



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DE MATERIAIS

JULIE ANNE PEREIRA CAVALCANTE

**DESIGN DE SISTEMA BIOPOLIMÉRICO DE MEMBRANA DE CELULOSE
BACTERIANA E MICROAGULHA COM LIBERAÇÃO DE METOTREXATO PARA
APLICAÇÕES DERMATOLÓGICAS**

Recife

2023

JULIE ANNE PEREIRA CAVALCANTE

**DESIGN DE SISTEMA BIOPOLIMÉRICO DE MEMBRANA DE CELULOSE
BACTERIANA E MICROAGULHA COM LIBERAÇÃO DE METOTREXATO PARA
APLICAÇÕES DERMATOLÓGICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Materiais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências de Materiais. Área de concentração: Materiais não metálicos.

Orientador (a): Prof. Dr. Severino Alves Júnior

Coorientador (a): Profa. Dra. Glória Maria Vinhas

Recife

2023

Catálogo na fonte
Bibliotecário Josias Machado da Silva Junior, CRB4-1690

C376d Cavalcante, Julie Anne, Pereira.
Design de sistema biopolimérico de membrana de celulose bacteriana e microagulha com liberação de metotrexato para aplicações dermatológicas / Julie Anne Pereira Cavalcante. – 2023.
87 f.: il., fig., tab., abrev. e sigls.

Orientador: prof. Dr. Severino Alves Júnior.
Coorientadora: profa. Dra. Glória Maria Vinhas
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN, Ciência de Materiais, Recife, 2023.
Inclui referências.

1. Psoríase. 2. Transdérmica. 3. Carboximetilcelulose. 4. Celulose bacteriana. 5. microagulhas. I. Alves Júnior, Severino (orientador). II. Vinhas, Maria Glória (coorientadora). III. Título.

620.19 CDD (23. ed.) UFPE- CCEN 2024 - 33

JULIE ANNE PEREIRA CAVALCANTE

**DESIGN DE SISTEMA BIOPOLIMÉRICO DE MEMBRANA DE CELULOSE
BACTERIANA E MICROAGULHA COM LIBERAÇÃO DE METOTREXATO PARA
APLICAÇÕES DERMATOLÓGICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Ciência de Materiais.

Aprovada em: 28/03/2023

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Severino Alves Júnior (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof^a. Dr^a. Yêda Medeiros Bastos de Almeida (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof^o. Dr. Marcos Vinícius da Silva Paula (Examinador Externo)
Universidade Federal do Pará – UFPA

Dedico este trabalho aos meus pais, José Eudes e Geraldina, fontes inesgotáveis de amor e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo Seu amor e Sua bondade de me proporcionar saúde e coragem durante a realização deste trabalho. A Ele toda honra e Glória.

Aos meus pais, Geraldina Pereira Cavalcante e José Eudes Cavalcante Lima, por tanto amor e dedicação durante toda minha vida, por me ensinarem, através de exemplos, que o amor, o respeito e a compreensão são virtudes necessárias para nossa vida. Por serem meu maior exemplo do amor de Deus vivo e serem espelhos em que um dia espero reproduzir.

Ao meu orientador, Severino Alves Júnior, pela orientação e por todos os ensinamentos. À minha coorientadora, Glória Maria Vinhas, por ter conduzido o trabalho com paciência e dedicação. Pelos conselhos sábios, pelo incentivo e pelo carinho.

À minha amiga/irmã e mentora, Giovanna Nogueira, por ter me guiado com tamanha paciência, carinho e disponibilidade durante grande parte do processo de produção deste trabalho. Ao meu amigo e instrutor, José Yago, por todos os ensinamentos, pela disponibilidade e pelo grande suporte que me proporcionou neste trabalho.

Aos meus irmãos, Mary e Pablo, por todo amor e companheirismo de vida.

Aos meus colegas do Laboratório de Terras Raras (BSTR), pelo carinho, acolhida e aprendizados. Em especial a Alice Nunes, Indira Brito, Braulio Tostes, Fellype Diorgenes e Maria Lima. E, principalmente, ao meu amigo/irmão: Yuri Albuquerque, você foi essencial durante todo esse trajeto.

Aos meus colegas do Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos, pelo acolhimento e ensinamentos. Em especial aos meus amigos: Karina Carvalho, Ângela Maria e Felipe Trindade.

Aos meus amigos desde a graduação: Alessandra Sousa e Jonathan Torquato, vocês foram meu grande apoio em diversos momentos. E também aos amigos que fiz durante o mestrado: Max Taylo, Ewellyn Sousa, Nicheilly Pontes e Winnie Brandão, por todo auxílio e carinho proporcionado durante esse processo.

A Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), essencial no meu processo de formação pessoal e profissional, por tudo o que aprendi durante o mestrado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida, insumo necessário à pesquisa.

“Confie no Senhor de todo o seu coração e não se apoie em seu próprio entendimento.
Lembre-se de Deus em tudo o que fizer, e Ele lhe mostrará o caminho certo”.

Provérbios 3:5-6

RESUMO

Devido à complexidade das vias comuns de administração de medicamentos e ao alto custo de alguns tratamentos, algumas doenças dermatológicas são mais dificilmente erradicadas, como no caso da psoríase, que afeta milhões de pessoas em todo o mundo. Essa patologia segue diferentes terapias administradas via tópica, oral e parenteral. Entretanto, possuem problemáticas nas três formas. Assim, a administração via transdérmica de metotrexato, principal fármaco para psoríase e outras patologias, aumenta a eficácia. No tratamento via processo transdérmico é importante que se tenha uma matriz para incorporação do fármaco, bem como um agente para vencer a barreira córnea da pele. Por isso, o desenvolvimento de sistemas de liberação de medicamentos baseados em microagulhas com níveis prolongados de liberação controlada pode ser um caminho de melhor eficiência. Portanto, neste trabalho foi desenvolvido um sistema de entrega transdérmica de metotrexato (MTX) em matriz biopolimérica de membrana de celulose bacteriana (CB) com microagulhas (MA) de carboximetilcelulose, denominado CB/MTX/MA, para possível aplicação na área biomédica como adesivo de entrega transdérmica. Foram realizados ensaios de microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de infravermelho (FTIR), análise termogravimétrica (TGA), difração de raios X (XRD), ensaios de intumescimento, ensaios mecânicos, análise de citotoxicidade e ensaios de liberação do fármaco in vitro. O MTX foi eficientemente incorporado e liberado na matriz de CB, como confirmado por TGA, FTIR e pelo teste de liberação in vitro, no qual 73% do fármaco foi disponibilizado para o ambiente externo após 24 horas. A CB com MTX aumentou a cristalinidade em 19%, conforme observado por DRX. Além disso, a MEV mostrou que tanto constituintes morfológicos de CB como de MTX, na união de ambos. A análise citotóxica não revelou toxicidade para CB e a CB com MTX, que apresentaram uma viabilidade celular de cerca de 123% e 111%, respectivamente. Assim, de acordo com os resultados obtidos, o sistema foi considerado um biomaterial promissor para a liberação de metotrexato no tratamento da psoríase.

Palavras-chave: psoríase; transdérmica; metotrexato; carboximetilcelulose; celulose bacteriana; microagulhas.

ABSTRACT

Due to the complexity of the common routes of drug administration and the high cost of some treatments, some dermatological diseases are more difficult to eradicate, as in the case of psoriasis, which affects millions of people worldwide. This pathology follows different therapies administered topically, orally and parenterally. However, all three are problematic. Thus, the transdermal administration of methotrexate, the main drug for psoriasis and other pathologies, increases efficacy. When treating via the transdermal process, it is important to have a matrix for incorporating the drug, as well as an agent to overcome the skin's corneal barrier. For this reason, the development of drug delivery systems based on micro-needles with prolonged levels of controlled release could be a more efficient way forward. Therefore, this study developed a transdermal delivery system for methotrexate (MTX) in a biopolymeric matrix of bacterial cellulose membrane (BC) with carboxymethylcellulose micro-needles (MC), called BC/MTX/MA, for possible application in the biomedical field as a transdermal delivery adhesive. Scanning electron microscopy (SEM), infrared spectroscopy (FTIR), thermogravimetric analysis (TGA), X-ray diffraction (XRD), swelling tests, mechanical tests, cytotoxicity analysis and in vitro drug release tests were carried out. MTX was efficiently incorporated and released into the CB matrix, as confirmed by TGA, FTIR and the in vitro release test, in which 73% of the drug was made available to the external environment after 24 hours. CB with MTX increased crystallinity by 19%, as observed by XRD. In addition, SEM showed that both CB and MTX morphologically bound constituents. Cytotoxic analysis revealed no toxicity for CB and CB with MTX, which showed cell viability of around 123% and 111%, respectively. Thus, according to the results obtained, the system was considered a promising biomaterial for the release of methotrexate in the treatment of psoriasis.

Keywords: psoriasis; transdermal; methotrexate; carboxymethylcellulose; bacterial cellulose; microneedles.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------|--|----|
| Figura 1 – | Manifestações de psoríase na pele | 20 |
| Figura 2 – | Estrutura química do metotrexato | 23 |
| Figura 3 – | Estrutura química do ácido fólico | 23 |
| Figura 4 – | Representação geral dos níveis plasmáticos de um fármaco ao longo do tempo, em diferentes sistemas de liberação | 27 |
| Figura 5 – | Representação das diferentes camadas e subcamadas que constituem a pele humana | 28 |
| Figura 6 – | Fases da liberação transdérmica de fármacos | 29 |
| Figura 7 – | Mecanismo de ação de microagulhas | 32 |
| Figura 8 – | Diferentes tipos de microagulhas a) sólidas b) revestidas c) dissolvíveis d) ocas e) formadoras de hidrogel | 33 |
| Figura 9 – | Ilustração esquemática do processo de fabricação de MAs poliméricas por micromoldagem com PDMS | 36 |
| Figura 10 – | Fórmula química estrutural da celulose vegetal e bacteriana | 38 |
| Figura 11 – | Diferenças entre as micrografias de (a) celulose bacteriana e (b) celulose vegetal em ampliações de 10.0Kx | 38 |
| Figura 12 – | Metodologia de preparação de membrana de celulose bacteriana | 42 |
| Figura 13 – | Moldes positivos impressos 3D a) molde 1 b) molde 2 | 43 |
| Figura 14 – | Moldes negativos de PDMS a) molde menor b) molde maior | 45 |
| Figura 15 – | Metodologia de preparação de microagulhas (MAs) | 46 |
| Figura 16 – | Imagens das membranas de celulose bacteriana (CB) (a) após preparação (b) após purificação | 53 |
| Figura 17 – | Membranas de celulose bacteriana (CB) (a) seca em estufa após processo de trituração (b) triturada com MTX e seca | 54 |
| Figura 18 – | Adesivo CB/MTX/MA | 54 |
| Figura 19 – | Microagulhas (MA) de carboximetilcelulose | 55 |
| Figura 20 – | Micrografias eletrônicas de varredura da (a) CB com 1,66 Kx (b) CB/MTX com 1,22 Kx (c) CB com 4,26 Kx e (d) CB/MTX com 2,79 Kx | 56 |

| | |
|--|----|
| Figura 21 – Gráfico de taxa de intumescimento para CB, CB/MTX e MA e CB/MTX/MA e os respectivos desvios padrão. | 57 |
| Figura 22 – Termograma de (a) membrana pura de CB (b) microagulha (MA) (c) metotrexato (MTX) puro | 60 |
| Figura 23 – Termograma de (a) membrana com fármaco CB-MTX (b) sistema completo (CB-MTX-MA) | 61 |
| Figura 24 – Espectros FTIR da celulose (CB), microagulha (MA) e metotrexato (MTX) | 62 |
| Figura 25 – Espectros FTIR dos sistemas produzidos CB/MTX e CB/MTX/MA | 63 |
| Figura 26 – Difractogramas de membrana de celulose bacteriana pura (CB), metotrexato (MTX) e sistema de membrana de celulose com metotrexato (CB/MTX) | 66 |
| Figura 27 – Imagem microscópica de parafilm após inserção das microagulhas na primeira camada com ampliações de (a) 1,0x (b) 1,5x (c) 2,0x (d) 3,0x | 68 |
| Figura 28 – Parafilm após inserção das microagulhas com ampliações de 1,0x das camadas (a) segunda (b) terceira (c) quarta | 68 |
| Figura 29 – Microcanais criados em pele de porco (a) pele não tratada (b) pele tratada com microagulhas e corante vermelho do congo | 69 |
| Figura 30 – Viabilidade celular das células Vero nas membranas de celulose pura (CB pura) e com metotrexato (CB/MTX) | 70 |
| Figura 31 – Espectro de absorção do MTX em UV-Vis, concentração de 25 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, tampão fosfato monobásico 0,1 $\text{mol}.\text{L}^{-1}$, pH 7,4 | 72 |
| Figura 32 – Curva padrão de soluções de MTX, com concentrações de 0,2 e 2,2 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ | 72 |
| Figura 33 – Perfil de liberação do metotrexato no sistema CB/MTX/MA e seus respectivos desvios padrão | 73 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------|--|----|
| Tabela 1 – | Parâmetros dos moldes positivos impressos 3D | 43 |
| Tabela 2 – | Valores do grau de intumescimento para os materiais e seus respectivos desvios padrão | 58 |
| Tabela 3 – | Atribuições das bandas características no espectro de FTIR de CB/MTX | 64 |
| Tabela 4 – | Atribuições das bandas características no espectro de FTIR do sistema CB/MTX/MA | 65 |
| Tabela 5 – | Percentual de cristalinidade da membrana pura (CB), do MTX puro e da membrana com MTX (CB/MTX) | 66 |
| Tabela 6 – | Quantidade de MTX liberado em função do tempo e seus respectivos desvios padrão | 74 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC Ácido Cítrico

CB Celulose Bacteriana

CB/MTX Celulose bacteriana incorporada com metotrexato

CB/MTX/MA Sistema de celulose bacteriana incorporada com metotrexato e microagulhas

CM Celulose Microcristalina

CMC Carboximetilcelulose

DRX Difração de Raios-X

FDA *Food and Drug Administration*

FTIR Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

MAs Microagulhas

MEV Microscopia Eletrônica de Varredura

MO Microscopia Ótica

MTT Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

MTX Metotrexato

PDMS Polidimetilsiloxano

TGA Análise termogravimétrica

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 15 |
| 2 | OBJETIVOS | 18 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL | 18 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 18 |
| 3 | FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 19 |
| 3.1 | DOENÇAS DERMATOLÓGICAS E A PSORÍASE | 19 |
| 3.2 | METOTREXATO (MTX) | 22 |
| 3.3 | ADMINISTRAÇÃO DE MEDICAMENTOS PELA VIA TRANSDÉRMICA | 24 |
| 3.4 | MICROAGULHAS (MAS) | 31 |
| 3.4.1 | Impressão 3D para obtenção de moldes de microagulhas | 35 |
| 3.4.2 | Micromoldagem como processo de produção de MA | 36 |
| 3.5 | MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA (CB) | 37 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 41 |
| 4.1 | PREPARAÇÃO DE MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA | 41 |
| 4.1.1 | Inoculação e biossíntese das membranas | 41 |
| 4.1.2 | Purificação das membranas | 42 |
| 4.2 | PRODUÇÃO DE MICROAGULHAS POLIMÉRICAS | 42 |
| 4.2.1 | Produção de moldes positivos impressos 3D | 42 |
| 4.2.2 | Produção de moldes negativos de polidimetilsiloxano (PDMS) | 44 |
| 4.2.3 | Produção de microagulhas de carboximetilcelulose | 45 |
| 4.3 | INCORPORAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MTX | 46 |
| 4.3.1 | Incorporação de MTX em CB e adição de microagulhas | 46 |
| 4.3.2 | Quantificação de MTX | 47 |
| 5 | TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO | 48 |
| 5.1 | CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA COM MICROSCOPIA ÓTICA (MO) | 48 |
| 5.2 | MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) | 48 |
| 5.3 | AVALIAÇÃO DO INTUMESCIMENTO | 48 |
| 5.4 | ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA) | 49 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 5.5 | ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) | 49 |
| 5.6 | DIFRATOMETRIA DE RAIOS X (DRX) | 49 |
| 5.7 | TESTE MECÂNICO DE MICROAGULHAS | 50 |
| 5.8 | INSERÇÃO DE MICROAGULHAS NA PELE DE PORCO | 50 |
| 5.9 | ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE | 51 |
| 5.10 | DETERMINAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE MTX NA CB | 51 |
| 5.11 | LIBERAÇÃO IN VITRO DE MTX NA CB | 52 |
| 6 | RESULTADOS E DISCUSSÕES | 53 |
| 6.1 | ANÁLISE VISUAL DAS MEMBRANAS DE CB | 53 |
| 6.2 | CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA COM MICROSCOPIA ÓTICA (MO) | 55 |
| 6.3 | MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) | 55 |
| 6.4 | AVALIAÇÃO DO INTUMESCIMENTO | 57 |
| 6.5 | ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA) | 59 |
| 6.6 | ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) | 62 |
| 6.7 | DIFRATOMETRIA DE RAIOS X (DRX) | 65 |
| 6.8 | TESTE MECÂNICO DE MICROAGULHAS | 67 |
| 6.9 | INSERÇÃO DE MICROAGULHAS NA PELE DE PORCO | 69 |
| 6.10 | ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE | 70 |
| 6.11 | DETERMINAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE MTX NA CB | 71 |
| 6.12 | LIBERAÇÃO IN VITRO DE MTX NA CB | 73 |
| 7 | PERSPECTIVAS | 75 |
| 8 | CONCLUSÃO | 76 |
| | REFERÊNCIAS | 77 |

1 INTRODUÇÃO

A manifestação clínica de algumas patologias ocorre através da pele, podendo estar relacionada a problemas em outros órgãos ou da pele propriamente dita. Esses sinais, algumas vezes, são negligenciados, de modo que podem ser confundidos ou até mesmo ignorados, devido ao fato que uma parte da população acredita que esse tipo de sintoma seja apenas de caráter estético (AGOSTINHO et al., 2013). Logo, a situação clínica tende a piorar e possíveis agravamentos podem acontecer, ou seja, pode ocorrer o desenvolvimento de doenças malignas, como o câncer.

Dentre essas patologias pode-se destacar a psoríase, doença inflamatória crônica e autoimune que infere aos seus portadores inúmeras dificuldades, pelo fato de ter como principal característica a formação de manchas na pele, associada a uma variedade de doenças com comorbidades, incluindo artrite psoriática, doença inflamatória intestinal, distúrbios cardiovasculares, diabetes, infecção e outras (DU et al., 2019; SBD, 2021).

Diferentes formas de terapias são usadas no tratamento da psoríase, e geralmente, são usadas de forma simultânea. O uso de medicamentos via tópica é, geralmente, usado nos casos mais brandos, quando há pouca incidência de manchas na pele (SBD, 2021). No entanto, a administração tópica é dificultada pela fraca solubilidade aquosa do metotrexato (MTX), fármaco mais utilizado para psoríase, e pela penetração inadequada através do estrato córneo, que é a camada mais externa da epiderme (BONATTO, 2022).

Contudo, em casos mais graves, onde há maior incidência de sintomas, são utilizadas as vias oral e parenteral (SBD, 2021). Quando o metotrexato é administrado pela via oral, maneira mais comum, o primeiro sistema a ser atingido é o gastrointestinal, podendo refletir em desistência do tratamento pelo paciente, devido aos efeitos colaterais, conforme a bula do medicamento expõe, como estomatite ulcerativa, leucopenia, náusea, desconforto abdominal, fadiga, calafrios e febre, tontura (MORAES, 2018).

Com intuito de contornar os entraves supracitados, uma via alternativa de administração de medicamentos tem sido explorada, a via transdérmica. Consiste no transporte do fármaco através da pele, para melhorar a eficiência do tratamento, bem como reduzir o impacto sobre os tecidos e órgãos saudáveis, além de aumentar a

aderência dos indivíduos. De tal forma, é uma via ideal de administração de fármacos, dado que entrega a substância ao local alvo para absorção e pode ter ação a uma taxa controlada durante um período determinado, mantendo assim uma concentração constante do composto terapeuticamente ativo no sangue, com o mínimo de variações e com velocidades previsíveis de liberação, visando também diminuição de toxicidade (ITA, 2015; JEONG et al., 2021).

Para que ocorra a entrega transdérmica de compostos ativos, é preciso que a penetração da barreira externa da pele, o estrato córneo, seja efetuada, e isso é ainda mais difícil para substâncias de alta massa molecular. Diante disso, muitas substâncias são limitadas ao uso por esta via (GRATIERI; GELFUSO; LOPEZ, 2008). Por isso, é necessário um método para aumentar a eficiência da entrega (ITA, 2017; PARK et al., 2016).

Nesse sentido, as microagulhas (MAs) surgiram como uma tecnologia alternativa, não invasiva e eficaz para aplicações dermatológicas, além de usos com vacinas e cosméticos. São agulhas de escala micrométrica que permitem um desvio do estrato córneo e melhoram a permeação de moléculas na pele (FONSECA et al., 2021).

Outro biomaterial bem difundido na área médica é a celulose bacteriana (CB), que consiste em uma rede de fibras ultrafinas nanoestruturada, que permite seu uso como suporte macromolecular para a incorporação de diferentes biomoléculas. De tal forma que tem sido utilizado para fins cosméticos na forma de máscaras faciais, enriquecidos com compostos ativos, devido à sua peculiar estrutura porosa, bem como à capacidade de retenção de água, moldabilidade e boas propriedades mecânicas (AMORIM, 2020).

Como comentado, a administração direta do MTX por sistemas convencionais de administração de fármacos leva à diminuição da eficácia terapêutica devido à baixa solubilidade em água e meia-vida curta. Portanto, a incorporação do fármaco na matriz polimérica da celulose bacteriana é uma forma eficaz de aumentar sua meia-vida e aumentar sua eficácia terapêutica para aplicação em tratamentos antipsoriáticos (DHANKA; SHETTY; SRIVASTAVA, 2018).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho é combinar as características de ambos os biomateriais em um sistema de microagulhas (MA) e CB como camada

posterior que suporta mecanicamente a matriz de MA e permite a incorporação de ingredientes ativos. A CB possibilitará a liberação de moléculas bioativas, nesse caso, o MTX, pelos microcanais criados pelas agulhas. Portanto, espera-se que a combinação da capacidade de reforço da MA e peculiar estrutura porosa 3D das membranas de celulose, na forma de adesivos para aplicação dérmica, crie uma ferramenta multifuncional para o tratamento da psoríase, e futuramente de outras patologias com outras substâncias incorporadas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um sistema adesivo transdérmico de Celulose Bacteriana (CB) com microagulhas (MA) de carboximetilcelulose (CMC), para liberação controlada de metotrexato (MTX), visando o tratamento de doenças dermatológicas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar membranas de celulose bacteriana em sistema estático;
- Elaborar um sistema de celulose com fármaco e microagulhas (CB/MTX/MA)
- Produzir moldes positivos de MA por impressão 3D;
- Elaborar moldes negativos de MA por micromoldagem;
- Desenvolver microagulhas poliméricas de CMC;
- Avaliar a presença de MTX na membrana;
- Analisar a morfologia da membrana com e sem MTX, pela Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);
- Investigar as propriedades mecânicas das microagulhas com inserção de pele *in vitro*;
- Verificar a liberação *in vitro* do fármaco no sistema CB/MTX/MA;
- Estudar o efeito da citotoxicidade *in vitro* do sistema CB/MTX/MA.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 DOENÇAS DERMATOLÓGICAS E A PSORÍASE

O maior órgão do corpo humano é a pele, que forma uma barreira entre os órgãos e o meio externo. É um órgão complexo, constituído por cerca de cinco tipos diferentes de células estruturais e ainda outras células provenientes da circulação sistêmica e do sistema imune. Tem notória importância, pois protege o corpo contra lesões ambientais, auxilia na regulação da temperatura corpórea e facilita a síntese de vitamina D. Através da pele pode-se identificar algumas patologias, pois manifestações clínicas que surgem nela podem ser relacionadas a doenças dermatológicas ou representar os primeiros sinais de outras doenças, ou até mesmo manifestações tardias de outras patologias, como câncer em níveis mais avançados (AGOSTINHO et al., 2013; JOHNER; FERNANDO; NETO, 2021; SPDV, 2023).

