

MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA E *ALOE VERA* COMO SISTEMA DE ENTREGA DE AGENTES TERAPÊUTICOS

K. CESCA¹, I. RUFINO¹, J. GODINHO¹, L. M. PORTO¹

¹Universidade Federal de Santa Catarina,
Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos

E-mail para contato: {karina, luismar}@intelab.ufsc.br

RESUMO – A importância do desenvolvimento de tecnologias menos invasivas para o tratamento de tumores encontra-se na adequação da liberação antitumoral no local do tratamento do tumor, visando minimizar os efeitos secundários em pacientes. Estas tecnologias buscam à produção de materiais biocompatíveis e com características essenciais para a liberação programada de fármacos. Entre esses materiais, encontra-se a celulose bacteriana (CB), que tem sido estudada para o desenvolvimento de dispositivos de entrega de agentes farmacológicos, com a adição de outros biomateriais a fim de melhorar suas características. Estudou-se a incorporação e liberação de doxorubicina em membranas de CB contendo *Aloe vera* com o objetivo de facilitar a permeação de macromoléculas quimioterápicas em células de câncer de mama. Foram produzidas membranas de CB por *Gluconacetobacter hansenii* com diferentes porções de gel e frações polissacarídicas de *Aloe vera* (20, 40 e 60%) e avaliada a incorporação, liberação e citotoxicidade de doxorubicina em células de câncer de mama. A incorporação de gel e frações polissacarídicas em membranas de celulose bacteriana diminuiu o potencial de incorporação de doxorubicina, porém a quantidade de doxorubicina incorporada apresenta um efeito citotóxico maior sobre as células de câncer de mama.

1. INTRODUÇÃO

Há muitas opções para a funcionalização da celulose bacteriana (CB) no que tange ao desenvolvimento de novos biomateriais. A CB pode ser sintetizada em cultura estática, o que produz uma película de celulose na interface da superfície do meio com o oxigênio, ou em cultura agitada, que resulta em formatos variados, incluindo esferas ou massas irregulares no meio de cultivo. A celulose bacteriana é biodegradável, não tóxica (Kerbel *et al.*, 1994; McConaughy *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009), devido às características de elevada penetrabilidade e matriz nanoestruturada, bem como a capacidade de manutenção de umidade (Park *et al.*, 2014). Pode, portanto, ser utilizada como um material para o desenvolvimento de dispositivos de liberação de fármacos aplicados diretamente sobre tumores (Chen *et al.*, 2009; Beneke *et al.*, 2012; Almeida *et al.*, 2013; Muller *et al.*, 2013; Amin *et al.*, 2014).

Outros produtos naturais de origem vegetal que possuem atividades biológicas benéficas à saúde também têm sido investigados em função de suas propriedades biológicas, nutricionais e farmacológicas, tais como a *Aloe vera* (Chen *et al.*, 2009; Beneke *et al.*, 2012).

A *Aloe vera* tem sido estudada para inibir a fibroplasia na cicatrização de feridas, promovendo o crescimento e diferenciação celular em cultura de tecidos e para o tratamento de queimaduras. Atividades do gel de *Aloe vera* como agente antiviral (Beneke *et al.*, 2012), imunomodulador, de redução de infecções oportunistas e estimulador dos processos de cicatrização foram relatadas (Chow *et al.*, 2005). Alguns estudos ainda demonstram a capacidade destes compostos como agentes de absorção do fármaco em novos sistemas de entrega de drogas (McConaughy *et al.*, 2008; Beneke *et al.*, 2012). Esses estudos sugerem que estes compostos têm um elevado potencial para serem utilizados como adjuvantes na absorção de fármacos para o tratamento de tumores (Chen *et al.*, 2009; Beneke *et al.*, 2012).

