

(19)

(11) Publication number:

**NZ 537951 A**

(41) Publication date:

**21.12.2007**

(51) Int. Cl:

**A61K9/48; A61K9/20;****A61K9/22; A61K9/52;**

(12)

**Patent Application**(21) Application number: **NZ20030537951**

(71) Applicant(s):

**SMITHKLINE BEECHAM CORP**(22) Date of filing: **07.08.2003**

(72) Inventor(s):

**IGNATIOUS FRANCIS  
SUN LINGHONG**(30) Priority: **20020401726P US 07.08.2002**(30) Priority: **2003US24641 WO 07.08.2003****(54) Title:****Using electrospun polymer nanofibers in amorphous pharmaceutical compositions****(57) Abstract:**

A process of making polymer nanofibers from either a solution or melt under electrical forces, to prepare stable, solid dispersions of amorphous drugs in polymer nanofibers is disclosed. Particularly disclosed is a process for making a stable formulation of an amorphous form of a pharmaceutically active agent, which comprises: (a) making a solution of the active agent, and a pharmaceutically acceptable polymeric carrier with a pharmaceutically acceptable solvent and (b) electrospinning the solution of step (a) into an electrospun fiber. A pharmaceutical composition comprising an electrospun fiber of a pharmaceutically acceptable polymeric carrier homogeneously integrated with a stable amorphous form of a pharmaceutically acceptable active agent is also disclosed.

A process of making polymer nanofibers from either a solution or melt under electrical forces, to prepare stable, solid dispersions of amorphous drugs in polymer nanofibers is disclosed. Particularly disclosed is a process for making a stable formulation of an amorphous form of a pharmaceutically active agent, which comprises: (a) making a solution of the active agent, and a pharmaceutically acceptable polymeric carrier with a pharmaceutically acceptable solvent; and (b) electrospinning the solution of step (a) into an electrospun fiber. A pharmaceutical composition comprising an electrospun fiber of a pharmaceutically acceptable polymeric carrier homogeneously integrated with a stable amorphous form of a pharmaceutically acceptable active agent is also disclosed.

## ELECTROSPUN AMORPHOUS PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS

### *FIELD OF THE INVENTION*

This invention relates to stabilization of solid dispersions of amorphous drugs in polymeric nanofibers, method of preparation thereof and pharmaceutical compositions containing these nanofibers.

### *BACKGROUND*

With the advent of combinatorial chemistry and high throughput screening, a great majority of the drug candidates selected for development are highly hydrophobic, exhibiting poor or negligible water solubility. In order to enhance the oral absorption of such poorly water soluble drugs, several formulation strategies such as salt formation, complexation, particle size reduction, prodrug, micellization, and solid dispersions are being extensively studied in the pharmaceutical industry.

Although solid dispersions have been known for the past four decades, there seems to be renewed interest in this technology, as described by Serajudin et al., Journal of Pharmaceutical Sciences, 1999, 88 (10), 1058 and by Habib et al., Pharmaceutical Solid Dispersion Technology, (Technomic, Lancaster, PA, 2001). Solid dispersions may be defined as the dispersion of one or more active ingredient in an inert carrier or matrix in the solid state prepared by the melting method, the solvent method or the melting-solvent method. Solid dispersions are classified into six major categories: (1) simple eutectic mixtures (2) solid solutions, (3) glass solutions of suspensions, (4) amorphous precipitation of a drug in a crystalline carrier, (5) amorphous precipitation of a drug in a amorphous carrier, and (6) any combination of these groups.

Two currently used methods of forming solid dispersions are fusion and solvent methods. In the fusion method, the drug and the carrier are melted, to above either the melting (softening) point of the higher melting (softening) component, or in some cases to above the melting point of the lower melting component provided the other non-melted component has good solubility in the former. The fused mixture is rapidly quenched and pulverized to produce free flowing powders for capsule filling or tableting. The fusion process requires both the drug and excipient to be thermally stable at the processing temperature.

In the solvent method, the drug and carrier are dissolved in one or more miscible organic solvents to form a solution. Removal of the organic solvent(s) is accomplished by any one or a combination of methods such as solvent evaporation, precipitation by a non-solvent, freeze drying, spray drying, and spray congealing. Among the several draw backs of the solvent method are: use of large volumes of organic solvents, presence of residual organic solvents in the resultant formulation, collection, recycling and/or disposal of organic solvents.

Solid dispersions of poorly soluble drugs prepared by both the fusion and solvent methods usually exhibit higher dissolution rates than the comparative crystalline drug. However, the dissolution rate of the drug may be hindered by dissolution of the carrier, usually a high molecular weight polymer. Therefore solid dispersions are usually prepared from low or moderate molecular weight polymers.

The need still remains to develop a process by which solid dispersions can be made of drugs having an amorphous morphology, that remain stable, and can use higher molecular polymers to aid in the dissolution rates of these drugs.

#### *BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS*

Figure 1 demonstrates a schematic representation electrospinning of viscous drug/polymer compositions either in solution or in melt form to produce nanofibers.

Figure 2 shows the X-Ray powder diffraction (XRPD) of electrospun 6-Acetyl-3,4-dihydro-2,2-dimethyl-trans(+)-4-(4-fluorobenzoylamo)-2H-benzo[b]pyran-3-ol hemihydrate fibers during storage up to 161 days at 25°C. Comparison with XRPD of the crystalline compound also shown in the figure, confirms the amorphous nature of the electrospun fiber.

Figure 3 demonstrates the enhanced in vitro dissolution profiles of electrospun amorphous 6-Acetyl-3,4-dihydro-2,2-dimethyl-trans(+)-4-(4-fluorobenzoylamo)-2H-benzo[b]pyran-3-ol hemihydrate fibers in comparison to crystalline ones.

Figure 4 shows the XRPDs of electrospun 3-Hydroxy-2-phenyl-N-[1-phenylpropyl]-4-quinoline carboxamide (Talnetant) fibers during storage up to 120 days at 25°C, room temperature. For comparison XRPD of the crystalline drug and PVP are included in the figure. The X-ray diffractograms show a halo, without any sharp peaks, attesting to the amorphous nature of the electrospun sample.

#### *DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION*

The present invention is directed to the discovery that the technique of electrospinning, i.e. the process of making polymer nanofibers from either a solution or melt under electrical forces, can be used to prepare stable, solid dispersions of an amorphous form of a drug in a polymer nanofibers.

Amorphous solids are disordered materials, which have no long-range order like crystalline materials. Amorphous materials exhibit both compositional and structural disorder. There is a distinguishing difference between compositional disorder and structural disorder. In compositional disorder, atoms are located in an ordered array like in crystalline materials. The spacing of the

atoms is equidistant, but only the type of atom is placed randomly. In structural disorder, all bond distances have random lengths and random angles. Therefore there is no long range order, and hence no definite X-ray diffraction patterns. Amorphous solid is a glass in which atoms and molecules exist in a totally non-uniform array. Amorphous solids have no faces and cannot be identified as either habits or polymorphs. Because the properties of amorphous solids are direction independent, these solids are called isotropic. Amorphous solids are characterized by a unique glass transition temperature, the temperature at which it changes from a glass to rubber.

Due to the absence of long-range order, amorphous materials are in an unstable (excited state) equilibrium, resulting in physical as well as chemical instability. The physical instability manifests itself in higher intrinsic aqueous solubility compared to the crystalline drug. The higher solubility of the amorphous drug leads to a higher rate of dissolution, and to better oral bioavailability.

The pharmaceutical industry makes use of the amorphous state of a poorly soluble drug to enhance its aqueous solubility, and its oral bioavailability. However, as stated above, the amorphous state has undesirable physical and chemical instability. This can be overcome by blending the amorphous drug with appropriate polymers, to stabilize the amorphous state, for the desired shelf-life of the drug. It has been reported [Zografi et al, Pharm. Res. 1999, 16, 1722-1728] that the polymer-drug combination should have some specific interaction for stabilization of the amorphous drug.

The electrospun fibers of the present invention are expected to have diameters in the nanometer range, and hence provide a very large surface area. This extremely high surface area can dramatically increase the dissolution rate of the high molecular weight polymeric carrier as well as drug present in them.

A suitable dosage form, such as oral or parenteral forms, including pulmonary administration, may be designed by judicious consideration of polymeric carriers, in terms of their physio-chemical properties as well as their regulatory status. Other pharmaceutically acceptable excipients may be included to ameliorate the stabilization or de-agglomeration of the amorphous drug nanoparticles. The pharmaceutical excipients might also have other attributes, such as absorption enhancers.

Electrospun pharmaceutical dosage forms may be designed to provide any number of dissolution rate profiles, such as rapid dissolution, immediate, or delayed dissolution, or a modified dissolution profile, such as a sustained and/or pulsatile release characteristic.

Taste masking of the active agent may also be achieved by using polymers having functional groups capable of promoting specific interactions with the drug moiety. The electrospun dosage forms may

be presented in conventional dosage formats, such as compressed tablets, capsules, sachets or films. These conventional dosage forms may be in the form of immediate, delayed and modified release systems, which can be designed by the appropriate choice of the polymeric carrier with the active agent/drug combination, using techniques well known and described in the art.

It is one embodiment of the present invention to provide drug particles in their amorphous form, embedded homogeneously in polymeric nanofibers, such that the drug is readily bioavailable independent of the route of administration.

It is another embodiment of the present invention to provide nanoparticle size drug particles having an amorphous morphology, which are embedded homogeneously within the polymeric nanofibers.

The starting compound as used herein, may be morphologically either in a crystalline state, or in an amorphous state. As can be seen herein, the present invention provides a novel vehicle which provides a means to allow a crystalline form of a drug to be stabilized in its amorphous form, or to take an amorphous form of a drug and retain its morphology in a controlled environment, i.e. the spun fibers. This can be used as noted, as a means to increase the surface area (nanoparticle size, etc.) and to improve its dissolution rate characteristics.

Electrospinning, commonly referred to as electrostatic spinning, is a process of producing fibers, with diameters in the range of 100nm. The process consists of applying a high voltage to a polymer solution or melt to produce a polymer jet. As the jet travels in air, the jet is elongated under repulsive electrostatic force to produce nanofibers. The process has been described in the literature since the 1930. A variety of polymers both natural and synthetic having optimal characteristics have been electrospun under appropriate conditions to produce nanofibers, (see Reneker et al., Nanotechnology, 1996, 7, 216). Different applications have been suggested for these electrospun nanofibers, such as air filters, molecular composites, vascular grafts, and wound dressings.

U.S. Patent No. 4,043,331, is intended for use as a wound dressing whereas U.S. Patent No. 4,044,404, and US Patent No. 4,878,908 are tailored towards creating a blood compatible lining for a prosthetic device. All of the disclosed water insoluble polymers are not pharmaceutically acceptable for use herein, however the water soluble polymers disclosed are believed to be pharmaceutically acceptable. None of the preparations in these patents disclose a working example of an electrospun fiber with an active agent. The patents claim the use of enzymes, drugs and/or active carbon on the surface of the nanofibers, prepared by immobilizing the active moieties so that they act at the site of application and "do not percolate throughout the body".

EP 542514, US 5,311,884 and US 5,522,879 pertain to use of spun fibers for a piezoelectric biomedical device. The piezoelectric properties of fluorinated polymers, such as those derived from a copolymer of vinylidene fluoride and tetrafluoroethylene are not considered pharmaceutically acceptable polymers for use herein.

US Patent 5,024,671 uses the electrospun porous fibers as a vascular graft material, which is filled with a drug in order to achieve a direct delivery of the drug to the suture site. The porous graft material is impregnated (not electrospun) with the drug and a biodegradable polymer is added to modulate the drug release. The vascular grafts are also made from non-pharmaceutically acceptable polymers, such as the polytetrafluoroethylene or blends thereof.

US Patent No. 5,376,116, US Patent No. 5,575,818, US Patent No. 5,632,772, US Patent No. 5,639,278 and US Patent No. 5,724,004 describe one form or another of a prosthetic device having a coating or lining of an electrospun non-pharmaceutically acceptable polymer. The electrospun outer layer is post-treated with a drug such as disclosed in the '116 patent (for breast prosthesis). The other patents describe the same technology and polymers but apply the technique to other applications, such as endoluminal grafts or endovascular stents.

Consequently, the present invention is the first to produce an electrospun composition of a pharmaceutically acceptable polymer in which one or more pharmaceutically acceptable active agents or drugs are stabilized in their amorphous form. The homogenous nature of this process produces a quantity of fibers which allow for nanoparticles of drugs to be dispersed throughout. The size of particle, and quality of dispersion provide for a high surface area of drug. One use of the increased surface area of drug is improved bioavailability in the case of a poorly water soluble drug. Other uses would be for decreased drug-drug or enzymatic interactions.

Yet another use of the present invention is to delay the release of drugs in the gastrointestinal tract by using pH sensitive polymers, such as the Eudragit group of polymers by Rohm, in particular the Eudragit L100-55 polymer (Methacrylic Acid Copolymer, Type C).

In one aspect, the invention provides a pharmaceutical composition comprising an electrospun fiber of a pharmaceutically acceptable polymeric carrier homogeneously integrated with a stable amorphous form of a pharmaceutically acceptable active agent.

In another aspect, the invention provides a process for making a stable formulation of an amorphous form of a pharmaceutically active agent comprising

a) making a solution of the active agent, and a pharmaceutically acceptable polymeric carrier with a pharmaceutically acceptable solvent; and

Intellectual Property  
Office of N.Z.

- 9 NOV 2007

RECEIVED

b) electrospinning the solution of step (a) into an electrospun fiber.

In a further aspect, the invention provides a process for making a stable formulation of an amorphous form of a pharmaceutically active agent comprising

- a) melting the active agent and a pharmaceutically acceptable polymeric carrier to form a melt; and
- b) electrospinning the melt of step (a) into an electrospun fiber.

In a further aspect, the invention provides a method for stabilization of an amorphous form of a pharmaceutically active agent comprising forming an electrospun fiber of a pharmaceutically acceptable polymeric carrier homogeneously integrated with an amorphous form of a pharmaceutically acceptable active agent.

The present invention is therefore directed to use in any form of an electrospun drug/polymer combination, wherein the drug is stabilized in the amorphous form; and another wherein the resulting drug/polymer combination provides for enhanced bioavailability of the poorly soluble drug or to modify the absorption profile of the drug(s). The modification of the rate of release of the active compound when incorporated within the polymeric fibers may be increased or decreased. The resulting bioavailability of the active agent may also be increased or decreased relative to the immediate release dosage form.

While the application of this process may be of use for incorporation of a pharmaceutically acceptable drug for topical delivery, a preferred route of administration is likely to be oral, intravenous, intramuscular, or inhalation.

A pharmaceutically acceptable agent, active agent or drug as defined herein follows the guidelines from the European Union Guide to Good Manufacturing Practice: Any substance or mixture of substances intended to be used in the manufacture of a drug (medicinal) product and that, when used in the production of a drug, becomes an active ingredient of the drug product. Such substances are intended to furnish pharmacological activity or other direct effect in the diagnosis, cure, mitigation, treatment, or prevention of disease or to affect the structure and function of the body. Preferably, their use is in a mammal, more preferably a human. The pharmacological activity may be prophylactic or for treatment of a disease state. The pharmaceutical compositions described herein may optionally comprise one or more pharmaceutically acceptable active agents or ingredients distributed within.

As used herein the terms "agent", "active agent", "drug moiety" or "drug" are used interchangeably.

Intellectual Property  
Office of N.Z.

- 9 NOV 2007

RECEIVED

Water solubility of the active agent is defined by the United States Pharmacopoeia. Therefore, active agents which meet the criteria of very soluble, freely soluble, soluble and sparingly soluble as defined therein are encompassed this invention. It is believed that the electrospun polymeric composition, which most benefits those drugs, are those which are insoluble or sparingly soluble. However, as the electrospun polymeric composition produces, or stabilizes an amorphous form of the drug, the solubility of the drug may not be as important than if it were in a crystalline state.

The fibers of this invention will contain high molecular weight polymeric carriers. These polymers, by virtue of their high molecular weight, form viscous solutions that can produce nanofibers, when subjected to an electrostatic potential. The nano fibers spun electostatically may have a very small diameter. The diameter may be as small as 0.1 nanometers, more typically less than 1 micron. This provides a high surface area to mass ratio. The fiber may be of any length, and it may include particles which vary from the more traditional spun cylindrical shape such as drop-shaped or flat.

Suitable polymeric carriers can be preferably selected from known pharmaceutical excipients. The physico-chemical characteristics of these polymers dictate the design of the dosage form, such as rapid dissolve, immediate release, delayed release, modified release such as sustained release, or pulsatile release etc.

The delivery rate of the active agent can be controlled by varying the choice of the polymer used in the fibers, the concentration of the polymer used in the fiber, the diameter of the polymeric fiber, and/or the amount of the active agent loaded in the fiber.

Suitable drug substances can be selected from a variety of known classes of drugs including, for example, analgesics, anti-inflammatory agents, anthelmintics, anti-arrhythmic agents, antibiotics (including penicillins), anticoagulants, antidepressants, antidiabetic agents, antiepileptics or anticonvulsants (also referred to as neuroprotectants, antihistamines, antihypertensive agents, antimuscarinic agents, antimycobacterial agents, antineoplastic agents, immunosuppressants, antithyroid agents, antiviral agents, anxiolytic sedatives (hypnotics and neuroleptics), astringents, beta-adrenoceptor blocking agents, blood products and substitutes, cardiac inotropic agents, corticosteroids, cough suppressants (expectorants and mucolytics), diagnostic agents, diuretics, dopaminergics (antiparkinsonian agents), haemostatics, immunological agents, lipid regulating agents, muscle relaxants, NK3 receptor antagonists, parasympathomimetics, parathyroid calcitonin and biphosphonates, prostaglandins, radiopharmaceuticals, sex hormones (including steroids), anti-allergic agents, stimulants and anorexics, sympathomimetics, thyroid agents, PDE IV inhibitors, vasodilators and xanthines.



Preferred drug substances include those intended for oral administration and intravenous administration. A description of these classes of drugs and a listing of species within each class can be found, for example, in Martindale, The Extra Pharmacopoeia, Twenty-ninth Edition, The Pharmaceutical Press, London, 1989, the disclosure of which is hereby incorporated herein by reference in its entirety. The drug substances are commercially available and/or can be prepared by techniques known and described in the art.

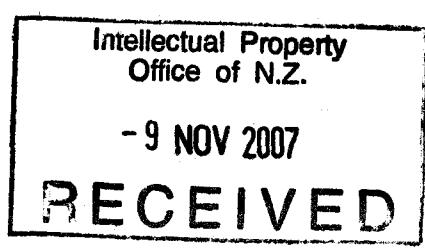
As noted, the electrospun composition may also be able to taste mask the many bitter or unpleasant tasting drugs, regardless of their solubility. Suitable active ingredients for incorporation into fibers of the present invention include the many bitter or unpleasant tasting drugs including but not limited to the histamine H<sub>2</sub>-antagonists, such as, cimetidine, ranitidine, famotidine, nizatidine, etinidine; lupiteridine, nifenidine, niperotidine, roxatidine, sulfotidine, tuvatinidine and zaltidine; antibiotics, such as penicillin, ampicillin, amoxycillin, and erythromycin; acetaminophen; aspirin; caffeine, dextromethorphan, diphenhydramine, bromopheniramine, chloropheniramine, theophylline, spironolactone, NSAIDS's such as ibuprofen, ketoprofen, naprosyn, and nabumetone; 5HT<sub>4</sub> inhibitors, such as granisetron, or ondansetron; serotonin re-uptake inhibitors, such as paroxetine, fluoxetine, and sertraline; vitamins such as ascorbic acid, vitamin A, and vitamin D; dietary minerals and nutrients, such as calcium carbonate, calcium lactate, etc., or combinations thereof.

Suitably, the above noted active agents, in particular the anti-inflammatory agents, may also be combined with other active therapeutic agents, such as various steroids, decongestants, antihistamines, etc., as may be appropriate in either the electrospun fiber or in the resulting dosage form.

Preferably, the active agents are 6-Acetyl-3,4-dihydro-2,2-dimethyl-trans(+)-4-(4-fluorobenzoylamino)-2H-benzo[b]pyran-3-ol hemihydrate, 3-Hydroxy-2-phenyl-N-[1-phenylpropyl]-4-quinoline carboxamide (Talnetant), rosiglitazone, carvedilol, hydrochlorothiazide, eprosartan, indomethacin, nifedipine, naproxen, ASA, and ketoprofen, or those described in the Examples section herein.

The relative amount of fiber forming material (primarily the polymeric carrier) and the active agent that may be present in the resultant fiber may vary. In one embodiment the active agent comprises from about 1 to about 50% w/w of the fiber when electrospun, preferably from about 35 to about 45% w/w.

DNA fibers have also been used to form fibers by electrospinning, Fang et al., J. Macromol. Sci.-Phys., B36(2), 169-173 (1997). Incorporation of a pharmaceutically acceptable active agent, such



as a biological agent, a vaccine, or a peptide, with DNA, RNA or derivatives, should they be amorphous, as a spun fiber is also within the scope of this invention.

The fiber forming characteristics of the polymer are exploited in the fabrication of nanofibers. Hence, molecular weight of the polymer is one of the single most important parameter for choice of polymer.

Another important criteria for polymer selection is the miscibility between the polymer and the drug. It may be theoretically possible to ascertain the miscibility's by comparing the solubility parameters of the drug and polymer, as described by Hancock et al, in International Journal of Pharmaceutics, 1997, 148, 1.

Another important criteria for polymer selection is its ability to stabilize the amorphous drug. It has been reported by Hancock et al, in Journal of Pharmaceutical Sciences, 1997, 86,1; that stable drug/polymer compositions should have glass transition temperatures (Tg) above the storage temperature. If the Tg of the drug/polymer combination is lower than the storage temperature, the drug will exist in the rubbery state, and will consequently be prone to molecular mobility and crystallisation. An example of this is the polymer poly(ethylene oxide) which is a semicrystalline/crystalline polymer. It has been shown that at least some crystalline drugs spun in such a polymer, having an amorphous morphology initially, will over time crystallize out.

Representative examples of amorphous polymers for use herein include, but are not limited to, polyvinyl alcohol, polyvinyl acetate, polyvinyl pyrrolidone, hyaluronic acid, alginates, carragenen, cellulose derivatives such as carboxymethyl cellulose sodium, methyl cellulose, ethylcellulose, hydroxyethyl cellulose, hydroxypropylcellulose, hydroxypropylmethyl cellulose, hydroxypropylmethyl cellulose phthalate, cellulose acetate phthalate, noncrystalline cellulose, starch and its derivatives such as hydroxyethyl starch, sodium starch glycolate, chitosan and its derivatives, albumen, gelatin, collagen, polyacrylates and methacrylic acid copolymers and their derivatives such as are found in the Eudragit family of polymers available from Rohm Pharma, poly(alpha-hydroxy acids) and its copolymers such poly(alpha-aminoacids) and its copolymers, poly(orthoesters), polyphosphazenes, polyethyloxazolines, poly(phosphoesters), and or combinations thereof.

The polymers, poly( $\epsilon$ -caprolactone), poly(lactide-co-glycolide), polyanhydrides, poly(ethylene oxide), are crystalline or semicrystalline polymers.



Most of these pharmaceutically acceptable polymers are described in detail in the Handbook of Pharmaceutical excipients, published jointly by the American Pharmaceutical association and the Pharmaceutical society of Britain.

Preferably, the polymeric carriers are divided into two categories, water soluble polymers useful for immediate release of the active agents, and water insoluble polymers useful for controlled release of the active agents. It is recognized that combinations of both carriers may be used herein. It is also recognized that several of the polyacrylates are pH dependent for the solubility and may fall into both categories.

Water soluble polymers include but are not limited to, polyvinyl alcohol, polyvinyl pyrrolidone, hyaluronic acid, alginates, carragenen, cellulose derivatives such as carboxymethyl cellulose sodium, hydroxyethyl cellulose, hydroxypropylcellulose, hydroxypropylmethyl cellulose, hydroxypropylmethyl cellulose phthalate, cellulose acetate phthalate, starch and its derivatives such as hydroxyethyl starch, sodium starch glycolate, dextrin, chitosan and its derivatives, albumen, zein, gelatin, and collagen.

A suitable water soluble polymer for use herein is polyvinylpyrrolidone, or polyvinylpyrrolidone and its copolymer with polyvinylacetate.

Water insoluble polymers include but are not limited to, polyvinyl acetate, methyl cellulose, ethylcellulose, noncrystalline cellulose, polyacrylates and its derivatives such as the Eudragit family of polymers available from Rohm Pharma (Germany), poly(alpha-hydroxy acids) and its copolymers such as poly(alpha-aminoacids) and its copolymers, poly(orthoesters), polyphosphazenes, and poly(phosphoesters).

The acrylic polymers of the Eudragit family are well known in the art and include a number of different polymers, ranging from Eudragit L100-55 (the spray dried form of Eudragit L30D), L30D, L100, S 100, 4135F, E100, EPO (powder form of E100), RL30D, RL PO, RL 100, RS 30D, RS PO, RS 100, NE 30 D, and NE 40 D. These polymers include the following: Eudragit L100-55 (the spray dried form of Eudragit L30D, Methacrylic Acid Copolymer, Type C), Eudragit L30 D55 (Methacrylic Acid Copolymer Dispersion), Eudragit L100 (Methacrylic Acid Copolymer, Type A), Eudragit S 100 (Methacrylic Acid Copolymer, Type B), Eudragit E 100 (Aminoalkyl Methacrylate Copolymer E) & Eudragit E PO (the powder form of E100), Eudragit RL 30D (Methacrylic Acid Copolymer Dispersion, Type A), Eudragit RL 100 & Eudragit RL PO (Ammonio Methacrylate Copolymer, Type A), Eudragit RS 30D (Methacrylic Acid Copolymer Dispersion, Type B), Eudragit RS PO (Ammonio Methacrylate Copolymer, Type B), Eudragit RS 100 (Ammonio

Intellectual Property  
Office of N.Z.

- 9 NOV 2007

RECEIVED

Methacrylate Copolymer, Type B), Eudragit NE 30D & Eudragit NE 40D (Ethyl Acrylate Methyl Methacrylate Copolymer Dispersion).

These pharmaceutically acceptable polymers and their derivatives are commercially available and/or be prepared by techniques known in the art. By derivatives it is meant, polymers of varying molecular weight, modification of functional groups of the polymers, or co-polymers of these agents, or mixtures thereof.

Further, two or more polymers can be used in combination to form the fibers as noted herein. Such combination may enhance fiber formation or achieve a desired drug release profile. One suitable combinations of polymers includes polyethyleoxide and polycaprolactone.

Preferably, the polymer of choice is an amorphous polymer, such as but not limited to: polyvinyl alcohol, polyvinyl acetate, polyvinyl pyrrolidone, hyaluronic acid, alginates, carraagenen, cellulose derivatives such as carboxymethyl cellulose sodium, methyl cellulose, ethylcellulose, hydroxyethyl cellulose, hydroxypropylcellulose, hydroxypropylmethyl cellulose, hydroxypropylmethyl cellulose phthalate, cellulose acetate phthalate, noncrystalline cellulose, starch and its derivatives such as hydroxyethyl starch, sodium starch glycolate, chitosan and its derivatives, albumen, gelatin, collagen, polyacrylates and its derivatives such as the Eudragit family of polymers available from Rohm Pharma, such as Eudragit L100-55, poly(alpha-hydroxy acids), poly(alpha-aminoacids) and its copolymers, poly(orthoesters), polyphosphazenes, and poly(phosphoesters). The preferred polymers are ones with functional groups capable of promoting specific interaction with the active agent to help stabilize the amorphous form of the agent. Suitable polymers are PVP and PVP with copolymers or the Eudragit group of polymers as described herein.

The choice of polymers taken with the active agent may provide suitable taste masking functions for the active agents. For instance, use of an ionic polymer of contrasting charge, such as a cationic polymer complexed with an anionic active agent, or an anionic polymer complexed with a cationic active agent may produce the desired results. Addition of a second taste masking agent, such as a suitable cyclodextrin, or its derivatives may also be used herein.

The polymeric composition may be electrospun from a solvent base or neat (as a melt). Solvent choice is preferably based upon the solubility of the active agent. Suitably, water is the best solvent for a water soluble active agent, and polymer. Alternatively, water and a water miscible organic solvent may used. However, it is necessary to use an organic solvent to prepare a homogenous solution of the drug with polymer when the drug is non-water soluble, or sparingly soluble.

It is recognized that these polymeric compositions which are spun neat may also contain additional additives such as, plasticizers, and antioxidants. The plasticizers are employed to assist in the

melting characteristics of the composition. Exemplary of plasticizers that may be employed in the coatings of this invention are triethyl citrate, triacetin, tributyl citrate, acetyl triethyl citrate, acetyl tributyl citrate, dibutyl phthalate, dibutyl sebacate, vinyl pyrrolidone and propylene glycol.

Preferably, the solvent of choice is a GRASS approved organic solvent, although the solvent may not necessarily be "pharmaceutically acceptable" one, as the resulting amounts may fall below detectable, or set limits for human consumption they may be used. It is suggested that ICH guidelines be used for selection.

Suitable solvents for use herein include, but are not limited to acetic acid, acetone, acetonitrile, methanol, ethanol, propanol, ethyl acetate, propyl acetate, butyl acetate, butanol, N,N dimethyl acetamide, N,N dimethyl formamide, 1-methyl-2- pyrrolidone, dimethyl sulfoxide, diethyl ether, diisopropyl ether, tetrahydrofuran, pentane, hexane, 2-methoxyethanol, formamide, formic acid, hexane, heptane, ethylene glycol, dioxane, 2-ethoxyethanol, trifluoroacetic acid, methyl isopropyl ketone, methyl ethyl ketone, dimethoxy propane, methylene chloride etc., or mixtures thereof.

A preferred solvent is ethanol, acetone, n-vinylpyrrolidone, dichloromethane, acetonitrile, tetrahydrofuran or a mixture of these solvents.

The solvent to polymeric composition ratio is suitable determined by the desired viscosity of the resulting formulation.

For electrospinning of a pharmaceutical polymeric composition, key parameters are viscosity, surface tension, and electrical conductivity of the solvent/polymeric composition.

By the term "nanoparticulate drug" as used herein, is meant, nanoparticule size of an active agent within the electrospun fiber, as opposed to a nanoparticule size of the resulting fibers themselves.

The polymeric carriers may also act as surface modifiers for the nanoparticulate drug. Therefore, a second oligomeric surface modifier may also be added to the electrospinning solution. All of these surface modifiers may physically adsorb to the surface of the drug nanoparticles, so as to prevent them agglomerating.

Representative examples of these second oligomeric surface modifier or excipients, include but are not limited to: Pluronics<sup>®</sup> (block copolymers of ethylene oxide and propylene oxide), lecithin, Aerosol OT<sup>TM</sup> (sodium dioctyl sulfosuccinate), sodium lauryl sulfate, Tween<sup>TM</sup>, such as Tween 20, 60 & 80, Span<sup>TM</sup>, Arlacel<sup>TM</sup>, Triton X-200, polyethylene glycols, glyceryl monostearate, Vitamin E-TPGST<sup>TM</sup> (d-alpha-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate), sucrose fatty acid esters, such

as sucrose stearate, sucrose oleate, sucrose palmitate, sucrose laurate, and sucrose acetate butyrate etc.

Triton X-200 is Polyethylene glycol octylphenyl ether sulfate ester sodium salt; or Polyethylene glycol octylphenyl ether sulfate sodium salt. Span and Arlacel are synonyms for a sorbitan fatty acid ester as defined in the Handbook of Pharmaceutical Excipients, and Tween is also a synonym for polyoxyethylene sorbitan fatty acid esters.

Surfactants are added on a weight/weight basis to the drug composition. Suitably, the surfactants are added in amounts of up to 15%, preferably about 10%, preferably about 5% or less. Surfactants can lower the viscosity and surface tension of the formulation, and in higher amounts can adversely effect the quality of the electrospun fibers.

The surfactant selection may be guided by HLB values but is not necessarily a useful criteria. While HLB surfactants have been utilised herein, such as Tween<sup>TM</sup> 80 (HLB=10), Pluronic F68 (HLB =28), and SDS (HLB>40), lower HLB value surfactants, such as Pluronic F92 may also be used.

Another pharmaceutically acceptable excipients may be added to the electrospinning composition. These excipients may be generally classified as absorption enhancers, flavouring agents, dyes, etc.

The polymeric carriers or the second oligomeric surface modifiers, if appropriately chosen, may themselves act as absorption enhancers, depending on the drug. Suitable absorption enhancers for use herein, include but are not limited to, chitosan, lecithin, lectins, sucrose fatty acid esters such as the ones derived from stearic acid, oleic acid, palmitic acid, lauric acid, and Vitamin E-TPGS, and the polyoxyethylene sorbitan fatty acid esters.

Use of the electrospun composition herein may be by conventional capsule or tablet fill as well known in the art. Alternatively, the fibers may be ground, suitably by cryogenic means, for compression into a tablet or capsule, for use by inhalation, or parenteral administration. The fibers may also be dispersed into an aqueous solution, which may then be directly administered by inhaled or given orally. The fibers may also be cut, optionally milled, and processed as a sheet for further administration with agents to form a polymeric film, which may be quick-dissolving.

An alternative electrospinning process for making the pharmaceutical compositions described herein is also possible. The Examples herein electrostatically charge the solution whereas the pharmaceutical composition may also be ejected from a sprayer onto a receiving surface that is electrostatically charged and placed at an appropriate distance from the sprayer. As jet travels in air

from the sprayer towards the charged collector, fibers are formed. The collectors can be either a metal screen, or in the form of a moving belt. The fibers deposited on the moving belt are continuously removed and taken away.

## **EXAMPLES**

### **General procedure for electrospinning**

A solution of the drug and polymer in a suitable organic solvent is electrospun using the following electrospinning set up. The solution to be electrospun is taken in a 25ml glass vessel having a 0.02mm capillary outlet at the bottom and two top inlets, one for applying a positive He pressure and the other for introducing the electrode through a rubber septum. The electrode is connected to the positive terminal of a high voltage power supply (Model ES30P/M692, Gamma High Voltage Research Inc., FL). The ground from the high voltage power supply is connected to a stainless steel rotating drum, which acts the collector for the fibers. A voltage of 18-25KV is applied to the polymer solution through the electrode which reaches the bottom of the glass vessel. This high voltage creates a monofilament from the capillary outlet and the monofilament is further splayed to form nanofibers. The inlet He pressure varying from 0.5-2 psi is adjusted to maintain a constant feed of liquid to the capillary tip, in order to produce continuous electrospinning and to prevent the formation of excess liquid droplets, which might simply fall off from the capillary. The rotating drum is kept a distance of 15-25cm from the positive electrode. The dry fibers collected on the drum is peeled off and harvested.

### **Materials**

Polyvinylpyrrolidone (PVP), molecular weight 1.3M, available from Sigma-Aldrich Chemicals (St.Louis, MO) and polyvinylpyrrolidone-co-polyvinylacetate (Kolloidon VA-64), available from BASF, Eudragit L100 55 (Rohm Pharma), polyethylene oxide as POLYOX WSR 1105 (Union Carbide) are used for experiments. Drug substances such as, rosiglitazone, carvedilol, eprosartan, hydrochlorothiazide, indomethacin, nifedipine, ketoprofen, and naproxen are available commercially from the manufacturer or from various catalogs, such as Sigma-Aldrich.

### **Methods**

#### **Drug content**

Drug content in the electrospun samples were determined by an appropriate HPLC method. A weighed amount of electrospun fibers, is dissolved in a solvent and analyzed by Agilent 1100 HPLC system having a C18 column.



### **In vitro dissolution Assay**

The equipment used for this procedure is a modified USP 4, the major differences being: 1. low volume cell. 2. stirred cell. 3. retaining filters which are adequate at retaining sub micron material. The total run time is 40 minutes. 2.5mg of drug (weigh proportionally more formulated material).

**Flow Cell Description:** Swinnex filter assemblies obtained from Millipore, having 0.2 micron Cellulose Nitrate membranes. (Millipore, MA) as internal filters. The internal volume of the cell is approximately 2 ml. A Small PTFE stirrer customized to fit the Swinnex assembly (Radleys Lab Equipment Halfround Spinvane F37136) is used. The dissolution medium at a flow rate of 5ml/min is used. The whole set up is placed at a thermostat of 37°C. The drug concentration is measured by passing the eluent through a UV detector having a flow cell dimension of 10mm. The UV detection is carried out at an appropriate wavelength for the drug.

### **Determination of extent of drug solubility**

The experimentation is designed to evaluate drug dissolution rate. As such it is unlikely with poorly soluble drugs, and with water as the dissolution medium, that 100% of the drug will dissolve in the 40 minute duration of the test. To determine the extent of drug solubility over this period one collects all 200ml of solution that elutes from the dissolution cell. Using a conventional UV spectrophotometer, this solution is compared against a reference solution of 2.5 or 4 mg of active agent dissolved in a suitable medium.

### **Amorphicity and its stability over time**

The amorphous nature of the drug in the formulation and its stability on ageing at 25°C and zero humidity, was determined by XRPD. The instrument is a Bruker D8 AXS Diffractometer.

Approximately 30 mg of sample is gently flattened on a silicon sample holder and scanned at from 2-35 degrees two-theta, at 0.02 degrees two-theta per step and a step time of 2.5 seconds. The sample is rotated at 25 rpm to reduce preferred orientation. Generator power is set at 40mA and 40 kV.

The amorphous nature of the drug was also confirmed by MDSC (TA instruments, New Castle, DE). The samples in hermetically sealed aluminium pans were heated from 0 to 200, or to 250°C at 2°C/min at a modulation frequency of  $\pm 0.159^\circ\text{C}$  every 30 seconds.

Intellectual Property  
Office of N.Z.

- 9 NOV 2007

RECEIVED

### **Example 1**

**Preparation of amorphous 6-Acetyl-3,4-dihydro-2,2-dimethyl-trans(+)-4-(4-fluorobenzoylamino)-2H-benzo[b]pyran-3-ol hemihydrate (Compound I) by electrospinning.**

Various samples shown in Table 1, were prepared by dissolving the title compound and PVP in ethanol. This solution was electrospun using the set up described in the experimental section above.

Table 1

Ingredients	Sample 1.1	Sample 1.2	Sample 1.3
Compound I	300mg	400mg	2g
PVP	600mg	600mg	3g
Ethanol used	10ml	7ml	40ml
Surfactant (Tween 80)		50mg	none
Yield (g)	400mg	n/a	4g
Drug content determined by HPLC	37.3%	37.1%	33.3%

### **XRPD of the electrospun Compound I, sample 1.2**

XRPDs of the electrospun sample 1.2 after storage at 25°C and zero humidity for several days up to 161 days, show the sample to be amorphous. Figure 1 compares the XRPDs of sample 1.2 stored for 45, 84, 133 and 161 days, along the XRPD of crystalline drug and PVP.

### **Thermal Analysis of samples 1.2 and 1.3**

Crystalline Compound I exhibits crystalline melting endotherm at 145°C, whereas the sample 1.2 and sample 1.3 do not have a crystalline melting endotherm, when heated from 0 to 200°C.

### **In vitro dissolution rates**

In vitro dissolution rates of samples 1.1, 1.2 and 1.3 were determined using the protocol described in the experimental section. The dissolution medium was a mixture of water and acetonitrile (8:2), and the wavelength used for drug detection 275nm. Two different lots of unmilled Compound I were also used for comparison. The data shown in Figure 2, indicates that the electrospun fibers have much higher dissolution rates than the crystalline drug.

The percentage drug dissolved at various time points are collated in the following table.

Table 2

Sample	Drug Content	% Drug Dissolved			
		10min	20min	30min	40 min
Compound I	99.5%	17.4	24.3	29.4	33.8

Compound I		12.1	18.2	23.2	27.8
Sample 1.1	37.3	61.1	73.5	82	87.1
Sample 1.2	37.1	52.4	67.7	78.5	84.1
Sample 1.3	33.1	36.7	61.5	73.7	82

## Example 2

### Preparation of amorphous Talnetant (Compound II) by electrospinning

Talnetant HCl, (3-Hydroxy-2-phenyl-N-[(1S)-1-phenylpropyl]-4-quinolinecarboxamide monohydrochloride, also referred to as Compound II, is dissolved in a minimum amount of tetrahydrofuran (THF), and then requisite quantity of PVP and ethanol are added to form a clear yellow solution. This solution is electrospun using the set up. The fibers collected are yellowish in color. Different samples prepared are described in the following table.

Ingredients	Sample 2.1	Sample 2.2	Sample 2.3	Sample 2.4	Sample 2.5	Sample 2.6	Sample 2.7	Sample 2.8	Sample 2.9
Compnd II	400mg	400	400	2g	1g	2g	400mg	600mg	600mg
THF	2ml	2ml	2ml	5ml	2.5ml	5ml	1.4ml	2.1ml	2.1ml
PVP	600mg	550mg	550	3g	none	none	550mg	860mg	860mg
Kolloidon VA64	none	none	none	none	1.5g	3g	none	none	none
Ethanol	10ml	10ml	10ml	50ml	10ml	20ml	10ml	13ml	13ml
Surfactant	none	Tween 80/50 mg	TPGS/ 50mg	none	none	none	Tween 80/50 mg	none	none
Yield	900mg	850mg	860mg	3.8g	2.3g	4.4g	720mg	1065mg	1065mg
Drug content by HPLC	36.7%	36.6%	39.9%	40.7%	40.0%	39.1%	39.2%	41.1%	38.7%

### XRPD of the electrospun Compound II, sample 2.1

XRPDs of the electrospun sample 2.1 after storage at 25°C and zero humidity for several days up to 161 days, show the sample to be amorphous. Figure 3 compares the XRPDs of sample 1.2 stored for 4, 43, and 120 days, along the XRPD of crystalline drug and PVP.

### Thermal Analysis of samples 2.1, 2.2, 2.3, and 2.4

Intellectual Property  
Office of N.Z.

- 9 NOV 2007

RECEIVED

Crystalline Compound II exhibits crystalline melting endotherm at 161°C, whereas the electrospun samples 2.1, 2.2, 2.3 and 2.4 do not have a crystalline melting endotherm, when heated from 0 to 200°C.

### **MDSC analysis of sample 2.7 and 2.8**

Analysis confirmed the drug to be in an amorphous state.

### **In vitro dissolution rates**

In vitro dissolution rates of samples 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5 and 2.6 were determined using the protocol described in the experimental section. The dissolution medium was 0.1M HCl, and the wavelength used for drug detection 244nm. An unmilled lot of Compound II was used for comparison. As shown in the Table below, the electrospun formulations have much faster rate of dissolution.

Sample	Drug Content	% Drug Dissolved			
		10min	20min	30min	40 min
Compound II	99.5%	3.8	6.3	8.5	10.7
Sample 2.1	36.7	15.7	30.1	43.8	59.1
Sample 2.2	36.6	24.8	42.6	58.8	69.9
Sample 2.3	39.9	19.6	44.9	62.8	75.9
Sample 2.4	40.7	8.5	15.1	21.1	29.8
Sample 2.5	40.	19.8	31.1	41.1	50.1
Sample 2.6	39.1	26.2	40.2	52.0	60.3

### **Example 3**

#### **Preparation of amorphous formulations of various drugs**

Various drugs such as avandia, eprosartan, carvedilol, hydrochloridethiazide, aspirin, naproxen, nifedipine, indomethacin, and ketoprofen were solubilized in appropriate solvents and mixed with PVP dissolved in ethanol to form clear solutions. These solutions were electrospun using the set up described in the experimental section above, and fibers containing the amorphous drug were collected. The following table describes the various formulations used to prepare the electrospun samples.

**Table 3**

Drug	Amount of drug	Solvent	PVP	Ethanol	Yield	Amorphous	
						DSC	XRPD
Rosiglitazone	350mg	THF/8ml	550mg	none	poor	yes	yes
Rosiglitazone	350mg	DCM*/3ml	550mg	9ml	poor	yes	yes

Intellectual Property  
Office of N.Z.

- 9 NOV 2007

RECEIVED

Carvedilol	700mg	NMP**/ 4ml	1.2g	6 ml	0.3g	yes	yes
Eprosartan	350mg	NMP/ 3ml	600mg	6 ml	0.2g	yes	yes
Hydrochloro-thiazide	400mg	Acetone/ 3ml	600mg	5 ml	0.7g	yes	yes
Aspirin	800mg	Ethanol/ 10ml	1.2g	5 ml	1.8g	yes	yes
Naproxen	800mg	Ethanol/ 10ml	1.2g	5ml	1.8g	yes	yes
Nifedipine	800mg	Ethanol/ 10 ml	1.2g	5ml	2g	yes	yes
Indomethacin	800mg	Aceto-nitrile/ 5ml	1.2g	10ml	1.8g	yes	yes

\* - DCM- Dichloromethane

\*\*- NMP – N-methyl pyrrolidone

#### Example 4

#### Electrospinning of 35.52% (w/w)Carvedilol HBr monohydrate composition

400 mg of crystalline material, Carvedilol HBr monohydrate was dissolved in 4.0 mL of tetrahydrofuran (Mallinckrodt) and 3 mL of MilliQ™ water. The drug solution was added to 600mg of POLYOX WSR 1105 (Union Carbide) in 10 mL of acetonitrile (EM). The contents were mixed to form a solution. This polymer solution has 1441 µS/cm of conductivity and 676 Cp of viscosity. This solution was spun using similar conditions as described above in Example 4 above to yield 402mg of nanofibers containing the title compound. The morphology of the drug using MDSC was confirmed as amorphous. Over time, the morphology of the drug will convert to a crystalline form.

#### Example 5

#### Electrospinning of (3R,3aS,6aR)-hexahydrofuro[2,3-b]furan-3-yl (1S,2R)-3-[(1,3-benzodioxol-5-ylsulfonyl)(isobutyl)amino]-2-hydroxy-1-{4-[(2-methyl-1,3-thiazol-4-yl)methoxy]benzyl}propylcarbamate- 39.76% (w/w) composition

400 mg of the free base, crystalline form title compound was dissolved in 2.0 mL of methylene chloride (EM) The drug solution was added to 600mg of Eudragit L100-55 (Rohm) in 2.0 mL of ethanol (AAPER). This solution was spun using similar conditions as described above in Example

Intellectual Property  
Office of N.Z.

- 9 NOV 2007

RECEIVED

2, above to yield 340mg of nanofibers containing the compound. The morphology of the drug using MDSC was confirmed as amorphous.

#### **Example 6**

##### **Electrospinning of 37.58% (w/w) (3R,3aS,6aR)-hexahydrofuro[2,3-b]furan-3-yl (1S,2R)-3-[(1,3-benzodioxol-5-ylsulfonyl)(isobutyl)amino]-2-hydroxy-1-{4-[(2-methyl-1,3-thiazol-4-yl)methoxy]benzyl}propylcarbamate composition**

500 mg of the title compound (crystalline form, free base) was dissolved in 2.5 mL of methylene chloride (EM). The drug solution was added to 700mg of POLYOX WSR 1105 (Union Carbide) in 15 mL of acetonitrile (EM). 50mg of Tween 80 (J.T.Baker) was added and polymer solution was clear. This solution was electrospun using similar conditions as described above in Example 2, above, to yield 774mg of nanofibers containing the title compound. The morphology of the drug using MDSC and X-Ray diffraction was confirmed as crystalline.

Repeat synthesis of the fibers using the conditions set forth in this example yielded a drug load of 39.12% w/w, and 38.06%, respectively and the morphology determination by MDSC, and XRD as crystalline.

#### **Example 7**

##### **Electrospinning of 30.22% (w/w) (3R,3aS,6aR)-hexahydrofuro[2,3-b]furan-3-yl (1S,2R)-3-[(1,3-benzodioxol-5-ylsulfonyl)(isobutyl)amino]-2-hydroxy-1-{4-[(2-methyl-1,3-thiazol-4-yl)methoxy]benzyl}propylcarbamate composition**

400 mg of the title compound (76.46%, tosylate salt) as an amorphous form, was dissolved in 3.0 mL of methylene chloride (EM). The drug solution was added to 600mg of Eudragit L100-55 (Rohm) in 3.0 mL of ethanol (AAPER). 10mg of Tween 80 (J.T.Baker) was added to the solution. This solution was electrospun using similar conditions as described above in Example 2, above, to yield 224mg of nanofibers containing the compound. The morphology of the drug in the spun fiber using MDSC and X-Ray diffraction was confirmed as amorphous.

A repeat of this experiment yielded a drug content of 29.66% w/w and confirmed morphology using MDSC and X-Ray diffraction as amorphous.

### **Example 8**

#### **Electrospinning of 29.66% (w/w) (-)-(S)-N-[ $\alpha$ -Ethylbenzyl]-3-hydroxy-2-phenyl quinoline-4-carboxamide HCl composition**

600 mg of the title compound was dissolved in 2.1 mL of tetrahydrofuran (Aldrich). The drug solution was added to 1030mg of POLYOX WSR 1105 (Union Carbide) in 26 mL of acetonitrile (EM) together with 80mg of Tween 80 (J.T.Baker). The contents were mixed to form a solution, then the polymer solution was sonicated for fifteen minutes. The solution was electrospun using similar conditions as described above in Example 2, above to yield 636mg of nanofibers containing the title compound. The morphology of the drug using MDSC and X-ray Diffraction was confirmed as crystalline.

### **Example 9**

#### **Electrospinning of 29.86% (w/w) (3R,3aS,6aR)-hexahydrofuro[2,3-b]furan-3-yl (1S,2R)-3-[(1,3-benzodioxol-5-ylsulfonyl)(isobutyl)amino]-2-hydroxy-1-{4-[(2-methyl-1,3-thiazol-4-yl)methoxy]benzyl}propylcarbamate (Tosylate) composition**

400 mg of the title compound as the amorphous form, tosylate salt (strength 78.74%) was dissolved in 2.0 mL of methylene chloride (EM). The drug solution was added to 600mg of POLYOX WSR 1105 (Union Carbide) in 23 mL of acetonitrile (EM) together with 60mg of Tween 80 (J.T.Baker). The contents were mixed to form a solution. The solution was electrospun using similar conditions as described above in Example 2 above, to yield 339mg of nanofibers containing the compound. The morphology of the drug using MDSC and X-Ray diffraction was confirmed as amorphous.

### **Example 10**

#### **Electrospinning of 29.08% (w/w) (3R,3aS,6aR)-hexahydrofuro[2,3-b]furan-3-yl (1S,2R)-3-[(1,3-benzodioxol-5-ylsulfonyl)(isobutyl)amino]-2-hydroxy-1-{4-[(2-methyl-1,3-thiazol-4-yl)methoxy]benzyl}propylcarbamate composition**

800 mg of the title compound (crystalline form) was completely dissolved in 5.0 mL of methylene chloride (EM). 1300mg of polycaprolactone(hereinafter "PCL") and 400mg of POLYOX WSR 1105 (Union Carbide) were added into drug solution together with 1mL of acetonitrile (EM). The contents were mixed to form a solution. The solution was electrospun using similar conditions as described above in Example 2, above. 757mg of nanofibers containing the compound were collected. The morphology of the drug substance as determined by MDSC was crystalline.

Intellectual Property  
Office of N.Z.

- 9 NOV 2007

RECEIVED

### **Example 11**

**Electrospinning of 48.46% (w/w) (3R,3aS,6aR)-hexahydrofuro[2,3-b]furan-3-yl (1S,2R)-3-[(1,3-benzodioxol-5-ylsulfonyl)(isobutyl)amino]-2-hydroxy-1-{4-[(2-methyl-1,3-thiazol-4-yl)methoxy]benzyl}propylcarbamate composition**

800 mg of the title compound (crystalline form) was completely dissolved in 5.0 mL of methylene chloride (EM). 800mg of PCL was added into drug solution together with additional 3.0mL of methylene chloride (EM). The contents were mixed to form a solution. The solution was electrospun using similar conditions as described above in Example 2, above. 482mg of nanofibers containing the compound were collected from the drum. The morphology of the drug substance as determined by MDSC was crystalline.

### **Example 12**

**Electrospinning of 39.14% (w/w) (3R,3aS,6aR)-hexahydrofuro[2,3-b]furan-3-yl (1S,2R)-3-[(1,3-benzodioxol-5-ylsulfonyl)(isobutyl)amino]-2-hydroxy-1-{4-[(2-methyl-1,3-thiazol-4-yl)methoxy]benzyl}propylcarbamate (Tosylate) composition**

1000 mg of the title compound (amorphous form) was completely dissolved in 3.0 mL of methylene chloride (EM). The drug solution was added into 500mg of PCL and 500mg of POLYOX WSR 1105 (Union Carbide) in 13 mL of acetonitrile (EM) The resultant solution was electrospun using conditions similar to Example 2 above, but using a feed pressure of 1psi. 1.5524g of fibers were collected and removed from the drum. The morphology of the drug substance as determined by MDSC was amorphous.

### **Example 13**

**Electrospinning of 38.35% (w/w) (3R,3aS,6aR)-hexahydrofuro[2,3-b]furan-3-yl (1S,2R)-3-[(1,3-benzodioxol-5-ylsulfonyl)(isobutyl)amino]-2-hydroxy-1-{4-[(2-methyl-1,3-thiazol-4-yl)methoxy]benzyl}propylcarbamate composition**

3.0 g of the free base, crystalline form title compound was dissolved in 15.0 mL of methylene chloride (EM) The drug solution was added to 4.5 g of Eudragit L100-55 (Rohm) in 22.0 mL of ethanol (AAPER). After that 98mg of Tween 80 (J.T.Baker) was added into the polymer solution. This solution was spun using similar conditions as described above in Example 2, above to yield 5.2 g of nanofibers containing the compound. The morphology of the drug substance as determined by MDSC was amorphous.

### **Example 14**

**Electrospinning of ~40% (w/w) 3-methyl-N-[(1S)-3-methyl-1-({[(4S,7R)-7-methyl-3-oxo-1-(2-pyridinylsulfonyl)hexahydro-1H-azepin-4-yl]amino}carbonyl)butyl]furo[3,2-b]pyridine-2-carboxamide composition**

Intellectual Property  
Office of N.Z.

- 9 NOV 2007

RECEIVED

400 mg of the title compound, as an amorphous material was dissolved in 1.8 mL of tetrahydrofuran (Aldrich). The drug solution was added to 600mg of POLY OX WSR 1105 (Union Carbide) in 16 mL of acetonitrile (EM). This solution was electrospun using similar conditions as described above in Example 2, to yield 85 mg of nanofibers containing the title compound. The morphology of the drug substance as determined by MDSC was amorphous.

All publications, including but not limited to patents and patent applications, cited in this specification are herein incorporated by reference as if each individual publication were specifically and individually indicated to be incorporated by reference herein as though fully set forth.

The above description fully discloses the invention including preferred embodiments thereof. Modifications and improvements of the embodiments specifically disclosed herein are within the scope of the following claims. Without further elaboration, it is believed that one skilled in the art can, using the preceding description, utilize the present invention to its fullest extent. Therefore, the Examples herein are to be construed as merely illustrative and not a limitation of the scope of the present invention in any way. The embodiments of the invention in which an exclusive property or privilege is claimed are defined as follows.

Intellectual Property  
Office of N.Z.

- 9 NOV 2007

RECEIVED

What is claimed is:

1. A pharmaceutical composition comprising an electrospun fiber of a pharmaceutically acceptable polymeric carrier homogeneously integrated with a stable amorphous form of a pharmaceutically acceptable active agent.
2. The composition according to Claim 1 wherein the polymeric carrier is an amorphous polymer.
3. The composition according to Claim 1 or 2 wherein the active agent is nanoparticle in size.
4. The composition according to Claim 1 or 2 wherein the active agent is water soluble.
5. The composition according to Claim 1 or 2 wherein the active agent is water insoluble.
6. The composition according to Claim 1 wherein the active agent is sparingly water soluble.
7. The composition according to Claim 1 or 2 wherein the polymeric carrier is water soluble.
8. The composition according to Claim 1 or 2 wherein the polymeric carrier is water insoluble.
9. The composition according to Claim 1 wherein the composition further comprises a surfactant which is a block copolymer of ethylene oxide and propylene oxide, lecithin, sodium dioctyl sulfosuccinate, sodium lauryl sulfate, Polysorbate 20, 60 & 80, Sorbitan esters, Sorbitan Fatty Acids, Triton X-200, polyethylene glycol, glyceryl monostearate, d-alpha-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate, sucrose fatty acid esters, sucrose stearate, sucrose oleate, sucrose palmitate, sucrose laurate, sucrose acetate butyrate, or mixtures thereof.
10. The composition according to Claim 9 wherein the surfactant is present in an amount of 0 to about 15% w/w.
11. The composition according to Claim 1 or 9 wherein the composition further comprises an absorption enhancer.
12. The composition according to Claim 1 which provides a taste masking effect of the active agent.

Intellectual Property  
Office of N.Z.

- 9 NOV 2007

RECEIVED

13. The composition according to Claim 1 wherein the polymeric carrier is polyvinyl alcohol, polyvinyl acetate, polyvinyl pyrrolidone, hyaluronic acid, alginates, carragenen, cellulose derivatives such as carboxymethyl cellulose sodium, methyl cellulose, ethylcellulose, hydroxyethyl cellulose, hydroxypropylcellulose, hydroxypropylmethyl cellulose, hydroxypropylmethyl cellulose phthalate, cellulose acetate phthalate, noncrystalline cellulose, starch and its derivatives such as hydroxyethyl starch, sodium starch glycolate, chitosan and its derivatives, albumen, gelatin, collagen, polyacrylate and polyacrylate derivatives, poly(alpha-hydroxy acids), poly(alpha-aminoacids) and its copolymers, poly(orthoesters), polyphosphazenes, or poly(phosphoesters).

14. The composition according to Claim 13 wherein the polymeric carrier is polyvinyl pyrrolidone or polyvinylpyrrolidone-co-polyvinylacetate.

15. The composition according to Claim 13 wherein the polymeric carrier is Methacrylic Acid Copolymer, Type C, Methacrylic Acid Copolymer Dispersion, Methacrylic Acid Copolymer, Type A, Methacrylic Acid Copolymer, Type B, Aminoalkyl Methacrylate Copolymer E, Methacrylic Acid Copolymer Dispersion, Type A, Ammonio Methacrylate Copolymer, Type A, Methacrylic Acid Copolymer Dispersion, Type B, Ammonio Methacrylate Copolymer, Type B, Ammonio Methacrylate Copolymer, Type B, Ethyl Acrylate Methyl Methacrylate Copolymer Dispersion, or a mixture thereof.

16. The composition according to Claim 1 wherein the pharmaceutically acceptable active agent is an analgesic, anti-inflammatory agent, antihelmintic, anti-arrhythmic agent, an antibiotic, anticoagulant, antidepressant, antidiabetic agent, antiepileptic, antihistamine, antihypertensive agent, antimuscarinic agent, antimycobacterial agent, antineoplastic agent, immunosuppressant, antithyroid agent, antiviral agent, anxiolytic sedative, astringent, beta-adrenoceptor blocking agent, contrast media, corticosteroid, cough suppressant, diuretic, dopaminergic, homeostatic, immunological agent, lipid regulating agent, muscle relaxant, parasympathomimetic, parathyroid, calcitonin, prostaglandin, radio-pharmaceutical, sex hormone, steroid, anti-allergic agent, antihistaminic, stimulant, sympathomimetic, thyroid agent, vasodilator, PDE IV inhibitor, or a mixture thereof.

17. The composition according to Claim 1 wherein the pharmaceutically acceptable active agent is aspirin, (S)-3-Hydroxy-2-phenyl-N-(1-phenylpropyl)-4-quinolinecarboxamide; 6-Acetyl-3,4-dihydro-2,2-dimethyl-trans(+)-4-(4-fluorobenzoylamino)-2H-benzo[b]pyran-3-ol hemihydrate, Rosiglitazone, Carvedilol, Eposartan, hydrochlorthiazide, nifedipine, ketoprofen, indomethacin, (3R,3aS,6aR)-hexahydrofuro[2,3-b]furan-3-yl (1S,2R)-3-[(1,3-benzodioxol-5-ylsulfonyl)(isobutyl)amino]-2-hydroxy-1-{4-[(2-methyl-1,3-thiazol-4-

Intellectual Property  
Office of N.Z.

- 9 NOV 2007

RECEIVED

yl)methoxy]benzyl}propylcarbamate, or a pharmaceutically acceptable salt thereof of any of these agents.

18. The composition according to Claim 1 in which active agent is present in an amount of about 1 to about 50% w/w.

19. The composition according to Claim 1 which is intended for oral administration.

20. The composition according to Claim 1 in which the active agent demonstrates improved bioavailability and/or improved stability, or has a modified or delayed absorption profile as compared to an immediate release dosage form in a human.

21. The composition according to Claim 1 in which the electrospun fiber is encapsulated or compressed into a tablet or capsule.

22. The composition according to Claim 1 in which the electrospun fiber is further ground in size.

23. The composition according to Claim 1 wherein the fiber is intended to rapidly dissolve.

24. The composition according to Claim 1 wherein the fiber results in the release of the active agent in a controlled release, sustained release, or pulsatile release delivery.

25. The composition according to Claim 1 wherein the fiber results in the release of the active agent immediately upon dissolution.

26. Use of a composition according to Claim 1 in the preparation of a medicament for use in inhalation therapy.

27. Use of a composition according to Claim 1 for dispersion in an aqueous solution.

28. A process for making a stable formulation of an amorphous form of a pharmaceutically active agent comprising

- a) making a solution of the active agent, and a pharmaceutically acceptable polymeric carrier with a pharmaceutically acceptable solvent; and
- b) electrospinning the solution of step (a) into an electrospun fiber.

29. The process according to Claim 28 wherein the solvent is water miscible.

Intellectual Property  
Office of N.Z.

- 9 NOV 2007

RECEIVED

30. The process according to Claim 28 wherein the solvent is water immisicible.
31. The process according to Claim 28 wherein the solution is mixture of one or more solvents.
32. The process according to Claim 29 wherein the solvent is a mixture of water and a water miscible solvent.
33. The process according to Claim 28 wherein the solvent is ethanol, or a mixture of ethanol and methylene chloride or tetrahydrofuran.
34. The process according to Claim 28 wherein the polymeric carrier is polyvinyl alcohol, polyvinyl acetate, polyvinyl pyrrolidone, hyaluronic acid, alginates, carragenen, cellulose derivatives such as carboxymethyl cellulose sodium, methyl cellulose, ethylcellulose, hydroxyethyl cellulose, hydroxypropylcellulose, hydroxypropylmethyl cellulose, hydroxypropylmethyl cellulose phthalate, cellulose acetate phthalate, noncrystalline cellulose, starch and its derivatives such as hydroxyethyl starch, sodium starch glycolate, chitosan and its derivatives, albumen, gelatin, collagen, polyacrylate and polyacrylate derivatives, poly(alpha-hydroxy acids) and its copolymers such poly(caprolactone), poly(alpha-aminoacids) and its copolymers, poly(orthoesters), polyphosphazenes, or poly(phosphoesters).
35. The process according to Claim 34 wherein the polymeric carrier is polyvinyl pyrrolidone, or polyvinylpyrrolidone-co-polyvinylacetate.
36. The composition according to claim 34 wherein the polymeric carrier is Methacrylic Acid Copolymer, Type C, Methacrylic Acid Copolymer Dispersion, Methacrylic Acid Copolymer, Type A, Methacrylic Acid Copolymer, Type B, Aminoalkyl Methacrylate Copolymer E, Methacrylic Acid Copolymer Dispersion, Type A, Ammonio Methacrylate Copolymer, Type A, Methacrylic Acid Copolymer Dispersion, Type B, Ammonio Methacrylate Copolymer, Type B, Ammonio Methacrylate Copolymer, Type B, Ethyl Acrylate Methyl Methacrylate Copolymer Dispersion, or a mixture thereof.
37. The process according to Claim 28 wherein the active agent is an analgesic, anti-inflammatory agent, anthelmintic, anti-arrhythmic agent, an antibiotic, anticoagulant, antidepressant, antidiabetic agent, antiepileptic, antihistamine, antihypertensive agent, antimuscarinic agent, antimycobacterial agent, antineoplastic agent, immunosuppressant, antithyroid agent, antiviral agent, anxiolytic sedative, astringent, beta-adrenoceptor blocking agent, contrast media, corticosteroid, cough suppressant, diuretic, dopaminergic, homeostatic,

Intellectual Property  
Office of N.Z.

- 9 NOV 2007

RECEIVED

immunological agent, lipid regulating agent, muscle relaxant, parasympathomimetic, parathyroid, calcitonin, prostaglandin, radio-pharmaceutical, sex hormone, steroid, anti-allergic agent, antihistaminic, stimulant, sympathomimetic, thyroid agent, vasodilator, PDE IV inhibitor, or a mixture thereof.