Muitas doenças dermatológicas são dificilmente tratadas, para alguns, elas apresentam apenas importância estética e atrelado a esse estereótipo está o alto custo de tratamentos, que dificulta ainda mais o acesso. Porém, essas doenças causam efeitos muito sérios tanto em aspectos sociais e psicológicos do indivíduo acometido, como na possível evolução do quadro patológico, vindo a aumentar o grau de risco da doença (AGOSTINHO et al., 2013).

Dentre as doenças de pele, a psoríase, é uma doença crônica, não contagiosa, caracterizada pela presença de manchas róseas ou avermelhadas recobertas por escamas esbranquiçadas. Conforme a literatura é uma doença cutânea comum, inflamatória, crônica, não contagiosa e considerada autoimune. Possui predisposição genética, porém fatores como ambiente e de comportamento podem estar relacionados, pois apresenta sintomas que desaparecem e reaparecem periodicamente (KAMIYA et al., 2019; RENDON; SCHÄKEL, 2019).

A psoríase afeta cerca de 125 milhões de pessoas em todo o mundo e cerca de 2 a 4% da população nos países ocidentais. Acomete homens e mulheres igualmente, variando de 0,91 a 8,5% de prevalência global, e em crianças de 0 a 2,1%, dependendo do local (BONATTO, 2022). Apesar de não ser contagiosa e apresentar baixa taxa de mortalidade, os pacientes com psoríase exibem um prejuízo significativo na qualidade de vida e uma carga psicossocial muito pesada, de modo que 73,4% dos

pacientes brasileiros com psoríase moderada a grave referem comprometimento da qualidade de vida relacionada à saúde (SBD, 2021; ZHOU et al., 2022).

A Sociedade Brasileira de Dermatologia aponta que a psoríase se desenvolve quando os linfócitos T (células responsáveis pela defesa do organismo) liberam substâncias inflamatórias que promovem dilatação dos vasos sanguíneos e dirigem outras células do sistema de defesa para pele, como neutrófilos. Este processo de ataque inflamatório à pele estimula uma rápida proliferação celular que resulta na descamação observada nas lesões (Figura 1). Normalmente, esse ciclo só pode ser encerrado com o tratamento adequado (SBD, 2021).

A psoríase tem diferentes tipos de variantes e a forma mais comum possui 70% dos casos, e recebe o nome de psoríase vulgar ou psoríase em placas (BONATTO, 2022). É caracterizada por manchas ou placas eritematosas escamosas na pele, como pode ser observado na Figura 1, com incidência maior em áreas intertriginosas, como dobras do pescoço, axilas, região da virilha e embaixo das mamas, ou seja, áreas em que ocorre superposição de pele (ARMSTRONG; READ, 2020; ZHOU et al., 2022). As outras formas são denominadas como psoríase gutata, psoríase pustular, psoríase invertida, psoríase eritrodérmica e psoríase palmoplantar (BONATTO, 2022).

Figura 1 – Manifestações de psoríase na pele.



Fonte: SBD (2021).

O tratamento da psoríase é individualizado, visto que deve estar relacionado a cada tipo e ao nível de gravidade da doença, uma gama de opções terapêuticas está disponível, sendo possível viver com uma pele sem ou quase sem lesões, independentemente da gravidade da psoríase (SBD, 2021). As opções terapêuticas para a psoríase incluem terapia tópica, fototerapia ou tratamento sistêmico (com medicamentos por via oral e/ou parenteral) (RAHARJA; MAHIL; BARKER, 2021). Os

medicamentos tópicos são aplicados diretamente nas lesões, tanto em casos mais graves como em casos mais leves. Já a fototerapia é utilizada em formas graves ou moderadas, quando o tratamento tópico não apresentar resultados. O tratamento sistêmico, geralmente, é utilizado em casos de psoríase moderada a grave. Vale ressaltar que, a presença de comorbidades também é altamente relevante na seleção do tratamento (RENDON; SCHÄKEL, 2019; SILVA; VEIGA, 2022).

Entretanto, as abordagens de tratamento supracitadas possuem diversas desvantagens, desde o alto custo de todo o tratamento, até dificuldades específicas em cada método (MAYA-RICO et al., 2021). Devido ao comprometimento multissistêmico, pois a doença atinge diferentes sistemas do corpo humano, como o imunológico e o cardiovascular (SBD, 2021), os custos para o sistema de saúde e para os pacientes, é relativamente alto, já que a doença ou as suas complicações e interações podem ser prolongadas (MAYA-RICO et al., 2021).

As administrações medicamentosas pelas vias comuns apresentam desvantagens, como na via tópica, em que o veículo apresenta natureza pegajosa e oleosa, bem como a baixa permeabilidade da pele e a retenção de baixa a nula da formulação do medicamento na pele com roupas. Já pela via oral, tem-se a falta de liberação controlada de longo prazo, e juntamente com o metabolismo hepático de primeira passagem, há a perda da biodisponibilidade do fármaco, sendo necessário aumentar a frequência de administração dos medicamentos, que pode levar a possíveis efeitos hepatóxicos e distúrbios gastrointestinais. E pela via parenteral, há possibilidades de reações no local da injeção, infecções, pacientes com fobia a agulha, dor e a necessidade de um profissional de saúde para administrar o medicamento (GOWDA et al., 2023).

A primeira linha de tratamento para a psoríase considerada leve a moderada, quando a área de superfície corporal afetada é de 3 a 5%, é a terapia tópica e os principais agentes terapêuticos usados são os inibidores de calcineurina, corticosteróides, queratolíticos, análogos da vitamina D, ditranol, alcatrão de hulha, etc., os quais são aplicados na pele afetada por meio de formulações convencionais, como gel, pomada, creme, loção, sabonete, xampu, fita adesiva, spray e óleo (GOWDA et al., 2023).

A segunda escolha de tratamento na psoríase leve a moderada é a fototerapia, e às vezes é considerada o tratamento de primeira linha na psoríase moderada a grave devido à sua acessibilidade. Tem como princípio o uso de raios ultravioleta (UV), que causa apoptose de células T e queratinócitos na epiderme para diminuir a formação de lesões na pele (ARMSTRONG; READ, 2020). Para a psoríase moderada a grave, considerada quando a doença atinge mais de 10% da superfície do corpo, a terapia sistêmica é altamente usada, através da administração de agentes antipsoriáticos por via oral ou parenteral, com intuito de atingir a circulação sistêmica e ocorra uma terapia eficaz da psoríase (GOWDA et al., 2023). Em casos muito graves de psoríase, recomenda-se, o uso simultâneo de todas as três terapias, tópica, sistêmica e fototerapia, para uma recuperação eficiente (ARMSTRONG; READ, 2020).

3.2 METOTREXATO (MTX)

O metotrexato (MTX) está listado como uma das primeiras opções em múltiplas diretrizes de tratamento para psoríase moderada a grave, e tem sido amplamente utilizado através de injeção e vias orais durante muitas décadas (GOWDA et al., 2023). Em doses elevadas, o MTX é amplamente utilizado para o tratamento de algumas doenças malignas, como leucemia linfocítica aguda infantil, osteossarcoma, câncer de pulmão e câncer de mama. E em baixas doses, para o tratamento de doenças autoimunes, como artrite reumatoide, psoríase e lúpus (PRASAD; KOUL, 2012; WANG; YAN, 2017).

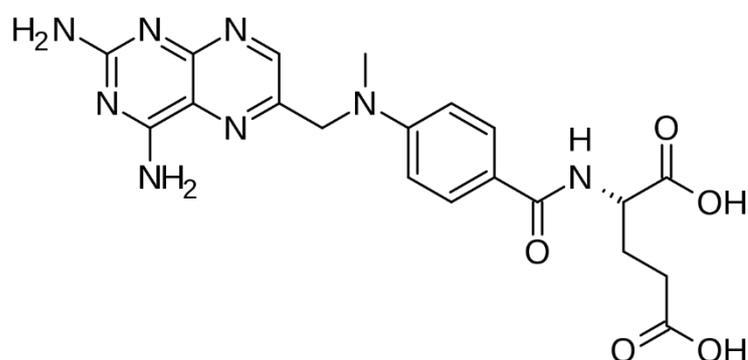
O MTX é caracterizado como um pó amarelado, de massa molecular 454,44 g/mol e quimicamente constituído por uma porção heterocíclica (anel pterínico 2,4-diaminossustituído) ligada à porção ρ -aminobenzoil que está ligada à unidade de ácido glutâmico (Figura 2). É classificado como classe III no Sistema de Classificação Biofarmacêutica, ou seja, apresenta baixa solubilidade e baixa permeabilidade, característica que limita sua administração oral, no tratamento de patologias como o câncer colônico (BONI, 2017).

MTX é um fármaco antineoplásico, antimetabólito e antifolato, ou seja, atua bloqueando a resposta produzida pelo ácido fólico, e isso faz com que o tratamento necessite de suplementação, para evitar que os pacientes apresentem problemas estomacais como náuseas e dor abdominal, problemas hepáticos e problemas com produção de células sanguíneas (GARCIA, 2014; WANG; YAN, 2017). Ainda, interfere

na formação de DNA, RNA e proteínas. Possui meia vida curta, é pouco solúvel em água, álcool, éter e clorofórmio, o que compromete sua biodisponibilidade (GARCIA, 2014). Pode ser administrado clinicamente por diferentes vias, como as vias de administração oral, intravenosa, subcutânea e/ou intramuscular (MURAKAMI; MORI, 2012). Porém, a eficácia clínica do MTX pode ser comprometida devido a efeitos colaterais tóxicos relacionados à dose, meia-vida curta na corrente sanguínea e baixa biodisponibilidade devido à sua solubilidade em água reduzida (WANG; YAN, 2017).

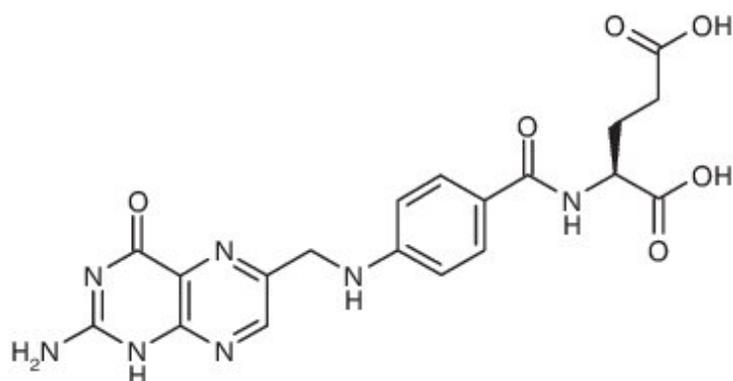
O metotrexato tem estrutura química (Figura 2) semelhante ao ácido fólico (Figura 3), e assim é um medicamento antifolato. Contém um ácido glutâmico e, portanto, possui dois grupos carboxilatos com pKa 4,8 e 5,5 em sua estrutura química. Em um pH fisiológico, o MTX é ionizado e hidrofílico. O MTX não penetra bem nas biomembranas lipóides por difusão passiva, mas penetra pelo sistema de transporte mediado por carreadores. Em um pH baixo, o MTX está na forma não ionizada e pouco solúvel (MURAKAMI; MORI, 2012).

Figura 2 - Estrutura química do metotrexato.



Fonte: Adaptado de Murakami e Mori (2012)

Figura 3 - Estrutura química do ácido fólico.



Fonte: Adaptado de Rubert et al. (2017).

O MTX, tendo uma estrutura química semelhante ao ácido fólico, é um composto hidrofóbico. De modo que, a eficácia clínica do MTX é frequentemente comprometida por efeitos colaterais tóxicos relacionados à dose, meia-vida curta na corrente sanguínea e baixa biodisponibilidade devido à sua baixa solubilidade em água e permeabilidade (WANG; YAN, 2017).

No tratamento de doenças autoimunes o MTX é, geralmente, administrado por via oral em nível de “mg” semanalmente e para doenças malignas, como usa-se altas doses, é administrado por via parenteral. Os valores de AUC (área sob a curva, que corresponde a integral definida da concentração de um fármaco no plasma sanguíneo em função do tempo) do MTX não diferem entre as administrações intramuscular e oral, indicando biodisponibilidade semelhante após essas vias de administração (MURAKAMI; MORI, 2012).

Apesar das desvantagens apontadas, o MTX mostra um notável efeito antipsoriásico e é mais rentável do que outras terapias. Portanto, é necessário proporcionar uma via segura e fácil para os indivíduos acometidos por psoríase para administração de MTX, justamente para evitar as desvantagens que as vias comuns de administração apresentam. Por isso, a comunidade científica tem trabalhado para o desenvolvimento de novos sistemas de administração de fármacos com menos desvantagens e custos reduzidos, principalmente, através do uso da via transdérmica de administração de fármacos (GOWDA et al., 2023).

3.3 ADMINISTRAÇÃO DE MEDICAMENTOS PELA VIA TRANSDÉRMICA

Uma propriedade importante em relação a administração de medicamentos é a absorção, a qual consiste na transferência de um fármaco do seu local de administração para a corrente sanguínea. De modo que, a velocidade e a eficiência da absorção dependem do ambiente onde o fármaco é absorvido, das suas características químicas e da via de administração, o que influencia sua biodisponibilidade. As vantagens e desvantagens das vias de administração são :

- Oral: via de administração mais segura, mais comum, conveniente e econômica. Porém, a absorção é limitada, uma vez que ocorre biotransformação de fármacos antes da absorção e a redução de biodisponibilidade pelo metabolismo de primeira passagem;

- Intravenosa: possui efeitos imediatos; é adequada para substâncias irritantes e misturas complexas; é ideal para fármacos proteicos de alta massa molecular;
- Subcutânea: adequada para fármacos de liberação lenta. Porém, possibilidade de dor e necrose dependendo do fármaco e inadequada para fármacos administrados em volumes elevados;
- Intramuscular: adequada para veículos oleosos e certas substâncias irritantes. Mas, pode ser dolorosa e pode causar hemorragia intramuscular;
- Transdérmica: Evita o efeito de primeira passagem, indolor. Porém, pode causar alergia aos adesivos e é limitado a fármacos que podem ser tomados em doses pequenas diárias;
- Retal: evita parcialmente o efeito de primeira passagem e a destruição pela acidez gástrica. Porém, o fármaco pode irritar a mucosa retal e não é uma via muito bem aceita pelos pacientes;
- Inalatória: absorção rápida, pode ter efeitos imediatos, eficaz para pacientes com problemas respiratórios, mas podem ter efeitos adversos sistêmicos;
- Sublingual: evita o efeito de primeira passagem e a destruição pela acidez gástrica, mantém a estabilidade do medicamento, porque a saliva tem pH relativamente neutro e pode causar efeitos farmacológicos imediatos. Mas, essa via é limitada, pelo fato de poder perder parte do fármaco caso deglutido.

Os sistemas de liberação de fármacos foram desenvolvidos para vias tradicionais de administração, como enteral e parenteral. Entretanto, a utilização de rotas consideradas não convencionais é importante, como nasal, ocular, pulmonar, vaginal, retal e transdérmica (WU, 2004).

A administração de medicamentos via transdérmica foi inicialmente desenvolvida como forma de superar as desvantagens que a via enteral, que recebe a substância via trato digestivo, ou seja, de forma oral; e parenteral, que recebe por meio de injeções, como intradérmica, intramuscular, intravenosa e subcutânea (ZHANG et al., 2021). A via oral tem como inconveniente a necessidade de passar pelo metabolismo hepático de primeira passagem, que reduz a atividade do composto ativo, a ocorrência da degradação da droga no trato gastrointestinal, a possibilidade de toxicidade do paciente, além do inconveniente fato que o baixo pH do estômago inativa alguns fármacos. Já a via parenteral, possui a questão da possibilidade de dor e outros fatores que podem implicar em baixa adesão dos pacientes, principalmente

em tratamentos de uso contínuo de medicamentos (HONG et al., 2018; ZHANG et al., 2021).

A administração de medicamentos pela via transdérmica tem como objetivo melhorar a eficiência do tratamento, manter um nível estável da droga no plasma sanguíneo, entregar as substâncias químicas ou biológicas através da pele para a circulação sanguínea a uma taxa fixa, além de ampliar a aderência aos tratamentos clínicos para pessoas com dificuldades gástricas, crianças e pessoas com outros tipos de necessidades especiais (ZHANG et al., 2021).

O primeiro sistema de liberação transdérmica de fármacos foi desenvolvido em 1979, nos Estados Unidos, e consistia em um adesivo, em inglês *patch*, à base de escopolamina, denominado *Transderm-Scop*® (DIAS, 2013). Em seguida veio o *Transderm-Nitro*®, à base de nitroglicerina, e assim outros sistemas foram desenvolvidos durante a década de 90, com diferentes princípios ativos incorporados, como: *Estraderm*®, com estradiol; *Duragesic*®, com fentanil; *Testoderm*®, com testosterona; *Deponit*®, também com nitroglicerina; além de adesivos transdérmicos com nicotina (ENGELHARDT, 2015; LARRAÑETA et al., 2016; PRAUSNITZ; LANGER, 2008).

Esses sistemas de adesivos de administração de fármacos foram muito difundidos, justamente por apresentarem inúmeras vantagens, como evitar o metabolismo hepático de primeira passagem e assim aumentar a sua biodisponibilidade, reduzir efeitos colaterais indesejáveis no estômago; aplicação de forma indolor; alta adesão dos pacientes devido a fácil administração efetuada pelos mesmos e não por terceiros; baixo risco de infecções e concentração plasmática constante, dentro da faixa terapêutica, sem passar por níveis tóxicos ou subterapêuticos (JUNG et al., 2020).

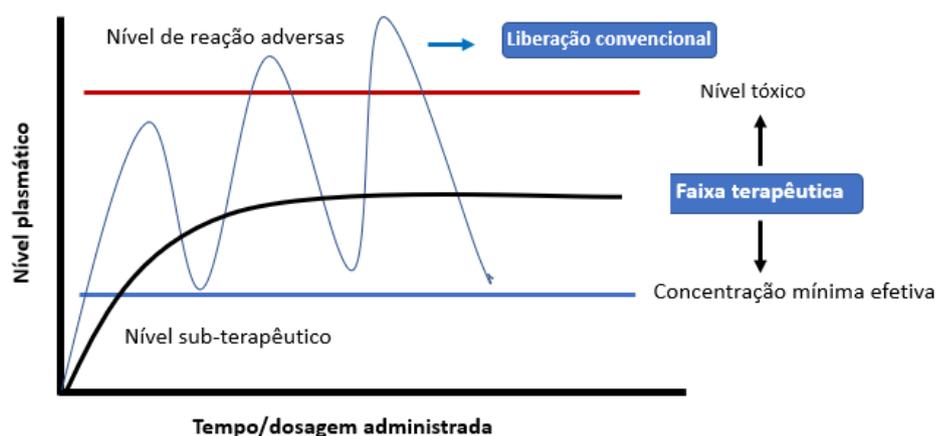
O desenvolvimento dos sistemas adesivos para administração transdérmica de fármacos exige requisitos próprios, seguindo-se os ideais: perfis farmacocinético e farmacodinâmico que permitam uma liberação constante de fármaco e por um período prolongado; prazo de validade até 2 anos, tamanho do adesivo de 40 cm², frequência de administração, geralmente, semanal e bom aspecto visual, preferencialmente de cor branca, bege ou transparente, fácil remoção, e não irritante (DIAS, 2013).

Além das vantagens citadas, o objetivo principal dos sistemas de liberação controlada, comumente chamados de *drug delivery systems*, é manter uma concentração constante do medicamento na corrente sanguínea (SOUSA et al., 2020).

Tendo em vista que, pelas formas tradicionais de administração, a liberação do medicamento, apresenta um aumento na corrente sanguínea, atinge um pico máximo e então declina (Figura 4). Enquanto na liberação controlada, como na via transdérmica, o fármaco se mantém na faixa de ação terapêutica, sem passar pelo nível tóxico, que se for atingido pode causar efeitos colaterais e danos severos a saúde do paciente, e evita, também, o nível subterapêutico, que apresenta ineficácia (ALKILANI; MCCRUDDEN; DONNELLY, 2015).

A diferença de concentração plasmática efetiva em função do tempo, entre sistemas convencionais e de liberação sustentada, pode ser visualizado na Figura 4, mostrando que o último mantém a concentração do medicamento no sistema circulatório na faixa terapêutica efetiva por um extenso período, tornando-se mais eficaz do que o tratamento convencional (DA SILVA, 2014).

Figura 4 - Representação geral dos níveis plasmáticos de um fármaco ao longo do tempo, em diferentes sistemas de liberação.



Fonte: Adaptado de Silva (2014).

Portanto, a administração transdérmica com liberação controlada visa diminuir a toxicidade, suprimir as reações adversas e diminuir o número de doses administradas diariamente de alguns fármacos, sendo assim sendo considerada fácil, conveniente e segura. Entretanto, a eficácia dessas formulações pode ser reduzida devido à barreira cutânea promovida pelo estrato córneo, a qual limita a penetração e

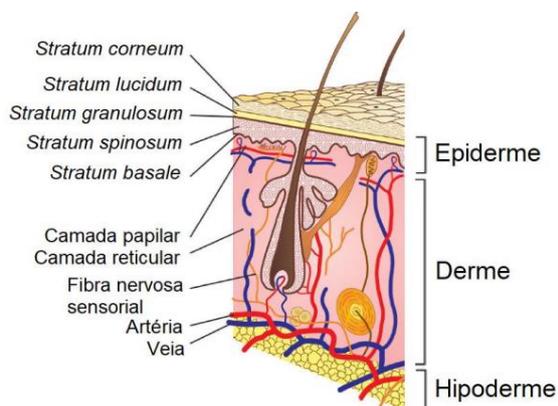
a liberação de compostos ativos, e por isso, faz-se necessário um agente químico ou físico para efetuar a penetração (DA SILVA, 2014; FONSECA et al., 2021; GRATIERI; GELFUSO; LOPEZ, 2008).

Para que o sistema transdérmico de administração de fármacos seja efetivo o fármaco deve penetrar através da barreira da pele e atingir o local alvo. A pele serve como uma barreira física e oferece proteção do ambiente externo, além do fato de que um terço da circulação sanguínea ocorre pela pele; sendo de suma importância para a finalidade transdérmica (PHATALE et al., 2022).

A pele, com uma espessura de 0,5 mm, é dividida em três principais camadas, conforme pode ser observado na Figura 4. A epiderme, a camada mais externa é composta por células do estrato córneo e por substâncias que as unem, como ceramidas e ácidos graxos livres, e assim tem-se a barreira cutânea de proteção física, química e microbiana. A derme, que consiste na camada intermediária é constituída por fibras, vasos sanguíneos e terminações nervosas. E a hipoderme é formada, principalmente, por células de gordura (INDERMUN et al., 2014; PEREIRA, 2019).

A epiderme é uma camada estratificada de epitélio escamoso composta principalmente por vários tipos de células: queratinócitos e células dendríticas e possui uma extensão, de cerca de 50 a 100 μm , dependendo de onde está no corpo. Pode ser dividida em cinco camadas (Figura 5): estrato córneo (*stratum corneum*), estrato lúcido (*stratum lucidum*), estrato granuloso (*stratum granulosum*), estrato espinhoso (*stratum spinosum*) e estrato basal (*stratum basale*), da mais superficial à mais profunda, respectivamente (DIAS, 2013; INDERMUN et al., 2014; KOLARSICK; KOLARSICK; GOODWIN, 2011).

