, Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.

PEREIRA, R.; MENDES, A.; BARTOLO, P. Alginate/Aloe vera hydrogel films for biomedical applications, **Procedia CIRP**. v 5, p. 210 – 215, 2013.

PETERSEN, N.; GATENHOLM, P. Bacterial cellulose-based materials and medical devices: current state and perspectives, **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 91, v.5, p.1277-1286, 2011.

PINTO, R. R. Equilíbrio líquido-líquido em sistemas ternários com líquidos iônicos baseados no íon amônio, incluindo a síntese e purificação dos mesmos. Tese de Doutorado, **Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas**, Campinas, 2016.

PUSNIK, Mascha et al. The agar diffusion scratch assay-A novel method to assess the bioactive and cytotoxic potential of new materials and compounds. **Scientific reports**, v. 6, p. 20854, 2016.

QUINTÃO, W. S. C. et al. Influence of monoolein on progesterone transdermal delivery. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 4, p. 923-929, 2015.

RAFEIRO, D. F. B. **Novas estratégias de promoção da permeação transdérmica**, Dissertação de Mestrado, 2013.

RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K.M.; KUMBHAR, J. V., Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n.6, p. 2491-2511, 2015.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**, 6ª edição. Rio de Janeiro: Guabanara, Koogan AS, 2007.

REIS, E. M. et al. **Funcionalização de hidrogéis de nanocelulose bacteriana para mimetização de microambiente tumoral**, Dissertação de Mestrado, 2016.

REIS, E. F. dos et al. Synthesis and characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogels and hybrids for rMPB70 protein adsorption. **Materials Research**, v. 9, n. 2, p. 185-191, 2006.

ROBYT, J.F.; WHITE, B.J. *Biochemical Techniques - Theory and Practice*, Chicago IL: Waveland, 1990.

ROCHA, L. K. H. et al. Sericin from *Bombyx mori* cocoons. Part I: Extraction and physicochemical-biological characterization for biopharmaceutical applications, **Process Biochemistry**, v. 61, p. 163-177, 2017.

SABERZADEH-ARDESTANI, B. et al. Type 1 Diabetes Mellitus: Cellular and Molecular Pathophysiology at A Glance, **Cell Journal**, v. 20, n. 3, p. 294-301, 2018.

SANTOS DE ALMEIDA, T. et al. Choline-versus imidazole-based ionic liquids as functional ingredients in topical delivery systems: cytotoxicity, solubility, and skin permeation studies, **Drug development and industrial pharmacy**, v. 43, n. 11, p. 1858-1865, 2017.

SALERNO, C.; CARLUCCI, A. M.; BREGNI, Carlos. Study of in vitro drug release and percutaneous absorption of fluconazole from topical dosage forms, **AAPS PharmSciTech**. v. 11, n. 2, p. 986-993, 2010.

SCHROEDER, I. Z. et al. Development and characterization of film forming polymeric solutions for skin drug delivery, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 65, n. 1, p. 111-121, 2007.

SEABRA, A. B. et al. Preparation, characterization, cytotoxicity, and genotoxicity evaluations of thiolated- and s-nitrosated superparamagnetic iron oxide nanoparticles: implications for cancer treatment, **Chemical Research in Toxicology**, v. 27, n. 7, p. 1207-1218, 2014.

SEVERINO, P. et al. Polímeros usados como sistemas de transporte de princípios ativos, **Polímeros**, v. 21, n. 5, p:361-368, 2011.

SILVA, J. A. et al. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas, **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 3, p. 125-131, 2010.

SOARES, M. et al. Permeação cutânea: desafios e oportunidades, **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.36, n.3, p. 337-348, 2015.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes da sociedade brasileira de diabetes, 2014-2015. Uso da insulina no tratamento do diabetes mellitus tipo 1. Disponível em <https://www.diabetes.org.br/profissionais/images/pdf/diabetes-tipo-1/001-Diretrizes-SBD-Uso-Insulina-pg80.pdf>. Acesso em 10 de dezembro de 2018.

SONG, A.; RANE, A. A.; CHRISTMAN, K. L. Antibacterial and cell-adhesive polypeptide and poly (ethylene glycol) hydrogel as a potential scaffold for wound healing, **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 1, p. 41-50, 2012.

SOUZA, L. K. et al. Ureasil–polyether hybrid film-forming materials. **Colloids and Surfaces B:Biointerfaces**, v. 101, p. 156-161, 2013.

TEIXEIRA, F. M. F. et al. Spongy film of cellulosic polysaccharide as a dressing for aphthous stomatitis treatment in rabbits. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 29, n. 4, p. 231-236, 2014.

VAN GOLEN, L. W. et al. Effects of insulin detemir and NPH insulin on body weight and appetite-regulating brain regions in human type 1 diabetes: a randomized controlled trial. **Plos One**, v. 9, n. 4, p. e94483, 2014.

VEIGA, I. G. Uso de xantana em substituição ao alginato em membranas coacervadas de quitosana projetadas para a cicatrização de lesões de pele, **Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química**, Campinas, SP, 2009.

VILLANOVA J. C. O. et al. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, n.1, p. 51-64, 2010.

VILLANUEVA, M. et al. Thermal stability of ionic liquids for their application as new absorbents, **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v.52, n. 45, p.15718-15727, 2013.

VILLEGAS, V. et al. Stabilization of proteins by rational design of  $\alpha$ -helix stability using helix/coil transition theory. **Folding and Design**, v. 1, n. 1, p. 29-34, 1996.

WANG, Z.; CHANG, J.; CAI, C. Tribological Performance of Phosphonium Ionic Liquids as Additives in Lithium Lubricating Grease. **Lubricants**, v. 6, n. 1, p. 23, 2018.

WILLIAMS, H. D. et al. Ionic liquids provide unique opportunities for oral drug delivery: structure optimization and in vivo evidence of utility. **Chemical Communications**, v. 50, n. 14, p. 1688-1690, fev. 2014.

YAN, C.; POCHAN, D. J. Rheological properties of peptide-based hydrogels for biomedical and other applications. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 9, p. 3528-3540, 2010.

YANG, T. **Mechanical and swelling properties of hydrogels**, Tese de Doutorado. KTH Royal Institute of Technology, 2012.

YANO, H. et al. Optically transparent composites reinforced with networks of bacterial nanofibers. **Advanced Materials**, v. 17, n. 2, p. 153-155, 2005.

YOUNG, A. L. Powder X-ray Diffraction and its Application to Biotherapeutic Formulation Development. **American Pharmaceutical Review**, v. 15, n. 1, p. 74, 2012.

ZAKREWSKY, M. et al. Ionic liquids as a class of materials for transdermal delivery and pathogen neutralization. **Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)**, v. 111, n. 37, p.13313-13318, 2014.

ZHAO, J. et al. Biomimetic and bioinspired membranes: Preparation and application. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 9, p. 1668-1720, 2014.

ZHOU, G.; LUO, Z.; FU, X. Preparation of starch nanoparticles in a water-in-ionic liquid microemulsion system and their drug loading and releasing properties. **Agricultural and Food Chemistry**, v.62, p. 8214-8220, 2014.

## Anexo A



## **Anexo B**



## **Anexo C**



## **Anexo D**



