UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

PEDRO VINICIUS DE ASSIS BUENO

**Complexos híbridos de polieletrólitos e magnetita
para liberação controlada de amoxicilina**

Versão original da Dissertação defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

08/06/2018

PEDRO VINICIUS DE ASSIS BUENO

**Complexos híbridos de polieletrólitos e magnetita
para liberação controlada de amoxicilina**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Química*

Orientador (a): Prof (a). Dr (a). Denise Freitas Siqueira Petri

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

B928c Bueno, Pedro Vinicius de Assis
Complexos híbridos de polieletrólitos e magnetita
para liberação controlada de amoxicilina / Pedro
Vinicius de Assis Bueno. - São Paulo, 2018.
74 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da
Universidade de São Paulo. Departamento de Química
Fundamental.

Orientador: Petri, Denise Freitas Siqueira

1. Goma xantana. 2. Amoxicilina. 3. Inibição do
crescimento microbiano. 4. Escherichia coli. 5.
Staphylococcus aureus. I. T. II. Petri, Denise
Freitas Siqueira, orientador.

Dedico este trabalho a minha supermãe,
meu superpai e meus incríveis irmãos,
pelo apoio, amor, carinho e
por estarem sempre ao meu lado.

AGRADECIMENTO(S)

Aos meus pais, Isabel Maria de Assis e Alcides Bueno Filho, e aos meus irmãos Paulo Henrique Bueno e Ana Carolina Bueno, por serem meu apoio de vida.

A minha super orientadora, Prof. Dr. Denise Freitas Siqueira Petri, pela sua orientação, pela paciência gigante e a amizade construída durante a realização deste trabalho.

A Prof. Dr. Ana Maria Carmona-Ribeiro pela oportunidade de explorar novas técnicas e contribuir com o meu crescimento profissional.

A Karina Cassio Pandeló Hilmatu por toda a ajuda, suporte e paciência ao longo do desenvolvimento deste projeto.

Aos demais companheiros do laboratório, que sempre estiveram presentes em todos os seminários e reuniões.

Ao Programa de Pós-graduação em Química, ao Departamento de Química, a Central Analítica e ao Instituto de Química, da Universidade de São Paulo, pela oportunidade.

Ao laboratório nacional de nanotecnologia (LNNano), Projeto XPS 22730.

As agências brasileiras de fomento, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processos 2015/25103-2, 2016/07862-6 e 2016/08750-7, e pelo Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), processos 305178/2013-0, 302352/2014-7 e 448497/2014-0, pelo apoio financeiro.

A todos os envolvidos o meu Muito Obrigado.

“My spirit is crying for leaving” (PAGE; PLANT, 1971).

RESUMO

(Bueno, P.V.A.) **Complexos híbridos de polieletrólitos e magnetita para liberação controlada de Amoxicilina**. 2018. (74p). Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Novos sistemas biocompatíveis para aplicações biotecnológicas são relevantes não só do ponto de vista tecnológico, mas também para avanços científicos. A presente dissertação visou à criação e caracterização de filmes finos (espessura de até 100 nm) ou micrométricos (espessura de 50 μm a 100 μm) formados por goma xantana (GXT), poli(cloreto de dimetil dialil amônio), (PDDA), albumina bovina sérica (BSA), e nanopartículas de magnetita (NPM). A incorporação de amoxicilina (Amox), um antibiótico amplamente utilizado contra muitas infecções, nos filmes foi realizada durante a formação dos sistemas. Os filmes finos foram caracterizados através de elipsometria e microscopia de força atômica. Em solução, as interações favoráveis entre o Amox e a BSA foram evidenciadas por mudanças substanciais na estrutura secundária da BSA, como revelado pelo dicroísmo circular. Os filmes micrométricos (“patches”) de GXT e GXT/NPM/BSA foram imersos em Amox 2 g/L, levando a incorporação de 10 ± 3 e 17 ± 4 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ de Amox, respectivamente. Sua caracterização compreendeu espectroscopia vibracional no infravermelho por transformada de Fourier no modo de refletância total atenuada (FTIR-ATR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), medidas de sorção e espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES). A incorporação de 0,2% em massa de Fe_3O_4 nos “patches” e sua exposição a um campo magnético externo, viabilizou a liberação total *in vitro* de Amox, em pH 5,5 e em 0,02 mol/L de NaCl, seguindo o comportamento *quasi*-Fickiano. A difusão da Amox dos “patches” de GXT/NPM/BSA em ágar contendo *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, levou halos de inibição consideráveis. A inibição do crescimento de *E. coli* foi particularmente eficiente sob efeito de campo magnético externo.

Palavras-chave: goma xantana; albumina; amoxicilina; inibição do crescimento microbiano; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

(Bueno, P.V.A.) **Hybrid complexes of polyelectrolytes and magnetite for controlled release of Amoxicillin.** 2018. (74p.). Masters Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

New biocompatible systems for biotech applications are relevant not only from a technological point of view, but also for scientific advances. The present project aimed at the creation and characterization of thin films (thickness up to 100 nm) or micrometric patches (thickness of 50 μm to 100 μm) formed by the deposition of xanthan gum (GXT), poly (dimethyl diallyl ammonium chloride) (PDAA), bovine serum albumin (BSA), and magnetite nanoparticles (NPM). The incorporation of amoxicillin (Amox), a widely used antibiotic against many infections, in the films was performed during the formation of the systems. Thin films were characterized by means of ellipsometry and atomic force microscopy. In solution, favorable interactions between Amox and BSA were evidenced by substantial changes in the secondary structure of BSA, as revealed by circular dichroism spectra. Patches of GXT and GXT/NPM/BSA were immersed into Amox solution at 2 g/L, leading to the Amox incorporation of 10 ± 3 and 17 ± 4 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, respectively. The patches characterization included Fourier Transform Infrared vibration spectroscopy in the attenuated total reflectance mode (FTIR-ATR), scanning electron microscopy (MEV), sorption measurements and inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES). The incorporation of 0.2 wt% of Fe_3O_4 in the patches and their exposure to an external magnetic field, allowed the total *in vitro* release of Amox, at pH 5.5 and 0.02 mol/L NaCl, following the behavior *quasi*-Fickian. Amox diffusion from GXT/NPM/BSA patches in agar containing *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* led to a considerable zone of inhibition. Inhibition of *E. coli* growth was particularly efficient under the effect of external magnetic field.

Keywords: xanthan gum; albumin; amoxicillin; inhibition of microbial growth; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -poli-L-lisina	α PLL
ϵ -poli-L-lisina	ϵ PLL
Albumina bovina sérica	31
Albumina humana sérica	31
Amoxicilina	31
Campo magnético externo	CME
Concentração mínima inibitória	MIC
Dicroísmo circular	CD
<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i>
Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado	ICP-OES
Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X	XPS
Espectroscopia vibracional no infravermelho por transformada de Fourier no modo de refletância total atenuada	FTIR-ATR
Goma xantana	31
Grau de intumescimento	GI
Layer-by-layer	LbL
Microbalança de cristal de quartzo	QCM
Microscopia de força atômica	AFM
Microscopia eletrônica de varredura	MEV

Nanopartículas magnéticas	NPM
Poli(brometo de 4-vinil- <i>N</i> -pentil piridino)	31
Poli(cloreto de dimetil dialil amônio)	PDDA
Poli(vinil piridíno)	PVP
Ponto isoeletrico	PI
Porcentagem de Amox	Γ
Porcentagem de enxofre	%S
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>S. aureus</i>
Zona de inibição	ZI

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Estrutura básica das penicilinas, anel β -lactâmico em vermelho e anel tiazolina em azul.....	17
Figura 02. Esquema da ação de antibióticos β -lactâmicos em <i>Staphylococcus aureus</i>	18
Figura 03. Esquema da permeação de antibióticos β -lactâmicos em bactérias Gram-negativa e Gram-positiva	19
Figura 04. Estrutura da Amox com os pKas respectivos (a) e do ácido clavulânico (b)	20 - 21
Figura 05. Representação das unidades repetitivas da GXT	23
Figura 06. Representação das unidades repetitivas (a) do PDDA e (b) do QPVP	24
Figura 07. Representação da (a) Lisina, das unidades repetitivas da (b) ϵ PLL e (c) α PLL.....	25
Figura 08. Esquema de deposição de filmes finos por interações eletrostáticas	26
Figura 09. Representação esquemática da técnica de automontagem LbL....	26
Figura 10. Esquema representativo da matriz de um hidrogel químico (a esquerda) e de um hidrogel físico (a direita)	28
Figura 11. Representação da formação dos filmes por LbL. * QPVP 50% e 100%	34
Figura 12. (a) Estrutura do ácido cítrico e (b) representação do mecanismo de formação dos “patches” que ocorre entre os grupos ácidos da GXT e os terminais ácidos do ácido cítrico	35-36

Figura 13. Curva padrão medida para Amox em 271 nm, no pH 5,5 e $(23 \pm 1) ^\circ\text{C}$. (a) em solução de NaCl 0,2 mol/L e (b) em solução de NaCl 0,02 mol/L..... 39

Figura 14. Visão geral da morfologia da superfície (imagens topográficas de AFM 1000x1000) e valores médios de espessura obtidos após cada deposição nas lâminas de Si. Imagens indicadas com (A) possuem escala de 650x650 e (B) é a ampliação ótica da superfície indicada em (A). 42

Figura 15. Visão geral das morfologias das superfícies típicas e os valores médios de espessura após cada deposição. Todas as imagens topográficas AFM correspondem ao tamanho de varredura de $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ 45

Figura 16. Espectros de dicroísmo circular obtidos para (a) Amox, PDDA e PLL puros, (b) Amox e PDDA puros e mistura de PDDA com Amox, (c) Amox e PLL puros e mistura de PLL com Amox, (d) QPVP 50% e 100% puros, (e) QPVP 50% e Amox puros e mistura de QPVP 50% com Amox (g) QPVP 100% e Amox puros e mistura de QPVP 100% com Amox..... 48-49

Figura 17. Espectros de FTIR-ATR na faixa de 600 cm^{-1} a 2000 cm^{-1} obtidos para (a) “patches” de GXT/NPM/BSA puros (b) “patches” de GXT/NPM/BSA incorporados com Amox, (c) Amox pura, (d) “patches” de GXT incorporados com Amox e (e) “patches” de GXT puros 52

Figura 18. Imagens de MEV obtidas para as superfícies de crio-fratura das amostras dos filmes de GXT, GXT/Amox, GXT/NPM/BSA e GXT/NPM/BSA/Amox 53

Figura 19. Perfis de liberação em pH 5,5 e $(23 \pm 1) ^\circ\text{C}$ de Amox (mmol/g “patch”) dos “patches” de GXT/NPM/BSA em (a) NaCl 0,02 mol/L, sob CME, (b) 0,2 mol/L NaCl, sob CME, (c) 0,02 mol/L de NaCl, sem CME, (d) 0,2 mol/L de NaCl, sem CME. Os correspondentes ajustes assintóticos são: (a) $y = 0.2482 - 0.098 (0.915)^x$, $R^2 = 0.9123$; (b) $y = 0.1656 - 0.060 (0.902)^x$, $R^2 = 0.9654$; (c) $y = 0.1335 - 0.045 (0.956)^x$, $R^2 = 0.9470$ and (d) $y = 0.1078 - 0.053 (0.892)^x$, $R^2 = 0.9258$. Perfis de liberação em pH 5,5 e $(23 \pm 1) ^\circ\text{C}$ de Amox (mmol/g “patch”) a partir dos “patches” de GXT puros em (e) NaCl 0,02 mol/L e (f) NaCl 0,2 mol/L, as linhas são apenas guias para os olhos..... 55

Figura 20. Halo de inibição após 24h de (a) *S. aureus* e (b) *E. coli* com e sem campo magnético, controle (GXT/NPM/BSA) “patch” com Amox (GXT/NPM/BSA/Amox)

..... 58

Figura A1. Viscosidade reduzida em função da concentração da solução de polímero determinada para (a) GXT em NaCl 0,1 mol/L, a $25,0 \pm 0,1$ °C, e (b) PDDA em NaCl 1,0 mol/L, a $30,0 \pm 0,1$ °C..... 69

Figura C1. Curva de sorção dos patches de (a) GXT (Amostra 1, 2 e 3) e (b) GXT/NPM/BSA (Amostra 4, 5 e 6). 71

Figura D1. Dados experimentais do ajuste da liberação de Amox com o tempo (Figura 6) (ajustada com a equação de Korsmeyers-Peppas) (eq. 3)..... 72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores médios de %C e %N, bem como de %C/%N obtidos por XPS para medidas realizadas em três regiões diferente da mesma amostra 46

Tabela 2. Caracterizações dos “*patches*” transdérmicos (GXT/Amox e GXT/NPM/BSA/Amox), onde GI é o grau de intumescimento, S% é a porcentagem de enxofre na amostra, Γ é a porcentagem de Amox no filme 51