Figura 5 - Representação das diferentes camadas e subcamadas que constituem a pele humana.



Fonte: Pereira (2019).

Já a derme é responsável por proporcionar nutrientes e suporte físico à epiderme, além de proteger o corpo de danos e infecções, atuando como um órgão de armazenamento de água, composta de fibroblastos, que conferem resistência e elasticidade à pele, colágeno e fibras elásticas (PEREIRA, 2019). Após atravessarem o estrato córneo, os fármacos penetram através dos estratos subsequentes a epiderme, ou seja, após passar pela barreira inicial, o fármaco passa por difusão até atingir a derme, conforme pode ser observado na Figura 6 (DIAS, 2013).

Figura 6 - Fases da liberação transdérmica de fármacos.



Fonte: Dias (2013).

O fármaco administrado pela via transdérmica é absorvido na circulação sistêmica através dos vasos sanguíneos da pele e depois circula pelo corpo, com objetivo de exercer sua função farmacológica (RAMADON et al., 2022).

Portanto, a existência do estrato córneo na camada mais externa da pele é uma dificuldade para a absorção transdérmica das substâncias. Assim, para garantir uma permeabilidade satisfatória são necessários agentes químicos e/ou abordagens físicas devem ser utilizadas, para assim obter-se uma metodologia de aumento da permeabilidade com maior eficácia (LARRAÑETA et al., 2016; PRAUSNITZ; LANGER, 2008; ZHANG et al., 2021). Desse modo, com objetivo de superar a barreira córnea inúmeros métodos têm sido criados, como:

- Iontoforese, baseado na aplicação de uma corrente elétrica de baixa intensidade para facilitar a liberação de uma variedade de fármacos, carregados ou

não, através de membranas biológicas, rumo à corrente sanguínea (MALINOVSKAJA-GOMEZ et al., 2016);

- Potenciadores de penetração química; os quais são substâncias adicionadas às formulações tópicas e transdérmicas de modo a melhorar a penetração dos fármacos através da pele (AGGARWAL; DHAWAN; HARIKUMAR, 2012; DE SOUSA, 2016);
- Sonoforese, a qual consiste na possibilidade do ultrassom em incrementar a penetração de agentes farmacológicos ativos através da pele. Trata-se de uma eficiente alternativa de transporte de substâncias além da utilização medicamentosa via oral, ou injeções intradérmicas (MANIKKATH et al., 2017);
- Pró-fármacos, os quais são administrados em forma inativa, sendo ativados somente após biotransformação e (MORRIS; BRAIN; HEARD, 2009);
- Microagulhas, as quais são conjuntos de agulhas em microescala que oferecem um meio de administração pouco invasivo e potencialmente indolor através do estrato córneo na pele (CAO et al., 2016; MÖNKÄRE et al., 2015).

Alguns métodos como a iontoforese, apesar de poderem melhorar a entrega transdérmica de fármacos, aplicando corrente elétrica e criando poros em nanoescala, os poros que são criados possuem tamanho inferior a 10 nanômetros e, geralmente, não são suficientemente grandes para a penetração de compostos de alto peso molecular. Embora o pulso elétrico de alta tensão possa melhorar a entrega de medicamentos de alto peso molecular, dores e contrações musculares causadas aos pacientes ocorrem no processo (PARK et al., 2016).

Dessa maneira, nem todos os métodos podem ser utilizados, pois dependendo do peso molecular dos fármacos o dispositivo utilizado deve ser diferente. Por exemplo, para substâncias de baixo peso molecular, apenas o uso de intensificadores de penetração seria suficiente para que a entrega seja eficiente. Porém, para substâncias de alto peso molecular são necessários métodos de entrega específicos, como microagulhas (MÖNKÄRE et al., 2015).

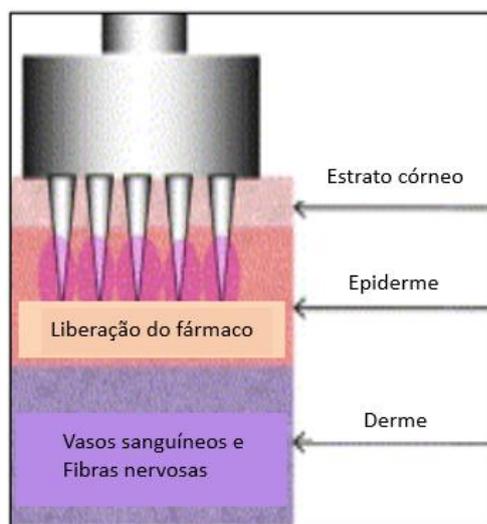
3.4 MICROAGULHAS (MAS)

Microagulhas (MAs) são projeções micrométricas dispostas sobre uma base de suporte, que podem ser adesivos, instrumentos em forma de caneta, rolos, carimbos, seringas convencionais ou seringas pré-preenchidas, as quais são capazes de penetrar a barreira do estrato córneo para administrar substâncias ativas, além de várias outras aplicações clínicas, como administração de insulina, peptídeos e material genético, e para imunização transcutânea (LEE et al., 2020; PEREIRA, 2019).

Assim, as microagulhas, em inglês, *microneedles* (MNs) são dispositivos pouco invasivos, que ao serem inseridos na pele penetram o estrato córneo. Por suas dimensões reduzidas, entretanto, essas microagulhas não atingem terminações nervosas, não causando dor ou sangramento (REQUENA, 2019), possuem diversas vantagens quando comparadas a outros métodos de ultrapassar a barreira córnea, como aplicação fácil pelo paciente e a natureza minimamente invasiva das MAs são atributos chave destes dispositivos que têm sido estudados como plataforma para a entrega de uma ampla faixa de medicamentos e vacinas, além de cosméticos (FONSECA et al., 2021).

Esses dispositivos são fáceis de utilizar, dado que são autoaplicáveis, e, também, minimamente invasivas, pois a aplicação na pele ocorre sem estimular os nervos da derme e sem danificar os vasos sanguíneos e podem ser usadas em conjunto com outros métodos. O fundamento desta técnica baseia-se na utilização de agulhas de tamanho na ordem dos micrômetros (μm), que ao perfurarem a camada superficial da pele geram canais aquosos transitórios a fim de facilitar um transporte eficaz de fármacos, além de permitir que moléculas grandes e hidrofílicas penetrem através dela, e assim ocorra a difusão do medicamento pela camada epidérmica, conforme pode ser observado na Figura 7 (DIAS, 2013; JEONG et al., 2021; ROJAS et al., 2022).

Figura 7 - Mecanismo de ação de microagulhas.



Fonte: Adaptado de Dias (2013).

O primeiro trabalho com microagulhas foi descrito em 1976 em uma patente da *ALZA corporation* por GERSTEL e PLACE (1971). Porém, sua fabricação só foi possível nos anos 90, com os avanços na área da microfabricação (PEREIRA, 2019; XU et al., 2021). Os compostos administrados pelas MAs até o momento têm sido tipicamente de alta potência, o que significa que apenas uma dose baixa é necessária para alcançar um efeito terapêutico ou provocar a resposta imune necessária (DONNELLY et al., 2014).

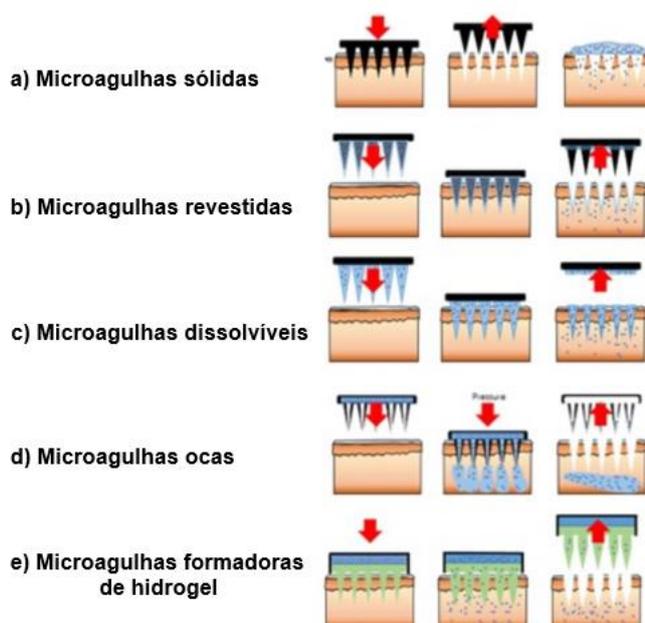
As microagulhas são classificadas de acordo com diferentes parâmetros, como materiais utilizados (vidro, silício, metal, cerâmica, polímeros), processo de fabricação, tamanho, forma, estrutura e densidade do dispositivo. Assim, os principais tipos são:

- **Sólidas:** não têm furo oco e nenhuma droga fisicamente associada a elas e são normalmente usadas como estruturas perfurantes que criam vias de transporte ou estimulam a produção de colágeno na pele e, às vezes, usadas como eletrodos, e assim, aumentam a permeação do fármaco, através da criação de micro orifícios (DALVI et al., 2021; INGROLE et al., 2021);
- **Revestidas:** também são sólidas, mas têm uma droga ou outro material revestido em sua superfície, geralmente para aplicações terapêuticas ou de detecção, e assim, resultam em rápida dissolução do fármaco (INGROLE et al., 2021);
- **Dissolvíveis:** são feitas de materiais que se dissolvem na água (ou seja, no tecido corpóreo). Assim, permitem a liberação rápida ou controlada da droga

incorporada nas microagulhas ou nos adesivos que o dispositivo faz parte (FONSECA et al., 2021; INGROLE et al., 2021) ;

- Ocas: perfuram a pele e permitem a liberação de um fármaco líquido após a difusão da formulação através dos orifícios da agulha. Ainda, nesse tipo de MAs as drogas podem ser misturadas com uma substância solúvel que penetra na pele e atinge o sistema circulatório, sendo possível o uso para administração transdérmica e não transdérmica de medicamentos. Na primeira, o foco está em reduzir a dor da injeção da via parenteral, na penetração da barreira da pele sem danificar o tecido e reduzir a frequência de administração, como no caso de aplicação de insulina em pacientes com diabetes. Na segunda, a utilização está baseada na liberação de drogas em tecidos expostos, como em cirurgias, ou seja, sem a necessidade de ultrapassar a barreira da pele, como na mucosa bucal, tecido vascular e trato gastrointestinal (XU et al., 2021);
- Formadoras de hidrogel: são inovadoras que não contêm drogas, mas embebem fluido intersticial para formar condutos contínuos entre a microcirculação dérmica e um reservatório do tipo adesivo anexado (ITA, 2015).

Figura 8 – Diferentes tipos de microagulhas a) sólidas b) revestidas c) dissolvíveis d) ocas e) formadoras de hidrogel.



Fonte: Adaptado de Lee et al. (2020).

Microagulhas de dissolução (DMAs), ou *dissolving microneedles*, após serem inseridas na pele, o fármaco começa a ser liberado de forma contínua a partir da matriz encapsulada. São compostos por polímeros biodegradáveis, solúveis em água,

isentos de efeitos colaterais e não deixam resíduos de agulhas, como dextrano, albumina, polivinilpirrolidona (PVP), poli (álcool vinílico) (PVA), fibroína, maltose, quitosana, ácido hialurônico (HA) e carboximetilcelulose (CMC). Possuem propriedades importantes como alta resistência mecânica, flexibilidade, baixa citotoxicidade, solubilidade em água, boa capacidade de formação de filme, alta capacidade de carga de drogas e os subprodutos dissolvidos não causarão danos ao corpo humano, pois após a degradação, hidrolítica ou enzimática, são convertidos em aminoácidos e sacarídeos (DALVI et al., 2021; XING et al., 2021)

As microagulhas denominadas dissolventes ou solúveis têm a capacidade de incorporar medicamentos nas matrizes poliméricas para que se dissolvam na pele após a aplicação e assim liberar fármacos que serão transportados para o sangue ita 2017

Também, podem ser os canais para passagem dos fármacos, conforme fizeram Fonseca et al. (2021), onde o sistema adesivo possui dois materiais, uma camada de filme com fármaco e a microagulha (MA) dissolvente, pois após os microfuros serem efetuados a MA se dissolve e o fármaco, juntamente com o filme é transferido pelo canal formado até chegar na epiderme. Portanto, as microagulhas (MNs) são uma tecnologia alternativa, não invasiva e eficaz para diferentes aplicações, principalmente cosméticas (FONSECA et al., 2021).

Um único sistema de microagulhas pode administrar os medicamentos antipsoriáticos localmente (tópico) ou sistemicamente (transdérmico), ajustando a altura da agulha sem causar dor. No caso da psoríase, principalmente na fase aguda, a possibilidade de aplicação de um sistema de aplicação local de fármaco com rápida liberação proporciona a redução dos efeitos colaterais sistêmicos, sendo uma alternativa para o controle da dor nesta disfunção. Reduzir a dor aguda é um dos objetivos principais na fabricação do dispositivo (GOWDA et al., 2023) .

Já para a microagulha propriamente dita, materiais poliméricos são os mais usados, e assim, muitos pesquisadores escolheram carboximetilcelulose (CMC) e trealose, materiais de matriz solúveis em água, para produção de adesivo de microagulhas porque ambos são aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*) e seguros para uso no corpo e podem ser usados em formulações para MAs pelo

processo de micromoldagem, além de aumentarem a resistência mecânica e a taxa de dissolução de MAs (DALVI et al., 2021).

A carboximetilcelulose (CMC) é um polissacarídeo natural e possui propriedades relevantes para diversos tipos de aplicações, como: baixa citotoxicidade, boa elasticidade, solúvel em água, boa capacidade de formação de filme, baixa viscosidade e seus subprodutos dissolvidos não prejudicam o organismo humano (ZHANG et al., 2021). Pereira (2019) utiliza CMC para fabricação de microagulhas, com outros reagentes, com o objetivo de encontrar a melhor combinação entre as concentrações e as propriedades requeridas das microagulhas, como mecânicas, químicas e físicas.

3.4.1 Impressão 3D para obtenção de moldes de microagulhas

Microagulhas podem ser fabricadas com diferentes técnicas, como fotolitografia, impressão 3D, ablação por laser, microestereolitografia, corrosão química, isotrópica, moldagem por injeção, gravação de íons reativos, microusinagem, micromoldagem, perfuração a laser, entre outras técnicas. Muitos desses métodos de fabricação convencionais têm algumas limitações de custo-benefício, exigindo etapas manuais e mão-de-obra intensiva. Portanto, tecnologias acessíveis e econômicas são necessárias para a produção de MAs (DABBAGH et al., 2021; DU et al., 2019; JEONG et al., 2021).

A impressão 3D ou manufatura aditiva consiste em uma faixa de tecnologias que utiliza um modelo virtual de desenho assistido por computador, *Computer-Aided Design* (CAD), para criar um objeto físico por meio da formação consecutiva de camadas. Na década de 1980, as pesquisas pioneiras, como de Yao et al., (2012), revolucionaram o campo das ciências farmacêuticas, biomédicas e de materiais, justamente pela vantagem de rapidez e economia em produzir estruturas complexas, pois a impressão 3D proporciona versatilidade ao processo de prototipagem e fabricação de objetos, os quais são fabricados em uma única etapa com altos graus de complexidade e reprodutibilidade. Entre as várias tecnologias que compreendem a impressão 3D, as técnicas baseadas em fotopolimerização permitem a fabricação de estruturas através da polimerização consecutiva em camadas de polímeros sensíveis a radiação ultravioleta (UV) (PERE et al., 2018).

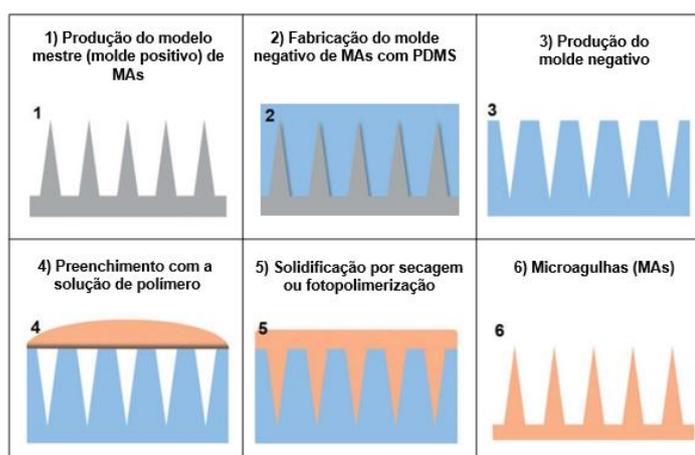
Cada método de impressão 3D tem um conjunto de características, como compensações em resolução, custo-benefício, biocompatibilidade e volume de saída. Dessa forma, a impressão 3D pode ser utilizada tanto para de fabricação de microagulhas, com impressão direta, quanto para fabricação de micromoldes, com impressão indireta (DABBAGH et al., 2021; ECONOMIDOU; DOUROUMIS, 2021).

A utilização de um molde mestre para produzir microagulhas é imprescindível, pois a partir deste, um molde propriamente dito é fabricado. Dessa maneira, a impressão 3D de moldes mestres para fabricação de MAs é um método econômico, fácil e rápido para com projetos variáveis (EL-SAYED; VAUT; SCHNEIDER, 2020; ZHANG et al., 2021).

3.4.2 Micromoldagem como processo de produção de MA

Como dito anteriormente, é necessário um molde mestre para fabricar MAs usando o método de micromoldagem, mas também para criar um outro molde reutilizável, geralmente, feito de polidimetilsiloxano (PDMS) (ZHANG et al., 2021). Esta técnica, tem boa eficiência, pois possui baixo custo, boa reprodutibilidade e fácil aplicação. O processo consiste em seis etapas, conforme a Figura 9.

Figura 9 - Ilustração esquemática do processo de fabricação de MAs poliméricas por micromoldagem com PDMS.



Fonte: Adaptado de Pereira (2019).

Portanto, o molde negativo de PDMS preparado na segunda etapa do processo descrito deve transcrever completamente as microestruturas do modelo mestre impresso 3D. Apesar da possibilidade de ser feito com diversos materiais poliméricos, o PDMS é o mais utilizado, pois apresenta capacidade de transcrição,

termoestabilidade, flexibilidade, não tem aderência superficial, o que facilita a separação de MAs do molde (ITA, 2017; PEREIRA, 2019; ZHANG et al., 2021).

Geralmente, microagulhas são carregadas com substâncias ativas através da incorporação direta como parte da solução polimérica usada no processo de fabricação por micromoldagem. Porém, algumas moléculas, de acordo com a sua natureza química, necessitam de encapsulamento, tornando o processo mais demorado e oneroso.

Deste modo, para incorporação de fármacos no sistema polimérico como dispositivo de entrega transdérmica, pesquisadores têm elaborado adesivos biocompósitos com matriz de microagulhas e uma camada posterior que permite a incorporação de substâncias ativas (FONSECA et al., 2021; FONTES et al., 2018). Tendo em vista que a celulose possui inúmeras propriedades relevantes, como grande afinidade com a água, apesar de ser insolúvel a ela, resistência mecânica elevada, estrutura porosa, que permite a incorporação de substâncias ativas, alta capacidade de retenção de água, dentro outros (ETALE et al., 2023).

3.5 MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA (CB)

Membranas de celulose bacteriana (CB) tem sido exploradas como novos sistemas de entrega transdérmica, atuando como carreadoras para a entrega de vários agentes terapêuticos, como fármacos, enzimas, hormônios e nanopartículas (SILVA et al., 2014). Diversas substâncias podem ser incorporadas na CB, pois a matriz nanofibrosa possui grande capacidade de retenção de líquidos, devido à sua alta área de superfície e porosidade (ADEPU; KHANDELWAL, 2020). Assim, a CB pode ser usada como uma plataforma de suporte para desenvolvimento de novos materiais compósitos complexos, como na indústria de alimentos como embalagens de filmes bioativos, na área médica como implantes para a engenharia de tecidos e como adesivos para cicatrização de feridas (AMORIM, 2020; BAO et al., 2021).

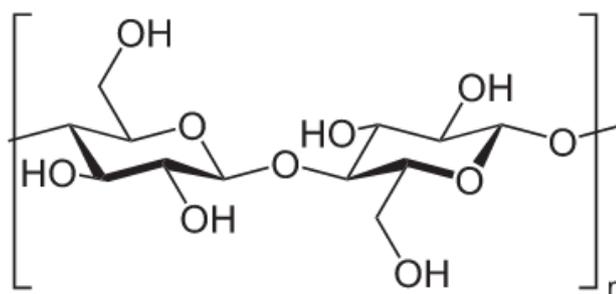
A celulose $(C_6H_{10}O_5)_n$ é um polissacarídeo estrutural e componente principal do envoltório rígido de muitas células vegetais, como ramos e caules de várias plantas, que consistem em grande parte de celulose. É um biopolímero largamente fabricado em todo o mundo, com uma produção, na natureza, de cerca de 10^{14} toneladas por ano (GORGIEVA; TRČEK, 2019; ZENG; LAROMAINE; ROIG, 2014). Este polímero pode ser dividido em dois grupos: grupo da celulose complexa, o qual se encontra a

celulose vegetal, e o grupo da celulose pura, no qual se encontra a celulose bacteriana (DONINI et al., 2010).

Ambos os tipos de celulose, a vegetal e a bacteriana, apresentam fórmula química estrutural iguais, como mostra a Figura 10. Porém, diferem em relação à pureza, pois a celulose bacteriana não contém lignina, hemiceluloses e outros constituintes presentes na celulose vegetal (DA COSTA et al., 2017).

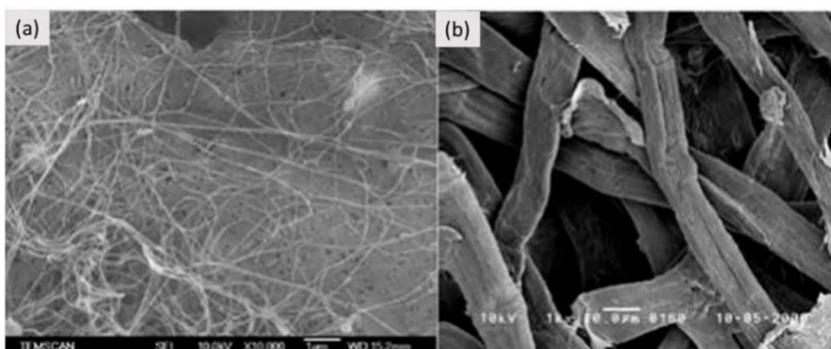
Embora apresentem custos de produção distintos, a fabricação da CB pode ser considerada mais onerosa que a celulose vegetal, no entanto, ela já possui alta pureza, o que elimina a necessidade de processos caros de extração e purificação e o uso de produtos químicos ambientalmente perigosos, tornando assim mais vantajoso sua produção em relação a vegetal. E isso infere em tamanhos distintos de suas fibras, pois possui fibras nanométricas e celulose vegetal fibras micrométricas, sendo então, aproximadamente, as fibras de CB 100 vezes mais finas, como pode ser visto através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), observada na Figura 11. Portanto, mesmo que tenham fórmula química iguais, apresentam propriedades físicas e mecânicas distintas (DONINI et al., 2010; VASCONCELOS et al., 2020).

Figura 10 - Fórmula química estrutural da celulose vegetal e bacteriana.



Fonte: Silva et al. (2017).

Figura 11 – Diferenças entre as micrografias de (a) celulose bacteriana e (b) celulose vegetal em ampliações de 10.0Kx.



Fonte: Donini et al. (2010).