O câncer de mama é a principal causa de morte relacionada ao câncer em mulheres em todo o mundo (Jemal *et al.*, 2009). As modalidades de tratamento para este tipo de câncer incluem cirurgia, quimioterapia e terapias de radiação. Um fator que contribui para a falha do tratamento é que as células cancerígenas se tornam resistentes à apoptose induzida por drogas, o que permite a progressão do câncer em fenótipos invasivos e metastáticos (Kerbel *et al.*, 1994). Dentre as terapias empregadas para o combate ao câncer, a quimioterapia é a modalidade de tratamento mais utilizada, sendo que a doxorrubicina é um dos agentes antineoplásicos mais importantes (Bhingé *et al.*, 2009). Entretanto, o maior desafio do tratamento antineoplásico é matar seletivamente as células neoplásicas com dano reduzido ou inexistente às células saudáveis.

O objetivo deste trabalho foi avaliar incorporação e liberação de doxorrubicina em membranas de celulose bacteriana contendo *Aloe vera* visando modular a permeação de macromoléculas quimioterápicas em células de câncer de mama.

2. METODOLOGIA

2.1. Linhagens celulares

Células de câncer de mama (MDA-MB-231) foram cultivadas em meio Dulbecco's modified Eagle's medium - DMEM (Gibco BRL, Grand Island, NY), suplementado com 10 % de soro fetal bovino - SFB (Gibco BRL, Grand Island, NY) e 1 % de penicilina/estreptomicina, mantidas a 37 °C em uma atmosfera umidificada de 5 % de CO₂.

2.2. Membranas de celulose bacteriana contendo gel e frações polissacarídicas de *Aloe vera*

Membranas de celulose bacteriana (CB) controle foram sintetizadas pela bactéria *Gluconacetobacter hansenii* (*G. hansenii*) (ATCC 23769), cultivadas em meio contendo em proporções (g·L⁻¹) de: 25 de manitol, 5 de extrato de levedura e 3 de peptona. Para a incorporação de

Aloe vera na síntese *in situ* da CB, seguiu-se a metodologia utilizada por Godinho (2014), na qual porções de gel e da fração polissacarídica (FP) foram adicionadas em concentração de 20, 40 e 60 % no meio à base de manitol, e completadas com 10 % de uma solução estoque da bactéria *G. hansenii*, em uma placa de 96 poços. A solução foi mantida a 30 °C, durante seis dias, em condições estáticas. As membranas foram removidas das placas para o processo de purificação e lavadas com água destilada. A purificação das membranas foi realizada utilizando uma solução alcalina de NaOH (0,1 mol·L⁻¹) a 50 °C por 24 h, seguida por lavagens sucessivas com água destilada. Ao final do processo de purificação e lavagem, o pH foi ajustado para 7,0. Os filmes foram esterilizados (autoclavados a 121 °C durante 20 min).

2.3. Caracterização das membranas CB-*Aloe vera*

A microestrutura das membranas de celulose bacteriana foi caracterizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram previamente congeladas (-80 °C por 24 h) e logo depois liofilizadas por 48 h e distribuídas em fitas de carbono, e em seguida revestidas com ouro. Após o revestimento as amostras foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) no Laboratório Central (LCME), usando um equipamento JEOL JSM modelo 6390LV.

2.4. Carregamento do fármaco

As membranas de CB e CB-*Aloe* foram imersas em uma solução de doxorubicina-HCl de 0,9 mg·mL⁻¹ diluída em tampão MES (1:1), sob agitação de 300 rpm, a 25 °C durante 20 h. A doxorubicina foi quantificada por espectrofluorimetria (SpectraMax Plus 384, Molecular Devices, EUA) usando comprimento de onda $\lambda_{\text{excitação}}$ de 498 nm e $\lambda_{\text{emissão}}$ de 596 nm.