Tabela B1. Valores de Rms e escalas Z para cada imagem topográfica AFM apresentada na Figura 3. Todas as imagens topográficas de AFM correspondem ao tamanho de varredura de 1 μm x 1 μm , exceto aquelas marcadas por “+”, que são 650 nm x 650 nm..... 70

SUMÁRIO

Prolegômeno	16
1. Introdução.....	17
1.1. Amoxicilina, uma penicilina semissintética.....	31
1.2. Macromoléculas naturais	21
1.3. Policátions.....	23
1.4. Filmes finos	25
1.5. Hidrogéis e “ <i>patches</i> ” transdérmicos.....	28
2. Objetivos	31
3. Materiais e métodos	32
3.1. Materiais	322
3.2. Formação de filmes automontados	32
3.3. Formação e caracterização de filmes macrométricos baseados em GXT.....	35
3.4. Interação entre Amox e os polieletrólitos em solução	38
3.5. Liberação da Amox a partir dos “ <i>patches</i> ” GXT e GXT/NPM/BSA	38
3.6. Atividade antibacteriana.....	39
4. Resultados e discussões.....	41
4.1. Adsorção de Amox em filmes finos	41

4.2.	Interação entre os polieletrólitos e BSA com Amox	46
4.3.	Caracterização de “patches” baseados em GXT antes e depois da incorporação da Amox	49
4.4.	Liberação controlada de Amox a partir dos “patches”	54
4.5.	Ensaio de dosamento microbiológico por difusão em agar	56
5.	Conclusões	59
6.	Perspectivas futuras	60
	Referências	61
	Apendice	68
	APÊNDICE A – determinação da massa molar da GXT e do PDDA	68
	APÊNDICE B – Valores de RMS e escalas do eixo Z dos AFMs da figura 14. 70	
	APÊNDICE C – Curvas de sorção de água nos “patches”	71
	APÊNDICE D – Ajuste matemático da liberação de Amox dos “patches”	72
	Súmula Curricular	73

Prolegômeno

A apresentação desta dissertação foi dividida em duas partes. Na primeira parte, superfícies com diferentes funcionalidades foram preparadas por deposição sequencial (automontagem) de camadas finas de macromoléculas sobre lâminas de Si. O comportamento de adsorção da amoxicilina no pH 5,5 foi investigado por meio de elipsometria e microscopia de força atômica. Poli(cloreto de dimetil dialil amônio) (PDDA) foi primeiramente depositado, seguido pela deposição de goma xantana (GXT), como a segunda monocamada, nanopartículas magnéticas (NPM) e albumina sérica bovina, foram a terceira e quarta camadas depositadas. O resultado do estudo de adsorção de amoxicilina (Amox) sobre cada uma das camadas depositadas permitiu escolher os candidatos para criar novos materiais antimicrobianos (*“patches”* transdérmicos). Também foram realizados estudos de adsorção de Amox sobre monocamadas de α -poli-L-lisina (α PLL) ou sobre poli (brometo de 4-vinil-*N*-pentil piridínio) (QPVP) com 50 ou 100% de quaternização, a fim de compreender as interações entre amoxicilina e policações com diferentes estruturas químicas. Em solução, as interações entre Amox e GXT, PDDA, albumina sérica bovina, α PLL ou QPVP com 50 ou 100% de quaternização foram avaliadas por meio de análises de dicroísmo circular.

A segunda parte deste trabalho abordou a síntese dos *“patches”* incorporados com Amox, a partir dos resultados da primeira parte. Sua caracterização compreendeu espectroscopia vibracional no infravermelho por transformada de Fourier no modo de refletância total atenuada (FTIR-ATR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), medidas de sorção e espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES). Até onde sabemos, não há nenhum registro sobre *“patches”* sensíveis ao campo magnético externo estático (CME). A inclusão de nanopartículas de Fe_3O_4 nos *“patches”* possibilitou estimular a liberação do fármaco através do CME, um estímulo não invasivo. A liberação *in vitro* de Amox a partir dos *“patches”* foi investigada no pH 5,5 por meio de medidas espectrofotométricas e a atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e *Escherichia coli* (*E. Coli*) foi testada pelo método de análise microbiana por difusão em ágar na ausência e na presença de CME.

1.Introdução

1.1. Amoxicilina, uma penicilina semissintética

As penicilinas são uma classe de antibiótico que possuem um anel β -lactâmico ligado a um anel tiazolina e a um grupo R substituinte (Figura 01). Estes antibióticos são considerados β -lactâmicos devido ao efeito biocida estar associado a atividade deste anel. (PETRI Jr., 2011)

Figura 01 – Representação da estrutura química das penicilinas, anel β -lactâmico em vermelho e anel tiazolina em azul. Fonte: Petri Jr. (2011).

Os antibióticos β -lactâmicos são muito úteis, e sua ação está associada à inibição da enzima D,D-transpeptase, impedindo a síntese de peptídeoglicano da parede celular (Figura 02). (PETRI Jr., 2011). As penicilinas são uma classe de fármacos muito importantes para a área biomédica, tendo seu efeito antimicrobiano relatado por Alexandre Fleming em 1928, onde, ele notou acidentalmente que a penicilina levou a morte de várias bactérias da variante *Staphylococcus*. (FLEMING,

1929) Posteriormente, a penicilina foi isolada, por Ernst Boris Chain e Sir Howard Walter Florey em 1940, suas propriedades biocidas foram comprovadas e a baixa citotoxicidade foi determinada, rendendo o prêmio Nobel de medicina de 1945 para Fleming, Chain e Florey. (CHAIN et al., 1940; ABRAHAN et al., 1941)

Figura 02 – Esquema da ação de antibióticos β-lactâmicos em *Staphylococcus aureus*.

Fonte: Petri Jr. (2011).

As bactérias podem ser divididas em duas classes simples, Gram-negativas e Gram-positivas (Figura 03). As Gram-positivas são sensíveis ao corante de Gram (este corante interage com a camada de peptidoglicano das bactérias), devido a sua parede celular ser constituída apenas da camada de peptidoglicano a qual fica exposta ao meio externo, assim, possibilitando o corante interagir com a camada de peptidoglicano facilmente. Já as bactérias Gram-negativas não são sensíveis ao corante de Gram, devido a sua parede celular ser mais complexa, possuindo uma membrana externa. Desta forma, a camada de peptidoglicano não fica em contato com o meio externo e, portanto, o corante não é capaz de permear a membrana externa, não tendo acesso a camada de peptidoglicano. Como os antibióticos da

classe das penicilinas também interagem na camada de peptídeoglicano, em geral são eficientes frente às bactérias Gram-positivas. Assim, alguns antibióticos específicos desta classe necessitam permear a membrana externa das bactérias Gram-negativas para possuir algum efeito biocida (Figura 03). (PETRI Jr., 2011).

Figura 03 – Esquema da permeação de antibióticos β -lactâmicos em bactérias Gram-negativa e Gram-positiva. Fonte: Petri Jr. (2011).

O uso excessivo e indiscriminado desse tipo de antibiótico levou, ao longo dos anos, o aparecimento de bactérias resistentes a esta classe de antibióticos. As bactérias resistentes produzem a enzima β -lactamase, a qual hidrolisa os antibióticos β -lactâmicos, diminuindo substancialmente a concentração de antibióticos ativos na camada de peptídeoglicano, tornando os antibióticos ineficientes frente a esse tipo de bactérias. (DAVIES; DAVIES, 2010).

As penicilinas podem ser classificadas de acordo com o seu grau de ação, os principais grupos são: (i) as penicilinas G e V, que são utilizadas frente contra infecções com bactérias cocos Gram-positiva, porém são suscetíveis a β -lactamase; (II) as penicilinas resistentes a β -lactamase, que são utilizadas frente a infecções na qual possuem bactérias resistentes, como a grande maioria das infecções de *Staphylococcus aureus*. Porém, elas possuem um menor efeito biocida frente as bactérias cocos Gram-positiva sucessíveis às penicilinas G e V; e (III) as penicilinas de amplo espectro, que são utilizadas frente a infecções por bactérias Gram-negativas; este tipo de antibiótico possui a capacidade de permear a membrana

externa da bactéria, e em geral são administradas juntamente com inibidores da β -lactamase. (PETRI Jr., 2011).

A amoxicilina (α -amino-hidroxi benzil penicilina), Amox, representada na Figura 04a, é uma penicilina semissintética classificada como penicilina de amplo espectro. A Amox é suscetível à enzima β -lactamase, e desta forma ela é administrada juntamente com o ácido clavulânico (Figura 04b), o qual é um inibidor da enzima β -lactamase. (PETRI Jr., 2011). As penicilinas, em geral, são instáveis em meio ácido. Nesta condição o anel β -lactâmico sofre hidrólise, perdendo o seu efeito biocida, inviabilizando o uso oral. (DAVIES; DAVIES, 2010; PETRI Jr., 2011). No caso da Amox, a estabilidade em meio ácido se deve à presença do grupo amino ($-\text{NH}_2$) em sua estrutura, sendo recomendada para o tratamento por via oral. (KAUR; RAO; NANDA, 2011; ALTINISIK; YURDAKOC, 2014; FELIX, et. al. 2016; LIU, 2016).

Figura 04 – Estrutura da Amox com os pKas respectivos (a) e o ácido clavulânico (b). Fonte Kaur, Rao e Nanda (2011).

Em baixas concentrações, a Amox possui uma cinética de degradação de pseudo primeira ordem (em pH próximo de 6). O aumento da força iônica leva um aumento da degradação da Amox, esta degradação é mais pronunciada em soluções contendo carboidratos. (KAUR; RAO; NANDA, 2011; ALTINISIK; YURDAKOC, 2014; FELIX, et. al. 2016; LIU, 2016).

1.2. *Macromoléculas naturais*

A IUPAC define proteína como sendo polipeptídios naturais ou sintéticos com massa molar maior que 10.000 g/mol. (MCNAUGHT; WILKINSON, 1997). Uma das proteínas mais abundante é albumina bovina sérica (BSA). Em soluções aquosas com pH superior a 4,9 ela apresenta carga líquida negativa (ponto isoelétrico (PI) = 4,7 a 4,9). (SEREFOLOU; OBERDISSE; STAIKOS, 2007). A BSA possui 583 resíduos de aminoácidos com massa molar de 66 kg/mol. Em pH neutro, apresenta uma estrutura em formato de coração subdividida em dois grandes grupos, no qual, o principal é formado pela estrutura de α -hélice. A BSA possui uma semelhança de aproximadamente 76% com a albumina humana sérica (HSA) e sua principal função é ser transportadora de metabolitos. (EL KADI et. al., 2006)

Segundo a IUPAC, polissacarídeos são compostos que consistem de no mínimo dez monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas. (MCNAUGHT; WILKINSON, 1997). Eles são oriundos de fontes abundantes e renováveis, como vegetais (amido, pectina, celulose, xiloglucana), algas (alginato, agarose), animais (quitina, heparina) e produção microbiana (dextrana, pululana, xantana, diutana) (DUMITRIU, 2005). A maioria dos polissacarídeos carrega grupos funcionais como hidroxilas, ácido carboxílico, aminoglicanos, sulfato, que dependendo do pH do meio podem ser ionizáveis, conferindo carga à macromolécula.

Os polissacarídeos que possuem elevada hidrofilicidade, e que em baixas concentrações aumentam consideravelmente a viscosidade de soluções aquosas, são chamados de gomas. A goma xantana (GXT) é um dos mais importantes polissacarídeos produzidos industrialmente, com diversos usos, como por exemplo, aditivos na indústria alimentícia, componente em comprimidos, e estabilizante de emulsões aquosas. A GXT apresenta propriedades interessantes de biocompatibilidade e biodegradabilidade possibilitando assim o uso da GXT em diversas áreas, ou seja, a GXT é um polissacarídeo versátil. A GXT é produzida a partir da fermentação da glicose usando a espécie *Xanthomonas campestris*. (ROSALAM; ENGLAND, 2006). A cadeia principal ("backbone") é constituída por unidades repetitivas de celobiose e cadeia lateral composta pelo trissacarídeo de D-manose (β -1,4), ácido D-glucurônico (β -1,2) e D-manose, a qual está ligada à cadeia principal por ligações (α -1,3), (Figura 05). Aproximadamente a metade dos terminais D-manose contem grupos ácido pirúvico ligados nas posições 4 e 6 e uma quantidade inexistente (fortemente dependente das condições de fermentação) de grupos acetato ligados na posição 6 da D-manose ligada à cadeia principal. (JANSSON; KENNE; LINDBERG, 1975; ROSALAM; ENGLAND, 2006; PETRI, 2015). Em soluções aquosas em pH superior a 4,5 a GXT apresenta carga negativa, devido à desprotonação dos grupos ácidos presentes na sua estrutura, assim, nestas condições a GXT é considerada um poliânion. A facilidade de formar redes tridimensionais, características de gelificação e resistência a meio ácido possibilitam o uso da GXT pura ou em combinação com outros materiais (como polissacarídeos, proteínas, polipeptídeos, nanopartículas entre outros) no desenvolvimento de formulações de matrizes para carregamento de fármacos.