38. The process according to Claim 28 wherein the active agent is aspirin, (S)-3-Hydroxy-2-phenyl-N-(1-phenylpropyl)-4-quinolinecarboxamide, or 6-Acetyl-3,4-dihydro-2,2-dimethyl-trans(+)-4-(4-fluorobenzoylamino)-2H-benzo[b]pyran-3-ol hemihydrate, Rosiglitazone, Carvedilol, Eposartan, hydrochlorthiazide, nifedipine, ketoprofen, or indomethacin.

39. The product produced by the process according to Claim 28.

40. A process for making a stable formulation of an amorphous form of a pharmaceutically active agent comprising

- a) melting the active agent and a pharmaceutically acceptable polymeric carrier to form a melt; and
- b) electrospinning the melt of step (a) into an electrospun fiber.

41. The process according to Claim 40 wherein the polymeric carrier is polyvinyl alcohol, polyvinyl acetate, polyvinyl pyrrolidone, hyaluronic acid, alginates, caragenen, cellulose derivatives such as carboxymethyl cellulose sodium, methyl cellulose, ethylcellulose, hydroxyethyl cellulose, hydroxypropylcellulose, hydroxypropylmethyl cellulose, hydroxypropylmethyl cellulose phthalate, cellulose acetate phthalate, noncrystalline cellulose, starch and its derivatives such as hydroxyethyl starch, sodium starch glycolate, chitosan and its derivatives, albumen, gelatin, collagen, polyacrylate and polyacrylate derivatives, poly(alpha-amino acids) and its copolymers, poly(orthoesters), polyphosphazenes, or poly(phosphoesters).

42. The process according to Claim 41 wherein the polymeric carrier is polyvinyl pyrrolidone, or polyvinylpyrrolidone-co-polyvinylacetate.

43. The composition according to Claim 41 wherein the polymeric carrier is Methacrylic Acid Copolymer, Type C, Methacrylic Acid Copolymer Dispersion, Methacrylic Acid Copolymer, Type A (Eudragit L100), Methacrylic Acid Copolymer, Type B, Aminoalkyl Methacrylate Copolymer E, Methacrylic Acid Copolymer Dispersion, Type A, Ammonio Methacrylate Copolymer, Type A, Methacrylic Acid Copolymer Dispersion, Type B (Eudragit RS 30D) Ammonio Methacrylate Copolymer, Type B, Ammonio Methacrylate Copolymer, Type B, Ethyl Acrylate Methyl Methacrylate Copolymer Dispersion, or a mixture thereof.

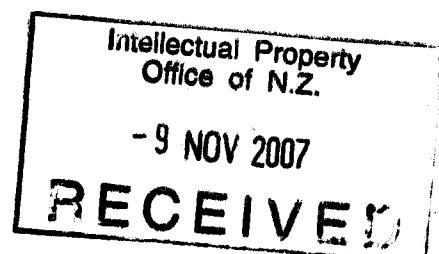
Intellectual Property  
Office of N.Z.

- 9 NOV 2007

RECEIVED

44. The process according to Claim 41 wherein the active agent is an analgesic, anti-inflammatory agent, anthelmintic, anti-arrhythmic agent, an antibiotic, anticoagulant, antidepressant, antidiabetic agent, antiepileptic, antihistamine, antihypertensive agent, antimuscarinic agent, antimycobacterial agent, antineoplastic agent, immunosuppressant, antithyroid agent, antiviral agent, anxiolytic sedative, astringent, beta-adrenoceptor blocking agent, contrast media, corticosteroid, cough suppressant, diuretic, dopaminergic, homeostatic, immunological agent, lipid regulating agent, muscle relaxant, parasympathomimetic, parathyroid, calcitonin, prostaglandin, radio-pharmaceutical, sex hormone, steroid, anti-allergic agent, antihistaminic, stimulant, sympathomimetic, thyroid agent, vasodilator, PDE IV inhibitor, or a mixture thereof.
45. The process according to Claim 41 wherein the active agent is, aspirin, (S)-3-Hydroxy-2-phenyl-N-(1-phenylpropyl)-4-quinolinecarboxamide, or 6-Acetyl-3,4-dihydro-2,2-dimethyl-trans(+)-4-(4-fluorobenzoylamino)-2H-benzo[b]pyran-3-ol hemihydrate, Rosiglitazone, Carvedilol, Eposartan, hydrochlorthiazide, nifedipine, ketoprofen or indomethacin.
46. The product produced by the process according to Claim 41.
47. The composition according to Claim 1 or 19 wherein the electrospun fiber rapidly dissolves in solution, or when administered to a human.
48. The composition according to Claim 1 wherein the fiber provides improved stability of the active agent as compared to a non-electrospun fiber.
49. A method for stabilization of an amorphic form of a pharmaceutically active agent comprising forming an electrospun fiber of a pharmaceutically acceptable polymeric carrier homogeneously integrated with an amorphic form of a pharmaceutically acceptable active agent.

## END OF CLAIMS



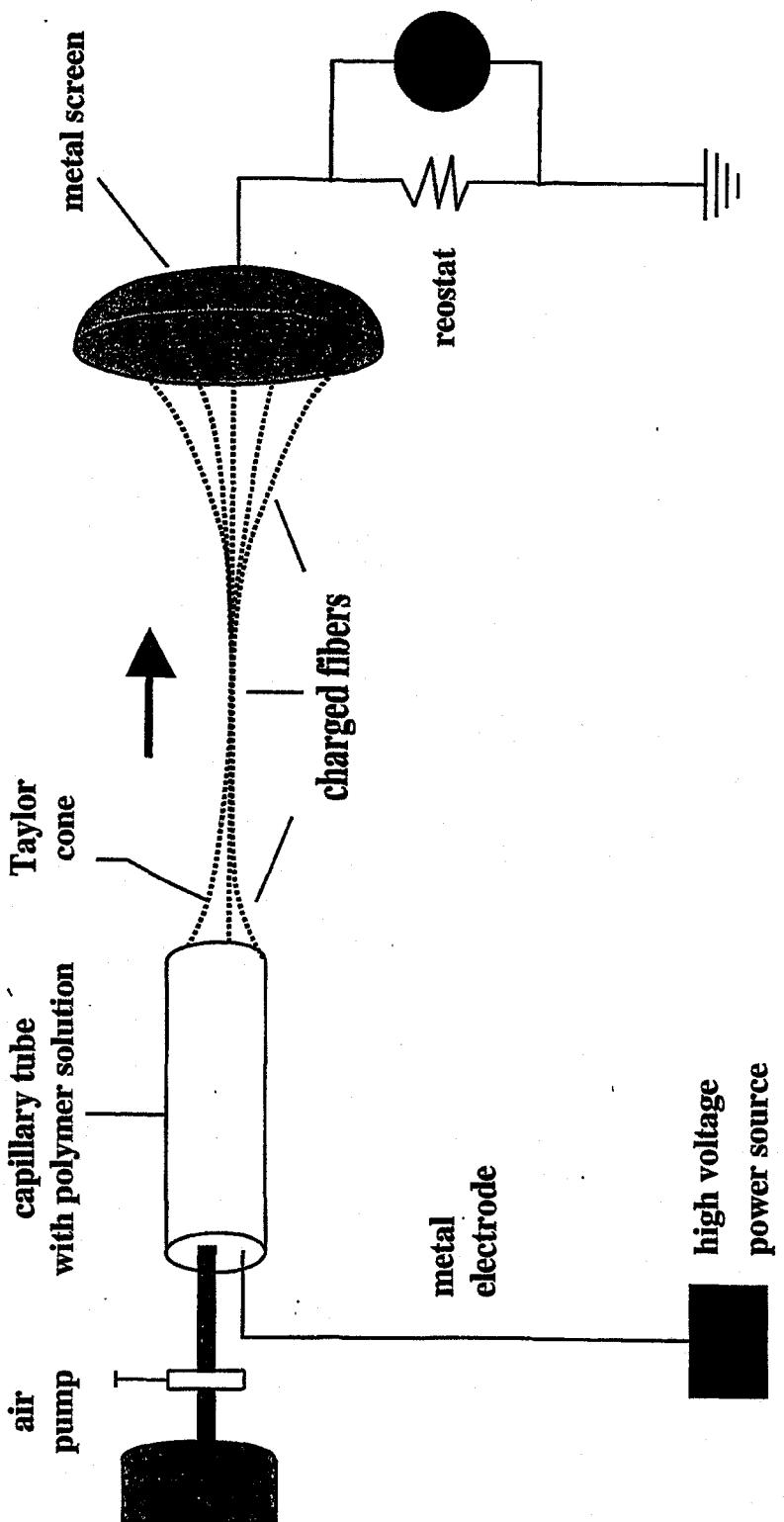
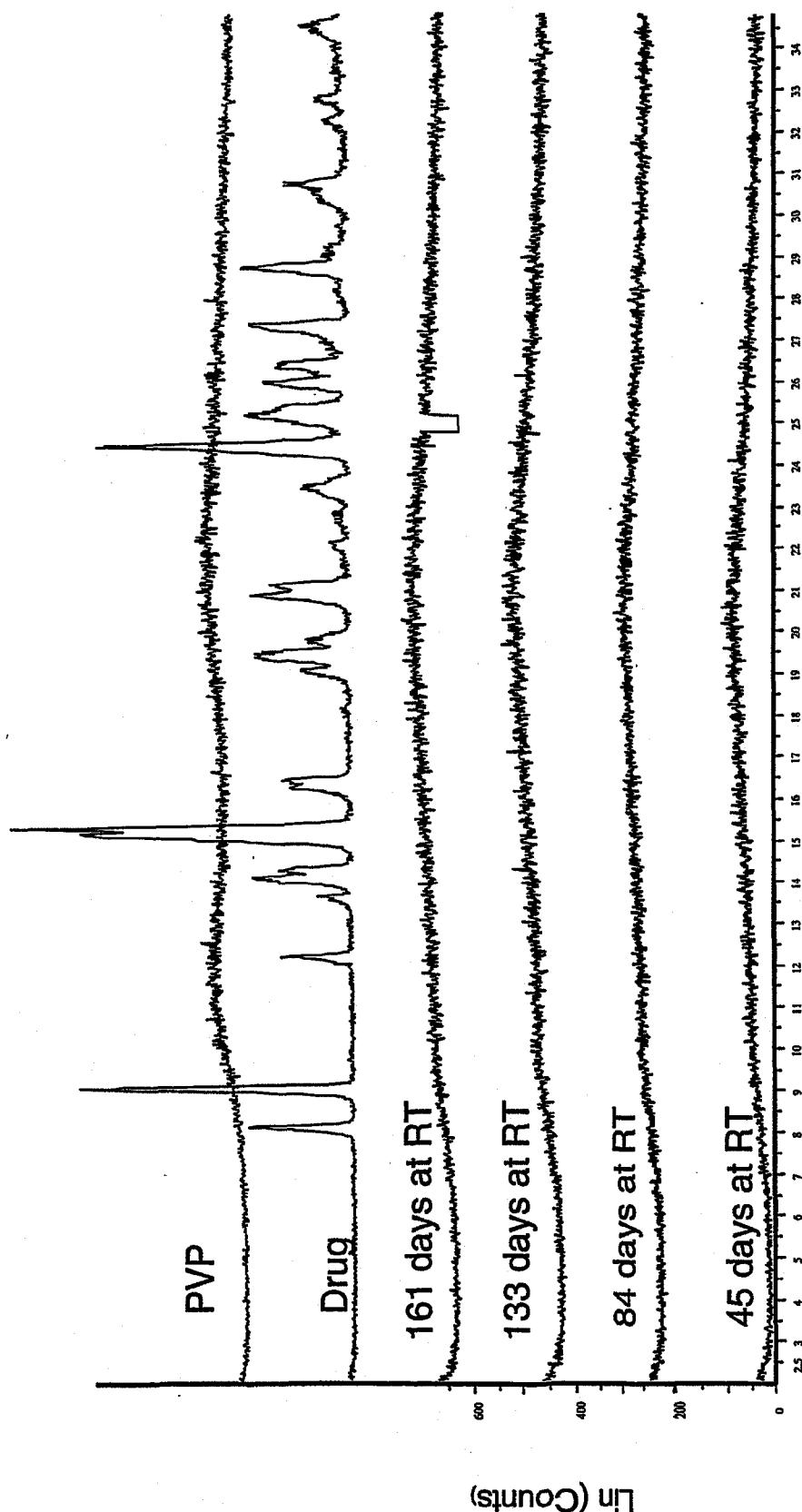


Figure 1



**Figure 2**

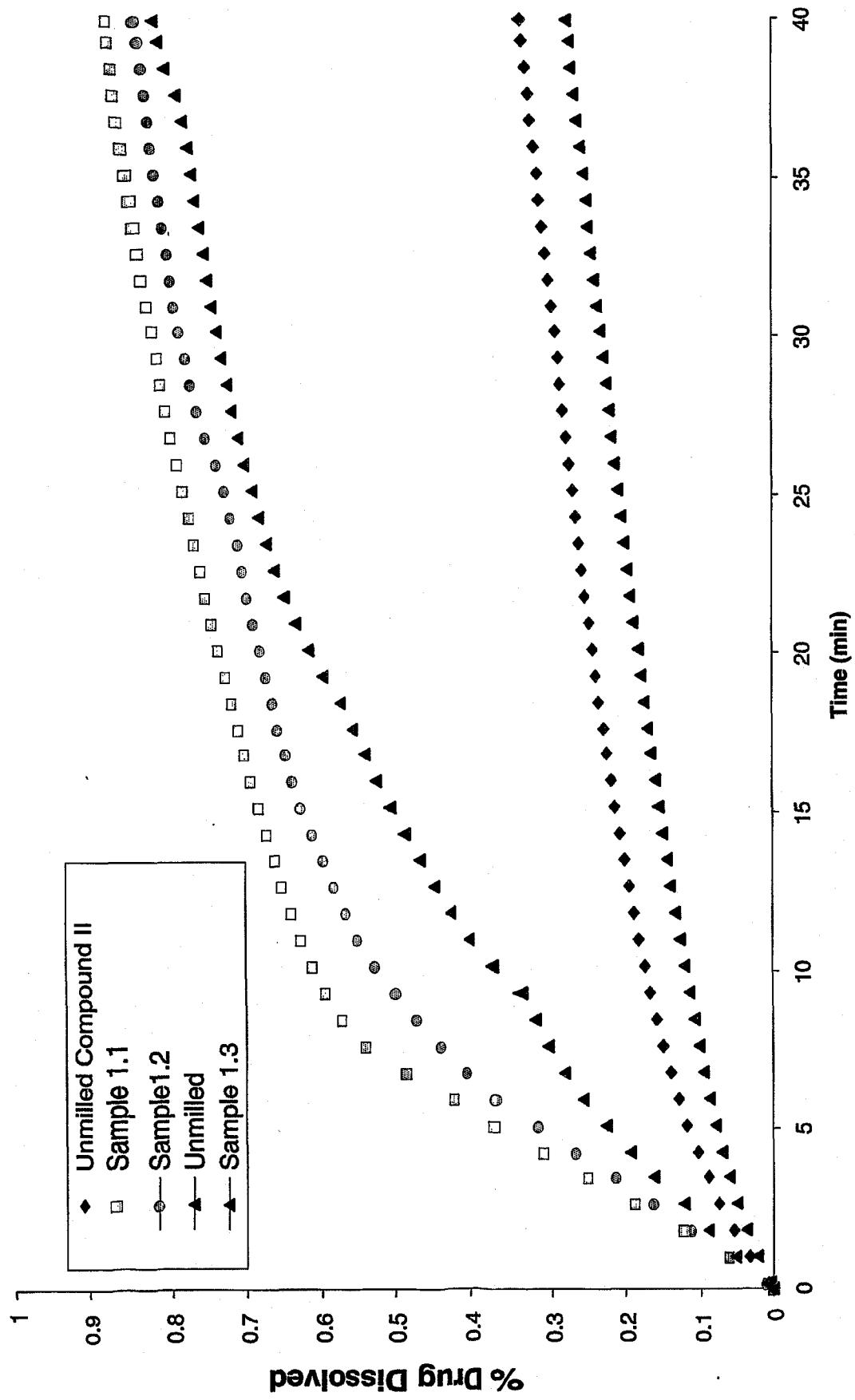


Figure 3

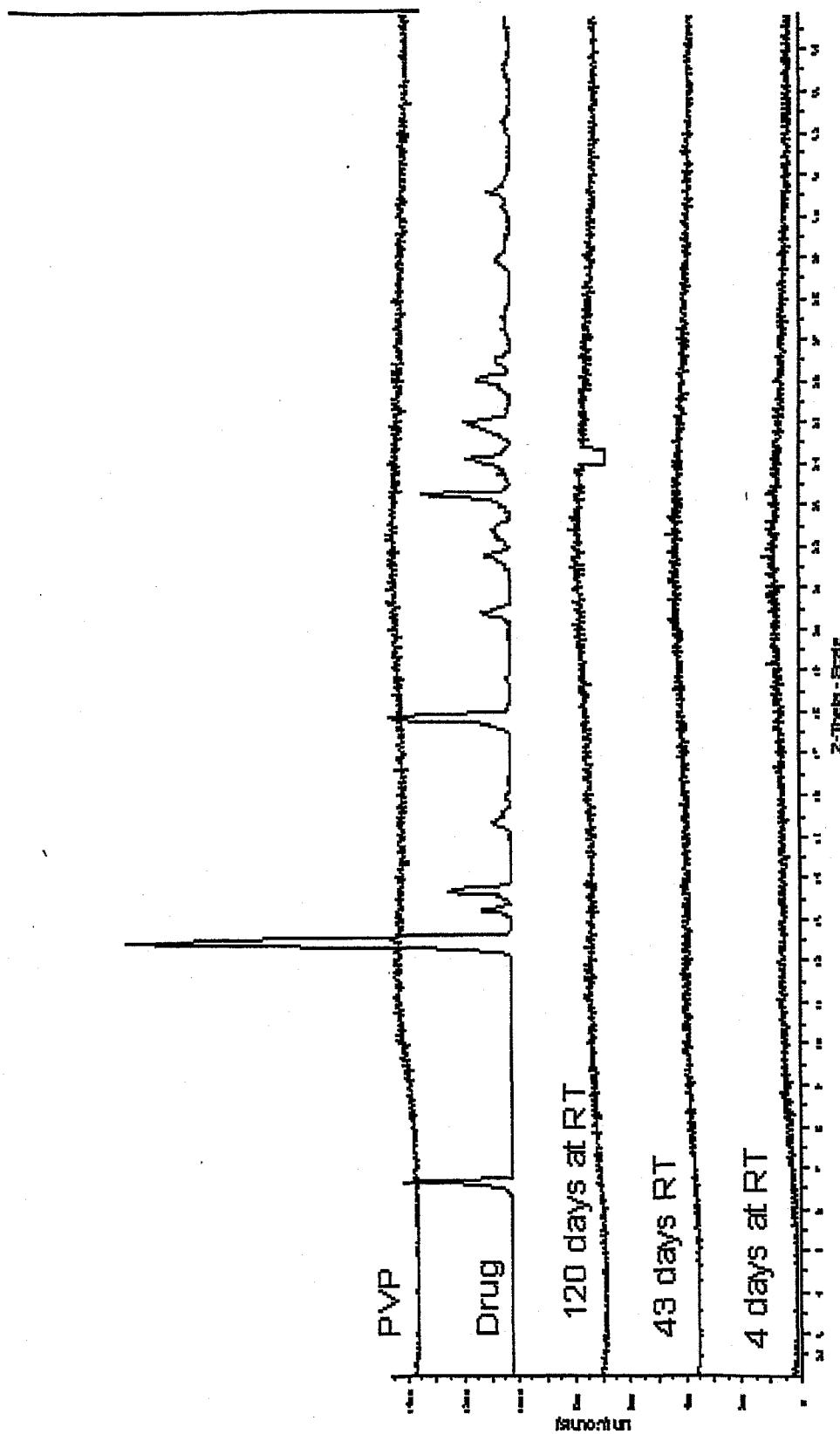


Figure 4

**END**



# UFBA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
ESCOLA POLITÉCNICA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM  
ENGENHARIA INDUSTRIAL - PEI

DOUTORADO EM ENGENHARIA INDUSTRIAL

EVANDO SANTOS ARAÚJO

Otimização de micro/nanofibras de polímeros biocompatíveis  
sintetizadas pela técnica de eletrofiação para aplicações  
farmacológicas



SALVADOR  
2015



**EVANDO SANTOS ARAÚJO**

**OTIMIZAÇÃO DE MICRO/NANOFIBRAS DE POLÍMEROS BIOCOMPATÍVEIS  
SINTETIZADAS PELA TÉCNICA DE ELETROFIAÇÃO PARA APLICAÇÕES  
FARMACOLÓGICAS**

Trabalho de Tese apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Industrial, da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Industrial, neste ano em curso.

**Orientadores:**

Prof. Dr. Helinando Pequeno de Oliveira

Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais - Universidade Federal do Vale do São Francisco (PPGCM - UNIVASF)

Prof. Dr. Marcio Luis Ferreira Nascimento

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Industrial – Universidade Federal da Bahia (PEI - UFBA)

**SALVADOR - BA**

**2015**

---

A663 Araújo, Evando Santos

Otimização de micro/nanofibras de polímeros  
biocompatíveis sintetizadas pela técnica de eletrofiação para  
aplicações farmacológicas / Evando Santos Araújo. – Salvador,  
2015.

105 f. : il. color.

Orientadores: Prof. Dr. Marcio Luis Ferreira Nascimento  
Prof. Dr. Helinando Pequeno de Oliveira.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Escola  
Politécnica, 2015.

1. Polímeros. 2. Materiais compostos. 3. Ciência dos  
materiais. 4. Nanotecnologia. I. Nascimento, Marcio Luis  
Ferreira. II. Oliveira, Helinando Pequeno de. III. Título.

CDD.: 620.192

---

OTIMIZAÇÃO DE MICRO/NANOFIBRAS DE POLÍMEROS BIOCOMPATÍVEIS  
SINTETIZADAS PELA TÉCNICA DE ELETROFIAÇÃO PARA APLICAÇÕES  
FARMACOLÓGICAS

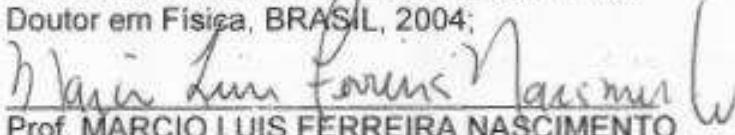
EVANDO SANTOS ARAÚJO

Tese submetida ao corpo docente do programa de pós-graduação em Engenharia Industrial da Universidade Federal da Bahia como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de doutor em Engenharia Industrial.

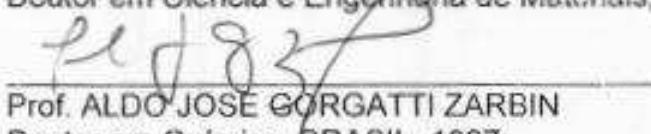
Examinada por:

  
Prof. HELINANDO PEQUENO DE OLIVEIRA

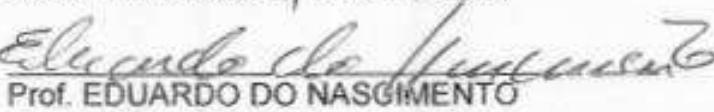
Doutor em Física, BRASIL, 2004;

  
Prof. MARCIO LUIS FERREIRA NASCIMENTO

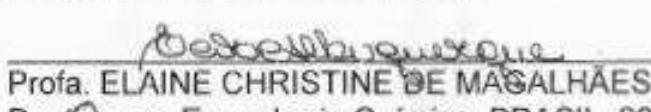
Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais, BRASIL, 2004;

  
Prof. ALDO JOSE GORGATTI ZARBIN

Doutor em Química, BRASIL, 1997;

  
Prof. EDUARDO DO NASCIMENTO

Doutor em Física, BRASIL, 2004;

  
Prof. ELAINE CHRISTINE DE MAGALHÃES CABRAL ALBUQUERQUE

Doutora em Engenharia Química, BRASIL, 2005;

  
Prof. JOSE EDSON GOMES DE SOUZA

Doutor em Ciência de Materiais, BRASIL, 2007;

Salvador, BA - BRASIL  
Maio/2015

Conforme resolução do Programa, o conjunto de orientadores teve a representação de 1 (um) único voto no parecer final da banca examinadora.



Ao meu bom Deus, por tantas graças  
alcançadas.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Adezil Pergentino e Maria Vilani, pelos ensinamentos, pela presença constante, pela paciência e pelo carinho em todos os momentos da minha vida;

À minha namorada e esposa, Amara Caroline, exemplo de mãe, de pessoa simples, companheira, amável e verdadeira. Obrigado imensamente por fazer parte da minha vida diariamente;

Ao meu filhote, Cauãzinho, de apenas oito meses, que me fez perceber aos vinte e nove anos de idade, e em tão pouco tempo, que a família deve estar sempre em primeiro plano;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Helinando P. de Oliveira, há aproximadamente sete anos, mesmo eu não tendo o mesmo ritmo e dedicação à pesquisa que ele. Agradeço pela sua paciência, pelos ensinamentos, pelo apoio e pelo seu amor pela ciência que me influenciaram bastante na escolha da minha profissão;

Ao meu orientador, prof. Dr. Marcio L. F. Nascimento, pelo apoio, pelos ensinamentos, pelas sugestões, pelas correções, durante o período de doutoramento e que me ajudaram a crescer enquanto profissional;

A todos que compõem o grupo LEIMO, pela ajuda e pelo respeito. Em especial às amigas Ariadne e Fábia;

Aos meus amigos Erlon e Gunter, por dividirem comigo inúmeras angústias, emoções e contratemplos das idas e vindas à Salvador;

A todos que participaram direta ou indiretamente de mais essa conquista, o meu muito obrigado.

"Um dos lindos segredos de cura interior é viver intensamente cada momento do dia e da própria vida. Existe uma beleza escondida em cada fase de nossa jornada. Não podemos comparar fases: adolescência, juventude, infância, maturidade. Tudo está revestido com uma beleza própria. Há um tempo para tudo, diz a Sagrada Escritura. É preciso aprender a saborear o que há de melhor em cada fase."

Padre Leo

## RESUMO

Neste trabalho foi proposto um estudo de preparação e caracterização de micro/nanofibras de poli (vinil álcool) (PVA), poli (vinil pirrolidona) (PVP) e do polímero entérico Eudragit® L-100 e seus compósitos produzidos pela técnica de eletrofiação. O objetivo foi aperfeiçoá-las para possíveis aplicações em sistemas de carreamento e liberação controlada de substâncias ativas/fármacos. Esses polímeros vem sendo amplamente utilizados sob outras formas de veiculação usuais (comprimidos e cápsulas) em aplicações na indústria farmacêutica e em biotecnologia, visto suas excelentes propriedades de biocompatibilidade e baixa toxicidade. Aliado a estas propriedades, uma maior relação de carreamento de fármacos / volume com relação a outros meios de liberação garantiu a essas estruturas com dimensão da ordem de ( $10^2$ - $10^3$ ) nm um crescente número de estudos relacionados. Para estas aplicações, fibras livres de defeitos são requeridas. Em um primeiro momento, aplicamos uma previsão teórica relativamente simples do processo de eletrofiação das fibras de PVA, PVP e Eudragit® L-100, a partir da relação diâmetro das fibras versus tensão superficial. A partir dos ajustes teóricos, obteve-se um novo parâmetro no processo, relacionado com a capacidade de estiramento da gota de solução polimérica na saída do capilar metálico como consequência da força elétrica aplicada. Em adição, foi proposta uma análise da influência da adição dos surfactantes Triton X-100 (TX-100) e do copolímero Poli (etileno-b-etileno óxido) (PE-b-PEO) na minimização dos defeitos estruturais do tipo grânulos em fibras de PVA. Os resultados mostraram que em concentrações em torno de 10 % em massa de TX-100 e em 35 % em massa de PE-b-PEO, os surfactantes foram fundamentais na minimização da quantidade de defeitos, originando fibras mais uniformes, como requerido pela indústria. Um fato marcante da pesquisa foi que pouco se tem estudado na literatura sobre micro/nanofibras de Eudragit® L-100. Nesse sentido, foram propostas duas aplicações a partir das fibras de polímero entérico produzidas. A primeira, no estudo da cinética de liberação do fármaco nifedipino em fluido gastrointestinal simulado, utilizando as micro/nanofibras de Eudragit® L-100 como carreadores, na ausência e na presença do PE-b-PEO (aditivo retardante do processo); e a segunda, com a preparação de um compósito bactericida a partir do encapsulamento das moléculas de ácido úsnico nas fibras de Eudragit® L-100, que se mostrou eficiente contra isolados bacterianos de *Staphylococcus* spp. A união de características peculiares com a incorporação de substâncias ativas fez com que esses compósitos adquirissem propriedades extremamente interessantes, visando a possibilidade de tratamento de doenças (dentrites, picos de pressão arterial, doenças intestinais, entre outras). A análise estrutural foi realizada a partir de imagens obtidas por MEV e a análise estatística dos dados obtida com uso dos programas Minitab 14 e ImageJ. A análise térmica foi realizada por DSC e a composição química dos compósitos verificada por FTIR. Os estudos de liberação foram realizados a partir das concentrações do fármaco liberadas no meio em função do tempo, utilizando um espectofotômetro e os dados experimentais obtidos foram ajustados segundo as teorias relacionadas.

**Palavras-chave:** Micro/nanofibras, eletrofiação, liberação controlada, substâncias ativas.

## ABSTRACT

In this work, we have explored the synthesis and characterization of electrospun fibers of poly (vinyl alcohol), poly (vinyl pyrrolidone) and enteric polymer Eudragit® L-100 and their composites. The main goal is directed to the application of controlled release systems and interaction of active substances / drugs. These polymers are widely used in other formulations than usual (tablets and capsules) for applications in the pharmaceutical industry and biotechnology, due to their excellent properties of biocompatibility and low toxicity. In addition, a higher ratio of surface area / volume relative to other vehicles of release is obtained with diameters in order of ( $10^2$ - $10^3$ ) nm. For these applications, defect free fibers are required. In a first step, we applied a relatively simple theoretical model of the electrospinning process of PVA, PVP and Eudragit® L-100 fibers, from the diameter ratio of the fibers versus surface tension. From theoretical adjustments, we have obtained a new parameter in the process associated with the stretchability of the polymer solution droplet in the output of the metallic capillary as a result of the electric force applied. In addition, an analysis about the influence of surfactant (TX-100 and PE-b-PEO copolymer) to minimize the structural defects (beads) in PVA fibers was proposed. The results showed that at 10 wt% of TX-100 and 35 wt% of PE-b-PEO, surfactants were able to minimize the number of defects drastically, yielding more uniform fibers for various applications. In spite of these advantages, few papers have been focused on enteric polymer micro/nanofibers. In this direction, have been proposed two applications from enteric polymer fibers. First, the study of the kinetics of drug release nifedipine in simulated gastrointestinal fluid, by using micro/nanofiber scaffolds as Eudragit® L-100, in the absence and presence of the PE-b-PEO (retardant additive); and secondly, the preparation of a bactericidal composite from the encapsulation of usnic acid molecules in Eudragit® L-100 fibers, that proved effective against bacterial isolates of *Staphylococcus* spp. These peculiar characteristics associated with specific drugs, would introduce interesting properties for treatment of diseases (dendrites, spikes in blood pressure, intestinal diseases, among others). Structural analysis was performed from images obtained by SEM and statistical analysis of data is given using Minitab 14 and ImageJ softwares. Thermal analysis was performed by DSC, whereas chemical composition of the composites observed by FTIR. Release studies were given through the absorption data versus concentration of the drug in a spectrophotometer and experimental data related to the theories.

**Keywords:** Micro/nanofibers, electrospinning, release control, active substances.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>BCC</b>	Arranjo cúbico de corpo centrado
<b>CMC</b>	Concentração micellar crítica
<b>D</b>	Diâmetro médio das fibras
<b>DL50</b>	Dose letal de uma dada substância para 50 % dos animais de teste
<b>DSC</b>	Differential scanning calorimetry (Calorimetria diferencial de varredura)
<b>EDGT</b>	Eudragit® L-100
<b>FTIR</b>	Fourier transform infrared spectroscopy (espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier)
<b>HCP</b>	Cilindros compactados hexagonalmente
<b>MEV</b>	Microscopia eletrônica de varredura
<b>P &amp; D</b>	Pesquisa e Desenvolvimento
<b>PE</b>	Poli (etileno)
<b>PEO</b>	Poli (etileno óxido)
<b>PE-b-PEO</b>	Poli (etileno–b-etileno óxido)
<b>PVA</b>	Poli (vinil álcool)
<b>PVP</b>	Poli (vinil pirrolidona)
<b>PXRD</b>	Powder X-Ray Diffraction (difração de raio-X por pó)
<b>Staphylococcus spp</b>	Espécies do gênero Staphylococcus
<b>TX-100</b>	Triton X-100
<b>USP</b>	U.S. Pharmacopeial Convention (Convenção de farmacopeia dos Estados Unidos)
<b>UV-vis</b>	Ultravioleta-visível
<b>Γ</b>	Tensão superficial
<b>k<sub>1</sub></b>	Capacidade de estiramento (ou da flexibilidade) característica da gota
<b>ΔH</b>	Entalpia de fusão
<b># grânulos</b>	Quantidade de grânulos

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO.....</b>	11
<b>CAPÍTULO 2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	14
<b>2.1 Técnica de eletrofiação para a produção de micro/nanofibras poliméricas.....</b>	14
2.1.1 Princípios da técnica.....	14
2.1.2 Defeitos estruturais do tipo grânulos.....	15
2.1.3 Parâmetros relacionados com a eletrofiação.....	17
2.1.4 Estudos teóricos em eletrofiação.....	18
2.1.5 Polímeros usados em eletrofiação.....	19
2.1.5.1 Poli (vinil álcool) (PVA).....	20
2.1.5.2 Poli (vinil pirrolidona) (PVP).....	21
2.1.5.3 Eudragit® L-100.....	22
<b>2.2 Tendências históricas, situação atual e perspectivas futuras das pesquisas em eletrofiação.....</b>	23
2.2.1 Dados históricos.....	24
2.2.2 Levantamento estatístico.....	27
2.2.3 Considerações finais sobre o tema.....	36
<b>2.3 Nanotecnologia aplicada à veiculação de fármacos.....</b>	38
2.3.1 Nanoestruturas para o carreamento de fármacos.....	38
2.3.2 Nifedipino e ácido úsnico: descrição e liberação controlada.....	39
<b>2.4 Surfactantes.....</b>	41
<b>2.5 Copolímeros em bloco.....</b>	43
<b>CAPÍTULO 3 PREPARAÇÃO DE MICRO/NANOFIBRAS POLIMÉRICAS POR ELETROFIAÇÃO.....</b>	47
<b>3.1 Influência da tensão superficial no diâmetro de micro/nanofibras de polímeros biocompatíveis sintetizadas por eletrofiação: uma investigação teórica/experimental....</b>	47
3.1.1 Introdução.....	47
3.1.2 Experimental.....	47
3.1.3 Resultados e discussão.....	50
3.1.3.1 Fundamentação teórica: diâmetro versus tensão superficial.....	50
3.1.3.2 Resultados experimentais.....	53
3.1.4 Considerações finais.....	59
<b>3.2 Influência do Triton X-100 na produção de fibras de PVA por eletrofiação.....</b>	60
3.2.1 Introdução.....	60
3.2.2 Experimental.....	60
3.2.3 Resultados e discussão.....	61
3.2.4 Considerações finais.....	67
<b>3.3 Aplicação do PE-b-PEO na minimização de grânulos em fibras de PVA produzidas por eletrofiação.....</b>	67
3.3.1 Introdução.....	67
3.3.2 Experimental.....	68
3.3.3 Resultados e discussão.....	69

3.3.4 Considerações finais.....	74
<b>CAPÍTULO 4 APLICAÇÕES FARMACOLÓGICAS DAS FIBRAS DE POLÍMERO ENTÉRICO.....</b>	<b>75</b>
<b>4.1 Fibras de polímero entérico produzidas por eletrofiação para aplicações em sistemas de liberação controlada de fármacos.....</b>	<b>75</b>
4.1.1 Introdução.....	75
4.1.2 Experimental.....	78
4.1.3 Resultados e discussão.....	80
4.1.3.1 Influência da concentração de Eudragit L-100 sobre o diâmetro das fibras produzidas.....	80
4.1.3.2 Estrutura das fibras eletrodepositadas.....	82
4.1.3.3 Análise da cinética de liberação do fármaco.....	86
4.1.3.4 Influência dos aditivos, do polímero entérico e do fármaco na liberação controlada a partir das fibras produzidas por eletrofiação.....	88
4.1.4 Considerações finais.....	90
<b>4.2 Patente de invenção: nanofibras com ação bactericida à base de poli (ácido metacrílico, metilmetacrilato) 1:1 e ácido úsnico.....</b>	<b>91</b>
<b>CAPÍTULO 5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>96</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>99</b>
<b>APÊNDICE A - PRODUÇÃO CIENTÍFICA DECORRENTE DA TESE.....</b>	<b>105</b>

# CAPÍTULO 1

## INTRODUÇÃO

Com o advento da nanotecnologia surgiu a possibilidade de se produzir estruturas cada vez menores para diversas aplicações tais como a síntese de nanopartículas, o desenvolvimento de nanocompósitos como sensores e dispositivos eletrônicos, baterias ultrafinas, nanoesferas do tipo casca-núcleo para carreamento de partículas e substâncias, micro/nanoemulsões estáveis e produção de meios de encapsulamento e liberação de fármacos mais eficientes [1]. Neste sentido, a técnica de eletrofiação é uma potencial candidata para o desenvolvimento de novos produtos com base nanotecnológica para a produção em larga escala pela indústria especializada [2].

A eletrofiação é um método simples e interessante para a síntese de micro/nanofibras poliméricas. Tais estruturas são produzidas a partir de uma força elétrica aplicada (da ordem de quilovolts, kV) na ponta de um capilar metálico contendo uma solução polimérica. Essa configuração faz com que fibras do polímero sejam formadas (com evaporação do solvente) em direção a um coletor metálico.

A área superficial das micro/nanofibras é maximizada em comparação com fibras de diâmetros maiores, obtendo-se uma relação área superficial /volume muito maior do que a razão obtida usualmente [3]. Essa característica influencia diretamente diversas aplicações, uma vez que se tem uma maior interação de partículas e substâncias incorporadas nestas fibras com o meio de ação.

Atualmente, existem companhias que se dedicam à produção de soluções poliméricas, componentes e equipamentos para eletrofiação e até mesmo de materiais a partir da técnica, visto os produtos inovadores em ascensão em todo o mundo [4-6].

Tem sido relatado na literatura um crescente número de estudos científicos e tecnológicos dessas estruturas, considerando as potenciais aplicações em ciências dos materiais, em biotecnologia e na indústria como meios de encapsulação e liberação controlada de fármacos, bem como de filtração, regeneração de tecidos musculares, revestimento de órgãos artificiais, células solares, bactericidas, supercapacitores, entre outros, utilizando como matriz polimérica o poli (vinil álcool) (PVA) [7] e o poli (vinil pirrolidona) (PVP) [8].

Estes polímeros são biodegradáveis, biocompatíveis, toxicologicamente seguros e altamente solúveis em solventes polares. Essas características fazem com que estes polímeros sejam amplamente estudados e utilizados como excipientes para a administração de fármacos

no organismo humano e como componentes de vários produtos farmacêuticos [8] sob a forma de cápsulas, óvulos, micro/nanoesferas, micro/nanocápsulas, aerossóis, pastilhas e géis [1].

Nesse contexto, a utilização de micro/nanofibras poliméricas como excipientes para encapsulamento e liberação de fármacos é um método inovador que surgiu com o avanço de estudos aplicados em nanotecnologia e vem crescendo fortemente nos últimos anos.

Outro polímero biocompatível que pode ser usado em eletrofiação é o polímero entérico Eudragit® L-100 (dissolução em pH > 6,0). Os polímeros entéricos se caracterizam por serem insolúveis em baixos valores de pH e a nomenclatura está relacionada ao uso em sistemas de liberação controlada no intestino (geralmente nas regiões do íleo e do cólon). Embora este polímero já seja amplamente estudado e utilizado na forma de microcápsulas para o carreamento de substâncias ativas no organismo, ainda é pouco estudado na literatura sob a forma de micro/nanofibras [9].

Pesquisas tanto para a produção e caracterização quanto para o melhoramento estrutural desses materiais [2] vêm sendo requeridas, uma vez que defeitos como a presença de grânulos do polímero dispostos na estrutura fibrosa, de fibras altamente quebradiças e da distribuição de diâmetros altamente irregular podem afetar as características inicialmente conhecidas e as aplicações requeridas. Estes defeitos podem ser observados quando há a falta de controle e (ou) limitação de diversos parâmetros envolvidos no aparato de eletrofiação, e consequentemente na produção desses materiais.

Dessa forma, este trabalho visa melhorar a produção de micro/nanofibras desses polímeros biocompatíveis (através da síntese, caracterização físico-química e estrutural) e propor aplicações dessas estruturas como carreadores/veículos de substâncias ativas [10] com potencial farmacológico, tais como o nifedipino e o ácido úsnico. Essa última substância é um poderoso agente antimicrobiano, antifúngico, antiviral, antitumoral e anti-inflamatório de origem linquênica, ainda pouco estudado na literatura encapsulado em micro/nanofibras de Eudragit® L-100 (de acordo com fontes de pesquisa tipo Web of Science e Scopus).

A estrutura da Tese foi organizada em capítulos. O Capítulo 2 é composto pela fundamentação teórica do trabalho, que descreve a técnica de eletrofiação, os parâmetros relevantes e os polímeros envolvidos no processo, os surfactantes e os copolímeros em bloco, a liberação controlada de fármacos, bem como as tendências históricas, a situação atual e as perspectivas futuras de pesquisa em eletrofiação, necessários ao entendimento e discussão dos resultados obtidos.

Os Capítulos 3 e 4 descrevem os resultados experimentais obtidos durante a pesquisa em conformidade com os objetivos propostos. No Capítulo 3 é dada atenção ao

melhoramento estrutural das fibras de PVA, PVP e Eudragit® L-100 como função da tensão superficial das soluções poliméricas usadas na eletrofiação. É descrito que a introdução dos surfactantes Triton X-100 e Poli(etileno)-b-poli(óxido de etileno) no preparo das soluções diminui a tensão superficial, favorecendo a produção de fibras livres de defeitos e com menores diâmetros. Já o Capítulo 4 descreve aplicações das fibras de Eudragit® L-100, produzidas por eletrofiação, como matrizes para encapsulação e liberação controlada de fármacos e compósitos bactericidas. O Capítulo 5 apresenta as conclusões do presente estudo, bem como as perspectivas de trabalhos futuros relacionados.

## CAPÍTULO 2

### REVISÃO DA LITERATURA

#### 2.1 Técnica de eletrofiação para a produção de micro/nanofibras poliméricas

##### 2.1.1 Princípios da técnica

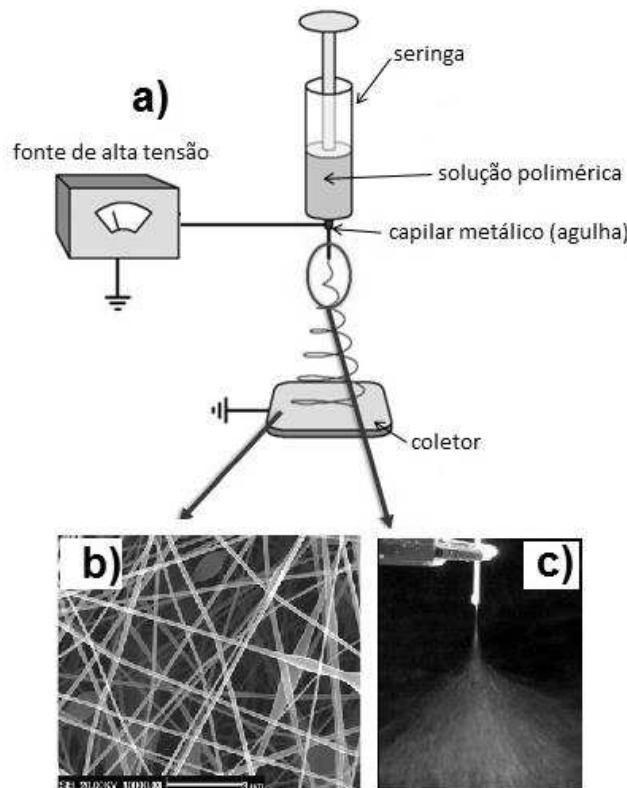
A eletrofiação (**Fig. 1**) é uma interessante e simples técnica para a produção de micro/nanofibras poliméricas como descrito em uma série de poucas patentes depositadas entre os anos de 1900 e 1940 [11-13]. Um crescente interesse pelo estudo desse método tem sido verificado na literatura considerando as potenciais aplicações em ciência dos materiais e biotecnologia [14-18] e no desenvolvimento de estruturas que podem ser progressivamente aplicadas como protótipos para liberação controlada de drogas e tecidos artificiais [19, 20].

Esses materiais são produzidos a partir de uma força resultante entre a força elétrica (originada de uma fonte de alta tensão, aplicada na ponta de um capilar metálico contendo uma solução do polímero) e a tensão superficial das gotas da solução na saída do capilar (**Fig. 1**).

Se um campo elétrico intenso (da ordem de dezenas de kV) for aplicado no material em forma de gota na saída do capilar metálico (agulha), o processo de separação de cargas fica estabelecido com a competição entre a força eletrostática e a tensão superficial: a repulsão eletrostática entre os íons presente na gota e a atração ao coletor metálico induz a deformação da gota a partir do momento em que a força eletrostática assume um valor muito maior do que a tensão superficial do gel polimérico. Como resultado, um cone de Taylor [21-23] é estabelecido com a deposição posterior da fibra no coletor metálico.

Enquanto a tensão superficial contribui para a forma esférica da gota, a força eletrostática tende a deformá-la seguindo um cone de Taylor, que se situa ao redor da gota do material à base de polímero na ponta de uma agulha. A ejeção de um jato em forma de cone carregado eletrostaticamente é estabelecida e então a repulsão eletrostática entre íons e a atração em direção a um coletor metálico cresce até o limite em que sobrepõe a tensão superficial da solução.

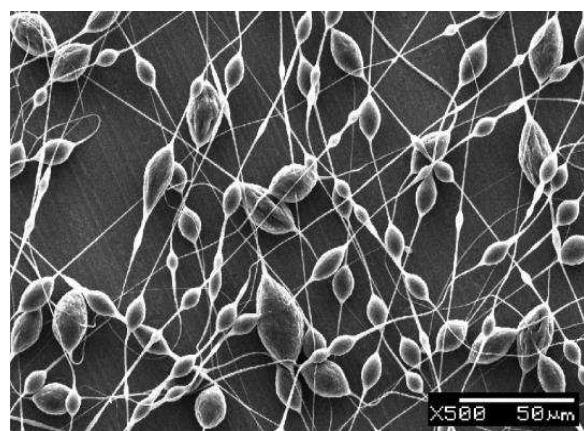
**Figura 1.** a) Esquema ilustrativo do processo de eletrofiação. Em b) uma microscopia eletrônica de varredura das fibras eletrodepositadas. Em c) o jato polimérico resultante da ação da força elétrica aplicada na ponta do capilar metálico.



### 2.1.2 Defeitos estruturais do tipo grânulos

As micro/nanofibras, sintetizadas por eletrofiação, podem apresentar defeitos estruturais do tipo grânulos (beads, em inglês) [24]. Estes defeitos (**Fig. 2**) estão intimamente relacionados com a instabilidade do jato de solução polimérica produzido com a ação da força elétrica aplicada na saída do capilar metálico contendo a solução.

**Figura 2.** Defeitos do tipo grânulos na formação de micro/nanofibras por eletrofiação [25].



Este fenômeno é resultado de uma inadequada viscoelasticidade, densidade de carga elétrica ou tensão superficial da solução em direção ao coletor metálico [26]. Adicionalmente, elevadas taxas de fluxo de polímero promovem uma secagem inadequada [27], o que também pode acarretar na formação desses defeitos. Como consequência, a formação de grânulos se mostra como um sério problema para aplicações industriais com eletrofiação, visto que as fibras se tornam extremamente irregulares, com consequente decréscimo da área superficial de ação dessas estruturas.

Yarin [28] e Entov [29] estudaram a instabilidade de jatos de soluções poliméricas durante o processo de eletrofiação. Assim como esses pesquisadores, Magarvey [30] e Huebner [31] também levaram em conta os parâmetros envolvidos na hidrodinâmica e na reologia das soluções, mas não fizeram alusão à influência dos efeitos do campo elétrico aplicado, necessário para que o processo viesse a ocorrer. Jaeger [32, 33] também estudou micro/nanofibras poliméricas produzidas com a presença de grânulos a partir de soluções aquosas de poli(óxido de etileno). Foi analisado que quanto menor o diâmetro das fibras produzidas, menor é o diâmetro dos grânulos e a distância entre eles.

Conforme relatado na literatura, o controle da formação de grânulos resulta na melhoria da elasticidade das fibras [34], a qual pode ser dada como função da concentração relativa de aditivos na solução de polímero. Mantendo-se os outros parâmetros do processo de eletrofiação constantes, outro processo aplicado na minimização dos defeitos é a diminuição da tensão superficial da solução.

Nesse sentido, a adição de um surfactante pode reduzir drasticamente a tensão superficial de uma solução polimérica. Como consequência se tem o aumento da regularidade das fibras produzidas, bem como a redução do tamanho e da quantidade dos grânulos [35, 36]. Essa é uma indicação de que quando os outros parâmetros da eletrofiação (que garantem a regularidade das fibras) são limitados, a inclusão de aditivos de custo relativamente baixo, como é o caso dos surfactantes, podem suprir tais necessidades, aumentando o rendimento da produção com fibras com diâmetros cada vez menores, livres de defeitos e com maior grau de orientação [37].

Li Yao et al. [38] relataram a correlação entre o ângulo de contato e o início da eletrofiação como consequência da diminuição da tensão superficial da gotícula na saída do capilar metálico, induzida por surfactante. X. Wang et al. [39] relataram a influência de glutaraldeído (GA) em acetona sobre a ligação cruzada de substratos de PVA visando a melhoria da qualidade da solução para o processo de eletrofiação e aumento da resistência mecânica das fibras produzidas. Em ambos os artigos, surfactantes têm sido utilizados para

diminuir a tensão superficial da solução e, consequentemente, estabelecer uma produção de estruturas mais regulares.

Outros trabalhos abordam o fenômeno relacionando-o diretamente com os parâmetros elétricos aplicados no processo. Eles deixam claro que quanto menor a corrente elétrica aplicada durante o processo de eletrofiação, maior a possibilidade de grânulos nas fibras produzidas [40, 41].

### 2.1.3 Parâmetros relacionados com a eletrofiação

Diversos parâmetros estão envolvidos no processo de eletrofiação. A **Tab. 1** traz uma descrição da relação entre esses parâmetros e o produto final da eletrofiação de soluções poliméricas. A produção de fibras com melhor qualidade estrutural e com maior área superficial de ação está diretamente relacionada com o controle desses parâmetros. Estes podem ser divididos em três classes: os parâmetros relacionados à solução polimérica, os relacionados ao próprio processo de eletrofiação e os relacionados aos fatores ambientais.

**Tabela 1.** Parâmetros envolvidos em eletrofiação e relação com a morfologia das fibras produzidas.

Parâmetro	Efeito na produção das micro/nanofibras	Refs.
Concentração do polímero	Aumentando a concentração do polímero, se tem aumentado o diâmetro das fibras produzidas.	[40-42]
Condutividade iônica da solução	Quanto maior a condutividade, menor o diâmetro das fibras produzidas.	[41, 43]
Distância da ponta da agulha ao coletor	Com a diminuição da distância, fibras planas (fitas) podem ser formadas. Aumentando-se a distância, fibras cilíndricas são originadas.	[44, 45]
Fluxo da solução polimérica	Diminuindo o fluxo da solução polimérica, o diâmetro das fibras também é diminuído. Com uma alta taxa de eletrodeposição, pode ocorrer a formação de grânulos, devido à evaporação inadequada do solvente.	[46, 47]
Massa molar do polímero	Com o aumento da massa molar do polímero, se tem uma redução no número de grânulos.	[48, 49]
Temperatura	Aumentando a temperatura, o diâmetro das fibras decresce.	[50, 51]
Tensão elétrica aplicada	Quanto maior a tensão, menor é o diâmetro das fibras produzidas.	[40, 48]
Tensão superficial da solução polimérica	Quanto menor a tensão superficial da solução polimérica, menor é o diâmetro das fibras.	[47, 52]
Tipo de coletor	Quanto menor o coletor metálico plano, maior a possibilidade da formação de grânulos. Em coletores metálicos planos as fibras são eletrodepositadas de forma aleatória, enquanto através do uso de um tambor metálico rotativo (ou roda rotativa) como o coletor, se tem a coleção de fibras mais paralelasumas às outras.	[53-57]
Umidade	Alta umidade pode resultar em fibras mais porosas.	[51, 58]
Viscosidade	Baixo número de grânulos (ou ausência) e aumento do diâmetro das fibras com o aumento da viscosidade da solução.	[59, 60]
Escolha do solvente	O uso de diferentes solventes para solubilizar um mesmo polímero varia a sua viscosidade e sua tensão superficial em solução.	[61]

Os parâmetros da solução polimérica estão relacionados ao tipo de polímero, à concentração, à massa molar, à viscosidade, à tensão superficial, à condutividade e à densidade de carga da solução polimérica, bem como da escolha do solvente.

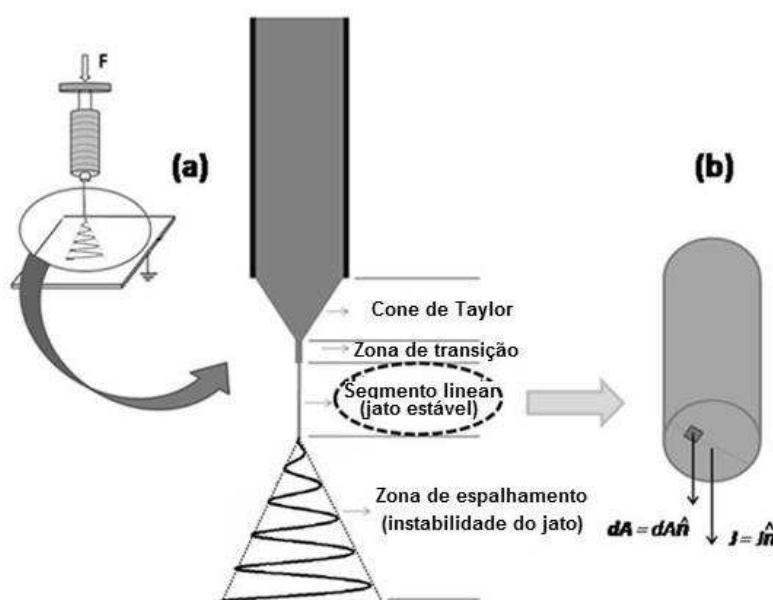
Já os parâmetros do processo estão associados à tensão elétrica aplicada, ao fluxo da solução polimérica, ao tipo de coletor e à distância da ponta da agulha ao coletor metálico. Os parâmetros ambientais dizem respeito principalmente à umidade e à temperatura.

#### 2.1.4 Estudos teóricos em eletrofiação

Estudos teóricos sobre o processo de eletrofiação foram desenvolvidos por J. Zeleny [62-64] a partir da análise de descargas elétricas em líquidos. G. Taylor [65], V. G. Drozin [66], Baumgarten [67] e J. Doshi & D. H. Reneker [68] continuaram os estudos teóricos nessa direção.

Recentemente, estudos teóricos de eletrofiação têm sido desenvolvidos por diferentes grupos de pesquisa. Gañán [69, 70] propôs um modelo unidimensional que discute a estabilidade do jato polimérico sobre ação de uma força elétrica na zona de transição entre o cone de Taylor (deformação da gota na saída do capilar metálico como consequência de uma força elétrica aplicada) e o segmento linear (região do jato polimérico onde o solvente é evaporado e o diâmetro das fibras se define) (ver **Fig. 3**) do jato eletrificado.

**Figura 3.** (a) Representação esquemática das quatro regiões do processo de eletrofiação e de (b) um corte transversal na região do segmento linear (onde o diâmetro das fibras se define).  $dA$  corresponde ao elemento infinitesimal de área da seção transversal da fibra e  $J$  corresponde à densidade de corrente elétrica que passa nessa seção transversal).



Holman et al. [71, 72] estudaram a estabilidade de jatos fluidos sob a ação de um campo elétrico durante o processo de eletrofiação e concluiu que a instabilidade na região de espalhamento (após a região de segmento linear) (ver **Fig. 3**) é uma consequência da interação entre a densidade superficial de cargas elétricas dos jatos e o campo elétrico aplicado.

Em adição, o efeito da temperatura na descrição do movimento do fluido carregado eletricamente foi considerado [73] através de adaptações nas Equações de Maxwell e de Navier-Stokes. Reneker et al. [74-79] propuseram um interessante modelo que retorna uma completa descrição das quatro regiões estabelecidas da ponta do capilar metálico eletrificado ao coletor metálico durante o processo, como ilustrado na **Fig. 3**.

Baseado nesses estudos, Reneker & Yarin [80] descreveram que a relaxação de cadeias poliméricas afeta o alongamento das fibras na região de segmento linear, onde um fluxo com taxa de estiramento de  $20\text{ s}^{-1}$  é controlado por efeitos de potencial elétrico e tensão de estiramento. É nessa região que o diâmetro das fibras se define [80].

### 2.1.5 Polímeros usados em eletrofiação

Diversos polímeros são utilizados em eletrofiação (**Tab. 2**). Os biodegradáveis, os biocompatíveis e os não-tóxicos se configuram entre os mais usados para produzir nanofibras para as aplicações requeridas.

**Tabela 2.** Polímeros usados em eletrofiação e suas aplicações.

Polímero	Aplicações	Refs.
Poli (vinil álcool) (PVA)	Curativos, sistemas de liberação controlada de fármacos, revestimento de órgãos, simulação de tecidos musculares	[84]
Poli (vinil pirrolidona) (PVP)	Sistemas de liberação controlada de fármacos	[85]
Poliuretano (PU)	Curativos para cicatrização de feridas	[86]
Poliestireno (PS)	Engenharia de tecidos da pele	[87]
Quitosana	Liberação controlada de drogas, curativos para feridas	[88]
Colágeno	Engenharia de tecidos e cosméticos	[89]
Colágeno/quitosana	Biomateriais	[90]
Polí(glicolídeo) (PGA)	Engenharia de tecidos	[91]
Poli (láctico-co-glicólico) (PLGA)	Aplicações biomédicas, componentes de curativos para feridas	[92]
Fibrinogênio	Curativos para feridas	[93]
Acetato de celulose	Membranas absorтивas, filtros	[94]
Poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL)	Regeneração de tecidos ósseos	[95]
Poli (etileno-co-vinil álcool) (PEVA)	Engenharia de tecidos não-ósseos	[96]
Celulose	Membranas semi-permeáveis, filtração	[97]
Gelatina	Matriz polimérica para cicatrização de feridas	[98]
Ácido Hialurônico (HA)	Implantes médicos	[99]
Poli (fluoreto de vinilideno)	Engenharia de tecidos neurais	[100]
Poli (etileno glicol) (PEG ou PEO)	Liberação controlada de fármacos, curativos para feridas	[88]
Polianilina	Sensor de umidade	[101]
Polipirrol	Aplicações biomédicas, liberação controlada de fármacos	[102]

Como exemplo, podemos citar o poli (vinil álcool), o poli (vinil pirrolidona), o poli (fluoreto de vinilideno), o hexafluoropropileno, o poli (etileno glicol), a quitosana [81, 82], polímeros usados como matrizes para o carreamento de nanopartículas e fármacos [19, 83].

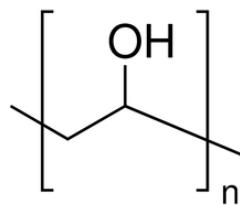
A **Tab.2** descreve as aplicações de alguns polímeros usados em eletrofiação. Esses polímeros se tornam potenciais em diversas aplicações nanobiotecnológicas, tais como descritas na **Tab. 2** e lideram amplamente os produtos produzidos por eletrofiação.

Na continuidade dessa discussão, devido às excelentes propriedades apresentadas e que são requeridas à eletrodeposição de micro/nanofibras, aliadas ao apelo por novas tecnologias relacionadas, uma maior atenção será dada aos polímeros biocompatíveis PVA, PVP e Eudragit® L-100 (polímero entérico). A seguir, estes polímeros potenciais em eletrofiação serão descritos detalhadamente.

#### 2.1.5.1 Poli (vinil álcool) (PVA)

O Poli (vinil álcool) ou álcool polivinílico (PVA) é um polímero sintetizado através da polimerização do acetato de vinila em acetato polivinílico (PVAc) com posterior hidrólise para gerar o PVA. A estrutura química do PVA é mostrada na **Fig. 4**. O grau de hidrólise aumenta a cristalinidade e a solubilidade do PVA em água e em outros solventes altamente polares. Além do grau de hidrólise, a solubilidade do PVA em água depende fortemente do grau de polimerização e da temperatura da solução.

**Figura 4.** Estrutura química do PVA.



Tem sido descrito na literatura que a viscosidade, a tensão superficial e a solubilidade do PVA em solução dependem da sua concentração, da temperatura, da sua hidrólise e da sua massa molar [103].

Soluções aquosas de PVA como matrizes poliméricas têm sido usadas em várias aplicações biológicas e farmacêuticas [84] devido à vantagem de serem não-tóxicas, não-carcinogênicas, biodegradáveis e transparentes. Esse biomaterial também mostra um caráter

elástico com alto grau de entumescimento em água ou em fluidos biológicos. Dessa forma, pode ser usado para simular tecidos naturais (como músculos) [104] e usados como carreadores de substâncias no organismo humano.

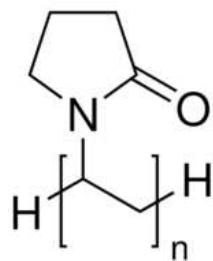
Hidrogéis de PVA têm sido amplamente usados na indústria na fabricação de lentes de contato, de revestimentos de órgãos artificiais e no encapsulamento e liberação controlada de fármacos. O PVA também é amplamente utilizado na indústria de medicamentos tópicos como estabilizantes em emulsões e em formulações medicamentosas orais [105].

Nos últimos anos, vem sendo amplamente utilizado como micro/nanofibras [24, 106] para diversas aplicações farmacológicas e em biotecnologia. Outras aplicações incluem a produção de células de combustível [107], de materiais eletrônicos moles [108], de dispositivos catalíticos [109], de detectores de radiação [110], em tecnologias e aplicações de filtração [111] e no desenvolvimento de dispositivos com ação antimicrobiana [112] e de sistemas de encapsulamento e liberação controlada de fármacos [113].

#### 2.1.5.2 Poli (vinil pirrolidona) (PVP)

O Poli (vinil pirrolidona), ou simplesmente PVP, é um polímero solúvel em água e em alcoóis e disponível em diferentes pesos moleculares variando entre 25.000 e 360.000. O PVP é obtido a partir da síntese por polimerização de monômeros de vinilpirrolidona em água ou isopropanol. A estrutura química do PVP é mostrada na **Fig. 5**.

**Figura 5.** Estrutura química do PVP.



É utilizado amplamente na indústria farmacêutica como excipiente (ligante) na formulação de comprimidos (oral e sublingual), de revestimentos de cápsulas para encapsulamento e liberação rápida de fármacos no organismo humano, de pastilhas para o tratamento de dentites e inclusões de anestésicos locais, dentre outros.

Possui boa capacidade de fluidez em solução e baixa friabilidade (susceptibilidade do material se esfarelar) [114, 115], além de aumentar a dissolução de princípios ativos de medicamentos no organismo humano.

Além disso, o PVP também é utilizado como matriz polimérica como excipiente para encapsular princípios ativos e liberação rápida de drogas e substâncias incorporadas.

Muitas substâncias ativas possuem uma fraca solubilidade em água, devido à biodisponibilidade limitada e (ou) natureza hidrofóbica. Uma forma simples de aprimorar a biodisponibilidade de um princípio ativo com essas características é melhorar a sua dissolução com a adição de agentes solubilizantes, tais como o PVP. Esse interage fortemente na superfície do ativo formando estruturas solúveis em água com consequente aumento da biodisponibilidade. Esse é um caso que podemos observar no encapsulamento de paracetamol, de diazepam e do nifedipino [116, 117].

Por exemplo, para o uso em pastilhas e comprimidos, o PVP faz com que o fármaco incorporado seja liberado mais rapidamente em comparação com outros ligantes como gelatina e hidroxipropil celulose, mesmo com aparência visual de um material rígido [118]. Neste sentido, o PVP também é útil para a preparação de soluções e dispersões sólidas devido à sua excelente propriedade hidrofílica e capacidade para fomar complexos solúveis em água.