2.5. Liberação do fármaco

As membranas de CB e CB-*Aloe* contendo doxorubicina foram colocadas em tubos do tipo Eppendorf contendo 1,5 mL de meio DMEM em pH 7,4 a 37 °C. Amostras de 500 μ L foram retiradas e os tubos foram novamente completados com um volume igual de solução tampão fresca a intervalos definidos. A doxorubicina foi quantificada por espectrofluorimetria (Spectramax, Molecular Devices – USA) usando $\lambda_{\text{excitação}}$ em 495 nm e $\lambda_{\text{emissão}}$ em 601 nm.

2.6. Citotoxicidade

A viabilidade celular depois do tratamento com as membranas de CB-*Aloe* contendo doxorubicina foram determinadas pela atividade mitocondrial das células, através da utilização do ensaio colorimétrico de MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazólio]. As células de câncer de mama MDA-MB-231 foram semeadas em placas de cultura de 6 poços (5 \times 10⁵ células/poço), contendo 1,5 mL de meio de cultura DMEM. Após 24 h de incubação, o meio de cultura foi substituído por um novo meio e adicionado às membranas de CB-*Aloe*-doxorubicina. A viabilidade celular foi avaliada em função do tempo de cultura, 0, 1, 3, 7 dias. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias. Após 24 h de cultivo celular, o meio de cultura foi

retirado; 300 μL de meio de cultura e 60 μL de MTS (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) foram adicionados e incubados por 3 h a 37 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 . A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em um equipamento de leitura de placas (SpectraMax Plus 384, Molecular Devices, EUA) em comprimento de onda de 490 nm. O ensaio do MTS baseia-se na medida de concentração de um produto solúvel resultante de uma reação do MTS com as mitocôndrias das células viáveis, sendo este quantificado por espectrofotometria UV-VIS (absorbância a 490 nm), que é diretamente proporcional ao número de células vivas em cultura.

2.7. Análise dos dados

Os dados foram avaliados estatisticamente utilizando-se o software OriginPro 8.5. Os resultados experimentais foram expressos como a média \pm erro padrão da média e comparados através da análise de variância one-way, seguida pelo teste de Tukey considerando-se estatisticamente diferentes para $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

A Figura 1 apresenta as micrografias das membranas compósitas de celulose bacteriana produzidas com diferentes porções de gel e da fração polissacarídica de *Aloe vera*.