A CB possui propriedades diferenciadas em relação a celulose vegetal, como maior grau de polimerização e maior cristalinidade, alta elasticidade e resistência mecânica, biocompatibilidade, biodegradabilidade, durabilidade, alto potencial hidrofílico (capacidade de retenção e absorção de água - cerca de 98 % de seu volume é composto por líquidos), e boa estabilidade térmica (FIGUEIREDO et al., 2015; PÉREZ, 2014).

A metodologia utilizada na síntese de produção de celulose bacteriana influencia nas propriedades finais do polímero formado, principalmente na cristalinidade e na morfologia. Quando ocorre de maneira estática, uma membrana espessa e gelatinosa de celulose acumula-se na superfície do meio de cultura. Já em cultura agitada, a CB pode ser obtida na forma de uma suspensão fibrosa ou em esferas. De modo que, a CB formada funciona como mecanismo de flotação para os micro-organismos que permanecem na interface ar/líquido para obter oxigênio mais facilmente (LIMA, 2022; VASCONCELOS et al., 2020).

Há quatro fontes naturais de nanocelulose: bactérias, plantas, algas e animais. A celulose bacteriana, também conhecida como celulose microbiana ou biocelulose (CHEN; LEE, 2018; PEDROZA, 2019), tem na composição do meio de cultura, principalmente, presença de carboidrato (sacarose, glicose, frutose, lactose, manitol), além de extrato de levedura como forma de nitrogênio (peptona, polipeptona, triptona, etc). Porém, a fonte de carbono no meio de produção é de suma importância, e por isso vários estudos tem tido foco na avaliação do desempenho dos diferentes meios de cultura usados no crescimento da CB, para inúmeras aplicações (VASCONCELOS et al., 2020).

A biocelulose é produzida por diversos microrganismos, principalmente, por diferentes cepas de bactérias dos gêneros *Glucanacetobacter*, *Acanthamoeba*, *Achromobacter*, *Zooglea*, *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Azobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Xylinum*, dentre outros (AMORIM, 2020). Porém, as mais utilizadas para essa finalidade, em larga escala, são as da linhagem *Glucanacetobacter hansenni* e *xylinum*, as quais são capazes de sintetizar membranas com aspecto de um hidrogel (BARUD, 2010).

A liberação de um fármaco de uma matriz nanofibrosa, como na CB é diretamente influenciada por vários fatores, como porosidade, distribuição do tamanho

dos poros, área superficial específica, cristalinidade e cinética de intumescimento (ADEPU; KHANDELWAL, 2020). Como morfologia em nanoescala da celulose imita a arquitetura da matriz extracelular nativa e, assim, a celulose pode ser considerada um substrato adequado para a adesão.

Além dos dois métodos de produção citados, estático e agitado, a CB também pode ser produzida com a adição de polímeros, materiais de reforço ou aditivos, e assim, as propriedades estruturais, físicas, químicas e morfológicas são afetadas diretamente. Para isso, as metodologias com finalidades diferentes são usadas: *ex situ*, que consiste na modificação da membrana após a formação da CB, através de métodos químicos ou físicos; e *in situ*, consiste na adição de aditivos e assim as modificações ocorrem durante a formação de CB (LIMA, 2022; VAZQUEZ et al., 2013).

Portanto, as propriedades da celulose bacteriana também podem variar de acordo com o método de produção utilizado, e a faixa de aplicações deste biopolímero também variam, como filtração e ultrafiltração, embalagem de alimentos e outros produtos sensíveis, conservação de artefatos históricos, construção de isolantes térmicos e retardadores de chama, extração e armazenamento de energia, acústica, sensores e liberação controlada de medicamentos. Nesse contexto, o uso de CB como matriz de incorporação de fármacos para liberação controlada tem se intensificado e obtido excelentes resultados. (CREMONINI et al., 2010) utilizaram a membrana de CB aditivada com ofloxacino para aplicação de lente de contato para cães, no tratamento de ceratite ulcerativa e foi observado que a CB aditivada promoveu liberação, em concentração adequada, até o terceiro dia de avaliação. Já (FONSECA et al., 2021) desenvolveram adesivos inovadores para aplicações dermocosméticas com nanocelulose bacteriana para a incorporação de compostos ativos, como a rutina, ou simplesmente vitamina P.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A nanocelulose bacteriana foi sintetizada sob a forma de membranas úmidas utilizando a cepa bacteriana *Gluconacetobacter hansenii* como uma linhagem de referência ATCC-23769 (American Type Culture Collection, USA), obtida da coleção de culturas da Universidade Católica de Pernambuco (UCP1619) e seguindo o procedimento de cultura estática com meio de cultura utilizado por Hestrin e Schramm (1953).

Resina Cosmos Splint SLA foi adquirida da Yller Cosmos Splint Incolor (Yller Biomateriais, Pelotas, RS, Brazil). Poldimetilsiloxano (PDMS) foi obtido da marca SYLGARD 184 Silicone Elastomer. Carboximetilcelulose (CMC) sal de sódio (grau de substituição:1,2, massa molecular média, aproximadamente, 250 000), celulose microcristalina (CM) (Avicel® PH-101, tamanho de partículas ~ 50 µm) e ácido cítrico (AC) anidro (99,6%, para análise ACS), os quais foram adquiridos à Sigma-Aldrich. Metotrexato e tampão fosfato monobásico 0,1M, pH 7,4, que foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Todos os reagentes eram de grau de reagente químico e foram usados como recebidos.

Obeve-se: CB (membrana de celulose bacteriana triturada e sem nenhum aditivo), CB/MTX (membrana de celulose bacteriana triturada com metotrexato), MA (microagulhas poliméricas de carboximetilcelulose) e CB/MTX/MA (sistema adesivo de celulose bacteriana com metotrexato e microagulha).

4.1 PREPARAÇÃO DE MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA

4.1.1 Inoculação e biossíntese das membranas

A metodologia utilizada para manter a viabilidade do microrganismo se baseou em estudos realizados por Hestrin e Schramm (1953), que é considerado como meio de cultura padrão. O meio HS é composto por 2% de glicose; 0,5% de peptona; 0,5% de extrato de levedura; 0,27% de fosfato dissódico; 0,115% de ácido cítrico e o restante de água destilada. Para a manutenção da bactéria, há um acréscimo de 1,8% de ágar ao meio HS anteriormente citado. Os meios foram esterilizados a 121°C por 20 minutos, em autoclave de marca Primatec, em pressão de 1 atm (GOTTSCHALK et al., 2013).

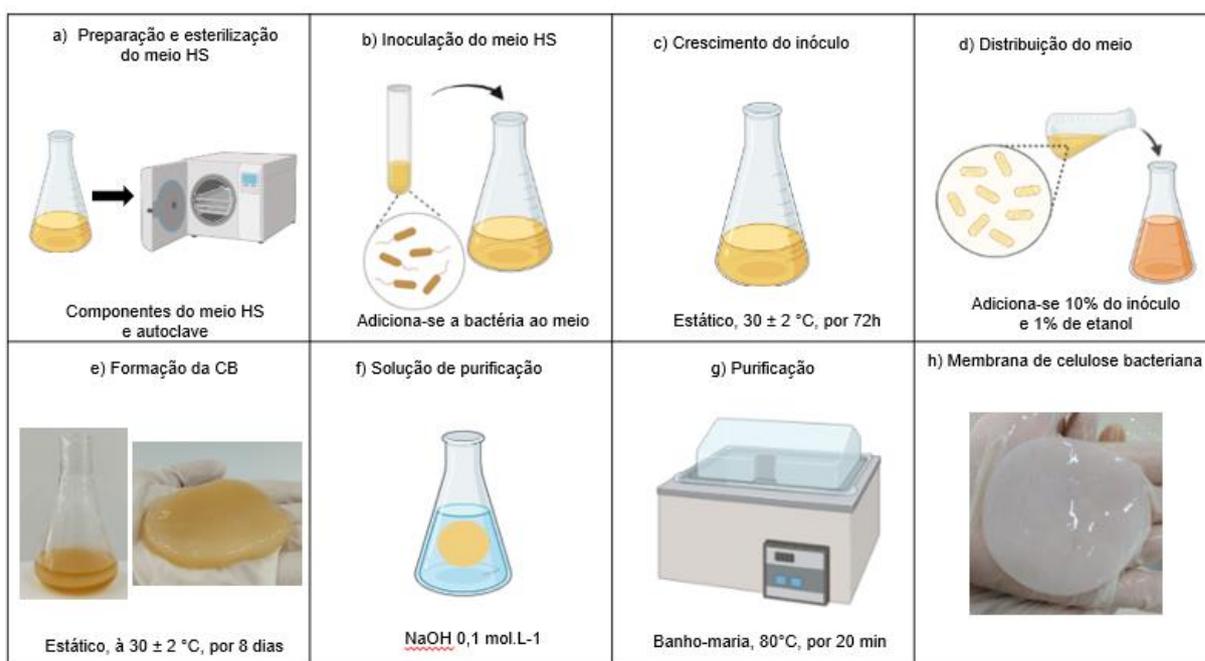
O inóculo foi preparado a partir do crescimento do microrganismo à 30 ± 2 °C em condições estáticas, em meio líquido HS, contidos em frascos Erlenmeyer. Após

72h, transferiu-se 10% do meio do inóculo e 1% de álcool etílico absoluto em meio HS em frascos Erlenmeyer, em triplicata. Após 8 dias, à 30 ± 2 °C, em condições estáticas, membranas de celulose bacteriana foram observadas nos frascos, e assim, retirou-se do sistema estático, para lavagem e purificação.

4.1.2 Purificação das membranas

Após o crescimento, as membranas foram purificadas com solução alcalina de hidróxido de sódio (NaOH), com concentração de $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, em banho-maria, a 80°C por 20 minutos, a fim de neutralizar o pH do meio, antes de, aproximadamente 4,5 e após a neutralização, por volta de 6,0. Em seguida, foram lavadas em água destilada e refrigeradas para posterior utilização. A Figura 12 mostra através de imagens a sequência de produção e purificação da celulose bacteriana.

Figura 12 – Metodologia de preparação de membrana de celulose bacteriana.



Fonte: A autora (2023).

4.2 PRODUÇÃO DE MICROAGULHAS POLIMÉRICAS

O processo de produção de microagulhas pode ser dividido em três etapas consecutivas: 1) Produção do molde positivo, por impressão 3D; 2) Produção do molde negativo e 3) Produção das microagulhas poliméricas.

4.2.1 Produção de moldes positivos impressos 3D

Para produção de moldes positivos, o projeto foi desenhado digitalmente, através do software *Chitubox*®, onde foi possível configurar e desenhar os padrões e

geometrias escolhidos com diferentes tamanhos. Esses processos foram realizados em parceria com o grupo de pesquisa do laboratório de Terras Raras (BSTR), principalmente com a aluna Edielen França, a qual trabalha com microagulhas em sua tese de doutorado. Assim, duas geometrias diferentes de moldes para MA foram impressos (Tabela 1).

Tabela 1 – Parâmetros dos moldes positivos impressos 3D.

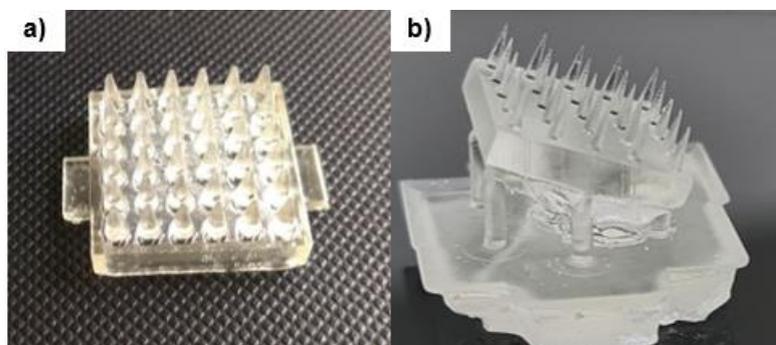
| Parâmetros | Molde 1 (6x6) | Molde 2 (5x5) |
|----------------------------|------------------|------------------|
| Tamanho da base | 2cm ² | 1cm ² |
| Altura da base | 3,3mm | 1,77mm |
| Altura da agulha | 3,5mm | 2mm |
| Distância entre as agulhas | 2mm | 2mm |

Fonte: A autora (2023).

Após o desenho ter sido concluído, o arquivo foi transferido para uma unidade de armazenamento móvel, a qual foi inserida na impressora 3D de modelo *Elegoo Mars 3 Resin 3D Printer*, e como insumo foi utilizada a resina *Cosmos Splint SLA*, da marca *Yllor*. Após o processo de impressão, os moldes impressos, que ficam aderidos à placa de impressão, foram removidos cuidadosamente com uma espátula.

Os moldes foram lavados em banho de álcool isopropílico para remoção do excesso de resina, e depois foram curadas sob radiação ultravioleta por 30 minutos, ambos os processos foram realizados no equipamento *Elegoo Wash Cure*. Os moldes obtidos podem ser observados na Figura 13.

Figura 13 – Moldes positivos impressos 3D a) molde 1 b) molde 2.



Fonte: A autora (2023).

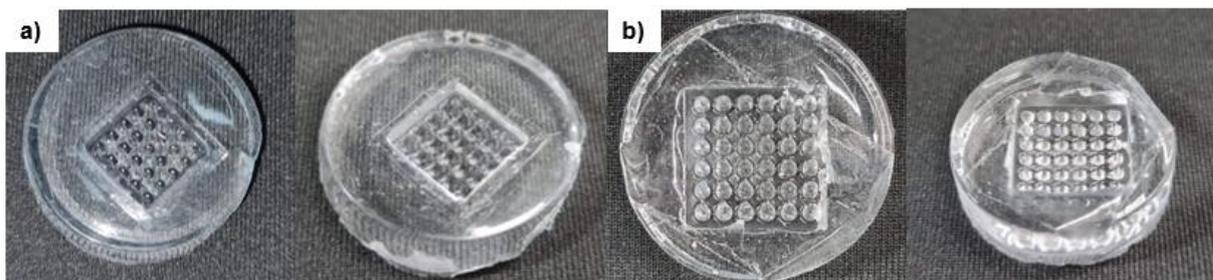
4.2.2 Produção de moldes negativos de polidimetilsiloxano (PDMS)

A utilização de um molde positivo para produzir microagulhas é imprescindível, pois a partir deste, um molde negativo pode ser fabricado. O polidimetilsiloxano (PDMS) é muito usado para esta finalidade, pois replica a forma do molde positivo, tem a vantagem de ser flexível, não tem aderência superficial à estrutura mestre e permite a fácil remoção das microagulhas poliméricas, além de não apresentar instabilidade como expansão ou contração após o processo de cura, como outros materiais poliméricos usados com a mesma finalidade. E ainda, após a produção do molde, pode ser curado por aquecimento, irradiação ultravioleta e outros métodos (ITA, 2017; ZHANG et al., 2021).

Para produção de moldes negativos de PDMS, utilizou-se o PDMS da marca *SYLGARD 184 Silicone Elastomer*, o qual apresenta uma proporção de 10:1, em relação a base do elastômero ao agente de cura, respectivamente. A mistura foi efetuada em placa de petri de vidro, sobre agitador magnético, por 20 minutos, tendo em vista que a reação entre essas duas substâncias promove a formação de bolhas, devido a liberação de gás hidrogênio. Por isso, com uma agulha as bolhas maiores formadas foram estouradas manualmente. Como forma de garantir a redução total das bolhas, a mistura foi colocada em dessecador com vácuo e aberto rapidamente, estourando-as.

Assim, a mistura foi vertida sobre os moldes positivos, o que resultou na formação de mais bolhas, e assim o processo de dessecador em vácuo foi repetido, até que não houvesse mais bolhas. Posteriormente, foi colocado em estufa à vácuo, inicialmente em 30°C por 20 minutos, 40°C por 20 minutos, e assim sucessivamente até atingir 120°C, que permaneceu por 2h. Após esse processo, os moldes negativos estavam prontos, porém para que o processo de cura fosse concluído esperou-se 24h para o desmolde. E assim, os moldes negativos foram obtidos, conforme a Figura 14.

Figura 14 - Moldes negativos de PDMS a) molde menor b) molde maior.



Fonte: A autora (2023).

4.2.3 Produção de microagulhas de carboximetilcelulose

A princípio, analisou-se qual seria a melhor combinação das concentrações dos reagentes. Para isso, a metodologia de (PEREIRA, 2019) foi usada como base. Primeiramente foram preparadas três soluções com concentrações distintas de carboximetilcelulose (CMC): 5; 7,5 e 10% (% m/v), e após realização de testes mecânicos, observou que a solução polimérica, que apresentou melhor resistência, após secagem, foi de a 7,5% (% m/v) de CMC. Seguindo no mesmo intuito, soluções com diferentes concentrações de ácido cítrico (AC) foram preparadas e testadas, e, também, padronizada em 10% (% m/v, em relação à quantidade total de CMC na solução). Da mesma forma de AC, fez-se com a celulose microcristalina (CM), também padronizada em 10% (% m/v, em relação à quantidade total de CMC na solução).

Para melhor compreensão, a Figura 15 descreve as etapas de metodologia de preparação de microagulhas. Na sequência da metodologia, após a consolidação das concentrações dos reagentes e encontrada a melhor combinação deles, foram pesados e adicionados a água destilada e, posteriormente, agitados, vigorosamente, em agitador mecânico. Posteriormente, a homogeneização completa da solução foi efetuada, aproximadamente com 30 minutos de agitação. Os moldes negativos de PDMS, de ambos os tamanhos, foram preenchidos com 1mL de solução e centrifugados, a 6000rpm por 10min, por três vezes, até o preenchimento total do molde.

Posteriormente, o molde foi colocado em um sistema à vácuo adaptado, como pode ser observado na Figura 15, onde um funil de Büchner foi acoplado a um Kitasato e ligados a uma bomba à vácuo, como objetivo de efetuar a sucção da solução e assim, obter o preenchimento total do molde, de modo que cada cavidade do molde

fosse completamente ocupada. Após 1h de sucção à vácuo, os moldes foram colocados em estufa, à 30°C, por 24h.

O processo foi realizado utilizando ambos os tamanhos dos moldes, porém, somente no molde maior foi possível observar a estruturação completa das microagulhas, pois no molde menor não foi possível observar o preenchimento completo das cavidades do molde.

Figura 15 – Metodologia de preparação de microagulhas (MAs).



Fonte: A autora (2023).

4.3 INCORPORAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MTX

4.3.1 Incorporação de MTX em CB e adição de microagulhas

Inicialmente preparou-se uma solução de metotrexato com tampão fosfato-salino (PBS) pH 7,2± 2 na concentração de 0,5 mg.mL⁻¹, conforme (YAO et al., 2012). Em seguida a incorporação foi feita por método mecânico, através de trituração da membrana de celulose bacteriana úmida com parte da solução de MTX/PBS. Posteriormente, foram secas em estufa a 40°C por 24h. Durante o processo de secagem das microagulhas poliméricas produzidas, parte da membrana aditivada foi sobreposta a base dela, formando uma camada posterior, e pelas propriedades da solução de MA, houve aderência e, por fim, secagem estufa a 40°C por 24h.

4.3.2 Quantificação de MTX

O MTX foi quantificado seguindo a metodologia usada por (FONTES et al., 2018), que consistiu na utilização de uma massa conhecida de amostras de CB com MTX mantida em etanol/ solução aquosa de NaOH 0,1 mol.L⁻¹ (1/2, v/v) sob agitação magnética suave por 8 h, seguida de centrifugação a 5000 rpm por 10 min. A concentração de MTX no sobrenadante foi quantificada segundo (GARCIA, 2014), usando um espectrofotômetro (PerkinElmer) medindo a absorvância a 303 nm a partir de uma curva de calibração padrão.

5 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

Todas as amostras de MA, CB, CB/MTX, CB/MTX/MA obtidas foram caracterizadas quanto à morfologia, com Microscopia Ótica (MO) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), estrutura com Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), ensaio de intumescimento, cristalinidade com Difração de Raios, (DRX), estabilidade térmica (TGA) e propriedades mecânicas, com ensaio de compressão e inserção de pele *in vitro*, bem como propriedades biológicas, com teste de citotoxicidade (MTT) com células Vero e liberação do fármaco no sistema.

5.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA COM MICROSCOPIA ÓTICA (MO)

Para a obtenção de mais detalhes morfológicos da superfície da membrana celulósica (CB), da membrana com fármaco (CB/MTX), das microagulhas (MA) e de CB/MTX/MA utilizou-se um microscópio ótico Motic SMZ-168.

5.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As micrografias das superfícies inferiores de crescimento das amostras foram obtidas utilizando um microscópio eletrônico de varredura (Modelo MIRA-3, Tescan Mira), operando com feixe de elétrons de 10kV e ampliações de 10 e 20 Kx. As amostras CB e CB/MTX foram recobertas com 10nm de ouro em um metalizador (SANYU ELECTRON) para execução da análise. A morfologia das amostras foi estudada a partir da superfície das amostras.

5.3 AVALIAÇÃO DO INTUMESCIMENTO

Para estudos de intumescimento as amostras CB, MA, CB/MTX e CB/MTX/MA (1 cm²) foram pesadas e os valores de massa seca inicial para cada amostra foi obtida em balança analítica (Shimadzu AX 200), ou seja, no ponto de tempo zero no estado seco (m_0) e então colocadas em um volume de 20 mL de PBS (*Phosphate Buffered Saline*), pH 7,4. O PBS foi selecionado como o meio de intumescimento pelo fato de ser considerado semelhante ao fluido intersticial da pele e por ser usado como meio de intumescimento em outros estudos semelhantes, como descreveram (DONNELLY et al., 2014). As amostras foram pesadas em tempos determinados, 30 minutos, 1h, 3h, 6h, 12h, 24h e 48h, em quintuplicata para cada um. E após o intumescimento foram pesadas (m_i), e a percentagem de intumescimento foi calculada segundo a seguinte equação:

$$\text{Grau de intumescimento (\%)} = \frac{m_i - m_0}{m_0} \times 100$$

5.4 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)

A estabilidade térmica e as temperaturas características de degradação (T_d) de todos os materiais (CB; CB/MTX; MAs e CB/MTX/MA) foi determinada através de análise termogravimétrica (TGA), de 30 °C a 800 °C sob uma atmosfera de nitrogênio com uma taxa de fluxo de 20 mL.min⁻¹, para evitar a degradação termo-oxidativa das amostras, com taxa de aquecimento de 10 °C .min⁻¹. A análise foi realizada no equipamento de marca Shimadzu, modelo DTG-60H, com porta amostra de platina, utilizando, aproximadamente, 8mg de amostra. As imagens foram processadas utilizando-se o *software* Origin, versão 8.5.

5.5 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Com o intuito de identificar os grupos funcionais presentes nas membranas de CB, utilizou-se a análise de espectroscopia de infravermelho, que foi realizada no Instituto de Pesquisa em Petróleo e Energia (LITPEG), na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). O equipamento utilizado foi de modelo Spectrum 400 da marca Perkin Elmer, com Módulo Reflectância Total Atenuada, onde todos os espectros foram registrados após 16 digitalizações com uma resolução de 4 cm⁻¹ e em uma faixa de absorção de 4000-550 cm⁻¹.

5.6 DIFRATOMETRIA DE RAIOS X (DRX)

Para identificação das fases cristalinas das membranas de celulose (CB) e com metotrexato incorporado (CB/MTX), realizou-se a técnica de Difratometria de Raios X (DRX). O equipamento usado foi um difratômetro *Bruker D2 Phaser*, para a amostra de CB e CB/MTX, por serem filmes, o equipamento atuou operando com tensão de 30 kV e corrente de 10 mA, com tubo de cobre com comprimento de onda de 0,154 nm, intervalo de varredura de 10 a 40° (2θ), passo angular 0,02°, tempo por passo de 1,25 segundos e velocidade de rotação 15 rpm. Já para o fármaco, por ser um pó, o equipamento atuou operando com velocidade do goniômetro de 0,02/min sob agitação de Cu-Kα (λ=1,5406Å) com varredura de ângulo aberto 2θ entre 4° e 50°.