Ultimamente também vem sendo estudado de forma ampla como matriz polimérica nos processos de eletrofiação como compósitos PVP/nanopartículas metálicas, para aplicações antibacterianas, e PVP/fármacos no encapsulamento e na liberação rápida de drogas por via oral, sublingual, vaginal e cutânea.

#### 2.1.5.3 Eudragit® L-100

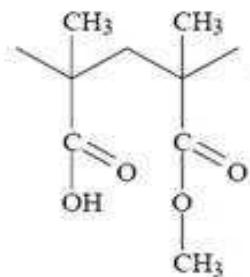
O Eudragit® L-100, poli (ácido metacrílico-b-metil metacrílico) na razão molar de 1:1, é marca registrada da companhia farmacêutica alemã Rohm GmbH & Co. KG. Trata-se de um copolímero em bloco não iônico baseado em ácido metacrílico e metil metacrilato [119].

É também um polímero biocompatível da classe dos polímeros entéricos, caracterizados por não solubilizarem em meios com baixos valores de pH. No caso do Eudragit® L-100, a dissolução ocorre a partir do pH=6.

Dessa forma, é caracterizado pela rápida dissolução em meios básicos e pela lenta dissolução em meios ácidos e neutros (em torno de 6 h para total dissolução do polímero). Apresenta-se como uma substância sólida em forma de pó branco com um ligeiro odor característico.

Devido à sua biodisponibilidade [120], este copolímero é usado amplamente no carreamento de princípios ativos para o intestino via administração oral e em outros locais de ação no organismo humano, com pH básicos. A estrutura química do Eudragit® L-100 é mostrada na **Fig. 6**.

**Figura 6.** Estrutura química do Eudragit® L-100.



Com relação à solubilidade em solventes seletivos, o Eudragit® L-100 pode se dissolver em metanol, etanol, em misturas aquosas com álcool isopropil ou acetona (3% em massa de água) e em soluções aquosas de hidróxido de Sódio (40 g/L). Nestes casos, apresentam-se como soluções claras, transparentes e se transformam em filmes com a evaporação do solvente. Em contrapartida, são praticamente insolúveis em água com pH < 6,0.

O Eudragit® L-100 tem sua origem sintética datada de 1985 [121] e apesar de amplamente difundido como meio para encapsulamento e liberação controlada de fármacos em micro/nanoesferas do tipo casca-núcleo, um pequeno número de trabalhos científicos [122, 123] têm sido dedicados ao Eudragit® L-100 como matrizes poliméricas para a produção de micro/nanofibras para aplicações farmacológicas. Esse fato garante um cenário amplo de pesquisas e desenvolvimento de novos procedimentos e tecnologias em eletrofiação de compósitos que envolvam esse polímero entérico para a indústria.

Além disso, existem substâncias ativas pouco estudadas na literatura com propriedades antimicrobianas e antitumorais e que podem ser encapsuladas às fibras de Eudragit® L-100 para as aplicações citadas, tornando este estudo ainda mais significativo [124]. Em consequência, futuros materiais híbridos eficientes com ação antimicrobiana, no tratamento de picos hipertensivos, de dentrites, no trato de doenças vaginais, de doenças intestinais, entre outras podem ser desenvolvidos.

## 2.2 Tendências históricas, situação atual e perspectivas futuras das pesquisas em eletrofiação

### 2.2.1 Dados históricos

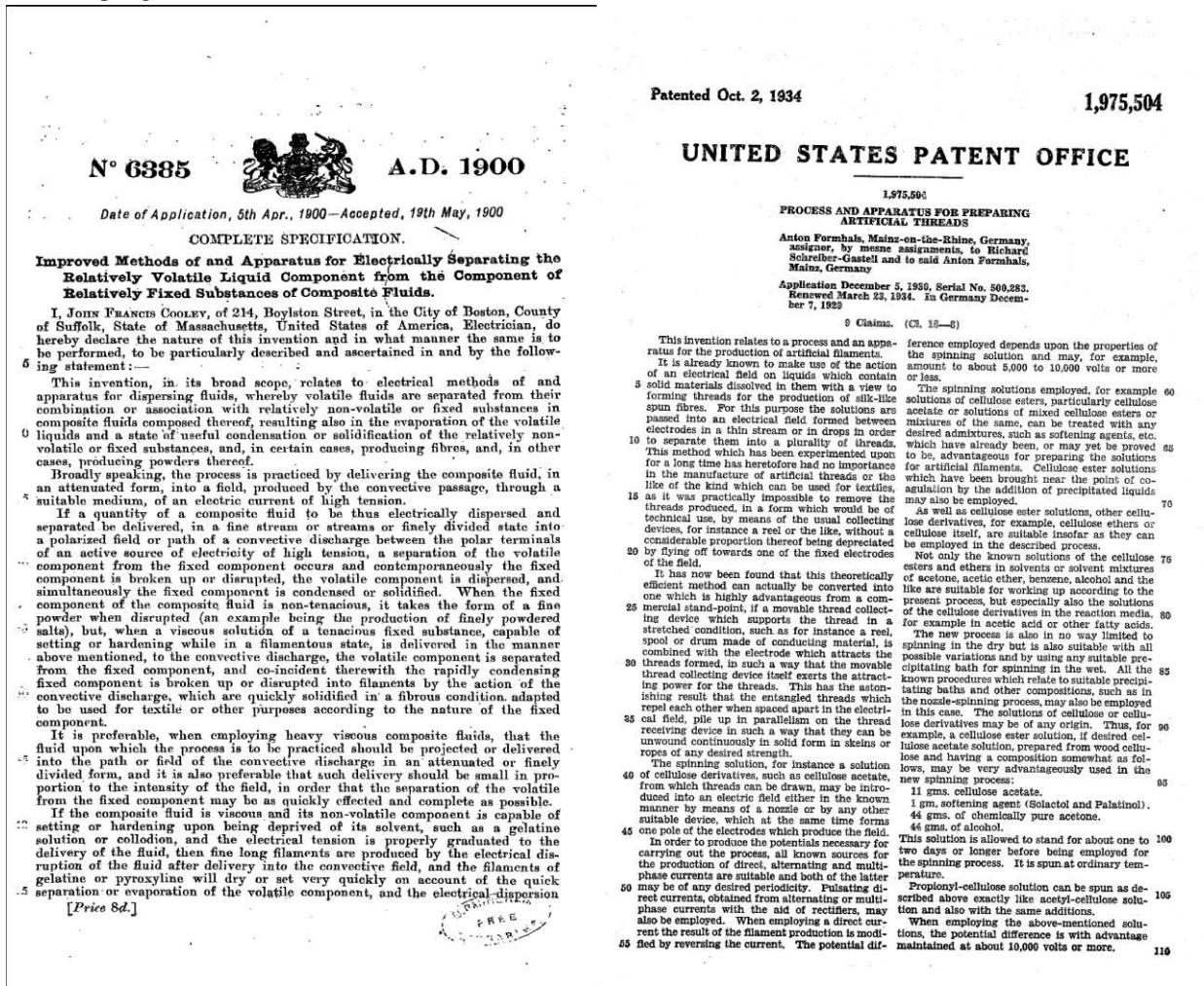
A história da produção de fibras pela técnica de eletrofiação teve início a mais de quatro séculos, mas nas últimas décadas este processo alcançou grande popularidade no meio acadêmico como um método para a fabricação de fibras em nano-escala. Ao longo da história, o entendimento da eletrofiação foi estritamente empírico, com base na experimentação de tentativa e erro. O primeiro artigo científico moderno que descreve a transição de gotas de um líquido no final de capilares de metal em fibras eletrodepositadas foi publicado pelo físico Tcheco-americano John Zeleny (1872-1951) em 1914 [125].

De acordo com Tucker et al. [126], em 1600, o primeiro registro sobre a atração eletrostática de um líquido foi observada por William Gilbert (1544-1603). Christian Friedrich Schönbein (1799-1868) utilizou a técnica para produzir nitrato de celulose com alto teor de nitrato, em 1846. Em 1887 Charles Vernon Boys (1855-1944) descreveu o processo em um artigo sobre fabricação de fibras. John Francis Cooley (1861-1903) depositou a primeira patente com eletrofiação em 1900 [127] (**Fig. 7**, à esquerda). Sua contribuição se baseou na tentativa de modelar matematicamente o comportamento de fluidos sob a ação de forças eletrostáticas. William James Morton (1845-1920) continuou os trabalhos de Cooley e também depositou outra patente relacionada em 1902. No período de 1934 a 1944, Anton Formhals (1877-1956) depositou pelo menos 22 patentes em eletrofiação, a primeira mostrada na **Fig. 7**, à direita [128]. Em 1938, Nikolai Albertovich Fuchs (1895-1982), Nathalie D. Rozenblum e Igor Vasil'evich Petryanov-Sokolov (1907-1996) desenvolveram a primeira aplicação de nanofibras por eletrofiação como filtros. No período de 1964 a 1969, Geoffrey Ingram Taylor (1886-1975) introduziu o primeiro conceito físico a cerca do processo de eletrofiação, modelando matematicamente a forma do cone (cone de Taylor) formado pela gota de fluido na saída de um capilar metálico sob o efeito de um campo elétrico.

Desde o início do século XX, vários grupos de investigação (notadamente o de Darrell H. Reneker, que popularizou o nome “eletrofiação”) têm produzido nanofibras por esta particular técnica. Nos últimos anos, especialistas como S. Ramakrishna (Singapura), H. Y. Kim (Coréia do Sul), P. Supaphol (Tailândia), A. Greiner (Alemanha), S. I. Stupp (EUA) e C. Wang (China) contribuíram significativamente para que a produção de nanofibras por

eletrofiação voltasse ao foco das atenções e desse início a uma nova era no desenvolvimento de novas tecnologias para a produção de nanocompósitos funcionais avançados.

**Figura 7.** À esquerda: a primeira página da patente em eletrofiação (Patente GB 6385) depositada por Cooley, em 05 de abril de 1900 [108], no Reino Unido ([www.ipo.gov.uk](http://www.ipo.gov.uk)). À direita: a primeira página da patente depositada por Formhals (Patente US 1975504) em 02 de outubro de 1934, nos Estados Unidos ([www.uspto.gov](http://www.uspto.gov)) [128].



Desde então, o campo de pesquisa nessa área têm se deslocado para o desenvolvimento de materiais poliméricos para tratar de questões de interesse global (purificação da água, tratamento de doenças, proteção solar, etc.). Consequentemente, essas investigações têm promovido um aumento exponencial no número de publicações, que refletem diretamente na comunidade industrial e em benefícios para à população [129].

O entendimento sobre o processo de eletrofiação apresentado nesta estapa da pesquisa foi atualizado nos quase quatro séculos que se seguiram este trabalho inovador. Apesar do longo tempo de existência do processo, apenas no final do século XX as palavras-chave

"eletrofiação" e "nanofibra(s)" (electrospinning e nanofiber(s), em inglês, respectivamente) foram mais utilizadas por cientistas e pesquisadores. Na verdade, o uso do termo "eletrofiação", derivado de "fiação eletrostática", é relativamente recente. Por esta razão, a análise estatística das tendências históricas, da situação atual e dos desafios futuros da produção de nanofibras por eletrofiação realizada nesta parte da tese considerou os trabalhos desenvolvidos de 1990 a 2013.

Tecnicamente falando, as nanofibras pertencem ao grupo dos nanomateriais; as suas dimensões (especialmente de diâmetro) podem variar de várias dezenas até centenas de nanometros.

As nanofibras produzidas por eletrofiação possuem propriedades extremamente interessantes, tais como a capacidade de produzir películas/filmes finos extremamente porosos como resultado do emaranhamento das fibras produzidas em um dado intervalo de tempo, a elevada razão área superficial / volume (de até  $10^3$  vezes maior do que a razão área superficial / volume no caso das microfibras), o baixo peso, a possibilidade de incorporar nanopartículas metálicas, células e princípios ativos, a flexibilidade na superfície, e as suas funcionalidades em solução aliadas a uma tecnologia acessível e ao custo de produção relativamente baixo, se comparado com outras tecnologias de nanofibras [130-132].

A utilização de nanofibras também permite uma nova geração de tipos de filtros de ar avançados que aumenta a eficiência de filtração, a partir de poros com dimensão da ordem de nanometros, muito menor do que a dimensão de poros de filtros convencionais. Outras propriedades pesquisadas por cientistas para a melhoria de processos incluem a resistência à tração e a capacidade de condução/transporte elétrico nesses meios [133]. Aplicações biomédicas podem ser melhoradas se for considerada a incorporação de nanopartículas (como por exemplo, de prata ou de dióxido de titânio) no processo de eletrofiação, contribuindo para o desenvolvimento de peles artificiais com proteção adicional contra as radiações UVA e UVB [134].

Como discutido anteriormente, o objetivo desta etapa da pesquisa é proporcionar uma visão global das tendências históricas e atuais das pesquisas em eletrofiação de nanofibras que justificam a escolha do tema de trabalho dessa Tese. Espera-se que este trabalho possa ser utilizado como referência no desenvolvimento de novas pesquisas em eletrofiação de nanofibras poliméricas, aproveitando a imensa estrutura de compreensão e de literatura publicada por precursores neste campo de estudo.

Neste sentido, para realizar o levantamento dos dados, foram consideradas as publicações catalogadas nas bibliotecas das áreas de Ciências da Vida (que compreende 4.300

títulos de periódicos), Ciências da Saúde (6.800 títulos), Ciências Físicas (7.200 títulos) e Ciências sociais e Humanidades (5.300 títulos) da base de dados bibliográfica Scopus, da Elsevier ([www.scopus.com](http://www.scopus.com)), devido à ampla gama de aplicações do tema registrada nesta base de dados. Especificamente foram procurados trabalhos com a palavra "electrospinning" no título, resumo ou nas palavras-chave. Com a escolha dessa estratégia de pesquisa, obviamente, muitos artigos relacionados com eletrofiação (caso dos documentos que tratam desse tema no corpo do texto, mas não explicitam estas palavras no título, no resumo ou nas palavras-chave) foram perdidos. No entanto, esta abordagem garante dados muito claros e precisos para se trabalhar a proposta e obter estatísticas confiáveis.

Nessa perspectiva, o número total de publicações (considerando todos os tipos de documentos indexados, incluindo artigos originais e de revisão em revistas científicas, artigos em conferências, capítulos de livros, erratas e notas técnicas entre 1900 e 2013) relacionadas com eletrofiação, registradas na base Scopus, chega a 11.973 considerando apenas a expressão ("electrospinning") no título, na lista de palavras-chave, ou no resumo do trabalho.

Em uma análise de dados mais restrita, verifica-se que a maioria dos documentos retornados são artigos publicados em revistas científicas. A busca resultou em um total de 9.328 artigos relacionados com eletrofiação na base de dados Scopus.

Uma pesquisa semelhante foi realizada na base de dados Web of Science (Thomson Reuters Scientific) e produziu um número comparável de dados com 11.982 documentos que tratavam de eletrofiação. Os artigos obtidos através desta estratégia de busca foram classificados de acordo com uma variedade de filtros, incluindo a data de publicação, título da revista, país de origem e filiação acadêmica (ou industrial) dos autores.

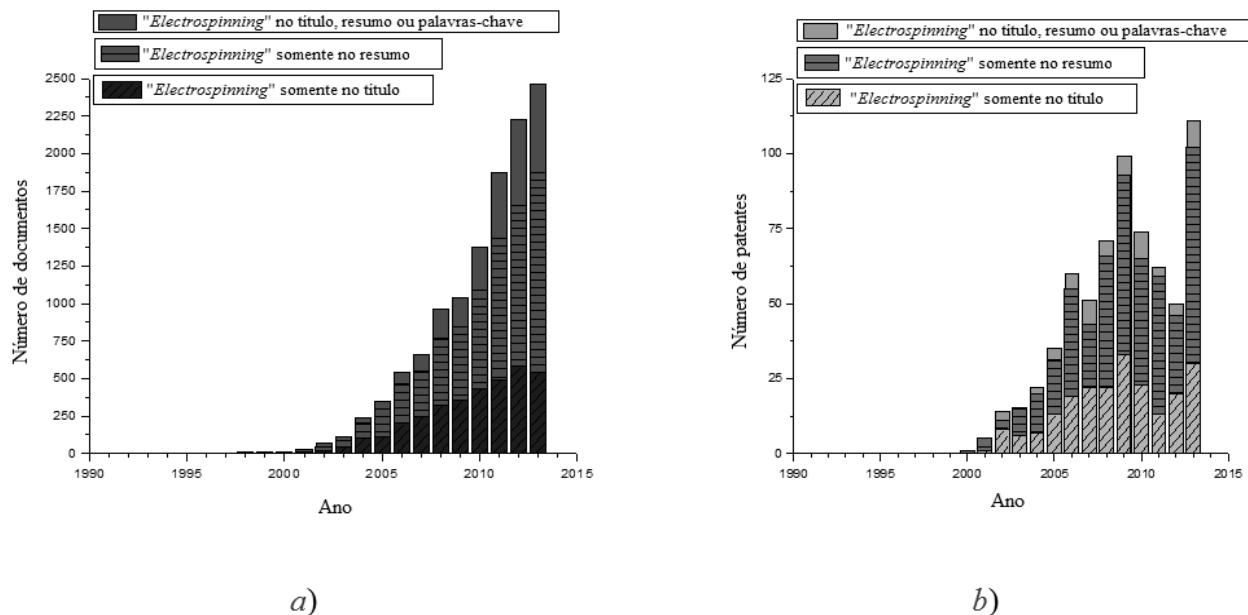
Para complementar o estudo, também foi realizada uma pesquisa paralela na literatura de patentes usando o banco de dados do Escritório Europeu de Patentes ([www.epo.org](http://www.epo.org)). Essa busca considerou as patentes concedidas entre os anos de 1990 e 2013, usando a mesma palavra-chave utilizada na busca na base Scopus. Essa busca resultou cerca de 1.890 patentes relacionadas à técnica de eletrofiação, emitidas em todo o mundo. As patentes obtidas foram classificadas de acordo com a data de emissão e detentor da patente.

## 2.2.2 Levantamento estatístico

A **Fig. 8** mostra uma comparação entre o número de documentos e patentes relacionadas com eletrofiação, por ano. Considerou-se a seguinte estratégia de busca nos dois tipos de trabalho: incluindo a expressão “electrospinning” especificada no título, resumo ou

palavras-chave dos documentos (11.973 documentos), apenas no resumo (9.333) e apenas no título (3.489 resultados de documentos), ver **Fig. 8 (a)**; os resultados obtidos para as patentes estão dispostos na **Fig. 8 (b)**. É possível verificar na **Fig. 8 (a)** que o número de publicações em eletrofiação vem crescendo exponencialmente ao longo dos últimos anos, como confirmado por Huang et al. [131] com dados dos últimos dez anos. De acordo com a **Fig. 8 (b)**, também há um aumento no número de patentes concedidas, mas não com o mesmo comportamento crescente como obtido para os outros tipos de documentos.

**Figura 8.** Publicações de documentos com o termo "electrospinning" (a): no título, resumo ou palavras-chave (11973 resultados), somente no resumo (9333 resultados) e apenas no título (3489 resultados). Na busca por patentes com o termo "electrospinning" (b): no título, resumo ou palavras-chave (711 resultados); apenas no resumo (652 resultados) e apenas no título (226 resultados). Dados obtidos da base de dados Scopus ([www.scopus.com](http://www.scopus.com)).



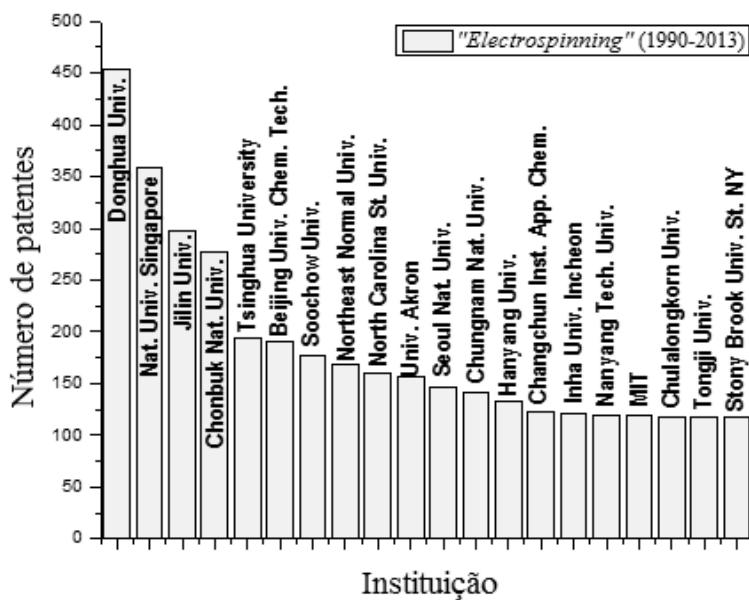
Mais precisamente, o número de patentes concedidas em matéria de processo de eletrofiação vem crescendo constantemente desde 1990, mas ainda não chegou a superar o número de publicações/ano de artigos científicos. Essa é uma indicação de que esta técnica se mostra como uma tecnologia promissora entre os cientistas e institutos. Para se ter ideia, cerca de 711 patentes relacionadas à técnica de eletrofiação foram concedidas em todo o mundo nos últimos 25 anos, segundo a Scopus.

Considerando-se os documentos científicos, 77,9 % eram artigos originais publicados em revistas, 15,8 % eram artigos de conferências e apenas 3,6 % eram artigos de revisão.

Entre os anos de 2009 e 2012 houve uma redução no número de patentes, provavelmente devido à crise financeira mundial ocorrida em 2009.

Com relação à distribuição de pesquisas por afiliação, e acordo com a **Fig. 9**, a instituição acadêmica que mais contribuiu com o depósito de patentes em eletrofiação até o ano de 2013 foi a Universidade de Donghua, na China, liderada pelos Professores Bin Ding, Zhu Limin e Jianyong Yu, entre outros.

**Figura 9.** (a) Número total de patentes publicadas em eletrofiação (1990-2013), classificadas por afiliação (as vinte principais instituições). Dados obtidos da base de dados Scopus ([www.scopus.com](http://www.scopus.com)).



Outras universidades asiáticas, incluindo a Universidade Nacional de Cingapura (segunda colocada), a Universidade de Jilin (China), a Universidade Nacional de Chonbuk (Coréia do Sul) e a Universidade de Tsinghua (China) também estão entre as dez instituições acadêmicas que mais contribuíram, considerando uma lista de 160 instituições.

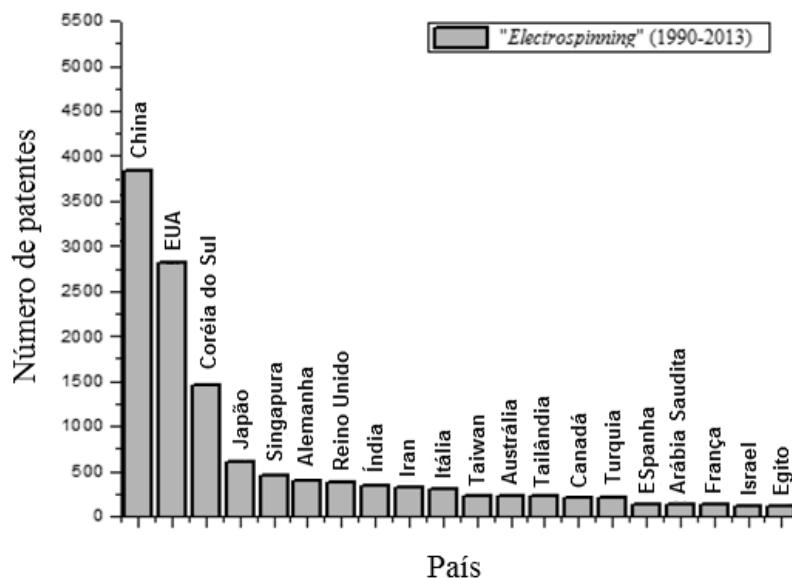
No geral, há uma mistura de instituições japonesas, russas, europeias, chinesas, indianas e americanas entre as vinte principais. É importante destacar a presença de importantes universidades americanas entre as vinte instituições que mais contribuíram para o desenvolvimento dessas patentes, como é o caso do Instituto de Tecnologia de Massashusets (MIT) e da Universidade de Akron.

Outra informação que se pode tirar da **Fig. 9** é que não há laboratórios industriais de pesquisa entre as instituições que mais contribuíram para o desenvolvimento de produtos e processos relacionados, considerando ambas as palavras-chave.

Se considerarmos as publicações por país (ver **Fig. 10**), a China é o país que concentra o maior número cumulativo de publicações, seguido pelos Estados Unidos, Coréia do Sul e

Japão. Cingapura, Alemanha e Reino Unido estão presentes na sequência da classificação. Fora da Europa, Índia e Irã também estão bem classificados no ranking.

**Figura 10.** Os vinte países que mais detém patentes em eletrofiação, de 1990 a 2013. Dados obtidos da base de dados Scopus ([www.scopus.com](http://www.scopus.com)).



A China e os Estados Unidos são os líderes globais em patentes concedidas em eletrofiação, seguidos pela Coréia do Sul e Japão. Ainda sobre a análise geográfica das patentes em eletrofiação, por país, a **Fig. 10** também mostra que a China leva grande vantagem sobre as outras nações, com 26,9 % do total de pesquisas, seguida pelos Estados Unidos (19,7 %), Coréia do Sul (10,2 %), Japão (4,2 %) e Cingapura (3,1 %), considerando uma lista de 88 países. As instituições chinesas dominam as publicações, especialmente em medicina regenerativa e tópicos relacionados à energia, na qual o número de trabalhos vem aumentando nos últimos anos.

A grande contribuição asiática (levando em conta as cinco primeiras instituições) provavelmente tem forte relação com o maior percentual de alocação de recursos do governo desses países nas áreas de energia sustentável e meio ambiente.

China, Coréia do Sul, Japão, Cingapura, Índia e Taiwan (11<sup>a</sup> posição nesse ranking) representam os locais mais proeminentes na Ásia em atividades de P & D em eletrofiação, concentrando 48,5 % do total de patentes depositadas em todo o mundo.

Como curiosidade, o Brasil está localizado na 22<sup>a</sup> posição, com 102 patentes concedidas, logo atrás da República Tcheca que detém duas patentes a mais.

Como especificado, os Estados Unidos se mostra como um país significativo no contexto mundial, com aproximadamente 20 % da partilha das atividades globais de pesquisa e desenvolvimento nessa área. Em uma pesquisa mais avançada, é possível verificar que a

academia norte-americana vem aplicando a técnica de eletrofiação principalmente para o desenvolvimento de novos produtos e processos relacionados à conversão eficiente de energia, capacitores e baterias, purificação de água, engenharia de tecidos e sistemas de liberação controlada de fármacos.

Em contrapartida, Coréia do Sul (3º colocado), Japão (4º colocado) e Cingapura (5º colocado) são países muito ativos na exploração de novos produtos e processos que visam o melhoramento do desempenho de dispositivos de energia, como por exemplo, de células solares, de eletrodos de células de combustível e de baterias e capacitores cada vez menos espessos e com maior capacidade de armazenamento de energia.

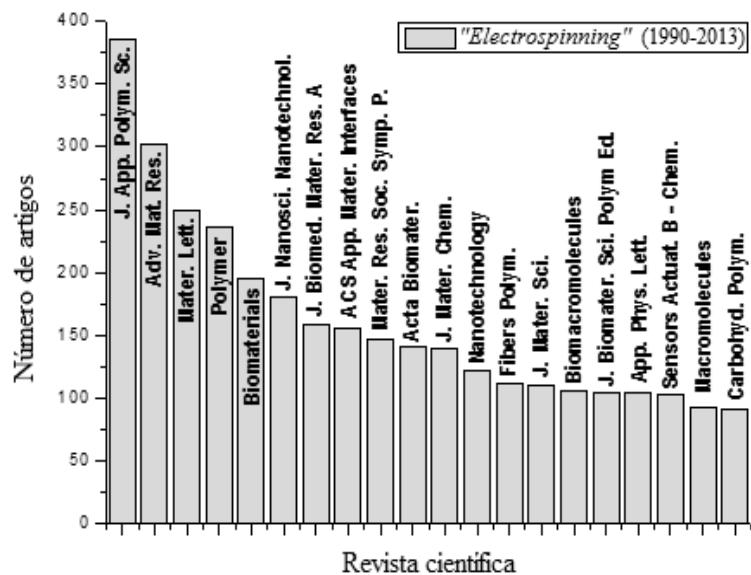
O Japão vem expandindo suas atividades de P & D em nanotecnologia com o crescente apoio da Fundação Nacional de Ciências, da Agência de Ciência e Tecnologia do Japão e de empresas privadas que trabalham em parceria com as universidades. As áreas mais promissoras são a de ciência dos materiais, química e engenharia (próximo tópico de discussão: número de publicações por área temática).

No continente europeu não há um país que se destaca tanto quanto a China e os Estados Unidos. Mas, no todo, a Europa se tornou uma região mundial de destaque para o desenvolvimento de novas tecnologias pela técnica de eletrofiação utilizando-a para solucionar problemas em biomedicina, agricultura, nano-segurança e armazenamento de energia, contribuindo com cerca de 11,5 % do total de produtos e processos desenvolvidos, proveniente principalmente da Alemanha (2,9 %), Reino Unido (2,4 %), Espanha (2,0 %), França (1,7 %), Itália (1,6 %) e Suécia (1,0 %), entre os vinte principais países, no período observado.

Sobre as revistas mais importantes dentro da comunidade de eletrofiação (**Fig. 11**), se destacam a Journal of Applied Polymer Science, que lidera o ranking com 4,8 % do total de publicações, a Advanced Materials Research (em 2º lugar, com 3,7 %), a Materials Letters (3,1 %), a Polymer (2,9 %) e a Biomaterials (na 5ª posição, com 2,4 %). É interessante notar que várias revistas especializadas em biomateriais aparecem no ranking.

Essas revistas descrevem uma gama de aplicações em eletrofiação e que servem como excelentes referências para trabalhos futuros nesta área, totalizando 9.333 artigos (ou 11.973 exemplares, se incluirmos os outros tipos de documentos analisados, como por exemplo, capítulos de livros, etc.). Pode-se verificar que a Journal of Applied Polymer Science, na 1ª posição, publicou duas vezes mais artigos relacionados do que a Biomaterials, a 5ª mais popular, tal como mostrado na **Fig. 11**.

**Figura 11.** Número acumulado de publicações relacionadas com eletrofiação em revistas científicas, de 1990 a 2013. A revista Journal of Applied Polymer Science lidera o ranking. Foram consideradas 160 fontes em todo o mundo no período analisado. Dados da base de dados Scopus ([www.scopus.com](http://www.scopus.com)).

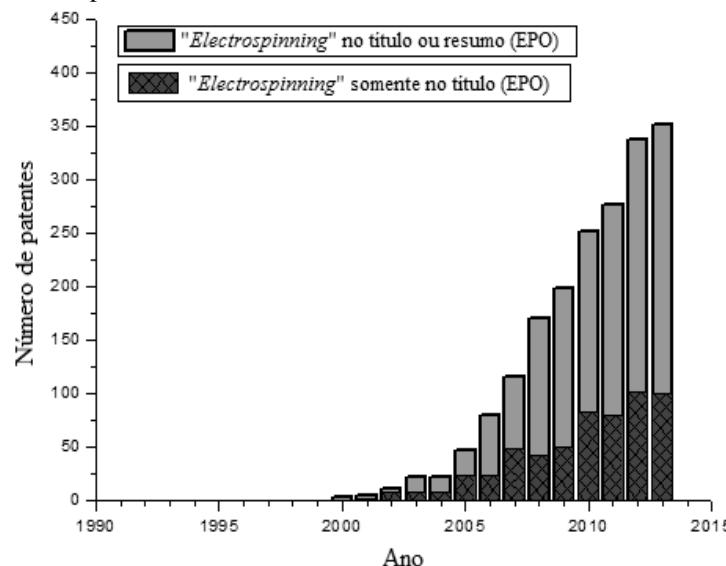


A partir de tais resultados também é possível observar que a maioria das revistas lida com a técnica de eletrofiação aplicada a áreas temáticas como a de Ciência dos Materiais, com 29,3 % do total de publicações, seguida pelas Engenharias, com 28,3 % (destaque para a Engenharia Química, que contribui com 40 % dos trabalhos em engenharia), Química (15,7 %) e Física (10,0 %). Na sequência, os próximos temas são Bioquímica, Genética e Biologia Molecular (6,3 %) e Medicina (2,7 %). Foram concedidas mais de 1.890 patentes em eletrofiação, depositadas no Instituto Europeu de Patentes (EPO), entre os anos de 1990 a 2013 (Fig. 12), sugerindo que P & D inovadoras em eletrofiação tem se destacado com o objetivo de enfrentar os desafios industriais e o mercado de produtos nanotecnológicos relacionados, tem se expandido. Curiosamente, não houve diminuição no número de patentes publicadas ao longo dos anos, como observado na Fig. 8 (quando estes mesmos dados foram obtidos a partir da base de dados Scopus).

Há pelo menos duas razões para o fato: em primeiro lugar, o número de patentes publicadas é maior no EPO do que na base de dados Scopus (mesmo considerando o período de 2009-2013, como descrito anteriormente); em segundo lugar, deve-se estar atento de que registrar vários pedidos de patente da mesma invenção em diferentes países é uma prática industrial comum para proteger a invenção. Portanto, o número de patentes retornadas na pesquisa utilizando o EPO deve ser maior do que o número real de invenções. Tais resultados

também estão de acordo com pesquisas realizadas em outros tópicos, como patentes em tubos de raios-X [135], ou até mesmo no processo industrial de vidros planos [136].

**Figura 12.** Resultados de distribuição de freqüência para a busca de patentes a partir do Escritório Europeu de Patentes (EPO) ([www.epo.org](http://www.epo.org)), usando "electrospinning" no título ou resumo, e, apenas no título da patente. Os dados foram considerados no período de 1990 a 2013.



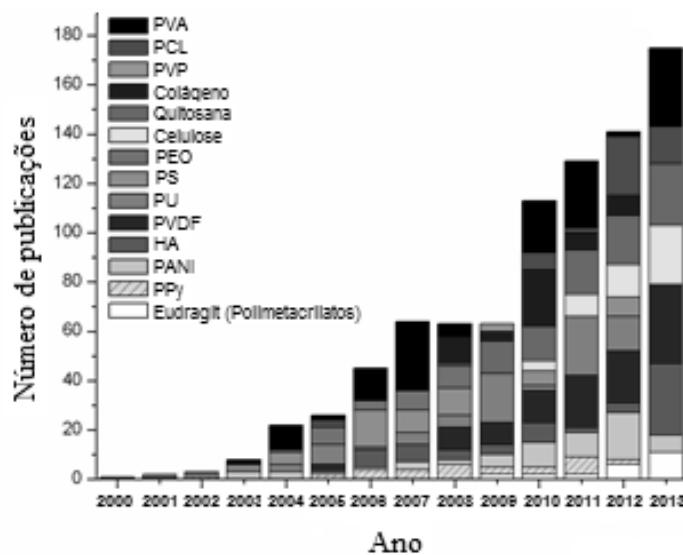
As pesquisas em eletrofiação têm gerado patentes promissoras para concorrer no mercado com sucesso. A primeira categoria é a de tecnologia de produção, ou seja, as inovações que oferecem tecnologia / acessórios de baixo custo e que aumentam a capacidade de produção. Invenções nesta direção são promissoras para que se possa reduzir o investimento de capital e custos de funcionamento para produzir nanofibras de qualidade. A Elmarco, empresa européia que produz equipamentos em escala industrial, detém grande parte das inovações que visam aperfeiçoar os processos de produção de nanofibras pela técnica de eletrofiação.

Não só a Elmarco (República Tcheca, [www.elmarco.com](http://www.elmarco.com)), como também a Dienes (Alemanha, [www.dienes.net](http://www.dienes.net)), a Freudenberg (Alemanha, [www.freudenberg-filter.com](http://www.freudenberg-filter.com)), a FibreRio (EUA, [www.fiberotech.com](http://www.fiberotech.com)), a Kato Tech (Japão, [www.keskato.co.jp](http://www.keskato.co.jp)) e Revolution Fibres (Nova Zelândia, [www.revolutionfibres.com](http://www.revolutionfibres.com)) têm se destacado pelos métodos exclusivos de produção de nanofibras por eletrofiação em larga escala.

A outra categoria é a aplicação do produto: como as nanofibras podem substituir/melhorar o desempenho em determinadas condições de morfologia e de processo. Neste quesito, a China é campeã em pedidos de patentes, seguidas pelas empresas dos Estados Unidos.

De acordo com Bhardwaj & Kundu [137], ao longo dos anos, mais de 200 polímeros naturais ou sintéticos foram utilizados como matrizes na produção de nanofibras por eletrofiação para diversas aplicações (e o número continua aumentando gradualmente com o tempo). Curiosamente, esta técnica é conhecida há mais de 80 anos na indústria têxtil para a fabricação de tecidos à base de fibras [137]. Alguns exemplos desses polímeros estão dispostos na Seção 2.1.5. A **Fig. 13** também mostra as publicações em eletrofiação utilizando esses polímeros. É possível observar que o PVA, o Poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) e o PVP são os mais utilizados para diversas aplicações devido à baixa toxicidade e alta biocompatibilidade. Polímeros condutores como a polianilina (PANI) e o polipirrol (PPy) são promissores no desenvolvimento de nanoestruturas fibrosas como meio de transporte elétrico e aplicações como biosensores.

**Figura 13.** Diversos polímeros relatados na literatura (no período de 2000 a 2013) para a produção de nanofibras por eletrofiação. Dados da base de dados Scopus ([www.scopus.com](http://www.scopus.com)).



Os polímeros entéricos, como os da classe dos Eudragits® (polimetacrilatos), também se desportam como potenciais materiais poliméricos em eletrofiação nos próximos anos, para o uso em liberação controlada de fármacos.

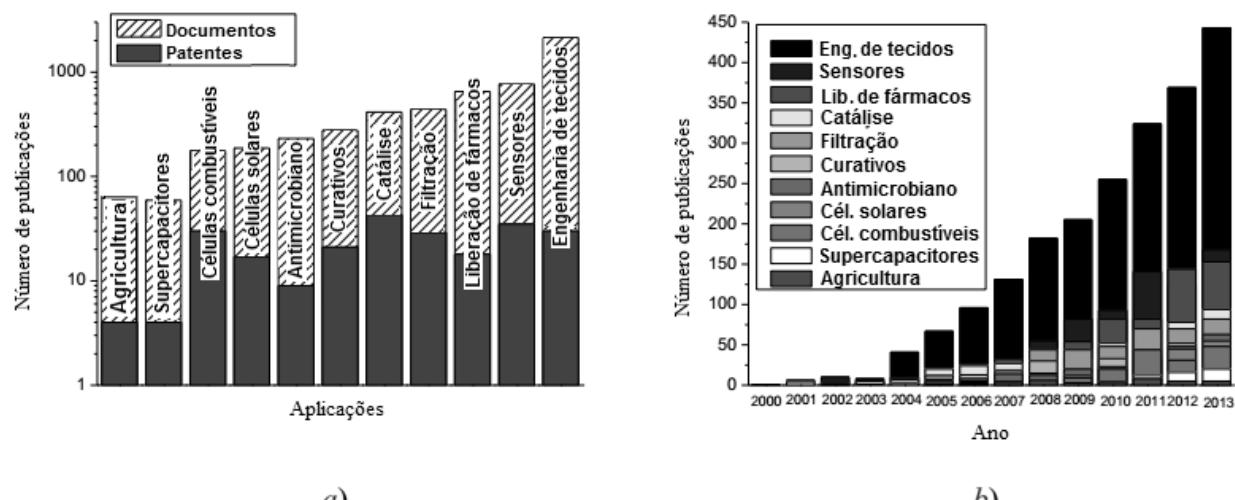
A **Fig. 14a** mostra que a engenharia de tecidos, os sensores, a liberação controlada de fármacos, filtração e catálise estão entre as cinco principais áreas de pesquisa em eletrofiação, com a maioria das aplicações. Também é possível verificar que o número de documentos científicos publicados é muito maior do que as patentes concedidas, considerando o mesmo período de análise. As áreas de agricultura e de supercapacitores podem ser entendidas como

novas áreas para serem exploradas pela técnica de eletrofiação e propor intervenções baseadas nessa tecnologia, de acordo com a **Fig. 14b**.

Recentemente, o aumento da demanda global por indústrias de tratamento de água tem sido responsável pela criação de um grande número de produtos baseados em nanofibras. Com isso, é notável que a tecnologia de nanofibras pode abrir novos e mais amplos mercados para a filtração por membranas.

As empresas constantemente identificam e implantam alternativas promissoras, na busca por melhorias nesses materiais filtrantes. Estima-se que o mercado da área de filtração pode chegar a um montante de 700 bilhões de dólares até o ano de 2020 [131].

**Figura 14.** (a) Número de publicações de documentos e patentes (em escala logarítmica) por tipo de aplicação. (b) Número de publicações por ano considerando as aplicações mais citadas (documentos científicos e patentes). Para esta pesquisa, foram usados os termos “electrospinning” e “tipo de aplicação” no título ou resumo do trabalho. Os dados foram obtidos da base de dados Scopus ([www.scopus.com](http://www.scopus.com)), considerando o período de 2000 a 2013.



Nesta área, se destacam as empresas Donaldson (EUA, [www.donaldson.com](http://www.donaldson.com)), a CLARCOR (EUA, [www.clarcor.com](http://www.clarcor.com)), a Ahlstrom (EUA, [www.ahlstrom.com](http://www.ahlstrom.com)) e a Espin (EUA, [www.espintechnologies.com](http://www.espintechnologies.com)), que já são bem conhecidas por seus produtos de qualidade com base em nanofibras. A maioria delas concentra suas pesquisas em tecnologias de filtração.

Por outro lado, os governos desempenham um papel importante no estabelecimento das direções em inovação e produção de potenciais patentes comerciais. Agências governamentais, como a Fundação Nacional de Ciência Natural da China, a Fundação Nacional de Ciência (EUA), a Fundação Nacional de Pesquisa (Cingapura), a União Européia, a Fundação Alemã de Pesquisa (Alemanha), o Conselho de Pesquisa em Engenharia e

Ciências Físicas (EPSRC) do Reino Unido para os países mais expressivos, bem como a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) no Brasil e outras fundações de pesquisa em países que desenvolvem trabalhos com eletrofiação têm apoiado financeiramente projetos inovadores de cientistas, institutos, universidades e indústrias para desenvolver soluções tecnológicas eficientes e sustentáveis.

Dessa forma, a tecnologia de produção de nanofibras pela técnica de eletrofiação se mostra como um tema promissor na literatura, devido a sua importância entre os pesquisadores e acadêmicos, e, consequentemente, um maior número de potenciais publicações/patentes/produtos nesse campo de estudo pode ser esperado nos próximos anos. Para as futuras melhorias na aplicabilidade destas fibras, diversas inovações em eletrofiação estão sendo desenvolvidas [137]. Essas inovações incluem a eletrofiação coaxial, a eletrofiação múltipla, a eletrofiação lado a lado, entre outras técnicas.

Um suporte fibroso em nanoescala simula melhor uma matriz extracelular do que suportes macroscópicos usuais, além de proporcionar um ambiente tridimensional a partir do emaranhamento das fibras. Com matrizes fibrosas em nanoescala, a adesão celular, a proliferação e a diferenciação de vários tipos de células têm sido verificadas, incluindo a incorporação de células tronco às fibras (com aplicação direta na regeneração de tecidos humanos). Nesse sentido, a tecnologia de nanofibras produzidas por eletrofiação se mostra como uma forte candidata para o desenvolvimento de uma gama de aplicações em engenharia de tecidos.

No entanto, é possível dizer que, devido ao (ainda) limitado número de artigos publicados até 2013, muitos assuntos relevantes em nanofibras poderão ser discutidos nos próximos anos e mostrar grandes avanços na ciência.

### 2.2.3 Considerações finais sobre o tema

Em uma primeira análise, a produção de nanofibras parece ser apenas uma nova maneira de produzir fibras muito pequenas. Em uma inspeção mais detalhada, pode-se constatar que as nanofibras produzidas por eletrofiação constituem um grupo fascinante de materiais, tanto do ponto de vista fundamental quanto aplicado.

A técnica de eletrofiação, embora antiga, tem evidenciado mais interesse e atenção da comunidade científica e industrial nos últimos anos devido à sua simplicidade, versatilidade e

potencial para aplicações em diversos campos de estudo em nanotecnologia, fazendo uso de uma grande variedade de matrizes poliméricas.

Outro ponto importante é que as nanofibras poliméricas podem ser produzidas em larga escala. As aplicações notáveis e de baixo custo incluem suportes/matrizes de tecidos artificiais, nanocatálise, biosensores, filtração, curativos, antimicrobianos, administração de medicamentos, dispositivos eletrônicos ópticos, imobilização de enzimas, defesa e segurança, e de armazenamento e geração de energia.

A técnica tem, de fato, quatro séculos de existência e pode ser considerada uma das técnicas mais antigas da história para se produzir materiais na escala de nanometros, mas, só a partir de 1990 ela voltou à tona com muita importância na literatura. No entanto, parece um paradoxo que o conhecimento sobre a técnica e os materiais produzidos por ela ainda está longe de se estagnar, principalmente pelas suas possíveis aplicações na indústria, levando-se em conta o número de patentes depositadas até então e o grande número de polímeros que podem ser utilizados para produzir nanofibras (aproximadamente 200 polímeros em estudo).

De forma resumida, esta etapa da tese apresentou o desenvolvimento do processo de eletrofiação desde 1990, mostrando que a técnica é um dos métodos de fabricação de nanofibras mais amplamente utilizados, pois garante alta excelência e alta produtividade para diversos setores industriais.

Aproximadamente 1.890 patentes utilizando o termo “electrospinning” têm sido concedidas em todo o mundo desde 1990, de acordo com o Instituto Europeu de Patentes e este número continua a crescer. No mesmo período, 11.973 documentos de pesquisa foram publicados, sendo, a maioria deles, artigos em revistas científicas, de acordo com a base de dados Scopus.

As patentes são indicadores de uma inovação bem sucedida. As principais razões para o aumento no número de patentes em eletrofiação incluem: i) o potencial impacto na produção de nanofibras; ii) o ritmo acelerado da concorrência, e; iii) a importância percebida pelas indústrias. Comparações entre artigos e patentes que tratam da técnica são úteis porque é comum que ainda existam potenciais aplicações em determinadas áreas temáticas que, apesar de publicadas em revistas científicas, há a necessidade de estudos mais detalhados para que se tornem produtos confiáveis à indústria e à população.

A taxa de publicações aumentou de forma exponencial desde o início do século XXI. Em geral, os países mais significativos em eletrofiação são a China, os EUA, o Japão e a Coreia do Sul, o que indica que as atividades de P & D neste campo de estudo estão em crescente avanço nessas regiões.

A popularidade do processo de eletrofiação pode ser relatada pelo fato de mais de 160 universidades e centros de investigação em todo o mundo estudarem vários aspectos da técnica e das nanofibras por ela produzidas. Nesse sentido, a Universidade de Donghua (China) e a Universidade Nacional de Cingapura se destacam como os principais centros de pesquisa na área.

Contudo, muitos desafios em eletrofiação de nanofibras poliméricas permanecem em aberto. Como uma nova fronteira em nanotecnologia, deve-se concordar com o famoso discurso do Prêmio Nobel Richard Feynman (e reproduzida anos depois) no Caltech em 1959 sobre uma nova e promissora era na ciência [138], ao afirmar que "Há muito espaço lá embaixo". Certamente considerando pelo menos o problema de manipular e controlar materiais em escala nanométrica, como é o caso das nanofibras produzidas pela técnica de eletrofiação.

## 2.3 Nanotecnologia aplicada à veiculação de fármacos

Desde que estruturas do tipo lipossomas foram descritas na década de 1960 [139] e propostas como carreadores de fármacos e de proteínas na gestão e no tratamento de doenças, o desenvolvimento de nanoestruturas tem causado um crescente e significante impacto no desenvolvimento de novos sistemas para o carreamento, encapsulamento e liberação controlada de drogas e de novas terapias genéticas. As principais vantagens do uso destes materiais em detrimento dos carreadores usuais estão no fato de oferecerem uma maior área superficial de ação/volume e dissolução de substâncias ativas.

Novos sistemas para carreamento e liberação de fármacos são amplamente requeridos visto que diversas moléculas possuem alta toxicidade (algumas moléculas possuem grupamentos toxicofóricos, responsáveis por tal característica), reduzido grau de biodisponibilidade, estabilidade no organismo humano, solubilidade e absorção intestinal, que minimizam a sua eficácia terapêutica.

### 2.3.1 Nanoestruturas para o carreamento de fármacos

Devido aos problemas apresentados, novas formas de administração oral, nasal, cutânea e vaginal de fármacos são amplamente estudadas pela comunidade científica e requeridos pela indústria farmacêutica.

Neste contexto, nanoestruturas para o carreamento de fármacos são fortes candidatos para superar os problemas de baixa eficácia de ação, descritos na seção anterior. Quase sempre poliméricas ou lipídicas, estas estruturas geralmente possuem a capacidade de proteger fármacos encapsulados no seu interior (estruturas do tipo casca-núcleo) contra a degradação enzimática no estômago e no intestino, de aumentar a dissolução da droga e de direcionar diversos medicamentos para diversas áreas do corpo humano para liberá-los de forma controlada (liberação esta dependente do pH do meio) [140-142].

Em adição, estas estruturas podem ser utilizadas para contornar os problemas de baixa solubilidade do fármaco em meio aquoso e evitar o metabolismo de primeira passagem (no fígado) da droga incorporada [143, 144].

Essas nanoestruturas podem também aumentar a biodisponibilidade de substâncias ativas (devido a mecanismos específicos de absorção, tais como a endocitose) e permanecer na circulação sanguínea liberando-as de forma contínua, evitando flutuações de concentrações no plasma (nível subterapêutico ou tóxico) e de efeitos colaterais [143].

Outra vantagem das nanoestruturas é a sua elevada relação área superficial/volume em comparação com os meios de carreamento e liberação convencionais, encapsulando cerca de quinze a duzentas e cinquenta vezes mais moléculas [145]. Por se apresentarem como estruturas com dimensões da ordem de  $10^{-9}$  metros, podem alcançar o interior de tecidos e permitir a liberação contínua e eficiente de princípios ativos. Os inúmeros benefícios apresentados fazem com que diversos estudos sejam desenvolvidos com essas estruturas nanométricas.

Entre essas estruturas para a veiculação de drogas destacam-se: lipossomas; nanocápsulas; nanoemulsões (emulsões com diâmetro da fase dispersa menor que 1 micrometro); nanopartículas cerâmicas (fabricadas com componentes inorgânicos tais como sílica, alumina e titânio, menores que 100 nm); nanopartículas metálicas (como as de ouro, prata e níquel com tamanho típico entre 1-200 nm); partículas lípidicas sólidas (nanoestruturas feitas de lipídios sólidos, 50-1000 nm); dendrímeros; micro/nanofibras ( $10^1$ - $10^3$  nm), nanoesferas, entre outras.

As moléculas-modelo escolhidas para incorporação nas matrizes poliméricas serão descritas mais detalhadamente a seguir.

### 2.3.2 Nifedipino e ácido úsnico: descrição e liberação controlada

O Nifedipino, ou 1,4-dihidropiridina, é uma substância ativa praticamente insolúvel em água, bloqueador de canais de cálcio, tipicamente aplicado no tratamento de angina pectoris, infarto do miocárdio e hipertensão [146-148] e como tocolítico (supressor) na prevenção de partos prematuros.

O nifedipino é também usado como substância padrão para a melhoria da estabilidade física de drogas amorfas [149-151]. A estrutura química do Nifedipino é mostrada na **Fig. 15**.

**Figura 15.** Estrura química do nifedipino.

A baixa solubilidade do nifedipino em soluções aquosas ( $5,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) [152] (como consequência da alta estabilidade da forma cristalina da droga), a baixo tempo de meia-vida (tempo necessário para que a concentração do fármaco no organismo seja reduzida à metade da concentração máxima) [141] e flutuações na concentração da droga no plasma (nível subterapêutico ou tóxico) [148] limitam a aplicação do nifedipino no tratamento de picos hipertensivos.

Assim, outras formas de administração são requeridas. Neste contexto, matrizes poliméricas nanométricas para a dissolução e encapsulamento, que possibilitam a liberação do fármaco de forma controlada, são amplamente investigadas para minimizar esse problema, no caso do uso do nifedipino.

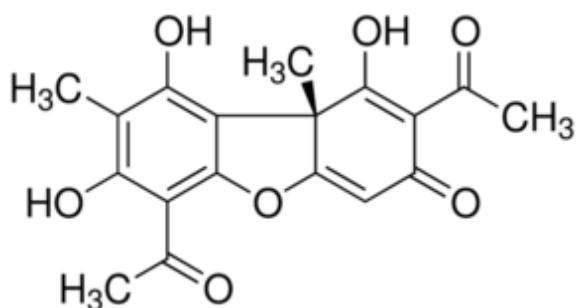
Já o ácido úsnico, ou 2,6-Diacetil-7,9-dihidroxil-8,9b-dimetil dibenzofurano-1,3(2H,9bH), é um composto químico de origem orgânica retirado de liquens que possui propriedade antibacteriana, apesar de possuir alta toxicidade.

É conhecido na literatura que o ácido úsnico ( $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_7$ ) (**Fig. 16**) possui atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral, antitumoral e anti-inflamatória. Esse composto é insolúvel em água e solúvel em solventes orgânicos como o metanol e o etanol. Sua atividade antibacteriana garante seu largo uso na indústria farmacêutica e de cosméticos com diferentes

matrizes de preparação tais como cápsulas, óvulos, micro/nanoesferas, micro/nanocápsulas, aerosóis e géis dentais [124].

Apesar de amplamente estudado sob outras formas de administração, se tem poucos estudos na literatura com relação ao seu encapsulamento em micro / nanofibras poliméricas. Quando a pesquisa se trata de encapsulamento em micro / nanofibras de polímero entérico, os estudos são ainda mais incipientes.

**Figura 16.** Estrutura química do ácido úsnico.



Devido às características apresentadas, o campo de estudo dessas duas substâncias ativas em matrizes de micro/nanofibras poliméricas está amplamente aberto para o desenvolvimento de novos processos e de tecnologias relacionadas.

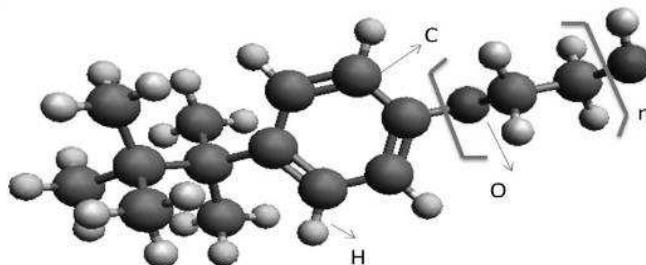
## 2.4 Surfactantes

É conhecido na literatura [153-155] que moléculas de substâncias formadas por duas partes com afinidades químicas bem definidas e distintas recebem o nome de anfifílicas. Nessa configuração, uma parte da molécula é chamada de hidrofílica (solúvel em água) enquanto a outra é chamada de hidrofóbica (insolúvel em água). A parte solúvel é composta por grupos polares (grupos iônicos, hidroxila, carboxila) interagindo fortemente com a molécula de água. Já a parte insolúvel é apolar e constituída por cadeias hidrocarbonadas de natureza alquílica. A estrutura de uma molécula anfifílica é mostrada na **Fig. 17**.

Esses sistemas moleculares são tipicamente conhecidos por serem fortemente absorvidos na interface água-ar, onde a parte hidrofóbica se orienta para fora do meio aquoso e a hidrofílica permanece imersa na água. Em adição, essas estruturas possuem elevada ação superficial, com a capacidade de diminuir bruscamente a tensão superficial de solventes como a água e de misturas entre líquidos sem afinidade química. Por essa característica intrínseca,

essas estruturas moleculares podem ser usadas como agentes dispersantes, e, por isso, também são chamadas de surfactantes [153-155].

**Figura 17.** Estrutura da molécula do surfactante não-iônico Triton X-100 [154].



As moléculas de surfactante são classificadas quanto à carga do grupo hidrofílico em iônicos, não-iônicos ou zwiteriônicos. Os iônicos se dividem em aniónicos e catiônicos. Os primeiros possuem o grupo hidrofílico carregado negativamente (na sua grande maioria, são formados por grupos polares carboxilatos, sulfatos, sulfonatos e fosfatos). Já os catiônicos possuem a parte hidrofílica carregada positivamente e caracterizados pela presença de átomos de nitrogênio que são responsáveis pelo transporte de cargas positivas.

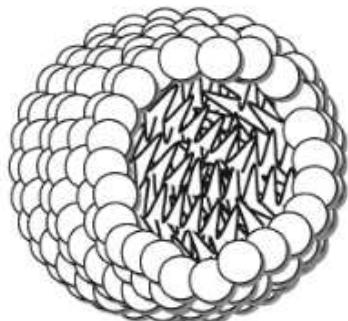
Nos zwiteriônicos há a peculiaridade da coexistência de cargas catiônicas e aniónicas. Já os surfactantes não-iônicos não apresentam grupos-cabeça carregados. Na grande maioria, os grupos polares são constituídos por monômeros de oxietileno, obtidos da polimerização do óxido de etileno.

Com o aumento da concentração do tensoativo, na interface água-ar, até atingir a saturação, as moléculas sem espaço suficiente para se instalarem na interface água-ar buscam uma estrutura mais estável, originando as micelas (**Fig. 18**). Nessas estruturas, a parte polar continua sendo hidratada, enquanto as cadeias apolares interagem internamente (no núcleo das micelas) [153-155]. Esse é um processo que ocorre de forma semelhante em outros solventes polares.

A dispersão de surfactantes em meios apolares ocorre de forma similar. A diferença é que a orientação das moléculas é invertida com a saturação na superfície. Neste caso, a parte insolúvel se orienta para dentro da solução na interface entre o solvente apolar e o ar.

A agregação de surfactantes em estruturas micelares é um processo que ocorre com diminuição da desordem ou entropia do sistema. A partir de uma determinada concentração, pela primeira vez essas estruturas são formadas e uma transição de fase de monômeros para micelas é observada. Este limite de concentração recebe o nome de concentração micelar crítica (CMC) [153,154, 156].

**Figura 18.** Micela do tipo direta em um meio polar [154].



Dessa forma, a CMC pode ser interpretada como a concentração em que soluções de surfactantes sofrem bruscas alterações em suas propriedades físicas, tais como tensão superficial, condutividade elétrica, densidade, espalhamento de luz, pressão osmótica, entre outras, como consequência de uma drástica mudança na organização molecular do tensoativo.

Nessas estruturas, as partes hidrofóbicas das moléculas do dispersante se agrupam no interior do líquido para formar regiões em que o solvente é excluído. Neste caso, as micelas são ditas diretas. As cabeças hidrofílicas, consequentemente, se auto-organizam como uma membrana envolvendo os segmentos hidrofóbicos. Com a formação das micelas, obtém-se a maximização da interação dos grupos polares com a água e com os contra-íons (íons com carga contrária ao do grupo cabeça) presentes na solução.

Como consequência, os contra-íons permanecem fortemente ligados na superfície das micelas, fazendo com que a força repulsiva entre as cabeças polares seja equilibrada e a agregação molecular estabelecida. Já nos solventes apolares, os grupos-cabeça tendem a se reagrupar formando uma região em que não há a presença do solvente apolar (micelas inversas).

A forma desses agregados pode variar a depender de diversos fatores tais como temperatura ou concentração do surfactante, bem como do tamanho da parte hidrofílica, comprimento e número de cadeias hidrocarbonadas.

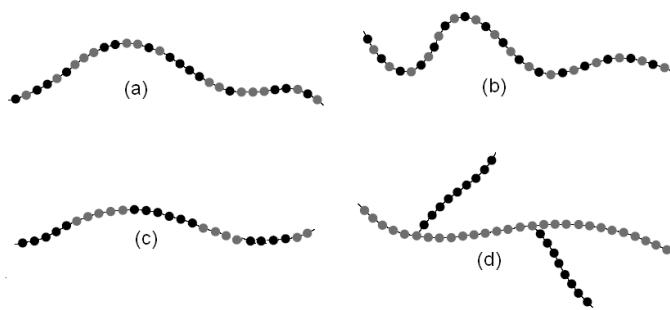
## 2.5 Copolímeros em bloco

Os copolímeros são estruturas poliméricas compostas por duas ou mais unidades químicas de afinidade diferente que se repetem na estrutura. Essa combinação entre unidades monoméricas diferentes origina um novo polímero com propriedades de ambos os constituintes.

Essas unidades podem ser organizadas ao longo da cadeia do polímero formando diferentes arranjos, a depender do processo de polimerização e das frações relativas de cada um na estrutura (**Fig. 19**) [157].

Quando os monômeros se organizam em blocos do tipo  $A_nB_m$  (onde  $A_n$  e  $B_m$  são longas sequências ou blocos monoméricos A e B), são chamados de copolímeros em bloco. Quando a molécula do copolímero em bloco é formada por apenas dois blocos distintos AB, estes são chamados de copolímeros dibloco. Com relação à nomenclatura, os copolímeros dibloco com unidades distintas A e B são representados na forma **A-b-B**.

**Figura 19.** Tipos de copolímeros: (a) randômico, (b) alternante, (c) em bloco e (d) grafitizado. Círculos pretos representam monômeros do tipo A e os vermelhos, do tipo B [157].



Outra observação bastante importante é que se não houver afinidade química entre os monômeros A e B, os copolímeros dibloco podem ser aplicados como surfactantes e por isso também chamados de surfactantes poliméricos [158].

Neste caso, estes surfactantes são chamados de copolímeros anfifílicos em bloco por possuírem em sua estrutura um bloco hidrofílico, com afinidade química a solventes ou superfícies polares; e outro hidrofóbico, com afinidade química a solventes ou superfícies apolares [153, 158].

Devido a essa interessante característica, os copolímeros dibloco têm sido uma das classes de polímeros mais pesquisadas atualmente [159] por possuírem propriedades mecânicas, ópticas e estruturais que os diferem dos outros. Nesse tipo de copolímero, as duas sequências de unidades monoméricas de afinidade química diferente são unidas por ligações químicas covalentes. Podem ser usados em diversas aplicações como surfactantes, como agentes compatibilizantes de blendas poliméricas (mistura física de homopolímeros) ou como adesivos [159].

Esses copolímeros têm chamado a atenção entre os outros copolímeros em bloco pela sua arquitetura molecular simples combinada a uma variedade de possíveis arranjos

nanoperiódicos; e, como consequência, pela possibilidade de aplicações em nanotecnologia [159].

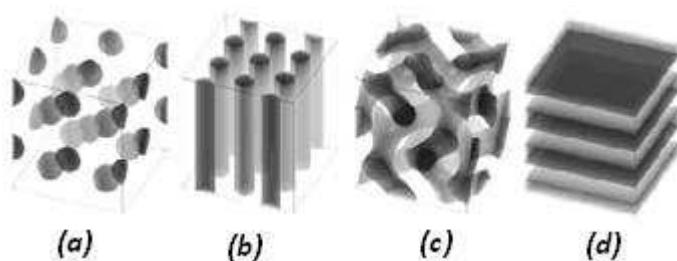
O uso dessas nanoestruturas é descrito principalmente em áreas tais como a de encapsulação e liberação controlada de fármacos, em cosméticos, no controle de poluição, na separação de substâncias químicas [160] e no desenvolvimento de novos dispositivos eletrônicos. A diversidade de aplicações desses copolímeros pode ser justificada pela capacidade de autoformação de mesofases em diferentes escalas de tamanho [161]. Especificamente nessa situação, ocorre a tendência à segregação (separação de fase em escala de nanometros), com a condição de que o copolímero seja formado por dois polímeros imiscíveis.

A repulsão entre os grupos sem afinidade química é o principal responsável pela formação de estruturas periódicas com dimensões da ordem de 10 nm a 100 nm [162] obtidas a partir dessa auto-organização dos copolímeros anfifílicos no estado fundido ou solubilizados em solventes seletivos [163-166]. Outra característica muito interessante é a possibilidade de controlar o tamanho e a morfologia das nanoestruturas resultantes. Como consequência, é possível aprimorar as propriedades do material, a partir de variações na massa molecular, na arquitetura molecular, na composição de cada bloco e na concentração ou temperatura do sistema.

Na literatura [164] é descrito que com a aplicação de solventes específicos, ocorrem as seguintes transições de fase no copolímero dibloco em função do aumento da concentração: esferas (S) em um arranjo cúbico de corpo centrado (BCC) → cilindros compactados hexagonalmente (HCP) → giróides (G) → lamelas (L) (**Fig. 20**).

De forma mais precisa, podem ser formadas estruturas nanoperiódicas com esferas de A em uma matriz de B (BCC), cilindros de A em uma matriz de B (HCP), labirintos de A em uma matriz de B (G) e camadas alternadas das fases A e B (L).