Figura 05 – Representação das unidades repetitivas da GXT. Fonte Jansson, Kenne, Lindberg (1975), Rosalam, England, (2006) e Petri (2015).

1.3. Policações

O poli(cloreto de dimetil dialil amônio) PDDA, cuja estrutura química está representada na Figura 06a, é um policação sintetizado através da polimerização radicalar de cloreto de dimetil dialil amônio, gerando cerca de 84% de PDDA em posição cis. A presença do amônio quaternário na unidade repetitiva do PDDA confere interessantes propriedades bactericidas a esse polímero. O poli (brometo de 4-vinil-*N*-pentil piridínio), (SANCHES et al., 2015) QPVP, (figura 6b) é um polímero sintetizado através da quartenização do nitrogênio presente no anel piridínico da poli(vinil piridina) (PVP) através da reação com bromo pentano. O grau de quartenização pode ser controlado pela cinética da quaternização. As amostras utilizadas neste trabalho, apresentam 50% e 100% de quartenização. (BLACHECHEN et al., 2015).

Figura 06 – Representação das unidades repetitivas (a) do PDDA e (b) do QPVP 100% quaternizado. Fonte: Sanches et al. (2015) e Blachechen et al. (2015).

Um dos aminoácidos essenciais para o ser humano é a lisina (Figura 07a). Através da polimerização da lisina podemos obter diversos polipeptídios. Os mais comuns são o α -poli-L-lisina (α PLL) e o ϵ -poli-L-lisina (ϵ PLL) (Figuras 07b e 07c). O α PLL e o ϵ PLL apresentam diferenças interessantes quando comparamos os seus efeitos biocidas. Frente as bactérias *E. coli* o ϵ PLL necessita de uma concentração aproximadamente quatro vezes menor para ter um efeito de inibição, quando comparado com o α PLL. Quando comparamos o efeito das poli-L-lisinas frente a *Micrococcus lysodeikticus*, o ϵ PLL apresenta uma concentração mínima inibitória de 2 μ g/mL enquanto o α PLL não apresenta fator de inibição. (SHIMA et al., 1984). Porém, a obtenção do ϵ PLL, que se dá através da *Streptomyces albulus*, é cara, (GROTZKY et al., 2010). limitando seu uso. Apesar das características bactericidas do α PLL em vários casos serem inferiores às do ϵ PLL, o α PLL ainda assim apresenta interessantes propriedades biocidas em uma grande faixa de bactérias. Cada unidade repetitiva apresenta um grupo ϵ -amido ($R-NH_3^+$), com pKa entre 9 e 10, assim, o α PLL é considerado um polycation nos meios ácido e neutro. (HIRAKI et al., 2003; YOSHIDA; NAGASAWA, 2003).

Figura 07 – Representação da (a) Lisina e das unidades repetitivas da (b) ϵ PLL e (c) α PLL. Fonte: Yoshida, Nagasawa, (2003) e Grotzky et al.(2010).

A presença de grupos amônio quaternário na estrutura de policátions favorece a interação eletrostática com os grupos fosfato presentes na parede celular de microrganismos, potencializando a ação antimicrobiana dos mesmos. (CARMONA-RIBEIRO; DE MELO CARRASCO, 2013).

1.4. Filmes finos

A formação de filmes finos pode ser obtida pela técnica de automontagem ou "Layer-by-Layer" (LbL). (DECHER; HONG, 1991; DECHER; SCHLENOFF, 2002). A técnica de LbL é um método eficiente para obtenção de filmes finos de multicamadas macromoleculares. O método LbL de obtenção de filmes finos consiste em imersões de um substrato sequencialmente em soluções aquosas diluídas de polímeros que possuem cargas opostas (Figuras 8 e 9). Os polieletrólitos adsorvem na superfície formando filmes de escala nano até micro e a sua espessura é incrementada pelo número de sucessivas imersões. (DECHER; HONG, 1991; DECHER; SCHLENOFF, 2002).

Figura 8 – Esquema de deposição de filmes finos por interações eletrostáticas. Fonte: Decher; Hong, (1991) e Decher; Schlenoff (2002).

Figura 9 – Representação esquemática da técnica de automontagem LbL. Fonte: Decher; Hong, (1991) e Decher; Schlenoff (2002).

Existem várias técnicas utilizadas na caracterização destes filmes finos, uma dessas técnicas é a elipsometria. A elipsometria é uma técnica utilizada na determinação das propriedades ópticas e espessura de filmes finos a partir da mudança do estado de polarização da luz após sua reflexão a partir de superfícies

refletoras. (AZZAM; BASHARA, 1987). A partir dos ângulos elipsométricos referentes à mudança de fase (Δ) e amplitude (Ψ) a espessura e índice de refração do filme depositado podem ser calculados através da equação fundamental da elipsometria:

$$e^{i\Delta} \tan\Psi = \frac{R_p}{R_s} = f(n_k, d_k, \lambda, \theta) \quad (1)$$

Onde R_p e R_s são os coeficientes de reflexão no plano p (paralelo) e s (perpendicular) ao plano de incidência, n_k e d_k se referem ao índice de refração e espessura de cada camada do modelo (Si, SiO₂ etc), λ é o comprimento de onda (632,8 nm) e θ é o ângulo de incidência (70°). Outra técnica importante é a microscopia de força atômica (AFM). AFM consiste na realização das medidas das forças entre uma sonda e a superfície da amostra. A sonda do AFM consiste em uma ponta piramidal, geralmente de Si₃N₄, localizada na extremidade de um cantilever; esta ponta interage com a amostra através de forças atrativas e repulsivas, que variam de intensidade de acordo com a morfologia da superfície da amostra. O sistema de varredura do AFM é sensível a distâncias extremamente pequenas. Uma técnica também muito utilizada nas análises de superfície de filmes finos é a espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS). Esta técnica consiste na emissão de uma onda específica de raios-X, usualmente utilizando elétrons K α do Al (1486,6 eV) ou Mg (1253,6 eV), sobre uma superfície fina levando a excitação e ejeção de elétrons 1s das moléculas, átomos e íons. A energia do fóton ($h\nu$) necessita ser superior a soma da energia cinética (E_k), energia de ligação (E_B) e da função trabalho (φ) (equação 2). (TOUGAARD, 2013).

$$h\nu = E_k + \varphi + E_B \quad (2)$$

Um equipamento muito útil para análises de filmes finos é a microbalança de cristal de quartzo (QCM) a qual possui uma lâmina de quartzo entre dois eletrodos, os quais induzem um campo elétrico oscilante perpendicular à superfície da lâmina. A variação da massa na superfície da lâmina leva a uma variação na frequência do campo oscilante da QCM (equação 3). (DEAKIN; BUTTRY, 1989).

$$\Delta f = \frac{-2\Delta m n f_o^2}{A\sqrt{\mu_q \rho_q}} \quad (3)$$

Onde Δf é a variação da frequência de oscilação, Δm é a variação da massa na superfície, A é a área, f_o é a frequência do campo oscilante da QCM, n é uma constante do equipamento, μ_q é o módulo de cisalhamento do quartzo e o ρ_q é a densidade do quartzo.

1.5. Hidrogéis e “patches” transdérmicos

Hidrogéis são materiais insolúveis no meio inserido, a sua matriz tridimensional é normalmente composta de polímeros sintéticos ou biopolímeros, que, devido as suas propriedades termodinâmicas e características estruturais, são capazes de intumescer em soluções aquosas ou em fluidos biológicos. Os hidrogéis podem ser classificados como hidrogéis químicos, quando são formados por ligações covalentes irreversíveis, e hidrogéis físicos, quando são formados por interações eletrostáticas, dipolo-dipolo, por ligações de hidrogênio ou dipolo induzido entre as cadeias poliméricas (Figura 10). (GULREZ; AL-ASSAF; PHILLIPS, 2011; AHMED, 2015).

Figura 10 – Esquema representativo da matriz de um hidrogel químico (a esquerda) e de um hidrogel físico (a direita).

Os hidrogéis químicos geralmente são aplicados em situações onde a integridade do material, pelo menos por certo período de tempo, é necessária, como por exemplo, no desenvolvimento de implantes em órgãos humanos e animais. Já a integridade da estrutura dos hidrogéis físicos pode ser facilmente perturbada por estímulos mecânicos ou mudanças de ambiente químico.

Um dos usos dos hidrogéis está relacionado a liberação controlada de fármacos. A liberação de fármacos pode ser estimulada através estímulos externos como variação de temperatura, pH, composição do solvente, campo elétrico e campo magnético. (KRAMARENKO; PHILIPPOVA; KHOKHLOV, 2006; SAHINER, 2007; KULKARNI; SA, 2008; KONDAVEETI; CORNEJO; PETRI, 2016). O estímulo magnético tem vantagens de ter ação instantânea e não precisar ser invasivo. A sensibilidade ao estímulo magnético é obtida pela incorporação de partículas magnéticas à matriz polimérica, ou seja, pode ser elaborado hidrogéis incorporados com nanopartículas magnéticas (NPM) para liberação controlada de fármacos por estímulo magnético. A citotoxicidade de nanopartículas de magnetita foi observada quando a concentração excede 1% (m/m); (GLASER et al., 2015). suportes de xantana contendo teores menores que 1% de magnetita não apresentaram citotoxicidade e mantiveram níveis adequados de magnetização. (GLASER et al., 2015).

A partir de hidrogéis de polissacarídeos, podem ser preparadas membranas incorporadas com fármacos que apresentam interessantes propriedades, como biocompatibilidade e baixa citotoxicidade, com a finalidade de ser uma alternativa de liberação por via tópica. A liberação transdérmica, por meio destas membranas, chamadas “*patches*” transdérmicos, pode apresentar diversas vantagens quando comparado com a liberação por via oral, como a facilidade de uso, a elevada tolerância dos pacientes, a redução da frequência das drogas, podem driblar intolerâncias gastrointestinais, também podem reduzir a flutuação da concentração das drogas na corrente sanguínea, e a remoção do “*patch*” cessa a liberação da droga. Os “*patches*” transdérmicos são considerados sistemas não invasivos aplicados para a administração tópica de alguns medicamentos, como nicotina, hormônios e anti-inflamatórios. Porém, há alguns fatores a serem avaliados antes da aplicação, pois a pele humana é uma barreira eficiente. Por exemplo, este modelo é insustentável para tratamentos de emergência, que necessitem de uma liberação

rápida, podem ocorrer efeitos de alergia tópica, o “*patch*” necessita uma adesão considerável na pele, e óleos, bem como hidratantes, podem levar a uma variação de adesão e de liberação do fármaco. (ISAAC; HOLVEY, 2012).

2.Objetivos

Preparar e caracterizar filmes finos e micrométricos a base de polieletrólitos na presença e ausência de nanopartículas magnéticas e determinar suas propriedades antimicrobianas sob efeito de campo magnético externo.

3. Materiais e Métodos

3.1. *Materiais*

GXT, de massa molar média viscosimétrica $M_v = 1.187.602$ g/mol (APÊNDICE A, Figura A1a), grau de piruvil = 0,38 e grau de acetil = 0,41, foi fornecida pela CP Kelco (EUA). α PLL (25988-63-0 Sigma) de massa molar entre 70.000 e 150.000 g/mol, QPVP de massa molar $M_v \sim 60.000$ g/mol, com valores de 50 % e 100 % de quaternização. PDDA (409014 Sigma), de massa molar média viscosimétrica $M_v = 25.787$ g/mol (APÊNDICE A, Figura A1b), Amox (A0166 Sigma), massa molar 371,39 g/mol, de grau analítico, BSA (A2058 Sigma, São Paulo, Brasil) foram utilizados sem purificação prévia. $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e hidróxido de amônio de grau analítico fornecidos pela LabSynth (São Paulo), foram utilizados para a síntese das NPMs. Laminas de silício (100) com uma camada nativa de dióxido de silício (SiO_2) foram obtidos pela University Wafer (Boston, USA).

3.2. *Formação de filmes automontados*

Soluções aquosas de GXT, QPVP (50% ou 100%) e PDDA foram preparadas nas concentrações de 0,2 g/L, 1,0 g/L e 1,0 g/L, respectivamente, na ausência e presença de 0,1 mol/L NaCl (pH $5,5 \pm 0,1$). As soluções de BSA foram preparadas em 1,0 g/L em solução de NaCl de 0,01 a 1,0 mol/L, em pH $5,5 \pm 0,1$. Todas as soluções foram preparadas em água MilliQ.