Para determinação do percentual de cristalinidade (%C), usou-se o método descrito por (SEGAL et al., 1952), que se baseia na diferença da intensidade entre os picos de maior e menor intensidade, conforme a equação mostra:

$$\text{Cristalinidade (\%)} = \frac{I_C}{(I_C + I_M)} \times 100$$

Onde I_C e I_M correspondem às fases cristalina e amorfa, respectivamente.

5.7 TESTE MECÂNICO DE MICROAGULHAS

Para o desenvolvimento de microagulhas é necessário que seja realizado a caracterização mecânica como etapa importante. Tendo em vista que, geralmente, MAs experimentam uma ampla gama de tensões, incluindo aquelas experimentadas durante a inserção ou a remoção, e isso infere que o dispositivo tenha resistência mecânica suficiente, para que falhas sejam evitadas (LARRAÑETA et al., 2016).

Para simular a pele ensaios de compressão foram realizados, conforme fizeram Larrañeta et al. (2014) e Rojas et al., (2022), onde foi utilizado *Parafilm M®* (Bemis Company Inc., EUA), que é composto de uma mistura de poliolefina e cera de parafina. O *Parafilm* foi dobrado, para obter uma película de oito camadas (1 mm de espessura), e para simular a inserção das microagulhas na pele, foram inseridas na película formada e removidos após 30s, para cada amostra. De modo a analisar a taxa de inserção e profundidade, cada camada de *Parafilm* foi observada ao microscópio ótico Motic SMZ-168 e o número de orifícios nas camadas foi contado.

5.8 INSERÇÃO DE MICROAGULHAS NA PELE DE PORCO

A pele suína neonatal de espessura total pode ser considerada um bom modelo para a pele humana em termos de escassez de cabelo e propriedades físicas (LARRAÑETA et al., 2014). Por isso, os estudos de inserção cutânea *in vitro* foram realizados com pele de porco colhida imediatamente após o sacrifício dos animais em um matadouro local (Matadouro de Paulista, Paulista-PE) durante o procedimento comum de processamento de carne para consumo humano. As amostras de pele foram enxaguadas com água fria, devidamente depiladas e armazenadas a -20°C até serem necessárias.

Antes dos experimentos a pele foi descongelada e cortada em quadrados de $2 \times 2 \text{ cm}^2$, onde foram fixadas em um suporte rígido e as MAs colocadas em sua superfície, sendo pressionadas contra a pele por 30s, aplicando uma força que poderia ser usada para pressionar um selo em um envelope ou apertar um botão de elevador, conforme descrevem (FONSECA et al., 2021). Posteriormente, as MAs foram retiradas da pele e o corante vermelho do congo ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) foi depositado na

superfície, por 5 minutos. A tinta residual foi limpa das amostras de pele, que foram observadas em microscópio ótico Motic SMZ-168. A eficácia de penetração após o teste foi calculada de acordo com a equação a seguir (ZHANG et al., 2021):

$$\text{Eficácia de penetração} = \frac{\text{Número de orifícios pintados}}{\text{Número de agulhas}} \times 100$$

5.9 ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE

Células Vero foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 (*Sigma-Aldrich*), St Louis, MO, EUA) suplementado com 10% (p/v) de soro fetal bovino (*Sigma-Aldrich*) em placa de 12 poços, sendo mantidas em incubadora a 37°C com 5% de dióxido de carbono (CO₂). Culturas de células (10⁶ células/poço) foram usadas para ensaios subsequentes.

Com objetivo de verificar a qualidade do sistema (CB/MTX/MA) como suporte ao metabolismo celular os testes de citotoxicidade foram realizados nos materiais produzidos (CB; CB/MTX; MA e CB/MTX/MA). Para esse teste, as amostras foram esterilizadas por radiação ultravioleta (UV), onde cada lado do material foi exposto a essa radiação por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram postas em placas de 12 poços com 35 mm de diâmetro para realização do teste em triplicata para cada material, bem como células sem material como grupo controle.

O protocolo MTT, usado para medir a atividade metabólica celular como um indicador de viabilidade e proliferação celular e citotoxicidade (Grela et al. 2018), foi realizado nos materiais produzidos. Neste ensaio, o anel tetrazolio do composto solúvel em água brometo de 3-(4,5 dimetiliazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolio quando em contato com células viáveis é clivado e produz cristais de formazan roxos que são insolúveis em soluções aquosas. Esses cristais são conseqüentemente dissolvidos em solução de solubilização MTT [M-8910]. A quantidade de células viáveis é, portanto, determinada a partir da solução resultante medida espectrofotometricamente. Todas as medidas foram repetidas com 3 amostras para todos os materiais e seus valores médios foram utilizados.

5.10 DETERMINAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE MTX NA CB

As amostras de CB/MTX/MA foram avaliadas quanto a quantidade de fármaco presente no material. A metodologia usada por Fontes et al. (2018) foi usada para determinação da carga de MTX, onde soluções padrão na faixa de 0,2–2,2 µg.mL⁻¹

foram preparadas e os dados de absorção foram plotados contra a concentração e examinados quanto à linearidade. A regressão linear foi obtida a partir de três curvas de calibração independentes com uma equação de linha de regressão de $y = 0,1075x - 0,0134$. O coeficiente de correlação mostra uma regressão linear satisfatória, com ajuste superior a 0,99 ($R^2=0,998$).

5.11 LIBERAÇÃO IN VITRO DE MTX INCORPORADO NA CB

O sistema CB/MTX/MA foi colocado em 25 mL de PBS (pH 7,4) e introduzido em tubo de diálise (membrana de celulose, corte 12000 kDa da Merck, Brasil), e colocado em banho-maria com agitação constante a 600 rpm a 37°C por 120 horas e a liberação de metotrexato (MTX) foi realizada, conforme a metodologia de Taheri et al., (2011). Em determinados intervalos de tempo, 1,5 mL de solução foram retirados e imediatamente reabastecidos com igual volume de solução fresca (PBS) para manter um volume constante. A quantificação de MTX em cada alíquota foi determinada por espectrofotometria UV-Vis a $\lambda = 304$ nm, em triplicata, usando um espectrofotômetro PerkinElmer modelo Lambda 650. A concentração de MTX foi determinada a partir da extrapolação de uma curva de calibração ($y = 0,1075x - 0,0134$, $R^2 = 0,998$), preparada com soluções de 0,2–2,2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

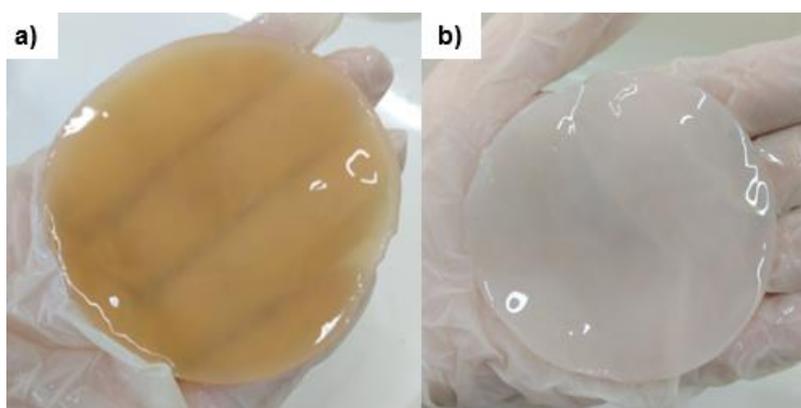
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos serão apresentados nesse tópico, e estão expostos na seguinte ordem: análise visual, caracterização morfológica, avaliação do intumescimento, análise termogravimétrica, espectroscopia, cristalinidade, testes mecânicos, análise citotóxica e liberação *in vitro* do fármaco.

6.1 ANÁLISE VISUAL DAS MEMBRANAS DE CB

A Figura 16 mostra a CB produzida após sua retirada do meio de cultura e a CB purificada, respectivamente. As membranas apresentaram diâmetro médio de $7,8 \pm 0,5$ cm, e essa variação depende da quantidade de meio de cultura usado e dias de síntese em cultura estática.

Figura 16 - Imagens das membranas de celulose bacteriana (CB) (a) após produção (b) após purificação.



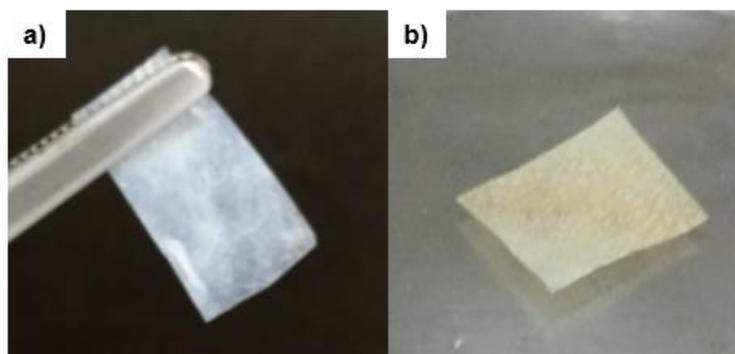
Fonte: A autora (2023).

As morfologias da membrana de celulose bacteriana (CB), antes e depois da purificação, apresentaram aspecto similar, pois ambas possuem superfície externa lisa. Porém, a coloração foi modificada depois da purificação, pois os microorganismos presentes na estrutura e o meio de cultura foram eliminados pelo contato com a solução alcalina e a temperatura alta. Ainda, o meio usado foi o padrão HS, patente de Hestrin e Schramm (1953), a cor alaranjada é inerente a alguns de seus componentes, nomeadamente, extrato de levedura e peptona, principais fontes de nitrogênio (GOTTSCHALK et al., 2013). Logo, após purificada a membrana apresentou cor esbranquiçada, visto que as bactérias e as substâncias foram eliminadas.

A CB pura e triturada sem fármaco (Figura 17a), foi produzida com intuito de comparar com a CB/MTX (Figura 17b), que é a CB triturada com metotrexato, para

verificar o efeito da presença do MTX na estrutura, que de maneira geral, macroscopicamente somente a cor foi modificada, tendo em vista que o MTX é uma substância amarelada.

Figura 17 - Membranas de celulose bacteriana (CB) (a) seca em estufa após processo de trituração (b) triturada com MTX e seca.



Fonte: A autora (2023).

A Figura 18 mostra a imagem de CB/MTX/MA, observando que a combinação da CB, MA e MTX foi eficiente para obtenção do material proposto com a CB incorporada com MTX na base do sistema e as microagulhas, com pontas agudas, que tornaram o arranjo promissor para aplicação como adesivo para entrega de fármacos, nesse caso específico o MTX. Detalhando a função de cada componente polimérico, a CB funciona como suporte para a incorporação da molécula bioativa (MTX) e CMC para formação de MA para ultrapassar a barreira córnea da pele, para assim facilitar a liberação da substância ativa.

Figura 18 – Sistema adesivo CB/MTX/MA.

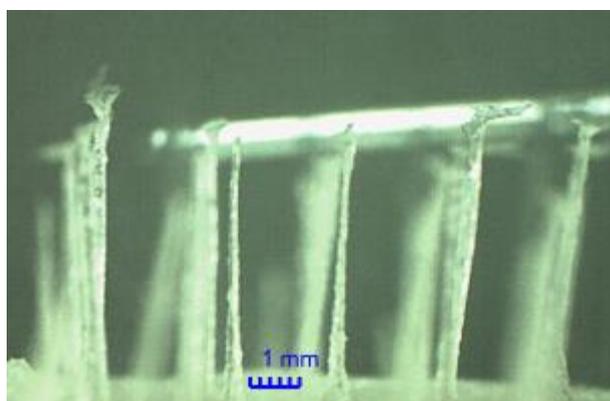


Fonte: A autora (2023).

6.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA COM MICROSCOPIA ÓTICA (MO)

A Figura 19 mostra a morfologia das MA e as formas das agulhas, altura, diâmetro da ponta, largura da base e espaçamento entre agulhas. As MAs apresentam base quadrada e formato piramidal, com morfologia regular e uniforme e pontas pontiagudas. As MAs apresentaram alturas médias de $4,5 \pm 0,05$ mm e distância entre as agulhas (de ponta a ponta) de $2,0 \pm 0,04$ mm. A presença de pontas afiadas é uma característica de interesse, visto que estudos reportam que a pele pode ser perfurada mais facilmente se a ponta das MAs for mais aguda (PEREIRA, 2019).

Figura 19 – Microagulhas (MA) de carboximetilcelulose.

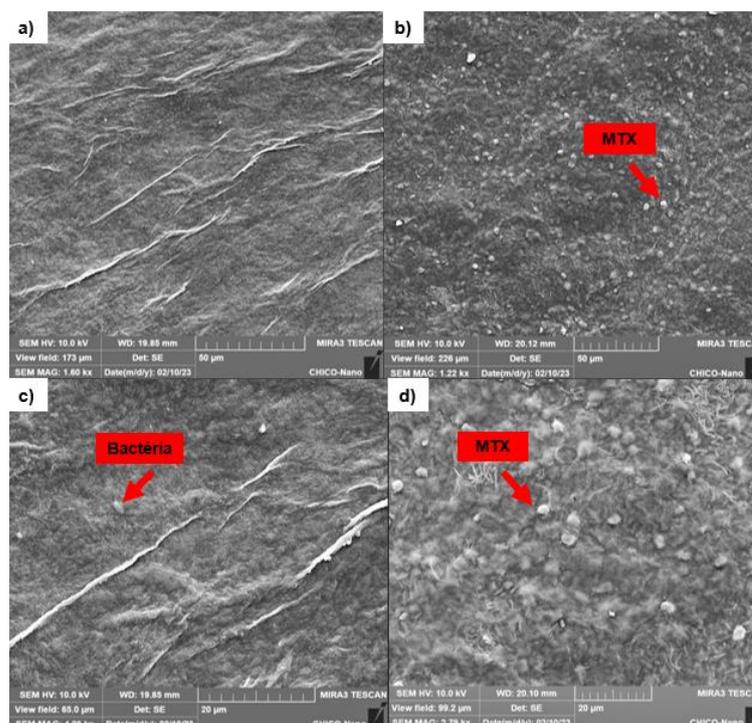


Fonte: A autora (2023).

6.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi realizada com o objetivo de observar a morfologia das nanofibrilas da celulose bacteriana e a presença do metotrexato incorporado. Na Figura 20 pode-se observar as micrografias da membrana pura (CB) e da membrana com o fármaco presente (CB/MTX).

Figura 20 - Micrografias de (a) CB com 1,66 Kx (b) CB/MTX com 1,22 Kx (c) CB com 4,26 Kx e (d) CB/MTX com 2,79 Kx.



Fonte: A autora (2023).

A Figura 20a mostra a morfologia de CB sem fármaco e seca após o processo de trituração, que apresenta uma rede 3D interconectada de nanofibras de celulose, e como resultado disso forma uma rede porosa e altamente fibrosa, e isso pode ser explicado pela organização hierárquica das cadeias celulósicas durante a produção (GALDINO, 2020). Ainda, a presença de bactérias (ou bacilos) pode ser notada nas micrografias, mesmo que de forma pouco aparente. Entretanto, esse fato é comum, pois as fibras são excretadas dessas células (DO NASCIMENTO et al., 2022).

A Figura 20b apresenta fotomicrografia da CB com MTX, que revelam partículas do fármaco incorporadas a matriz celulósica de CB, com formatos esféricos. As Figuras 20c e 20d mostram as mesmas estruturas que as Figuras 20a e 20b, porém com maior grau de magnitude, e assim mais facilmente de visualizar que a incorporação do MTX na matriz de celulose bacteriana foi efetuada de forma eficiente.

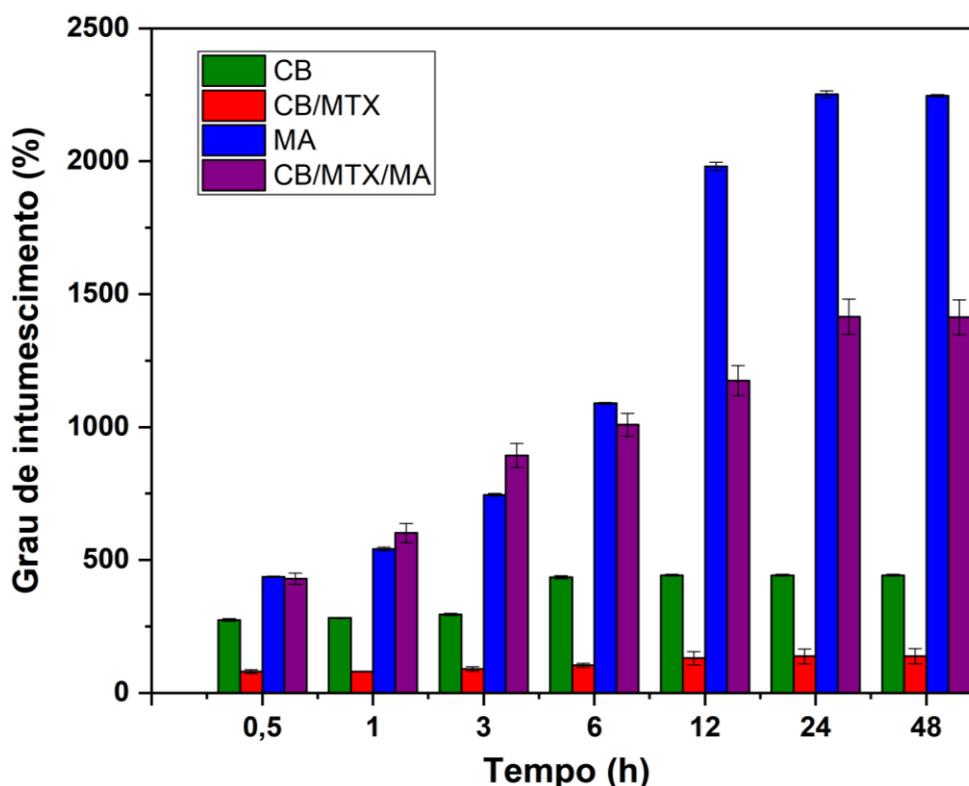
Uma grande perda de água, devido a sua propriedade higroscópica e a capacidade de absorver até 100 vezes sua massa (ALMEIDA et al., 2013). A CB e a CB//MTX que passaram pelo mesmo processo de trituração (Figuras 17b e c, respectivamente) sofreram desorganização das fibras, mas durante a secagem

voltaram a se organizar na estrutura. Todavia, as fibras foram preservadas e a cristalinidade aumentada, devido a redução do espaço entre as fibras.

6.4 AVALIAÇÃO DO INTUMESCIMENTO

A avaliação do intumescimento foi feita para a CB pura, MA pura, CB com fármaco (CB/MTX), e o adesivo com fármaco e microagulhas (MAs) (CB/MTX/MA). Nessa análise foi investigado o comportamento de aumento de volume dos materiais quando inseridos no fluido corpóreo, simulado pelo PBS (pH 7,4), e os graus de intumescimento em até 48h são mostrados na Figura 21 e na Tabela 2. (CHANG et al., 2017) investigaram o intumescimento de microagulhas de ácido hialurônico metacrilatado, também através da mudança de MAs antes e depois de serem inseridas em solução salina tamponada com fosfato (PBS), que é um método comum para avaliar a capacidade de intumescimento de materiais à base de hidrogel.

Figura 21 – Gráfico do grau de intumescimento para CB, CB/MTX e MA e CB/MTX/MA e os respectivos desvios padrão.



Fonte: A autora (2023).

Tabela 2 - Valores do grau de intumescimento para os materiais e seus respectivos desvios padrão.

| Tempo de análise (h) | Taxa de intumescimento (%) CB | Taxa de intumescimento (%) CB/MTX | Taxa de intumescimento (%) MA | Taxa de intumescimento (%) CB/MTX/MA |
|----------------------|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|
| 0,5 | 274,29 ± 4,70 | 80,33 ± 6,51 | 437,24 ± 2,16 | 429,36 ± 21,73 |
| 1 | 281,83 ± 1,86 | 80,49 ± 1,44 | 541,33 ± 7,57 | 601,47 ± 35,89 |
| 3 | 295,21 ± 3,88 | 90,23 ± 8,76 | 745,52 ± 5,23 | 892,90 ± 44,97 |
| 6 | 434,80 ± 5,68 | 104,15 ± 7,89 | 1089,29 ± 3,23 | 1008,78 ± 43,29 |
| 12 | 442,80 ± 3,33 | 130,87 ± 24,59 | 1980,80 ± 15,08 | 1175,07 ± 56,23 |
| 24 | 442,80 ± 3,33 | 137,53 ± 27,70 | 2252,17 ± 12,39 | 1415,34 ± 66,34 |
| 48 | 442,80 ± 3,33 | 137,94 ± 28,27 | 2246,80 ± 3,85 | 1413,25 ± 65,87 |

Fonte: A autora (2023).

Cada valor representa, portanto, a média de 5 ensaios. De forma geral, a celulose bacteriana pura (CB) apresenta alto grau de intumescimento quando comparado com a membrana com fármaco incorporado (CB/MTX), cerca de 3x maior. Isso é explicado pela característica hidrofílica da CB, que apresenta diversos grupos hidroxila dispostos na superfície (GOTTSCHALK et al., 2013), além de sua estrutura ser porosa e com alta capacidade de retenção de água (FONSECA et al., 2021).

Nota-se que o grau de inchaço aumentou com o tempo de imersão para todos os materiais. Para CB e CB/MTX o aumento foi de quase o dobro, de 274,29 ± 4,70 para 442,80 ± 3,33 após 12h, em CB, onde atingiu sua porcentagem de equilíbrio de intumescimento, e de 80,33 ± 6,51 para 137,53 ± 27,70 após 24h, para CB/MTX. Há, portanto, uma certa diferença, também, no tempo para atingir o ponto de equilíbrio, ou seja, o máximo de inchaço que o material apresenta, devido justamente a presença do MTX que infere à estrutura uma modificação na organização, levando mais tempo para se estabilizar no ensaio.

As amostras com microagulhas (MA e CB/MTX/MA) mostraram intumescimento altíssimo quando comparados com as amostras supracitadas (CB e CB/MTX), indicativo da absorção de fluido. No entanto, tanto MA quanto CB/MTX/MA apresentaram intumescimento com valores próximos, a partir de 30 minutos de teste, depois CB/MTX/MA aumenta o volume mais do que MA, em 1h e 3h de teste, e após isso ambos aumentaram. Tanto MA como CB/MTX/MA após 24h mostraram equilíbrio de intumescimento.

O fato do grau de MA ser maior do que o de CB/MTX/MA a partir de 6h de ensaio, pode ser explicado pela presença do MTX, que provavelmente não tem propriedade de intumescer como os outros materiais. Por outro lado, MA, que é nitidamente o material mais intumescível, devido a sua composição ser de carboximetilcelulose (CMC) e a presença do ácido cítrico (AC), tendo em vista que CMC é um material superabsorvente, conforme descreve Lara (2019), quando entra em contato com água, CMC tem a capacidade de interagir com o meio expandindo suas ligações através de reticulações absorvendo assim o meio em que está em contato.

Por fim, a capacidade de absorção de líquidos, nomeadamente intumescimento, é de suma importância para a regeneração do tecido no local da inserção, pois promove o processo de cicatrização e a posterior dissolução para que o fármaco seja entregue com boa biodisponibilidade. Para uma avaliação mais detalhada o teste deve ser feito em períodos maiores, até estabelecer um grau máximo de intumescimento e a completa dissolução dos materiais.