**Figura 20.** Representação esquemática das transições de fase ocorridas na fusão de um copolímero dibloco como função da concentração: (a) fase BCC; (b) fase HCP; (c) fase G; (d) fase L.

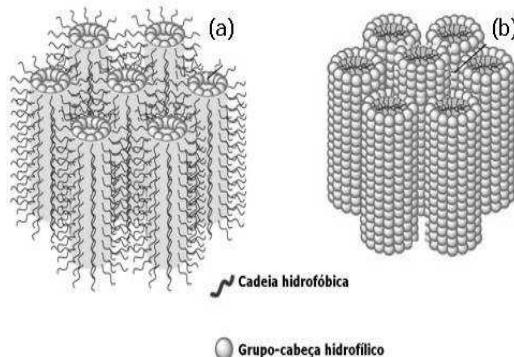


Em regimes de forte separação das fases, as nanoestruturas formadas se tornam mais estáveis, sem a existência da fase giróide.

Dispostas em solução, essas estruturas são caracterizadas por uma organização do tipo casca-núcleo na qual um dos blocos poliméricos do copolímero (núcleo) é envolvido pelo outro bloco que possui afinidade química com o solvente (casca) (**Fig. 21**).

Se o solvente for polar, o núcleo será formado pela agregação dos blocos hidrofóbicos, envolvidos por uma casca hidrofílica (blocos hidrofílicos) e as estruturas formadas são chamadas de diretas; se o solvente é apolar, os papéis de cada bloco se invertem e as estruturas são ditas inversas.

**Figura 21.** Estrutura (a) inversa e (b) direta para a fase HCP.



De forma resumida, a variedade de nanoestruturas periódicas, aliada à possibilidade de manipulação de suas propriedades físicas, faz com que esses sistemas poliméricos sejam materiais de grande aplicabilidade no campo da nanotecnologia. Neste trabalho, estudamos a influência das fases do surfactante polimérico poli (etileno)-b-poli (óxido de etileno) (PE-b-PEO) na minimização da tensão superficial de soluções poliméricas de PVA no processo de eletrofiação e consequente produção de fibras livres de defeitos e com melhor qualidade estrutural. Na sequência o PE-b-PEO também foi aplicado como agente retardante no processo de liberação controlada de nifedipino, como uma barreira adicional (encapsulando as moléculas do fármaco) no interior da matriz fibrosa do polímero entérico Eudragit® L-100.

# CAPÍTULO 3

## PREPARAÇÃO DE MICRO/NANOFIBRAS POLIMÉRICAS POR ELETROFIAÇÃO

Neste capítulo é dada atenção à preparação das fibras de PVA, PVP e Eudragit<sup>®</sup> L-100 em termos estruturais com atenção à dependência direta com a tensão superficial das soluções poliméricas usadas na eletrofiação. É descrito que a introdução de surfactantes no preparo das soluções diminui a tensão superficial, o que influencia fortemente na produção de fibras livres de defeitos (como a presença de grânulos) e com menores diâmetros.

Além disso, a aplicação de uma previsão teórica relativamente simples que relaciona diâmetro das fibras resultantes com a tensão superficial das soluções poliméricas retornou um novo parâmetro no processo, relacionado com a capacidade de estiramento da gota de solução polimérica na saída do capilar metálico em direção ao coletor, como consequência da força elétrica aplicada.

### 3.1 Influência da tensão superficial no diâmetro de micro/nanofibras de polímeros biocompatíveis sintetizadas por eletrofiação: uma investigação teórica/experimental

#### 3.1.1 Introdução

Em meio a uma variedade de estudos que modelam o processo de eletrofiação (Seção 2.1.4), a generalização da influência da tensão superficial (induzida por surfactante) sobre o diâmetro das fibras eletrodepositadas permanece como um importante tópico de análises e aplicações na indústria.

Nesta seção, estabelecemos uma análise teórica/experimental do processo de eletrofiação, a partir de uma função característica do diâmetro médio  $d$  das fibras versus tensão superficial  $\gamma$  (obtida através da análise detalhada do balanço de forças no jato polimérico eletrificado), para a determinação da tensão de estiramento característica das soluções poliméricas investigadas no processo de eletrofiação.

Usando esse parâmetro, temos informações importantes sobre a capacidade de fiação dos modelos poliméricos e do potencial de desenvolvimento de fibras em escala nanométrica.

#### 3.1.2 Experimental

Os polímeros Eudragit<sup>®</sup> L-100 (EDGT) da Evonik Industries, DL50(oral, ratos) > 15.900 mg/Kg (a dose letal via oral para 50 % dos ratos de teste é maior que 15.900 mg da substância/Kg corporal do animal; PVA (Sigma Aldrich), DL50(oral, ratos) = 14.700 mg/Kg; PVP (Sigma Aldrich), DL50(oral, ratos) = 100.000 mg/Kg; e o surfactante não-iônico Triton X-100 (TX-100) (Sigma Aldrich), DL50(oral, ratos) = 5.000 mg/Kg, foram usados como recebidos.

Todas essas substâncias pertencem à Classe 5 de toxicidade (DL50 > 2.000 mg/Kg), segundo o Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos, GHS (do inglês, Globally Harmonized System - ONU), indicando que possuem reduzido potencial de toxicidade aguda (o teste de toxicidade aguda estima a DL50).

A solução padrão de PVA utilizada como solução base para o processo de eletrofiação foi preparada a partir de 50 mL de água deionizada com a inserção de 4g do polímero (concentração de 0,8 g/mL). Em seguida, a dispersão foi colocada em banho térmico durante 3 h a uma temperatura constante de 80 °C para haver a completa solubilização do soluto e formar uma estrutura do tipo gel. A solução padrão de PVP foi preparada a partir da mistura de 2,1 g de PVP em 1,3 mL de álcool etílico, a 25 °C, até a completa dispersão do polímero na forma de gel. Já a solução-mãe de EDGT foi preparada a partir de 1,4 g do polímero, dispersas em 7 mL de álcool etílico, a 25 °C, até a completa dispersão do polímero.

As fibras eletrodepositadas de PVA/TX-100 foram sintetizadas com relativas concentrações de 0, 1, 2, 5, 8 e 11 % em massa (% m/m) de TX-100, enquanto as fibras de PVP e EDGT foram produzidas a partir de 0, 2, 5, 8, 11 e 15 % em massa (% m/m) de TX-100, nas soluções-padrão.

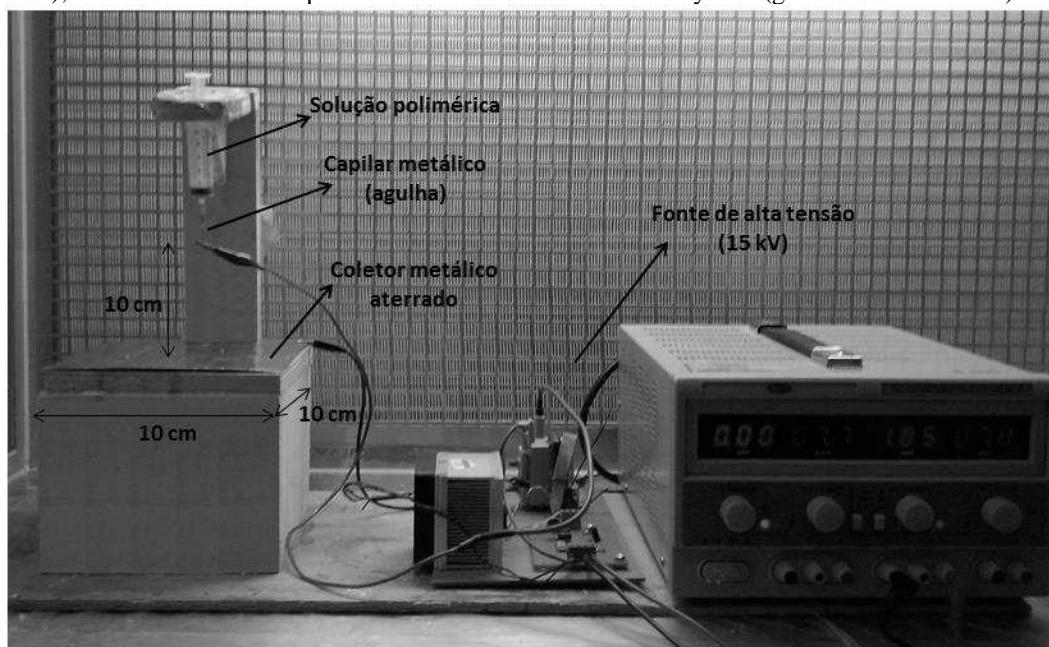
A tensão superficial ( $\gamma$ ) das amostras produzidas foi medida a 25 °C usando o método Estalagmométrico (também conhecido como método do peso da gota) [7]. Os valores de tensão superficial foram dados como média de três medidas independentes.

Com relação ao processo de eletrofiação, foram preparados 5 mL de cada amostra em bêqueres de 10 mL e em seguida transferidas para uma seringa convencional de 10 mL e diâmetro do capilar metálico (agulha) de 0,7 mm. A mistura foi mantida na seringa sob pressão constante com um fluxo característico de  $166 \mu\text{L min}^{-1}$ , sem interferência de campo elétrico externo. Simultaneamente, um fluxo regular das soluções poliméricas é estabelecido na ponta do capilar sob ação de um potencial elétrico (ddp) da ordem de 15 kV [167] entre a ponta da agulha e o aparador metálico plano (10 cm x 10 cm) separados por uma distância típica de 10 cm (**Fig. 22**).

Pela ação da força resultante entre a força elétrica e a tensão superficial da solução, a partir do cone de Taylor, as amostras de micro/nanofibras foram produzidas e depositadas em um suporte metálico composto por duas agulhas dispostas paralelamente e acoplado na superfície do aparador aterrado. Os experimentos de eletrofiação foram conduzidos com progressiva deposição das fibras no suporte metálico por um intervalo de 5 minutos.

É importante destacar que o aparato de eletrofiação foi desenvolvido na Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF). Um circuito elétrico contendo um dispositivo flyback (gerador de alta tensão) foi projetado para transformar a tensão de entrada (220 V) em uma tensão de saída da ordem de 15kV, e o processo de eletrofiação pudesse ocorrer. Para maiores detalhes do aparato de eletrofiação, ver **Fig. 22**.

**Figura 22.** Aparato de eletrofiação na configuração vertical, desenvolvido na UNIVASF. Em destaque os parâmetros envolvidos no processo: seringa contendo a solução polimérica; capilar metálico (agulha) sob ação de um potencial elétrico de 15 kV; distância da ponta da agulha ao coletor de 10 cm; coletor metálico plano (10 cm x 10 cm); fonte de alta tensão a partir de um circuito contendo um flyback (gerador de alta tensão).



Logo em seguida, as fibras foram levadas a um microscópio eletrônico de varredura MEV Hitashi TM 1000 (microscópio de bancada, com tensão de aceleração de 15 kV, ampliação de 20 – 10.000 ×, Zoom digital: 4 ×), para que a morfologia das fibras fossem analisadas a partir das imagens obtidas.

O tratamento estatístico dos dados foi estabelecido usando os software Minitab 14 e ImageJ, software de processamento e análise estatística de imagens de domínio público

desenvolvido pelo Instituto Nacional de Saúde “National Institutes of Health (NIH)” dos Estados Unidos, comumente aplicado em análise de materiais biológicos.

Para a análise dos diâmetros das fibras, para cada concentração relativa de PVA/TX-100, EDGT/TX-100 e PVP/TX-100, foram consideradas três microscopias independentes das fibras produzidas. Foram consideradas imagens em que mais de 30 fibras pudessem ser contabilizadas ( $n > 30$ ), visto que uma distribuição normal dos valores de diâmetro é esperada para uma amostra com mais de 30 medidas individuais [168]. A partir da superfície das fibras nas imagens, foram determinados o diâmetro médio amostral  $\bar{d} = \frac{\sum_{i=1}^n (\text{diâmetros})}{n}$  e o desvio padrão correspondente ( $s_{\bar{d}}$ ) para cada uma das configurações polímero/TX-100. Foi aplicado o teste de hipóteses Kolmogorov-Smirnov (KS) [169] com significância ( $\alpha$ ) de 0,05, para confirmar a normalidade da distribuição de diâmetros.

O diâmetro médio das fibras ( $d=2r$ ) para cada concentração relativa de TX-100 foi estimado a partir dos dados amostrais ( $\bar{d}$ ,  $s_{\bar{d}}$  and  $n$ ) e dados em intervalos de confiança para a média populacional ( $\bar{d} - t_{(\frac{\alpha}{2}, n-1)} \frac{s_{\bar{d}}}{\sqrt{n}}$ ;  $\bar{d} + t_{(\frac{\alpha}{2}, n-1)} \frac{s_{\bar{d}}}{\sqrt{n}}$ ), com distribuição t de Student ( $\alpha = 0,05$  e  $n-1$  graus de liberdade) com 95% de confiança [170, 171]. Em seguida, os valores de  $d$  foram ajustados à previsão teórica proposta ( $d$  versus  $\gamma$ ), no software Origin 7.0.

### 3.1.3 Resultados e discussão

#### 3.1.3.1 Fundamentação teórica: diâmetro versus tensão superficial

As forças envolvidas no processo de ejeção das fibras poliméricas a partir da interface ar /orifício metálico (ponta da agulha) são a força elétrica aplicada, a força peso e a força devido à contribuição da tensão superficial da gota, de acordo com a Equação 1:

$$(\vec{F}_E + \vec{P}) - \vec{F}_S = m\vec{a} \quad (\text{Eq. 1}),$$

onde  $\vec{F}_E$  é a força elétrica,  $\vec{F}_S$  a força superficial da gota (no sentido contrário ao do fluxo de cargas elétricas, dada por  $F_S = 2\pi R\gamma$ , ( $R$  é o raio da gota e  $\gamma$  é a tensão superficial da solução polimérica na interface ar / fim do orifício metálico;  $m$  representa a massa da gota ( $P=mg$ ) e  $\vec{a}$  é a aceleração resultante da fibra ejetada em direção ao coletor metálico).

Por sua vez, a taxa de fluxo de cargas elétricas I (corrente elétrica) através de uma superfície S (nesse caso, a seção transversal da fibra) é dada pela expressão:

$$I = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{|\Delta Q|}{\Delta t} = \frac{dQ}{dt} \quad (\text{Eq. 2}),$$

A corrente elétrica se relaciona com a densidade de corrente elétrica  $\vec{J}$  (grandeza vetorial que representa a quantidade de carga elétrica por unidade de tempo, que passa por determinada área superficial ou seção transversal e tem direção e sentido dados pelo vetor normal a esta mesma superfície), pela equação:

$$I = \int_S \vec{J} \cdot d\vec{A} \quad (\text{Eq. 3}),$$

onde  $\vec{J} = J\hat{n}$ , ( $\hat{n}$  é o versor normal à seção transversal da fibra) e  $d\vec{A} = dA\hat{n}$  é o vetor elemento infinitesimal de área da seção. Como  $\vec{J}$  e  $d\vec{A}$  possuem a mesma direção e sentido (Fig. 3b), o produto interno entre esses dois vetores reduz a Equação 3 a

$$I = \int J dA \quad (\text{Eq. 4}),$$

Em adição, as estruturas poliméricas ultrafinas e alongadas, de diâmetro constante (formato cilíndrico), sintetizadas foram consequência da densidade de corrente elétrica constante em qualquer seção transversal desses materiais, especialmente a partir da região do segmento linear, onde o balanço entre as forças envolvidas no processo (força resultante) havia sido estabelecido para que o processo de eletrofiação viesse a ocorrer. Dessa forma, a Equação 4 pode ser simplificada a:

$$I = J \int dA = JA \quad (\text{Eq. 5}),$$

com  $A = \pi r^2$  (r representa o raio das fibras ejetadas). Consequentemente, temos a informação de que a corrente elétrica é constante em qualquer seção transversal das fibras, o que prevê diâmetros uniformes das fibras. Este resultado é bastante importante, uma vez que se mostra como premissa essencial para que se possa simplificar os cálculos na busca por uma previsão teórica do processo de eletrofiação, que relate o diâmetro (d) das fibras com a tensão superficial ( $\gamma$ ) da solução polimérica.

Essa afirmação indica que para a previsão discutida neste trabalho ser considerada na prática, deve-se confirmar que os diâmetros das fibras produzidas (a partir de uma formulação específica, mantendo-se constantes os parâmetros do processo) segue pelo menos uma distribuição normal de valores. Essa aproximação é aceitável uma vez que se devem levar em conta outros parâmetros envolvidos no processo, que por ventura não sejam devidamente controlados e sofram pequenas variações (como comumente ocorre em processos industriais com produção em larga escala).

Na continuidade da demonstração, sem perca de generalidade, a densidade de corrente elétrica também pode ser representada na forma  $\vec{J} = \rho\vec{\mu}$ , onde  $\rho$  é a densidade de cargas elétricas e  $\vec{\mu} = \mu\hat{n}$  é a velocidade de ejeção das fibras, em cada seção transversal, em direção ao coletor metálico. Dessa forma, I pode ser reescrita pela identidade:

$$I = JA = \rho\mu\pi r^2 \quad (\text{Eq. 6}).$$

Assim, o raio  $r$  pode ser explicitado em termos de corrente, de acordo com a Equação 7,

$$r = \sqrt{\frac{I}{\rho\mu\pi}} \quad (\text{Eq. 7}),$$

com  $r \propto \mu^{-1/2}$ . Derivando implicitamente a Equação 7 em função do tempo,

$$\frac{dr}{dt} = -\frac{1}{2} \sqrt{\frac{I}{\rho\pi}} \mu^{-3/2} \frac{d\mu}{dt} = -\frac{1}{2} \sqrt{\frac{I}{\rho\pi}} \mu^{-3/2} a \quad (\text{Eq. 8}),$$

onde  $a$  é a aceleração constante do jato polimérico, temos que:

$$\frac{dr}{r^3} \approx -\frac{1}{2} \sqrt{\frac{I}{\rho\pi}} a dt \quad (\text{Eq. 9}).$$

Resolvendo esta equação diferencial separável, obtemos:

$$r^{-2} \approx \sqrt{\frac{I}{\rho\pi}} a t \quad (\text{Eq. 10}).$$

Essa equação pode ser combinada com a equação de balanço de forças (Equação 1) com o objetivo de reescrevê-la na forma:

$$r \approx \left(\frac{\rho\pi}{I}\right) \left[ \frac{m}{(F_E + mg - F_S)t} \right]^{1/2} \quad (\text{Eq. 11}).$$

Nesse sentido, podemos utilizar o fato de que  $\gamma = F_S/2\pi R$ , para finalmente propormos uma expressão geral e simplificada do fenômeno, que relate o raio das micro/nanofibras com a tensão superficial:

$$r \approx \left(\frac{\rho^2\pi m}{2RI^2t}\right)^{1/2} \left( \frac{1}{\frac{(F_E + mg)}{2\pi R} - \gamma} \right)^{1/2} \quad (\text{Eq. 12}).$$

Dessa forma, a dependência do diâmetro ( $d=2r$ ) das fibras sintetizadas com a tensão superficial ( $\gamma$ ) pode ser descrita por uma função do tipo  $d(\gamma) = \frac{k}{\sqrt{k_1 - \gamma}}$ , com

$k \approx \sqrt{\frac{\rho^2\pi m}{2RI^2t}}$  e  $k_1 = \frac{F_E + mg}{2\pi R}$ . Em uma análise mais detalhada das componentes do termo  $k_1$  é possível verificar que este parâmetro é dado em unidades de força por unidade de

comprimento (N/m). No contexto do problema, este termo pode ser interpretado fisicamente como a constante elástica (como em um sistema massa-mola) da gota que mede a capacidade de estiramento (ou da flexibilidade) característica da gota (dado uma matriz polimérica qualquer) na saída do capilar metálico, sobre ação de uma força elétrica aplicada.

Assim, quanto maior o valor de  $k_1$  menor o estiramento da gota por unidade de força, o que resulta em um alto grau de separação de cargas (da ponta da agulha eletrizada ao coletor metálico), induzido por um campo elétrico, durante o processo sobre o material polimérico. Esse fenômeno permite que a ejeção das fibras se dê de forma adequada, com uma distribuição de diâmetros menores e mais regulares. Nesta direção,  $k_1$  pode ser utilizado como um indicador do grau de elasticidade das gotas como resposta a um campo elétrico externo aplicado à solução polimérica, no sentido de aperfeiçoar experimentações em eletrofiação de micro/nanofibras poliméricas.

### 3.1.3.2 Resultados experimentais

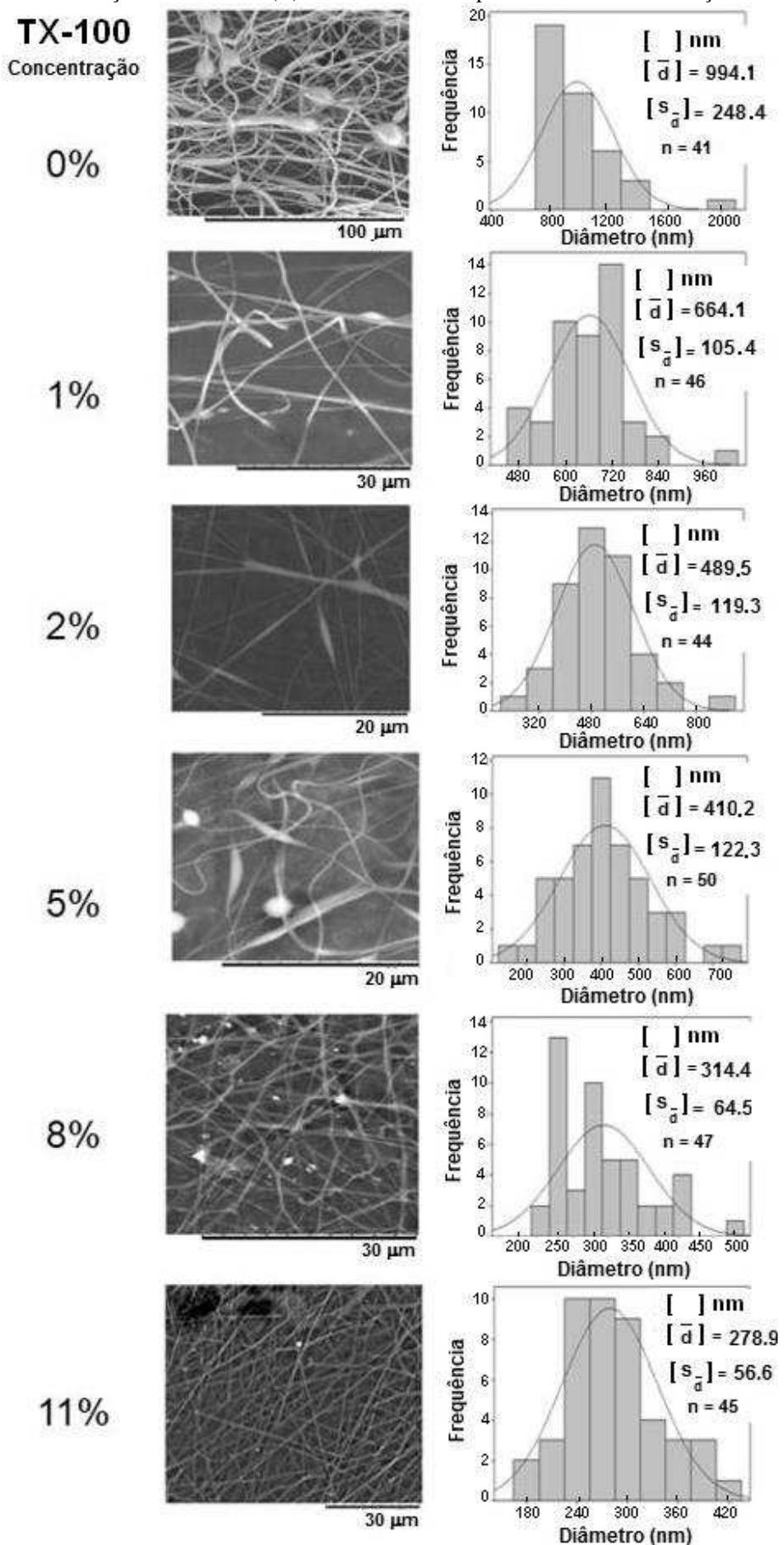
Como podemos observar na **Fig. 23**, defeitos estruturais do tipo grânulos estão dispersos nas nanofibras de PVA na ausência de aditivos. Esses defeitos podem estar associados com limitações no aparato experimental (como distância da agulha ao coletor, pressão, potencial elétrico, etc.) de eletrofiação que não foram capazes de evitar uma eletrodeposição inadequada das gotas de solução polimérica em direção ao coletor metálico. Esses defeitos foram minimizados da rede fibrosa a partir do adequado controle da tensão superficial das gotas induzida pela ação do surfactante TX-100.

Associado com a produção de fibras regulares com baixa concentração de grânulos, a adição progressiva do surfactante afetou fortemente o diâmetro médio amostral,  $\bar{d}$ , das fibras de PVA, proporcionando uma redução de 994 nm para 278 nm nas amostras analisadas.

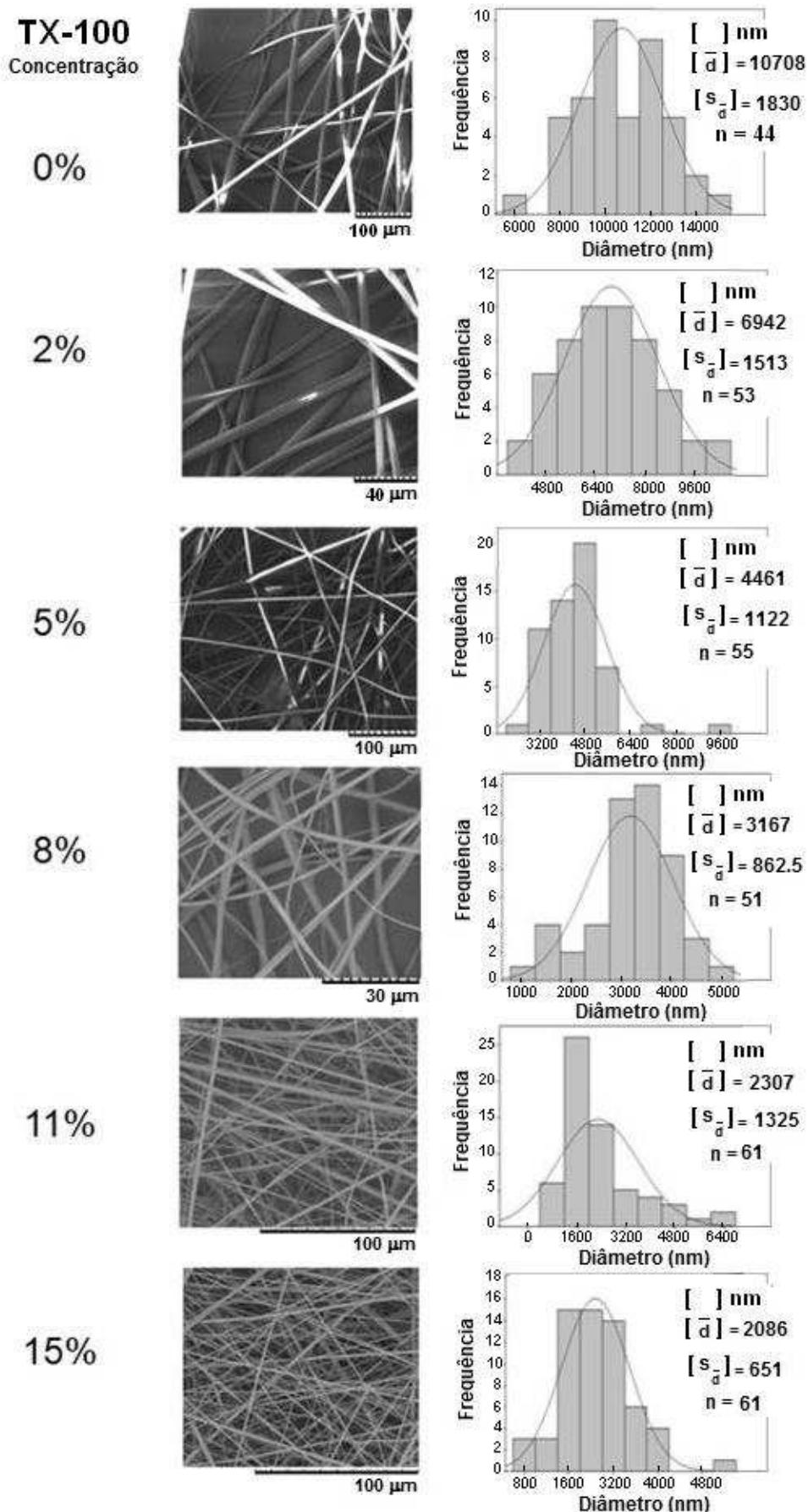
A influência de TX-100 na produção de fibras de PVP (dados e imagens mostrados na **Fig. 24**), indica uma redução no diâmetro médio amostral das fibras de 10  $\mu\text{m}$  para 2  $\mu\text{m}$ .

Por sua vez, a dependência do diâmetro das fibras de EDGT com a concentração de TX-100 é mostrada na **Fig. 25**, no qual é possível verificar uma redução no diâmetro médio amostral de 8,62  $\mu\text{m}$  para 3,16  $\mu\text{m}$ . Concentrações insignificantes de defeitos são verificadas em toda a gama das amostras de PVP e EDGT avaliadas. A partir dos dados amostrais, foi possível realizar uma análise estatística inferencial para determinar o p-valor do teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov [169] e o intervalo de confiança para o diâmetro médio ( $d$ ) das fibras de PVA, PVP e EDGT (**Tab. 3**), dada uma tensão superficial específica.

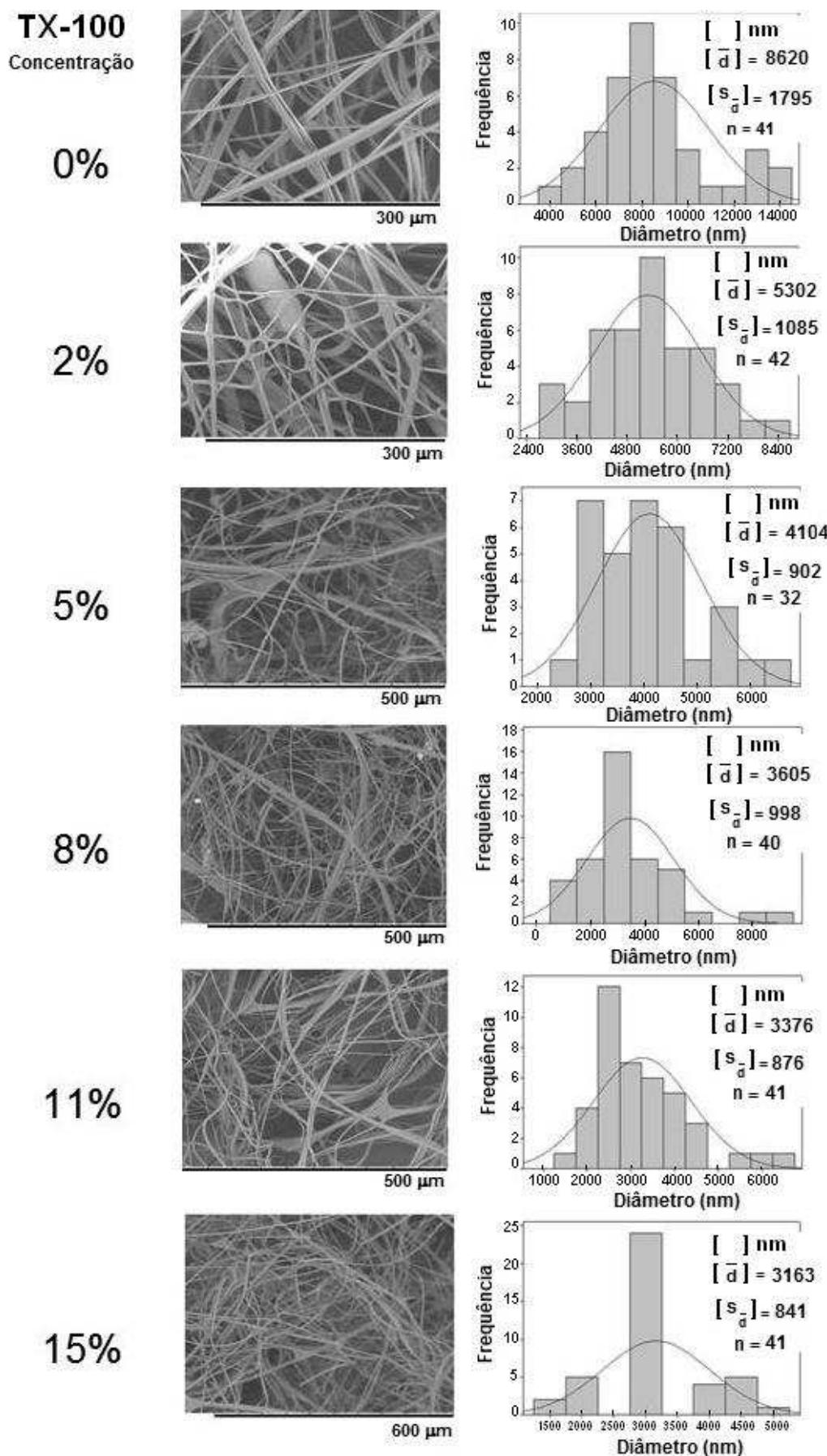
**Figura 23.** Distribuição de diâmetros ( $\bar{d}$ ) das fibras de PVA para diferentes concentrações de TX-100.



**Figura 24.** Distribuição de diâmetros ( $\bar{d}$ ) das fibras de PVP para diferentes concentrações de TX-100.



**Figura 25.** Distribuição de diâmetros ( $\bar{d}$ ) das fibras de EDGT para diferentes concentrações de TX-100.



Os resultados indicaram que as amostras analisadas são advindas de uma população de diâmetros normalmente distribuída ( $p$ -valor  $> 0,05$ ), com intervalos de confiança razoavelmente estreitos para o diâmetro médio das fibras. Essa característica garantiu a aplicação da previsão teórica  $d$  versus  $\gamma$  proposta (Eq. 12), aos dados experimentais, uma vez que ela estabelece um diâmetro específico para cada valor de  $\gamma$ .

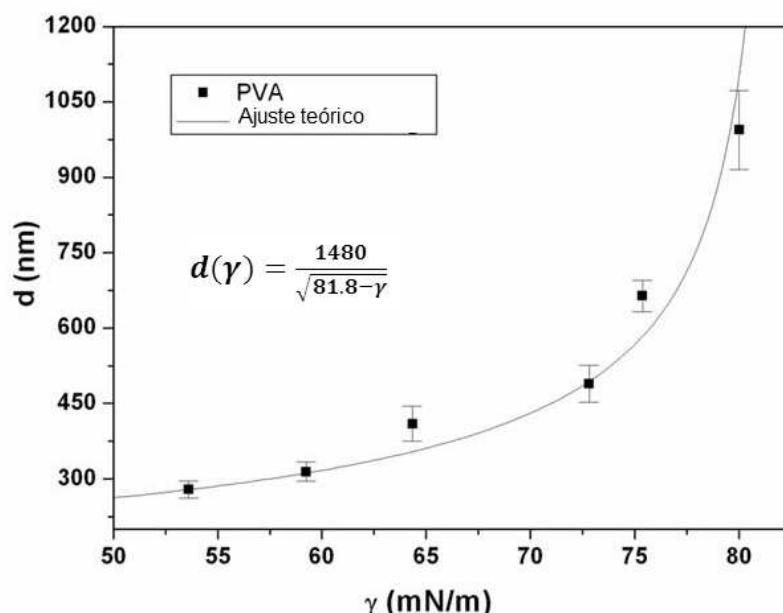
**Tabela 3.** Dados estatísticos:  $p$ -valor do teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov para verificação da normalidade dos dados de diâmetro e intervalo de confiança para o diâmetro médio ( $d$ ) das fibras resultantes de PVA, PVP e Eudragit® L-100.

TX-100 (wt %)	nanofibras de PVA		micro/nanofibras de PVP		micro/nanofibras de Eudragit® L-100	
	p-valor	d (nm)	p-valor	d (μm)	p-valor	d (μm)
0	< 0,01	(915,7; 1072,5)	> 0,15*	(10,2; 11,3)	> 0,15*	(8,1; 9,2)
1	> 0,15*	(632,8; 695,4)	-	-	-	-
2	> 0,15*	(453,2; 525,8)	> 0,15*	(6,5; 7,4)	> 0,15*	(5,0; 5,7)
5	> 0,15*	(375,4; 445,0)	0,121*	(4,2; 4,8)	> 0,15*	(3,3; 3,9)
8	0,113*	(295,5; 333,3)	> 0,15*	(2,9; 3,4)	> 0,15*	(3,3; 3,9)
11	> 0,15*	(261,9; 295,9)	< 0,01	(2,0; 2,7)	> 0,15*	(3,1; 3,7)
15	-	-	0,095*	(1,9; 2,3)	> 0,15*	(2,9; 3,4)

\*  $p$ -valor  $> 0,05$ : distribuição normal.

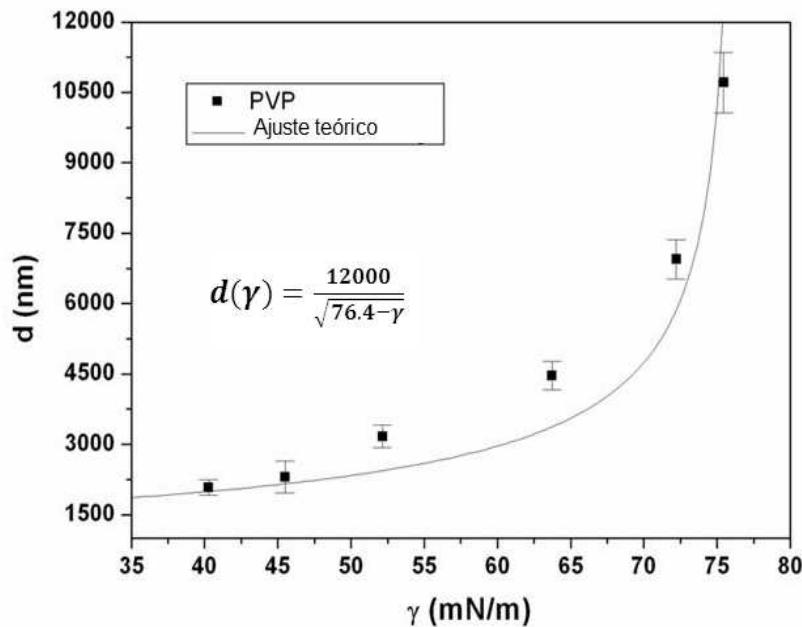
Do ajuste da Eq. 12 aos dados de  $d$  e  $\gamma$  das fibras de PVA (**Fig. 26**), obteve-se uma capacidade de estiramento das gotículas de PVA ( $k_{lPVA}$ ) de 81,8 N/m.

**Figura 26.** Dependência do diâmetro ( $d$ ) das fibras de PVA com a tensão superficial ( $\gamma$ ).



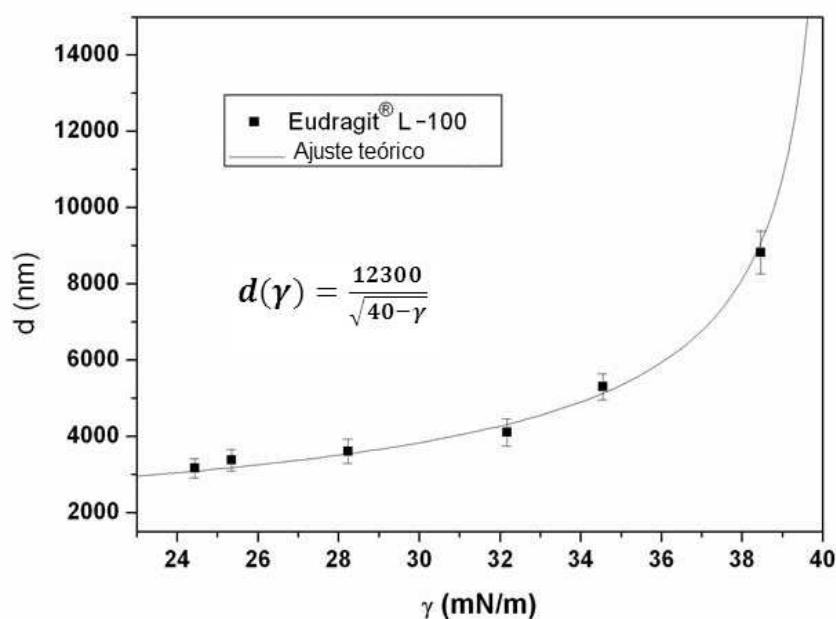
A relação entre os dados experimentais e os melhores valores de ajuste para os parâmetros da Eq. 12 (**Fig. 27**), retornou para o PVP um  $k_1$  de 76,4 N/m.

**Figura 27.** Dependência do diâmetro (d) das fibras de PVP com a tensão superficial ( $\gamma$ ).



Para o EDGT, a dependência do diâmetro das fibras com a tensão superficial (**Fig. 28**) retornou uma capacidade de estiramento de 40 N/m.

**Figura 28.** Dependência do diâmetro (d) das fibras de Eudragit® L-100 com a tensão superficial ( $\gamma$ ).



Se considerarmos que a tensão superficial afeta o tamanho da gota na saída da agulha carregada, podemos verificar que a concentração relativa de surfactante afeta a Eq. 1: a redução do diâmetro da gotícula reduz o peso da gota, e, consequentemente, a densidade de carga na extremidade da gotícula.

De maneira geral, os resultados indicam que a inclusão progressiva de surfactante nas soluções poliméricas reduz a tensão superficial das gotículas na saída da agulha carregada eletricamente. Como resultado, a redução da tensão superficial afeta fortemente a taxa de deposição devido às alterações no equilíbrio de forças durante a eletrofiação.

A concentração relativa de 11 % em massa de TX-100 reduz em cerca 70 % o diâmetro das fibras de PVA, enquanto a uma concentração de 15 % em massa de TX-100, o diâmetro das fibras de PVP é reduzido em até 80% e das fibras de EDGT em 63 %, se comparados com os diâmetros iniciais, sem aditivo. Estes resultados estão de acordo com os resultados relatados por Ramakrishna et al. [172], que indicam que o diâmetro ( $d$ ) das fibras é proporcional ao diâmetro da gotícula na ponta da agulha ( $2R$ ).

Neste sentido, o parâmetro  $k_1$  introduz uma vantagem adicional em comparação com a medição do diâmetro da gotícula, uma vez que pode ser convenientemente aplicado na quantificação da influência do tamanho da gotícula sobre o diâmetro das fibras sintetizadas.

Comparando os valores da constante  $k_1$ , que define a capacidade de estiramento das gotículas, verificamos que  $k_{1\text{ PVA}} > k_{1\text{ PVP}} > k_{1\text{ EDGT}}$ . Esse resultado está de acordo com a ordem inversa dos diâmetros resultantes das fibras:  $d_{\text{PVA}} < d_{\text{PVP}} < d_{\text{EDGT}}$ .

Essa é uma confirmação de que o aumento da capacidade de estiramento da gotícula, a partir de uma excitação elétrica externa, contribui com a deposição regular de fibras.

Em adição, esses resultados abrem inúmeras possibilidades a serem exploradas nesses e em outros sistemas poliméricos usados em eletrofiação, de modo a estimar o potencial de diversas matrizes poliméricas para aplicação segura e eficaz dessas estruturas, com mínima dispersão de defeitos e progressiva redução no diâmetro das fibras ejetadas.

### 3.1.4 Considerações finais

A produção de micro/nanofibras com diâmetro controlado e distribuição mínima de defeitos com a utilização da técnica de eletrofiação é extremamente dependente da tensão superficial sobre a gotícula disposta na ponta da agulha eletrificada.

Em trabalho anterior, Ramakrishna S. et al. [172] descreveram a força resultante na saída do capilar metálico, a fim de prever a influência do diâmetro da gota no diâmetro das

fibras resultantes. Neste trabalho, propomos um novo parâmetro para o processo de eletrofiação, denominado  $k_1$ , que introduz uma vantagem adicional em comparação com a medição do diâmetro das gotas, uma vez que pode ser convenientemente aplicado na quantificação da influência do tamanho da gotícula sobre o diâmetro das fibras sintetizadas.

Tal previsão teórica relativamente simples e usual, bem como a definição de um novo parâmetro relacionado com a capacidade de estiramento da gota (a partir dos ajustes teóricos) podem ser explorados para analisar a capacidade de fiação de materiais específicos para as inúmeras aplicações potenciais em eletrofiação.

### **3.2 Influência do Triton X-100 na produção de fibras de PVA por eletrofiação**

#### **3.2.1 Introdução**

O uso do poli (álcool vinílico) (PVA) como matriz de suporte em solução aquosa para a elektrodeposição de fibras apresenta vantagens importantes relacionadas à liberação controlada de fármacos (baseado na baixa toxicidade do polímero).

Por outro lado, imperfeições nas fibras sintetizadas, como a formação de grânulos, representam um problema a ser contornado. Como verificado na Seção 3.1, a introdução do surfactante não-iônico TX-100 contorna a formação desses defeitos e melhora a homogeneidade das fibras de PVA produzidas.

A partir desses resultados, foi proposto um estudo estatístico descritivo mais detalhado da influência do surfactante TX-100 na minimização desses defeitos e nas propriedades térmicas, estruturais e morfológicas das fibras.

Os resultados indicaram que em uma concentração de TX-100 em solução (da ordem de 1% em massa), a circularidade e a dispersão dos grânulos na rede de fibras produzida são afetadas, enquanto que a 11% em massa do surfactante, fibras de PVA livres de defeitos são produzidas, acompanhadas da redução no diâmetro e aumento da cristalinidade.

#### **3.2.2 Experimental**

O PVA (Sigma Aldrich) foi utilizado como matriz polimérica e o Triton X-100 (TX-100) (Sigma Aldrich) como dispersante nas soluções do polímero. A preparação da solução padrão de PVA segue a mesma metodologia utilizada na Seção 3.1.2.

Após estabilização da solução padrão de PVA por 24h em temperatura ambiente (25 °C), foram preparadas sete amostras com concentrações variáveis de TX-100 (conforme descrito na Seção 3.1.2) adicionadas à solução polimérica padrão de PVA.

Essas amostras foram submetidas à agitação constante de 100 rotações por minuto (rpm) no agitador magnético por 30 minutos.

Os experimentos de eletrofiação para cada amostra com concentração relativa de PVA / TX-100 seguem os mesmos parâmetros estabelecidos na Seção 3.1.2.

A tensão superficial das amostras ( $\gamma$ ) foi medida a 25 °C, usando o método do peso da gota.

O diâmetro das fibras, a quantidade média de grânulos por imagem, a área média dos grânulos, a fração de grânulos por imagem e a circularidade desses defeitos em função da concentração do TX-100 foram analisados estatisticamente, a partir de dez diferentes imagens com área de (328,6 x 246,4)  $\mu\text{m}^2$  representativas das amostras em questão, utilizando o ImageJ.

As propriedades térmicas (ponto de fusão e entalpia de fusão) das amostras foram exploradas por Calorimetria Diferencial de Varredura ou DSC (Differential Scanning Calorimetry) em um aparelho DSC Shimadzu DSC-60 (Shimadzu).

Os cadiinhos para o experimento de DSC foram preparados com 1 mg de cada amostra. O fluxo de calor do processo foi estabelecido a uma taxa constante de 10 °C  $\text{min}^{-1}$  e o fluxo de nitrogênio ( $\text{N}_2$ ) a 50 mL  $\text{min}^{-1}$ .

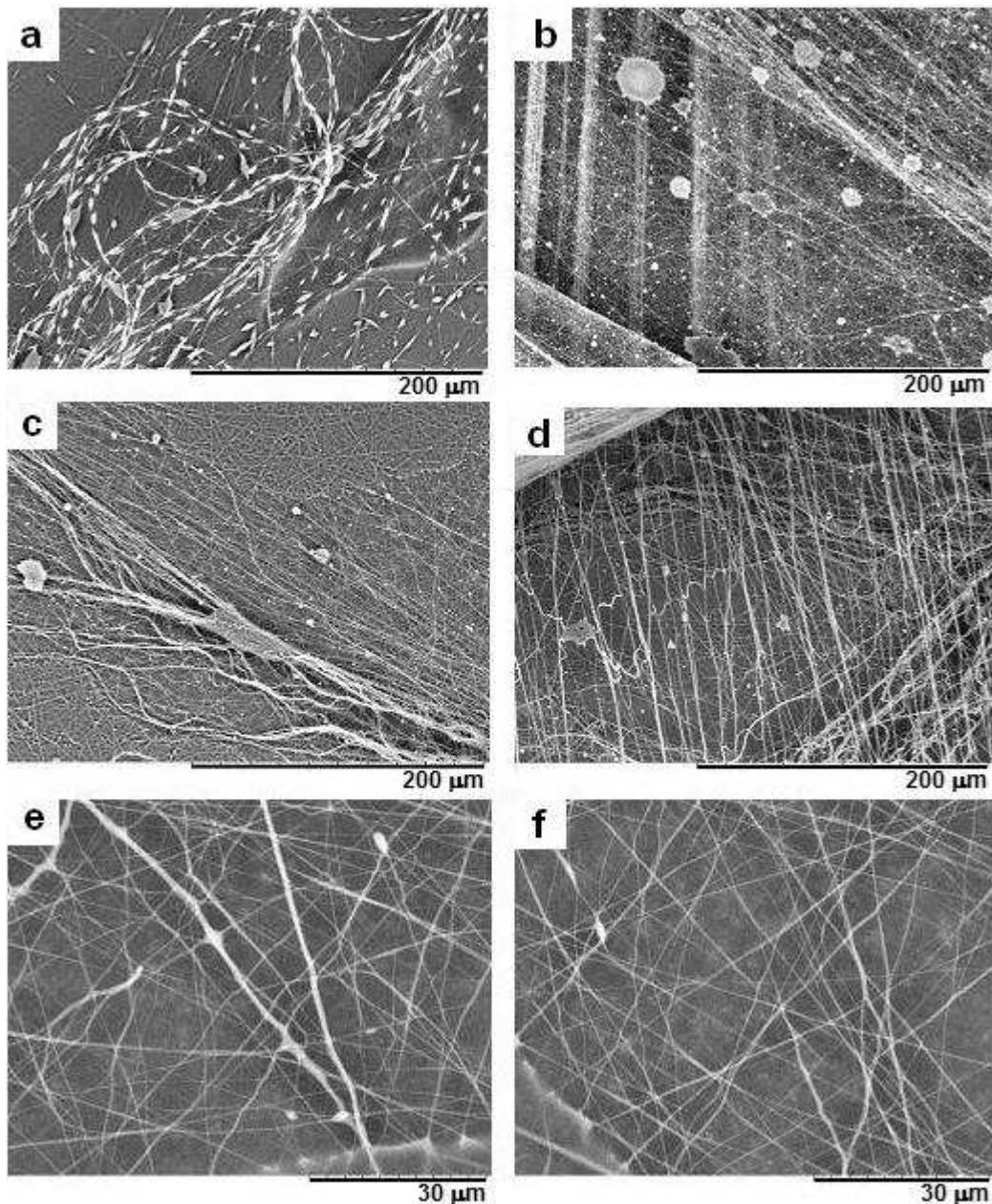
### 3.2.3 Resultados e discussão

Como podemos verificar na **Fig. 29**, a progressiva inclusão do surfactante TX-100 (imagens de **a** a **f** – com variação na concentração de surfactante de 0 % em massa a 11 % em massa) promove uma aparente redução na concentração de grânulos com consequente produção de fibras mais regulares.

À medida que fibras com menores diâmetros foram produzidas, a resolução das imagens foi aumentada para uma melhor visualização das estruturas formadas (**Fig. 29e** e **f**).

Estes resultados mostram uma dependência direta com a tensão superficial das soluções poliméricas de PVA.

**Figura 29.** Microscopias obtidas por MEV das fibras de PVA eletrodepositadas com diferentes concentrações de TX-100 (% em massa): (a) 0, (b) 1, (c) 2, (d) 5, (e) 8 e (f) 11. Todos os experimentos de eletrofição foram realizados a temperatura ambiente com tempo de deposição de 5 minutos. A resolução das imagens (e) e (f) foi aumentada para uma melhor visualização das estruturas formadas.



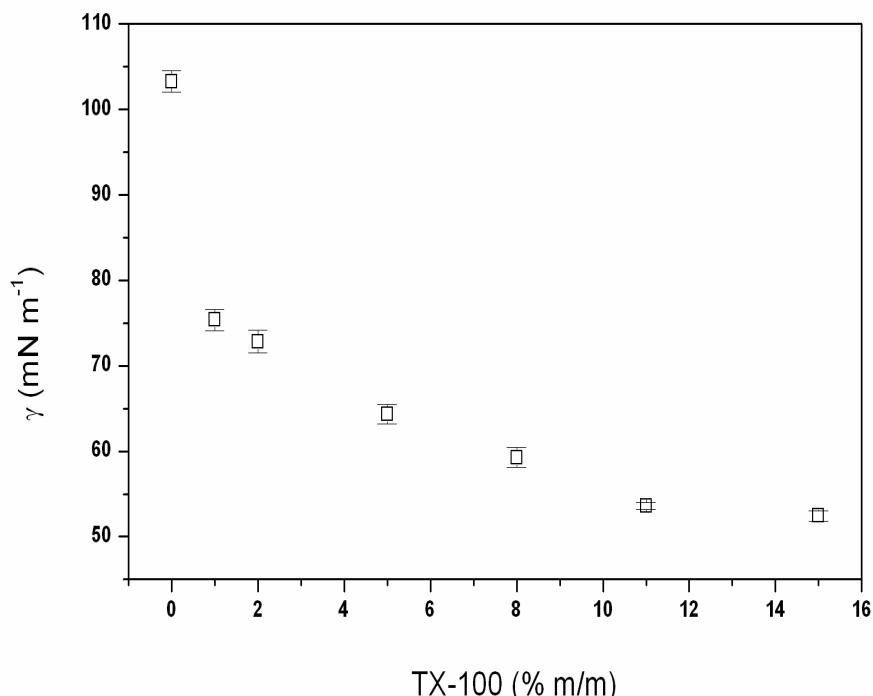
Como podemos observar na **Fig. 30**, a tensão superficial reduz fortemente com a inclusão progressiva do surfactante TX-100 até atingir a metade do valor da tensão superficial inicial (solução polimérica de PVA puro), em concentrações a partir de 11% em massa de surfactante.

A partir dessa concentração, a tensão superficial se torna constante (com mínimas variações observadas experimentalmente). Este resultado indica que a partir desse ponto a

tensão superficial da solução saturou e a inclusão progressiva do surfactante não mais influenciou nos valores obtidos.

É importante relembrar que a redução na tensão superficial afetou fortemente a competição estabelecida com a força eletrostática, aumentando a qualidade estrutural das fibras produzidas durante o processo de eletrofiação.

**Figura 30.** Tensão superficial ( $\gamma$ ) da solução polimérica de PVA como função da concentração de TX-100.



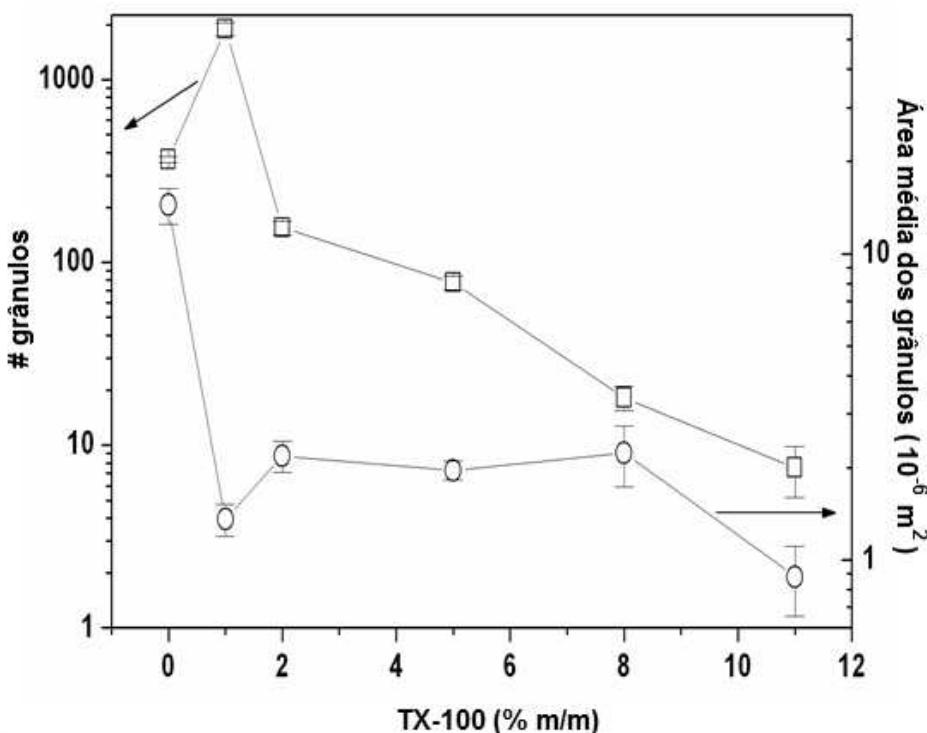
Se considerarmos que um campo elétrico constante pode ser estabelecido com o aumento da concentração do surfactante, é possível inferir a influência desse aditivo na formação de defeitos do tipo grânulos.

A dependência do número médio de defeitos e da área média dos defeitos com a quantidade de surfactante dispersa na solução polimérica é mostrada na **Fig. 31**.

É interessante observar que o número de grânulos cresceu fortemente em baixas concentrações do surfactante (se comparado com a solução inicial sem adição de TX-100) enquanto a área média dos grânulos foi reduzida com a progressiva inserção do surfactante. O número médio de grânulos por imagem cresceu sete vezes enquanto a área média dos grânulos reduz em quinze vezes.

Apesar do crescimento do número de defeitos (com adição de 1% em massa de TX-100), essa é uma indicação de que o processo de dispersão dos grânulos se inicia visto que o diâmetro desses defeitos é reduzido em comparação com as microfibras de PVA puro.

**Figura 31.** Quantidade média (quadrados) e área média dos grânulos (círculos) por imagem em função da quantidade de TX-100 dispersa na solução polimérica de PVA. As setas indicam a escala corresponde a cada medida.



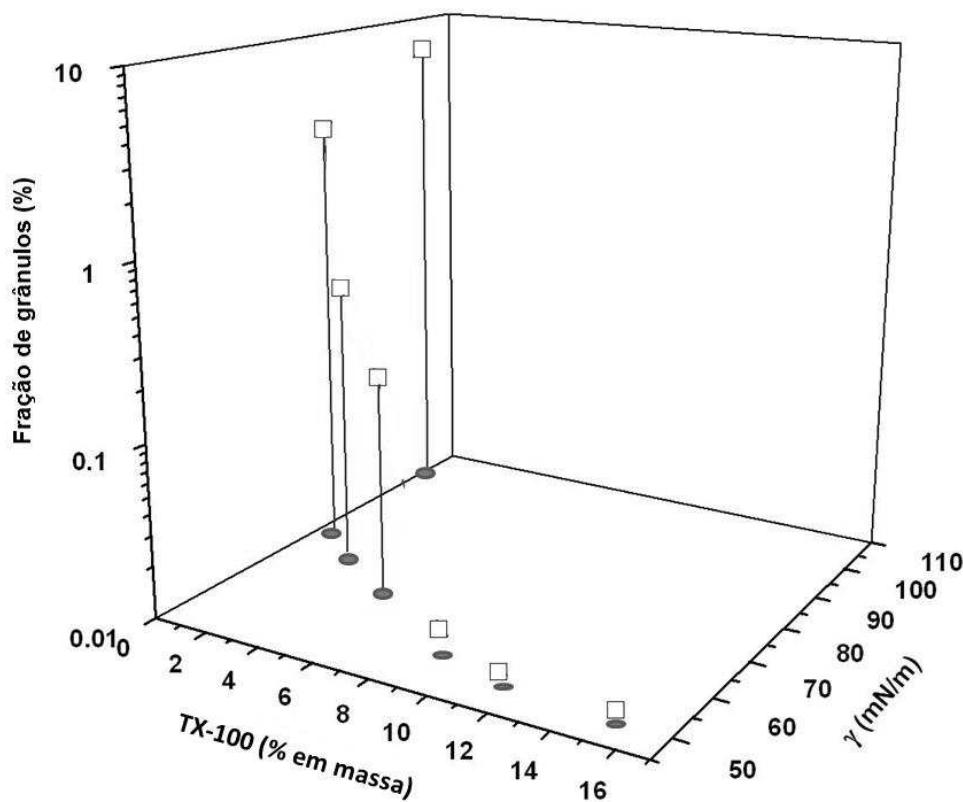
Logo em seguida, com a progressiva inclusão do TX-100 na solução, ambos o número e a área dos defeitos reduziram, dando origem a estruturas homogêneas que se repetem ao longo da rede de fibras.

Note que a fração de grânulos (razão entre a área total de grânulos e a área total de fibras) (como mostrado na **Fig. 32**) é abruptamente reduzida (por cinco ordens de grandeza), em uma indicação de que a regularidade das fibras produzidas foi significativamente melhorada.

É importante verificar nesta curva (**Fig. 32**) a relação direta entre tensão superficial e quantidade de surfactante e a implicação na eliminação dos grânulos. Os resultados da influência da inclusão do surfactante na regularidade das fibras são apresentados na **Tab. 4**. Outro aspecto descrito na **Tab. 4** é que o grau de circularidade dos grânulos é melhorado pela presença do TX-100 disperso na solução de PVA.

Com o aumento da concentração de TX-100 os grânulos tornam-se mais circulares, indicando a forte interação do surfactante com a solução (em especial com a tensão superficial). Apesar dessa dependência, o papel principal do TX-100 está ligado à diminuição do tamanho e da quantidade dos defeitos distribuídos ao longo das fibras.

**Figura 32.** Gráfico 3D da fração de grânulos como função da tensão superficial ( $\gamma$ ) e concentração de TX-100. A fração de grânulos (razão entre a área total de grânulos e a área total de fibras) é reduzida por cinco ordens de grandeza em uma indicação de que fibras com melhor qualidade estrutural foram produzidas.

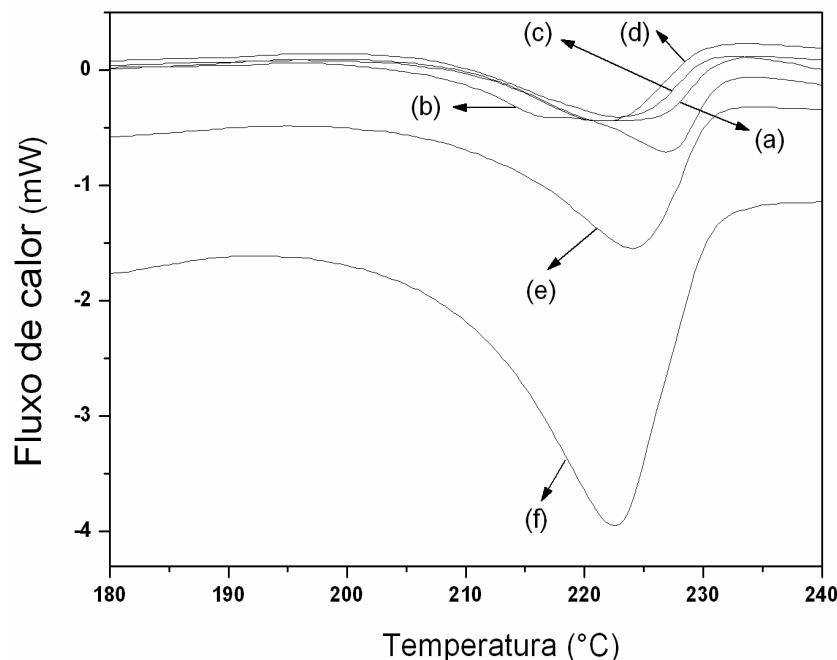


**Tabela 4.** Influência do Triton X-100 na tensão superficial e nas propriedades dos grânulos.

TX-100 (% em massa)	$\gamma$ ( $\text{mN m}^{-1}$ )	# grânulos	Área dos grânulos ( $\mu\text{m}^2$ )	fração de grânulos (%)	circularidade (0 – 1)
0	$103,3 \pm 1,3$	$365,3 \pm 15,2$	$14,4 \pm 0,8$	$6,4 \pm 0,4$	$0,47 \pm 0,02$
1	$75,4 \pm 1,2$	$1894,1 \pm 152,8$	$1,36 \pm 0,06$	$3,16 \pm 0,30$	$0,89 \pm 0,03$
2	$72,8 \pm 1,3$	$154,8 \pm 13,1$	$2,19 \pm 0,19$	$0,42 \pm 0,03$	$0,90 \pm 0,01$
5	$64,3 \pm 1,1$	$77,7 \pm 6,5$	$1,96 \pm 0,06$	$0,19 \pm 0,02$	$0,94 \pm 0,08$
8	$59,3 \pm 1,2$	$18,2 \pm 2,7$	$2,23 \pm 0,20$	$0,0005 \pm 0,0001$	$0,76 \pm 0,05$
11	$53,6 \pm 0,4$	$7,5 \pm 2,3$	$0,88 \pm 0,11$	$0,00008 \pm 0,00001$	$0,97 \pm 0,07$

A inclusão progressiva do TX-100 na solução padrão afeta ligeiramente a temperatura crítica em que o ponto de fusão é estabelecido, como podemos observar na **Fig. 33**.