As dispersões de NPM foram preparadas a partir da mistura das soluções de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,1 mol/L) e $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,05 mol/L) com o pH corrigido para a faixa entre 9 e 10 utilizando NH_4OH , em temperatura ambiente. O meio reacional foi colocado em um banho de água a 24 ± 1 °C, no qual o sonotrodo MS7 com densidade de potência acústica de 130 w/cm² acoplado ao processador ultrassônico

Hielscher UP100H foi imerso. O sonotrodo não foi imerso diretamente no meio reacional para evitar possível contaminação com partículas de Ti. O sonotrodo operou por 10 min, período em que a temperatura dentro e fora do meio reacional se manteve em 24 ± 1 °C. (BUENO et al., 2013). O processo de cavitação favoreceu a formação das nanopartículas de Fe_3O_4 , resultando em concentração final média de 48 ± 2 g/L, a qual foi determinada por gravimetria. As NPM foram preparadas em meio alcalino, assim, antes da utilização, o pH foi ajustado para o pH 5,5 com uma solução de HCl diluída. As NPM preparadas por cavitação ultrassônica apresentam pl de $6,5 \pm 0,1$. (BUENO et al., 2013).

Soluções de Amox foram preparadas em água MilliQ (pH $5,5 \pm 0,1$), na concentração de 2,0 g/L, na ausência de sal, em 0,02 e 0,2 mol/L de NaCl. Multicamadas foram preparadas por deposição sequencial a (23 ± 1) °C. Primeiro, as lâminas de Si/SiO₂ (1,0 cm x 1,0 cm) foram enxaguadas com isopropanol e secas sob uma corrente de N₂(g). As adsorções foram divididas em: Grupo I (Figura 11, em verde), as lâminas foram imersas na solução de PDDA durante 3 minutos para formar a primeira monocamada. Em seguida, os filmes foram lavados três vezes em água MilliQ durante 15 segundos cada, depois foram secas sob uma corrente de N₂(g), antes de prosseguir com a deposição da próxima monocamada. A monocamada de PDDA foi definida como substrato para as deposições subsequentes de GXT, NPM ou BSA e Amox, seguindo os mesmos procedimentos de deposição, secagem e lavagem. Grupo II (Figura 11, em azul), onde a interação entre filmes finos de diferentes polications sobre Si/SiO₂ e Amox foi estudada. Cada adsorção foi realizada durante 3 min para a formação da primeira monocamada (ou dos polications, ou da Amox) sobre a lâmina de Si/SiO₂. Depois as lâminas foram enxaguadas três vezes em água MilliQ (15 segundos cada), secas com jato de N₂(g), para depois prosseguir com a imersão na solução da próxima camada e três novos enxagues em água MilliQ.

Figura 11 – Representação da formação dos filmes por LbL. * QPVP 50% e 100%.

A espessura de cada camada depositada seca foi determinada por meio de medições elipsométricas no ar usando um elipsômetro vertical controlado por computador DRE-EL02 (Ratzeburg, Alemanha). O ângulo de incidência (ϕ) foi estabelecido em $70,0^\circ$ e o comprimento de onda (λ) do laser He-Ne foi de 632,8 nm. Em primeiro lugar, a espessura das camadas de SiO_2 foi determinada em ar, considerando o índice de refração do Si como $\pm 3,88 - 0,018i$, (PALIK, 1985). para o meio externo (ar), o índice de refração foi considerado como 1,00, as suas espessuras foram consideradas infinito. Como a camada de SiO_2 nativa é muito fina, seu índice de refração foi definido como 1,462 (PALIK, 1985) e apenas a espessura foi calculada. A espessura média da camada de dióxido de silício nativo em 70 laminas foi de $(1,9 \pm 0,1\text{nm})$. Para a determinação da espessura da camada depositada, para das camadas de PDDA, GXT, NPM, α PLL, QPVP, BSA e Amox, utilizou os índices de refração de 1,50, (SILVA et al., 2010). 1,53, (DÁRIO et al. 2011). 1,85, (SILVA et al., 2010) 1,52, 1,50, 1,52 (SILVA et al., 2010) e 1,701, respectivamente. Análises de microscopia de força atômica (AFM) foram realizadas no ar com um microscópio PICO SPM-LE (Molecular Imaging) em modo de contato intermitente no ar à temperatura ambiente, utilizando cantilevers de Si_3N_4 com frequência de ressonância próxima a 300 kHz. O processamento das imagens (512×512 pixels) e a determinação dos valores da rugosidade da raiz quadrada média (rms) foram realizados utilizando o software Pico Scan. Pelo menos três filmes da mesma composição foram analisados em diferentes áreas da superfície. A diferença nas superfícies dos filmes finos formados utilizando os polications também foi

avaliada por espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS), modelo K-Alpha, da *Thermo Scientific* no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano, Campinas).

3.3. Formação e caracterização de filmes micrométricos baseados em GXT

Todos os filmes micrométricos ou “*patches*” à base de GXT foram produzidos através casting a partir de uma solução aquosa de 6 g/L de GXT contendo ácido cítrico a 0,6 g/L e hipofosfito de sódio a 0,03 g/L, em placas de polietileno, onde, primeiramente, ocorre a formação do anidrido cítrico, catalisado pelo hipofosfito de sódio (YANG et al., 1998; YANG; XU; WANG, 1996; REDDY; YANG, 2009) (Figura 12 (I)). Os sistemas ficaram em estufa a 45 °C até completa evaporação da água (~ 20 h). A reticulação entre os grupos hidroxila da GXT o anidrido cítrico foi obtido através de uma reação de esterificação (YANG et al., 1998; REDDY; YANG, 2009), o qual ocorreu através do aquecimento das amostras secas (~ 0,030 mm de espessura) a 165 °C por 7 minutos. (BUENO; PETRI, 2014) (Figura 12 (III)). A reticulação das cadeias de GXT só ocorre se não houver a esterificação no grupo carboxílico central do ácido cítrico (Figura 12 (II)). (YANG et al., 1998).

Figura 12. (I) representação da reação de formação do anidrido a partir do ácido cítrico, (II) processo de esterificação no grupo carboxílico central e (III) processo de esterificação e reticulação da GXT. Fonte YANG et al. (1998).

Os “*patches*” resultantes foram lavados extensivamente com água MilliQ para remover moléculas que não reagiram. O processo de enxágue parou quando a condutividade do banho era similar à da água MilliQ ($\sim 5 \mu\text{S} / \text{cm}$). As amostras de GXT foram imersas em dispersões de NPM durante aproximadamente 10 segundos e enxaguadas três vezes em água MilliQ; este procedimento permite manter o teor de NPM inferior a 1,0% m/m nos “*patches*”, o que é considerado seguro para as células. (GLASER et al., 2015). Os “*patches*” GXT e GXT/NPM foram imersos em uma solução de BSA a 1,0 g/L, preparados em NaCl 0,05 mol/L, em pH $5,5 \pm 0,1$ e $(23 \pm 1) ^\circ\text{C}$, por três horas; este período de tempo foi necessário para alcançar

condições de equilíbrio. Em seguida, as amostras foram lavadas três vezes em água MilliQ para remover as moléculas de BSA fracamente ligadas e imersas em solução de Amox a 2,0 g/L (pH 5,5 ± 0,1), sem NaCl, durante três horas a (23 ± 1) °C. Por fim, os “*patches*” foram lavados e liofilizados para caracterização, estudos de liberação e testes antimicrobianos. A liofilização foi necessária para evitar a degradação térmica da Amox.

A caracterização foi realizada utilizando espectroscopia vibracional de infravermelho por transformada de Fourier no modo de refletância total atenuada (FTIR-ATR) com um cristal ZnSe, ângulo de incidência de 45°, usando um equipamento Perkin Elmer Frontier com resolução de 4 cm⁻¹ e na faixa de 600 a 4000 cm⁻¹. A morfologia dos “*patches*” baseados em GXT foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em um microscópio JEOL Neoscope JCM-5000; as superfícies crio-fraturadas foram revestidas com uma camada de ouro de 2 nm de espessura antes das análises. O grau de intumescimento dos “*patches*” de GXT e GXT/NPM/BSA foi determinado em água MilliQ antes da incorporação da Amox por meio de medições de sorção num tensiometro de precisão Krüss K100 (Krüss, Hamburg). As análises de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) foram realizadas com um equipamento Spectro Smart Analyzer Vision (SPECTRO Analytical Instruments GmbH, Alemanha) para determinar o teor de ferro, o que permitiu calcular o Fe₃O₄ nos “*patches*” GXT/NPM. O teor de BSA (% m/m) nos “*patches*” GXT/NPM/BSA foi calculado com base no teor de nitrogênio determinado pela análise elementar de CHN. (HAMES; SCARLATA; SLUITER, 2008). O teor de enxofre (% S) nos “*patches*” e na Amox pura foi quantificado por ICP-OES. A quantidade de Amox incorporada nos “*patches*” (Γ) foi calculada através da equação:

$$\Gamma \text{ (wt \%)} = \frac{\frac{\% S}{8.757}}{1 - \frac{\% S}{8.757}} \times 100 \quad (4)$$

3.4. Interação entre Amox e os polieletrólitos em solução

Dicroísmo circular (CD) foi usado para obter informações sobre as interações entre a Amox e os polieletrólitos GXT, PDDA, PLL, QPVP (50% e 100%) e BSA em solução. As medidas de CD foram realizadas em um espectropolarímetro Jasco J-720, na faixa de comprimento de onda de 190 a 280 nm, a (24 ± 1) °C, usando uma célula de quartzo de 0,5 cm. As concentrações das soluções utilizadas na obtenção dos espectros de CD foram de 2 g/L de GXT, 0,05 g/L de PLL, 1 g/L de QPVP (50% ou 100%), 1 g/L de PDDA, 0,125 g/L de BSA e 0,125 g/L de Amox. Para as misturas entre os polieletrólitos (GXT, PDDA, PLL, QPVP (50% ou 100%), BSA) e a Amox foram mantidas as concentrações de cada componente, como descrito acima. Os espectros de CD foram obtidos utilizando a velocidade de varredura de 50 nm/min, constante de tempo de 0,5 segundo e largura de banda de 1 nm, com o acúmulo de 4 espectros. Todo o instrumento, incluindo a câmara de amostra, foi constantemente purgado com gás N₂ durante as medidas. Foram coletadas oito varreduras para cada amostra.

3.5. Liberação do Amox a partir dos “patches” GXT e GXT/NPM/BSA

A liberação *in vitro* de Amox a partir dos “patches” GXT e GXT/NPM/BSA (~ 1 cm²) em função do tempo foi investigada por imersão em 10 mL de NaCl 0,02 e 0,2 mol/L, em pH 5,5 e (23 ± 1) °C, na ausência e presença de campo magnético externo (CME). Resumidamente, os ímãs de neodímio foram cuidadosamente posicionados abaixo dos frascos contendo os “patches” carregados e o meio, de modo que os ímãs estivessem alinhados com os “patches”. A cada cinco minutos, uma alíquota de 5 mL foi removida e substituída por 5 mL de tampão para completar o volume inicial. A absorbância de cada alíquota foi determinada a 271 nm num espectrofotômetro Beckmann Coulter DU650 e analisada com base na curva padrão medida para o Amox a 271 nm (Figura 13). A quantidade de Amox liberada foi normalizada pela massa da matriz polimérica seca.

(a)

(b)

Figura 13 – Curva padrão medida para Amox em 271 nm, no pH 5,5 e $(23 \pm 1) ^\circ\text{C}$. (a) em solução de NaCl 0,2 mol/L e (b) em solução de NaCl 0,02 mol/L.

3.6. Atividade antibacteriana

O meio de cultura contendo a bactéria concentrada de interesse (*E.coli* e *S. aureus*) foi descongelado. Em seguida, raspou-se um pouco desse meio com um

rastelo. O qual foi colocado no meio de cultura (placa de ágar). A raspagem foi feita em quadrantes com “*swab*” com o objetivo de obter colônias isoladas. O procedimento foi realizado próximo à chama do bico de Bunsen. As bactérias foram deixadas crescendo por 18 a 24 h. Posteriormente, sob fluxo laminar, utilizou um “*swab*” para coletar colônias isoladas das bactérias (*E.coli* e *S. aureus*), raspando seu conteúdo nas laterais de um tubo Falcon, previamente preenchido com solução de glicose 0,264 mol/L estéril. A solução de glicose pura foi utilizada como branco em uma cubeta de 1,5 mL e mediu-se a absorbância da suspensão de bactérias a 625 nm em outra cubeta de 1,5 mL. A absorbância entre 0,08 e 0,1 indicou uma concentração de aproximadamente 10^8 unidades formadoras de colônias por mL ou UFC/mL (escala de McFarland). Os “*patches*” foram expostos no UV por aproximadamente 15 minutos de cada lado como método de esterilização. Mergulhou-se um “*swab*” na suspensão padronizada de bactérias, espremendo um pouco na parede do tubo falcon para eliminar o excesso. Para preparar a placa de petri com ágar para a análise antimicrobiana, o “*swab*” foi passado em todo o contorno do ágar na placa de petri e posteriormente estriou em diferentes direções, a fim de obter um tapete de bactérias³⁸. Os “*patches*” foram depositados no meio de cultura de forma que ficaram bem aderidos, e permaneceram em estufa a 37°C por 24 h. Após esse tempo, foi observado e medido o halo de inibição de crescimento de bactéria ao redor dos filmes. Cada conjunto de experiências foi realizado em triplicado na ausência e na presença de ímãs de neodímio (diâmetro = 1,5 cm) posicionados por baixo da placa de cultura, exatamente no centro das placas, de modo a ficar o mais próximo possível dos “*patches*”.