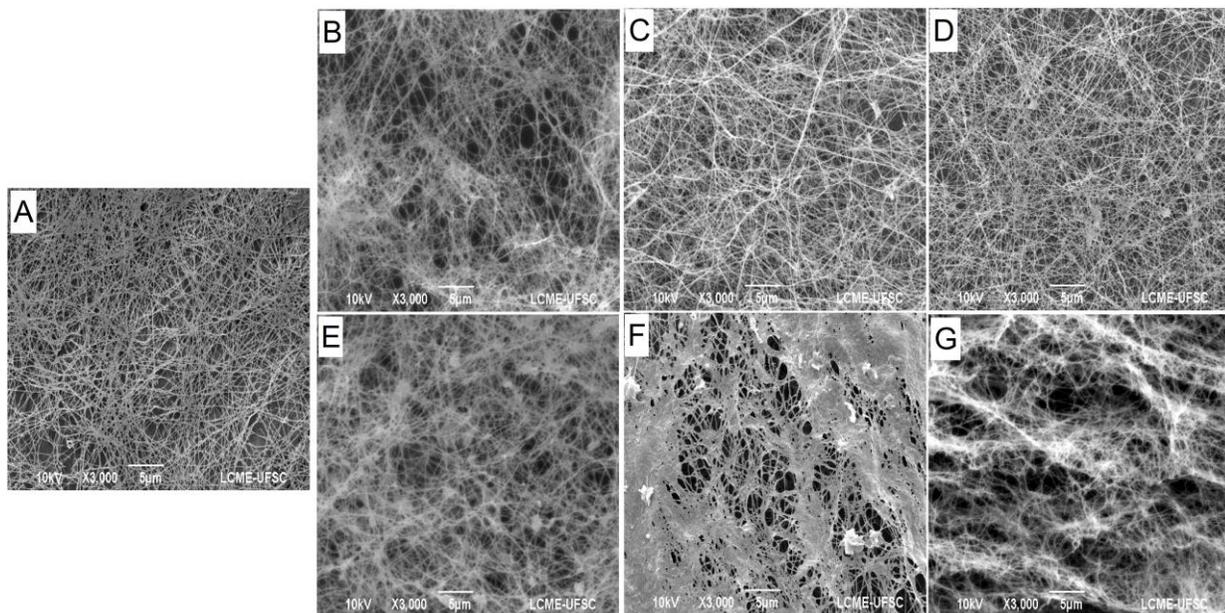


Figura 1 – Micrografias da face inferior dos hidrogéis de celulose bacteriana produzidos com diferentes porcentagens de Frações e Gel de *Aloe vera*. A) CB controle, B) CB + 20 % de Fração, C) CB + 40 % de Fração, D) CB + 60 % de Fração, E) CB + 20 % de Gel, F) CB + 40 % de Gel, G) CB + 60 % de Gel. Amplificação de 3000 \times .

Como aumento das porções tanto de gel como das frações, observa-se um preenchimento dos poros e o colapso das fibras de celulose. Saidbuatong e Phisalaphong (2010) reportaram que a introdução do gel de *Aloe vera insitu* na produção da CB gera membranas com maior área superficial e reduzido tamanho de poros em condições secas, e o preenchimento dos poros com o gel em condições hidratadas.

A Figura 2 apresenta a incorporação de doxorrubicina nas membranas de celulose bacteriana contendo diferentes porções de gel e fração polissacarídica de *Aloe vera*.

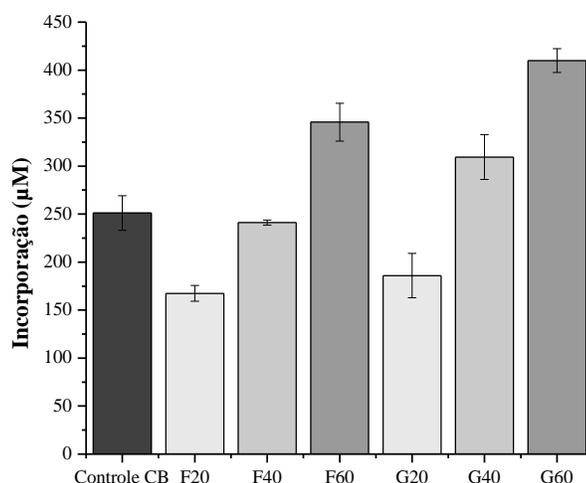


Figura 2 – Incorporação de doxorrubicina em membranas de celulose bacteriana (controle CB) e modificadas com diferentes porcentagens de frações (F20, F40 e F60) e gel (G20, G40 e G60) de *Aloe vera*.

Observa-se que a incorporação de doxorrubicina diminui na presença de 20 % de gel e fração (167 e 185 µM), quando comparadas com a CB controle (251 µM). Conforme a porcentagem de gel ou fração polissacarídica na membrana é elevada para 40 e 60 %, a incorporação de doxorrubicina nestas amostras aumenta (309 e 409 µM) respectivamente.

A Figura 3 apresenta o perfil de liberação nos tempos de 1, 3 e 7 dias. As porcentagens de gel e fração polissacarídica incorporadas nas membranas de CB não influenciam, de maneira significativa, a liberação de doxorrubicina. Em 24 horas de cultivo, o perfil de liberação da doxorrubicina manteve-se inalterado para as membranas sintetizadas com a fração polissacarídica e com o gel, liberando duas a três vezes mais do que a membrana de CB controle nos tempo de 3 e 7 dias, respectivamente.