**Figura 33.** Curvas de DSC das nanofibras de PVA com diferentes concentrações de TX-100 (% em massa) (a) 0, (b) 1, (c) 2, (d) 5, (e) 8 e (f) 11.



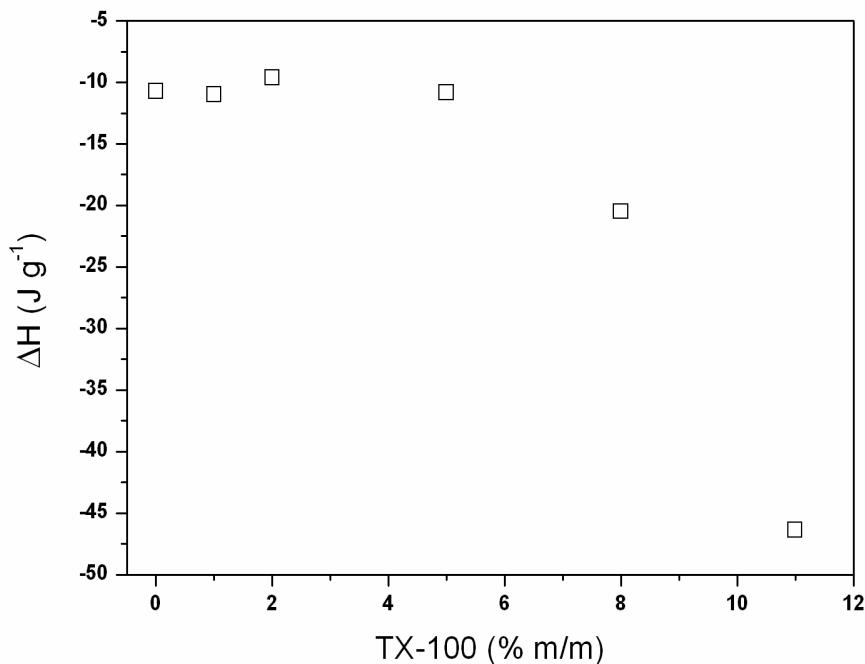
Os resultados indicam que as fibras sintetizadas com maior regularidade estrutural (se comparado com as fibras produzidas por PVA puro) preservam o ponto de fusão do PVA, tipicamente identificado como um agudo pico endotérmico em torno de 222 °C, como descrito na literatura [173, 174].

Com relação à caracterização térmica das fibras de PVA produzidas, é conhecido que mudanças na temperatura de fusão estão associadas à textura e ao estado cristalino das fibras, como consequência da inclusão de um aditivo solúvel durante o processo de eletrofiação. As curvas de DSC mostraram que a temperatura de fusão foi reduzida (com a inclusão progressiva de 0 - 11 % em massa de surfactante), em uma indicação de que as moléculas de TX-100 foram incorporadas à estrutura cristalina do PVA [175, 176].

Em adição, a entalpia de fusão ( $\Delta H$ ) das fibras de PVA produzidas é fortemente dependente da quantidade de surfactante dispersa na solução polimérica.

O valor do  $\Delta H$  aumentou (em módulo) com o incremento da quantidade de TX-100 (Fig. 34) indicando que estruturas mais regulares e homogêneas foram obtidas com a redução da concentração dos grânulos.

**Figura 34.** Entalpia de fusão das fibras como função da concentração de TX-100.



É importante destacar que a homogeneidade das fibras está associada com a elevação no grau cristalino do material sintetizado, obtida a partir da forte interação entre o TX-100 e o PVA durante a eletrodeposição.

### 3.2.4 Considerações finais

Como verificado, fibras livres de defeitos podem ser obtidas a partir da interação entre a matriz de PVA e o surfactante TX-100 (na ordem de 10 % em massa). O aumento na concentração do surfactante disperso na solução de PVA diminuiu progressivamente a quantidade de grânulos e retornou a produção de estruturas com maior qualidade e cristalinidade, a partir da minimização da tensão superficial da solução polimérica e aumento da entalpia de fusão das fibras eletrodepositadas.

## 3.3 Aplicação do PE-b-PEO como surfactante polimérico na minimização de grânulos em fibras de PVA produzidas por eletrofiação

### 3.3.1 Introdução

Como verificado nas Seções 3.1 e 3.2, a introdução de um surfactante minimiza a tensão superficial das soluções poliméricas de PVA no processo de eletrofiação, produzindo fibras livres de defeitos e com menores diâmetros.

Baseado nesses princípios, buscou-se estudar também a influência de concentrações relativas do copolímero dibloco PE-b-PEO como surfactante polimérico na minimização dos grânulos em fibras de PVA produzidas por eletrofiação.

Os resultados confirmaram a eficácia desse copolímero dibloco anfifílico na fase HCP para a produção de estruturas livres de defeitos, adequadas para uso em aplicações tecnológicas.

### 3.3.2 Experimental

O copolímero dibloco PE-b-PEO (50 % PEO), em grânulos, com  $DL50_{PEO}$ (oral, ratos) = 28.000 mg/Kg e  $DL50_{PE}$ (oral, ratos) > 5.000 mg/Kg, massa molar = 920, CMC = 28,8 mg/L a 25 °C (Sigma Aldrich) foi utilizado como surfactante polimérico.

A matriz polimérica padrão de PVA foi preparada da mesma forma que a descrita na Seção 3.1.2. Logo em seguida, a solução padrão de PVA foi estabilizada por 24 h em temperatura ambiente (25 °C) para posterior uso como matriz polimérica nos compósitos PVA / PE-b-PEO.

Quatro diferentes amostras de compósitos PVA / PE-b-PEO foram preparadas a partir da diluição do copolímero na matriz polimérica padrão de PVA. As concentrações de 20 mg/L (0,002 % m/m, abaixo da CMC), de 5 % m/m (na fase BCC) e de 35% m/m (na fase HCP) de PE-b-PEO na solução padrão de PVA foram utilizadas para se verificar o efeito das fases do copolímero na minimização de grânulos nas micro/nanofibras de PVA produzidas por eletrofiação.

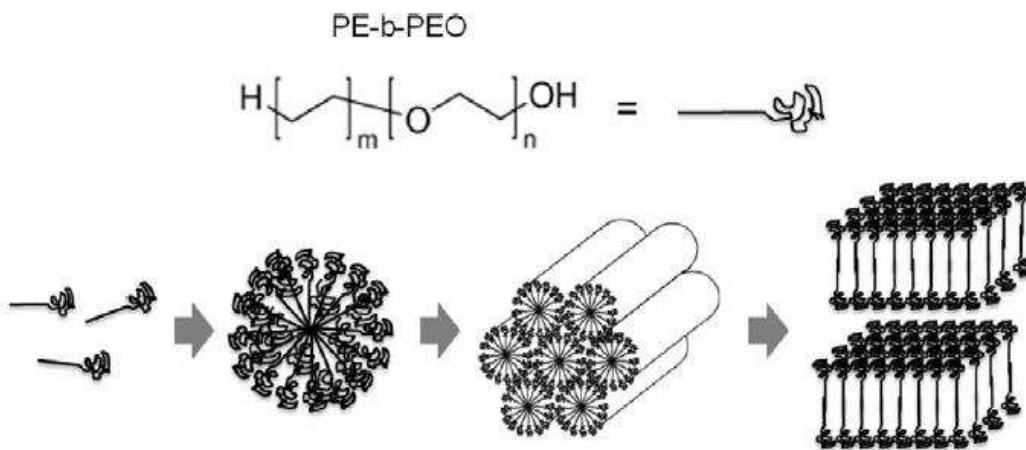
A transição da fase BCC para HCP (em 14 % m/m) e a transição da fase HCP para bicamadas (em 50 % m/m) no PE-b-PEO foram determinadas experimentalmente em trabalho anterior (E. S. Araújo et al.) [177] (**Fig. 35**) pela técnica de Espectroscopia de Impedância Elétrica e estão em conformidade com os valores encontrados na literatura [130].

Esses valores de concentração foram usados como referência para que escolhessemos propositalmente para o nosso trabalho concentrações que nos garantissem que o PE-b-PEO estivesse nas fases monômero, BCC e HCP do copolímero em solução.

Logo em seguida, 5 mL de cada mistura foi introduzida em uma seringa convencional com agulha metálica com capilar de 0,7 mm para o processo de eletrofiação. O processo de

eletrodeposição dos compósitos poliméricos PVA/PE-b-PEO ocorreu da mesma forma descrita na Seção 3.1.2 (compósitos PVA/TX-100).

**Figura 35.** Transições de fase do copolímero dibloco PE-b-PEO [177]: de monômeros para micelas (BCC) (em 28,8 mg/L); da fase micelar para estruturas cilíndricas compactas hexagonalmente (HCP) (em 14 % m/m); e da fase HCP para a fase de bicamadas (em 50 % m/m).



A análise dos dados foi baseada nas estatísticas de dez imagens ( $274,68 \times 205,58 \mu\text{m}^2$ ) independentes obtidas em um MEV (Hitachi TM1000), com ampliação de  $600 \times$ , para cada amostra com crescente aumento da concentração do copolímero. A estatística descritiva das imagens foram realizadas com o software ImageJ.

### 3.3.3 Resultados e discussão

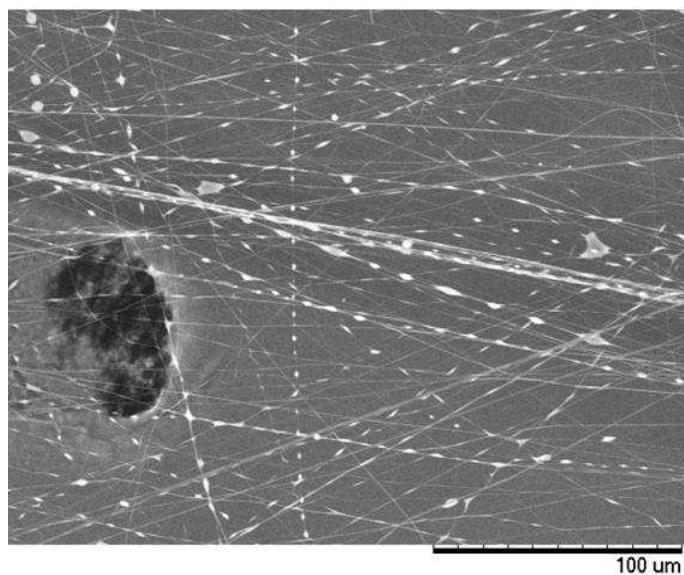
A deposição de fibras irregulares de PVA com a presença de grânulos é estabelecida sem aditivos, mantendo-se constantes os parâmetros envolvidos no processo de eletrofiação, como expectado nos resultados do capítulo anterior (ver **Fig. 29a**). A baixa qualidade das fibras precisa ser contornada com o controle da tensão superficial durante a competição com a força eletrostática na direção do coletor metálico.

Sem o aditivo, foi obtida uma média de 475 grânulos por imagem. Na **Fig. 36**, é mostrada a influência do PE-b-PEO na concentração de 20 mg/L (abaixo da CMC) na produção das fibras. Como podemos verificar, os defeitos ainda aparecem em grande quantidade em toda a rede fibrosa na fase de monômeros. A inclusão do PE-b-PEO na forma monomérica aumentou a quantidade média de defeitos para aproximadamente 705 por imagem. Em contrapartida, esse aumento esteve associado à redução de tamanho dos defeitos,

evidenciando o início do efeito do copolímero como surfactante polimérico na dispersão dos grânulos. No entanto, em concentrações abaixo da CMC não se tem ainda a produção de fibras livres de defeitos, em uma indicação de que em concentrações abaixo da CMC o PE-b-PEO influencia minimamente na tensão superficial das gotículas da solução na saída da agulha no processo de eletrofiação.

Com o aumento da concentração do copolímero em solução, já acima da CMC, uma forte redução na quantidade de grânulos foi obtida (**Tab. 5**), resultando na melhoria da morfologia das fibras eletrodepositadas.

**Figura 36.** MEV das micro/nanofibras de PVA com PE-b-PEO a 20 mg/L (0,002 % m/m), abaixo da CMC.

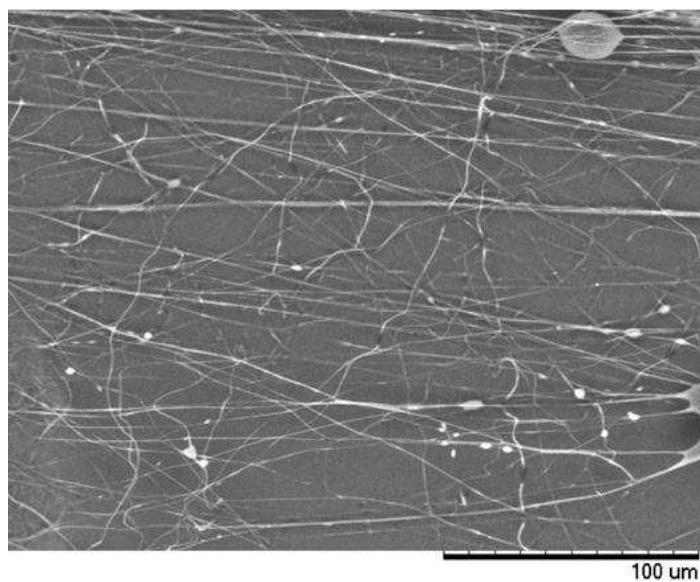


**Tabela 5.** Influência do PE-b-PEO nas propriedades dos grânulos.

PE – b – PEO (% m/m)	# grânulos	área dos grânulos ( $\mu\text{m}^2$ )	fração de grânulos (%)	circularidade (0 – 1)
<b>0</b>	$475.1 \pm 132.4$	$6,7 \pm 1,8$	$5,82 \pm 0,02$	$0,75 \pm 0,08$
<b>0,002</b> <b>(abaixo da CMC)</b>	$705,9 \pm 152,1$	$4,2 \pm 1,2$	$5,23 \pm 0,02$	$0,61 \pm 0,05$
<b>5</b> <b>(fase BCC)</b>	$77,9 \pm 25,4$	$2,7 \pm 0,6$	$0,34 \pm 0,01$	$0,83 \pm 0,06$
<b>35</b> <b>(fase HCP)</b>	~ 0	~ 0	~ 0	–

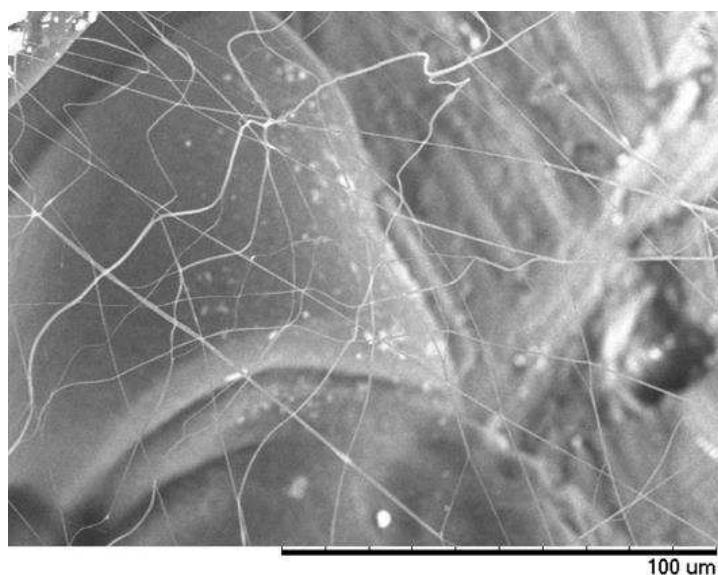
Como indicado na **Fig. 37**, quando a concentração do PE-b-PEO é da ordem de 5 % m/m (acima da CMC e na fase BCC) uma considerável redução na concentração dos grânulos foi observada. A área média desses defeitos também foi reduzida (**Tab. 5**) em comparação com os resultados anteriores.

**Figura 37.** MEV das micro/nanofibras de PVA com PE-b-PEO a 5% m/m.



Os resultados mais interessantes são verificados com as micro/nanofibras produzidas com PE-b-PEO dispersa na fase HCP (ou fase C). Quando o surfactante polimérico foi incluído no hidrogel de PVA numa concentração de 35 % m/m, fios livres de defeitos foram produzidos, como mostrado na **Fig. 38**.

**Figura 38.** MEV das nanofibras de PVA com 35 % m/m de PE-b-PEO.

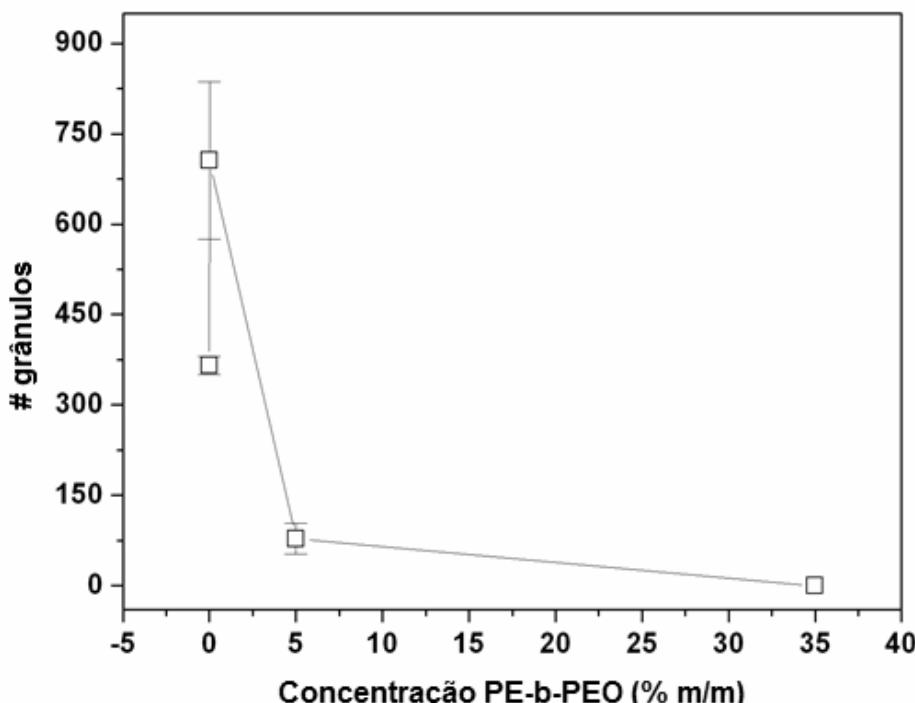


Nesta fase, as moléculas do copolímero em bloco PE-b-PEO se auto-organizam como estruturas nanométricas cilíndricas diretas (ver **Fig. 21b**) alongadas, com as partes apolares (PE) revestidas pelos grupos de PEO (hidratados pela solução aquosa) compondo a superfície dos cilindros. Nessa geometria, se tem uma maior interação entre os grupos polares PEO e as moléculas de PVA, além de fazer com que uma maior fração do solvente seja deslocada para a parede do tubo (i.e. interior da agulha) capilar, com consequente diminuição da tensão superficial da solução na ponta da agulha.

Dessa forma, essa mesofase do PE-b-PEO melhorou o processo de eletrofiação uma vez que enquanto as outras variáveis como pressão e distância entre ponta da agulha e coletor permanecem constantes, a força resultante entre a força elétrica aplicada e a força superficial da solução na saída do capilar metálico, necessária para que o processo ocorra, foi bem maior do que a força resultante inicial (sem adição de PE-b-PEO), com consequente minimização dos defeitos nas fibras produzidas.

Usando um grupo de dez imagens diferentes no MEV, representativas de cada amostra analisada, foi possível verificar que a quantidade média de grânulos foi sensivelmente afetada com a transição do PE-b-PEO de monômeros para concentrações acima da CMC. Como é possível observar na **Fig. 39**, a quantidade de grânulos foi reduzida de centenas para dezenas com a micelização (fase BCC).

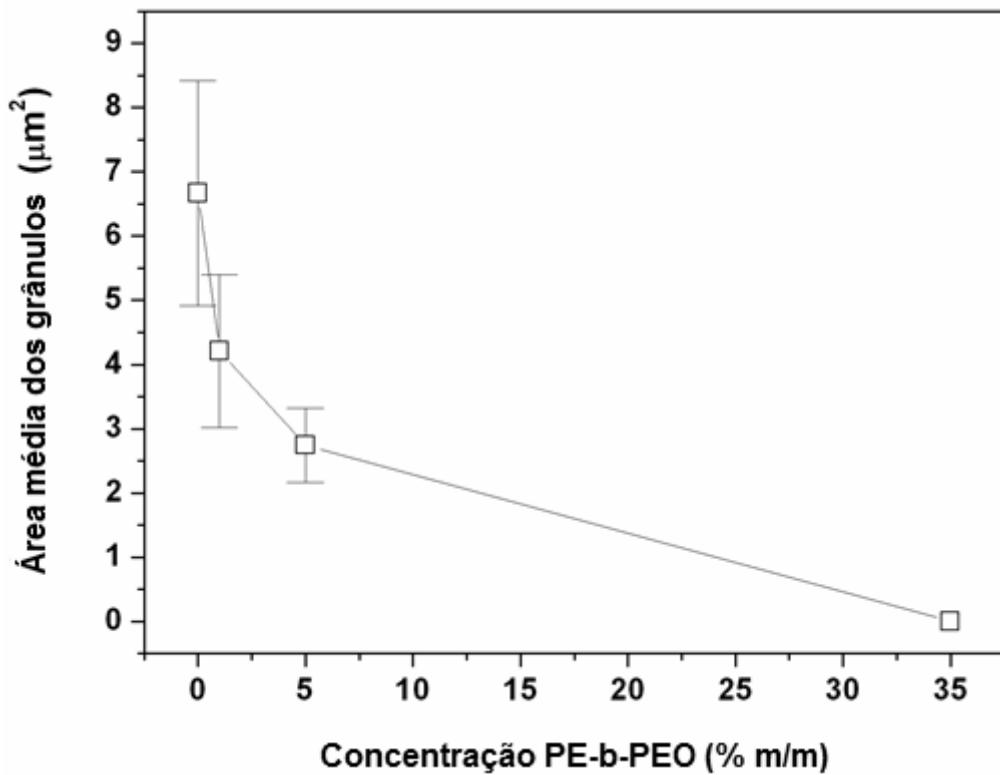
**Figura 39.** Dependência do número médio de grânulos nas nanofibras de PVA como função da concentração de PE-b-PEO.



Contudo, se considerarmos a fase HCP, a quantidade média de grânulos tende a zero (redução por duas ordens de grandeza, se comparado com a quantidade inicial de detectada nas amostras), indicando de que esta fase representa a mais adequada condição de interação PVA/PE-b-PEO aplicada para a produção de fibras de PVA livres de defeitos pela técnica de eletrofiação.

É importante notar que a redução no número de defeitos foi acompanhada pela redução na área média dos grânulos (como mostrado na **Fig. 40**), o que evidencia e confirma a eficiência de interação entre o PVA e o surfactante polimérico na forma de micelas e em agregados mais complexos induzidos pela elevação da concentração do copolímero.

**Figura 40.** Dependência da área média dos grânulos nas nanofibras como função da concentração de PE-b-PEO.



Os resultados relacionados à influência do PE-b-PEO na distribuição dos defeitos (dimensão e quantidade) encontram-se sumarizados na **Tab. 5**.

Neste sentido, é possível confirmar a partir deste estudo que a inclusão de surfactantes poliméricos do tipo copolímero dibloco anfifílico na fase HCP em soluções poliméricas pode contribuir com a produção de micro/nanofibras estruturalmente uniformes e livres de defeitos.

Os resultados obtidos neste trabalho representam um importante passo para a definição de estruturas adequadas para aplicações tecnológicas a partir de micro/nanofibras de PVA produzidas por eletrofiação.

### 3.3.4 Considerações finais

Nesse estudo, verificou-se a influência do nível de agregação do copolímero dibloco PE-b-PEO na uniformidade de fibras de PVA produzidas por eletrofiação. Quando o copolímero é aplicado como surfactante polimérico, é possível verificar que fibras de PVA livres de defeitos do tipo grânulos são obtidas na presença do PE-b-PEO na fase HCP.

Em uma visão geral, a conjunção entre a ciência básica e a aplicada desse copolímero introduz importantes aspectos relativos ao melhoramento estrutural de sistemas poliméricos já existentes e às futuras tecnologias a serem desenvolvidos utilizando estes materiais híbridos.

# CAPÍTULO 4

## APLICAÇÕES FARMACOLÓGICAS DAS FIBRAS DE POLÍMERO ENTÉRICO

Este capítulo descreve as aplicações farmacológicas das fibras do polímero entérico Eudragit® L-100 produzidas por eletrofiação.

Em um primeiro momento será apresentada a aplicação potencial desses sistemas como carreadores de fármacos em sistemas de liberação controlada. Em adição, a incorporação do PE-b-PEO nas fibras de Eudragit® L-100 é descrita como um importante fator retardante da cinética de liberação do fármaco de teste em meio básico.

Na segunda parte do capítulo, será discutida a aplicação das fibras de Eudragit® L-100 na preparação de um compósito com ação bactericida a partir do encapsulamento das moléculas de ácido úsnico nas fibras do polímero entérico. Os resultados mostraram a eficiência do compósito contra isolados bacterianos de *Staphylococcus spp.*

### 4.1 Fibras eletrodepositadas de polímero entérico para aplicações em sistemas de liberação controlada de fármacos

#### 4.1.1 Introdução

O desenvolvimento de novas estratégias para encapsulação e liberação controlada de fármacos pode ser considerado uma importante ferramenta para o controle da ação local de fármacos no organismo humano. Tipicamente, o tempo de passagem do fluido e o valor do pH no trato gastrointestinal humano apresentam um comportamento padrão, com crescente valor do pH a partir do estômago (pH de 1,0 - 2,0 e tempo de passagem de 2h), passando pelo intestino delgado (no duodeno, com pH 4,5) e chegando ao jejuno e ao íleo (pequena parte do intestino delgado, com pH 6,4). O pH do meio ainda atinge um valor de 7,0 no cólon [178].

A protonação (reação química que ocorre quando um próton ( $H^+$ ) se liga a um átomo, uma molécula ou um íon) induzida pelo baixo pH no estômago aumenta a solubilidade do fármaco enquanto maiores valores de pH induzem a desprotonação (quando o átomo perde um próton  $H^+$ ) e, como consequência, diminui a solubilidade do fármaco no intestino. A encapsulação de substâncias ativas usando polímeros entéricos como carreadores contribui com um comportamento reverso: em baixos valores de pH, a matriz entérica é insolúvel no meio e impermeabiliza a substância, minimizando a sua solubilidade. Aumentando o pH, o

polímero entérico tem alta solubilidade no meio enquanto a solubilidade do fármaco tende a reduzir. Como consequência, o perfil de liberação de substâncias ativas encapsuladas por esses polímeros tendem a ser pH-dependentes [179].

Sistemas de liberação controlada de fármacos atuando no cólon [180] tendem a aumentar a eficácia de fármacos, uma vez que menores quantidades relativas à dose inicial são solubilizadas antes do local de ação. Como consequência, os efeitos colaterais tipicamente associados com a administração oral dessas substâncias ativas são minimizados. Por fim, a proteção de fármacos por matrizes poliméricas pH-dependentes contribui com a liberação controlada de fármacos em regiões específicas do corpo humano. O Eudragit® L-100 é um conhecido polímero entérico composto por blocos de copolímero de ácido metacrílico e metil metacrilato, na razão ácido/éster de 1:1, insolúvel em meios ácidos e solúvel a partir de pH = 6.

Como aplicações da encapsulação de materiais específicos no núcleo de polímeros entéricos, podemos citar a liberação controlada de insulina [181], o tratamento de doenças tais como inflamações e úlceras no cólon [182] e aplicações em formulações medicamentosas para atuarem no intestino, na região bucal, sublingual, transdermal e vaginal.

Nesta direção, o controle do grau de difusão de fármacos em pH específicos caracteriza um importante parâmetro para o controle da ação de drogas no organismo. O nosso grupo de pesquisa tem explorado os mecanismos básicos de ação do Eudragit® L-100 [183], bem como caracterizado a liberação controlada de metronidazol encapsulados nesse polímero entérico [184].

Baseado nos conceitos do uso de fibras eletrodepositadas para o uso como carreadores de fármacos *in vivo*, aplicações com o fármaco claritromicina têm sido reportadas na literatura: a melhoria na bioatividade do fármaco foi associada com a minimização de efeitos colaterais como náusea, diarréia e cólicas abdominais.

Nessas aplicações, as nanofibras foram processadas na forma de tabletes para administração oral.

Como descrito nos capítulos anteriores, a incorporação de princípios ativos em nanofibras sintetizadas por eletrofiação fornecem carreadores com elevada razão área superficial / volume em comparação com os carreadores usuais, o que contribui diretamente com o aumento da absorção de fármacos com caráter hidrofóbico [185].

D. -G. Yu et al. [186] mostraram que fibras de Eudragit produzidas por eletrofiação são materiais tipicamente planos com uma desvantagem característica para aplicações em liberação controlada, uma vez que essas estruturas fazem com que um fármaco encapsulado

seja liberado rapidamente no meio. Este problema é normalmente contornado quando o fármaco é disposto em uma configuração fibrosa do tipo casca núcleo, usando a técnica de eletrofiação coaxial.

Por outro lado, a incorporação de fármacos em sistemas do tipo micelares [187], tais como micelas poliméricas de copolímeros em bloco de poli(etileno)-b-poli(óxido de etileno) (ou PE-b-PEO), fornece a encapsulação adequada de substâncias fracamente solúveis em água, no núcleo polimérico dessas nanoestruturas. Em adição, ligações de hidrogênio presentes nas moléculas de PEO melhoram a proteção da droga contra a adsorção de proteínas e adesão celular [188]. Esse efeito faz com que o tempo de circulação do fármaco no sangue aumente, com consequente ação prolongada do princípio ativo no organismo [189].

Neste capítulo, exploramos um método não-convencional para a produção de fibras por eletrofiação com aplicações em liberação controlada de fármacos. Usando o simples processo de eletrofiação a partir de uma solução do polímero entérico Eudragit® L-100, estudamos a influência da interação dessas soluções com o copolímero em bloco PE-b-PEO (surfactante polimérico) com o objetivo de produzir de micro / nanofibras, capazes de retardar a liberação de fármacos em meios com o pH básico.

A interação entre diferentes parâmetros importantes envolvidos na síntese dessas estruturas, como a concentração do surfactante, concentração do polímero entérico e concentração do fármaco, introduzem uma dificuldade adicional no estudo exploratório das respostas relacionadas ao perfil de liberação das substâncias incorporadas nessas matrizes poliméricas.

Para superar tal limitação, o planejamento fatorial dos experimentos tem sido considerado, uma vez que se caracteriza como uma habitual ferramenta estatística para identificação dos parâmetros mais relevantes em uma resposta de um dado sistema ou processo [190].

Usando este procedimento estatístico, elaboramos um estudo quimiométrico onde esses três parâmetros foram simultaneamente variados com o objetivo de otimizar a liberação controlada de fármacos em pH específico.

A concentração de Eudragit® L-100 foi variada com o objetivo de estimar a influência desse parâmetro no diâmetro das fibras eletrodepositadas enquanto variações na concentração de um fármaco padrão (nifedipino) e do aditivo (surfactante polimérico PE-b-PEO) foram consideradas com a finalidade de analisar o perfil de liberação dos fármacos *in vitro* em pH 6,8 (fluido gastrointestinal).

Nesse contexto, a importância de um parâmetro específico é dada pela média das diferenças entre os meios de resposta das amostras preparadas utilizando a maior e a menor concentração estabelecida para cada parâmetro. Se a concentração do fármaco liberada no meio for considerada como resposta a ser analisada, um valor positivo na importância do fator revela que o parâmetro em análise fornece uma liberação rápida do fármaco em intervalos fixos de tempo. Usando o valor de importância do fator, pode-se definir a ordem de importância relativa de cada um dos parâmetros de acordo com o seu potencial no controle do tempo característico para a libertação do fármaco.

Para facilitar a descrição dos sistemas estudados, cada amostra foi identificada como uma composição de letras de cada componente, em que a presença de cada um caracteriza o valor máximo correspondente do parâmetro, como por exemplo, a amostra ENP, que é preparada com as concentrações máximas de Eudragit® L-100 (E), nifedipino (N) e PE-b-PEO (P). A amostra com as quantidades mínimas de cada componente foi representada pela letra I.

A importância do fator [Eudragit L-100] (definido na Eq. 13) caracteriza a diferença da média da quantidade de fármaco liberada em formulações em que o máximo e mínimo de Eudragit® L-100 são considerados:

$$[\text{Eudragit L-100}] = \frac{1}{4}(E+EN+ENP+EP) - \frac{1}{4}(I+P+N+NP) \quad (\text{Eq. 13})$$

A importância do fator [PE-b-PEO] no controle da liberação controlado do fármaco é dada por:

$$[\text{PE-b-PEO}] = \frac{1}{4}(P+NP+ENP+EP) - \frac{1}{4}(I+E+N+EN) \quad (\text{Eq. 14})$$

Enquanto, a importância do parâmetro [nifedipino] é dada por:

$$[\text{Nifedipino}] = \frac{1}{4}(NP+ENP+NE+N) - \frac{1}{4}(I+E+P+EP) \quad (\text{Eq. 15})$$

#### 4.1.2 Experimental

Eudragit® L-100 (Evonik), PE-b-PEO com 20 % PEO ((-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>80</sub>-(-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>20</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH), PM=875 g/mol (Sigma Aldrich) e o fármaco nifedipino (Vetec) foram usados como recebidos.

Soluções alcoólicas de Eudragit® L-100 foram preparadas a partir da inclusão de (0,9 - 1,6) g do polímero entérico em 6 mL de álcool etílico a 25° C e agitadas mecanicamente até a completa dispersão do polímero. Para a análise estatística, as medições foram estabelecidas em triplicatas (independentes) para cada amostra.

Os experimentos de eletrofiação foram conduzidos utilizando a mesma metodologia descrita na Seção 3.1.2. A incorporação da molécula de prova (nifedipino, 100 e 200 mg) na matriz polimérica resultante foi estabelecida a partir da completa solubilização do fármaco na solução alcoólica de Eudragit® L-100.

As microscopias das fibras resultantes foram obtidas a partir de dois microscópios eletrônicos de varredura (Hitachi TM 1000 e Vega 3XM Tescan).

Para estudar a distribuição de diâmetros das fibras nas amostras, foram analisadas nove microscopias independentes para cada concentração relativa de Eudragit® L-100. A análise estatística descritiva e inferencial dos dados amostrais, como diâmetro médio das fibras e respectivo desvio padrão, foram obtidas a partir do software Minitab 14 e ImageJ.

Análises por FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) foram estabelecidas a partir de um aparelho FTIR Prestige 21 (Shimadzu), para confirmar a interação entre os parâmetros destacados anteriormente, nas fibras resultantes.

As propriedades térmicas (ponto de fusão e entalpia de fusão) das amostras foram exploradas por DSC em um aparelho DSC Shimadzu DSC-60 (Shimadzu), a fim de analisar a influência dos aditivos na resposta do sistema. Os cadiños de alumínio utilizados nos experimentos de DSC foram preparados com 1 mg de cada amostra. O fluxo de calor do processo foi estabelecido a uma taxa constante de 10 °C min<sup>-1</sup> e o fluxo de nitrogênio (N<sub>2</sub>) a 50 ml min<sup>-1</sup>, na faixa de temperatura de 25 °C a 280 °C.

Difração de raios X por pó (Powder X-Ray Diffraction (PXRD) foi estabelecida a partir de um aparelho DRX Equinox 1000 (Inel).

Os experimentos de liberação controlada in vitro foram estabelecidos com 80 mL de um fluido gastrointestinal simulado (GIT) (de acordo com os procedimentos estabelecidos na USP 36 - Reagentes), onde 50 mg de cada material fibroso resultante da eletrofiação (a partir das variações nos parâmetros estudados) foi disperso na solução sobre uma agitação de 90 rpm, para que a cinética de liberação pudesse ocorrer.

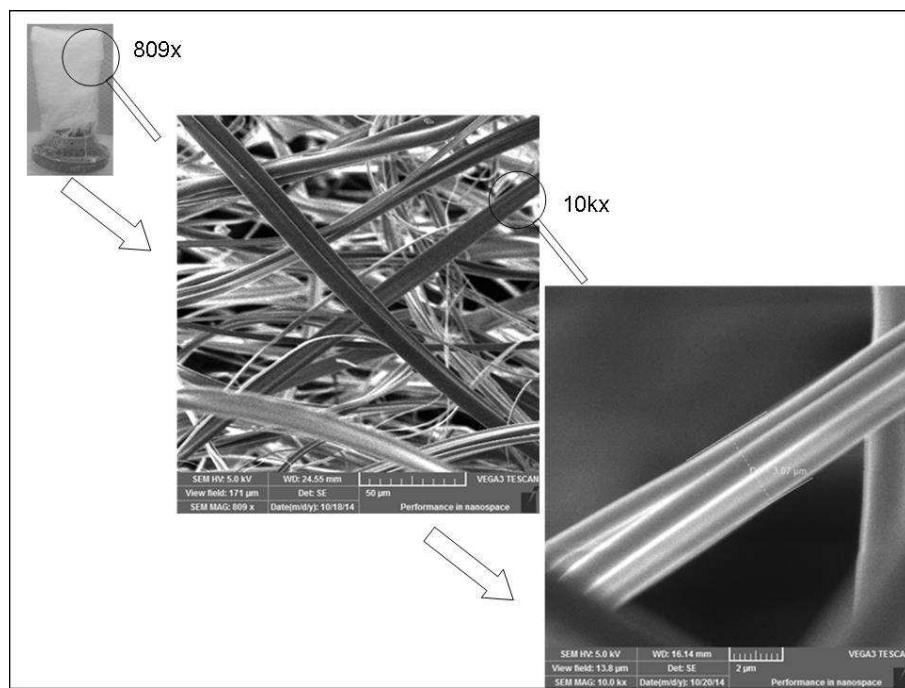
Os perfis de cinética de liberação do nifedipino foram obtidos através das medidas de absorbância em função do tempo, convertidas em concentração a partir da curva de calibração do fármaco (relação linear, Absorbância versus concentração), tendo como base o pico característico de absorção da droga (238 nm). Nesse experimento, foram analisadas alíquotas

da solução em intervalos fixos de tempo, usando um espectrofotômetro Hach DR 5000 UV-vis (Hach, EUA).

#### 4.1.3 Resultados e discussão

Em uma primeira análise, é importante destacar a ausência de grânulos nas fibras de Eudragit® L-100 produzidas nas diferentes concentrações analisadas. Em adição, o diâmetro das fibras dependeu fortemente da concentração do polímero entérico. A morfologia das fibras resultantes é mostrada na **Fig. 41**.

**Figura 41.** Morfologia das fibras de Eudragit® L-100 eletrodepositadas. Imagens obtidas por MEV.

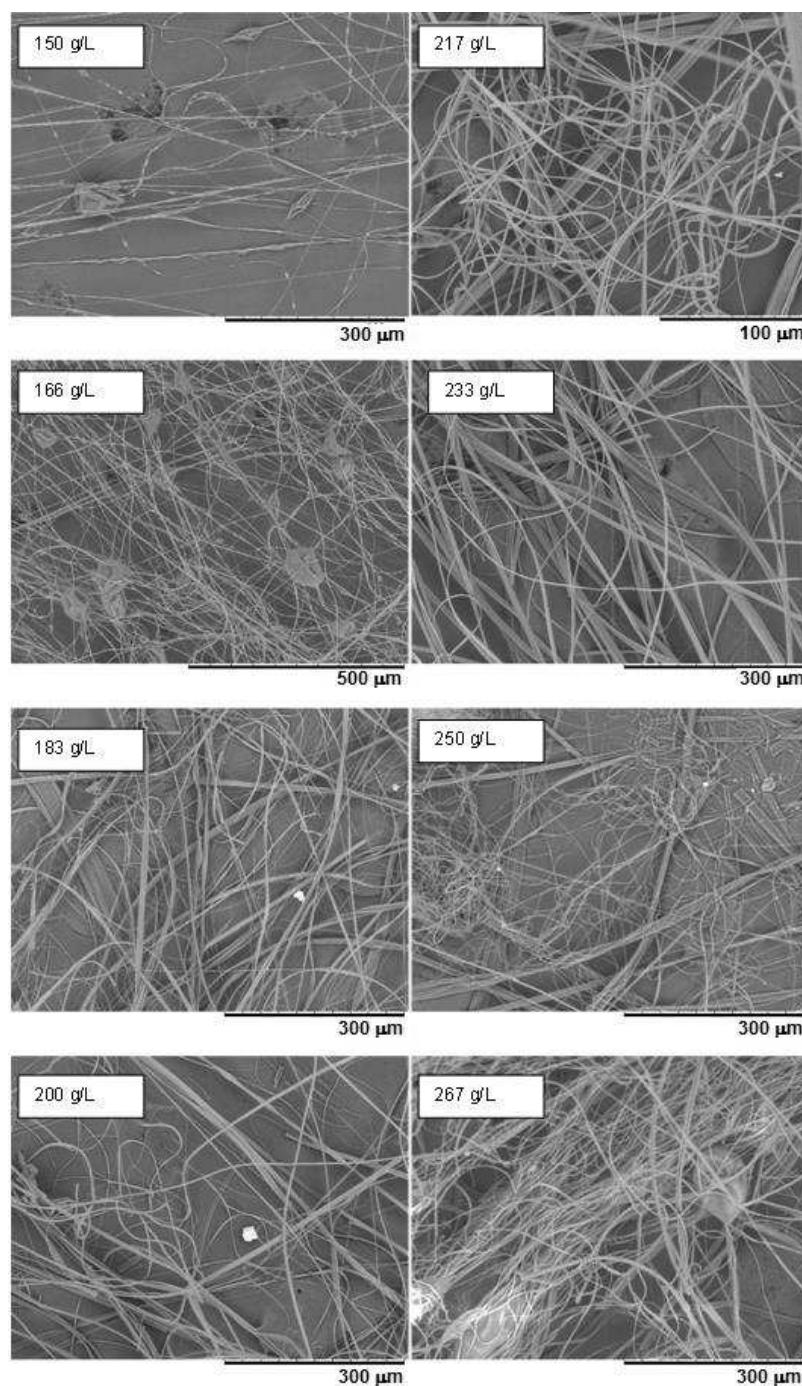


##### 4.1.3.1 Influência da concentração de Eudragit® L-100 sobre o diâmetro das fibras produzidas

A influência da concentração relativa de Eudragit® L-100 sobre o diâmetro das fibras resultantes foi analisada em termos do diâmetro das fibras obtidas nas imagens por MEV, conforme mostrado na **Fig. 42**. Como se pode verificar, o aumento da concentração relativa do polímero entérico induziu um aumento progressivo do diâmetro das fibras resultantes. A dependência do diâmetro das fibras resultantes com as concentrações do veículo polimérico apresentou um comportamento interessante, como indicado na **Fig. 43**. A presença de dois

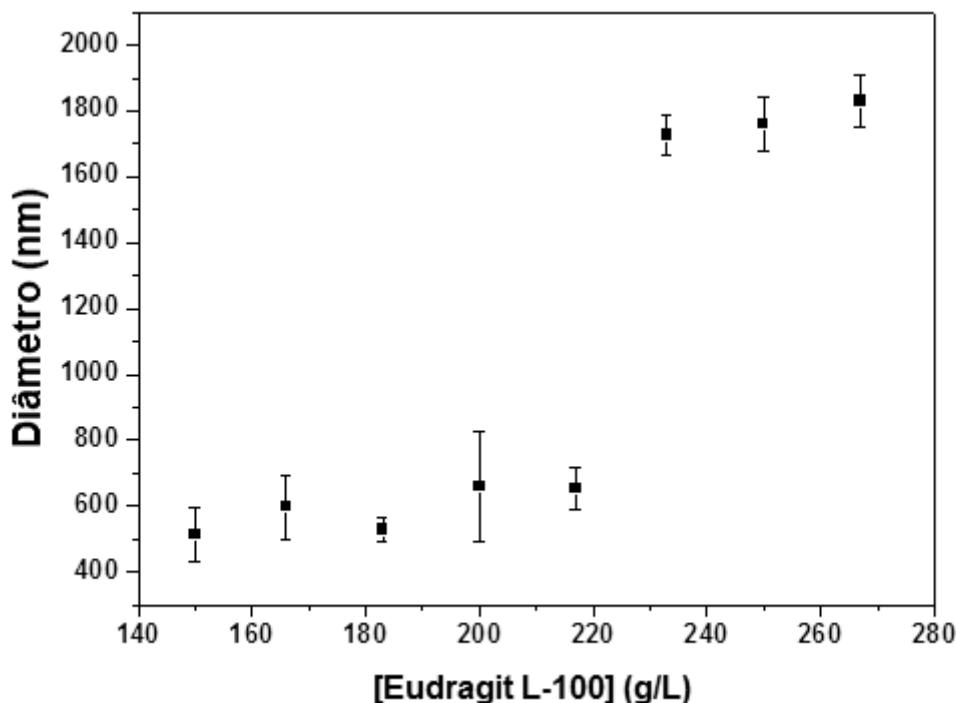
diferentes platôs obtidos nas medidas de diâmetro pode ser considerada como a indicação de que uma típica transição no diâmetro médio das fibras ocorreu com o aumento da concentração de Eudragit® L-100: nas baixas concentrações do polímero entérico ( $C < 220$  g/L), próximo a concentração de solubilização do Eudragit® L-100 em etanol (120 g/L) indicada pelo fabricante, pode ser observada uma invariância típica do diâmetro das fibras (diâmetro médio na ordem de 500 nm).

**Figura 42.** MEV das fibras de Eudragit® L-100 como função da concentração do polímero (na faixa de 150 g/L a 267 g/L).



Na faixa de concentrações do polímero entérico em solução denominada como alta, C > 230 g/L (aproximadamente duas vezes maior que a indicada pelo fornecedor para solubilizar o polímero entérico), um novo patamar de medidas foi atingido e o diâmetro de fibras tendeu a um valor da ordem de três vezes o diâmetro inicial (1,7 µm).

**Figura 43.** Dependência do diâmetro das fibras com a concentração de Eudragit® L-100.



#### 4.1.3.2 Estrutura das fibras eletrodepositadas

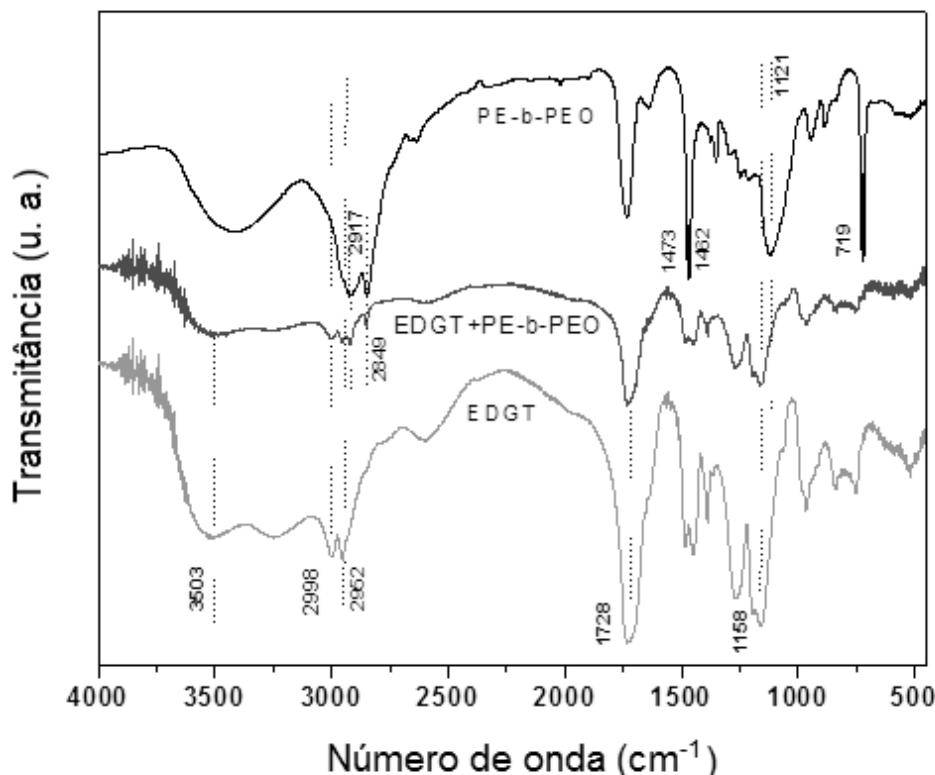
Os espectros de FTIR para o PE-b-PEO puro, para as fibras eletrodepositadas de Eudragit® L-100 e de Eudragit L-100 / PE-b-PEO são mostrados na **Fig. 44**.

Bandas características do poli (etileno) foram atribuídas aos modos de vibração de estiramento assimétrico/simétrico do CH<sub>2</sub> (2917/2849) cm<sup>-1</sup>; aos modos de vibração de flexão do CH<sub>2</sub> em 1473/1462 cm<sup>-1</sup> e ao modo de vibração do CH<sub>2</sub> em 719 cm<sup>-1</sup> [191]. Grupos PEO são caracterizados por modos de vibração de estiramento de COC em 1121 cm<sup>-1</sup> e vibração de estiramento do OH em 3400 cm<sup>-1</sup>.

As bandas características das fibras de Eudragit® L-100 por eletrofiação são em 3503 cm<sup>-1</sup> (atribuído a forma livre do ácido carboxílico) [192], em 2998 cm<sup>-1</sup> (vibração do CH<sub>x</sub>) [193], em 1728 cm<sup>-1</sup> (vibração dos dímeros do éster carboxílico) e das vibrações do éster em 1158 cm<sup>-1</sup> [192].

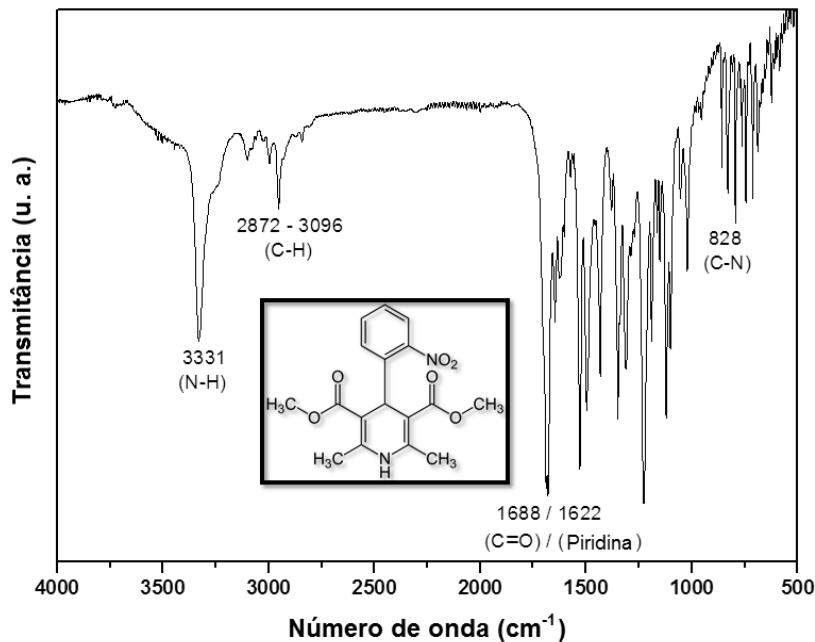
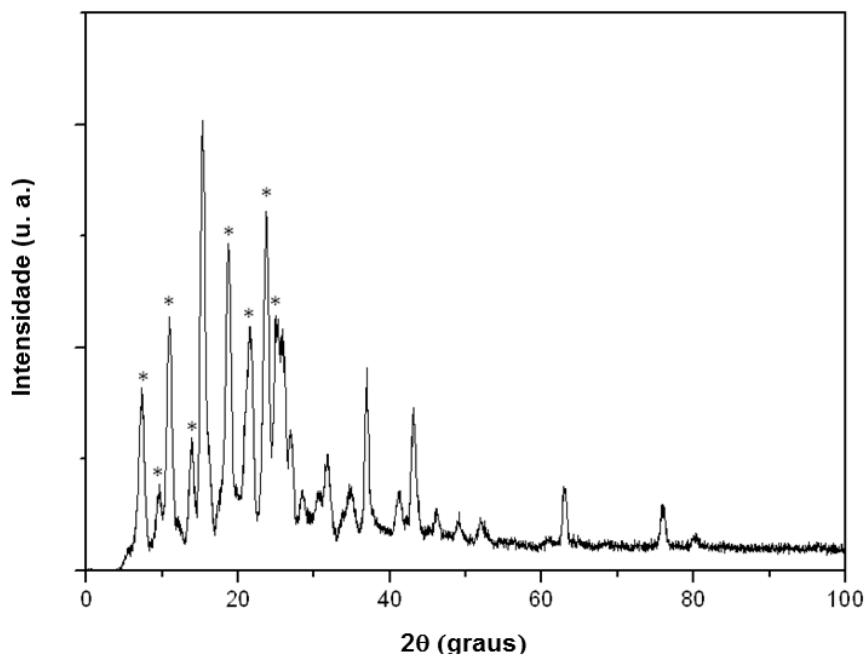
A incorporação de PE-b-PEO nas fibras resultantes de Eudragit® L-100 / PE-b-PEO pode ser detectada a partir da presença de bandas adicionais no espectro de FTIR das fibras híbridas, tais como em 2917 e 2849 cm<sup>-1</sup> (como ocorre no PE-b-PEO puro), devido ao razoável grau de dispersão de blocos de copolímero ao longo das fibras produzidas.

**Figura 44.** Espectro de FTIR do PE-b-PEO e das fibras de Eudragit L-100 (EDGT) e Eudragit® L-100+PE-b-PEO (EDGT+PE-b-PEO) produzidas por eletrofiação, com indicação dos principais picos.



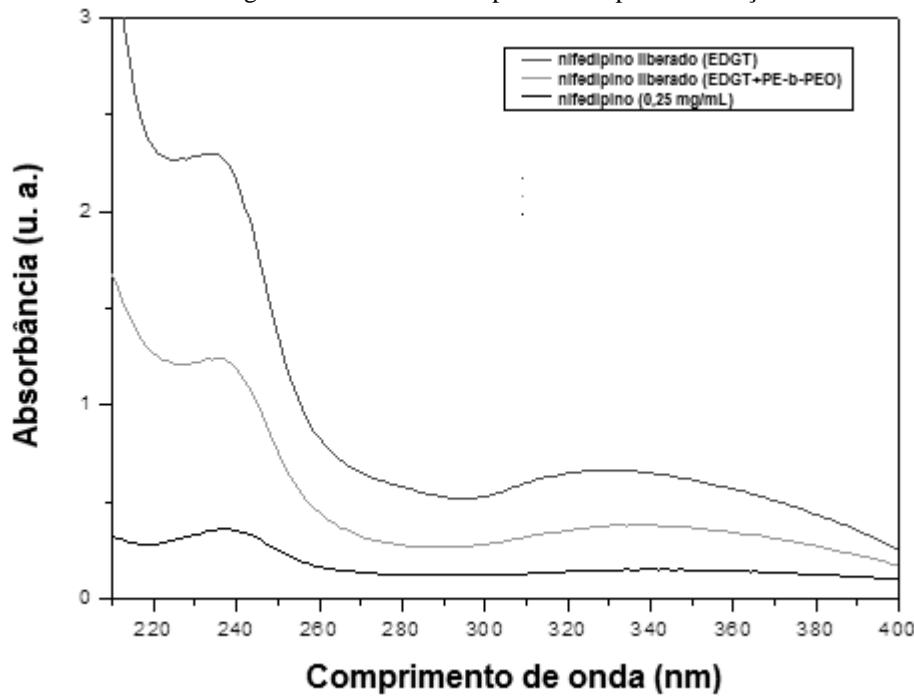
A estrutura do fármaco encapsulado (nifedipino) encontra-se detalhada no FTIR da **Fig. 45**. Os grupos característicos da molécula (indicados na figura) estão presentes no espectro [194, 195], em uma indicação de que as moléculas do fármaco são preservadas durante a preparação das fibras por eletrofiação.

O padrão de PXRD do nifedipino puro exibe picos agudos nos ângulos de espalhamento 2θ de 7,3, 9,6, 10,9, 13,8, 18,6, 21,4, 23,7 e 26,8 [194, 196] (como mostrado na **Fig. 46**), que caracteriza o uso de nifedipino cristalino no processo de encapsulamento na eletrofiação. O grau de encapsulamento e integridade do fármaco após sua saída da matriz polimérica híbrida foram analisados a partir da comparação do espectro de UV-vis das moléculas livres dispersas no fluido GIT simulado e após a liberação controlada do fármaco a partir das fibras.

**Figura 45.** Espectro de FTIR do nifedipino puro.**Figura 46.** Difratograma de raios-X do nifedipino puro com indicação da fase principal por (\*).

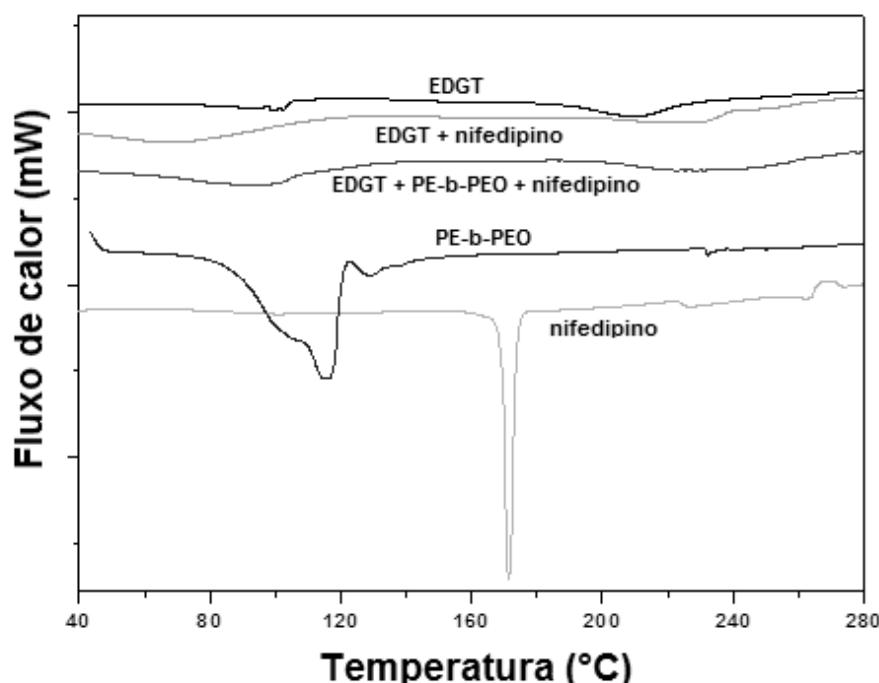
Como é possível observar na **Fig. 47**, o nifedipino resultante do processo de liberação controlada apresenta picos de absorbância equivalentes em comparação com o nifedipino puro cristalino solúvel no fluido GIT, em uma forte evidência de que o encapsulamento preserva a estrutura química do fármaco e de que a influência da luz (fotodegradação do fármaco) pode ser considerada desprezível.

**Figura 47.** Espectro de UV-vis do nifedipino puro e do nifedipino liberado das fibras de Eudragit® L-100 e Eudragit® L-100+PE-b-PEO produzidas por eletrofiação.



As curvas de DSC do PE-b-PEO, do nifedipino puro, do Eudragit® L-100 e das fibras eletrodepositadas de Eudragit® L-100+nifedipino e Eudragit® L-100+PE-b-PEO+nifedipino, são mostrados na **Fig. 48**.

**Figura 48.** Curvas de DSC do Eudragit® L-100, PE-b-PEO, EDGT+Nifedipino, EDGT+PE-b-PEO+Nifedipino e nifedipino puro.



Conforme relatado na literatura [197, 198], um pico endotérmico característico do Eudragit® L-100 a 210 °C foi atribuído à perda de água devido à formação de anidrido [194]. Já o pico agudo em 171,3 °C, (mostrado na **Fig. 48**) [199], está relacionado a assinatura típica do ponto de fusão do nifedipino puro. A incorporação do nifedipino e do PE-b-PEO na estrutura das fibras eletrodepositadas de Eudragit® L-100 promove uma ligeira mudança na temperatura característica de fusão e um pico endotérmico mais largo para o material resultante.

Outra observação importante é o desaparecimento dos picos que representam a temperatura de fusão do PE-b-PEO e do nifedipino nos compósitos EDGT + nifedipino e EDGT + PE-b-PEO + nifedipino, em uma indicação de que o fármaco e o copolímero em bloco foram encapsulados pela matriz entérica.

#### 4.1.3.3 Análise da cinética de liberação do fármaco

A cinética de liberação controlada do nifedipino, a partir das fibras produzidas por eletrofiação, foi explorada na presença e na ausência do aditivo retardante (PE-b-PEO).

Como se pode verificar na **Fig. 49**, a introdução do PE-b-PEO nas fibras afeta fortemente a cinética de liberação do nifedipino, permitindo uma liberação prolongada do fármaco em comparação com o perfil de liberação a partir das fibras produzidas sem o copolímero em bloco, em pH 6,8.

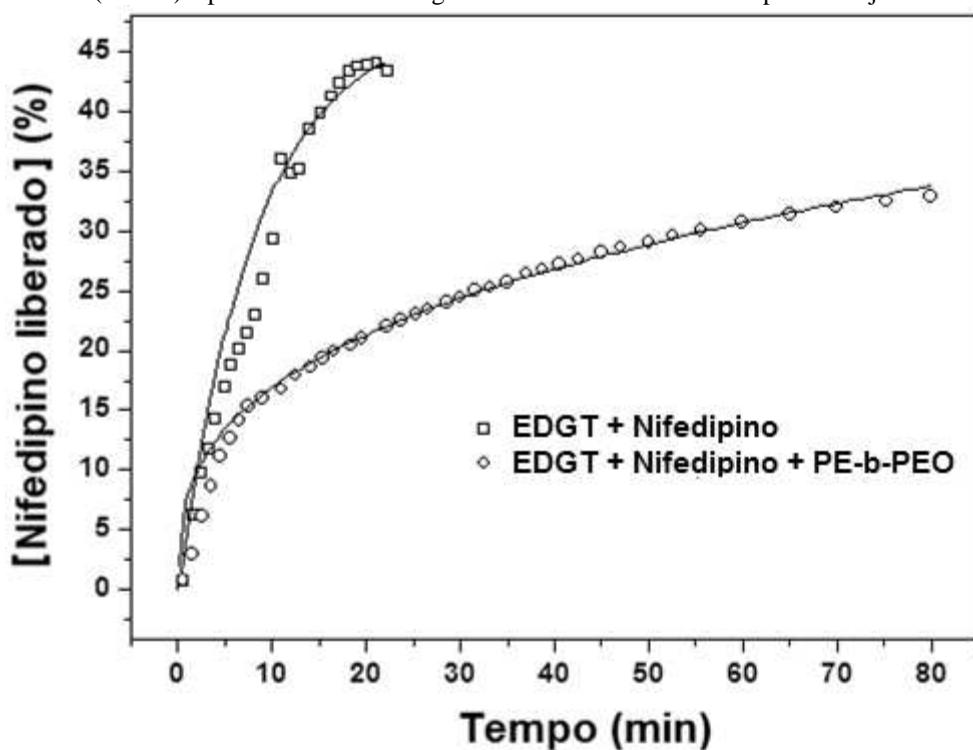
De acordo com K. Kosmidis et al. [200], evidentes alterações no perfil de liberação de um fármaco podem ser induzidas pela mudança na geometria da matriz e pela difusão do fármaco. Consequentemente, a modelagem matemática do processo de liberação também se altera. Nesse contexto, a cinética de liberação a partir de matrizes cilíndricas (como é o caso das micro/nanofibras de Eudragit® L-100) é convenientemente descrita pela função de Weibull, dada pela Eq. 16:

$$M_t / M_\infty = 1 - \exp(-at^b) \quad (\text{Eq. 16}),$$

onde a representa um parâmetro de escala relativo à dependência do tempo e b representa a progressão da curva de dissolução. A modelagem (linha contínua, na **Fig. 49**) dos dados experimentais de liberação (representados por retângulos) do fármaco de teste, a partir das fibras de Eudragit® L-100, usando a Eq. 4 retornou um valor de b=1. Este resultado garante um ajuste tipicamente exponencial para o perfil de liberação do nifedipino, como consequência da liberação rápida do fármaco no meio GIT simulado.