4. Resultados e discussão

4.1. Adsorção de Amox em filmes finos

A Figura 14 mostra a espessura e imagem topográfica AFM de cada camada adsorvida, referentes aos sistemas Grupo I. A fim de obter informações sobre as interações entre Amox e PDDA, GXT, NPM e BSA, a espessura de cada camada depositada foi determinada logo após os processos de deposição, enxágue e secagem. Todas as deposições foram realizadas em $\text{pH } 5,5 \pm 0,1$, neste pH, o SiO_2 é carregado negativamente porque seu ponto isoelétrico é no pH 2; (ALVES JR.; BALDO, 2014) assim, a interação eletrostática levou a adsorção de PDDA à superfície de Si/SiO₂. A espessura média da camada de PDDA adsorvida nas lâminas de Si/SiO₂ foi determinada em 70 amostras como $1,0 \pm 0,4$ nm. As interações eletrostáticas também favoreceram a adsorção de GXT sobre a superfície de PDDA, porque em pH 5,5 os grupos ácidos da GXT estão desprotonados ($-\text{COO}^-$). A adsorção da GXT gerou camada com espessura média de $1,7 \pm 0,9$ nm. Os altos valores do desvio padrão revelaram que este método de deposição manual das camadas não corresponde a condição de equilíbrio, mas é uma estratégia fácil e rápida para criar multicamadas. (DECHER; SCHLENOFF, 2002). Além disso, ao adsorver, as cadeias de polieletrólito podem adotar diferentes conformações (alças, caudas e trens) na superfície. As superfícies de PDDA apresentaram baixa rugosidade média ($\text{rms} = 0,74 \pm 0,04$ nm), mas após a adsorção de GXT a rugosidade média aumentou ($\text{rms} = 2,2 \pm 0,4$ nm) devido ao arranjo fibroso das cadeias de GXT. A ramificação de GXT e a alta massa molar favorecem o arranjo de cadeias em redes fibrosas após adsorção. (DÁRIO et al., 2011).

Figura 14 – Visão geral da morfologia da superfície (imagens topográficas de AFM 1000 nm x 1000 nm) e valores médios de espessura obtidos após cada deposição nas lâminas de Si. Imagens indicadas com (A) possuem escala de 650 nm x 650 nm e (B) é a ampliação ótica da superfície indicada em (A). Valores do eixo Z e do RMS no APÊNDICE B Tabela B1.

A adsorção das NPMs na superfície do PDDA foi praticamente nula, isto porque as NPM possuem ponto isoelétrico em 6,5, (BUENO; PETRI, 2014) logo, em pH 5,5 as NPMs estão predominantemente carregadas positivamente, desta forma, são repelidos eletrostaticamente pela superfície de PDDA. Por outro lado, as NPMs são adsorvidas sobre a superfície de GXT, a qual está carregada negativamente. A adsorção de NPM sobre GXT gerou uma camada de espessura média de (28 ± 11) . Considerando que as NPMs apresentam em média (15 ± 3) nm de diâmetro médio, (BUENO et al., 2013) o valor médio da espessura pode corresponder as NPMs dispostas em uma ou duas camadas. No entanto, a distribuição das NPMs sobre a superfície de GXT não foi homogênea e agregados de NPMs apareceram em diferentes pontos da superfície.

Como o ponto isoelétrico da BSA está entre 4,7-4,9 (SEREFOLOU; OBERDISSE; STAIKOS, 2007) em pH 5,5, a BSA apresenta carga líquida negativa. A adsorção de BSA nos filmes de PDDA/GXT foi próxima de zero devido à repulsão eletrostática entre os resíduos de carga negativa da BSA e os grupos carboxílicos da GXT. Experimentos adicionais de adsorção foram realizados em pH 4, mas os grupos carboxílicos da GXT estão protonados e assim, a afinidade com a BSA carregada positivamente era muito fraca. Por outro lado, a BSA foi adsorvida nos filmes PDDA/GXT/NPM, produzindo uma camada de espessura média de $3,0 \pm 0,5$ nm. A imagem topográfica correspondente mostra poucos agregados distribuídos na superfície; no entanto, nas imagens topográficas de AFM não foi possível distinguir se os agregados são referentes as moléculas de BSA adsorvidas, ou se são referentes as NPM da camada irregular anterior. A adsorção de Amox em superfícies de BSA (filme PDDA/GXT/NPM/BSA) também foi bem-sucedida; a espessura média foi de $(0,7 \pm 0,2)$ nm. As interações entre Amox e BSA não foram consideradas interações eletrostáticas, pois não foi observada variação significativa de adsorção ao aumentar a força iônica do meio (20 mmol/L ou 200 mmol/L de NaCl).

As moléculas de Amox não foram adsorvidas sobre as camadas catiônicas de PDDA ou das NPMs. Em pH 5,5, os grupos carboxílicos da Amox deveriam interagir com as superfícies catiônicas, mas isso não foi observado. Por outro lado, as moléculas de Amox foram adsorvidas na superfície de GXT, com pequenos padrões (Figura 14 (B)), preenchendo os espaços na rede formada pela GXT e reduzindo os valores médios de rms de $(2,2 \pm 0,4)$ nm para $(1,09 \pm 0,06)$ nm (APÊNDICE B, Tabela B1). Os pequenos padrões podem ser resultados da formação de dímeros ou oligômeros de Amox no pH 5,5, com pouca ou nenhuma exposição de grupos carboxílicos, explicando a adsorção desfavorável nestas superfícies catiônicas. A espessura média da camada de Amox na superfície de GXT foi de $(1,4 \pm 0,6)$ nm. Após a adição de sal ao meio (10 mmol/L ou 100 mmol/L de NaCl), nenhuma adsorção de Amox foi observada na superfície de GXT, indicando que interações eletrostáticas são determinantes para a adsorção das moléculas de Amox na superfície de GXT. A atração das moléculas de Amox por superfícies negativamente carregadas também foi verificada nas lâminas de Si/SiO₂, que são carregadas negativamente em pH 5,5. As moléculas de Amox foram adsorvidas nas superfícies de Si/SiO₂, formando uma camada $(1,2 \pm 0,1)$ de espessura com pequenos anéis

interessantes, que podem ser resultados da formação de dímeros ou oligômeros formados pela Amox. A fim de investigar a presença de agregados de Amox em solução no pH 5,5, foram realizadas medições de espalhamento de luz dinâmico, com radiação laser a 632,8 nm. No entanto, durante as medições, pequenas bolhas apareceram na solução, a mesma mudou de incolor para amarelada, indicando degradação da Amox sob radiação laser. O mesmo problema foi enfrentado durante medições elipsométricas *in situ*; por esse motivo, todas as amostras foram analisadas por medições *ex situ*. A fim de melhor compreender as interações entre Amox e superfícies positivas, foram testados outros polycations com estrutura diferente do PDDA (Grupo II). Escolhemos o α PLL e o QPVP (50% e 100%) como polycations; nestes dois casos, a adsorção de Amox a partir de solução 2 g/L (pH 5,5) foi bem-sucedida. Sobre filmes de PLL, a adsorção de Amox foi determinada nas concentrações de 0, 10 e 100 mmol/L de NaCl no meio, obtendo espessuras médias de $(1,9 \pm 1,1)$ nm, $(1,3 \pm 0,2)$ nm e $(3,8 \pm 0,9)$ nm, respectivamente. O aumento de espessura média com o aumento da concentração de NaCl no meio indicou que as interações entre a Amox e a PLL não são eletrostáticas, ou seja, são interações de van der Waals e/ou dipolo-dipolo. A adsorção sobre os filmes de QPVP 50% e 100% foi testada na ausência de sal; os valores de espessura média obtidos foram $(0,9 \pm 0,2)$ nm e $(1,4 \pm 0,3)$ nm respectivamente. Os resultados indicaram aumento de adsorção com aumento da quaternização da QPVP. Esses resultados evidenciaram que a estrutura do polycation tem um papel relevante no processo de adsorção de Amox. Como mostra a Figura 15, somente o α PLL e QPVP tem cadeias laterais relativamente longas em sua estrutura. Comparando os sistemas α PLL e QPVP50% e 100%, na ausência de sal, a espessura média de Amox adsorvida foi maior sobre o α PLL. Possivelmente, a cadeia lateral pentila presente no QPVP pode diminuir a interação com moléculas de Amox por causa do aumento de hidrofobicidade na vizinhança do íon piridínio. (OLIVEIRA; MIRANDA; PETRI, 2012).

Figura 15 – Visão geral das morfologias das superfícies típicas e os valores médios de espessura após cada deposição. Todas as imagens topográficas AFM correspondem ao tamanho de varredura de 1 μ m x 1 μ m.

Na tabela 01 temos os valores de porcentagem de carbono (%C), nitrogênio (%N) e a razão carbono nitrogênio (%C/%N) para os filmes obtidos de α PLL/Amox e QPVP(50% e 100%)/Amox, a partir dos espectros de XPS. A razão %C/%N cai aproximadamente 33% após adsorção de Amox sobre o α PLL, em comparação com a razão %C/%N do filme de α PLL puro. Isso é devido à adsorção de Amox levar ao aumento da concentração de nitrogênio na superfície. Os filmes de QPVP 50% e 100% após adsorção de Amox foram analisados. Em ambos, os valores de razão %C/%N foram maiores do que aquele observado para Amox sobre α PLL, corroborando com a tendência dos valores de espessura média observada (Figura 15). Podemos observar também uma menor razão %C/%N no filme de QPVP50% quando comparado com o filme de QPVP100%. Este resultado pode ser atribuído ao

fato da quaternização da QPVP 50% ter sido a metade da quaternização do QPVP 100% ou seja, à menor quantidade de carbonos na cadeia.

Tabela 1 – Valores médios de %C e %N, bem como de %C/%N obtidos por XPS para medidas realizadas em três regiões diferente da mesma amostra.

Amostra	%C			%N			%C/%N		
αPLL	23	±	4	1,3	±	0,2	17	±	1
αPLL/Amox	23	±	1	2,05	±	0,03	11,2	±	0,6
Amox em pó	67	±	1	11,4	±	0,2	5,9	±	0,2
QPVP – C5 100%/ Amox	31	±	3	2,7	±	0,2	12	±	2
QPVP – C5 50%/ Amox	55	±	3	6,1	±	0,2	9,0	±	0,8

4.2. Interações entre os polieletrólitos e BSA com a Amox

Para avaliar melhor as interações entre os polieletrólitos (GXT, PDDA, α PLL, QPVP 50% e 100%), BSA e Amox em solução foram realizadas medidas de dicroísmo circular na ausência de sal. A BSA apresentou sinais negativos em 209 nm (transição $\pi - \pi^*$) e 221 nm (transição $n - \pi^*$), que são típicos da conformação α -hélice, (ANAND; MUKHERJEE, 2013), (figura 16b). A quiralidade e a presença de cromóforos na estrutura da molécula de Amox resultaram em um forte sinal CD negativo em 209 nm e um forte sinal positivo em espectros de 236 nm (figura 16). As

cadeias da GXT mostraram uma banda positiva fraca em aproximadamente 200 nm e uma banda negativa fraca em aproximadamente 220 nm, típica da conformação helicoidal de cadeias de GXT em solução. (BUENO; PETRI, 2014). A Figura 16d evidenciou mudanças substanciais nos espectros de CD obtidos para a mistura de BSA e Amox, ambos na concentração de 0,125 g/L, em comparação com os espectros de BSA pura ou Amox pura na mesma concentração. A estrutura secundária da BSA foi perdida e os sinais da Amox mudaram de posição e intensidade, indicando interação favorável entre elas. Os espectros de CD obtidos para as misturas de Amox (0,125 g/L) e GXT (2,5 g/L) na Figura 16f se assemelharam aos obtidos para o espectro da Amox pura (0,125 g/L), indicando ausência de interação entre eles.

Podemos observar nos espectros das figuras 16a e 16g os sinais característicos dos polímeros α PLL e QPVP (50% ou 100%) e Amox livre em solução (pH 5,5). No espectro da α PLL temos o sinal em 204 nm, referente a estrutura do novelo gaussiano que ela possui em soluções aquosas no pH 5,5. (GREENFIELD; FASMAN, 1969). Os polímeros PDDA e QPVP (independente do grau de quaternização) não são ativos no CD. Quando temos a mistura de α PLL com Amox (figura 16c) podemos observar primeiro uma mudança no sinal em 214 nm da Amox e também há o desaparecimento do sinal negativo em 204 nm referente ao novelo gaussiano da PLL, ou seja, a mistura da α PLL com Amox faz ambas perderem suas estruturas originais, indicando interação entre as mesmas. As figuras 16h e 16i são referentes às misturas de QPVP 50% ou QPVP 100% e Amox, respectivamente. Nas duas misturas foi possível observar a diminuição de intensidade do sinal em 214 nm, ou seja, o QPVP também interage com a Amox mudando a sua estrutura ordenada em solução. Os espectros correspondentes à mistura de Amox e PDDA (Figura 16e) são semelhantes ao de Amox pura, indicando que a presença de PDDA no meio não afeta a estrutura ordenada da Amox. Portanto, as mudanças de estrutura de Amox na presença de α PLL, BSA ou QPVP indicam afinidade entre eles em solução e corroboram com os ensaios de adsorção em filmes finos.