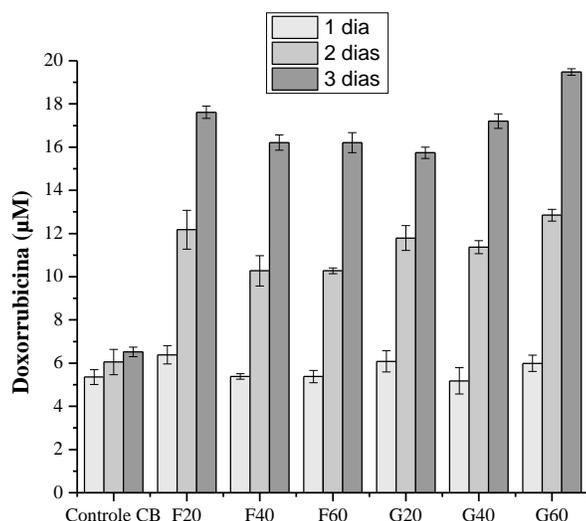


Figura 3 – Liberação de doxorubicina de membranas de celulose bacteriana (controle CB) e membranas de celulose bacteriana modificadas com diferentes porcentagens de frações (F20, F40 e F60) e gel (G20, G40 e G60) de *Aloe vera*.

A Figura 4 apresenta a citotoxicidade do fármaco (doxorubicina) liberado pelas membranas de CB e CB-Aloe sobre as células de câncer de mama MDA-MB-231.

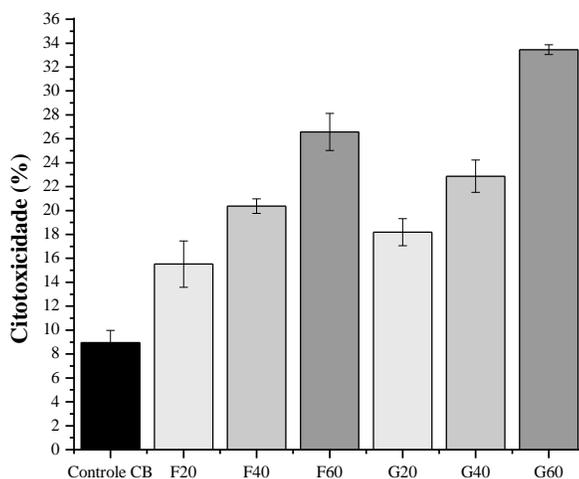


Figura 4 – Porcentagem citotóxica de doxorubicina liberada pelas de membranas de celulose bacteriana (controle CB) e membranas de celulose bacteriana modificadas com diferentes porcentagens de frações (F20, F40 e F60) e gel (G20, G40 e G60) de *Aloe vera* sobre células MDA-MD-231.

É possível observar na Figura 4 que a doxorrubicina liberada pelas membranas de CB-Aloe apresentam uma porcentagem de citotoxicidade maior sobre as células de câncer de mama do que a doxorrubicina liberada pelas membranas de CB controle. Isso pode estar relacionado com a densidade fibrilar encontrada nessas membranas modificadas com o gel ou a fração de *Aloe vera*. Existem evidências de que certos compostos podem aumentar os poros ou aberturas, de forma a permitir a passagem de macromoléculas hidrofílicas pelas estruturas dinâmicas das células epiteliais, sem causar danos ou efeitos tóxicos, aumentando a biodisponibilidade de drogas em células-alvo (Sharma *et al.*, 2005; Beneke *et al.*, 2012).