6.5 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)

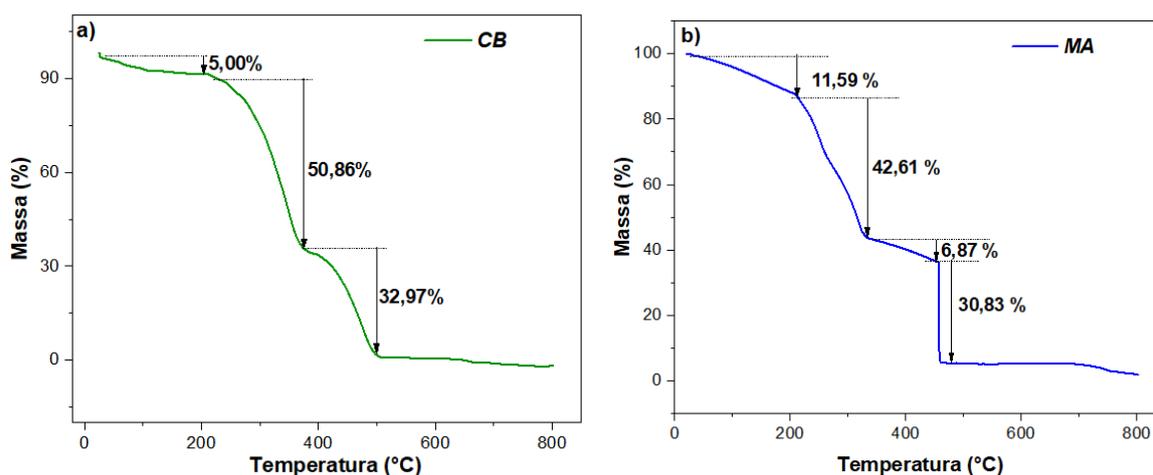
A temperatura máxima de decomposição de um produto é um critério de estabilidade térmica e a degradação térmica é afetada por fatores estruturais. A análise termogravimétrica, que relaciona o percentual de massa com a temperatura, em °C, foi realizada nos três materiais puros: CB, MA e MTX, e nos materiais combinados: membrana com fármaco (CB/MTX) e membrana com fármaco e microagulhas (CB/MTX/MA). As perdas de massa relativas a cada evento foram obtidas através de gráfico no software OriginPro e encontram-se nas Figuras 22 e 23.

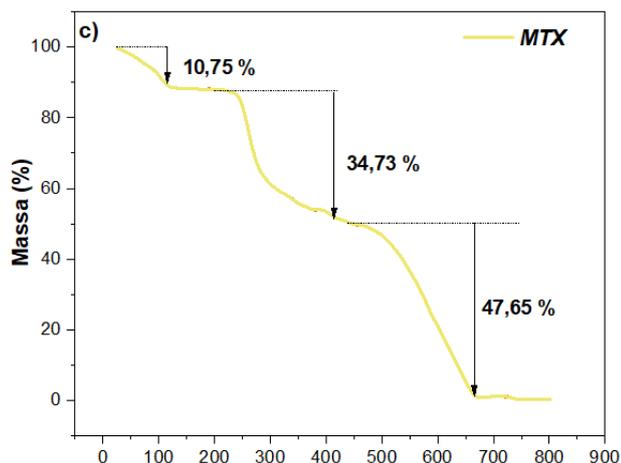
Para a amostra de celulose bacteriana pura (Figura 22a) inicialmente, foram observadas temperaturas de degradação na faixa de 30°C a 230°C, que são atribuídas a evaporação da água residual, com 5% de perda de massa, sendo considerado pouco, pois a CB já estava seca em estufa. Já no segundo estágio, em temperaturas mais altas, em torno de 250°C a 380°C, houve uma perda de massa maior, de 50,86%, característica da decomposição térmica da celulose. Nesta fase ocorre o processo de despolimerização, desidratação e decomposição das unidades de monossacarídeos, seguida da formação de resíduos de carbono, característico da celulose bacteriana (AMORIM, 2020; BARUD, 2010). No terceiro estágio, acima de 380 °C, houve a degradação termo-oxidativa (SASKA et al., 2011).

A Figura 22b ilustra a curva termogravimétrica da microagulha preparada a partir de carboximetilcelulose (CMC), ácido cítrico (AC) e celulose microcristalina (CM). No primeiro estágio ocorre a perda de 11,59% de massa, entre 35 e 210°C, relacionada à decomposição da porção inorgânica (KUMAR et al., 2020). Já no segundo estágio de 210 a 330°C a perda é de 42,61%, característica dos derivados de CMC, que apresentam um grande perfil de degradação térmica nessa faixa (PETTIGNANO; CHARLOT; FLEURY, 2019). Entre 330 e 450°C a massa perdida foi de 6,87%, e por fim uma perda rápida de 30,83% de massa, podendo ser inerente à reação de pirólise (KUMAR et al., 2020).

A Figura 22c mostra a curva termogravimétrica característica de MTX, que é característico pela perda inicial de água de hidratação com perda de massa de 10,75%. Após a remoção da água de hidratação, forma-se o metotrexato anidro, que apresenta uma boa estabilidade térmica no intervalo de temperatura de 127-194 °C, que mostra uma constante (FULIAS et al., 2014). Logo após é possível observar um segundo evento na curva de TGA com perda de massa de 34,73% e pico em 240°C, e em seguida inicia sua decomposição com uma perda de massa de 47,65% e termina em 660°C (GARCIA, 2014).

Figura 22 – Termogramas de (a) membrana pura de CB (b) microagulha (MA) (c) metotrexato (MTX) puro.

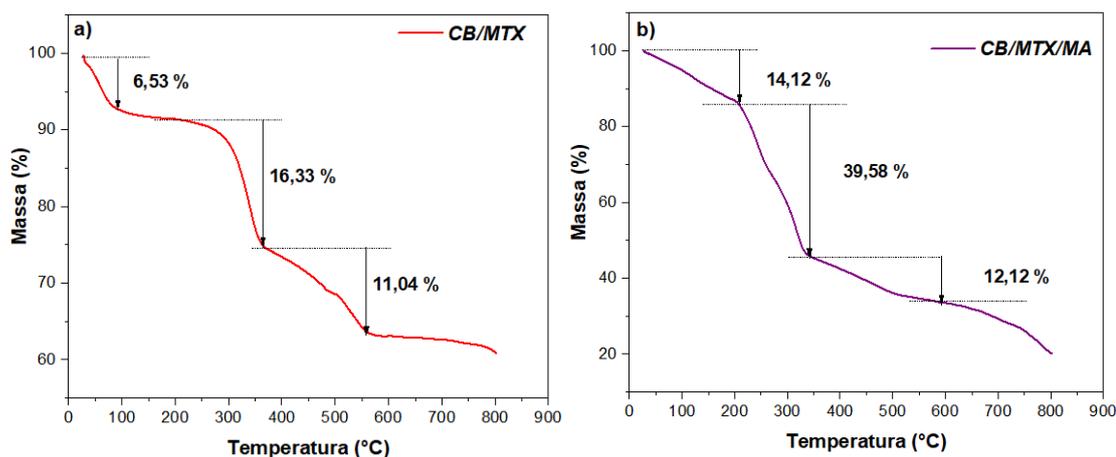




Fonte: A autora (2023).

Para CB/MTX e para CB/MTX/MA o primeiro estágio foi atribuído ao teor de água livre, observado no intervalo de temperatura de 30 a 95°C, para a CB/MTX, apresentando uma perda de massa igual a 6,53% e para CB/MTX/MA de 30 a 210°C, com perda de massa de 14,12%. O segundo estágio, de 200 a 370°C com 16,33% de perda em CB/MTX, e de 210 a 340°C com 39,58% de perda para CB/MTX/MA, que pode ser atribuído à decomposição térmica do biomaterial para ambas as amostras (Figura 23). Além disso, no estágio final ambas as amostras apresentam cerca de 12% de perda, relacionadas a decomposição dos materiais.

Figura 23 – Termograma de (a) CB/MTX (b) CB/MTX/MA.

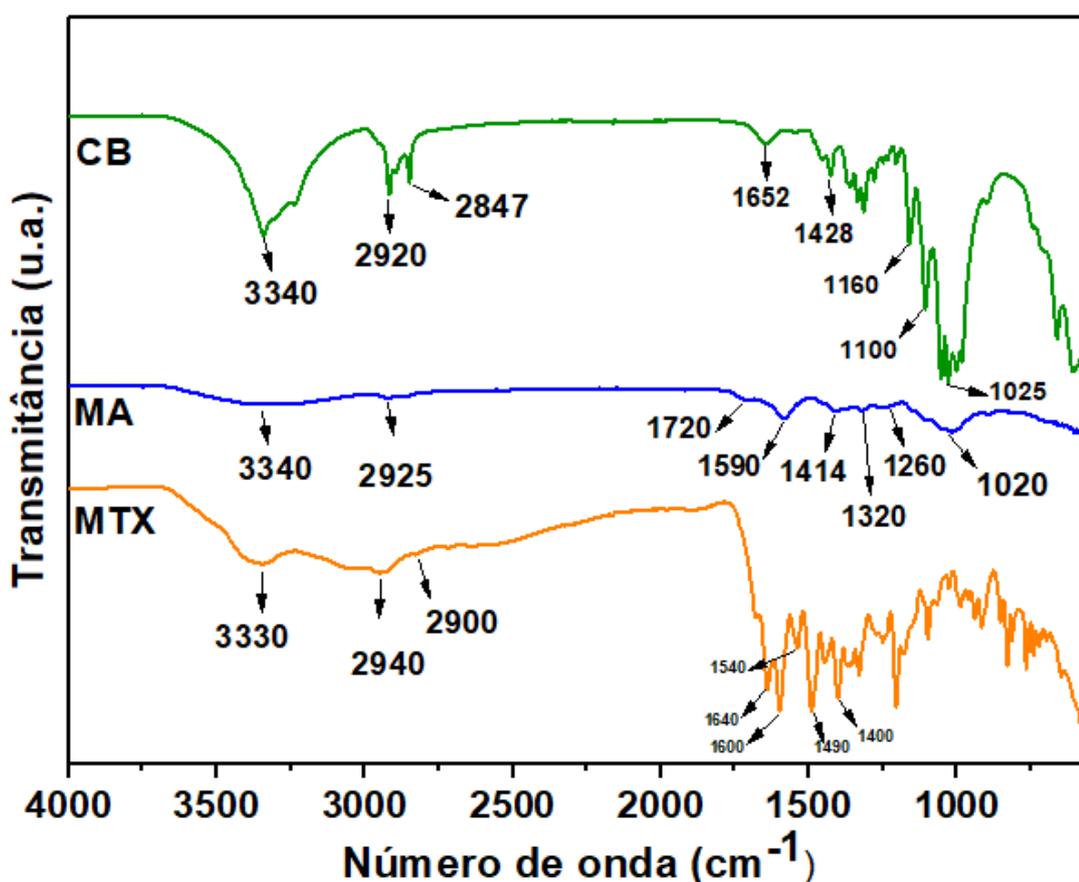


Fonte: A autora (2023).

6.6 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

As amostras foram também analisadas por espectroscopia de infravermelho, com o objetivo de identificar o MTX incorporado nos materiais. As Figuras 24 e 25 mostram os espectros representativos da CB, MA e MTX e dos materiais incorporados CB/MTX e CB/MTX/MA.

Figura 24 - Espectros FTIR da celulose (CB), microagulha (MA) e metotrexato (MTX).



Fonte: A autora (2023).

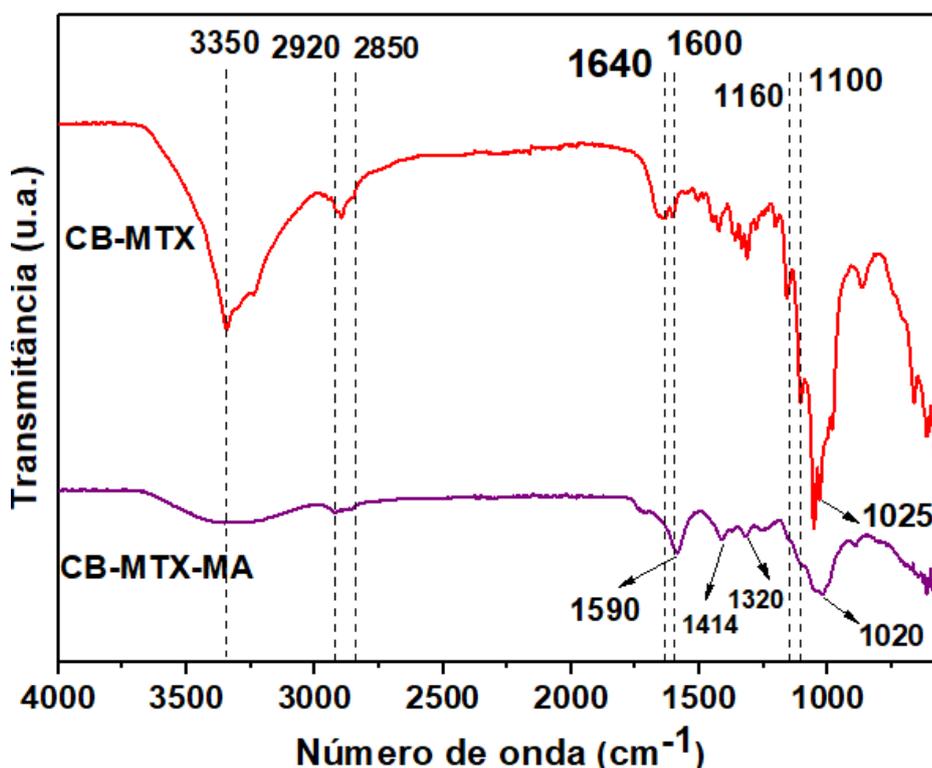
A membrana de celulose bacteriana (CB) exibiu picos de absorção, conforme mostra a Figura 24, em 3340 cm^{-1} atribuído ao grupo -OH , e em 2920 cm^{-1} atribuído ao estiramento C-H , o pico em 2847 cm^{-1} pode ser atribuído ao alongamento C-H , que pode ser ainda apresentado por vários picos em 1428 cm^{-1} , representando as vibrações de flexão de CH . A banda em 1652 cm^{-1} é atribuída ao grupo carbonila presente na celulose bacteriana, em 1160 cm^{-1} , 1100 cm^{-1} e em 1025 cm^{-1} representam a estrutura polissacarídica da CB (WAHID et al., 2019).

O espectro FTIR de microagulha (MA) (Figura 24) exibiu a banda observada em 3340 cm^{-1} relacionada ao alongamento do O-H , e em 2925 cm^{-1} ao alongamento

do CH₂, bandas próximas a 1590 cm⁻¹ de absorção, que são atribuídas ao alongamento do grupo carboxila, a banda em 1414 cm⁻¹ é relacionada a ligação -CH₂, e a ligação OH, que se estende até no plano em 1320 cm⁻¹. E a banda 1020 cm⁻¹ corresponde ao alongamento do grupo éter carboximetilado (FONTES et al., 2018), proveniente do composto principal da microagulha, carboximetilcelulose (CMC). Ainda, conforme está descrito na literatura a coexistência de carboxilatos (bandas nos 1590 cm⁻¹, 1414 cm⁻¹ e 1320 cm⁻¹) e de ácidos carboxílicos (bandas nos 1720 cm⁻¹ e 1260 cm⁻¹) ocorre devido à substituição do Na⁺ por H⁺ nas cadeias do CMC durante a acidificação promovida pelo ácido cítrico (AC) (PEREIRA, 2019).

O espectro do metotrexato (Figura 24) apresenta as seguintes bandas: uma banda cerca de 1640 cm⁻¹ correspondente ao C=O também caracteriza o ácido presente na molécula. O anel aromático (C=C) caracteriza-se por três bandas aparentes, cerca de 1600 cm⁻¹, 1540 cm⁻¹ e 1490 cm⁻¹. O ácido carboxílico presente na composição e o grupamento O-H pode ser caracterizado entre as bandas de 2900 - 3200 cm⁻¹. Porém, conforme (GARCIA, 2014) explica em seu trabalho, as amins possuem picos em cerca de 3300-3400 cm⁻¹, e por isso, nesse caso, o FTIR não é a melhor técnica para identificá-la, pois a banda larga característica do ácido pode não deixar o pico da amina distinto (GARCIA, 2014; RUDNIK et al., 2020).

Figura 25 - Espectros FTIR de CB/MTX e CB/MTX/MA.



Fonte: A autora (2023).

O espectro FTIR da membrana com fármaco (CB/MTX) apresenta picos de absorção característicos da celulose (CB) e do metotrexato (MTX), comprovando a incorporação do fármaco na membrana de celulose bacteriana. Na Tabela 3 estão apresentadas as principais atribuições relativas a CB/MTX. E mesmo que o processo de produção do material (CB/MTX) seja novo, as interações podem ser confirmadas pelas bandas presentes, relacionados a cada material, como mostram (WAHID et al., 2019) sobre CB e (GARCIA, 2014) sobre MTX.

Tabela 3 - Atribuições das bandas características no espectro de FTIR de CB/MTX.

| Número de onda (cm⁻¹) | Atribuições |
|---|--|
| 3350 | grupo -OH |
| 2920 | estiramento C-H |
| 2850 | alongamento C-H |
| 1640 | ligação C=O do MTX |
| 1600 | anel aromático (C=C) do MTX |
| 1160, 1100 e 1025 | Vibrações característicos da estrutura de polissacarídeo de CB |

Fonte: A autora (2023).

O espectro FTIR de CB/MTX/MA apresenta as mesmas bandas da membrana com o fármaco (CB/MTX), porém com bandas adicionais presentes, referentes aos compostos da microagulha (MA), presente no sistema. Na Tabela 4 estão apresentados as principais atribuições relativas a CB/MTX/MA. Como nas bandas 1590 cm⁻¹, que é atribuída ao alongamento carboxila, a banda observada em 1414 cm⁻¹ é relacionada a ligação -CH₂, e a ligação OH, que se estende até no plano em 1320 cm⁻¹, e a banda 1020 cm⁻¹ corresponde ao alongamento do grupo éter carboximetilado (FONTES et al., 2018; PEREIRA, 2019). Portanto, comprovando a presença dos compostos no sistema dos três materiais, celulose, metotrexato e as microagulhas produzidas com carboximetilcelulose (CMC).

Tabela 4 - Atribuições das bandas características no espectro de FTIR do sistema CB/MTX/MA.

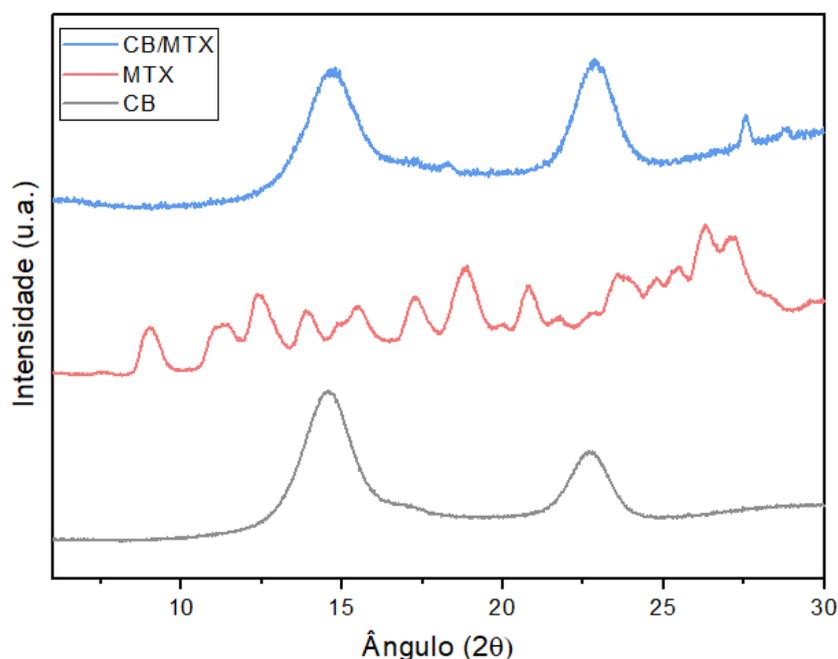
| Número de onda (cm⁻¹) | Atribuições |
|---|--|
| 3350 | grupo -OH |
| 2920 | estiramento C-H |
| 2850 | alongamento C-H |
| 1640 | ligação C=O do MTX |
| 1600 | anel aromático (C=C) do MTX |
| 1160, 1100 e 1025 | Vibrações característicos da estrutura de polissacarídeo de CB |
| 1590 | alongamento do grupo carboxila |
| 1414 e 1320 | ligação -CH ₂ e a ligação OH |
| 1020 | alongamento do grupo éter carboximetilado de MA |

Fonte: A autora (2023).

6.7 DIFRATOMETRIA DE RAIOS X (DRX)

Para confirmação da estrutura cristalina, os difratogramas de raios X das amostras de celulose bacteriana pura (CB), metotrexato puro (MTX) e a membrana com fármaco incorporado (CB/MTX) estão ilustradas na Figura 26, bem como os valores correspondentes à cristalinidade estão compilados na Tabela 5. Desse modo, a análise de DRX foi realizada com o objetivo de verificar a cristalinidade, dos precursores (CB pura e MTX puro) e de CB/MTX, para assim identificar a presença do MTX incorporado na membrana. Entretanto, os materiais com microagulhas presentes não foram avaliados por essa técnica, pois são materiais completamente amorfos segundo (PEREIRA, 2019), e como o objetivo do DRX consiste na verificação do material cristalino presente através do pico característico, seria inviável para as MAs.

Figura 26 – Difratomogramas de membrana de celulose bacteriana pura (CB), metotrexato (MTX) e membrana de celulose com metotrexato (CB/MTX).



Fonte: A autora (2023).

O difratograma de raios X do MTX apresentou picos de cristalinidade de maior intensidade na região de 9° a 28°. Essa região de maior intensidade está relacionada ao tipo de estrutura do cristal de fármaco, tendo em vista que o MTX apresenta polimorfismo, todavia, pode-se observar outros difratogramas típicos de acordo com os níveis de organização de suas moléculas e estrutura formada (BONI, 2017). Ainda, segundo Rudnik et al., (2020) e (GARCIA, 2014) os picos em $2\theta = 9,16^\circ$, $12,8^\circ$, $19,42^\circ$ e $26,74^\circ$, e outros de menor intensidade, mostrando a cristalinidade característica do MTX. Os resultados estão de acordo com os resultados encontrados por Garcia (2014). Ao analisar o difratograma de raios-X para o MTX puro, diferentes picos de cristalinidade são observados e isso indica a natureza cristalina do fármaco, com 87,39% de cristalinidade (Tabela 5) (DHANKA; SHETTY; SRIVASTAVA, 2018).

Tabela 5 - Percentual de cristalinidade da membrana pura (CB), do MTX puro e da membrana com MTX (CB/MTX).

| Amostra | Cristalinidade (%) |
|---------|--------------------|
| CB | 53,77 |
| MTX | 87,39 |
| CB/MTX | 72,81 |

Fonte: A autora (2023).