Em contrapartida, a introdução do PE-b-PEO na matriz cilíndrica de polímero entérico modifica a velocidade de transferência do fármaco no meio, ao ponto que a modelagem do perfil de liberação também é fortemente alterada. Nessa nova configuração, os dados experimentais são melhores ajustados a partir de uma típica lei de potência  $M_t / M_\infty = kt^n$  (modelo de Korsmeyer-Peppas) com um valor de  $n=0,3$ . A linha contínua seguindo os valores obtidos em laboratório (Fig. 49) indica uma boa concordância entre os dados experimentais e o ajuste proposto.

**Figura 49.** Comparação dos perfis de liberação do nifedipino encapsulado pelas fibras de Eudragit® L-100 (EDGT) e pelas fibras de Eudragit® L-100+PE-b-PEO com respectivos ajustes.



A incorporação do nifedipino no núcleo de micelas poliméricas de PE-b-PEO criou um nanoambiente hidrófobo disperso na matriz de Eudragit® L-100, o que garante uma distribuição mais homogênea da droga na matriz entérica. Este processo contribui com uma difusão mais homogênea da droga ao longo das fibras e com a subsequente ação prolongada durante a liberação controlada do fármaco.

Considerando que os 6 mL de solução utilizados na eletrofiação produzem 259,2 mg de fibras e que 49,6 mg de nifedipino são efetivamente encapsulados na matriz de Eudragit® L-100, pode-se estabelecer que a concentração relativa do fármaco por fibra é de 19,1 % em massa. Após a liberação controlada do fármaco em fluido GIT, uma concentração de 51,9

$\mu\text{g/mL}$  é atingida após 20 minutos (ausência de PE-b-PEO), o que corresponde a 43,3 % de fármaco liberado na solução durante os minutos iniciais do processo.

#### 4.1.3.4 Influência dos aditivos, do polímero entérico e do fármaco na liberação controlada a partir das fibras produzidas por eletrofiação

A partir dos resultados obtidos anteriormente, foram analisados dois níveis diferentes de diâmetro das fibras eletrodepositadas de Eudragit® L-100 (baixo ( $C < 220 \text{ g/L}$ ) e alto ( $C > 230 \text{ g/L}$ )) em associação com a presença/ausência de retardante ( copolímero em bloco PE-b-PEO) e a concentração do fármaco (concentração baixa e alta de nifedipino).

Usando os níveis extremos das três variáveis independentes, preparou-se grupos de oito amostras e verificou-se a potencial aplicação desses sistemas em liberação controlada de fármacos, a partir das medidas de absorbância a 238 nm (pico característico do nifedipino) após 10 minutos (uma vez que a mudança nos perfis de liberação é evidente a partir desse tempo) de imersão das fibras produzidas no fluido simulado GIT (pH 6,8). Nesse sentido, se pretendia avaliar o nível de importância dos parâmetros e de suas combinações na liberação do nifedipino. É importante deixar claro que essa medida poderia ser estabelecida em um  $t > 10 \text{ min}$  (em toda a faixa de tempo estudada), no qual o nível de importância de cada parâmetro e de suas combinações se mantém, mas com valores de importância maiores (em módulo), seguindo o perfil de liberação do fármaco nos dois sistemas estudados (**Fig. 49**).

Utilizando a curva de calibração do nifedipino (aplicação da lei de Beer-Lambert), os dados de absorbância foram convertidos em concentração relativa de nifedipino liberada na solução. Considerando o mesmo tempo de liberação em todos os sistemas, o grau de encapsulamento do fármaco pode ser estimado a partir da comparação entre as concentrações de nifedipino liberadas em solução, como uma resposta às diferentes condições de preparação.

A **Tab. 6** mostra as concentrações de nifedipino liberadas (em  $\mu\text{g/mL}$ ), em função das diferentes combinações dos parâmetros (Eudragit® L-100, Nifedipino e PE-b-PEO). Como esperado, a concentração mais elevada de nifedipino liberada (80,3  $\mu\text{g/mL}$ ) em solução é verificada na maior concentração de nifedipino (200 mg, amostra N - baixa concentração de Eudragit e ausência de PE-b-PEO) utilizada no estudo quimiométrico.

Em compensação, a associação da maior concentração de nifedipino com os níveis altos de Eudragit® L-100 (230 mg/mL) e de PE-b-PEO (100 mg) reduzem a concentração de fármaco liberada em cerca de 39 % (de 80,3  $\mu\text{g/mL}$  para 31,2  $\mu\text{g/mL}$ ) em comparação com a

amostra N, permitindo a aplicação do PE-b-PEO como um potencial aditivo retardante no processo de liberação do fármaco.

**Tabela 6.** Concentração de nifedipino liberada das fibras produzidas por eletrofiação após 10 minutos, a partir das diferentes combinações dos parâmetros (E, N e P).

Amostras	Eudragit L100 (E) (mg/mL)	Nifedipino (N) (mg)	PE-b-PEO (P) (mg)	[nifedipino liberada] (μg/mL)
I	200	100	0	64,3 ± 1,3
P	200	100	100	47,8 ± 0,9
N	200	200	0	80,3 ± 1,8
NP	200	200	100	49,8 ± 0,5
E	230	100	0	66,5 ± 1,2
EP	230	100	100	27,1 ± 0,8
EM	230	200	0	69,8 ± 1,1
ENP	230	200	100	31,2 ± 0,8

Outra importante resposta foi obtida a partir da comparação dos dados do perfil de liberação das amostras com alta concentração de nifedipino e baixa concentração de Eudragit® L-100 com as amostras resultantes a partir da alta concentração de ambos os componentes. Como se pode verificar a partir dos dados da **Tab. 6**, o aumento no diâmetro das fibras contribuiu com a diminuição na quantidade de fármaco liberada em um tempo fixado, uma vez que a difusão da droga depende da espessura da camada entérica.

O valor correspondente para a importância do parâmetro [Eudragit L-100] na liberação do fármaco, estimado em -11,9 (resultado da Eq. 13 aplicada aos dados da **Tab. 6**) indicando que a taxa de liberação do fármaco foi inversamente proporcional ao aumento no diâmetro das fibras, o que permitiu um tempo mais prolongado de circulação da substância no meio a partir de fibras poliméricas mais espessas.

Em adição, o parâmetro [PE-b-PEO] retornou uma importância de -31,3 (a partir da Eq. 2), caracterizando-o como o principal fator nos sistemas estudados como retardante para a liberação controlada do fármaco.

Como esperado, a importância do parâmetro [Nifedipino] (Eq. 3) retornou um valor positivo (+6,4), devido à sua relação direta entre o aumento da concentração de fármaco dispersa no veículo polimérico e a quantidade de fármaco liberada no fluido GIT.

A importância dos parâmetros, em termos da ação combinada das variáveis "efeitos de interação" resulta em valores negativos considerando-se a combinação dos parâmetros, dois a dois: [EDGT + Nifedipino] = -2,7, [EDGT + PE-b-PEO] = -7,8, [Nifedipino + PE-b-PEO] = -3,3. Esse resultado ocorreu uma vez que a resposta típica do PE-b-PEO e do EDGT dominou a melhoria da liberação de nifedipino induzida pela alta concentração do fármaco. O nível de importância de cada parâmetro e de suas combinações é mantido após os 10 min de liberação, em toda a faixa de tempo estudada.

Com base nestes resultados foi possível verificar que a ação combinada do polímero entérico com o copolímero em bloco pode melhorar a proteção do fármaco em condições agressivas quando do seu transporte na matriz polimérica no organismo (baixo pH no estômago).

#### 4.1.4 Considerações finais

Os resultados iniciais mostraram que as fibras de Eudragit® L-100 produzidas por eletrofiação possuem dois platôs bem definidos de distribuição de diâmetro, dependente da concentração do polímero entérico nas soluções de preparo, definidos como de nível baixo (diâmetros de aproximadamente 500 nm) e de nível alto (diâmetros da ordem de 1,7 µm).

O desenvolvimento de uma ideia simples e eficiente para sintetizar carreadores de fármacos pela técnica de eletrofiação que retardasse o processo de liberação de fármacos pode ser obtido através da introdução de aditivos, tais como o copolímero em bloco PE-b-PEO. Esse surfactante polimérico contribuiu consideravelmente com efeitos retardantes de liberação em situações críticas, como em meios de pH básico, onde o Eudragit® L-100 foi bastante solúvel.

Nesse sentido, a incorporação de aditivos de baixo custo, aliada à produção em massa de fibras por eletrofiação a partir do método de solução (em comparação com o método de eletrofiação coaxial), representa um procedimento promissor a ser aplicado na produção de veículos de baixo custo para diversos fármacos com ação do cólon.

Dos perfis de cinética liberação do fármaco com e sem retardante, foi possível verificar que o balanço entre a concentração relativa da matriz de Eudragit® L-100 e a concentração de PE-b-PEO aplicado na eletrofiação pode ser entendido como um importante parâmetro para a definição do tempo de liberação controlada de fármacos em meios básicos, encapsulados nessas matrizes entéricas.

#### **4.2 Patente de invenção: nanofibras com ação bactericida à base de poli (ácido metacrílico, metilmetacrilato) 1:1 e ácido úsnico**

A presente invenção se refere a um novo método de produção de fibras de blocos de copolímeros à base de poli (ácido metacrílico, metilmetacrilato) 1:1 (de nome comercial Eudragit® L-100) e ácido úsnico (AU) a partir da aplicação da técnica de eletrofiação na solução polimérica resultante.

A produção de fibras ultrafinas resultou em uma matriz com poder bactericida, o que permite a produção massiva de um novo material de baixa densidade e baixo custo a ser aplicado in vitro e in vivo no controle do crescimento bacteriano.

A invenção proposta também se refere a uma nova tecnologia a ser agregada ao desenvolvimento de meios de encapsulação e liberação de ácido úsnico a partir da utilização de micro/nanofibras de blocos de copolímero entérico como matriz, produzidas pela técnica de eletrofiação.

Diversas patentes envolvendo a técnica de eletrofiação foram depositadas em todo o mundo nos últimos anos para diversas aplicações e usando diversas matrizes poliméricas. Como exemplo, podemos citar as patentes U.S. 5,311,884, U.S. 5,522,879 e E.P. 542,514 que utilizam a técnica de eletrofiação para produzir dispositivos biomédicos com características piezoelétricas à base de polímeros derivados do fluoreto de vinilideno. Já as patentes U.S. 4,044,404 e U.S. 4,878,908 mostram o desenvolvimento de vasos sanguíneos artificiais biocompatíveis. A patente americana U.S. 4,043,331 protege o uso de nanofibras poliméricas como curativos para feridas. A patente U.S. 5,024,671 descreve a utilização de nanofibras poliméricas como material de enxerto vascular. Nessa aplicação, substâncias ativas são incorporadas às fibras para serem liberadas de forma controlada no local de ação. Já a patente U.S. 0013,869 direciona o uso da eletrofiação para o preparo de dispersões sólidas estáveis de drogas amorfas em nanofibras poliméricas. A patente brasileira BR PI0703280-3 estudou a síntese e caracterização de nanofibras de poliamida 6,6 com argila para a obtenção de mantas e membranas artificiais em escala nanométrica. Embora existam inúmeros trabalhos na literatura com eletrofiação de compósitos poliméricos, nenhum deles se refere à produção de micro/nanofibras de poli (ácido metacrílico, metilmetacrilato) 1:1 e ácido úsnico para aplicação bactericida (comumente, compósitos bactericidas com AU são produzidos pela indústria farmacêutica e de cosméticos sob a forma de cápsulas, micro/nanoesferas, micro/nanocápsulas, aerosóis e géis dentais).

Em adição, esta é a primeira invenção que produz um compósito deste copolímero com ácido úsnico para aplicação bactericida, usando a técnica de eletrofiação. Nesta direção, a produção de micro/nanofibras de Eudragit® L-100 pela técnica de eletrofiação se mostra como uma estratégia inovadora e de baixo custo para as indústrias farmacêuticas na fabricação de carreadores eficientes de ácido úsnico para aplicações antimicrobianas.

A encapsulação do ácido úsnico em micro/nanofibras de polímero entérico potencializa propriedades extremamente importantes tais como maior área superficial de ação e liberação controlada/dependente do pH. Além disso, a adequação das partículas de ácido úsnico, encapsuladas homogeneousmente nas nanofibras do polímero entérico, faz com que o princípio ativo seja mantido em um ambiente controlado, prolongando o seu tempo de ação e aumentando a sua biodisponibilidade.

A preparação e aplicação das micro/nanofibras com ação bactericida de Eudragit® L-100 / ácido úsnico são apresentadas em duas partes: a primeira trata-se da síntese e caracterização das micro/nanofibras enquanto que a segunda comprehende os testes da ação bactericida *in vitro*.

#### Primeira Etapa – Síntese e caracterização das micro/nanofibras.

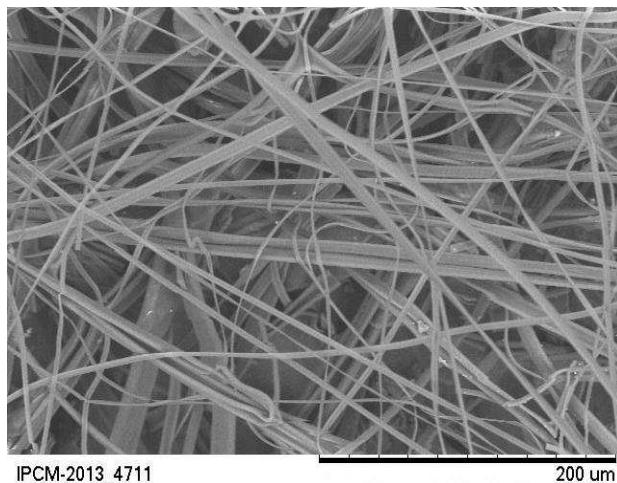
Em um bêquer de 10 mL foi preparada uma solução padrão misturando 1,4 g do polímero entérico comercial Eudragit® L-100 (Rohm Pharma) em 6 mL de álcool etílico P.A. 99,5 % (Vetec). Em seguida foi adicionado 1 mL de solução etanólica de ácido úsnico a uma concentração de 20 mg/mL e logo após a mistura resultante foi agitada durante 5 minutos para total dispersão. Posteriormente, a mistura foi levada ao aparato de eletrofiação (com os mesmos parâmetros estabelecidos na seção 3.1.2).

As fibras produzidas foram colocadas em uma estufa a uma temperatura de 40 °C, durante 24h, para a total evaporação do solvente.

A estrutura do material produzido pode ser visualizada diretamente por microscopia eletrônica de varredura, mostrada na **Fig. 50**. A ausência de agregados nas imagens registradas é uma indicação de que a dispersão do ácido úsnico se dá homogeneousmente ao longo das fibras produzidas. As fibras mais espessas têm diâmetro típico de 10 µm e o material resultante tem aspecto de uma teia com elevada porosidade e baixa solubilidade em água, o que possibilita a liberação prolongada do princípio ativo no meio de interesse.

Com a produção das fibras de Eudragit® L-100 / ácido úsnico foi possível testar o potencial bactericida do compósito sintetizado.

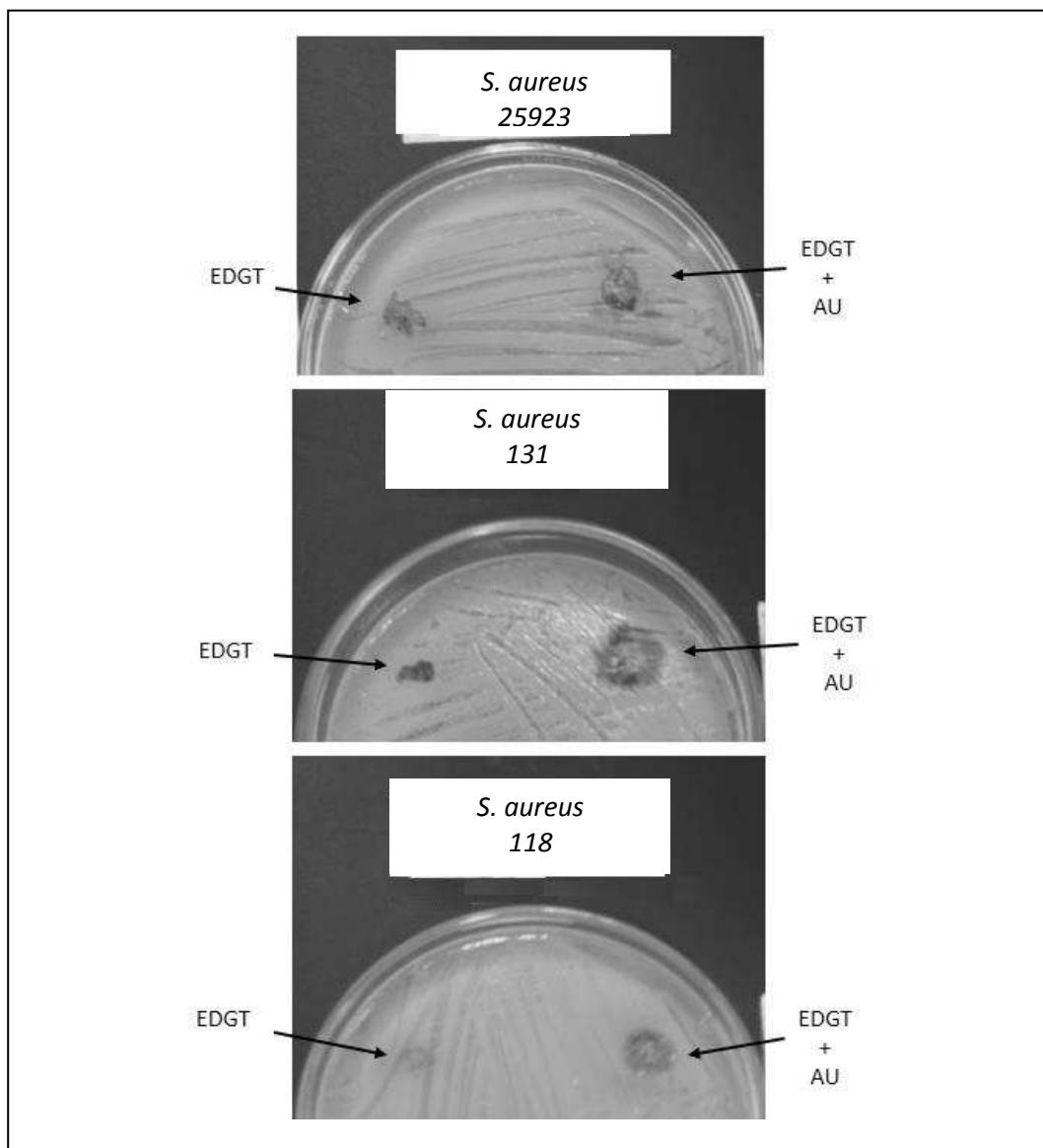
**Figura 50.** Microscopia eletrônica de varredura do compósito bactericida (Eudragit® L-100/ ácido úsnico) preparado por eletrofiação.



#### Segunda Etapa – Testes da ação bactericida in vitro.

A segunda etapa se refere aos testes in vitro das fibras preparadas à base de Eudragit L100 com a incorporação do ácido úsnico. Para avaliação da atividade bactericida foi utilizado o teste de difusão em disco (Bauer, 1966). Para tal, isolados bacterianos de *Staphylococcus* spp. de diferentes ATCCs (American Type Colection Culture) foram incubados em meio de Caldo Muller Hington por 18 horas a 37 °C até a obtenção de uma turvação equivalente a escala 0,5 Mac Farland ( $1 \times 10^8$  UFC/mL). A suspensão bacteriana foi aplicada em placas contendo Agar MH (Muller Hington) (meio de cultura microbiológico frequentemente utilizado para isolar e cultivar bactérias) com auxílio de swab (chumaço de algodão fixado à extremidade de uma haste para aplicar, manipular medicamentos e colher material biológico) e na sequência foram aplicados pequenos agregados de fibras de EDGT+ácido úsnico (aproximadamente 50 mg) sobre as placas que foram incubadas por 24 horas a 37 °C.

A **Fig. 51** ilustra de forma clara a ação bactericida das fibras frente às diferentes colônias de bactérias que foram analisadas. Após a incubação foram medidos os halos de inibição (círculos de inibição das colônias de bactéria no Agar MH) sendo obtidos os seguintes resultados resumidos na **Tab. 7**, comprovando a ação bactericida do composto EDGT+AU em *S. aureus* (lado direito) comparativamente à ação de fibras puras (EDGT) – lado esquerdo.

**Figura 51.** Halos de inibição resultantes da ação bactericida dos compósitos sintetizados.**Tabela 7.** Resultados dos halos de inibição, para as diferentes colônias de bactérias analisadas, obtidos com as fibras de Eudragit® L-100 + ácido úsnico.

Bactéria	Halo
S. aureus 25923	10 mm
S. aureus 131	15 mm
S. aureus 118	10 mm
S. aureus 6538	5 mm
S. epidermidis	10 mm

Em suma, a referida patente reivindica um novo método baseado na produção de fibras ultrafinas que atuam como agentes bactericidas de alto desempenho, aplicável a qualquer

método de preparação de agentes bactericidas a partir da técnica de eletrofiação envolvendo suportes poliméricos de poli (ácido metacrílico, metilmacrilato) 1:1 e ácido úsnico.

Esta descrição da invenção é parte integrante do Pedido de Patente de Inovação depositado no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), sob o nº BR1020140104372, em 30/04/2014.

# CAPÍTULO 5

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A prospecção dos trabalhos relacionados ao processo de eletrofiação para a produção de fibras poliméricas revelou que a técnica vem se desenvolvendo ao longo de quatro séculos de pesquisa, com o particular aspecto que somente patentes nesta área são centenárias. As tendências atuais e os desafios futuros dessa área de estudo indicam que a técnica é bastante promissora em aplicações em nanotecnologia.

No que diz respeito à síntese e caracterização de micro/nanofibras de PVA pela técnica de eletrofiação, foi mostrado que estruturas mais regulares, sem a presença de grânulos (beads), podem ser obtidas pela interação do PVA com o surfactante TX-100. O aumento da quantidade de TX-100 dispersa na solução polimérica aprimorou o processo de eletrofiação e retornou uma produção de fibras com qualidade superior às produzidas com PVA puro além de oferecer uma maior cristalinidade a essas estruturas, como pôde ser comprovado com o aumento progressivo da entalpia de fusão.

A concentração ótima do surfactante requerida para tal fenômeno foi obtida nas proximidades do valor de saturação da tensão superficial da solução (em torno de 10% em massa), considerando-se a uniformidade da rede de fibras sintetizada nesta concentração.

Neste sentido, a inserção de TX-100 em soluções aquosas de PVA (nas proporções indicadas) introduziu importantes aspectos no desenvolvimento de novos métodos de produção e no melhoramento de aplicações específicas para a indústria, tais como componentes de curativos para feridas e bloqueadores solares.

Em um terceiro momento, foi analisada a influência do nível de agregação do copolímero dibloco PE-b-PEO na uniformidade de fibras de PVA produzidas por eletrofiação. Foi possível verificar que fibras livres de granulos (beads) foram obtidas na presença de PE-b-PEO na fase HCP (organização cilíndrica do surfactante, cerca de 35 % em massa do copolímero).

Como o PVA é amplamente utilizado para aplicações biomédicas (por exemplo, em curativos e matrizes para o carreamento de substâncias ativas), a eliminação dos grânulos minimizou a agregação dessas substâncias (que na maioria são fármacos) distribuindo-as de forma regular ao longo da rede fibrosa produzida, evitando que sejam liberadas no organismo com flutuações na concentração. Esse é um grande problema para as tecnologias que

trabalham nesse ramo e por isso a necessidade eminente de estudos que busquem soluções alternativas e que minimizem custos adicionais.

É importante destacar que a produção de fibras de PVA, sem defeitos e mais regulares, por meios não convencionais e de baixo custo, como é o caso da inserção do TX-100 e PE-b-PEO, é uma das alternativas oferecidas à indústria para suprir limitações dos parâmetros envolvidos no processo (como tensão elétrica aplicada e viscosidade da solução) em seus aparelhos de eletrofiação.

Logo em seguida, foi desenvolvido um estudo teórico/experimental em eletrofiação que relacionou a tensão superficial da gota de solução polimérica com o diâmetro das fibras resultantes. A previsão teórica nos retornou a descrição de um novo parâmetro em eletrofiação, fisicamente interpretado como a capacidade de estiramento da gota na saída do capilar metálico sob a ação de um campo elétrico aplicado. Esse novo parâmetro influencia diretamente a síntese de micro/nanofibras poliméricas livres de defeitos e com menor diâmetro, como observado nos resultados. Este parâmetro pode ser explorado mais detalhadamente em uma gama de outros polímeros e surfactantes de modo a mapear, aperfeiçoar o uso de hidrogéis poliméricos em aplicações industriais envolvendo a produção de fibras com diâmetro controlado e livres de defeito, pela técnica de eletrofiação.

Com relação às aplicações propostas, o desenvolvimento de ideias simples e eficientes para sintetizar carreadores de fármacos pela técnica de eletrofiação que retardem o processo de liberação de fármacos pode ser obtido através da introdução de aditivos, tais como o copolímero em bloco PE-b-PEO. Esse surfactante polimérico contribui consideravelmente com efeitos retardantes de liberação em situações críticas como em meios de pH básico (onde o Eudragit® L-100 é bastante solúvel), sem modificar as características iniciais do fármaco.

Nesse sentido, a incorporação de aditivos de baixo custo, aliada à produção em massa de fibras por eletrofiação a partir do método de solução (em comparação com o método de eletrofiação coaxial), representa um procedimento promissor a ser aplicado na produção de veículos fibrosos para diversos fármacos, com ação prolongada no intestino. Esses resultados mostram a potencial possibilidade de estender a pesquisa explorando outras classes de fármacos e de Eudragit com dissolução característica em outros meios básicos (como no jejuno) e (ou) em meios ácidos (por exemplo, no estômago, utilizando o Eudragit® E-100).

Espera-se que o estudo de otimização das fibras de PVA, PVP e Eudragit® L-100 desenvolvidos aqui possa contribuir para o avanço de novos métodos de liberação de drogas *in vitro* e *in vivo*. Em adição, a grande variedade de aplicações do Eudragit® L-100 aliado ao

seu uso como matriz polimérica em eletrofiação sugere este estudo como inovador e extremamente importante como referência para pesquisas futuras na área.

Portanto, podemos comprovar que a conjunção entre ciência básica e aplicada à eletrofiação pode introduzir importantes aspectos relativos ao desenvolvimento de futuras tecnologias usando materiais híbridos, como é o caso dos compósitos com ação bactericida desenvolvidos neste trabalho.

## REFERÊNCIAS

- [1] C. E. Mora-Huertas, et al. Int. J. Pharm. 385 (2010) 113–142.
- [2] Tong Lin. Nanofibers - Production, Properties and Functional Applications, 2011. Rijeka, Croácia: InTech, 2011. ISBN 978-953-307-420-7.
- [3] Z. M. Huang, et al. Composites Sci and Tech 63 (2003) 2223–2253.
- [4] Electrospinning Apparatus EC-DIG. IME Technologies. Disponível em: <http://www.imetechnologies.nl/Electrospinning-Apparatus-n263m338>. Acesso em 15 de março de 2014.
- [5] Nanofiber Equipment.Nanospider™ Electrospinning Technology. Disponível em: <http://www.elmarco.com/nanofiber-equipment/nanofiber-equipment/>. Acesso em 23 de março de 2014.
- [6] Nanofiber Electrospinning Unit from NaBond. NaBond Thechnology. Disponível em: <http://www.nabond.com/Nanofiber%20electrospinning%20Unit%20from%20NaBond.html> Acesso em:23 de março de 2014.
- [7] ES Araújo, MLF Nascimento, HP de Oliveira, Fibres & Textiles in Eastern Europe, 21, 4(100): 39-43, 2013.
- [8] Srivastava, Y. et al. Microfluid Nanofluid. 2007.
- [9] Deng-Guang Yu, et al. J. Nanomaterials, 8 pages, 2014. 8p.
- [10] Shen, X. Int. J. Pharm., 2011. 408, 200-207.
- [11] USA, Patent No.1975504, 1934.
- [12] USA Patent No. 2169962, 1939.
- [13] USA, Patent No. 2187306, 1940.
- [14] ZM Huang, YZ Zhang, M Kotaki, S Ramakrishna, Composites Science and Technology, 63 (15), 2003, 2223-2253.
- [15] C Shin, G. G. Chase, D. H. Reneker, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 262, 2005, 211–215.
- [16] MdS Islam, N Akter, MdR Karim, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 362, 2010, 117–120.
- [17] HR Pant, MP Bajgai, C Yi, R Nirmala, KT Nam, W Baek, HY Kim, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 370, 2010, 87–94.
- [18] Z Ma, H Ji, D Tan, Y Teng, G Dong, J Zhou, J Qiu, M Zhang, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 387, 2011, 57– 64.
- [19] YG Wu, Q An, JX Yin, T Hua, HM Xie, GT Li, H Tang, Colloid and Polymer Science, 286 (8-9), 2008, 897-905.
- [20] TJ Sill, HA Von Recum, Biomaterials, 29 (13), 2008, 1989-2006.
- [21] Taylor, G. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, A313 (1515), 1969, 453-475.
- [22] AL Yarin, S Koombhongse, DH Reneker, Journal of Applied Physics, 90 (9), 2001, 4836-4846.
- [23] SW Matthias, M Matthias, International Journal of Mass Spectrometry, 136 (2–3), 1994, 167–180.
- [24] A Matusevičiūtė, A Butkienė, S Stanys, E Adomavičiūtė, Fibres and Textiles in Eastern Europe, 20, 2012, 21-25.
- [25] Y Liu et al. Polym Int 57:632–636 (2008).
- [26] Y Liu, J H He, JY Yu, HM Zeng, Polymer International, 57, 2008, 632–636.
- [27] P Supaphol, O Suwantong, P Sangsanoh et al., Electrospinning of Biocompatible Polymers and Their Potentials in Biomedical Applications, in: R Jayakumar, SV Nair (Eds.), Biomedical Applications of Polymeric Nanofibers, Springer, Berlin, 2012, 213-240.

- [28] AL Yarin. Free liquid jets and films: hydrodynamics and rheology. New York: Wiley, 1993.
- [29] VM Entov, LE Shmaryan. Fluid Dynamics 1997; 32(5): 696–703.
- [30] RH Magarvey, LE Outhouse. Journal of Fluid Mechanics 1962; 13: 151–157.
- [31] AL Huebner. Journal of Fluid Mechanics 1969; 38(4): 679–688.
- [32] R Jaeger, H Schonherr, J Vancso. Macromolecules 1996;29(23):7634–7636.
- [33] R Jaeger, M Bergshoef, C Balle, H Schonherr, J Vancso. Macromolecular Symposium 1998;127:141–150.
- [34] H Fong, I Chun, DH Reneker, Polymer, 40 (16), 1999, 4585-4592.
- [35] C Kriegel, KM Kit, DJ McClements, J Weiss, Food Biophysics, 4 (3), 2009, 213-228.
- [36] T Lin, HX Wang, HM Wang, XG Wang, Nanotechnology, 15, 2004, 1375-1381.
- [37] C Huang, S Chen, C Lai, DH Reneker, H Qiu, Y Ye et al. Nanotechnology, 17, 2006, 1558-1563.
- [38] L Yao, T Haas, A Guiseppi-Elie, GL Bowlin, DG Simpson, GE Wnek. Chem. Mater. 15, 2003, 1860-1864.
- [39] X Wang, X Chen, K Yoon, D Fang, BS Hsiao, B Chu. Environ. Sci. Technol. 39, 2005, 7684-7691.
- [40] B Kim, et al. Mater Lett 2005b;59:829–32.
- [41] Z Jun, et al. e-Polym 2003;9:1–9.
- [42] WK Son, et al. Polymer 2004c;45:2959–66.
- [43] A Koski, et al. Mater Lett 2004;58:493–7.
- [44] CS Ki, et al. Polymer 2005;46:5094–102.
- [45] X Geng, et al. Biomaterials 2005;26:5427–32.
- [46] TJ Sill, HAV Recum. Biomaterials 2008;29:1989–2006.
- [47] WW Zuo, et al. Polym Eng Sci 2005;45:704–9.
- [48] MM Demir, et al. Polymer 2002;43:3303–9 and
- [49] P Gupta, C Elkins, Polymer 2005;46:4799–810
- [50] C Mit-uppatham, Macromol Chem Phys 2004;205:2327–38.
- [51] DH Reneker, L Chun. Nanotechnology 996;7:216–23.
- [52] C Zhang, Eur Polym J 2005b;41:423–32.
- [53] SG Kumbar, SP Nukavarapu, R James, MV Hogan, CT Laurencin. Biomed Eng 2008;1: 68–78.
- [54] J Doshi, DH Reneker. J Electrost 1995;35:151–6.
- [55] DH Reneker, AL Yarin, H Fong, S Koombhongse. J Appl Phys 2000;87:4531–47.
- [56] YM Shin, MM Hohman, MP Brenner, GC Rutledge. 2001a;42:9955–67.
- [57] X Wang, IC Um, D Fang, A Okamoto, BS Hsiao, B Chu. Polymer 2005b;46:4853–67.
- [58] Li D, et. al. Adv Mater 2004;16:361–6.
- [59] ZZ Zhao, J Appl Polym Sci 2005;97: 466–74.
- [60] Jiang HL, Biomacromolecules 2004a;5: 326–33.
- [61] Zhang Y, et. al. Eur Polym J 2002;38:333–7.
- [62] Zeleny J. Phys Rev 1914; 3: 69-91.
- [63] Zeleny J. Phy Rev 1917; 10:1-6.
- [64] Zeleny J. Electrical discharges from pointed conductors. Phys Rev 1920; 16:102-125.
- [65] Taylor G. Electrically driven jets. Proc R Soc LondA 1969; 313: 453-475.
- [66] Droz V. The electrical dispersion of liquids as aerosols. J Colloid Sci 1955;10: 158-164.
- [67] Baumgarten PK. Electrostatic spinning of acrylic microfibers. J Colloid Interf Sci 1971; 36: 71-79.
- [68] Doshi J and Reneker DH. Electrospinning. J Electrostat 1995; 35: 151-160.
- [69] Gañán AM. Phys Rev Lett 1997; 79: 217-220.

- [70] Gañán AM. *J Aerosol Sci* 1999; 30: 863-872.
- [71] Hohman MM, Shin YM, Rutledge GC and Brenner MP. *Phys Fluids* 2001; 13: 2201-2220.
- [72] Hohman MM, Shin YM, Rutledge GC and Brenner MP. *Phys Fluids* 2001; 13: 2221-2236.
- [73] Wan YQ, Guo Q and Pan N. *Int J Nonlinear Sci Num Simul* 2004; 5: 5-8.
- [74] Yarin AL, Koombhongse S, Reneker DH. *J Appl Phys* 2001; 90: 4836-4846.
- [75] Yarin AL. *J Appl Phys* 2001; 89: 3018-3026.
- [76] Yarin AL, Chase GG, Liu W, Doiphode SV, Reneker DH. *Aiche J* 2006; 52: 217-227.
- [77] Han T, Reneker DH, Yarin AL. *Polymer* 2008; 49: 2160-2169.
- [78] Han T, Yarin AL, Reneker DH. *Polymer* 2008; 49: 1651-1658.
- [79] Reneker DH, Yarin AL, Fong H, Koombhongse S. *J Appl Phys* 2000; 87: 4531-4547.
- [80] Reneker DH and Yarin AL. *Polymer* 2008; 49: 2387-2425.
- [81] Y Liu, H Antaya, C Pellerin, *The Journal of Physical Chemistry B*, 114 (7), 2010, 2373-2378.
- [82] DG Liu, PR Chang, MD Chen, QL Wu, *Journal of Colloid and Interface Science*, 354 (2), 2011, 637-643.
- [83] PT Jia, WA Yee, JW Xu, CL Toh, J Ma, XH Lu, *Journal of Membrane Science*, 376 (1-2), 2011, 283-289.
- [84] Jia J, et.al. *J US China Med Sci* 2007; 4: 52-4.
- [85] Yu, D., et. al. *Health* 2009, 1, 67-75.
- [86] Khil MS, et. al. *J Biomed Mater Res B* 2003; 67: 675-9.
- [87] Sun T, et. al. *Tissue Eng* 2005; 11: 1023-33.
- [88] Duan B, et. al. *J Biomater Sci Polym Ed* 2004; 15: 797-811.
- [89] Matthews JA, et.al. *Biomacromolecules* 2002; 3: 232-8.
- [90] ChenZ, Mo X, Qing F. *Mater Lett* 2007; 61: 3490-4.
- [91] Boland ED, et. al. Poly (Glycolic Acid). In: Bowlin GL, Wnek GE, editors. *Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering*, vol. 2. New York: Marcel Dekker, Inc; 2004b. p. 1246-53.
- [92] Zong, X. *Polymer* 2003; 44: 4959-67.
- [93] Wnek GE, *Nano Lett* 2003; 3: 213-6.
- [94] Zhang L, et. al. *J Membr Sci* 2008; 319: 176-84.
- [95] Yoshimoto H, *Biomaterials* 2003; 24: 2077-82.
- [96] Kenawy R, et. al. *Biomaterials* 2003; 24: 907-13.
- [97] Ma ZW, *J Membr Sci* 2005; 265: 115-23.
- [98] Balakrishnan B, Jayakrishnan A. *Biomaterials* 2005; 26: 3941-51.
- [99] Um IC, Fang DF, Hsiao BS, Okamoto A, Chu B. *Biomacromolecules* 2004; 5: 1428-36.
- [100] Jingwei Xie, et al. *Nanoscale*, 2010, 2, 35.
- [101] Qianqian L, et al. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2012; 161, 1, 967-972.
- [102] Qianqian L, et al. *Polymers* 2013, 5, 1115-1157.
- [103] Hassan, CM, Peppas, NA. *Adv. Polym. Sci.* 2000, 153, 37-65.
- [104] Yan, F. *Advance Journal of Food Science and Technology* 5(8): 1073-1078, 2013.
- [105] Zamani, M.; et al. *Int J Nanomedicine* 2013; 8: 2997-3017.
- [106] J Šukytė, E Adomavičiūtė, R Milašius, J Bendoraitienė, PP Danilovas, *Fibres & Textiles in Eastern Europe*, 20, 2012, 16-20.
- [107] S Mollá, V Compañ, *Journal of Membrane Science*, 372 (1-2), 2011, 191-200.
- [108] Q Fu, Y Jin, X Song, J Gao, X Han, X Jiang, Q Zhao, D Yu, *Nanotechnology*, 21 (9), 2010, 5703-5707.
- [109] X Fang, H Ma, S Xiao, M Shen, R Guo, X Cao, X Shi, *Journal of Materials Chemistry*, 21, 2011, 4493-4501.

- [110] D Choa, N Hoepkerb, MW Frey, Materials Letters, 68, 2012, 293–295.
- [111] RS Barhate, S Ramakrishna, Journal of Membrane Science, 296 (1-2), 2007, 1-8.
- [112] JH Park, MR Karim, IK Kim, IW Cheong, JW Kim, DG Bae, JW Cho, JH Yeum, Colloid and Polymer Science, 288 (1), 2010, 115-121.
- [113] D Yang, Y Li, J Nie, Carbohydrate Polymers, 69 (3), 2007, 538-543.
- [114] Chowhan, Z.T. J. Pharm. Sci. 1980, 69, 1-4.
- [115] Chowhan, Z.T.; Amaro, A.A.; Ong, J.T.H. J. Pharm. Sci. 1992, 81, 290-294.
- [116] Jun, Y.B.; et.al. Kor. Pharm. Sci. 1989, 19, 123-128.
- [117] Forster, A.; et. al. J. Pharm. Pharmacol. 2001, 53, 303-315.
- [118] Jun, Y.B.; et.al. Kor. Pharm. Sci. 1989, 19, 123-128.
- [119] S.-Y. Lin, C.-M. Liao and G.-H. Hsiue, Polym. Degrad. Stab. 1995, 47, 299.
- [120] M.A. Alhnan, S. Murdan and A.W. Basit. Int. J. Pharm. 2011, 416, 55.
- [121] Rowe, CR; et. al. Hand book of pharmaceutical excipients. 3. ed. Londres: Pharmaceutical Press.
- [122] X. Shen et al. Int J Pharm 408 (2011) 200–207.
- [123] Y. Zhang et al. Bioresource Tech 101 (2010) 3153–3158.
- [124] Moura, M.P.S. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 2008. v. 44, 4, 2008, 621-628.
- [125] J. Zeleny. Phys.Rev. 3 (1914) 69-91.
- [126] N. Tucker, J. Stanger, M. P. Staiger, H. Razzaq, K. Hofman. J. Eng. Fiber Fabr. 7 (2012) 63-73.
- [127] J. F. Cooley. Improved Methods of and Apparatus for Electrically Separating the Relatively Volatile Liquid Component from the Component of Relatively Fixed Substances of Composite Fluids. United Kingdom Patent G.B. 6,385 (1900).
- [128] A. Formhals. Process and Apparatus for Preparing Artificial Threads. US Patent 1,975,504. (1934).
- [129] S. Ramakrishnaa, K. Fujihara, W.-E. Teo, T. Yong, Z. Ma, R. Ramaseshan. Electrospun nanofibers: Solving Global Issues. Mater. Today 9 (2006) 40-50.
- [130] E. S. Araujo, M. L. F. Nascimento, H. P. de Oliveira. Fibres & Textiles in Eastern Europe 21 (2013) 39-43.
- [131] Z.-M. Huang, Y.-Z. Zhang, M. Kotaki, S. Ramakrishna. Composites Sci. Tech. 63 (2003) 2223-2253.
- [132] C. M. Rogers , G. E. Morris, T. W. A. Gould, R. Bail. S. Toumpaniari, H. Harrington, J. E. Dixon, K. M. Shakesheff, J. Segal, F. R. A. J. Rose. Biofabrication 6 (2014) 035003.
- [133] X.-H.Qin, S.-Y.Wang. J. App.Polym. Sci.102 (2006) 1285-1290.
- [134] A. H. P. de Oliveira, J. A. S. Moura, H. P. de Oliveira. Polimeros, 23 (2013) 196-200.
- [135] M. L. F. Nascimento. World Patent Information 37 (2014) 48-53.
- [136] M. L. F. Nascimento. World Patent Information, to be published.
- [137] N. Bhardwaj, S. C. Kundu. Biotech. Adv. 28 (2010) 325-347.
- [138] R. P. Feynman. There's Plenty of Room at the Bottom. J. Microelectromech. Systems 1 (1992) 60-66.
- [139] Bangham, A.D.; Horne R. W. J. Mol. Biol. 1964, 8, 660-668.
- [140] Nimesh, S.; et al. Int. J. Pharm. 2006; 323: 146-152.
- [141] Soppimath, K.; et. al. J. Controlled Release, 2001; 70: 1-20.
- [142] Jung, T.; et. al. Eur. J. Pharm. Biopharm., 2000; 50: 147-160.
- [143] Italia, J.L. J. Controlled Release, 2007; 119(2): 197-206.
- [144] Sahoo, S.K.; Labhasetwar V. Drug Discovery Today, 2003; 8(24): 1112-1120.
- [145] Panyam, J.; Labhasetwar, V. Adv Drug Delivery Rev, 2003; 55(3): 329-347.
- [146] L. Giovanelli, et.al. Int. J. Pharm., 2005, 293, 225.
- [147] V.R. Babu, K.S.V. Krishna and Y.I. Lee. Polym. Bull., 2010, 65, 157.

- [148] N. Isiklan, et. al. Carbohyd. Polym., 2011, 84, 933.
- [149] K.L.A. Chan; S.G. Kazarian., Mol.Pharm. 2004, 1(4), 331.
- [150] L. Zhu, L. Wong; L. Yu, Mol. Pharm., 2008, 5(6), 921.
- [151] D. Grooff, W. Liebenberg and M.M. de Villiers., J. Pharm. Sci. 2011, 100(5), 1944.
- [152] J. Huang, R.J. Wigent; J.B. Schwartz J. Pharm.Sci., 2008, 97(1), 251.
- [153] K. Homberg, et al. Surfactants and polymers in aqueous solutions. 2 ed. Nova York: John Wiley & Sons, 2003.
- [154] E. R. De Macedo. Fotofísica das rodaminas B e 6G: processos fotocatalíticos e de engrandecimento da fluorescência. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais). Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF. 69 f. 2012.
- [155] M. Fanun. Microemulsions: Properties and Applications. Taylor & Francis, EUA, 2009.
- [156] D. I. Bauer. An Introduction to Polymer Physics. Cambridge University, Inglaterra, 2002.
- [157] W. D. Callister. Materials Science and Engineering: An Introduction. 6 ed. Nova York: John Wiley & Sons, 2003.
- [158] D. I. Bower. An Introduction to Polymer Physics. Nova York: Cambridge University Press, 2002.
- [159] Araújo, E. S. de Oliveira, H. P. Electrical Properties of Polyethylene-b-Polyethylene Oxide Diblock Copolymer: Segregation and Development of Nanowires. In: BLOCK COPOLYMERS: Phase Morphology, Material Applications and Future Challenges. New York: Nova Publishers, 2014. ISBN: 978-1629486253.
- [160] P. L. Soo, A. Eisenberg. Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics, 2004. 42, 923-938.
- [161] L. Sun, Y. Liu, L. et. al. Macromolecular Rapid Communications, 2004. 25, 853–857.
- [162] M. W. Matsen, M. Schick. Physical Review Letters, 1994. 72(16), 2660-2663.
- [163] K. J. Hanley, T. P. Lodge. Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics, 1998. 36(17), 3101-3113.
- [164] B. Yu, B. Li, et. al. Journal of Chemical Physics, 2005. 123, 234902- 1-7.
- [165] M. W. Matsen. Journal of Physics: Condensed Matter, 2002. 14(2), R21-R47.
- [166] D. A. Hajduk, et. al. The Journal of Physical Chemistry B, 1998. 102(8), 1356-1363.
- [167] Park, J. Y.; Lee, I. H.; Bea, G. N. Journal of Industrial and Engineering Chemistry 14 (2008) 707–713.
- [168] DeHoff RT and Rhines FN (Eds.). Quantitative Microscopy. New York: McGraw-Hill, 1968.
- [169] Kolmogorov AN. Inst Ital Atti Giorn 1933;4: 83-91.
- [170] Gosset WS. Biometrika 1908; 6: 1-25.
- [171] Fisher RA. Metron 1925;5: 90-104.
- [172] Tan SH, Inai R, Kotaki M, Ramakrishna S. Polymer 2005; 46: 6128-6134.
- [173] RK Tubbs, Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 3 (12), 1965, 4181-4189.
- [174] MdS Islam, MdR Karim, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 366, 2010, 135-140.
- [175] Martuscelli, E.; Pracella, M. & Crispino, L. Polymer, 24, p.693 (1983).  
[http://dx.doi.org/10.1016/0032-3861\(83\)90005](http://dx.doi.org/10.1016/0032-3861(83)90005).
- [176] Wunderlich, B. Macromolecular Physics. Vol. 3. Crystal Melting. New York: Academic Press, (1980).
- [177] Araújo, E. S.; et al. Eur Polym J 2010, 46, 1854-1859.

- [178] B. Li, J. He, D. G. Evans, X. Duan. International Journal of Pharmaceutics, 287 (2004) 89-95.
- [179] F. Siepmann, A. Hoffmann, B. Leclercq, B. Carlin, J. Siepmann. J. Control Release 119 (2007) 182–189.
- [180] M. Rodriguez, J. L. Vila-Jato, D. Torres. Journal of Controlled Release, 1998, 55(1), 67-77.
- [181] C. Damgé, P. Maincent, N. Ubrich. Journal of Controlled Release, 2007, 117(2), 163-170.
- [182] M. Ashford, J. T. Fell, D. Attwood, P. J. International Journal of Pharmaceutics, 91 (1993), 241-245.
- [183] H.P. de Oliveira, J.J.F. Albuquerque Jr., C. Nogueiras, J. Rieumont, International Journal of Pharmaceutics 366 (2009) 185–189.
- [184] H.P. de Oliveira, G.F. Tavares, C. Nogueiras, J. Rieumont. International Journal of Pharmaceutics 380 (2009) 55–61.
- [185] A. Akhgari, Z. Heshmati, B. S. Makhmalzadeh. Advanced Pharmaceutical Bulletin, 2013, 3(1), 85-90.
- [186] D. -G. Yu, Y. Xu, Z. Li, L. -P. Du, B. -G. Zhao and X. Wang. Journal of Nanomaterials, vol. 2014, Article ID 967295, 8 pages, 2014.
- [187] Z. Xiang, P. Sarazin, B. D. Favis. Biomacromolecules vol. 10, pp. 2053-2066, 2009.
- [188] A. Rösler, G. W. M. Vandermeulen, H.-A. Klok. Advanced Drug Delivery Reviews vol. 64, pp. 270-279, 2012.
- [189] M. L. Adams, A. Lavasanifar, G. S. Kwon. Journal of Pharmaceutical Sciences vol. 92, no. 7, pp.1343-1355, 2003.
- [190]. B. Barros Neto, I. S. Scarminio, R. E. Bruns. Como fazer experimentos: aplicações na ciência e na indústria. 4 ed. Porto Alegre: Boohman, 2010. 414 p.
- [191] X. Zheng, Q. Xu, L. He, N. Yu, S. Wang, Z. Chen and J. Fu. The Journal of Physical Chemistry B, vol. 115, no. 19, pp. 5815-5826, 2011.
- [192] T. M. M. Santos, P. H. Oliveira Jr., L. A. A. Ribeiro, e H. P. de Oliveira. Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research, vol. 4, no. 1, pp. 63-71, 2014.
- [193] M. Bharathi, S. C. Prasad, R. L. Eswari, S. W. Raja, R. T. Allena, S. B. Raj, and K. B. Reddy. Der Pharmacia Sinica, vol.3, no. 5, pp. 516-525, 2012.
- [194] Y. Lalitha, P. K. Lakshmi. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, v. 3, pp.41-46, 2011.
- [195] N. Kanagathara, P. Shenbagarajan, C. E. Jeyanthi, M. Thirunavukkarasu. International Journal of Pharmacy and Biological Sciences, vol. 1, pp. 52-56, 2011.
- [196] T. Sharkawi, E. Ruiz, T. Cacciaguerra, M. Domurado, B. Bataille. Macromolecular Symposium v. 336, pp. 47– 52, 2014.
- [197] S.-Y. Lin, C. -M. Liao, G.-H. Hsieue. Polymer, vol. 36, no. 16, pp. 3239-3241, 1995.
- [198] M. Sharma, V. Sharma, A. K. Panda, D. K. Majumdar. Yakugaku Zasshi Journal of the Pharmaceutical Society of Japan, vol. 131, no. 5, pp. 697-709, 2011.
- [199] D. Grooff, M. M. De Villiers, W. Liebenberg. Thermochimica Acta, vol. 454, p. 33-42, 2007.
- [200] K. Kosmisdis, P. Argyrakis and P. Macheras. Pharmaceutical Research, vol. 20, 7, p. 988-995, 2013.

## APÊNDICE A – PRODUÇÃO CIENTÍFICA DECORRENTE DA TESE

- 1.** E. S. Araujo, M. L. F. Nascimento, H. P. de Oliveira. **Influence of Triton X-100 on PVA Fibres Production by the Electrospinning Technique.** Fibres & Textiles in Eastern Europe, 21, 39-43, 2013.
- 2.** E. S. Araújo, H. P. de Oliveira. **Electrical Properties of Polyethylene-b-Polyethylene Oxide Diblock Copolymer: Segregation and Development of Nanowires.** In: BLOCK COPOLYMERS: Phase Morphology, Material Applications and Future Challenges. New York: Nova Publishers, 2014. ISBN: 978-1629486253.
- 3.** E. S. Araújo, H. P. de Oliveira, C. A. L. Machado, M. M. Costa, E. C. G. Pereira. **Nanofibras com ação bactericida à base poli (ácido metacrílico, metil metacrilato) 1:1 e ácido úsnico.** Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI, 2014. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020140104372. Depósito: 30/04/2014.
- 4.** E. S. Araujo, M. L. F. Nascimento, H. P. de Oliveira. **Influence of surface tension on formation of electrospun fibers of poly (vinyl alcohol) and poly (vinyl pyrrolidone).** In: XIII Encontro da SBPMat, 2014, João Pessoa - PB. Anais do XIII Encontro da SBPMat. João Pessoa - PB, 2014.
- 5.** F. Costa, E. S. Araújo, M. L. F. Nascimento, H. P. de Oliveira. **Electrospun fibers of enteric polymer for controlled drug delivery.** International Journal of Polymer Science, Artigo ID 902365, 1-9, 2015.
- 6.** M. L. F. Nascimento, E. S. Araújo, E. R. Cordeiro, A. H. P. de Oliveira, H. P. de Oliveira. **A Literature Investigation about Electrospinning and Nanofibers: Historical Trends, Current Status and Future Challenges.** Recent Patents on Nanotechnology, 2015. (aceito para publicação).



**UFBA**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
ESCOLA POLITÉCNICA

**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA INDUSTRIAL - PEI**

Rua Aristides Novis, 02, 6º andar, Federação, Salvador BA  
CEP: 40.210-630  
Telefone: (71) 3283-9800  
E-mail: [pei@ufba.br](mailto:pei@ufba.br)  
Home page: <http://www.pei.ufba.br>



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais  
e de Minas**

**Dissertação de Mestrado**

**Desenvolvimento e Caracterização de Nanofibras Obtidas pela  
Técnica de Eletrofiação Coaxial Visando a Liberação de  
Bevacizumabe para o Tratamento de Degeneração Macular  
Relacionada a Idade**

**Autor: Sarah Oliveira Lamas de Souza**

**Orientador: Prof. Rodrigo Lambert Oréfice**

**Coorientadora: Sílvia Ligório Fialho**

**Janeiro/2016**

**Sarah Oliveira Lamas de Souza**

**Desenvolvimento e Caracterização de Nanofibras Obtidas pela  
Técnica de Eletrofiação Coaxial Visando a Liberação de  
Bevacizumabe para o Tratamento de Degeneração Macular  
Relacionada a Idade**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas.

**Área de Concentração: Ciências e Engenharia de Materiais**

**Orientador: Prof. Rodrigo Lambert Oréfice**

**Coorientadora: Sílvia Ligório Fialho**

**Belo Horizonte**

**Universidade Federal de Minas Gerais**

**Escola de Engenharia**

**2016**

S719d

Souza, Sarah Oliveira Lamas de.

Desenvolvimento e caracterização de nanofibras obtidas pela técnica de eletrofiação coaxial visando a liberação de Bevacizumabe para o tratamento de degeneração macular relacionada a idade [manuscrito]

Sarah Oliveira Lamas de Souza. - 2016.

xiii, 78 f., enc.: il.

Orientador: Rodrigo Lambert Oréfice.  
Coorientadora: Sílvia Ligório Fialho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais,  
Escola de Engenharia.

Bibliografia: f. 68-78.

1. Engenharia metalúrgica - Teses.
2. Ciência dos materiais - Teses.
3. Retina - Doenças - Teses. I. Oréfice, Rodrigo Lambert, 1968-.
- II. Fialho, Sílvia Ligório. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia. IV. Título.

CDU: 669(043)

## Agradecimentos

Agradeço a Deus pela vida e proteção, e por me mostrar os melhores caminhos durante esta caminhada.

À minha mãe, irmãos e cunhados pelo carinho e conselhos, e por estarem sempre presentes. À minha sobrinha que ainda tão pequena tem a habilidade de fortalecer os elos dos que estão por perto e nos permitir um amor tão sincero.

Ao Arthur, que esteve comigo em todos os momentos. Pelo amor, incentivo e compreensão, que faz da minha vida um grande motivo de felicidade.

Ao Rodrigo Oréfice pela orientação, incentivo e pela confiança depositada em mim. Uma pessoa a quem muito admiro e que muitas vezes me transmitiu uma tranquilidade em que eu precisava naquele momento.

À Silvia Fialho pela disponibilidade, sugestões e por me acolher carinhosamente em seu ambiente de trabalho.

À Luísa e ao Giovanni que iniciaram o mestrado comigo, pelas conquistas e angústias compartilhadas nesse período. E juntamente com os colegas do laboratório LEPCom

Anderson, Camila, Diego, Giuliano, Marys, Matheus, Nicolas, Orlando, Túlio e Viviane,

agradeço pelas contribuições técnicas e pela convivência dentro e fora do laboratório.

À Eliane Ayres que considero membro da equipe, por transmitir seus conhecimentos e

entusiasmos de forma que o dia a dia se torne mais agradável.

Ao Tadeu Lima, Alexandra Rodrigues, Janaina Villanova, Monique Cotrim, Maíra Morais e Fernanda Borsagli pela amizade, pelas conversas alegres e pela disponibilidade em ajudar sempre que preciso.

À Maria Carolina Guerra, Luiz Guilherme Heneine e a Valéria Correia da FUNED pela contribuição neste trabalho e conhecimentos transmitidos.

Ao pessoal da FUNED Brenda, Samuel, Bruna, Daniele, Oliver e Marina pelas ajudas com os experimentos e convivência no laboratório.

Ao pessoal do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da UFMG Vinícius Pereira, Marcela, Vinícius Borges e Diogo pelo grande apoio no desenvolvimento deste trabalho, principalmente ao Prof. Armando Cunha Júnior por disponibilizar o seu laboratório para os nossos experimentos.

À Carolina Reis, pela empresa CELLSEQ, pela contribuição do teste de citotoxicidade no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do ICB da UFMG disponibilizado pelo Prof. Dawison Gomes e pelo Prof. Alfredo Góes.

À Ana Eliza pela convivência e pela colaboração com as análises térmicas e à Patrícia pela colaboração das imagens do MEV.

Ao Centro Brasileiro de Ciências Visuais (CBCV) por disponibilizar o Avastin® para a realização deste trabalho.

Aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação da Engenharia Metalúrgica e de Minas da UFMG, Cida e Nelson.

Agradeço a todos que de alguma forma, contribuíram na realização deste trabalho.