4. CONCLUSÕES

A importância de se desenvolver tecnologias menos invasivas para o tratamento de tumores, resulta em maximizar a liberação do agente antitumoral no local a ser tratado e minimizar os efeitos colaterais nos pacientes. A incorporação de gel e frações polissacarídicas em membranas de celulose bacteriana diminuiu o potencial de incorporação de doxorrubicina, quando comparada com a membrana controle. Porém, a quantidade de doxorrubicina incorporada nas membranas modificadas com gel ou fração, apresenta um efeito citotóxico maior sobre as células de câncer de mama. Isso pode ser devido à influência dos compostos contidos no gel e frações polissacarídicas que potencializam a abertura dos poros das células, ocasionado assim maior entrada do fármaco nas células-alvo, e elevando a taxa de morte celular.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, I. F.; PEREIRA, T.; SILVA, N. H.; GOMES, F. P.; SILVESTRE, A. J.; FREIRE, C. S.; SOUSA LOBO, J. M.; COSTA, P. C. Bacterial cellulose membranes as drug delivery systems: An in vivo skin compatibility study. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2013.
- AMIN, M. C.; ABADI, A. G.; KATAS, H. Purification, characterization and comparative studies of spray-dried bacterial cellulose microparticles. *Carbohydr. Polym.* 99: 180-189, 2014.
- BENEKE, C.; VILJOEN, A.; HAMMAN, J. In Vitro Drug Absorption Enhancement Effects of *Aloe vera* and *Aloe ferox*. *Sci. Pharm.*, 80(2): 475-486, 2012.
- BHINGE, K. N.; GUPTA, V.; HOSAIN, S. B.; SATYANARAYANAJAIS, S. D.; MEYER, S. A.; BLAYLOCK, B.; ZHANG, Q. J.; LIU, Y. Y. The opposite effects of doxorubicin on bone marrow stem cells versus breast cancer stem cells depend on glucosylceramide synthase. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 44(11): 1770-1778, 2012.
- CHEN, W.; LU, Z.; VILJOEN, A.; HAMMAN, J. Intestinal drug transport enhancement by *Aloe vera*. *Plant. Med.* 75(6): 587-595, 2009.
- GODINHO, J. F. Hidrogéis de Celulose Bacteriana Incorporados com Frações de *Aloe vera*. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.
- JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; HAO, Y.; XU, J.; THUN, M. J. Câncer statistics. *CA. Cancer. J. Clin.* 59(4): 225-249, 2009.

- KERBEL, R. S.; KOBAYASHI, H.; GRAHAM, C. H. Intrinsic or Acquired Drug-Resistance and Metastasis - Are They Linked Phenotypes. *J. of Cell. Biochem.* 56(1): 37-47, 1994.
- MCCONAUGHY, S. D.; KIRKLAND, S. E.; TREAT, N. J.; STROUD, P. A.; MCCORMICK, C. L. Tailoring the Network Properties of Ca_2^+ Crosslinked *Aloe vera* Polysaccharide Hydrogels for in Situ Release of Therapeutic Agents. *Biomacromolecules.* 9(11): 3277-3287, 2008.
- MULLER, A.; NI, Z.; HESSLER, N.; WESARG, F.; MULLER, F. A.; KRALISCH, D.; FISCHER, D. The biopolymer bacterial nanocellulose as drug delivery system: investigation of drug loading and release using the model protein albumin. *J. Pharm. Sci.* 102(2): 579-592, 2013.
- PARK, S. U.; LEE, B. K.; KIM, M. S.; PARK, K. K.; SUNG, W. J.; KIM, H. Y.; HAN, D. G.; SHIM, J. S.; LEE, Y. J.; KIM, S. H.; KIM, I. H. The possibility of microbial cellulose for dressing and scaffold materials. *Int. Wound. J.* 11(1): 35-43, 2014.
- SAIBUATONG, ONG-ARD; PHISALAPHONG, MUENDUEN. Novo *Aloe vera*-bacterial cellulose composite film from biosynthesis. *Carbohydr. Polym.* 79(2): 455-460, 2010.
- SHARMA, P.; VARMA, M. V.; CHAWLA, H. P.; PANCHAGNULA, R. Relationship between lipophilicity of BCS class III and IV drugs and the functional activity of peroral absorption enhancers. *Farmaco* 60(11-12): 870-873, 2005.
- TAI-NIN CHOW, J.; WILLIAMSON, D. A.; YATES, K. M. GOUX, W. J. Chemical characterization of the immunomodulating polysaccharide of *Aloe vera* L. *Carbohydrate Research* 340(6): 1131-1142, 2005.