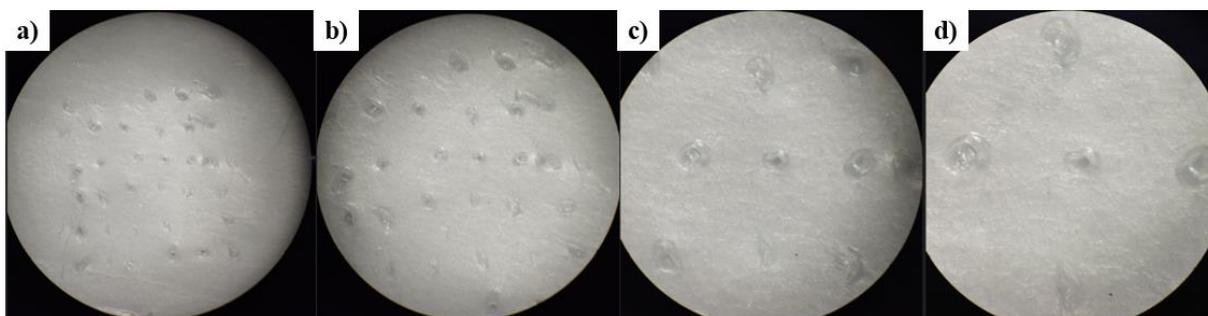
Já a celulose bacteriana (CB) é um biopolímero semicristalino, de forma que duas fases cristalinas estão presentes em sua estrutura: α e β , referentes às estruturas triclinica e monoclinica, respectivamente (AIRES et al., 2018). Para confirmação dessa estrutura, os difratogramas de raios X das amostras de celulose bacteriana após trituradas e secas estão ilustradas na Figura 26, onde é possível observar os picos característicos nos ângulos em torno de 14° e 22° , os quais equivalem aos planos $(-1\ 1\ 0)$ e $(2\ 0\ 0)$, respectivamente. E por fim, a CB apresentou cristalinidade de acordo com a literatura, de 53,77% (ZAPAROLLI, 2015).

Por fim, na Figura 26 é mostrado, ainda, o difratograma de CB/MTX, onde os dois picos característicos da CB são observados com clareza e apenas um pico do MTX é evidenciado. Contudo, mesmo que o processo de trituração desordene as fibras na estrutura semicristalina da CB, durante o resfriamento as cadeias que são aleatórias e entrelaçadas tendem a adquirir uma configuração ordenada, portanto, aumenta a cristalinidade do material e para que isso ocorra, deve ser dado tempo suficiente para que as cadeias se movam e se alinhem umas com as outras (CALLISTER JR.; RETHWISCH, 2013). Portanto, durante o processo de secagem as fibras se reorganizam e voltam a sua estrutura semicristalina, mesmo que apresente 72,81% de cristalinidade, que pode ser atribuído a natureza cristalina do MTX e semicristalina da CB. Portanto, mesmo que os picos mais aparentes do DRX sejam da CB, o MTX está presente, sendo possível a comprovação por outras técnicas de caracterização efetuadas, como MEV e FTIR.

6.8 TESTE MECÂNICO DE MICROAGULHAS

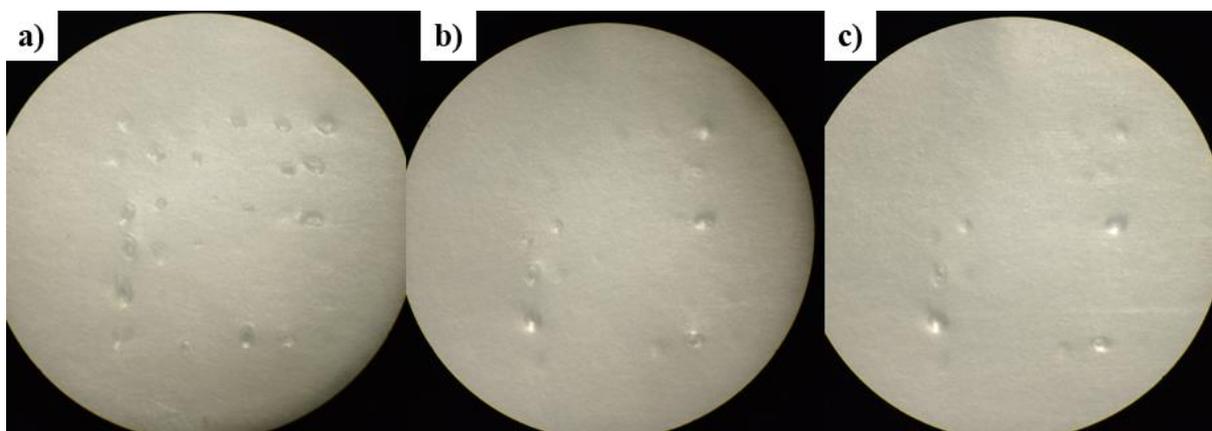
Para transportar o MTX através da pele, as MAs precisam ser resistentes mecanicamente para perfurar o estrato córneo, sem que dobrem ou quebrem antes do processo. De modo que, será por meio dos canais formados pelas MAs que o MTX da membrana CB/MTX irá permear. A resistência mecânica da MAs pode ser afetada por vários fatores, como o raio da ponta, composição do material, geometria, proporção, etc (DU et al., 2019; ZHANG et al., 2021). Tendo isso em vista, testes mecânicos de caráter qualitativo foram realizados, primeiro com Parafilm M®, onde as MAs foram inseridas em camadas formadas desse filme e observada por microscópio ótico (Figuras 27 e 28) e posteriormente com pele de porco (seção subsequente).

Figura 27 – Imagem microscópica de Parafilm M® após inserção das microagulhas na primeira camada com ampliações de (a) 1,0x (b) 1,5x (c) 2,0x (d) 3,0x.



Fonte: A autora (2023).

Figura 28 – Parafilm M® após inserção das microagulhas com ampliações de 1,0x das camadas (a) segunda (b) terceira (c) quarta.



Fonte: A autora (2023).

A observação das camadas de Parafilm M® por microscópio revelou que as amostras têm capacidade de penetrar a barreira formada, até a quarta camada. Na primeira camada (Figura 27) 27 furos foram contados, na segunda, terceira e quarta foram contados 19, 6 e 5, respectivamente, conforme mostra a Figura 28.

Entretanto, conforme descrevem (ZHANG et al., 2021) o método de contagem de furos é simples e intuitivo, mas é inevitável que existam alguns erros humanos, como erros de visualização de furos, por isso que é necessário um teste complementar, como no caso da inserção na pele de porco.

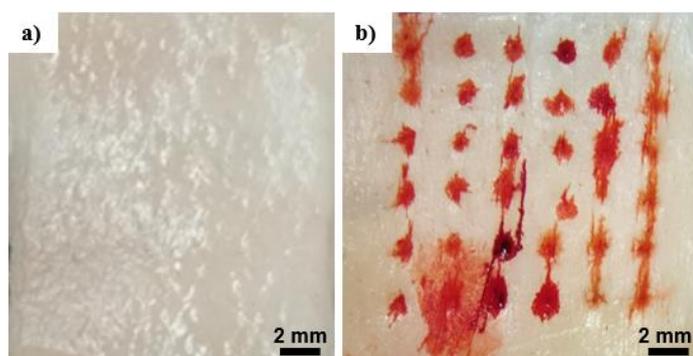
6.9 INSERÇÃO DE MICROAGULHAS NA PELE DE PORCO

A capacidade de penetração das microagulhas (MAs), geralmente, é julgada observando as alterações morfológicas das MAs ou os orifícios na pele após serem inseridas na pele. Alguns experimentos usaram membranas artificiais em vez de pele

para testar o desempenho de inserção de MAs, outros inseriram MAs na pele do porco e tingiram a pele do porco com corantes diversos, desde azul de metileno, violeta de metila e vermelho do congo para avaliar o desempenho da punção das MAs (ZHANG et al., 2021).

A inserção da pele foi avaliada após a penetração manual do sistema CB/MTX/MA na pele de porco e, após a remoção, corante vermelho do congo foi depositado na superfície e foram observados poros correspondentes ao local de inserção (Figura 29). Como análise qualitativa, a inserção da matriz de microagulha na pele teve como objetivo avaliar a capacidade de penetração na pele para vencer a barreira do estrato córneo e calcular a eficácia de penetração, visto que o metotrexato será entregue através dos microcanais formados, conforme (NGUYEN et al., 2018), que descreveram que esta observação indica uma excelente eficiência de penetração das microagulhas na pele humana.

Figura 29 - Microcanais criados em pele de porco (a) pele não tratada (b) pele tratada com microagulhas e corante vermelho do congo.



Fonte: A autora (2023).

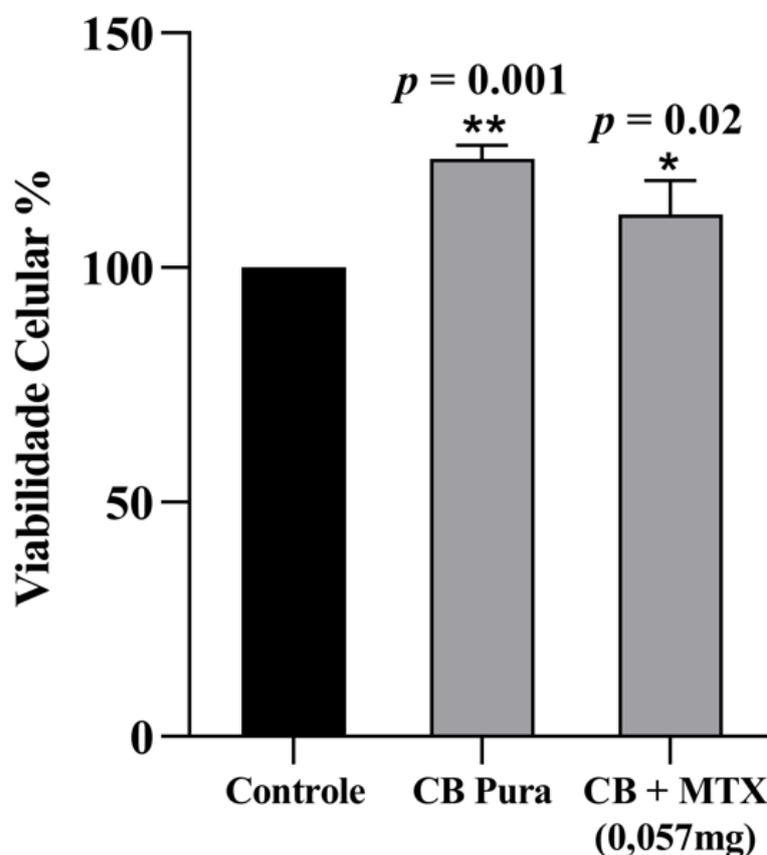
Uma imagem da pele de porco após o tingimento é mostrada na Figura 29, onde pode ser observado que a pele apresentou 32 furos, tendo em vista que a matriz apresenta 36 agulhas (6x6), portanto com uma eficácia de penetração de 88,9%. Logo, esses resultados confirmam a capacidade de inserção de CB/MTX/MA e a criação de vias para permitir a entrega de moléculas ativas com sucesso, superando a barreira do estrato córneo e atingindo a derme.

6.10 ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE

O teste de toxicologia *in vitro* foi realizado a fim de avaliar se as membranas de celulose produzidas apresentam toxicidade para o crescimento celular provocando alguma alteração ou morte, além da influência da adição de MTX. O ensaio foi realizado em triplicata por material e a viabilidade celular em todas as amostras foi medida por ensaio de MTT baseado na absorção óptica.

Não obstante, o ensaio foi realizado para as amostras de MA e o para sistema CB/MTX/MA. Todavia, as microagulhas dissolveram, como era esperado, mas isso deixou o meio turvo e interferiu na leitura, portanto, nesse caso não foi possível avaliar a biocompatibilidade dessas amostras. Contudo, conforme (PEREIRA, 2019) demonstrou, microagulhas de CMC, apresentaram viabilidade celular, cerca de 95%, demonstrando que as MAs não são citotóxicas. A Figura 30 apresenta o gráfico de viabilidade celular para as amostras de CB e CB/MTX, além do controle, que são as células Vero sem material adicionado.

Figura 30 - Viabilidade celular das células Vero nas membranas de celulose pura (CB pura) e com metotrexato (CB/MTX).



Fonte: A autora (2023).

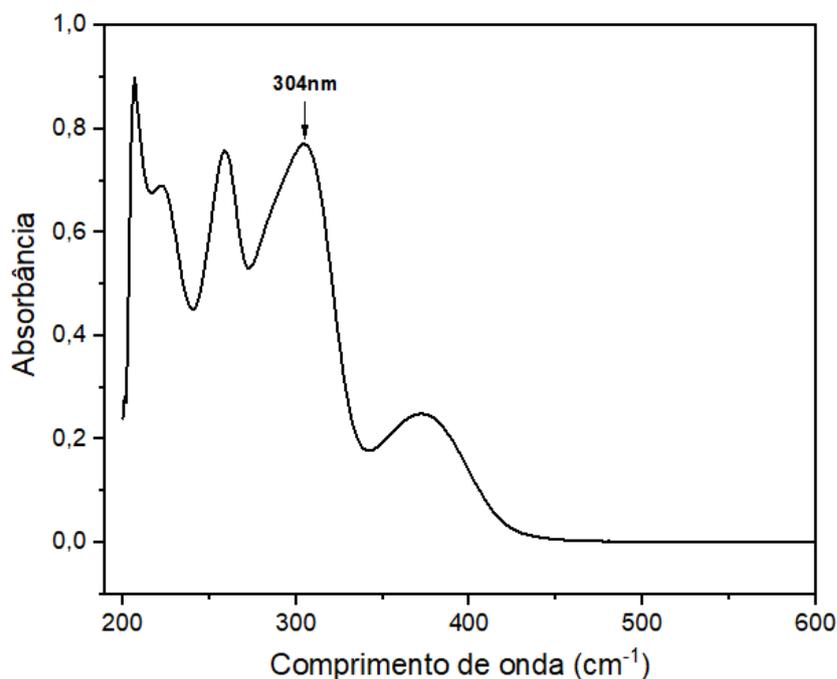
Conforme observado na Figura 30 os materiais produzidos CB e CB/MTX não tiveram impacto negativo, sendo a viabilidade celular muito acima do percentual de potencial citotóxico. De modo que, conforme a norma ISO 10993-12 se a viabilidade celular for reduzida para valores inferiores a 70% o material apresenta potencial citotóxico. Dessa forma, pode-se inferir que os biomateriais desenvolvidos não demonstram toxicidade.

As amostras de CB pura apresentaram um percentual de $123,187 \pm 2,3\%$ de viabilidade celular e as amostras com MTX um percentual de $111,367 \pm 5,8\%$. Dessa forma, foi observado que a incorporação de MTX na matriz de celulose influenciou em um pequeno aumento do potencial citotóxico do material, de 11,87%, que pode ser justificada pela presença dos principais metabólitos do MTX, os poliglutamatos, que podem ser retidos nos tecidos pela formação de cadeias de poliglutamatos e, desse modo, contribuem para a ação farmacológica ou tóxica nas células após exposição ao MTX (BARBISAN, 2014). Por conseguinte, ambos os materiais (CB e CB/MTX) não são citotóxicos para as células Vero, o que indica que são adequados para fins de aplicações biomédicas.

6.11 DETERMINAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE MTX NA CB

O objetivo para validar um método analítico é garantir a segurança e a reprodutibilidade da técnica, no qual o valor de amostragem está próximo ao valor verdadeiro (padrão) e para isso devem ser realizados distintos testes. A Figura 31 mostra o espectro de absorção do MTX entre 200 e 600nm, com distintos picos de máxima absorção em diferentes comprimentos de onda, porém os picos de comprimentos de onda mais baixos e mais altos, geralmente, sofrem interferências, por isso não convêm que sejam selecionados. Portanto, o comprimento de onda de máxima absorção mais adequado para ser utilizado na análise quantitativa do MTX foi o de 304nm (GARCIA, 2014).

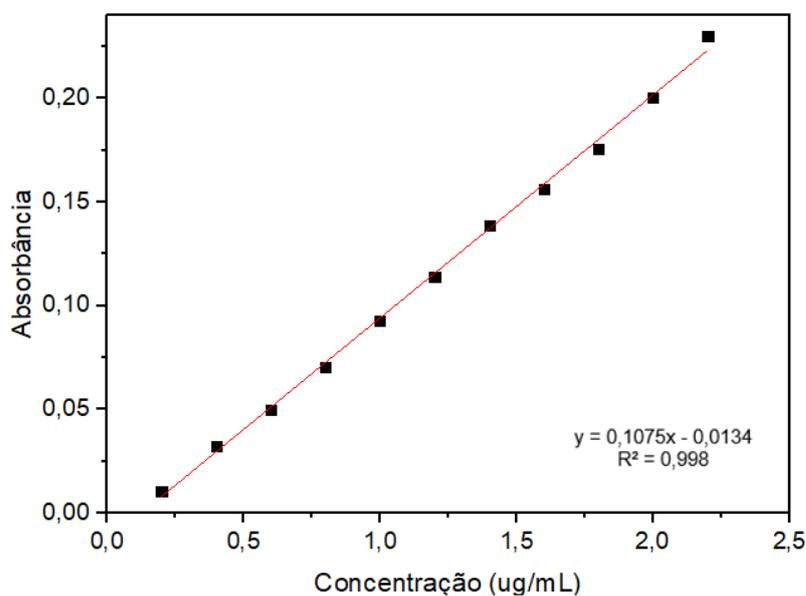
Figura 31 - Espectro de absorção do MTX em UV-Vis, concentração de 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, tampão fosfato monobásico 0,1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,4.



Fonte: A autora (2023).

A Figura 32 exibe a curva analítica de absorbância em função da concentração de MTX e apresenta equação da reta: $y = 0,1075x - 0,0134$ e $R^2=0,998$. A linearidade foi verificada com soluções padrão de metotrexato na faixa de concentração de 0,2-2,2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A curva padrão foi analisada por regressão linear da absorbância versus concentração de metotrexato.

Figura 32 - Curva padrão de soluções de MTX, com concentrações de 0,2 e 2,2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.



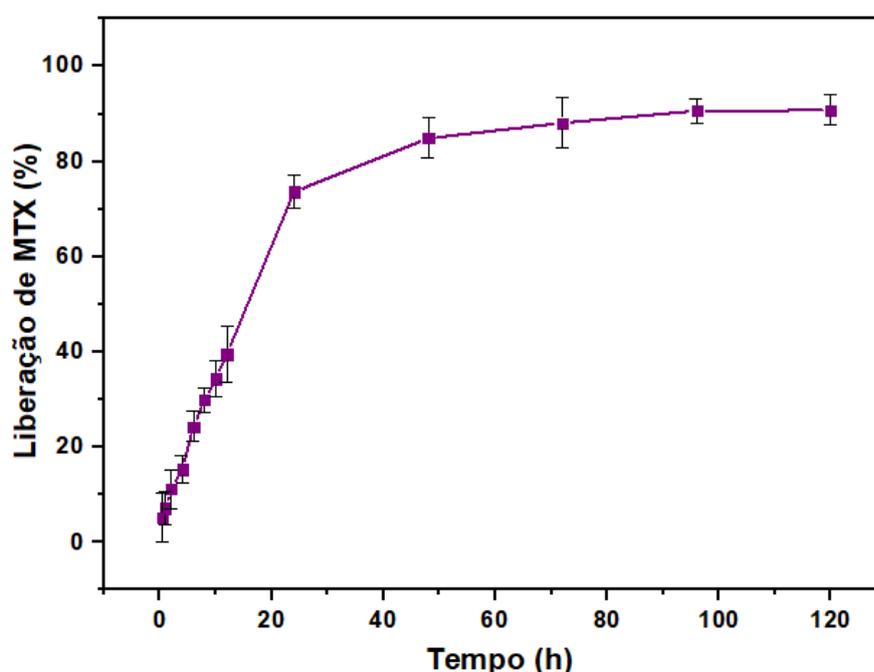
Fonte: A autora (2023).

De acordo com a literatura (BRASIL, 2003), o coeficiente de correlação $R^2 = 0,998$ encontra-se dentro dos limites estabelecidos e pode-se concluir que o método é considerado linear dentro da faixa de concentração de $0,2$ e $2,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

6.12 LIBERAÇÃO IN VITRO DE MTX INCORPORADO NA CB

Os ensaios de liberação in vitro foram realizados em PBS (pH 7,4) durante 120h, para investigar o perfil de liberação do metotrexato (MTX) do sistema CB/MTX/MA e obter uma compreensão sobre sua capacidade de entrega. O MTX foi liberado de forma dependente do tempo, como mostra a Figura 33 e a Tabela 6.

Figura 33 - Perfil de liberação do metotrexato no sistema CB/MTX/MA e seus respectivos desvios padrão.



Fonte: A autora (2023).

Uma liberação inicial de fármaco com perfil gradual pode ser observada, e isso pode ser atribuído ao comportamento de intumescimento dos materiais do sistema, principalmente das microagulhas, que apresentam alto grau de intumescimento em pouco tempo, contribuindo para a retenção do fármaco na pele e assim retardar o processo de permeação (DU et al., 2019).

Tabela 6 – Quantidade de MTX liberado em função do tempo e seus respectivos desvios padrão.

| Tempo (h) | Liberação de MTX (%) no sistema CB/MTX/MA |
|-----------|--|
| 0,5 | 5,1 ± 5,0 |
| 1 | 7,2 ± 3,5 |
| 2 | 11,2 ± 4,0 |
| 4 | 15,3 ± 2,9 |
| 6 | 24,3 ± 3,2 |
| 8 | 29,9 ± 2,5 |
| 10 | 34,3 ± 3,9 |
| 12 | 39,5 ± 5,8 |
| 24 | 73,6 ± 3,5 |
| 48 | 84,8 ± 4,2 |
| 72 | 88,1 ± 5,3 |
| 96 | 90,6 ± 2,5 |
| 120 | 90,7 ± 3,2 |

Fonte: A autora (2023).

O sistema apresenta desempenho ideal de liberação sustentada, visto que em 8h quase 30% do fármaco foi disponibilizado no meio. Entre 12 e 24 horas a taxa quase dobrou, de $39,52 \pm 5,8\%$ para $73,65 \pm 3,5\%$, que pode ser atribuído a dissolução das microagulhas (MA) e provavelmente ao intumescimento da CB e provável liberação do MTX do sistema CB/MTX/MA, que ao serem dissolvidas aumentam o tamanho dos poros, tendo em vista que, conforme Wang e Yan (2017) explicam, a taxa de difusão de MTX livre em poros maiores é maior do que em poros menores e, portanto, o MTX desorvido pode se difundir mais rapidamente de poros maiores para meios de liberação em massa do que de poros menores.

Posteriormente, após 48h, a taxa de liberação tornou-se progressivamente mais lenta, mantendo-se quase inalterada. Finalmente, a quantidade cumulativa não foi alterada significativamente após 96h, com a porcentagem final por volta de 90%. Por fim, a quantidade máxima do fármaco foi liberada do sistema em 120 horas, quando não houve mais alterações e o sistema foi dissolvido pelo meio.

7 PERSPECTIVAS

Como perspectivas, pode-se realizar a continuação do estudo de CB/MTX e CB/MTX/MA e com outros métodos e outros testes, como:

- Produzir microagulhas com metotrexato incorporado;
- Produzir moldes e microagulhas em tamanhos e geometria reduzidos;
- Fazer testes mecânicos de forma quantitativa, como compressão mecânica;
- Realizar testes *in vivo* em camundongos;
- Realizar testes com Células T com o sistema CB/MTX/MA, para avaliar a proliferação das células, visto que se espera que o metotrexato iniba o crescimento desse tipo de célula, pois é a responsável pelo desencadeamento da psoríase.

8 CONCLUSÃO

Neste trabalho pode-se inferir que a incorporação de MTX em CB/MTX e em CB/MTX/MA foi confirmada a partir dos resultados obtidos. No MEV foi observado a diferença superficial na microestrutura de CB com a presença de MTX, além da mudança de coloração observada por microscopia óptica.

Pelo DRX, CB/MTX mostrou cristalinidade intermediária dos dois materiais, bem como os principais picos característicos, como era esperado. CB e MA mostraram alto grau de intumescimento quando comparados a CB/MTX e CB/MTX/MA, que mostraram menor grau de intumescimento, relacionados a presença do fármaco em ambos, que reduz essa propriedade. MAs apresentaram estrutura com pontas afiadas, base resistente e espaçamento entre as agulhas conforme o esperado.