## Sumário

Agradecimentos .....	iv
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tabelas.....	xi
Siglas e abreviaturas.....	xii
Resumo.....	xiv
Abstract.....	xv
Capítulo 1: Introdução .....	1
Capítulo 2: Objetivos.....	3
2.1      Objetivo Geral .....	3
2.2      Objetivos Específicos .....	3
Capítulo 3: Revisão Bibliográfica.....	4
3.1      Eletrofiação .....	4
3.1.1    Processo de Eletrofiação .....	5
3.1.2    Parâmetros da solução .....	6
3.1.3    Parâmetros do processo .....	7
3.1.4    Parâmetros ambientais .....	9
3.1.5    Eletrofiação coaxial .....	9
3.2      Aplicações na área biomédica.....	12
3.2.1    Poli( $\epsilon$ -caprolactona) - PCL.....	14
3.2.2    Gelatina .....	15
3.2.3    Poli(álcool vinílico) - PVA .....	15
3.3      Biomateriais na oftalmologia .....	16
3.3.1    Bulbo Ocular .....	17
3.3.2    Segmento posterior do bulbo do olho.....	17
3.3.3    Degeneração Macular Relacionada à idade (DMRI) .....	19
3.3.4    Bevacizumabe (Avastin®) .....	21
Capítulo 4: Materiais e Métodos .....	23
4.1      Processamento de nanofibras por eletrofiação com estrutura <i>core-shell</i> .....	23
4.2      Caracterização .....	25
4.2.1    Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) .....	25

4.2.2	Termogravimetria (TG) e Termogravimetria Derivada (DTG) .....	26
4.2.3	Calorimetria exploratória diferencial (DSC) .....	26
4.2.4	Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) .....	26
4.3	Ensaios biológicos .....	26
4.3.1	Avaliação da atividade do Bevacizumabe pelo teste ELISA indireto.....	27
4.3.2	Avaliação da atividade do Bevacizumabe incorporado ao sistema biodegradável de nanofibras poliméricas utilizando-se modelo de membrana corioalantóica de embrião de galinha (CAM) .....	29
4.3.3	Avaliação da citotoxicidade pela redução do MTT .....	30
	Capítulo 5: Resultados e Discussão.....	33
5.1	MEV e MET.....	33
5.2	Análise Térmica .....	40
5.2.1	Análise térmica das nanofibras PCL/gelatina, PVA e Coaxial.....	40
5.2.2	Análise térmica das nanofibras PCL, PVA e Coaxial com as diferentes concentrações do Bevacizumabe .....	46
5.3	Infravermelho FTIR-ATR .....	53
5.3.1	Espectros infravermelho das nanofibras PCL/gelatina, PVA e Coaxial.....	53
5.3.2	Espectros infravermelho das nanofibras PCL/gelatina, PVA e Coaxial com a incorporação do Bevacizumabe .....	56
5.4	Ensaios biológicos .....	57
5.4.1	Avaliação da atividade do Bevacizumabe pelo teste ELISA indireto.....	57
5.4.2	Avaliação da angiogênese utilizando o modelo Membrana Corioalantóica (CAM) de embrião de galinha.....	60
5.4.3	Avaliação da citotoxicidade pela redução do MTT .....	63
	Capítulo 6: Conclusão .....	66
	Capítulo 7: Sugestões para trabalhos futuros.....	67
	Referências Bibliográficas .....	68

## **Lista de Figuras**

Figura 3.1 - Eletrofiação coaxial, adaptado de WANG et al., 2013.....	10
Figura 3.2 - Representação estrutura química da poli ( $\epsilon$ -caprolactona). Fonte: Sigma-Aldrich.....	14
Figura 3.3 - Representação da estrutura química do poli (álcool vinílico). Fonte: Sigma-Aldrich.....	16
Figura 3.4 - Estruturas do bulbo do olho. Fonte Google.....	17
Figura 3.5 - <i>Anatomia do olho. Fonte Angiogenesis Foundation.</i> .....	20
Figura 3.6 - Depósitos de drusas que provocam a distorção da visão. Fonte Angiogenesis Foundation.....	20
Figura 3.7 - Crescimento anormal de vasos sanguíneos responsáveis pelo extravasamento de sangue e líquido. Fonte: Angiogenesis Foundation. ....	20
Figura 4.1 - Equipamento de electrospinning (INSTOR – Sistemas de Inspeção Robótica). Lab. LEPCoM.....	25
Figura 4.2 - Dispositivo coaxial. Lab. LEPCoM.....	25
Figura 4.3 - Esquema representativo do ELISA, CROWTHER, 2000.....	27
Figura 4.4 - a) Abertura da casca do ovo evidenciando a membrana carioalantóica; b) Ovos selados com fita adesiva transparente na incubadora.....	30
Figura 4.5 - ARPE-19 em aumentos de 20X (A e B) e 100X (C). Fonte: VIEIRA, 2011. ....	31
Figura 4.6 - Esquema da placa utilizada nos testes de citotoxicidade do Bevacizumabe e nanofibras para a ARPE-19.....	32
Figura 5.1 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (20.000X) e histogramas representativos dos diâmetros das nanofibras: (a) nanofibras de PCL/gelatina; (b) nanofibras de PCL/gelatina.Bva 0,5%; (c) nanofibras de PCL.gelatina.Bva 1%; (d) nanofibras de PCL.gelatina.Bva 2%; (e) nanofibras de PCL/gelatina.Bva 4%. ....	35
Figura 5.2 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (20.000 X) e histogramas representativos dos diâmetros das nanofibras: a) nanofibras de PVA; b) nanofibras de PVA.Bva 0,5%; c) nanofibras de PVA.Bva 1%; d) nanofibras de PVA.Bva 2%; e) nanofibras de Pva.Bva 4%. ....	37
Figura 5.3 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (20.000 X) e histogramas representativos dos diâmetros das nanofibras. a) nanofibras Coaxial; b) nanofibras Coaxial.Bva 0,05%; c) nanofibras Coaxial.Bva 1%; d) nanofibras Coaxial.Bva 2%; e) nanofibras Coaxial.Bva 4%. ....	39

Figura 5.4 - Imagem da estrutura de nanofibrasCoaxial contendo CuSO <sub>4</sub> através de microscopia eletrônica de transmissão.....	40
Figura 5.5 - Análise da TG e DTG das nanofibras a)PCL/gelatina, b)PVA e c) coaxial.....	43
Figura 5.6 - Curvas DSC para o 1º aquecimento. Comparação das nanofibras a) PCL, b) PVA e c) coaxial.....	44
Figura 5.7 - Curvas do DSC para o resfriamento. Comparação das nanofibras a) PCL, b) PVA e c) coaxial.....	45
Figura 5.8 - Curvas DSC para o segundo aquecimento. Comparação das nanofibras a) PCL, b) PVA e c) coaxial.....	45
Figura 5.9 - Curvas da TG das nanofibras de PCL, PVA e Coaxial e das nanofibras PCL, PVA e coaxial contendo Bevacizumabe .....	48
Figura 5.10 - Curvas de DSC para o 1º aquecimento, resfriamento e 2º aquecimento das nanofibras: (a) PCL, (b) PCL.Bva 0,5%, (c) PCL.Bva 1%, (d) PCL.Bva 2%, (e) PCL.Bva 4%.....	51
Figura 5.11 - Curvas de DSC para o 1º aquecimento, resfriamento e 2º aquecimento das nanofibras: (a) PVA, (b) PVA.Bva 0,5%, (c) PVA.Bva 1%, (d) PVA.Bva 2%, (e) PVA.Bva 4%.....	52
Figura 5.12 - Curvas de DSC para o 1º aquecimento, resfriamento e 2º aquecimento das nanofibras: (a) Coaxial, (b) Coaxial.Bva 0,5%, (c) Coaxial.Bva 1%, (d) Coaxial.Bva 2%, (e) Coaxial.Bva 4%.....	52
Figura 5.13 - Espectro FTIR-ART das nanofibras de PCL/gelatina e filme de gelatina. ....	54
Figura 5.14 - Espectro do FTIR-ATR das nanofibras de PVA.....	54
Figura 5.15 - Comparação dos espectros de FTIR-ATR das nanofibras coaxial antes de ser lavada com TFE, após ser lavada e a nanofibras de PVA como controle.....	55
Figura 5.16 - Comparação dos espectros de FTIR-ATR da nanofibra coaxial PCL/PVA antes de ser lavada, após ser lavada e a nanofibra de PCL como controle.....	56
Figura 5.17 - Espectro da solução do Bevacizumabe, e das nanofibras PCL, PVA e Coaxial contendo Bva 10%. ....	57
Figura 5.18 - Representação da interação anticorpo antígeno das concentrações do Bva para a curva padrão. ....	58
Figura 5.19 - Curva padrão do Bevacizumabe. ....	58
Figura 5.20 - (a) Liberação acumulada (%) da Bva na amostra PVA.Bva 4%. (b) Perfil de liberação do Bva das nanofibras em relação a amostra PVA.Bva 4%. ....	59

Figura 5.21 - Imagens dos vasos e respectivos pixels dos grupos: (a) PBS; (b) 250 $\mu$ g Bva; nanofibras: (c) Pva, (d)PVA.Bva 0,5%, (e)PVA.Bva 1%, (f)PVA.Bva 2%, (g) PVA.Bva 4%, (h)Coaxial (i) Coaxial.Bva 0,5%, (j) Coaxial.Bva 1%, (k) Coaxial.Bva 2%, (l) Coaxial.Bva 4%.....	61
Figura 5.22 - Redução dos vasos sanguíneos das amostras em relação ao controle (PBS). .....	62
Figura 5.23 - Viabilidade celular em 24 horas através do ensaio MTT.....	63
Figura 5.24 - Viabilidade celular em 72 horas através do ensaio MTT.....	64

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1 - Média dos diâmetros das nanofibras PCL/gelatina, PVA e coaxial PCL/PVA nas diferentes concentrações de Bevacizumabe.....	33
Tabela 2 - Valores da temperatura de transição vítreo (Tg), temperatura de fusão (Tm), entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ), temperatura de cristalização (Tc) e entalpia de cristalização ( $\Delta H_c$ ) obtidos no 1º aquecimento, resfriamento e 2º aquecimento das nanofibras de PCL, PVA e coaxial((1)representa os valores do 1º aquecimento, (2) resfriamento e (3) o 2º resfriamento) via DSC.....	43
Tabela 3 - Resultados da TG e DTG das nanofibras de PCL, PVA e Coaxial e das nanofibras PCL, PVA e coaxial contendo Bevacizumabe.....	47
Tabela 4 - Valores da temperatura de transição vítreo (Tg), temperatura de fusão (Tm), entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ) e temperatura de cristalização (Tc) e entalpia de cristalização ( $\Delta H_c$ ) obtidos no 1º aquecimento, resfriamento e 2º aquecimento das curvas DSC das nanofibras de PCL/gelatina, PVA e coaxial e das nanofibras PCL/gelatina, PVA e coaxial contendo Bevacizumabe ((1)representa os valores do 1º aquecimento, (2) resfriamento e (3) 2º resfriamento).....	49

## Siglas e abreviaturas

AMD Age-related macular degeneration

Anti-Human IgG Anticorpo utilizado no teste Elisa

ARPE Arising Retinal Pigment Epithelia- EPR, cultura de célula do epitélio pigmentado da retina

ATR Reflexão Total Atenuada

Bloom Força do gel (elasticidade mecânica do gel)

Bva Bevacizumabe

CAM membrana corioalantóica (“chorioallantoic membrane”, CAM) de ovo de galinha

Coaxial.Bva nanofibra core-shell PCL/Gelatina/PVA e Bevacizumabe

DMEM Minimal Essential Medium, meio de cultura utilizado pela maioria das células

DMRI Degeneração Macular Relacionada à Idade

DNA ou ADN Ácido desoxirribonucléico

DTG Termogravimetria Derivada

ELISA Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – Ensaio imunoenzimático

FDA Food and Drug Administration

FTIR Espectroscopia infravermelho

$H_2O_2$  Peróxido de Hidrogênio

$H_2SO_4$  Ácido Sulfúrico

$K_2HPO_4$  Fosfato monopotássico

kV Quilovolts

MEV Microscopia Eletrônica de Varredura

NaCl Cloreto de Sódio

$Na_2CO_3$  Carbonato de sódio

$NaHCO_3$  Bicarbonato de sódio

$Na_2HPO_4$  Fosfato dissódico

ng Nanograma

nm Nanômetro

$\mu m$  Micrometro

PBS Solução salina tamponada com fosfato

PCL Poli( $\epsilon$ -caprolactona)

PCL/gelatina.Bva Poli( $\epsilon$ -caprolactona)/gelatina e Bevacizumabe

PEG Poli(etileno glicol)

PVA Poli(álcool vinílico)

PVA.Bva Poli(álcool vinílico) e Bevacizumabe

OPD Ortofenilenodiamina

SBF Soro Fetal Bovino

TFE Trifluoroetanol

TG Termogravimetria

VEGF Fator de crescimento do endotélio vascular

## Resumo

A eletrofiação coaxial é reconhecida como uma técnica eficiente para a fabricação de nanofibras *core-shell* (casca-núcleo). A eletrofiação coaxial permite encapsular agentes bioativos frágeis em soluções aquosas e eliminar os efeitos prejudiciais decorrentes do contato direto dos agentes com solventes ou das condições adversas durante o processamento. A degeneração macular relacionada à idade (DMRI) atinge a região central da retina, a mácula, e é a principal causa de cegueira em indivíduos acima de 50 anos de idade. Fatores angiogênicos têm sido determinantes no processo neovascular, o que levou ao uso de fármacos antiangiogênicos, como o Bevacizumabe, no tratamento atual desta patologia. Neste trabalho, pela técnica de eletrofiação coaxial, foram produzidas nanofibras biodegradáveis *core-shell* para incorporação e liberação de Bevacizumabe. A casca das nanofibras foi constituída de policaprolactona e gelatina, enquanto poli(álcool vinílico) e Bevacizumabe foram usados na formação do núcleo das nanofibras. As nanofibras foram caracterizadas pela Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Termogravimetria (TG) e Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR). Nanofibras produzidas foram também avaliadas *in vitro* quanto à biocompatibilidade e à atividade antiangiogênica do Bevacizumabe. Os resultados obtidos comprovaram a viabilidade de produção das nanofibras casca-núcleo com PCL/gelatina como formador da casca, enquanto o núcleo das nanofibras foi formado pelo PVA. As nanofibras não apresentaram citotoxicidade às células, mesmo na presença do Bevacizumabe. Bevacizumabe manteve a sua atividade antiangiogênica quando incorporado ao sistema.

Palavras-chave: Eletrofiação coaxial, nanofibras casca-núcleo, degeneração macular relacionada à idade, Bevacizumabe.

## Abstract

The coaxial electrospinning is known as an efficient technique for manufacturing core-shell nanofibers. The coaxial electrospinning allows the encapsulation of fragile bioactive agents in water solutions and eliminates the harmful effects resulting from direct contact with solvents and adverse conditions during processing. The age-related macular degeneration (AMD) affects the central retina, the macula, and is the leading cause of blindness in people over 50 years old. Angiogenic factors have been associated with the neovascular process, which led to the use of antiangiogenic drugs, such as bevacizumab as the current treatment of this pathology. In this work, the technique of coaxial electrospinning was used to produce biodegradable core-shell nanofibers for incorporation and release of bevacizumab. Poly(caprolactone) and gelatin were used to form the shell of the nanofiber, while poly(vinyl alcohol) and bevacizumab were part of the core. Nanofibers were characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM), thermogravimetry (TG) and Fourier transform infrared (FT-IR). The *in vitro* biocompatibility antiangiogenic activity and the activity of bevacizumab were also evaluated. The obtained results proved the viability of the production of core-shell nanofibers having PCL/gelatin as the shell and PVA as the core material. The nanofibers showed no cytotoxicity to the cells, even in the presence of Bevacizumab. Bevacizumab maintained its antiangiogenic activity when incorporated into the system.

**Keywords:** Coaxial electrospinning, core-shell nanofibers, Age-related macular degeneration, Bevacizumab.

## Capítulo 1: Introdução

A técnica de eletrofiação (ou fiação eletrostática) ganhou uma atenção considerável nas últimas décadas, principalmente pelo seu potencial de produção de materiais constituídos de nanofibras (COSTA *et al.*, 2012).

Essas nanofibras que, quando reunidas, podem dar origem a mantas e membranas apresentam características como grande área superficial específica, alta porosidade e interconectividade, tornando-as adequadas para transporte de nutrientes, comunicação celular e respostas celulares eficientes, sendo possível sua utilização em várias aplicações biomédicas (GARG e BOWLIN, 2011).

O sistema de eletrofiação possui alguns componentes principais como uma seringa com uma agulha metálica, uma bomba de seringa, uma fonte de alta tensão de alimentação e um coletor aterrado. Ao se controlar os parâmetros de processamento da eletrofiação, incluindo propriedades de soluções (viscosidade, elasticidade, condutividade e tensão superficial), condições de processamento (tensão, diâmetro da agulha, distância entre a agulha e o coletor), e do ambiente (temperatura e umidade), estruturas fibrosas podem ser fabricadas com sucesso, oferecendo excelentes perspectivas (SCHIFFMAN e SCHAUER, 2008; BHARDWAJ e KUNDU, 2010).

Eletrofiação coaxial é uma extensão inovadora da eletrofiação básica, que utiliza núcleo (DO *et al.*, 2012). Essa modificação no processo tem sido feita para melhorar a qualidade e a funcionalidade das estruturas das nanofibras resultantes (LI *et al.*, 2010).

Uma das principais motivações para o uso de eletrofiação coaxial é na liberação controlada de fármacos, já que possibilita contornar as limitações da eletrofiação comum em relação ao encapsulamento de agentes bioativos sensíveis que desempenham um papel importante na área biomédica (JIANG *et al.*, 2014).

A degeneração macular relacionada à idade (DMRI), na maioria dos casos, ocorre em indivíduos acima de 50 anos. Essa degeneração é uma doença do olho que é caracterizada pelo dano à mácula, presente na porção central da retina, que leva à uma perda progressiva da visão central (MESQUITA *et al.*, 2008). A DMRI pode ser apresentada nas formas não exsudativa (seca ou atrófica) e exsudativa (úmida) (SERRA *et al.*, 2008).

Esse bloqueio das imagens é caracterizado pelo crescimento de vasos sanguíneos na região macular. Os sintomas mais comuns da DMRI são o embaçamento e a distorção

da imagem, o que torna as atividades diárias do indivíduo prejudicadas. (PARANHOS *et al.*, 2013).

Nesse contexto, com a evolução do conhecimento da doença e o aumento da expectativa de vida, o uso da terapia antiangiogênica na DMRI tem sido eficaz devido a sua alta especificidade (GUIMARÃES e GERENUTTI, 2013). O fármaco Bevacizumabe tem sido utilizado como um desses inibidores angiogênicos (CONLEY e NAASH, 2010; GUIMARÃES e GERENUTTI, 2013).

Tratamentos atuais com injeções intraoculares contendo o Bevacizumabe podem causar eventos oculares adversos aos pacientes, como perfuração do globo ocular, hemorragias na retina ou vítreo, descolamento da retina e endoftalmite (GUIMARÃES e GERENUTTI, 2013).

Visando um tratamento mais adequado no segmento posterior do olho, em particular na mácula, este trabalho pretendeu contribuir no desenvolvimento de um futuro tratamento com implantes de nanofibras eletrofiadas compostas de diferentes polímeros e fármaco encapsulado que permitiria um maior controle da liberação da molécula ativa. Tal sistema pode aumentar a biodisponibilidade, obter uma liberação constante e prolongada, manter a concentração no local da ação dentro de níveis terapêuticos, atingir especificamente um tecido e eliminar a utilização de injeções intraoculares, além de aumentar o conforto do paciente, garantindo assim uma melhor adesão ao tratamento.

Dessa forma, neste trabalho, nanofibras poliméricas biodegradáveis foram produzidas por eletrofiação coaxial contendo o fármaco Bevacizumabe. Foi testada a hipótese de que a estrutura casca-núcleo produzida por eletrofiação coaxial poderia permitir a proteção do fármaco no núcleo da nanofibra rico em poli (álcool vinílico) e o controle de sua liberação a partir de uma casca formada por um polímero biodegradável (como o PCL) de baixa taxa de biodegradação. Além disso, a presença de um polímero natural como a gelatina (derivada do colágeno) na casca em conjunto com o polímero biodegradável poderia conferir à nanofibra maior capacidade de interação com tecidos vivos. Um dispositivo formado por mantas de nanofibras com este tipo de estrutura casca-núcleo poderia combinar a vantagem da preservação da integridade do fármaco durante o processamento com a possibilidade de sua liberação controlada e estendida. Tal dispositivo poderia eventualmente restringir os riscos e desconforto da realização das injeções intraoculares.

## **Capítulo 2: Objetivos**

### **2.1 Objetivo Geral**

Desenvolver e caracterizar nanofibras com estrutura casca-núcleo pela técnica de eletrofiação coaxial visando a liberação de Bevacizumabe para o tratamento de degeneração macular relacionada à idade (DMRI).

### **2.2 Objetivos Específicos**

- ✓ Preparar nanofibras de poli(álcool vinílico) contendo Bevacizumabe por eletrofiação;
- ✓ Sintetizar mantas de nanofibras com estrutura casca-núcleo pela técnica da eletrofiação coaxial. As nanofibras serão programadas e processadas de tal forma a apresentar poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) e gelatina como formadores da casca, enquanto o núcleo das nanofibras será formado pelo fármaco Bevacizumabe e poli(álcool vinílico) (PVA);
- ✓ Caracterizar a estrutura e morfologia das nanofibras produzidas;
- ✓ Aplicar um método imunoenzimático para avaliar a atividade biológica do Bevacizumabe presente nas nanofibras poliméricas e sua liberação em função do tempo;
- ✓ Avaliar a atividade antiangiogênica do Bevacizumabe incorporado às nanofibras poliméricas utilizando modelo de membrana corioalantóica;
- ✓ Avaliar a citotoxicidade *in vitro* do sistema biodegradável de nanofibras poliméricas contendo Bevacizumabe.

## Capítulo 3: Revisão Bibliográfica

### 3.1 Eletrofiação

Polímeros em filamentos e multifilamentos contínuos podem ser formados a partir de várias técnicas tradicionais como a fiação à seco (*dry spinning*), fiação úmida (*wet spinning*), fiação via gel (*gel spinning*) e fiação do fundido (*melt spinning*) (HUANG *et al.*, 2003; SATO, 2011). Com essas técnicas, as fibras obtidas possuem uma variação média em diâmetro entre 10 a 500 µm (PARK *et al.*, 2001; SATO, 2011). Por outro lado, para se produzir fibras com diâmetros médios muito menores, tem sido muito investigada a técnica de eletrofiação ou fiação eletrostática (*electrospinning*). A eletrofiação permite produzir fibras em malhas, ou mantas ou membranas poliméricas com diâmetros variando entre 10nm a 10µm (EICHHORN e SAMPSON, 2005).

Essas nanofibras eletrofiadas apresentam vantagens, como: alta área superficial; podem ser obtidas numa variedade de formas e tamanhos; podem possuir propriedades e funcionalidades a partir do controle sobre a composição dessas nanofibras (BHARDWAJ e KUNDU, 2010; SATO, 2011); além de poderem ser produzidas a partir de uma infinidade de polímeros (SILVA *et al.*, 2013).

O primeiro estudo de eletrofiação foi patenteado por FORMHALS (1934) descrevendo seu experimento onde a produção de filamentos poliméricos ocorre a partir da força eletrostática.

Polímeros de alta massa molar são envolvidos em estudos de eletrofiação uma vez que suas cadeias sofrem emaranhamentos (*chair entanglements*), sendo um fator importante para a formação de fibras eletrofiadas. Porém, outros trabalhos demonstraram que a alta massa molar média do polímero não é um ponto fundamental para a obtenção de fibras eletrofiadas, e sim a presença de suficientes interações intermoleculares, que proporciona um substituto para a conectividade através do emaranhamento das cadeias (SATO, 2011).

TAYLOR (1964) contribuiu para a técnica de eletrofiação com um modelo matemático conhecido até hoje como cone de Taylor, que estabelece as condições para a formação de um cone gerado pela gota de fluido sob a influência de um campo elétrico.

Para o processo de eletrofiação, são necessários três componentes essenciais: uma fonte de alta tensão, um tubo capilar com uma agulha de pequeno diâmetro e uma placa condutora aterrada (SALLES, 2013).

Esse processo consiste em uma aplicação de campo elétrico entre o polímero e um coletor metálico em rotação. Normalmente, esse polímero (solubilizado em um solvente apropriado, ou seja, uma solução com concentração e viscosidade adequadas) está presente em um tubo capilar (uma seringa hipodérmica com agulha) e é escoado por ação da gravidade ou pelo uso de uma bomba peristáltica através de um orifício (ALCOBIA, 2013). Um eletrodo ligado à uma fonte de alta tensão positiva é conectado nesse tubo capilar e posicionado a uma certa distância do outro eletrodo negativo fixado ao coletor aterrado. A solução é mantida inicialmente pela sua tensão superficial na extremidade do capilar na forma de gota. A superfície da gota se alonga com o aumento da tensão elétrica para formar um cone, conhecido como cone de Taylor (SILL e RECUM, 2008). Quando as forças eletrostáticas, de ação repulsiva, (BAJI *et al.*, 2010) superam a tensão superficial, de ação coesiva, um jato carregado da solução na extremidade do cone é ejetado e atraído ao coletor. Na ponta da agulha, o jato é estável, mas apresenta instabilidade a caminho do coletor. Durante essa trajetória, o solvente evapora e o polímero precipita, originando uma manta de fibras de diâmetros micro ou nanométricos (SCHUEREN *et al.*, 2010; JÚNIOR *et al.*, 2013).

Sendo assim, o processo de eletrofiação envolve um alongamento rápido do jato eletrificado e uma rápida evaporação do solvente durante o processo de eletrodeposição. As cadeias poliméricas emaranhadas sofrem uma força de cisalhamento e se consolidam rapidamente quando atingem a placa coletora. Devido à presença dos emaranhamentos das cadeias no fluido polimérico carregado, o fluido não se rompe na forma de gotículas esféricas, o que ocorre em outro tipo de processo denominado eletrospray, mas forma um jato estável quando as forças eletrostáticas repulsivas nas superfícies do fluido sobrepõem a tensão superficial (RAMAKRISHNA *et al.*, 2005).

### **3.1.1 Processo de Eletrofiação**

O processo de eletrofiação depende de vários parâmetros, os quais desempenham um importante papel no processo de geração das nanofibras (JÚNIOR *et al.*, 2013), permitindo ajustar as dimensões e qualidades das fibras (ALCOBIA, 2013).

Os principais parâmetros da solução são: massa molar do polímero, viscosidade da solução, tensão superficial e condutividade elétrica. Os principais parâmetros do processo são: tensão aplicada, vazão da solução, temperatura, diâmetro da agulha, coletor e a distância da ponta da agulha. Os parâmetros ambientais são: umidade

relativa do ar, temperatura do ambiente e a composição da atmosfera. Modificações nos parâmetros da eletrofiação influenciam a morfologia das fibras.

### 3.1.2 Parâmetros da solução

Os parâmetros de solução influenciam nas morfologias e na geometria das nanofibras. Eles estão relacionados com as propriedades físico-químicas dos solventes, dos polímeros e com as interações do tipo polímero-solvente (COSTA *et al.*, 2012a-).

A escolha de um solvente ideal para cada tipo de polímero é importante para que este seja totalmente solubilizado, e seja adequado para a geração da morfologia de interesse das fibras (WANNATONG *et al.*, 2004).

Um polímero com alta massa molar é menos solúvel, gastando mais tempo para se dissolver quando comparado a um polímero com uma menor massa molar. A massa molar de um polímero também influencia diretamente a viscosidade da solução (WANNATONG *et al.*, 2004). A viscosidade da solução está associada com o grau de emaranhamentos das cadeias poliméricas do polímero em solução. Para que ocorra a formação de fibras uniformes e sem contas (grânulos ou defeitos) no processo de eletrofiação, é necessário que se tenha um valor mínimo de emaranhamento, o qual corresponde a um valor de viscosidade mínima (COSTA *et al.*, 2012a-). Um aumento na viscosidade ou concentração da solução origina fibra com diâmetro maior e mais uniforme. Quando a viscosidade da solução é muito baixa pode não haver material suficiente no jato e grau de emaranhamento adequado para que uma fibra contínua se forme. Nesse caso, tem-se a formação de micro/nano gotas (*electrospraying*). Por outro lado, se a viscosidade da solução for muito alta, a agulha pode ficar obstruída, ou então a bomba pode não ter potência suficiente para bombear uma solução muito viscosa, que inviabilizaria o processo de eletrofiação (KULKARNI *et al.*, 2010; COLLINS *et al.*, 2012).

A tensão superficial está relacionada com a formação do cone de Taylor. A tensão aplicada tem que ser alta suficiente para que as forças eletrostáticas superem a tensão superficial da gota. E, a partir dessa voltagem (voltagem crítica), o processo de fiação é iniciado (COSTA *et al.*, 2012a-).

Vários solventes podem contribuir com diferentes tensões superficiais. Quando existe uma concentração alta de moléculas de solventes livres, há uma tendência das moléculas do solvente se agregarem e adquirirem uma forma esférica devido à tensão

superficial. Já uma viscosidade elevada permite uma maior interação entre moléculas do solvente e do polímero. Sob influência das cargas, o jato polimérico sofre elongação e as moléculas dos solventes se espalham sobre o polímero emaranhado, reduzindo a possibilidade da união das moléculas do solvente sob influência da tensão superficial (BHARDWAJ e KUNDU, 2010).

A condutividade elétrica está ligada a quantidade de carga na solução. Uma maior condutividade com adição de sais nas soluções possibilita maior fluidez de carga e uma aceleração eletrostática maior, sob mesmo campo elétrico (RAMAKRISHNA *et al.*, 2005), ou seja, o tipo de polímero utilizado, solvente e a disponibilidade de sais ionizáveis determinam a condutividade elétrica na solução. O aumento da condutividade elétrica da solução diminui significativamente o diâmetro das nanofibras eletrofiadas e o número de defeitos, enquanto que a baixa condutividade da solução forma um alongamento insuficiente do jato pela força elétrica para formação de fibras uniformes e livres de grânulos (BHARDWAJ e KUNDU, 2010).

Todos esses fatores ligados à concentração dos polímeros na solução, o tipo de solvente utilizado, a condutividade e a tensão aplicada controlam o diâmetro das fibras (BAJI *et al.*, 2010).

### **3.1.3 Parâmetros do processo**

A tensão aplicada entre a agulha contendo a solução e o coletor é facilmente ajustada e crucial na eletrofiação. Assim que a força eletrostática supera a tensão superficial da solução, a alta tensão irá induzir cargas na solução junto com o campo elétrico externo (BAJI *et al.*, 2010).

Dependendo das propriedades da solução e da distância de trabalho, os campos elétricos no processo de eletrofiação ocorrem na ordem de 1-5kV/cm. Isso significa trabalhar com tensões na ordem quilovolts, podendo variar entre 1 a 30 kV, para distâncias entre 5 a 30 cm (ALCOBIA, 2013).

Na maioria dos casos, uma tensão mais elevada provoca uma elongação da solução devido a maiores forças eletrostáticas no jato, como também um forte campo elétrico, o que implica em redução no diâmetro das fibras e uma rápida evaporação do solvente. Assim, a tensão influencia no diâmetro das fibras, mas juntamente com a concentração

da solução do polímero e a distância entre a ponta e a placa coletora (BHARDWAJ e KUNDU, 2010).

A vazão da solução determina a quantidade de solução disponível para a eletrofiação. Quando ocorre um aumento da taxa de alimentação, aumenta-se o diâmetro das fibras ou o tamanho das estruturas globulares já que há um aumento do fluxo da solução que sai da ponta da agulha (WANG *et al.*, 2004). Vazão elevada necessita de um tempo maior para vaporização do solvente para não originar fibras com defeitos (HUANG *et al.*, 2003). Para que o solvente tenha tempo suficiente para evaporar, o ideal é que o fluxo seja contínuo e a taxa de alimentação seja baixa (WANG *et al.*, 2004).

A temperatura da solução aumenta a taxa de evaporação do solvente e reduz a viscosidade na solução polimérica. Em casos onde ocorre a presença de substâncias biológicas, tais como enzimas ou proteínas adicionadas na solução eletrofiada, tais substâncias podem perder sua atividade biológica em elevadas temperaturas (DEMIR *et al.*, 2002).

O diâmetro interno da agulha tem efeito sobre o processo de eletrofiação. Quando o volume da gota na ponta da agulha é reduzido com a redução do diâmetro da agulha, a tensão superficial da gota aumenta. Para a mesma tensão fornecida, a força eletrostática deve ser maior para que se inicie o jato.

Um coletor metálico cilíndrico em rotação é muito utilizado para obtenção de nanofibras alinhadas. A tração fornecida pela velocidade da rotação do cilindro é o mecanismo que define o alinhamento dessas fibras (BAJI *et al.*, 2010). Quando o cilindro apresenta uma rotação baixa não há mecanismo de alinhamento das fibras, as quais acabam por apresentar formas aleatórias.

É necessária uma distância mínima entre a agulha e a placa coletora para que haja tempo suficiente para evaporar o solvente antes de atingir a placa coletora (SILL e RECUM, 2008), e um valor máximo para que o campo elétrico estabilize o cone de Taylor, e consequentemente a formação de nanofibras (COSTA *et al.*, 2012-a). Em distâncias muito próximas ou muito afastadas, pode ser observada a presença de grânulos ao invés de fibras (KULKARNI *et al.*, 2010).

### **3.1.4 Parâmetros ambientais**

Os parâmetros ambientais, como umidade, temperatura e composição do ar também podem influenciar na formação e morfologia das nanofibras (MEDEIROS *et al.*, 2009). Por isso é interessante realizar o processo de eletrofiação em um ambiente em condições controladas.

O nível de umidade e gases atmosféricos pode afetar a taxa de evaporação de solventes à base de água. Em um ambiente rico em água, é observada a formação de uma pele com contornos bem definidos ao redor do jato eletrofiado, enquanto que em uma situação oposta, uma fina estrutura permite uma evaporação rápida do solvente (COLLINS *et al.*, 2012).

### **3.1.5 Eletrofiação coaxial**

A grande versatilidade na técnica de eletrofiação permite obter excelentes propriedades além de vários tipos de fibras através de simples ajustes nas variáveis do processo (MEDEIROS *et al.*, 2009). Dependendo da aplicação, podem ser necessárias misturas de polímeros distintos, onde os polímeros se diferem no tempo de degradação e/ou em suas propriedades mecânicas e de superfície. Aplicações podem ainda requisitar a liberação controlada de componentes como fármacos, hormônios, proteínas ou fatores de crescimento. Essas características podem ser encontradas em fibras com morfologia coaxial com estrutura casca núcleo (*core-shell*) (ALCOBIA, 2013).

A montagem da eletrofiação coaxial é semelhante à utilizada para a eletrofiação comum. A modificação é feita através da inserção de uma agulha menor (interno) que se encaixa de forma concêntrica no interior da agulha maior (externo) para realizar a configuração coaxial, que, de forma independente, ejetam duas soluções poliméricas ao mesmo tempo (LI *et al.*, 2010; JIANG *et al.*, 2014), permitindo a combinação de propriedades de diferentes tipos de materiais, representada pela Figura 3.1.

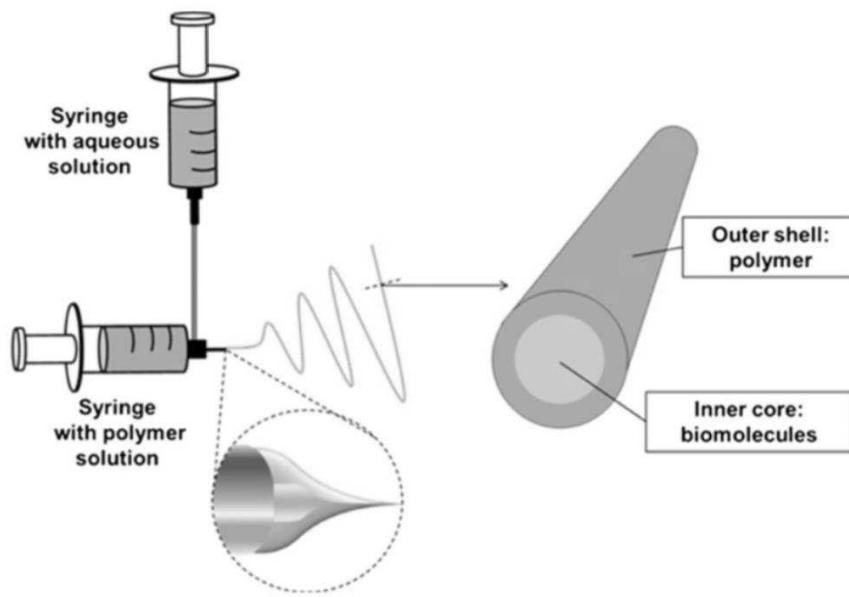


Figura 3.1 - Eletrofiação coaxial, adaptado de WANG et al., 2013.

O processamento da nanofibra coaxial ocorre quando as soluções poliméricas são carregadas pela tensão aplicada, e as cargas são acumuladas predominantemente sobre a superfície da solução que sai da agulha externa do coaxial. A gota dessa solução se alonga e se estende formando um cone devido à repulsão de cargas. As tensões geradas na solução da casca causam cisalhamento na solução do núcleo através do escoamento viscoso e contato de atrito entre as soluções, fazendo com que a solução do núcleo se deforme em forma cônica e um composto de jato coaxial se desenvolva na ponta dos cones. Espera-se que, enquanto o cone composto é estável, o núcleo incorpore uniformemente na casca para a formação de fibras de núcleo-invólucro. Antes de atingir o coletor, como acontece na eletrofiação, os solventes evaporam, e as nanofibras core-shell são formadas (GREINER *et al.*, 2010; JIANG *et al.*, 2014).

Alguns parâmetros que podem influenciar no processamento da nanofibra coaxial são descritos a seguir.

Em relação à viscosidade da solução, é necessário que exista uma viscosidade suficiente do material da casca sobre o material do núcleo para ultrapassar a tensão interfacial entre as duas soluções e permitir a formação do cone, possibilitando ao núcleo a estrutura de formação. E o fluido do núcleo também deve possuir uma viscosidade mínima para ser conduzido continuamente sem ruptura (LI *et al.*, 2010).

Um aumento na concentração da solução da eletrofiação comum aumenta o diâmetro da nanofibra devido ao aumento de material no jato da eletrofiação (WANG *et al.*, 2012). Um efeito semelhante é observado na eletrofiação coaxial: o aumento da concentração do núcleo aumenta tanto o núcleo quanto o diâmetro total de fibra, mantendo constante o volume da casca. E com o aumento da concentração da solução da casca, ocorre um aumento no diâmetro total da nanofibra e da casca, mantendo constante o diâmetro do núcleo (LI, 2013).

A interação entre núcleo e as soluções da casca (polímeros ou solventes) é também um parâmetro importante a ser considerado. Em primeiro lugar, o solvente em qualquer uma das soluções não deve precipitar o polímero da outra solução quando as soluções se encontram na ponta do capilar. Em segundo lugar, a tensão interfacial entre a casca e o núcleo deve ser baixa para a geração do cone de Taylor estabilizado (DÍAZ *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2010).

O tipo de solvente usado, principalmente na solução de núcleo, também pode ter efeito sobre a morfologia resultante de estrutura casca núcleo. O solvente que evapora rapidamente (por exemplo, clorofórmio, acetona, etc.), quando utilizado no núcleo cria uma camada fina na interface entre a casca e o núcleo, devido à rápida evaporação. Esta camada tende a reter o solvente interior mais lentamente devido à barreira recém-criada (LARSEN *et al.*, 2004; LI, 2013). Para evitar a formação de cones instáveis, não devem ser usados solventes de alta pressão de vapor. Os cones instáveis podem causar a formação de estruturas casca e núcleo irregulares, bem como resultar em fibras separadas das duas soluções (LI *et al.*, 2010).

Em relação a tensão aplicada, uma voltagem baixa pode causar gotejamento das duas soluções, seguido de um jato intermitente a partir da solução da casca com uma incorporação ocasional do núcleo. Uma voltagem alta pode separar os jatos da solução da casca e do núcleo, ocasionando fibras sem a formação de casca e núcleo (LI *et al.*, 2010).

A vazão está diretamente ligada às dimensões da casca e do núcleo na eletrofiação coaxial. Quando a vazão do núcleo é muito baixa, uma quantidade insuficiente de solução é entregue impossibilitando a incorporação contínua do núcleo no interior da casca. Por outro lado, se a vazão do núcleo é elevada, a quantidade da solução da casca é insuficiente para reter a solução de núcleo dentro do cone. Isto faz com que o cone interno perca a sua característica, o que resulta na mistura das soluções internas e externa. Para que a solução do núcleo fique encapsulada pela solução da casca é

necessário que a vazão do núcleo seja menor ou igual à da casca (DÍAZ *et al.*, 2006; LI, 2013).

No caso de aplicações biomédicas, a eletrofiação coaxial proporciona vários benefícios, já que os materiais do núcleo (*core*) podem fornecer propriedades específicas desejadas pelo tecido a ser reparado, enquanto os materiais da casca (*shell*) podem incluir propriedades adicionais, tais como biocompatibilidade ou propriedades hidrofílicas (COSTA *et al.*, 2012-a).

Já para outras aplicações, pode-se ter o material do núcleo hidrofílico para facilitar o carregamento e a preservação da bioatividade de moléculas biológicas, e uma casca hidrofóbica para permitir a formação da fibra, após a evaporação do solvente orgânico volátil (SARAF *et al.*, 2009).

Esta técnica é interessante no desenvolvimento de nanofibras multifuncionais, as quais podem apresentar diferentes taxas de biodegradação em diferentes períodos de uso no corpo humano.

As características mecânicas de nanofibras, com específicas concentrações de polímeros no núcleo e na casca, produzidas por esse processo, normalmente são melhores do que aquelas produzidas somente com um polímero (COSTA *et al.*, 2012-Parte I). Esta técnica pode ser utilizada para a produção de nanofibras com liberação controlada de agentes bioativos solúveis em água, tais como proteínas, enzimas e medicamentos dentro do núcleo, e, consequentemente o polímero da casca impede a liberação inicial acelerada do fármaco encapsulado no polímero do núcleo (MEINEL *et al.*, 2012; JIANG *et al.*, 2014). Além disso, a eletrofiação coaxial protege as moléculas bioativas no núcleo das condições adversas de eletrofiação (por exemplo, campo elétrico elevado, de solvente orgânico, etc.) que são encontradas principalmente pelo material que reveste o núcleo (TIWARI e VENKATRAMAN, 2012).

### **3.2 Aplicações na área biomédica**

A técnica de eletrofiação é bem versátil, o que possibilita o processamento de diferentes materiais sintéticos ou naturais, com ou sem adições de substâncias biológicas como fatores de crescimento, proteínas e elementos de matriz extracelular (HUANG *et al.*, 2003; BHARDWAJ e KUNDU, 2010). Tais características permitem a produção de materiais para as mais variadas aplicações tecnológicas, como produção de biosensores, geração de energia, filtros de alta eficiência, dispositivos eletrônicos, entre

outros (COSTA *et al.*, 2012- Parte II; ALCOBIA, 2013). É importante destacar o uso da eletrofiação para aplicações biomédicas, como a engenharia de tecidos, liberação de drogas, curativos, imobilização de enzimas, etc.

A engenharia de tecidos ou medicina regenerativa é um campo interdisciplinar que envolve conhecimentos da medicina, biologia, engenharia e ciência dos materiais. A engenharia de tecidos faz uso de três componentes básicos (células, *scaffolds* e biomoléculas) (JANG *et al.*, 2009).

As estruturas das nanofibras eletrofiadas apresentam dimensões que se assemelham a dos componentes extracelulares do corpo humano (COSTA *et al.*, 2012 b). Quando a matriz celular é destruída por doenças, ferimentos ou defeitos congênitos, o uso de *scaffolds* para regenerar uma nova matriz celular pode oferecer suporte para as células, posterior integração ao tecido ativo e proporcionar a vascularização, sem resposta imune agressiva (AGARWAL *et al.*, 2008; KAI *et al.*, 2014). Os *scaffolds* podem também fornecer suporte mecânico e serem usados como meio para liberação de antibióticos ou fatores de crescimento para acelerar o crescimento do tecido ou cura ou para prevenir infecções (DASH e KONKIMALLA, 2012).

Nas aplicações de engenharia de tecidos, muitas vezes o uso de fibras eletrofiadas envolve várias considerações, incluindo a escolha do material, a orientação das fibras, porosidade, modificação da superfície e aplicação nos tecidos (KAI *et al.*, 2014). Os materiais naturais e sintéticos (biodegradáveis e não-biodegradáveis), bem como misturas de dois polímeros, podem proporcionar uma ótima combinação de propriedades mecânicas, entre outras, que são semelhantes às do tecido que se pretende substituir.

A porosidade garante uma eficiência no transporte dos nutrientes e oxigênio aos tecidos, mas não deve ser excessiva para comprometer a estabilidade mecânica dos *scaffolds* (CUNHA *et al.*, 2011).

Variando-se os parâmetros de processamento, a flexibilidade na seleção dos materiais e capacidade de controlar suas propriedades, os *scaffolds* podem ser otimizados para cada aplicação específica, até mesmo modificar as superfícies com moléculas bioativas (SILL e RECUM, 2008; KULKARNI *et al.*, 2010).

Ao escolher um material para uma aplicação de engenharia de tecidos, ele deve ser biocompatível com todos os elementos celulares. A toxicidade, assim como respostas inflamatórias e imunes devem ser minimizadas, para propiciar uma interação celular

favorável à regeneração. Além disso, os biomateriais devem ser biodegradáveis e bioreabsorvíveis para evitar inflamação prolongada (CUNHA *et al.*, 2011).

Pesquisas iniciais em biocompatibilidade com a utilização de materiais bioinertes tentam reduzir interações específicas, onde esse material elucidará poucas interações específicas com o meio envolvido, incluindo os tecidos ou fluidos circundantes extracelulares (VATANKHAAH *et al.*, 2014). Por outro lado, a incorporação de materiais bioativos pode interagir com o ambiente biológico facilitando a regeneração celular (VATANKHAAH *et al.*, 2014). Esses materiais bioativos podem apresentar fatores como o de crescimento celular, estimuladores de angiogênese, proteínas, gene, etc. (HERNÁNDEZ *et al.*, 2010).

A escolha de um material biodegradável permite eliminar uma segunda cirurgia para a remoção do material implantado (SILL e RECUM, 2008; ORÉFICE *et al.*, 2012).

Portanto, na engenharia de tecidos, é possível a criação de scaffolds reprodutíveis e biocompatíveis para reparação de tecidos vascular, ósseo, neural, pele, tendão/ligamentos entre outros (KULKARNI *et al.*, 2010; ORÉFICE *et al.*, 2012; KAI *et al.*, 2014).

### **3.2.1 Poli( $\epsilon$ -caprolactona) - PCL**

A vasta aplicabilidade e interesse em suas propriedades fazem do poli( $\epsilon$ - caprolactona) uma escolha na engenharia de tecidos. O estudo do polímero sintético poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) começou por volta de 1930 e sua propriedade de biodegradação foi primeiramente estudada em 1973 (NATTA *et al.*, 1934; WOODRUFF e HUTMACHER, 2010).

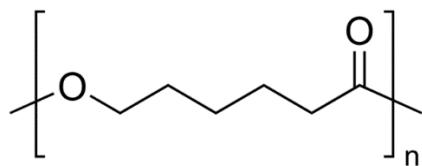


Figura 3.2 - Representação estrutura química da poli ( $\epsilon$ -caprolactona). Fonte: Sigma-Aldrich.

O PCL é um polímero semicristalino hidrofóbico com propriedades térmicas compatíveis com a temperatura corpórea. Possui ótima biocompatibilidade entre vários polímeros, biodegradabilidade e resistência mecânica. A sua compatibilidade e degradação muito mais lenta do que outros polímeros possibilitam seu uso quando tempos prolongados de biodegradação são necessários. Essas características permitem que ele seja usado

como biomaterial na área biomédica e farmacêutica (CUNHA, 2012; DASH e KONKIMALLA, 2012), permitindo sua utilização para liberação controlada de medicamentos devido a sua alta permeabilidade à vários fármacos (MCEACHIN e LOZANO, 2012).

### **3.2.2 Gelatina**

A gelatina é uma proteína natural derivada da hidrólise parcial do colágeno animal, presente em ossos e peles, principalmente de bovinos e suínos. Gelatinas do tipo A são obtidas por tratamento ácido e possuem uma maior quantidade de polipeptídios de baixa massa molar. Enquanto isso, as gelatinas do tipo B são as obtidas pelo tratamento alcalino, e apresentam uma maior proporção de frações de alta massa molar (SILVA *et al.*, 2011).

Como ocorre com as demais proteínas, os aminoácidos são os componentes básicos do colágeno e são ligados entre si através de ligações peptídicas, formando grandes cadeias. A gelatina é formada por 18 diferentes aminoácidos. No momento em que o colágeno é hidrolisado e transformado em proteína solúvel, tem-se a gelatina, cuja massa molar varia dependendo do grau de hidrólise. As propriedades da gelatina resultam de cadeias laterais que possui grupos carregados e sequências de aminoácidos tanto hidrofílicos quanto hidrofóbicos, permitindo que ela se ligue a superfícies de diferentes naturezas químicas. (SCHRIEBER e GAREIS, 2007).

Além do baixo custo, a gelatina possui características e propriedades tais como promover a adesão celular e proliferação, transporte de substâncias e baixa alergenicidade, baixa viscosidade em solução aquosa, odor neutro, incolor, transparência, propriedades emulsificantes e estabilizantes e, solubilidade, que possibilitam numerosas aplicações (PRESTES, 2013).

A gelatina pode ser utilizada isoladamente ou em mistura com outro polímero (sintético) biodegradável, para produzir membranas de nanofibras de tecidos, scaffolds ou dispositivos de cuidados para saúde, e outras aplicações biomédicas (SELL *et al.*, 2009).

### **3.2.3 Poli(álcool vinílico) - PVA**

O poli(álcool vinílico) (PVA) é um polímero sintético hidrofílico e semicristalino. Devido a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, boa estabilidade química e térmica tem sido amplamente utilizada em aplicações biomédicas e na liberação controlada de fármaco. (WON *et al.*, 2012; Nirmala 2011).

O PVA apresenta uma estrutura química com grupos hidroxila laterais, que resulta da mistura do álcool vinílico e acetato de vinila. Tanto as propriedades físicas e químicas dependem do seu grau de hidrólise e massamolecular. A cristalinidade e a solubilidade do PVA em água e em outros solventes altamente polares são aumentadas dependendo do grau de hidrólise. Além do grau de hidrólise, a solubilidade do PVA em água depende do grau de polimerização e da temperatura da solução. O PVA é parcialmente hidrolisado quando o grau de hidrólise está na faixa de 87-89% e, totalmente hidrolisado, com grau de hidrólise de 98-99% (HASSAN e PEPPAS, 2000; WANG *et al.*, 2004).

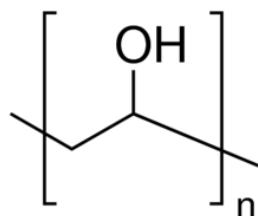


Figura 3.3 - Representação da estrutura química do poli(álcool vinílico). Fonte: Sigma-Aldrich.

Um aumento do número de hidroxilas leva à formação de ligações de hidrogênio fortes entre os grupos hidroxilas intramoleculares e intermoleculares, restringindo sua solubilização em água. Por outro lado, o aumento dos grupos acetato enfraquece as ligações intramoleculares e intermoleculares dos grupos hidroxila vizinhos, aumentando sua solubilidade (GUIRGUIS e MOSELHEY, 2012).

A solubilização do PVA com grau de hidrólise de 98,5% ou maior pode ser feita em água a 70°C, devido à alta energia associada à dissolução da fase cristalina. Após a dissolução, o PVA mantém-se em solução aquosa mesmo em temperatura ambiente (ARANHA e LUCAS, 2001; WANG *et al.*, 2004).

### 3.3 Biomateriais na oftalmologia

O olho humano é um órgão complexo, onde diferentes estruturas interagem dinamicamente. Os biomateriais estão presentes em tratamentos oftalmológicos em traumas oculares, doenças infecciosas ou degenerativas (ORÉFICE *et al.*, 2012).

Dentre as enfermidades oftalmológicas associadas ao envelhecimento, destaca-se a Degeneração Macular Relacionada a Idade (DMRI). Para uma melhor compreensão da DMRI, é necessário o entendimento sobre anatomia ocular.

### 3.3.1 Bulbo Ocular

O Bulbo ocular é formado por três camadas. A córnea e a esclera formam a camada externa ou de sustentação, sendo os meios transparentes. A íris, corpo ciliar e coroide formam a camada média ou vascular, e internamente tem-se a retina (ORÉFICE et al., 2012).

O bulbo do olho é formado por estruturas que compõem os segmentos anterior e posterior do olho. O segmento anterior é delimitado anteriormente pela córnea e posteriormente pelo cristalino. É dividido pela íris e preenchido pelo humor aquoso. O segmento posterior compreende os 2/3 posteriores do olho, delimitado anteriormente pelo cristalino e envolvendo o corpo vítreo, retina, coroide, nervo óptico (NAIK et al., 2009; RIORDAN-EVA e CUNNINGHAM, 2011). Parte do segmento anterior (exceto parte revestida pela córnea) e posterior é revestida pela esclera (ORÉFICE et al., 2012).

Além dessas estruturas, existem os anexos do bulbo do olho, os quais são formados pelas pálpebras, conjuntiva e sistema nasolacrimal.

Neste trabalho dar-se-á ênfase apenas no segmento posterior do bulbo do olho.

### 3.3.2 Segmento posterior do bulbo do olho

As estruturas que formam o olho estão ilustradas na Figura 3.4

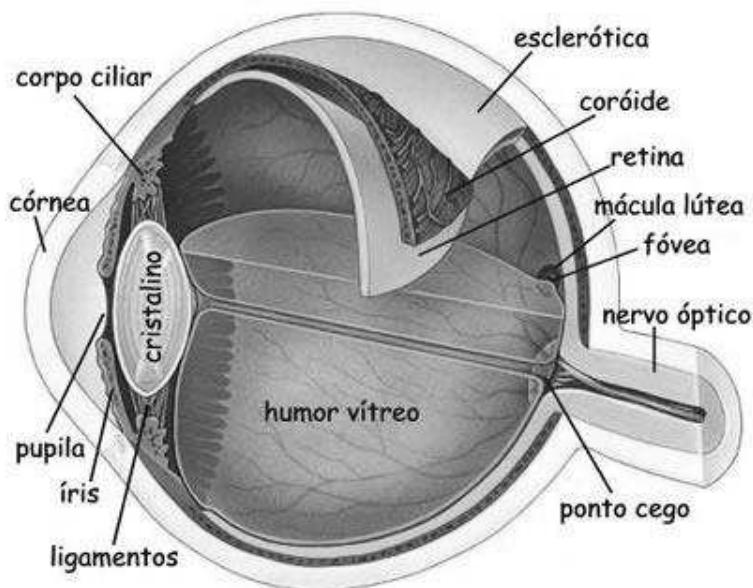


Figura 3.4 - Estruturas do bulbo do olho. Fonte Google.

A esclera (ou esclerótica) é a camada opaca mais externa do segmento posterior. É também conhecida como branco do olho. Juntamente com a córnea, sua função, além de proteger e manter a pressão intraocular, é manter a forma e o volume ocular. Através de uma área posterior desta estrutura, as fibras do nervo óptico atravessam a esclera (WATSON e YOUNG, 2004; RIORDAN-EVA e CUNNINGHAM, 2011).

A coroide é encontrada firmemente ligada à esclera na região do nervo óptico, onde as artérias ciliares posteriores e os nervos ciliares penetram no olho. Ela é mais espessa na região posterior e se torna gradualmente mais fina ao se aproximar da região anterior. A coroide é a responsável pelo suporte sanguíneo da retina uma vez que fornece nutrientes para as células da retina. Ela é altamente vascularizada e contém uma camada vascular com vasos sanguíneos grandes (coriocapilar) e uma camada capilar. A retina e a coroide são separadas pela membrana de Bruch (ORÉFICE et al., 2012)

A retina é uma membrana fina, flexível e sensível que reveste a superfície interna da parte posterior do globo ocular. As camadas externas são as mais próximas da coroide e as mais internas estão mais próximas do corpo vítreo (ORÉFICE et al., 2012).

A retina diferencia-se em duas partes: a retina neurossensorial e o epitélio pigmentado. A retina neurossensorial é formada por uma camada fotossensível de cones e bastonetes e suas conexões neurais. Através do nervo óptico, a luz é absorvida e convertida em impulsos elétricos nervosos. Os cones são as células fotorreceptoras responsáveis pela visão colorida. Os bastonetes são os fotorreceptores que proporcionam a visão no escuro (RIORDAN-EVA e CUNNINGHAM, 2011; PARANHOS et al., 2013).

No polo posterior da retina encontra-se a mácula, região responsável pela visão de alta resolução. Ela transmite ao cérebro 90% da informação visual. A fóvea, localizada na região central da mácula, contém as células fotorreceptoras sendo responsável pela maior capacidade visual do olho (MESQUITA et al., 2008; QUEIROZ et al., 2010).

A retina recebe seu fornecimento de sangue da camada coriocapilar da coroide (supre o terço externo da retina e a fóvea) e das ramificações da artéria central da retina (suprem os 2/3 internos) (RIORDAN-EVA e CUNNINGHAM, 2011).

O corpo vítreo, ou humor vítreo, é uma estrutura transparente e viscoelástica constituída de 99% por água, fibras de colágeno e de ácido hialurônico, que promove coesão e dá uma consistência gelatinosa ao meio. Ocupa toda a cavidade posterior ao cristalino, espaço vítreo, exercendo a função de amortecimento do globo ocular. Sua superfície

externa, a membrana hialoide, adere firmemente à retina em certos pontos, particularmente no nervo óptico, tornando os locais propícios à maior tração e consequente descolamento da retina (RIORDAN-EVA e CUNNINGHAM, 2011).

### **3.3.3 Degeneração Macular Relacionada à idade (DMRI)**

A degeneração macular relacionada à idade (DMRI) ou maculopatia relacionada à idade é uma patologia cada vez mais frequente, devido ao envelhecimento geral da população, e vem assumindo a dimensão de um verdadeiro problema de saúde pública (GUIMARÃES e GERENUTTI, 2013).

A DMRI afeta um ou ambos os olhos, embora o desenvolvimento de DMRI em um olho pode aumentar o risco da doença surgir no segundo olho. Ela não causa dor, por isso, pode ser imperceptível até que produza alterações na visão. Quando a DMRI afeta um olho, ela geralmente se mantém indetectada pelo fato do cérebro usar a informação do segundo olho para compensar qualquer perda de visão no primeiro olho. Essa degeneração pode causar a perda da visão central e até mesmo atingir a cegueira, acometendo indivíduos com mais de 50 anos (PARANHOS *et al.*, 2013).

Essa degeneração tem seu desenvolvimento considerável com o envelhecimento, mas outros fatores de risco vêm sendo investigados, como a predisposição genética, hipertensão arterial, etnia, dieta não balanceada associada à obesidade, e até mesmo aos fatores ambientais como os relacionados à exposição aos raios ultravioletas e ao tabagismo (NEHEMY, 2006; TORRES *et al.*, 2009).

A DMRI é caracterizada por alterações degenerativas envolvendo a parte externa da retina, epitélio pigmentar da retina (EPR) e a membrana de Bruch. Ela apresenta-se sob duas formas clínicas distintas: uma forma “não exsudativa” ou atrófica ou seca, e uma forma exsudativa ou neovascular ou úmida (QUEIROZ *et al.*, 2010).

Na forma seca de DMRI, as células do epitélio pigmentar ficam menos eficientes em suas funções com o avançar da idade. Sendo assim, a retina não recebe mais alimentação adequada e acumula resíduos, o que leva a depósitos amarelos denominados drusas amorfas, esquematizadas nas Figura 3.5 e Figura 3.6. A medida que o número de drusas e o tamanho delas aumentam, lentamente as células da membrana pigmentar da retina se degeneram, ocasionando a perda da visão central (PARANHOS *et al.*, 2013), na maioria dos casos sem o comprometimento significativo da função visual.

A forma exsudativa de DMRI é responsável por 90% dos casos de perda visual grave em pessoas idosas (PARANHOS et al., 2013). Essa forma ocorre quando a integridade da membrana de Bruch é afetada. Sendo assim neovasos (vasos sanguíneos imaturos) da coroide se desenvolvem e crescem entre as células do epitélio pigmentado da retina (EPR) e as células fotorreceptoras na retina central, formando uma membrana neovascular coroidea (YAMADA et al., 2010), representadas na Figura 3.7. Esses vasos sanguíneos frágeis possibilitam vazamentos e hemorragias, levando ao edema, que compromete a integridade da retina, mácula e fóvea, prejudicando a função visual. O resultado final gera uma cicatriz fibrosa densa que pode atingir toda a área macular (NEHEMY, 2006; YAMADA et al., 2010).

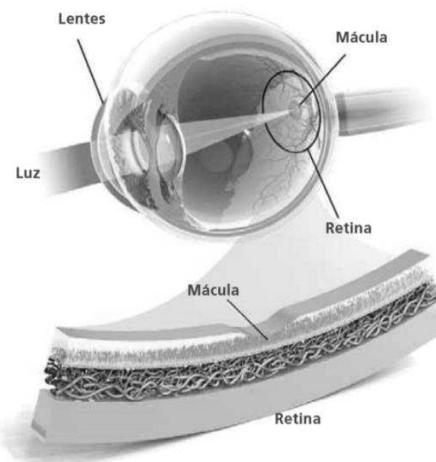


Figura 3.5 - Anatomia do olho. Fonte Angiogenesis Foundation.

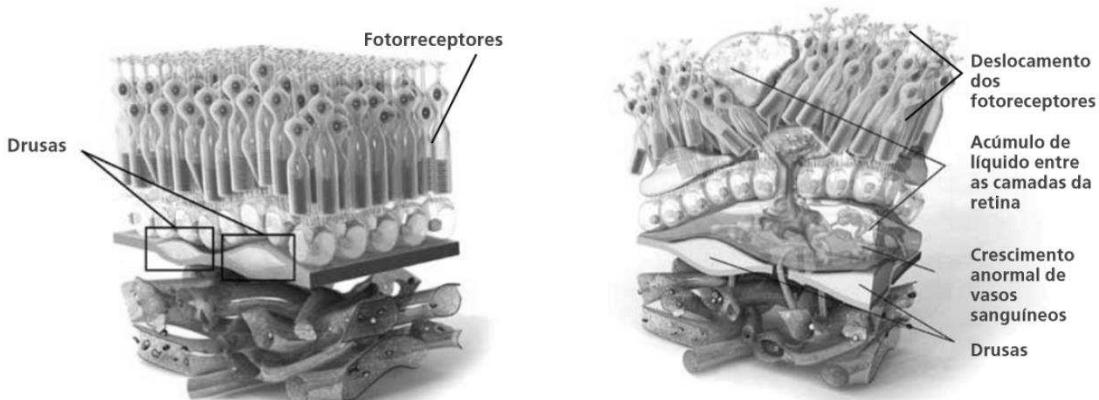


Figura 3.6 - Depósitos de drusas que provocam a distorção da visão. Fonte Angiogenesis Foundation.

Figura 3.7 - Crescimento anormal de vasos sanguíneos responsáveis pelo extravasamento de sangue e líquido. Fonte: Angiogenesis Foundation.

Indivíduos com DMRI geralmente são assintomáticos no inicial da doença. O sintoma inicial é a diminuição da sensibilidade ao contraste devido ao comprometimento macular, levando a impressão da falta de luz para ler ou escrever. Podem perceber o embaçamento da visão central, a distorção da imagem, linhas tortas, aparecimento de manchas escuras ou esbranquiçadas (escotomas) na visão de um ou de ambos os olhos (FLETCHER *et al.*, 2008; PARANHOS *et al.*, 2013). Devido à DMRI, atividades básicas como ler, escrever, dirigir, cozinar ou reconhecer face das pessoas ficam prejudicadas, evoluindo muitas vezes para a cegueira (CONLEY e NAASH, 2010).

### **3.3.4 Bevacizumabe (Avastin®)**

Na busca por substâncias que poderiam atuar na terapia pró e antiangiogênica para o tratamento da forma neovascular úmida da DMRI, os inibidores da angiogênese são uma classe de medicamentos mais utilizada que visa bloquear a proliferação de novos vasos sanguíneos (MESQUITA *et al.*, 2008)

Em dezembro de 2004, a *Food and Drug Administration* (2004), (FDA) dos Estados Unidos aprovou o uso do Bevacizumabe, mas no Brasil foi aprovado apenas para tratamentos de câncer (ZOU *et al.*, 2011).

Em 2011, foi encaminhado à ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) pela Câmara Técnica de Oftalmologia do Conselho Federal de Medicina (CFM), um parecer técnico solicitando autorização para o tratamento com Bevacizumabe de pacientes portadores de Degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI) (COSTA, 2011)

Bevacizumabe é pensado ser tão seguro quanto o ranibizumabe (Lucentis®, Genetech), um medicamento de prescrição aprovada para o tratamento de DMRI exsudativa (KERNT *et al.*, 2007). Tem sido cada vez mais utilizado em muitos países como um tratamento *off-label* eficaz para a forma úmida da degeneração macular relacionada à idade (LI *et al.*, 2012).

O Bevacizumabe é um anticorpo monoclonal humanizado, produzido por tecnologia de DNA recombinante em um sistema de expressão em célula de mamífero, de ovário de Hamster Chinês, em um meio nutriente contendo o antibiótico gentamicina e é purificado por um processo que inclui a inativação viral específica e etapas de remoção (Food e Drug Administration, 2004). Esse anticorpo é constituído por 214 aminoácidos (GOMES *et al.*, 2012).

O mecanismo de ação do Bevacizumabe está ligado ao fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF, um dos principais agentes que estimulam a formação de novos vasos). Ele inibe a ligação do VEGF aos seus receptores na superfície das células endoteliais diminuindo a vascularização (RODRIGUES *et al.*, 2009).

Sendo assim, devido ao seu efeito inibidor da angiogênese, além da aplicação do Bevacizumabe no tratamento de vários tipos de câncer, o fármaco vem sendo utilizado também em doenças degenerativas oftalmológicas decorrentes da angiogênese excessiva como na Degeneração Macular Relacionada à Idade (GOMES *et al.*, 2012). O Bevacizumabe tem sido empregado no tratamento dessa doença por meio de injeções intravítreas diretamente no olho (GUIMARÃES e GERENUTTI, 2013). Repetidas injeções intraoculares podem causar sérias complicações, tais como hemorragia intraocular, descolamento de retina, endoftamite, catarata, entre outras (GAUDANA *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2009), além de proporcionar um enorme desconforto ao paciente. Além disso, a semivida intravítrea de 1,25 mg Bevacizumabe injetado é de aproximadamente apenas 3 dias (LI *et al.*, 2012).

## Capítulo 4: Materiais e Métodos

### 4.1 Processamento de nanofibras por eletrofiação com estrutura *core-shell*

Material Utilizado:

PCL de massa molar 80.000 a 90.000g/mol (Sigma Aldrich); 2,2,2- Trifluoroetanol (Sigma Aldrich); Ácido Acético 99% (Sigma Aldrich); Gelatina (couro de porco) massa molar 90-110g/mol (Sigma Aldrich); PVA 98-99% hidrolisado, massa molar 146.000-186.000 g/mol (Sigma Aldrich); Avastin® (Bevacizumabe 25mg/mL); Sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ).

PBS pH 7,4 (1L água deionizada, 8g NaCl, 0,2g KCl, 1,44g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,24g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ); Tampão carbonato pH 9,6 (1L água destilada, 1,59g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 2,93g  $\text{NaHCO}_3$ ); Tampão de bloqueio (3g albumina, 100mL PBS); Solução reveladora (5mg de OPD (Ortofenilenodiamina) e, 15,5mL tampão citrato); Anti-Human IgG (Fc specific) (Sigma Aldrich).

Solução de formaldeído a 10% em água (Sigma Aldrich); DMEM-F12 (Sigma Aldrich), soro fetal Bovino (Sigma Aldrich), célula ARPE-19.

Preparo das soluções:

O PCL e a gelatina foram dissolvidos em 2,2,2- trifluoroetanol (6% em massa de PCL e 6% em massa de gelatina) separadamente, com auxílio de um agitador magnético durante 3 horas, à temperatura ambiente. Foi preparada uma mistura com as soluções de PCL e gelatina na concentração de 60:40 e acrescentando-se 1 ml da solução de 0,2% de ácido acético em TFE.

O PVA (15% em massa) foi dissolvido em água deionizada em um Banho Dubinoff Micropressurizado a 90º C, durante 2 horas. O Bevacizumabe foi adicionado à solução de PVA nas seguintes quantidades: 1,25mg, 2,5mg; 5mg; 10mg (equivalente à 0,05mL, 0,1mL, 0,2mL, 0,4mL da solução à 25mg/ml) de tal maneira a gerar nanofibras contendo 0,5%, 1%, 2% e 4% em massa de Bevacizumabe em PVA, respectivamente.

O  $\text{CuSO}_4$  (10% em massa) foi dissolvido em solução aquosa de PVA com auxílio de um agitador magnético.

Processamento:

O processo de eletrofiação foi realizado com o auxílio do equipamento de electrospinning, (INSTOR – Sistemas de Inspeção Robótica) (Figura 4.1), instalado no Laboratório de Engenharia de Polímeros e Compósitos (LEPCom) da UFMG. O processamento das nanofibras de PCL e PVA foi realizado da forma descrita a seguir.

A solução de PCL/gelatina foi adicionada em uma seringa de vidro de 5mL (Arti Glass, CE, Italy) com agulha metálica sem bisel (21G 1) (agulha hipodérmica para irrigação, Konnen) e acoplada ao dispositivo electrospinning o qual possui um sistema para pressionamento da seringa com velocidade regulável (sistema de ejeção), permitindo regular a vazão da solução polimérica. A vazão utilizada foi de 4,2 mL/h e uma tensão de +25/0kV foi aplicada entre a agulha e o disco coletor. As nanofibras foram coletadas sobre uma folha de alumínio envolta em um disco coletor giratório automatizado de 8 cm de diâmetro. O disco coletor foi posicionado a uma distância de 15,5cm da ponta da agulha. O aparelho permaneceu ligado e as nanofibras foram processadas até o consumo de toda a solução da seringa. Além da nanofibra de PCL/gelatina pura, foram processadas nanofibras de PCL/gelatina para cada concentração do Bevacizumabe (PCL/gelatina.Bva). As nanofibras foram colocadas em uma placa petri e armazenadas sob refrigeração. O mesmo procedimento foi executado com a solução de PVA, alterando-se apenas a seringa, que foi substituída por uma de 3mL e a vazão para 1,7mL/h.