Figura 16 – Espectros de dicroísmo circular obtidos para (a) Amox, PDDA e α PLL puros, (b) Amox e PDDA puros e mistura de PDDA com Amox, (c) Amox e α PLL puros e mistura de α PLL com Amox, (d) QPVP 50% e 100% puros, (e) QPVP 50% e Amox puros e mistura de QPVP 50% com Amox (g) QPVP 100% e Amox puros e mistura de QPVP 100% com Amox.

4.3. Caracterização de “patches” baseados em GXT antes e depois da incorporação de Amox

Considerando as análises de filmes finos (Figura 14 e 15) ficou claro que entre todas as superfícies testadas, as lâminas de Si/SiO₂, bem como as superfícies de GXT (do filme PDDA/GXT) de BSA (do filme de PDDA/GXT/NPM/BSA), de α PLL (do filme α PLL/Amox) e de QPVP(50% ou 100%) (do filme QPVP(50% e 100%)/Amox) proporcionaram interações favoráveis com as moléculas de Amox. Os filmes de QPVP e α PLL foram utilizados apenas para compreender melhor as

interações entre superfícies positivas e a Amox. Outro ponto importante, é que a única condição que foi possível obter um sistema com NPMs (passível de ser estimulado magneticamente) foi o filme de GXT/NPM/BSA. Por essa razão, filmes de GXT/NPM/BSA foram escolhidos como sistemas para a preparação, incorporação e estudos de liberação de “*patches*” contendo Amox. Filmes de GXT foram utilizados para efeito de controle.

Os “*patches*” de GXT e GXT/NPM/BSA (aproximadamente 20 μm de espessura) foram caracterizados antes e depois da incorporação de Amox. O grau de intumescimento dos “*patches*” de GXT/NPM/BSA foi maior do que dos “*patches*” de GXT puro (Tabela 2), indicando que a presença de BSA aumentou a hidrofiliabilidade (APÊNDICE C, Figura C1). Os “*patches*” de GXT e GXT/NPM/BSA apresentaram boa transparência e aderência à pele (Tabela 2). A análise de ICP-OES para ferro indicou 0,2% em peso de Fe_3O_4 nos “*patches*” de GXT/NPM e a análise elementar de CHN para os “*patches*” de GXT/NPM/BSA indicou 1,5% em peso de BSA nas amostras. A análise de ICP-OES indicou $(7 \pm 1)\%$ de enxofre na Amox, o que corresponde a 81% de pureza. Dentro do limite de detecção do equipamento, o enxofre não pôde ser detectado nos “*patches*” de GXT e GXT/NPM/BSA. A porcentagem de enxofre, bem como os valores calculados com a equação 2 para os “*patches*” de GXT/Amox e GXT/NPM/BSA/Amox (Tabela 2) indicaram que a incorporação de Amox nos “*patches*” de GXT/NPM/BSA foi aproximadamente 50% maior do que nos “*patches*” de GXT puro, uma explicação possível é a interação mais favorável entre a Amox e a BSA do que entre a Amox e GXT. Considerando as análises de CD (figura 16f e 16d), a GXT não possui interação significativa com a Amox, diferente da BSA, e portanto, os espectros de CD na (Figura 16f e 16d) sustentam a hipótese sobre a forte interação entre Amox e a BSA, o que favoreceu uma maior incorporação de Amox nos “*patches*” de GXT/NPM/BSA, quando comparado com os “*patches*” puros de GXT (Tabela 2).

As concentrações inibitórias mínimas (MICs) determinadas para a Amox frente a *S. aureus* e *E. coli* são de 0,25-0,50 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ e de 2-8 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, respectivamente. (HAKANEN et al., 2002). Para os “*patches*” transdérmicos, é possível estimar a concentração de Amox no material seco, [Amox], a partir dos valores de Γ , da massa média de (3 ± 1) mg e do volume médio (área multiplicada pela espessura) de $(0,016 \pm 0,002)$ cm^3 determinado para os “*patches*” secos. Os

valores da [Amox] nos “*patches*” de GXT e de GXT/NPM/BSA (Tabela 2) são superiores das [Amox] das MICs reportadas para administração oral.

Tabela 2 – Caracterizações dos “*patches*” transdérmicos (GXT/Amox e GXT/NPM/BSA/Amox), onde GI é o grau de intumescimento (g de água por g de polímero), S% é a porcentagem de enxofre na amostra, Γ é a porcentagem de Amox no filme.

	GI (g/g)	S %	Γ (%)	[Amox] ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)	Transparência e adesão na pele
GXT/Amox	46 ± 14	0.38 ± 0.11	5.4 ± 1.5	10 ± 3
GXT/NPM/BSA/Amox	61 ± 12	0.64 ± 0.14	8.9 ± 2.0	17 ± 4

A Figura 17 mostra os espectros vibracionais de FTIR-ATR obtidos para Amox (c) e patches na faixa de 600 cm^{-1} a 2000 cm^{-1} . Nos espectros obtidos para os patches (a), (b), (d) e (e) podem ser observadas as bandas em 1720 cm^{-1} e 1602 cm^{-1} referentes aos estiramentos das ligações C=O dos grupos ácidos e ésteres presentes na GXT. (BUENO et al., 2015). A banda em 1519 cm^{-1} presente na Amox (figura 17 (c)) e nos patches (b) e (d) foi associado as vibrações N-H dos grupos amidas indicando a incorporação da Amox nos “*patches*”. Destaca-se que os espectros dos “*patches*” de GXT e de GXT/NPM/BSA não apresentaram bandas nessa região. A faixa complexa de 900 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} foi atribuída a diferentes modos vibracionais do anel glicosídico de GXT e das bandas fracas da Amox.

Figura 17 – Espectros de FTIR-ATR na faixa de 600 cm^{-1} a 2000 cm^{-1} obtidos para (a) “patches” de GXT/NPM/BSA puros (b) “patches” de GXT/NPM/BSA incorporados com Amox, (c) Amox pura, (d) “patches” de GXT incorporados com Amox e (e) “patches” de GXT puros.

A Figura 18 mostra as imagens de MEV obtidas para as superfícies de criofratura dos “patches” de GXT com e sem Amox e dos “patches” de GXT/NPM/BSA com e sem Amox. Todas as imagens indicaram as cadeias da GXT alinhadas no interior dos “patches”. Nenhuma mudança visível foi observada após a incorporação da Amox, NPMs ou BSA, provavelmente porque as cadeias de GXT colapsaram após a secagem dos “patches”.

Figura 18 – Imagens de MEV obtidas para as superfícies de crio-fratura das amostras dos filmes de GXT, GXT/Amox, GXT/NPM/BSA e GXT/NPM/BSA/Amox.

A estabilidade dos “*patches*” de GXT/NPM e GXT/NPM/BSA foi testada por imersão em solução de NaOH (pH 8,0) por uma hora. Após esse tempo as NPMs foram dessorvidas dos “*patches*”. Em pH superior a 6,5, as NPMs estão carregadas negativamente, porque seu ponto isoelétrico é pH 6,5. As cadeias de GXT também estão carregadas negativamente ($pK_a \sim 4,5$), assim, as NPMs são dessorvidas dos “*patches*” de GXT/NPM e GXT/NPM/BSA devido à repulsão eletrostática. Desta forma, a faixa de pH que os “*patches*” de GXT/NPM e GXT/NPM/BSA são estáveis é entre o pH 3,5 a 7,0.

4.4. Liberação controlada de Amox a partir dos “patches”

A Figura 19 mostra os perfis de liberação *in vitro* da Amox a partir dos “patches” de GXT e de GXT/NPM/BSA em função do tempo, em soluções de NaCl com as concentrações de 0,02 e 0,2 mol/L, em pH 5,5 e $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$, sob ausência e presença de um CME. A pele normal tem pH entre 4,5 e 6, (BEBU et al., 2011) e como a estabilidade dos “patches” de GXT incorporados com NPMs está na faixa de 3,5 a 7,0 o pH 5,5 foi escolhido para a liberação. A dependência da liberação do Amox com o tempo foi ajustada com a equação de Korsmeyers-Peppas :

(SIEPMANN; PEPPAS, 2012).

$$\log\left(\frac{m_t}{m_{eq}}\right) = \log k + n \log(t) \quad (5)$$

Onde m_t é a quantidade liberada no tempo “t”, m_{eq} é a quantidade liberada no equilíbrio, k é uma constante e “n” é o coeficiente difusional, que está relacionado à interação entre a droga e a matriz polimérica e descreve o mecanismo de liberação. Para $n = 0$, não existe interações entre o fármaco e o polímero; para $0 < n < 0,5$, as interações entre o fármaco e o polímero são fracas e a liberação obedece a um comportamento *quasi*-fickiano; para $n = 0,5$, as interações fármaco/fármaco são tão favoráveis quanto fármaco/polímero e a liberação tem comportamento Fickiano; para $0,5 < n < 1,0$, as interações entre fármaco e matriz polimérica são mecanismo de difusão forte e anômalo. Os valores de n obtidos para a liberação da Amox a partir dos “patches” variou de 0,1 a 0,2 indicando interações fracas entre a Amox e todas as matrizes poliméricas, apresentando um comportamento *quasi*-Fickiano (APÊNDICE D, Figura D1).

A dependência da liberação da Amox em função do tempo se ajustou bem ao comportamento assintótico (linhas sólidas), como mostrado na Figura 19. A quantidade de Amox liberada dos “patches” de GXT/NPM/BSA foi influenciada pela força iônica média e pela exposição ao campo magnético externo (CME) de 0,4 T.

Após 30 min, em baixa força iônica (0,02 mol/L NaCl), sob CME, a quantidade de Amox incorporada no “patch” foi completamente liberada, ou seja, aproximadamente 0,25 mmol/g “patch”, mas na ausência de um CME, a liberação foi de 0,13 mmol/g “patch”. A mesma tendência foi observada em alta força iônica (NaCl 0,2 mol/L); na presença e ausência de CME, a quantidade de Amox liberada foi de 0,17 mmol/g “patch” e 0,11 mmol/g “patch”, respectivamente.

Figura 19 – Perfis de liberação em pH 5,5 e (23 ± 1) °C de Amox (mmol/g “patch”) dos “patches” de GXT/NPM/BSA em (a) NaCl 0,02 mol/L, sob CME, (b) 0,2 mol/L NaCl, sob CME, (c) 0,02 mol/L de NaCl, sem CME, (d) 0,2 mol/L de NaCl, sem CME. Os correspondentes ajustes assintóticos são: (a) $y = 0.2482 - 0.098 (0.915)^x$, $R^2 = 0.9123$; (b) $y = 0.1656 - 0.060 (0.902)^x$, $R^2 = 0.9654$; (c) $y = 0.1335 - 0.045 (0.956)^x$, $R^2 = 0.9470$ and (d) $y = 0.1078 - 0.053 (0.892)^x$, $R^2 = 0.9258$. Perfis de liberação em pH 5,5 e (23 ± 1) °C de Amox (mmol/g “patch”) a partir dos “patches” de GXT puros em (e) NaCl 0,02 mol/L e (f) NaCl 0,2 mol/L, as linhas são apenas guias para os olhos.

O CME estimulou a liberação da Amox dos “*patches*” de GXT/NPM/BSA sob baixa e alta força iônica. A presença do CME promove a oscilação das NPM na direção do campo, causando vibrações mecânicas na matriz polimérica e, conseqüentemente, estimulando a liberação do fármaco. É o chamado efeito magneto-mecânico no domínio único das NPMs; sua relevância encontra lugar na atuação remota de liberação de drogas e de forças intermoleculares em sistemas biológicos. (GOLOVIN et al., 2015).

A fim de avaliar o efeito da BSA no comportamento de liberação da Amox, os perfis de liberação de Amox a partir de “*patches*” de GXT pura foram determinados na ausência do CME, a 0,02 mol/L e 0,2 mol/L NaCl, como mostrado na Figura 19, curvas (e) e (f), respectivamente. Em 0,02 mol/L de NaCl, a liberação da Amox dos “*patches*” de GXT foi de 0,10 mmol/g “*patch*” (curva e), menor do que observado nas amostras de GXT/NPM/BSA, que foi de 0,125 mmol/g “*patch*” (curva c). Em 0,2 mol/L de NaCl, a liberação da Amox dos “*patches*” de GXT e GXT/NPM/BSA foi de 0,04 mmol/g “*patch*” (curva f) e 0,11 mmol/g “*patch*” (curva d), respectivamente. Indicando que (i) o aumento da força iônica diminuiu a liberação da Amox dos “*patches*” para o meio, (ii) a liberação da Amox do “*patch*” de GXT foi mais rápida que do “*patch*” de GXT/NPM/BSA e (iii) em equilíbrio, a quantidade de Amox liberada do “*patch*” de GXT puro foi menor que do “*patch*” de GXT/NPM/BSA porque a incorporação de Amox do “*patch*” de GXT puro foi menor, como evidenciado pelos valores de Γ na Tabela 2. Logo, a camada de BSA nos “*patches*” levou a uma maior incorporação de Amox e a possibilidade de criar um sistema sensível a estímulos magnéticos.