Os testes mecânicos, mesmo que de maneira qualitativa, indicaram que as MAs penetraram com sucesso na barreira simulada. Tendo em vista que após a remoção das MAs, uma matriz de microporos no filme e na pele foram observados, excelente para que o MTX seja transportado da membrana pelos canais até a epiderme.

As curvas termogravimétricas de CB/MTX e CB/MTX/MA demonstraram que houve uma diminuição de estabilidade térmica após a adição de MA, pois em CB/MTX a estabilidade térmica é maior, e em CB/MTX/MA a curva se mostra mais instável a partir do segundo estágio, por volta de 200°C, pela presença de MN na composição.

Ainda, a análise citotóxica demonstrou que não há toxicidade para CB e CB/MTX, indicando que podem ser utilizados em aplicações biomédicas, pois apresentam viabilidade celular acima do esperado, por volta de 123 e 111%, respectivamente.

A incorporação do MTX em CB foi confirmada, também, através do teste de liberação *in vitro* que mostrou liberação gradual inicialmente e desempenho de liberação sustentada, ou seja, o MTX foi liberado de modo gradativo. E ainda, após 24h quase 73% do fármaco incorporado na CB foi liberado, indicando um ótimo sistema para entrega via transdérmica.

Dessa forma, CB/MTX/MA demonstrou ser promissor para aplicação no setor biomédico como biomaterial para liberação de metotrexato no tratamento de doenças dermatológicas.

REFERÊNCIAS

- ADEPU, S.; KHANDELWAL, M. Ex-situ modification of bacterial cellulose for immediate and sustained drug release with insights into release mechanism. **Carbohydrate Polymers**, v. 249, p. 116816, 1 dez. 2020.
- AGGARWAL, G.; DHAWAN, S.; HARIKUMAR, S. L. Natural Oils as Skin Permeation Enhancers for Transdermal Delivery of Olanzapine: In Vitro and In Vivo Evaluation. **Current Drug Delivery**, v. 9, p. 172–181, 2012.
- AGOSTINHO, K. M. et al. Doenças dermatológicas frequentes em unidade básica de saúde. **Cogitare Enfermagem**, v. 18, n. 4, 30 dez. 2013.
- AIRES, R. S. et al. **Produção e avaliação da cristalinidade de biopolímeros de celulose bacteriana: influência da temperatura de secagem**. 2018. Disponível em: <<https://www.doity.com.br/anais/4encontroabpolne/trabalho/66862>>. Acesso em: 21 nov. 2023
- ALKILANI, A. Z.; MCCRUDDEN, M. T. C.; DONNELLY, R. F. Transdermal Drug Delivery: Innovative Pharmaceutical Developments Based on Disruption of the Barrier Properties of the stratum corneum. **Pharmaceutics**, v. 7, n. 4, p. 438, 22 out. 2015.
- ALMEIDA, D. M. et al. Propriedades Físicas, Químicas e de Barreira em Filme Formados por Blenda de Celulose Bacteriana e Fécula de Batata. **Polimeros**, v. 23, n. 4, p. 538–546, 10 abr. 2013.
- AMORIM, J. D. P. DE. **Obtenção de celulose bacteriana aditivada com extrato de própolis para aplicação em cosméticos**. Dissertação de mestrado—Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2020.
- ARMSTRONG, A. W.; READ, C. Pathophysiology, Clinical Presentation, and Treatment of Psoriasis: A Review. **JAMA**, v. 323, n. 19, p. 1945–1960, 19 maio 2020.
- BAO, L. et al. Implantation of air-dried bacterial nanocellulose conduits in a small-caliber vascular prosthesis rabbit model. **Materials Science and Engineering C**, v. 122, 1 mar. 2021.
- BARBISAN, F. **Efeito farmacogenético e farmacogenômico do metotrexato na citotoxicidade de células mononucleares periféricas do sangue**. Dissertação de mestrado—Santa Maria RS: Universidade Federal de Santa Maria, 2014.

BARUD, H. DA S. **Novos Materiais Multifuncionais Baseados em Celulose Bacteriana**. Tese de doutorado—Araraquara: UNESP – Universidade Estadual Paulista, 2010.

BONATTO, M. R. DE O. Associação entre exposição a fatores de risco ambientais e psoríase. 18 nov. 2022.

BONI, F. I. **Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas com propriedades mucoadesivas baseadas em ácido hialurônico para liberação cólon específica de metotrexato**. Dissertação de mestrado—Araraquara-SP: Universidade Estadual Paulista, 2017.

CALLISTER JR., W. D.; RETHWISCH, D. G. **Materials science and engineering: an introduction**. 9th. ed. Rio de Janeiro: John Wiley & Sons, Inc, 2013.

CAO, Y. et al. Development of sinomenine hydrochloride-loaded polyvinylalcohol/maltose microneedle for transdermal delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 35, p. 1–7, 1 out. 2016.

CHANG, H. et al. A Swellable Microneedle Patch to Rapidly Extract Skin Interstitial Fluid for Timely Metabolic Analysis. **Advanced Materials**, v. 29, n. 37, p. 1702243, 1 out. 2017.

CHEN, Y. W.; LEE, H. V. Revalorization of selected municipal solid wastes as new precursors of “green” nanocellulose via a novel one-pot isolation system: A source perspective. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, n. PartA, p. 78–92, 1 fev. 2018.

CREMONINI, D. N. et al. Liberação intraocular de ofloxacina associada a lente de contato biossintética em ceratite bacteriana experimental em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 4, p. 791–796, ago. 2010.

DA COSTA, J. F. et al. Nanocristais de celulose bacteriana: Da obtenção, sob diferentes condições de hidrólise, à incorporação como reforço em poli(L-ácido láctico). **Revista Materia**, v. 22, 2017.

DA SILVA, I. D. V. **Preparação e caracterização de blendas formadas por goma xantana e poli (álcool vinílico) para aplicação na área de liberação controlada de**

fármacos. Trabalho de Conclusão de Curso—João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba, 19 fev. 2014.

DABBAGH, S. R. et al. 3D-printed microneedles in biomedical applications. **iScience**, v. 24, n. 1, p. 102012, 22 jan. 2021.

DALVI, M. et al. **Panorama of dissolving microneedles for transdermal drug delivery.** **Life Sciences** Elsevier Inc., , 1 nov. 2021.

DE SOUSA, A. L. V. **Modulação da permeação cutânea de substâncias ativas a partir de produtos tópicos.** Dissertação de mestrado—Covilhã: Universidade da Beira Interior, out. 2016.

DHANKA, M.; SHETTY, C.; SRIVASTAVA, R. Methotrexate loaded gellan gum microparticles for drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 110, p. 346–356, 15 abr. 2018.

DIAS, A. R. P. **Sistemas transdérmicos.** Dissertação de mestrado—Lisboa: Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, 2013.

DO NASCIMENTO, H. A. et al. Influence of gamma irradiation on the properties of bacterial cellulose produced with concord grape and red cabbage extracts. **Current Research in Biotechnology**, v. 4, p. 119–128, 1 jan. 2022.

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

DONNELLY, R. F. et al. Hydrogel-forming microneedles prepared from “super swelling” polymers combined with lyophilised wafers for transdermal drug delivery. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, 31 out. 2014.

DU, H. et al. Hyaluronic Acid-Based Dissolving Microneedle Patch Loaded with Methotrexate for Improved Treatment of Psoriasis. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 11, n. 46, p. 43588–43598, 20 nov. 2019.

ECONOMIDOU, S. N.; DOUROUMIS, D. 3D printing as a transformative tool for microneedle systems: Recent advances, manufacturing considerations and market potential. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 173, p. 60–69, 1 jun. 2021.

EL-SAYED, N.; VAUT, L.; SCHNEIDER, M. Customized fast-separable microneedles prepared with the aid of 3D printing for nanoparticle delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 154, p. 166–174, 1 set. 2020.

ENGELHARDT, R. L. **Avaliação do cenário regulatório de testes de permeação transdérmica de fármacos**. Dissertação de mestrado—Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2015.

ETALE, A. et al. Cellulose: A Review of Water Interactions, Applications in Composites, and Water Treatment. **Chemical Reviews**, v. 123, n. 5, p. 2016–2048, 8 mar. 2023.

FIGUEIREDO, A. R. P. et al. In situ synthesis of bacterial cellulose/polycaprolactone blends for hot pressing nanocomposite films production. **Carbohydrate Polymers**, v. 132, p. 400–408, 6 jul. 2015.

FONSECA, D. F. S. et al. Bacterial nanocellulose-hyaluronic acid microneedle patches for skin applications: In vitro and in vivo evaluation. **Materials Science and Engineering C**, v. 118, 1 jan. 2021.

FONTES, M. DE L. et al. Effect of in situ modification of bacterial cellulose with carboxymethylcellulose on its nano/microstructure and methotrexate release properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 179, p. 126–134, 1 jan. 2018.

FULIAS, A. et al. Thermoanalytical and spectroscopic study on methotrexate–active substance and tablet. **researchgate.net**A Fúliaş, C Popoiu, G Vlase, T Vlase, D Oneţiu, G Săvoiu, G Simu, C Pătruţescu, G IliuDig. **J. Nanomater. Biostruct**, 2014•**researchgate.net**, v. 9, n. 1, p. 93–98, 2014.

GALDINO, C. J. DA S. J. **Avaliação do potencial da celulose bacteriana no tratamento de águas oleosas**. Dissertação de mestrado—Recife: Universidade Católica de Pernambuco, fev. 2020.

GARCIA, M. C. **MICROPARTÍCULAS DE METOTREXATO E ÁCIDO POLI LÁTICO-CO-GLICÓLICO OBTIDAS POR “SPRAY-DRYING”**. Araraquara: Universidade Estadual Paulista, 2014.

GERSTEL, M. S.; PLACE, V. A. **Drug delivery device**. Estados Unidos da América, 17 maio 1971. . Acesso em: 19 fev. 2023

GORGIEVA, S.; TRČEK, J. Bacterial Cellulose: Production, Modification and Perspectives in Biomedical Applications. **Nanomaterials** 2019, Vol. 9, Page 1352, v. 9, n. 10, p. 1352, 20 set. 2019.

GOTTSCHALK, L. M. F. et al. **Produção de celulose bacteriana pela cepa *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 1431 com diferentes fontes de nitrogênio.** Embrapa Instrumentação. **Anais...2013.** Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/88508/1/2013-053.pdf>>. Acesso em: 25 nov. 2023

GOWDA, B. H. J. et al. Microneedles as a momentous platform for psoriasis therapy and diagnosis: A state-of-the-art review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 632, p. 122591, 5 fev. 2023.

GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M.; LOPEZ, R. F. V. Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1490–1498, 2008.

GRELA, E.; KOZŁOWSKA, J.; GRABOWIECKA, A. Current methodology of MTT assay in bacteria – A review. **Acta Histochemica**, v. 120, n. 4, p. 303–311, 1 maio 2018.

HESTRIN, S.; SCHRAMM, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. **Biochemical Journal**, v. 58, n. 2, p. 345, 1953.

HONG, J. Y. et al. Efficacy and safety of a novel, soluble microneedle patch for the improvement of facial wrinkle. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 17, n. 2, p. 235–241, 1 abr. 2018.

INDERMUN, S. et al. Current advances in the fabrication of microneedles for transdermal delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 185, n. 1, p. 130–138, 10 jul. 2014.

INGROLE, R. S. J. et al. Trends of microneedle technology in the scientific literature, patents, clinical trials and internet activity. **Biomaterials**, v. 267, p. 120491, 1 jan. 2021.

ISO 10993-12 INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Biological evaluation of medical devices.** Disponível em: <<https://www.iso.org/standard/68936.html>>. Acesso em: 7 mar. 2023.

ITA, K. Transdermal Delivery of Drugs with Microneedles—Potential and Challenges. **Pharmaceutics 2015, Vol. 7, Pages 90-105**, v. 7, n. 3, p. 90–105, 29 jun. 2015.

ITA, K. Dissolving microneedles for transdermal drug delivery: Advances and challenges. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 93, p. 1116–1127, 1 set. 2017.

JEONG, W. Y. et al. Recent advances in transdermal drug delivery systems: a review. **Biomaterials Research**, v. 25, n. 1, p. 1–15, 1 dez. 2021.

JOHNER, K.; FERNANDO, C.; NETO, G. Análise dos fatores de risco para o envelhecimento da pele: aspectos nutricionais / Analysis of risk factors for skin aging: nutritional aspects. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 3, p. 10000–10018, 7 maio 2021.

JUNG, H. et al. Adhesive Hydrogel Patch with Enhanced Strength and Adhesiveness to Skin for Transdermal Drug Delivery. **Advanced Functional Materials**, v. 30, n. 42, 1 out. 2020.

KAMIYA, K. et al. Risk Factors for the Development of Psoriasis. **International Journal of Molecular Sciences 2019, Vol. 20, Page 4347**, v. 20, n. 18, p. 4347, 5 set. 2019.

KOLARSICK, P. A. J.; KOLARSICK, M. A.; GOODWIN, C. Anatomy and Physiology of the Skin. **Journal of the Dermatology Nurses' Association**, v. 3, n. 4, p. 203–213, jul. 2011.

KUMAR, B. et al. Nanoporous Sodium Carboxymethyl Cellulose-g-poly (Sodium Acrylate)/FeCl₃ Hydrogel Beads: Synthesis and Characterization. **Gels 2020, Vol. 6, Page 49**, v. 6, n. 4, p. 49, 11 dez. 2020.

LARA, E. DA S. **Análise das características físico-químicas de hidrogel de poliacrilamida/carboximetilcelulose/argila.** Trabalho de Conclusão de Curso—Campo Mourão: Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 10 jul. 2019.

LARRAÑETA, E. et al. A proposed model membrane and test method for microneedle insertion studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 472, n. 1–2, p. 65–73, 10 set. 2014.

LARRAÑETA, E. et al. Microneedle arrays as transdermal and intradermal drug delivery systems: Materials science, manufacture and commercial development. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v. 104, p. 1–32, 1 jun. 2016.

LEE, K. J. et al. A practical guide to the development of microneedle systems – In clinical trials or on the market. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 573, p. 118778, 5 jan. 2020.

LIMA, A. DA C. A. DE. **Desenvolvimento de blendas de celulose bacteriana/ poli (vinil álcool) e celulose bacteriana/carboximetilcelulose enriquecidos com complexo antioxidante**. Dissertação de Mestrado—Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 27 out. 2022.

MALINOVSKAJA-GOMEZ, K. et al. Transdermal iontophoresis of flufenamic acid loaded PLGA nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, p. 154–162, 30 jun. 2016.

MANIKKATH, J. et al. Influence of peptide dendrimers and sonophoresis on the transdermal delivery of ketoprofen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 521, n. 1–2, p. 110–119, 15 abr. 2017.

MAYA-RICO, A. M. et al. Out-of-pocket costs for patients with psoriasis in an outpatient dermatology referral service. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 96, n. 3, p. 295–300, 1 maio 2021.

MÖNKÄRE, J. et al. IgG-loaded hyaluronan-based dissolving microneedles for intradermal protein delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 218, p. 53–62, 28 nov. 2015.

MORAES, C. N. **Desenvolvimento de microagulhas poliméricas dissolvíveis contendo anti-inflamatório não-esteroidal para aplicação na tendinite**. Dissertação de Mestrado—Tubarão: Universidade do Sul de Santa Catarina, 28 set. 2018.

MORRIS, A. P.; BRAIN, K. R.; HEARD, C. M. Skin permeation and ex vivo skin metabolism of O-acyl haloperidol ester prodrugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 367, n. 1–2, p. 44–50, 9 fev. 2009.

MURAKAMI, T.; MORI, N. Involvement of Multiple Transporters-mediated Transports in Mizoribine and Methotrexate Pharmacokinetics. **Pharmaceutics 2012, Vol. 5, Pages 802-836**, v. 5, n. 8, p. 802–836, 10 ago. 2012.

NGUYEN, H. X. et al. Poly (vinyl alcohol) microneedles: Fabrication, characterization, and application for transdermal drug delivery of doxorubicin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 129, p. 88–103, 1 ago. 2018.

PARK, Y. H. et al. Fabrication of degradable carboxymethyl cellulose (CMC) microneedle with laser writing and replica molding process for enhancement of transdermal drug delivery. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 21, n. 1, p. 110–118, 1 jan. 2016.

PEDROZA, T. DE M. **Aplicação da membrana de biocelulose embebida em ciprofloxacina na ceratoplastia lamelar**. Dissertação de Mestrado—Araçatuba: Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, 16 ago. 2019.

PERE, C. P. P. et al. 3D printed microneedles for insulin skin delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 544, n. 2, p. 425–432, 15 jun. 2018.

PEREIRA, B. A. R. **Desenvolvimento de microagulhas intumescíveis biopoliméricas para extração de fluido intersticial**. Dissertação de mestrado—Aveiro - Portugal: Universidade de Aveiro, 2019.

PÉREZ, E. C. Y. **PRODUÇÃO DE BIOCAMPÓSITOS POR POLICONDENSAÇÃO DE L-ÁCIDO LÁCTICO EM HIDROGÉIS DE CELULOSE BACTERIANA**. Dissertação de mestrado—Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 17 abr. 2014.

PETTIGNANO, A.; CHARLOT, A.; FLEURY, E. Solvent-Free Synthesis of Amidated Carboxymethyl Cellulose Derivatives: Effect on the Thermal Properties. **Polymers 2019, Vol. 11, Page 1227**, v. 11, n. 7, p. 1227, 23 jul. 2019.

PHATALE, V. et al. Overcoming skin barriers through advanced transdermal drug delivery approaches. **Journal of Controlled Release**, v. 351, p. 361–380, 1 nov. 2022.

PRASAD, R.; KOUL, V. Transdermal delivery of methotrexate: past, present and future prospects. **Therapeutic Delivery**, v. 3, n. 3, p. 315–325, 7 mar. 2012.

PRAUSNITZ, M. R.; LANGER, R. Transdermal drug delivery. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 11, p. 1261–1268, nov. 2008.

RAHARJA, A.; MAHIL, S. K.; BARKER, J. N. Psoriasis: a brief overview. **Clinical Medicine**, v. 21, n. 3, p. 170, 1 maio 2021.

RAMADON, D. et al. Enhancement strategies for transdermal drug delivery systems: current trends and applications. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 12, n. 4, p. 758–791, 1 abr. 2022.

RENDON, A.; SCHÄKEL, K. Psoriasis Pathogenesis and Treatment. **International Journal of Molecular Sciences 2019, Vol. 20, Page 1475**, v. 20, n. 6, p. 1475, 23 mar. 2019.

REQUENA, M. B. **Otimização da entrega de fármacos para tratamento de câncer de pele por terapia fotodinâmica**. Tese de Doutorado—São Carlos: Universidade de São Paulo, fev. 2019.

ROJAS, J. E. U. et al. Silk Fibroin/Poly(vinyl Alcohol) Microneedles as Carriers for the Delivery of Singlet Oxygen Photosensitizers. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, v. 8, n. 1, p. 128–139, 10 jan. 2022.

RUBERT, A. et al. Vitaminas do complexo B: uma breve revisão. **Revista Jovens Pesquisadores**, v. 7, n. 1, p. 30–45, 5 jan. 2017.

RUDNIK, L. A. C. et al. Co-Loaded Curcumin and Methotrexate Nanocapsules Enhance Cytotoxicity against Non-Small-Cell Lung Cancer Cells. **Molecules 2020, Vol. 25, Page 1913**, v. 25, n. 8, p. 1913, 21 abr. 2020.

SASKA, S. et al. Bacterial cellulose-hydroxyapatite nanocomposites for bone regeneration. **International Journal of Biomaterials**, v. 2011, p. 1–8, 2011.

SBD. **Psoríase: O que é, sintomas, causas, diagnóstico e tratamentos - SBD**. Disponível em: <<https://www.sbd.org.br/doencas/psoriase/>>. Acesso em: 13 fev. 2023.

SEGAL, L. et al. **opportunity for new developments in all phases of textile manufacturing.** ' Literature Cited An Empirical Method for Estimating the Degree

of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer Apparel Manufacturing. [s.l: s.n.].

SILVA, L. F. DA; VEIGA, W. A. PSORÍASE: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E FISIOPATOLÓGICOS UMA REVISÃO DE LITERATURA. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 8, n. 9, p. 1241–1257, 19 out. 2022.

SILVA, N. H. C. S. et al. Bacterial cellulose membranes as transdermal delivery systems for diclofenac: In vitro dissolution and permeation studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 106, n. 1, p. 264–269, 15 jun. 2014.

SILVA, S. S. et al. 2.11 Polymers of biological origin. **Comprehensive Biomaterials II**, p. 228–252, 1 jan. 2017.

SOUSA, R. R. M. DE et al. Desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de tiabendazol utilizando sílica modificada com 2-mercaptobenzimidazol. **Revista Desafios**, v. 7, mar. 2020.

SPDV. **A pele - Sociedade Portuguesa de Dermatologia e Venereologia**. Disponível em: <https://www.spdv.pt/_a_pele>. Acesso em: 14 fev. 2023.

TAHERI, A. et al. Nanoparticles of conjugated methotrexate-human serum albumin: Preparation and cytotoxicity evaluations. **Journal of Nanomaterials**, v. 2011, 2011.

VASCONCELOS, G. M. D. DE et al. Production and characterization of cellulose by *glucanoacetobacter hansenii* in medium containing glucose or mannitol. **Revista Materia**, v. 25, n. 4, p. 1–10, 2020.

VAZQUEZ, A. et al. Bacterial Cellulose from Simple and Low Cost Production Media by *Gluconacetobacter xylinus*. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 21, n. 2, p. 545–554, 1 jun. 2013.

WAHID, F. et al. Reusable ternary PVA films containing bacterial cellulose fibers and ϵ -polylysine with improved mechanical and antibacterial properties. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 183, p. 110486, 1 nov. 2019.

WANG, X.; YAN, H. Methotrexate-loaded porous polymeric adsorbents as oral sustained release formulations. **Materials Science and Engineering C**, v. 78, p. 598–602, 1 set. 2017.

XING, M. et al. Novel dissolving microneedles preparation for synergistic melasma therapy: Combined effects of tranexamic acid and licorice extract. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 600, 1 maio 2021.

XU, J. et al. Advances of Microneedles in Biomedical Applications. **Molecules** **2021**, Vol. 26, Page 5912, v. 26, n. 19, p. 5912, 29 set. 2021.

YAO, S. et al. The Development of PAT (Process Analytical Technology) for Drug Production and the Requirements for Domestic Pharmaceutical Engineering Education. **Creative Education**, v. 03, n. 07, p. 76–79, 2012.

ZAPAROLLI, F. B. **Aplicação e caracterização de celulose bacteriana impregnada com timol**. Trabalho de Conclusão de Curso—Ponta Grossa: Universidade Tecnológica Federal do Paraná., maio 2015.

ZENG, M.; LAROMAINE, A.; ROIG, A. Bacterial cellulose films: influence of bacterial strain and drying route on film properties. **Cellulose**, v. 21, n. 6, p. 4455–4469, 6 nov. 2014a.

ZENG, M.; LAROMAINE, A.; ROIG, A. Bacterial cellulose films: influence of bacterial strain and drying route on film properties. **Cellulose**, v. 21, n. 6, p. 4455–4469, 6 nov. 2014b.

ZHANG, K.; WU, X. Y. Temperature and pH-responsive polymeric composite membranes for controlled delivery of proteins and peptides. **Biomaterials**, v. 25, n. 22, p. 5281–5291, out. 2004.

ZHANG, L. et al. Fabrication, evaluation and applications of dissolving microneedles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 604, 15 jul. 2021.

ZHOU, X. et al. Advances in the pathogenesis of psoriasis: from keratinocyte perspective. **Cell Death & Disease** **2022 13:1**, v. 13, n. 1, p. 1–13, 24 jan. 2022.