4.5. Ensaios de dosamento microbiológico por difusão em ágar

As propriedades antimicrobianas dos “*patches*” de GXT/NPM/BSA incorporados com a Amox frente as bactérias *S. aureus* e *E. coli* foram avaliadas pelo método de difusão em ágar na ausência e na presença de um CME; “*patches*” puros foram usados como experimentos de controle (“*patches*” de GXT/NPM/BSA sem Amox). A Figura 20a mostra fotografias tiradas para os “*patches*” de GXT/NPM/BSA incorporadas com a Amox e os controles correspondentes, após 24

h de contato com *S. aureus* na ausência e na presença de um CME. A zona de inibição (ZI) foi medida como a distância entre o limite do filme e a zona inibida, indicada pelas barras vermelhas. (Os valores médios das ZI foram calculados sobre triplicatas). Nenhuma ZI foi observada nas placas de cultura contendo os “patches” de GXT/NPM/BSA (controle), como esperado. Após 24 h, todos os “patches” incorporados com Amox apresentaram um valor de ZI médio de 10 ± 1 mm, independentemente do tipo de bactéria ou da presença do CME. A Figura 20b apresenta as fotografias tiradas para os “patches” de GXT/NPM/BSA incorporadas com Amox e os controles correspondentes, após 24 h de contato com *E. coli* na ausência e na presença do CME. Nenhuma ZI foi observada nas placas de cultura contendo “patches” de GXT/NPM/BSA (controle). Após 24 h, a média da ZI medida para os “patches” carregados com Amox na ausência do CME foi de 4 ± 1 mm, enquanto que na presença do CME o valor médio da ZI foi de 9 ± 1 mm.

Na ausência do CME, a ZI observada para *E. coli* foi menor do que o determinado para ensaios com *S. Aureus*. O valor de MIC para *E. coli* é uma ordem de magnitude maior do que para *S. aureus*. (BEBU et al., 2011). Assim, a quantidade de Amox liberada necessária para inibir *E. coli* é maior do que a necessária para inibir *S. aureus*. No entanto, nos ensaios com os “patches” de GXT/NPM/BSA incorporados com Amox em presença do CME, a ZI observada para *E. coli* aumentou, alcançando um valor de ZI semelhante ao determinado para *S. aureus*. O aumento da ZI para *E. coli* sob CME demonstrou que o CME estimulou a liberação de Amox dos “patches” para o meio, corroborando com a liberação da Amox dos “patches” GXT/NPM/BSA com estímulo de CME observados nos experimentos *in vitro* (Figura 19).

Figura 20 – Halo de inibição após 24h de (a) *S. aureus* e (b) *E. coli* com e sem campo magnético, controle (GXT/NPM/BSA) “patch” com Amox (GXT/NPM/BSA/Amox).

	<i>(a) S. aureus</i>		<i>(b) E. coli</i>	
	Controle	“patch” com Amox	Controle	“patch” com Amox
Sem campo
Com campo

5. Conclusões

A Amox apresenta características únicas, assim o estudo de suas interações com polieletrólitos e proteínas é um campo promissor a ser estudado. Cada superfície apresentou peculiaridades quando houve a tentativa de adsorção de uma camada de Amox. As superfícies com carga positiva apresentaram diferenças interessantes, a Amox não adsorveu sobre as camadas de PDDA e NPMs. Porém Amox adsorveu sobre as camadas de α PLL e QPVP (50% ou 100%), esse efeito foi associado ao α PLL e o QPVP (50% ou 100%) possuírem carga na cadeia lateral. A Amox adsorveu sobre as superfícies negativas (SiO_2 , GXT e BSA) através de interações eletrostáticas.

O filme PDDA/GXT/NPM/BSA apresentou características interessantes, pois foi o único sistema sobre o qual houve adsorção de Amox. A presença de NPM permitiu elaborar um “patch” transdérmico e realizar o estudo da liberação de Amox através do estímulo de campo magnético externo. Particularmente em baixa força iônica, o sistema GXT/NPM/BSA/Amox sob estímulo magnético liberou cerca de 2,3 vezes mais Amox do que na ausência do campo magnético.

Os patches magnéticos apresentam um grande potencial para combater infecções bacterianas. Para as bactérias *S. aureus* (modelo gram positiva) e *E. coli* (modelo gram negativa), as diferenças entre os halos de inibição estão ligadas as estruturas das membranas. Os estudos indicaram que é possível obter aumento de inibição bacteriana através da liberação de antibióticos estimulada por campo magnético não invasivo.

6. Perspectivas futuras

Os resultados sobre as interações entre Amox e polications de diferentes estruturas mostraram que as interações entre Amox e o amônio quaternário depende da sua exposição ao longo da cadeia polimérica. No caso da α PLL a carga positiva está na ponta da cadeia lateral, enquanto que no caso do QPVP a carga está no anel piridínio, o qual sofre blindagem parcial pelo grupo lateral pentila. Novos QPVPs devem ser sintetizados com grupo lateral curto (metila ou etila) e comparado com α PLL. Cálculos teóricos podem ser ferramentas importantes para elucidar as questões sobre as interações entre os polications e a Amox. Também podemos vislumbrar com a possibilidade de combinar α PLL com Amox para reduzir a MIC o máximo possível. A redução da quantidade de antibiótico necessária para inibir a proliferação microbiana é importante como estratégia para reduzir os efeitos de resistência bacteriana. Para isso serão necessários estudos sistemáticos de determinação da MIC de diversas misturas de Amox com diferentes polications a fim de descobrir as condições para estabelecer interação sinérgica entre estes componentes.

Referências

ABRAHAN, E. P.; CHAIN, E.; FLETCHER, C. M.; GARDNER, A. D.; HEATLEY, N. G.; JENNINGS, M. A.; FLOREY, H. W. Further observations on penicillin. **The Lancet**, Londres, v. 238, n. 6155, p. 177-189, 1941.

AHMED, E. M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. **J. Adv. Research**, v. 6, n. 2, p. 105-121, 2015.

ALTINISIK, A.; YURDAKOC, K. Chitosan/poly(vinyl alcohol) hydrogels for amoxicillin release. **Polymer Bulletin**, v. 71, n. 3, p. 759-774, 2014.

ALVES JR. J. A.; BALDO, J. B. The Behavior of Zeta Potential of Silica Suspensions. **New Journal of Glass and Ceramics**, v. 4, n. 2, p. 29-37, 2014.

ANAND, U.; MUKHERJEE, S. Binding, unfolding and refolding dynamics of serum albumins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 12, p. 5394-5404, 2013.

AZZAM, R. M. A.; BASHARA, N. M. **Ellipsometry and Polarized Light**, 1 ed. Amsterdam, North Holland Publication, 1987, 539 p.

BEBU, A.; SZABÓ, L.; LEOPOLD, N.; BERINDEAN, C.; DAVID, L. IR, Raman, SERS and DFT study of amoxicillin. **Journal of Molecular Structure**, v. 993, n. 3, p. 52-56, 2011.

BLACHECHEN, L. S.; AMIM JR., J.; LINCOPAN, N.; PETRI, D. F. S. Carboxymethylcellulose acetate butyrate/poly(4-vinyl-N-pentyl pyridinium bromide) blends as antimicrobial coatings. **Express Polymer Letters**, v. 9, n. 9, p. 790-798, 2015.

BUENO, V. B.; PETRI, D.F.S. Xanthan hydrogel films: Molecular conformation, charge density and protein carriers. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, n. 30, p. 897-904, 2014.

BUENO, V. B.; SILVA, A. M.; BARBOSA, L. R. S.; CATALANI, L. H.; TEIXEIRA-NETO, E.; CORNEJO, D. R.; PETRI, D. F. S. Hybrid composites of xanthan and

magnetic nanoparticles for cellular uptake. **Chem. Commun.**, v. 49, n. 85, p. 9911-9913, 2013.

BUENO, V. B.; TAKAHASHI, S. H.; CATALANI, L. H.; TORRESI, S. I. C.; PETRI, D. F. S. Biocompatible xanthan/polypyrrole scaffolds for tissue engineering. **Mat. Sc. Eng. C**, v. 52, n. 1, p. 121-128, 2015.

CARMONA-RIBEIRO, A. M.; DE MELO CARRASCO, L. D. Cationic antimicrobial polymers and their assemblies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 9906-9946, 2013

CHAIN, E.; FLOREY H. W.; GARDNER, A. D.; HEATLEY, N. G.; JENNINGS, M. A.; ORR-EWING, J.; SANDERS A. G. Penicillin as a chemotherapeutic agent. **The Lancet**, Londres, v.236, n. 6104, p. 226-228, 1940.

DÁRIO, A. F.; HORTÊNCIO, L. M. A.; SIERAKOWSKI, M. R. J.; NETO, C.Q.; PETRI, D.F.S. The effect of calcium salts on the viscosity and adsorption behavior of xanthan. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 669-676, 2011.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 74, n. 3, p. 417-433, 2010. Disponível em: <<http://mmbr.asm.org/content/74/3/417.full.pdf&a=bi&pagenumber=1&w=100>>. Acesso em janeiro de 2018.

DEAKIN, M. R.; BUTTRY, D. A. Electro chemical applications of the Quartz Crystal Microbalance. **Analytical Chemistry**, v. 61 n. 20, p. 1147A-1153A, 1989.

DECHER, G.; HONG, J. D. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process, 1 consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles on charged surfaces. **Makromol. Chemie Macromol. Symposia**, v. 46, n. 1, p. 321-327 1991.

DECHER, G.; SCHLENOFF, J. B. **Multilayer Thin Films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials**, 1 ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. 2002.

DUMITRIU, S. **Polysaccharides**. 2 ed. Marcel Dekker, Inc. 2005.

EL KADI, N.; TAULIER N.; LE HUÉROU, J. Y.; GINDRE, M.; URBACH, W.; NWIGWE, I.; KAHN, P. C.; WAKS, M. Unfolding and Refolding of Bovine Serum Albumin at Acid pH: Ultrasound and Structural Studies. **Biophysical Journal**, v. 91, n. 9, p. 3397-3404, 2006.

FELIX, I. M. B.; MOREIRA, L. C.; CHIAVONE-FILHO, O.; MATTEDI, S. Solubility measurements of amoxicillin in mixtures of water and ethanol from 283.15 to 298.15 K. **Fluid Phase Equilibria**, 2016. Disponível em: < https://www.researchgate.net/publication/297591076_Solubility_measurements_of_amoxicillin_in_mixtures_of_water_and_ethanol_from_28315_to_29815_K>. Acesso em janeiro de 2018.

FLEMING, A. On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to their Use in the Isolation of B. influenzæ. **The british journal of experimental pathology**, v. 10, n. 3, p. 226-236, 1929.

GLASER, T.; BUENO, V. B.; CORNEJO, D. R.; PETRI, D. F. S.; ULRICH, H. Neuronal adhesion, proliferation and differentiation of embryonic stem cells on hybrid scaffolds made of xanthan and magnetite nanoparticles. **Biomed. Mat.**, v. 10, n. 4, p. 1-10, 2015.

GOLOVIN, Y. I.; GRIBANOVSKY, S. L.; GOLOVIN, D. Y.; KLYACHKO, N. L.; MAJOUGA, A. G.; MASTER, A. M.; SOKOLSKY, M.; KABANOV. A. V. Towards nanomedicines of the future: Remote magneto-mechanical actuation of nanomedicines by alternating magnetic fields. **J. Control Release**, v. 219, n. 10, p. 43-60, 2015.

GREENFIELD, N. J.; FASMAN, G.D. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. **Biochemistry**, v. 8, n. 10, p. 4108-4116, 1969.

GROTZKY, A.; MANAKA, Y.; FORNERA, S.; WILLEKE, M.; WALDE, P. Quantification of α -polylysine: a comparison of four UV/Vis spectrophotometric methods. **Anal. Methods**, v. 2, n. 10, p. 1448-1455, 2010.

GULREZ, S. K.; AL-ASSAF, S.; PHILLIPS, G. O. Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications. In: CARPI, A. **Progress in Molecular and Environmental Bioengineering**. 1 ed. InTech, 2011, p. 117-150.

HAKANEN, A.; HUOVINEN, P.; KOTILAINEN, P.; SIITONEN, A.; JOUSIMIES-SOMER, H. Quality Control Strains Used in Susceptibility Testing of *Campylobacter* spp. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 7, p. 2705-2706, 2002.

HAMES, B.; SCARLATA, C.; SLUITER, A. Determination of protein content in biomass, National Renewable Energy Laboratory, **Technical Report NREL/TP-510-42625**, 2008.

HIRAKI, J.; ICHIKAWA, T.; NINOMIYA, S.; SEKI, H.; UOHAMA, K.; SEKI, H.; UOHAMA, K.; SEKI, H.; KIMURA, S.; YANAGIMOTO, Y.; BARNETT, J. W. Use of ADME studies to confirm the safety of ϵ -polylysine as a preservative in food. **Reg. Tox. Pharm.**, v. 37, n. 2, p. 328-340, 2003.

ISAAC, M.; HOLVEY, C. Transdermal patches: the emerging mode of drug delivery system in psychiatry. **Therapeutic Advances in Psychopharmacology**, v. 2, n. 6, p. 255-263, 2012.

JANSSON, P. E.; KENNE, L.; LINDBERG, B. Structure of the extracellular polysaccharide from *xanthomonas campestris*. **Carbohydrate Research**, v. 45, n. 1, p. 275-282, 1975.

KAUR, S. P.; RAO, R.; NANDA, S. Amoxicillin: a broad spectrum antibiotic. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 11, p. 30-37, 2011.

KONDAVEETI, S.; CORNEJO, D. R.; PETRI, D. F. S. Alginate/magnetite hybrid beads for magnetically stimulated release of dopamine. **Coll. Surf. B: Biointerfaces**, v. 138, n. 1, p. 94-101, 2016.

KRAMARENKO, E. Y.; PHILIPPOVA, O. E.; KHOKHLOV, A. R. Polyelectrolyte networks as highly sensitive polymers. **Polym. Sci. Ser. C**, v. 48, n. 1, p. 1216-1240, 2006.

KULKARNI, R. V.; SA, B. Evaluation of pH-sensitivity and drug release characteristics of (polyacrylamide-grafted-xanthan)-carboxymethyl cellulose-based pH-sensitive interpenetrating network hydrogel beads. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 34, n. 12, p. 1406-1414, 2008.

LIU, H.; HU, Z.; LIU, H.; XIE, H.; LU, S.; WANG, Q.; ZHANG, J. Adsorption of amoxicillin by Mn-impregnated activated carbons: performance and mechanisms. **RSC Advances**, Londres, v. 6, n. 14, p. 11454-11460, 2016.

MCNAUGHT, A. D.; WILKINSON, A. IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2 ed. Blackwell Scientific Publications, 1997.

MELO, L. D.; PALOMBO, R. R.; PETRI, D. F. S.; BRUNS M.; PEREIRA, E. M. A.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Structure–Activity Relationship for Quaternary Ammonium Compounds Hybridized with Poly(methyl methacrylate). **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 3, n. 6, p. 1933-1939, 2011.

OLIVEIRA, A. M.; MIRANDA, P. B.; PETRI, D. F. S. Self-Assembly of Poly(4-vinyl-N-alkylpyridinium) Bromide onto Silica: Effect of Side-Chain Length on Structural Aspects at a Molecular Level. **J. Phys. Chem. C**; v. 116, n. 34, p. 18284-18291, 2012.

PALIK, E. D., **Handbook of Optical Constant of Solids**. 1 ed. Academic Press, London. 1985. 1906p.

PETRI, D. F. S. Xanthan gum: A versatile biopolymer for biomedical and technological applications. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 23, p. 42035-42048 2015.

PETRI Jr., W. A. Penicillins, Cephalosporins, and Other β -Lactam Antibiotics. In: BRUNTON, L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMAN, B. **Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 12 ed. San Diego. McGraw-Hill Education/Medical. 2011. p.1477 – 1493.

REDDY, N.; YANG, Y. Q. Citric acid cross-linking of starch films. **Food Chem.**, v. 118, n. 3, p. 702–711, 2010.

ROSALAM, S.; ENGLAND, R. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas comprestis* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 197-207, 2006.

SAHINER, N. Hydrogel nanonetworks with functional core–shell structure. **Eur. Polym. J.**, v. 43, n. 5, p. 1709-1717, 2007.

SANCHES, L. M.; PETRI, D. F. S.; CARRASCO, L. D. M.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. The antimicrobial activity of free and immobilized poly (diallyldimethylammonium) chloride in nanoparticles of poly (methylmethacrylate). **Journal of Nanobiotechnology**, v. 13, n. 58, p. 1-13, 2015.

SEREFOLU, E.; OBERDISSE, J.; STAIKOS G. Characterization of the Soluble Nanoparticles Formed through Coulombic Interaction of Bovine Serum Albumin with Anionic Graft Copolymers at Low pH. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 4, p. 1195-1199, 2007.

SHIMA, S.; MATSUOKA, H.; IWAMOTO, T.; SAKAI, H. Antimicrobial action of epsilon-poly-L-lysine. **The Journal of Antibiotics**, v. 37, n. 11, p. 1449-1455, 1984.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Adv. Drug Delivery Rev**, v. 64, p. 163-174, 2012.

SILVA, R. A.; URZÚA, M. D.; PETRI, D. F. S.; DUBIN, P. L. Protein Adsorption onto Polyelectrolyte Layers: Effects of Protein Hydrophobicity and Charge Anisotropy. **Langmuir**, v. 26, n. 17, p. 14032-14038, 2010.

TOUGAARD, S. Surface Analysis | x-ray Photoelectron Spectroscopy. **Encyclopedia of Analytical Science**, 2013.

YANG, C. Q.; XU, L.; LI, S.; JIANG, Y. Nonformaldehyde Durable Press Finishing of Cotton Fabrics by Combining Citric Acid with Polymers of Maleic Acid. **Textile Research Journal**, v. 68, n. 6, p. 457–464, 1998.

YANG, C. Q.; XU, Y.; WANG, D. FT-IR spectroscopy study of the polycarboxylic acids used for paper wet strength improvement. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 35, n. 11, p. 4037–4042, 1996.

YOSHIDA, T.; NAGASAWA, T. Epsilon-Poly-L-lysine: microbial production, biodegradation and application potential. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 62, n. 1, p. 21-26, 2003.

Apêndice

APÊNCICE A – Determinação da massa molar da GXT e do PDDA

Figura AP1. Determinação da massa molar média viscosimétrica (M_v) da GXT [a] e PDDA [b]. As soluções de GXT e PDDA foram preparadas em NaCl 0,1 mol/L e NaCl 1,0 mol/L, respectivamente. As medidas viscosimétricas das soluções de GXT e PDDA foram realizadas com equipamento automático AVS Schott 350, utilizando o viscosímetro Ubbelohde, a $25,0 \pm 0,1$ °C e $30,0 \pm 0,1$ °C, respectivamente. O aumento da viscosidade reduzida em função da concentração da solução de polímero determinada para GXT e PDDA é apresentado nas figuras AP1 (a) e (b), respectivamente. Os ajustes lineares forneceram os valores dos coeficientes lineares, que correspondem aos valores de viscosidade intrínseca, $[\eta]$, para GXT e PDDA como $(0,1627 \pm 0,094)$ L/g e $(0,0216 \pm 0,0026)$ L/g, respectivamente.

A equação empírica de Mark-Houwink-Sakurada para a GXT (TINLAND; RINAUDO, 1989). e PDDA (DAUTZENBERG; GORNITZ; JAEGER, 1998) são as seguintes:

$$\text{GXT: } [\eta] = 2.79 \times 10^{-3} (\text{mL/g}) M_v^{0.7846}$$

$$\text{PDDA: } [\eta] = 4.7 \times 10^{-3} (\text{mL/g}) M_v^{0.83}$$

A substituição dos valores de $[\eta]$ nas equações correspondentes, os valores M_v determinados para GXT e PDDA, foram de 1.187.602 g/mol e 25.787 g/mol, respectivamente.

TINLAND, B.; RINAUDO, M. Dependence of the stiffness of the xanthan chain on the external salt concentration. **Macromolecules**, v. 22, n. 4, p. 1863-1865, 1989.

DAUTZENBERG, H.; GORNITZ, E.; JAEGER, W. Synthesis and characterization of poly(diallyldimethylammonium chloride) in a broad range of molecular weight. **Macromol. Chem. Phys.**, v.199, n. 8, p. 1561-1571, 1998.

Figura A1 – Viscosidade reduzida em função da concentração da solução de polímero determinada para (a) GXT em NaCl 0,1 mol/L, a $25,0 \pm 0,1$ °C, e (b) PDDA em NaCl 1,0 mol/L, a $30,0 \pm 0,1$ °C.

APÊNCICE B – Valores de RMS e escalas do eixo Z dos AFM da figura 14

Tabela B1. Valores de Rms e escalas Z para cada imagem topográfica AFM apresentada na Figura 14. Todas as imagens topográficas de AFM correspondem ao tamanho de varredura de 1 μm x 1 μm , exceto aquelas marcadas por “+”, que são 650 nm x 650 nm.

	Z (nm)	Z* (nm)	rms (nm)	rms* (nm)
SiO₂/PDDA	1.4	-	0.74 $\pm$ 0.04	-
SiO₂/Amox	2.9	2.6	0.63 $\pm$ 0.14	0.53 $\pm$ 0.04
PDDA/XG	8.4	-	2.2 $\pm$ 0.44	-
PDDA/XG/Amox	4.5	3.9	1.09 $\pm$ 0.06	0.97 $\pm$ 0.13
PDDA/XG/MNP	150	-	-	-
PDDA/XG/MNP/BSA	8.0	-	-	-
PDDA/XG/MNP/BSA/Amox	1.6	1.5	0.53 $\pm$ 0.26	0.34 $\pm$ 0.07

APÊNDICE C – Curvas de sorção de água nos “patches”

Figura C1 – Curvas típicas de sorção de água determinadas para os patches de (a) GXT (duplicatas) e (b) GXT/NPM/BSA (duplicatas).

APÊNDICE D – Ajuste matemático da liberação de Amox dos “patches”

Figura D1. Dados experimentais do ajuste da liberação de Amox com o tempo (Figura 19) (ajustada com a equação de Korsmeyers-Peppas) (eq. 5).

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Pedro Vincius de Assis Bueno

Maringá, Paraná, Brasil, 18/11/1992

EDUCAÇÃO

2016

Mestrado em andamento em Química (Conceito CAPES 7).

Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Orientador: Denise Freitas Siqueira Petri.

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.

2011 - 2015

Graduação em Química (licenciado em Química).

Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringá, Paraná, Brasil.

2007 - 2009

Ensino Médio (2º grau).

Branca da Mota Fernandes C. E. - E. F. M., BMF, Maringá, Paraná, Brasil.

OCUPAÇÃO

Bolsista de Mestrado, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, outubro de 2016 – fevereiro de 2018

PUBLICAÇÕES

BUENO, P. V. A., HILAMATU, K. C. P., CARMONA-RIBEIRO, A. M., PETRI, D. F. S. Magnetically triggered release of amoxicillin from xanthan/Fe₃O₄/albumin patches. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 792-800, 2018.

FILHO, C. M. C.; **BUENO, P. V. A.**; MATSUSHITA, A. F. Y.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C.; DURÃES, L.; MURTINHO, D. M. B.; VALENTE, A. J. M. Synthesis, characterization and sorption studies of aromatic compounds by hydrogels of chitosan blended with β -cyclodextrin- and PVA-functionalized pectin. **RCS Advances**, v. 8, p. 14609-14622, 2018.

KONDAVEETI, S.; **BUENO, P. V. A.**; CARMONA-RIBEIRO, A. M.; ESPOSITO, F.; LINCOPAN, N.; SIERAKOWSKI, M. R.; PETRI, D. F. S. Microbicidal gentamicin-alginate hydrogels. **Carbohydrate Polymers**, v. 186, p. 159-167, 2018.

FACCHI, S. P.; SCARIOT, D. B.; **BUENO, P. V. A.**; SOUZA, P. R.; FIGUEIREDO, L. C.; FOLLMANN, H. D. M.; NUNES, C. S.; MONTEIRO, J. P.; BONAFÉ, E. G.; NAKAMURA, C. V.; MUNIZ, E. C.; MARTINS, A. F. Preparation and cytotoxicity of N-modified chitosan nanoparticles applied in curcumin delivery. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 87, p. 237-245, 2016.

BUENO, P. V. A.; SOUZA, P. R.; FOLLMANN, H. D. M.; PEREIRA, A. G. B.; MARTINS, A. F.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C. N,N-Dimethyl chitosan/heparin polyelectrolyte complex vehicle for efficient heparin delivery. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 186-191, 2015.

MARTINS, A. F.; **BUENO, P. V. A.**; ALMEIDA, E. A.; RODRIGUES, F. H.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C. Characterization of N-trimethyl chitosan/alginate complexes and curcumin release. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 57, p. 174-184, 2013.

MARTINS, A. F.; **BUENO, P. V. A.**; FOLLMANN, H. D.; NOCCHI, S. R.; NAKAMURA, C. V.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C. Synthesis, characterization, and cytotoxicity of TMC-graft-poly(vinyl alcohol) copolymers. **Carbohydrate Research**, v. 381, p. 153-160, 2012.