O processamento da estrutura *core-shell* foi realizado da seguinte maneira: a solução de PCL/gelatina (casca) foi transferida para uma seringa de vidro de 5mL (Arti Glass, CE, Italy) e a solução de PVA (núcleo) foi transferida para uma seringa de vidro de 3ml (Arti Glass, CE, Italy). Cada seringa foi acoplada em um dispositivo coaxial (Figura 4.2), onde a solução foi ejetada por uma agulha metálica, a qual possui um sistema para pressionamento da seringa com velocidade regulável (sistema de ejeção), possibilitando regular a vazão da solução polimérica. Foram utilizadas agulhas com diâmetros internos e externos de 0,8mm e 1,0 mm, respectivamente. A vazão utilizada foi de 4,2 mL/h para a solução da casca e 1,7 mL/h para solução do núcleo. A voltagem de +25/0kV foi aplicada entre o dispositivo coaxial e o disco coletor. O dispositivo foi posicionado a uma distância de 15,5cm da ponta da agulha. O aparelho permaneceu ligado e as nanofibras processadas até o consumo total das soluções das seringas. Foram preparadas também nanofibras *core-shell* para cada concentração do Bevacizumabe (Coaxial.Bva). As nanofibras foram colocadas em placa petri e armazenadas sob refrigeração.

Para a caracterização por microscopia eletrônica de transmissão, foi processada a nanofibra *core-shell* com adição do CuSO<sub>4</sub> na solução de PVA. A nanofibra foi coletada diretamente em um grid Holey Carbon de 300 mesh por 10 minutos.



Figura 4.1 - Equipamento de electrospinning (INSTOR – Sistemas de Inspeção Robótica). Lab. LEPCom.

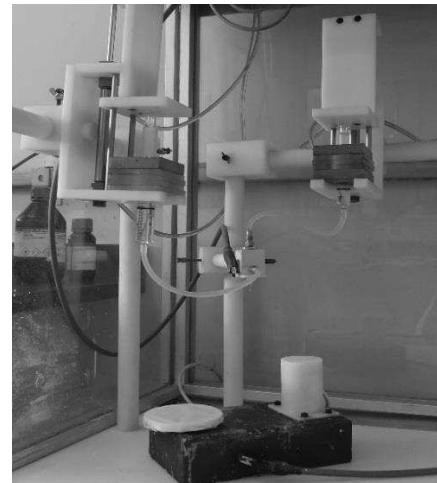


Figura 4.2 - Dispositivo coaxial. Lab. LEPCom.

## 4.2 Caracterização

### 4.2.1 Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para a obtenção das imagens por microscopia eletrônica de varredura, as amostras de nanofibras PCL/gelatina, PVA e Coaxial e PCL/gelatina.Bva, PVA.Bva e Coaxial.Bva com as diferentes concentrações de Bevacizumabe foram recortadas nas dimensões de 1cmx1cm e metalizadas com ouro. Para a obtenção das imagens, foi utilizado o aparelho de Microscopia Eletrônica de Varredura (FEI, INSPECT S50) e Metalizadora (SPI Suplies – Sputter coater) do laboratório de Microscopia Eletrônica (LAB MEV) da UFMG.

Os diâmetros das nanofibras foram medidos utilizando o software ImageJ, através da medida de 100 fibras de cada uma das imagens obtidas pelo MEV.

Para a produção das imagens por microscopia eletrônica de transmissão foi utilizado o Microscópio Eletrônico de Transmissão Tecnai G2-20 - SuperTwin FEI - 200 kV do Centro de Microscopia da UFMG.

#### **4.2.2 Termogravimetria (TG) e Termogravimetria Derivada (DTG)**

As curvas TG das nanofibras PCL/gelatina, PVA e Coaxial e PCL/gelatina.Bva, PVA.Bva e Coaxial.Bva foram obtidas sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 30ml/min e uma taxa de aquecimento de 20 °C/min, no intervalo de 20 °C à 700 °C.

As curvas TG foram obtidas utilizando o equipamento EXSTAR TG/DTA 7200 do laboratório LEPCom da UFMG. O software OriginPro 8.0 foi utilizado para a plotagem e análise dos gráficos de TG e DTG.

#### **4.2.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)**

Curvas DSC das nanofibras PCL/gelatina, PVA e Coaxial e PCL/gelatina.Bva, PVA.Bva e Coaxial.Bva foram obtidas sob atmosfera de nitrogênio, aquecimento de 30 a 250°C, resfriamento até - 50°C, e reaquecimento até 250°C com taxa de 10°C/min.

O comportamento térmico dos sistemas foi avaliado utilizando o equipamento EXSTAR DSC 7020. O software OriginPro 8.0 foi utilizado para a plotagem e análise dos gráficos.

#### **4.2.4 Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)**

O espectrofotômetro Thermo Scientific modelo Nicolet6700 do laboratório LEPCom da UFMG foi utilizado para a coleta dos espectros de infravermelho com transformada de Fourier. Os espectros foram obtidos através da técnica ATR (Reflexão Total Atenuada) para as amostras de nanofibras de PCL/gelatina, PVA e Coaxial com as diferentes concentrações de Bevacizumabe, com 16 varreduras e resolução de 4cm<sup>-1</sup>.

O software OriginPro 8.0 foi utilizado para a plotagem e análise dos espectros.

### **4.3 Ensaios biológicos**

O teste ELISA foi realizado no Departamento de Desenvolvimento Tecnológico Farmacêutico na Fundação Ezequiel Dias (FUNED). A avaliação da atividade antiangiogênica foi realizada no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Farmácia da UFMG. E o teste de citotoxicidade foi realizado em parceria com a Carolina Reis da

empresa CELLSEQ, no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

#### 4.3.1 Avaliação da atividade do Bevacizumabe pelo teste ELISA indireto

O ensaio imunoenzimático ELISA é utilizado para a detecção e/ou quantificação de anticorpos que se ligam a seu antígeno em referência a um padrão. As etapas do ELISA indireto estão resumidas na Figura 4.3.

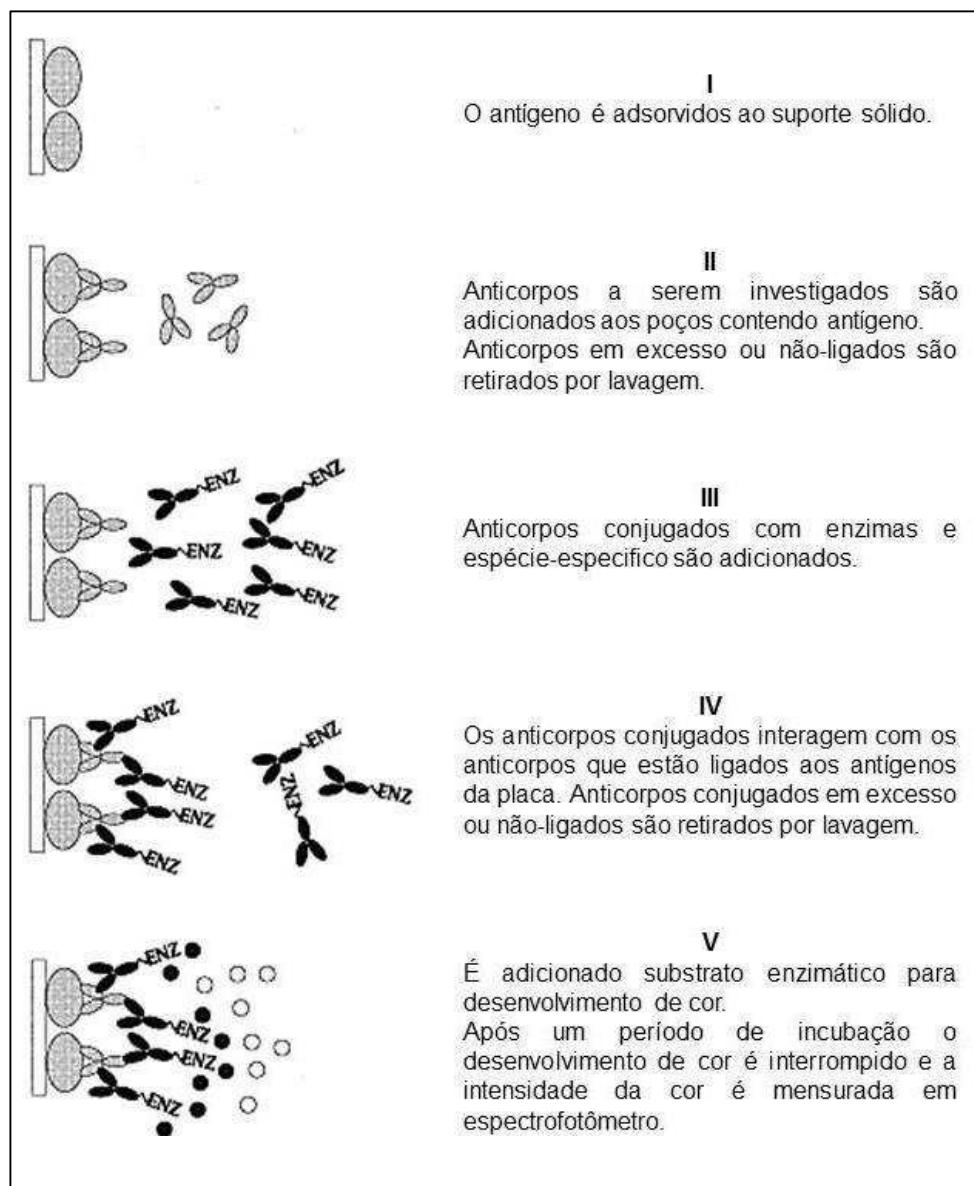


Figura 4.3 - Esquema representativo do ELISA, CROWTHER, 2000.

Preparo das amostras das nanofibras e concentrações do Bevacizumabe para o ensaio ELISA:

Foram cortadas e pesadas 5 amostras, de 8x8mm, de cada manta de nanofibra de PVA, PVA.Bva 2%, PVA.Bva 4%, Coaxial, Coaxial.Bva 2% e Coaxial.Bva 4%.

Cada amostra PVA.Bva 2% e Coaxial 2% possivelmente apresentaram uma média de 0,0458mg do Bevacizumabe. E cada amostra PVA.Bva 4% e Coaxial 4% possivelmente uma média 0,0914mg do Bevacizumabe. A previsão dessas médias foi feita a partir da quantidade de Bevacizumabe incluída no processamento das amostras e a suposição de um grau de encapsulamento de 100%. As amostras foram colocadas individualmente em tubos de eppendorf juntamente com 2000 $\mu$ L de PBS. Os tubos eppendorf foram identificados e colocados em um Environ Shaker a 37°C a 50 RPM por 21 dias. As amostras foram coletas nas primeiras 12 e 24 horas e, após isso, a cada 48 horas até finalizar os 21 dias. As amostras foram refrigeradas e posteriormente utilizadas apenas 1000  $\mu$ L de cada mostra para o ensaio ELISA.

Para a curva padrão, foram utilizadas as seguintes concentrações do Bevacizumabe: 1,56 $\mu$ g/mL; 0,78 $\mu$ g/mL; 0,39  $\mu$ g/mL; 0,195  $\mu$ g/mL; 0,098  $\mu$ g/mL; 0,049  $\mu$ g/mL; 0,024  $\mu$ g/mL.

O ensaio ELISA envolveu as seguintes fases: sensibilização, bloqueio (BSA), aplicação do conjugado, revelação, parada e leitura.

#### Sensibilização (primeiro dia):

Foram aplicados 100 $\mu$ L do tampão de sensibilização (tampão carbonato pH 9,6) em cada poço das microplacas, exceto nos poços onde foi aplicado o ponto 1 da curva analítica. Nos poços do primeiro ponto da curva analítica, adicionou-se 200 $\mu$ L da solução de Bevacizumabe de 1,56  $\mu$ g/mL. Realizou-se a diluição seriada dos pontos da curva (a 50%) a partir do ponto 1, retirando 100 $\mu$ L do ponto 1 e transferindo para o ponto 2 e assim sucessivamente até o último ponto, atingindo-se as concentrações citadas anteriormente. Foram desprezados 100 $\mu$ L do último ponto da curva.

Nos poços das amostras das nanofibras, foram adicionados 100 $\mu$ L coletados de cada amostra. A homogeneização das amostras no poço foi realizada com a pipeta ao pipetar e retornar com o conteúdo para o poço. As placas foram tampadas com papel toalha ou alumínio e deixadas na geladeira overnight.

#### Bloqueio (segundo dia):

Foi desprezado o conteúdo das placas, as quais foram lavadas, utilizando-se a lavadora de placas. A programação desta foi ajustada com 200  $\mu$ L de tampão salina fosfato de

lavagem para cada poço em 3 ciclos de lavagem. Foi retirado o excesso que ficou na placa e aplicou-se 100 µL de BSA 3% em PBS 0,1M em cada poço. As placas tampadas foram incubadas a 37º C durante 1 hora.

#### Aplicação do Conjugado

A placa foi retirada da estufa e todo conteúdo foi desprezado. As placas foram lavadas novamente utilizando-se a lavadora de placas com 200 µl de tampão salina fosfato de lavagem para cada poço, em 3 ciclos de lavagem. Foi aplicado, em cada poço, 100µL do conjugado Anti-Human IgG diluído em tampão de bloqueio (1:60.000). As placas foram incubadas a 37º C, novamente, durante 30 minutos.

#### Revelação

O conteúdo foi desprezado novamente e lavado utilizando-se a lavadora de placas. Foram acrescentados 100 µl de uma solução de OPD (ortofenilenodiamina) preparada em tampão citrato-fosfato, acrescentado de 15 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em cada poço. As placas foram novamente incubadas a 37º C durante 30 minutos.

#### Parada e leitura

A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em cada poço. Os resultados foram obtidos com base na leitura da densidade ótica (D.O.) em espectrofotômetro com filtro de 492 nm.

#### **4.3.2 Avaliação da atividade do Bevacizumabe incorporado ao sistema biodegradável de nanofibras poliméricas utilizando-se modelo de membrana corioalantóica de embrião de galinha (CAM)**

Ovos embrionados da espécie Gallus domesticus e da linhagem Ross foram adquiridos junto à empresa Rivelli, localizada no município de Mateus Leme-MG.

Os ovos das aves fertilizados foram incubados a temperatura de 37ºC e 60% de umidade relativa do ar, utilizando-se uma chocadeira do tipo incubadora automática digital (Premium Ecológica). No 3º dia de incubação, a casca dos ovos foi removida ao redor da câmara de ar, evidenciando a membrana interna da casca, que foi retirada cuidadosamente, expondo a membrana corioalantóica. Os ovos foram selados com fita adesiva transparente e mantidos na posição vertical na incubadora (Figura 4.4). No 5º dia, as amostras foram aplicadas e, imediatamente, foram colocados discos de celulose de tamanho padronizado sobre a CAM.

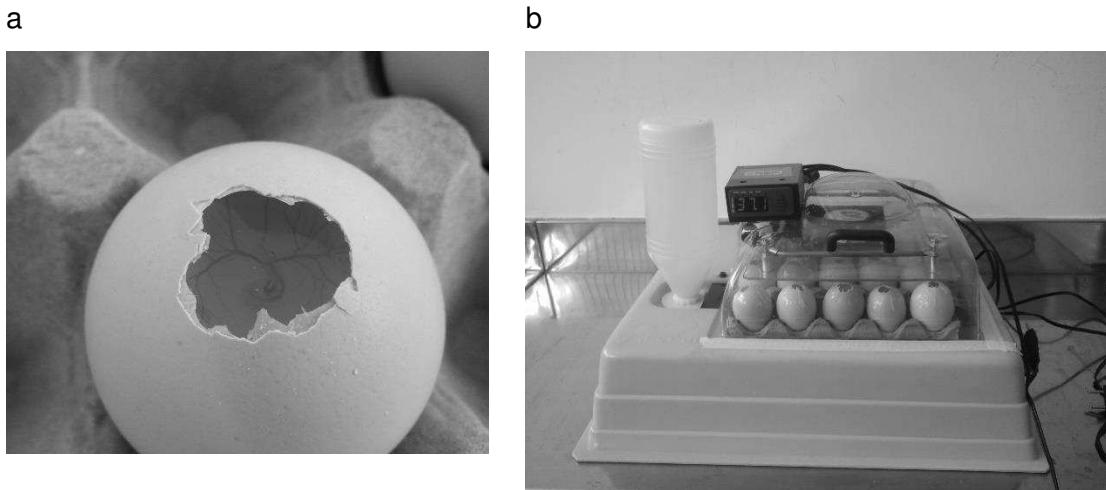


Figura 4.4 - a) Abertura da casca do ovo evidenciando a membrana carioalantóica; b) Ovos selados com fita adesiva transparente na incubadora.

Ovos embrionados foram aleatoriamente divididos em três grupos ( $n=14$  para cada grupo): controle negativo (10  $\mu\text{l}$  de tampão PBS, pH 7,4), controle positivo (10  $\mu\text{l}$  de solução comercial de Bevacizumabe para quantidade equivalente a 250 $\mu\text{g}$  de Bevacizumabe/mL) e amostras experimentais (amostras 8x8mm de nanofibras de PVA e Coaxial, e amostras 8x8mm de nanofibras de PVA e Coaxial com 0,5%, 1%, 2% e 4% de Bevacizumabe).

No 7º dia de incubação, foi realizada a extração das CAMs após prévia fixação com solução de formaldeído a 10% por 10 minutos. As CAMs foram fotografadas com uma câmera digital Moticam 2300 Q715CVD-2300-0-0 (Motic) acoplada a um estereomicroscópio Q766P/L/ZL (Motic). As imagens foram capturadas pelo software Images Plus 2.0 (Motic) com um aumento padronizado de 20X. As imagens obtidas foram processadas com o auxílio do programa ImageJ.

A resposta foi mensurada em função da área (pixels) relativa aos vasos sanguíneos em relação ao grupo controle negativo (CN), que foi fixado em 100% para o cálculo da redução dos vasos sanguíneos. Os resultados foram expressos como percentual de vasos sanguíneos (média). Foi realizada, pelo programa Prism 5.04, a análise estatística (ANOVA One-Way) dos dados obtidos, onde  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

#### **4.3.3 Avaliação da citotoxicidade pela redução do MTT**

Para avaliar a citotoxicidade das nanofibras de PCL/gelatina, PCL/gelatina.Bva 4%, PVA, PVA.Bva 4%, Coaxial e Coaxial.Bva 4% sobre a linhagem celular ARPE-19,

células epiteliais pigmentadas da retina humana,(Figura 4.5), foi utilizado um método colorimétrico sensível, descrito por MOSMANN (1983), que mensura a viabilidade e proliferação celular.

Este ensaio baseia-se na capacidade de enzimas desidrogenases, presentes nas mitocôndrias de células viáveis, em converter o sal de tetrazólio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio bromide (MTT), solúvel em água, no cristal de formazan, produto insolúvel em água. A quantidade de formazan produzida é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Os cristais de formazan são solubilizados e a densidade ótica é quantificada pelo espectofotômetro a 595 nm.

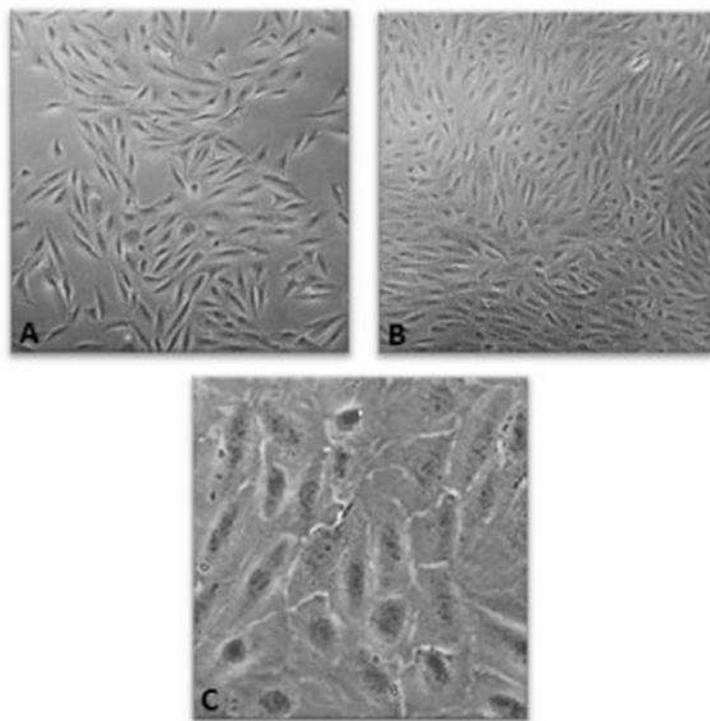


Figura 4.5 - ARPE-19 em aumentos de 20X (A e B) e 100X (C). Fonte: VIEIRA, 2011.

A ARPE-19 foi cultivada em meio DMEM-F12 suplementados com 10% de soro fetal bovino (SBF). As células foram semeadas em placas de poliestireno de 96 poços na densidade de  $1 \times 10^4$  células/poço em um volume de 100  $\mu\text{L}$ /poço de meio suplementado com 10% de SBF e incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 horas, o meio de cultura foi retirado e então foram adicionadas mantas de nanofibras de 4mmx4mm, e 100 $\mu\text{l}$  de cada solução crescente de Bva (100, 178, 320, 560, 1000, 1780 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) em cada poço com meio de cultura. Outros meios também foram submetidos ao mesmo procedimento: células ARPE-19 mais o meio DMEM F12, utilizado como controle negativo; meio DMEM

F12, utilizado como branco; e o meio DMEM F12 e ARPE-19 com o DMSO, utilizado como controle positivo. As células foram, então, incubadas por 24 e 72 horas.

Ao final desse tempo, o meio foi removido, assim como as nanofibras, e adicionou-se 85 µL de MTT (5 mg/mL) e 105 µL de meio DMEM-F12 suplementado com SBF. Após 2 horas de incubação, os cristais de formazan precipitados foram solubilizados por adição de 55µL dodecilsulfato de sódio (SDS) contendo 10% de HCl. A densidade óptica foi medida a 595 nm usando um leitor de microplacas, pelo Espectrofotômetro Anthos 2010, após 18 horas. O desenho das placas está representado na Figura 4.6.

Figura 4.6 - Esquema da placa utilizada nos testes de citotoxicidade do Bevacizumabe e nanofibras para a ARPE-19.

Todos poços foram semeados com as células ARPE na densidade  $1 \times 10^4$  células/poço e após 24h foram adicionadas as soluções contendo a Bva em concentrações crescentes, assim como as nanofibras, com e sem a Bva.

Os dados foram expressos como percentagem de viabilidade celular em comparação com o controle (média ± desvio padrão). Os dados foram avaliados pelo programa Prism 5.04 por meio da análise de variância (ANOVA Two-way).  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significante. Pelo menos três experimentos independentes foram realizados para cada concentração.

## Capítulo 5: Resultados e Discussão

### 5.1 MEV e MET

As Figura 5.1, Figura 5.2 e Figura 5.3 mostram as imagens do MEV e a distribuição dos diâmetros presentes nas nanofibras de PCL/gelatina, PVA e Coaxial, e PCL/gelatina.Bva, PVA.Bva e Coaxial.Bva.

As imagens mostraram que os três grupos apresentaram fibras bem formadas, aleatoriamente distribuídas e sem beads, ou contas. Produzir fibras livres de defeitos e sem falhas depende da regulagem da tensão superficial e taxa de evaporação do solvente, permitindo assim a interação entre polímero e solvente (GONÇALVES *et al.*, 2015).

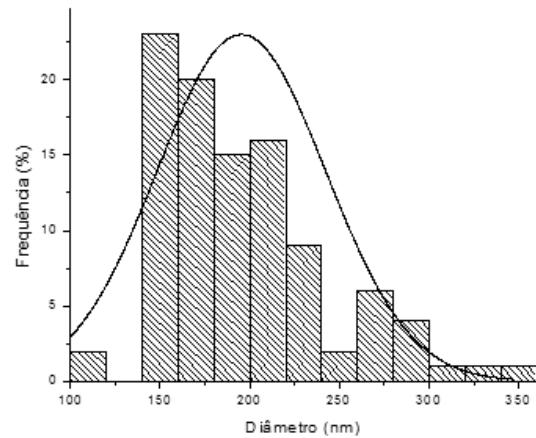
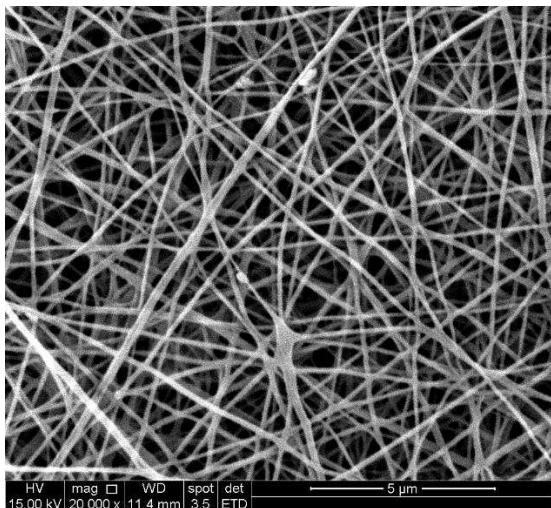
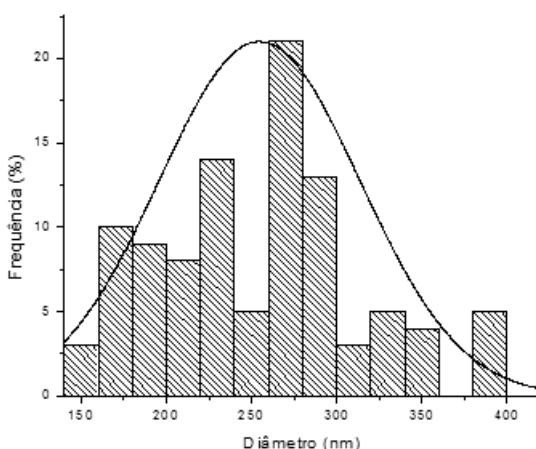
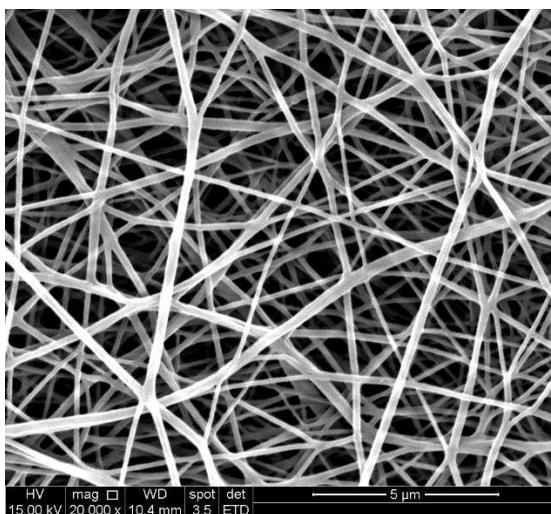
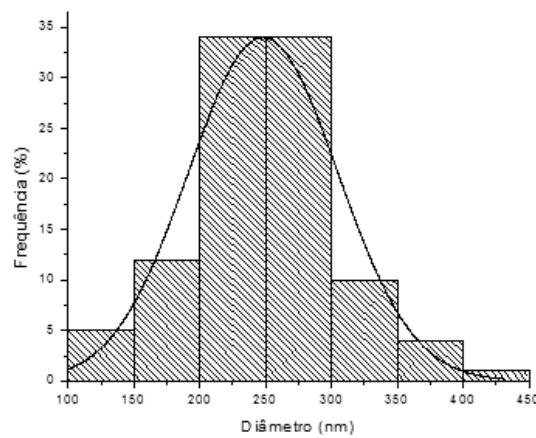
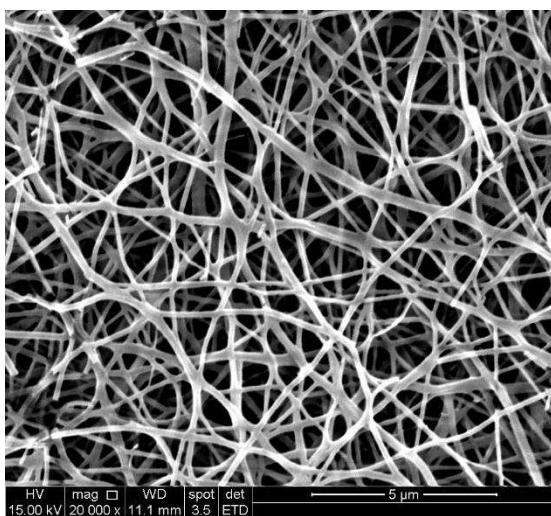
As fibras de PCL/gelatina com o Bva apresentaram diâmetros na faixa entre 50 a 450nm. As fibras de PVA apresentaram uma faixa maior entre 100 a 800nm. E os diâmetros das fibras coaxial apresentaram uma faixa entre 50 e 600nm.

A presença do Bva nas diferentes concentrações nas nanofibras não gerou grande diferença nos diâmetros das nanofibras, uma vez que a média dos diâmetros variou pouco entre elas (Tabela 1).

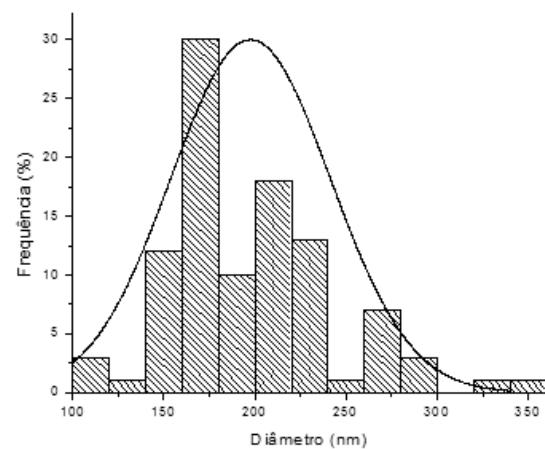
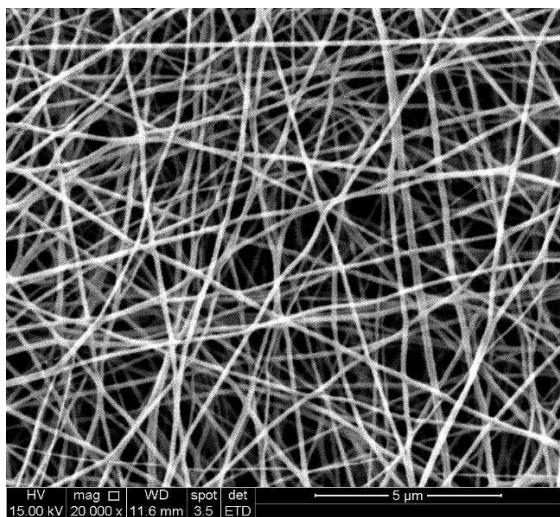
Tabela 1 - Média dos diâmetros das nanofibras PCL/gelatina, PVA e coaxial PCL/PVA nas diferentes concentrações de Bevacizumabe.

Média dos diâmetros das nanofibras (nm)

	PCL	PVA	Coaxial
nanofibra sem Bva	195±47	473±194	190±40
Bva 0,5%	255±59	299±69	224±44
Bva 1%	248±57	326±104	244±60
Bva 2%	198±44	313±109	272±86
Bva 4%	175±38	311±90	255±87

**a****b****c**

d



e

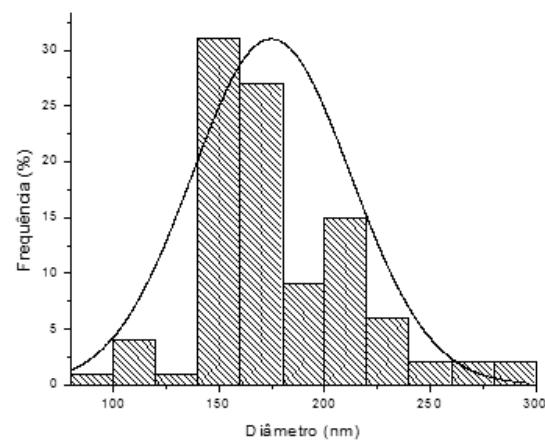
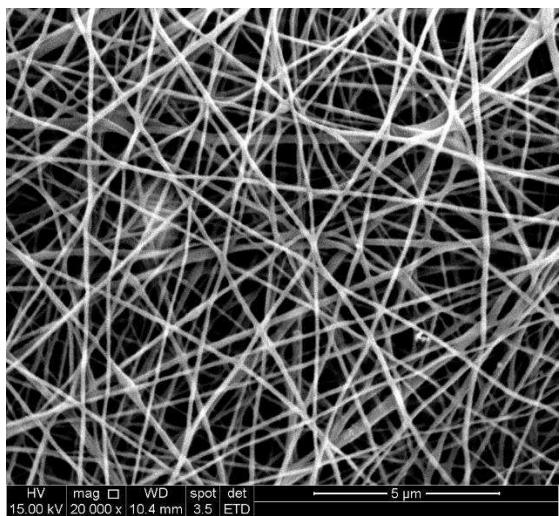
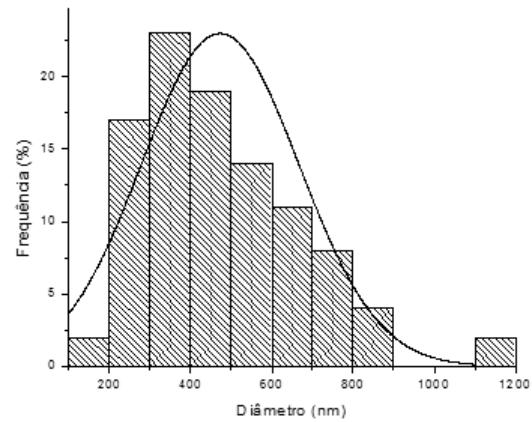
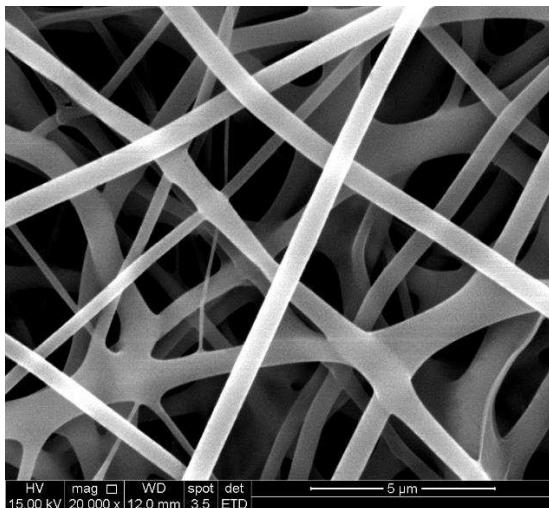
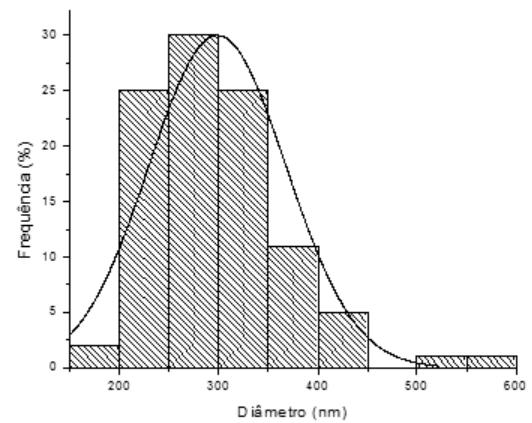
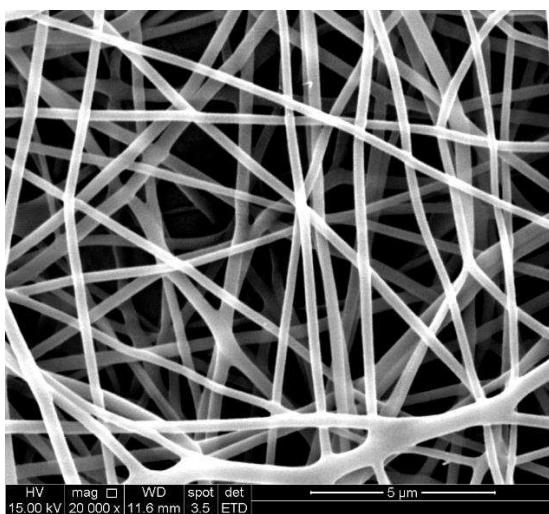
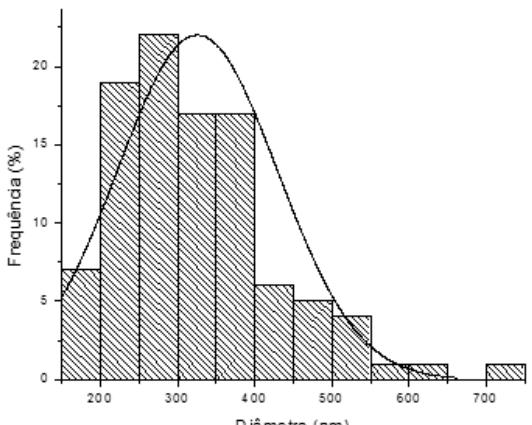
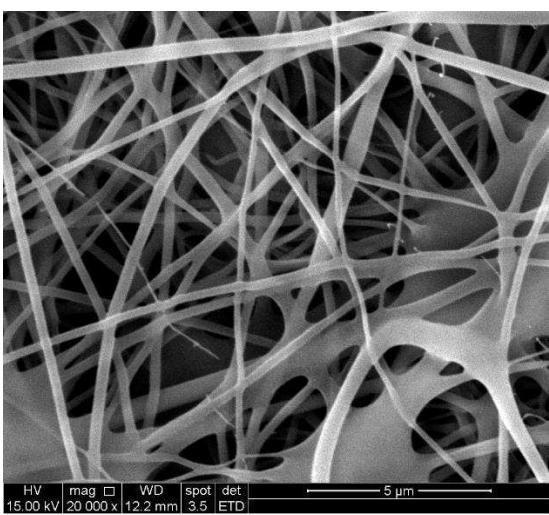
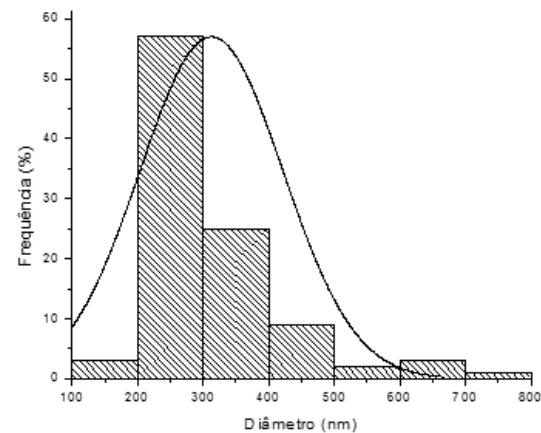
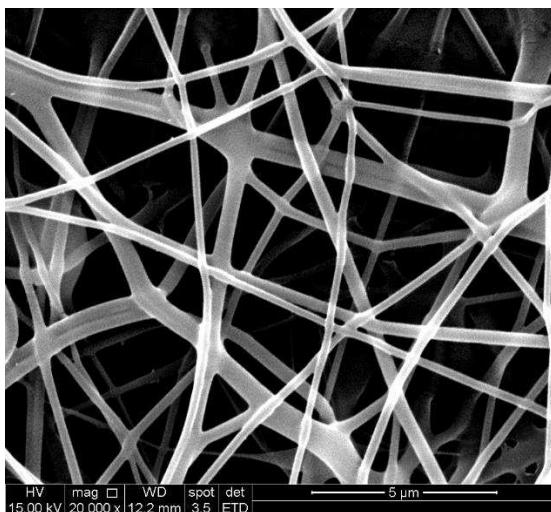


Figura 5.1 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (20.000X) e histogramas representativos dos diâmetros das nanofibras: (a) nanofibras de PCL/gelatina; (b) nanofibras de PCL/gelatina.Bva 0,5%; (c) nanofibras de PCL.gelatina.Bva 1%; (d) nanofibras de PCL.gelatina.Bva 2%; (e) nanofibras de PCL/gelatina.Bva 4%.

**a****b****c**

d



e

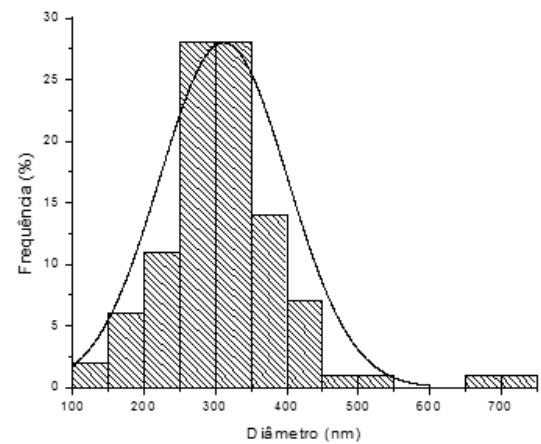
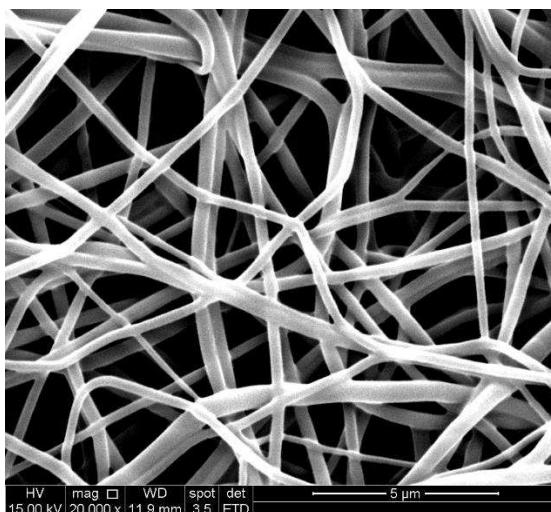
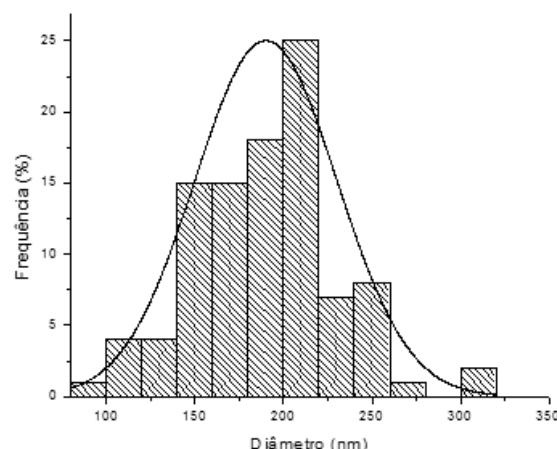
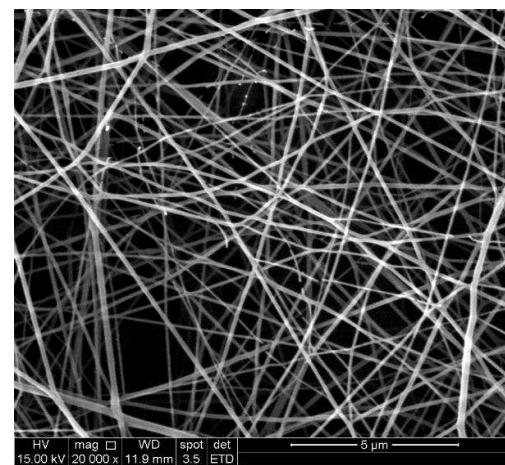
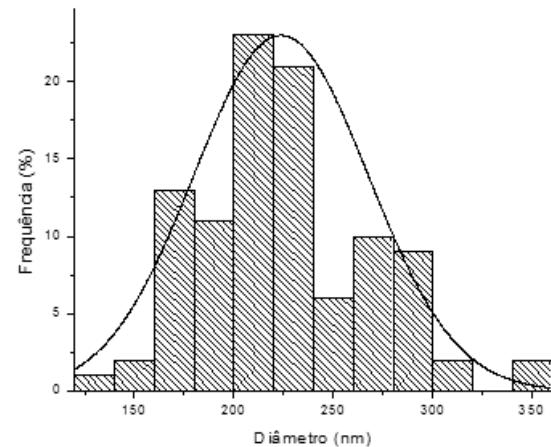
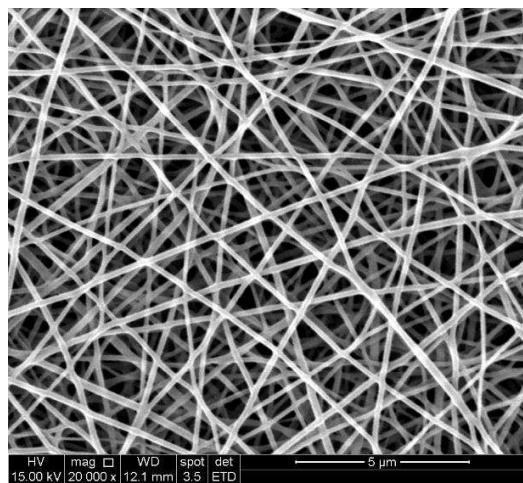
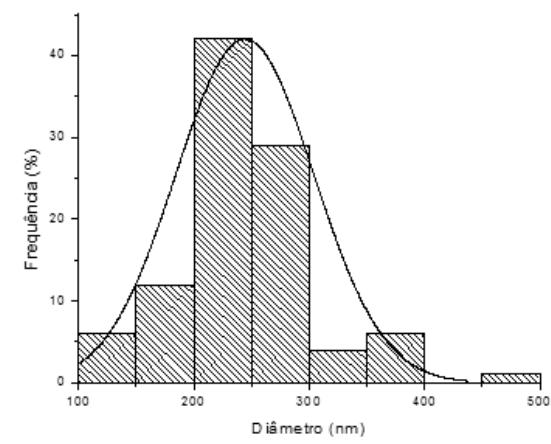
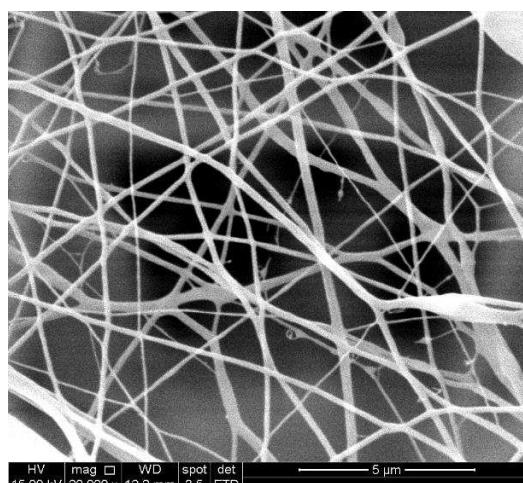
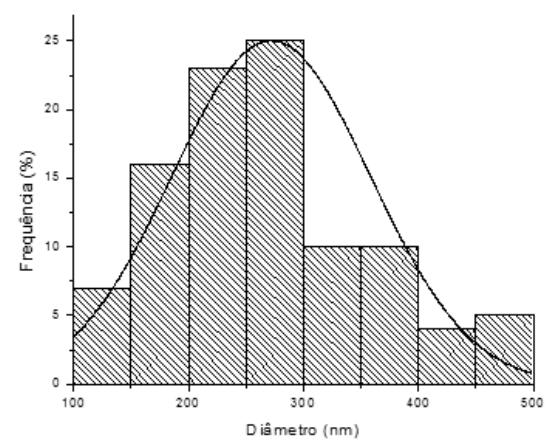
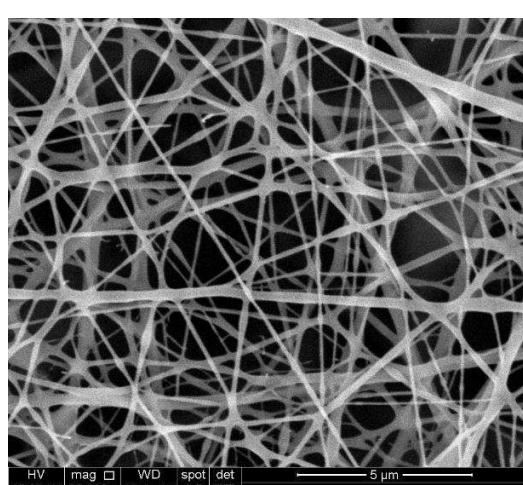


Figura 5.2 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (20.000 X) e histogramas representativos dos diâmetros das nanofibras: a) nanofibras de PVA; b) nanofibras de PVA.Bva 0,5%; c) nanofibras de PVA.Bva 1%; d) nanofibras de PVA.Bva 2%; e) nanofibras de PVA.Bva 4%.

a



**b****c****d**

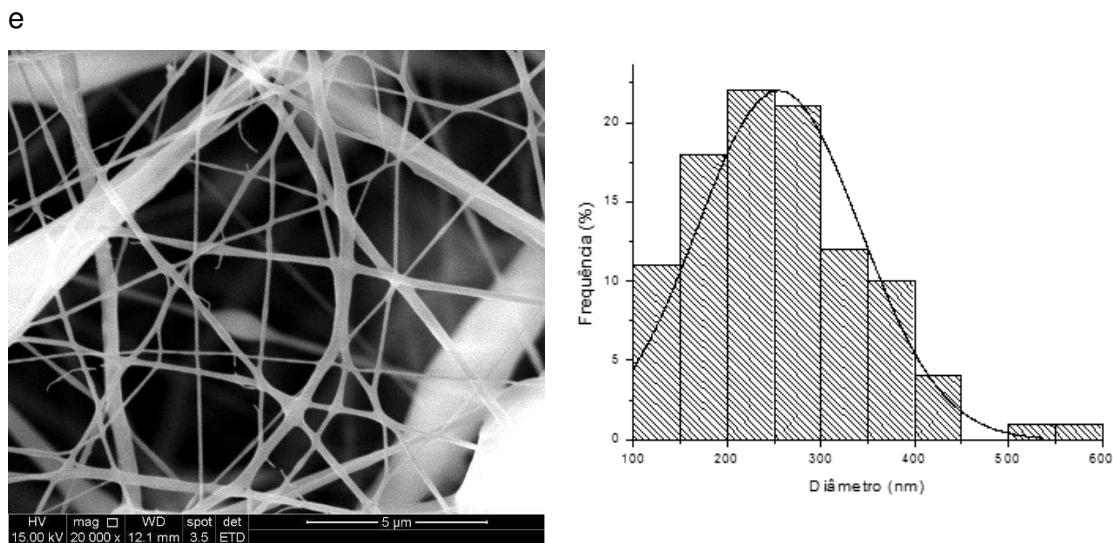


Figura 5.3 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (20.000 X) e histogramas representativos dos diâmetros das nanofibras. a) nanofibras Coaxial; b) nanofibras Coaxial.Bva 0,05%; c) nanofibras Coaxial.Bva 1%; d) nanofibras Coaxial.Bva 2%; e) nanofibras Coaxial.Bva 4%.

A imagem de microscopia eletrônica de transmissão, Figura 5.4, exibiu camada dupla devido aos diferentes pesos moleculares dos materiais presentes (WON *et.al*, 2012). Essa imagem da nanofibra coaxial foi possível, , devido a diferença de peso molecular entre a casca (PCL/gelatina) e núcleo (PVA) possibilitando sua distinção, apóas acrescentar o CuSO<sub>4</sub> ao núcleo.

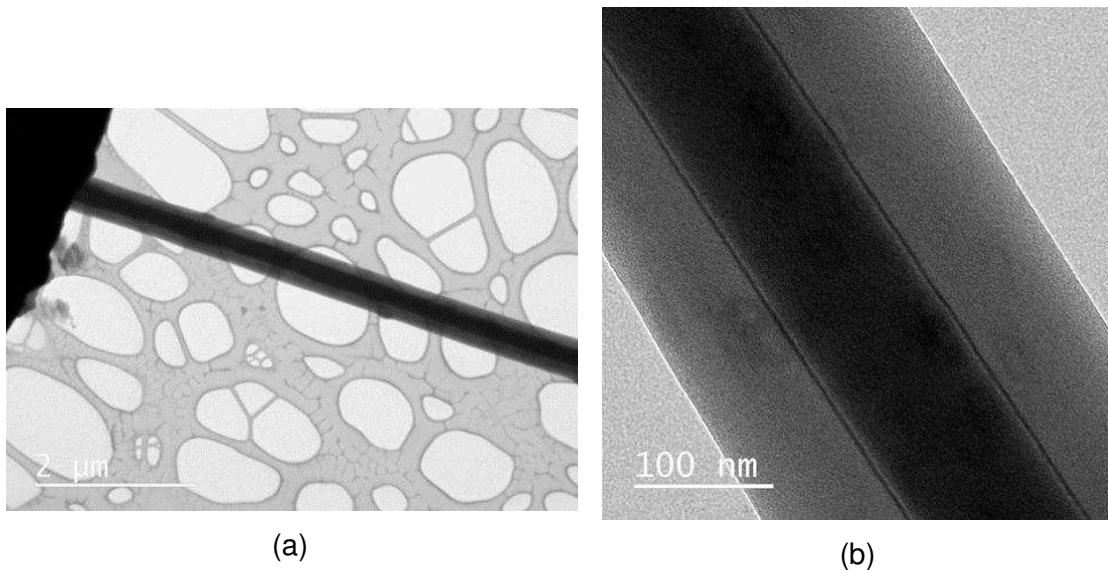


Figura 5.4 - Imagem da estrutura de nanofibrasCoaxial contendo CuSO<sub>4</sub> através de microscopia eletrônica de transmissão.

## 5.2 Análise Térmica

### 5.2.1 Análise térmica das nanofibras PCL/gelatina, PVA e Coaxial

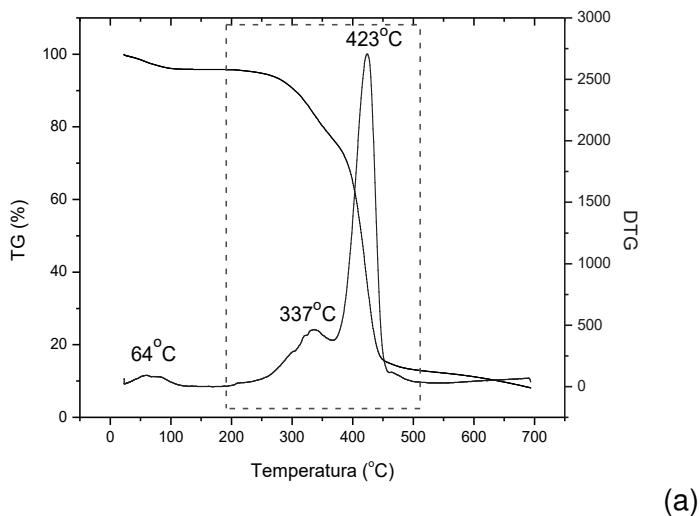
As curvas TG e DTG (primeira derivada das curvas TG) das nanofibras PCL/gelatina, PVA e Coaxial PCL/PVA permitiram a determinação das temperaturas de ocorrência de regimes de perdas de massa.Nas curvas de DSC, foram avaliados os valores de temperatura de fusão ( $T_m$ ), temperatura de cristalização ( $T_c$ ) e temperatura de transição vítreia ( $T_g$ ) dos polímeros, além da entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ) e entalpia de cristalização ( $\Delta H_c$ ).

As curvas da TG e DTG para a nanofibra de PCL/gelatina, Figura 5.5.a., apresentaram, na primeira etapa na faixa de 22 °C a 112 °C, um pico de temperatura máxima a 64 °C, apresentando perda de massa de aproximadamente 4%, associada à evaporação da água fisicamente adsorvida na rede polimérica. A segunda etapa, na faixa de 195 °C à 362 °C, apresentou um pico centrado em 337 °C correspondendo a uma perda de massa de aproximadamente 19%. Uma terceira etapa, na faixa de 373 °C a 505 °C, com pico centrado em 423 °C, apresentou perda de massa de aproximadamente 67%, atribuída à

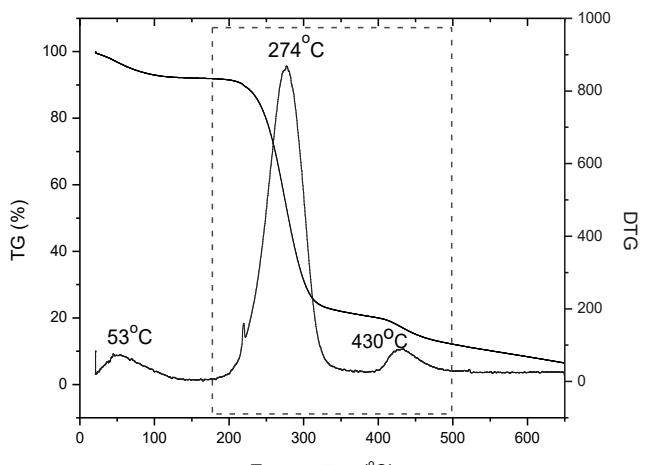
degradação térmica da cadeia polimérica. A segunda etapa está associada à degradação da gelatina presente nas nanofibras de PCL/gelatina, e a terceira etapa associada à degradação do PCL. PORTO (2007) encontrou uma temperatura máxima em 350°C e 62,2% de perda de massa associado à degradação da proteína em filmes de gelatina. CASARIN (2010) encontrou um início da faixa próximo aos 390°C com 98% de perda de massa associado a degradação do PCL. AGUDELE (2015) encontrou uma temperatura máxima de degradação em 320°C associada à perda de massa da gelatina, e em 405° C associado ao PCL, em uma nanofibra de PCL/gelatina 60:40.

As curvas TG e DTG para as nanofibras de PVA, Figura 5.5.b, apresentaram uma primeira etapa de degradação na faixa de 23°C a 119°C (pico de temperatura máxima a 53°C), com perda de massa de aproximadamente 7%, associada à evaporação da água/solventes. Uma segunda etapa na faixa de 182°C à 347°C apresentou um pico de degradação máxima centrado em 274°C, correspondendo a uma perda de massa de aproximadamente 70%, atribuída à fragmentação da cadeia do PVA e eliminação de moléculas menores (SCHREUDER *et.al*, 2002). Tais valores se mostram consistentes ao encontrado por PARPARITA *et al.*, 2012 e WON *et al.*, 2012. Uma terceira etapa de degradação na faixa de 391 °C a 495°C, e com pico centrado em 430 °C, apresentou perda de massa de aproximadamente 14%, a qual pode ser atribuída à degradação dos fragmentos restantes da molécula (MELO, 2012).

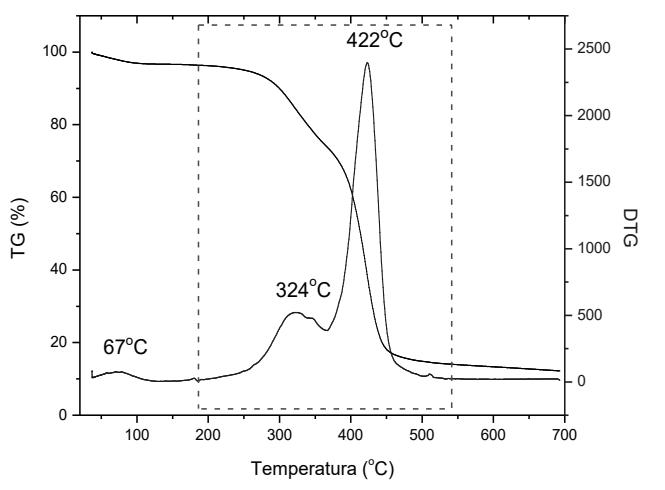
As curvas da TG e DTG para a nanofibra coaxial, Figura 5.5.c, apresentou uma primeira etapa de degradação, na faixa de 38 °C a 117 °C (pico de temperatura máxima a 67 °C), apresentando perda de massa de aproximadamente 3% associada à evaporação da água fisicamente adsorvida na rede polimérica. A segunda etapa, na faixa de 189 °C à 363 °C, apresentou um pico centrado em 324 °C correspondendo a uma perda de massa de aproximadamente 22%. A perda de massa nesta etapa pode ser atribuída à degradação da gelatina e degradação parcial do PVA. Uma terceira etapa, na faixa de 367 °C a 534 °C, com pico centrado em 422 °C, apresentou perda de massa de aproximadamente 62%, atribuída à degradação térmica do PCL e PVA na mesma faixa de temperatura.



(a)



(b)



(c)

Figura 5.5 - Análise da TG e DTG das nanofibras a)PCL/gelatina, b)PVA e c) coaxial.

As curvas DSC das nanofibras de PCL/gelatina, PVA e coaxial apresentaram características de polímeros semicristalinos, com picos de fusão durante o aquecimento, temperatura de transição vítreia e picos de cristalização no resfriamento (CASARIN, 2010). Na Tabela 2 estão listados os valores obtidos pelas curvas do DSC das várias transições observadas no primeiro aquecimento, resfriamento e segundo aquecimento.

Tabela 2 - Valores da temperatura de transição vítreia ( $T_g$ ), temperatura de fusão ( $T_m$ ), entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ), temperatura de cristalização ( $T_c$ ) e entalpia de cristalização ( $\Delta H_c$ ) obtidos no 1º aquecimento, resfriamento e 2º aquecimento das nanofibras de PCL, PVA e coaxial((1)representa os valores do 1º aquecimento, (2) resfriamento e (3) o 2º resfriamento) via DSC.

	Amostras					PCL					PVA				
	$T_g(^{\circ}C)$	$T_m(^{\circ}C)$	$\Delta H_m(mJ/mg)$	$T_c(^{\circ}C)$	$\Delta H_c(mJ/mg)$	$T_g(^{\circ}C)$	$T_m(^{\circ}C)$	$\Delta H_m(mJ/mg)$	$T_c(^{\circ}C)$	$\Delta H_c(mJ/mg)$	$T_g(^{\circ}C)$	$T_m(^{\circ}C)$	$\Delta H_m(mJ/mg)$	$T_c(^{\circ}C)$	$\Delta H_c(mJ/mg)$
PCL	(1)	-	50,7	46,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	(2)	-	-	-	10,5	-28,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	(3)	-	47,4	32,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PVA	(1)	-	-	-	-	-	-	219,7	47,3	-	-	-	-	-	-
	(2)	-	-	-	-	-	71	-	-	186,8	-57	-	-	-	-
	(3)	-	-	-	-	-	71,2	223,6	52,5	-	-	-	-	-	-
Coaxial	(1)	-	47,4	18,5	-	-	-	222,8	19,2	-	-	-	-	-	-
	(2)	-	-	-	12,4	-15,4	67	-	-	181,5	-19,7	-	-	-	-
	(3)	-	46	15,4	-	-	85	219,8	23,0	-	-	-	-	-	-

No primeiro aquecimento, Figura 5.6.a, a curva DSC da nanofibra de PCL/gelatina apresentou uma acentuada banda endotérmica associada ao processo de fusão do PCL com uma temperatura de 50°C e uma entalpia de 49,9 mJ/mg (que estão de acordo com AGUDELO,2015. Há um segundo evento endotérmico relacionada com o início da degradação térmica da gelatina, presente na nanofibra de PCL, que ocorre em torno de 180°C.

A curva DSC do PVA relativa ao primeiro aquecimento, Figura 5.6.b, apresentou eventos endotérmicos relacionados à perda de água (semelhante ao verificado na análise TG) com temperatura aproximada aos 120°C. Pode-se notar a temperatura de transição vítreia do PVA em torno de 75°C.

A curva DSC relativa ao primeiro aquecimento das nanofibras coaxiais, Figura 5.6.c, apresentou evento de fusão relacionado ao PCL à 47°C com entalpia de 18,5 mJ/mg. Além disso, eventos associados com a eliminação de voláteis (125°C) e de fusão do PVA também são notados. Estes resultados reforçam as informações reveladas por MET e comprovam a presença de PVA nas nanofibras coaxiais. A razão entre as entalpias de fusão dos polímeros nas nanofibras puras e as entalpias de fusão dos mesmos polímeros nas nanofibras coaxiais se mostra próxima da composição programada para as mantas, ou seja, 50/50 em massa de PVA/PCL.

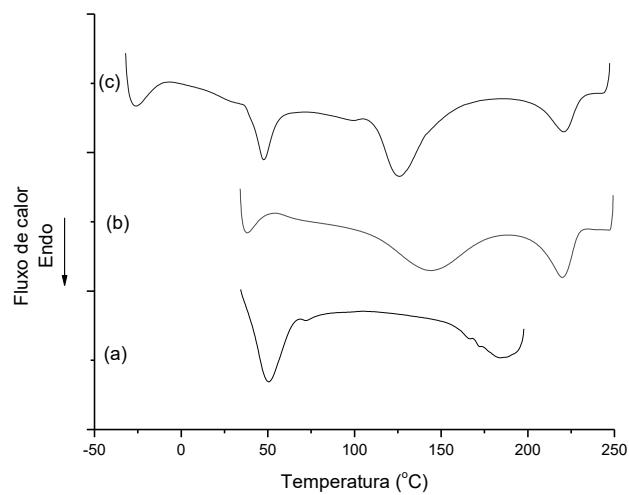


Figura 5.6 - Curvas DSC para o 1º aquecimento. Comparação das nanofibras a) PCL, b) PVA e c) coaxial.

No resfriamento, Figura 5.7.a, curva relativa às nanofibras de PCL/gelatina apresentou uma liberação de calor de cristalização a 10,5°C com entalpia de -28,6 mJ/mg, valor que está de acordo com o reportado por OLIVEIRA *et al.*, 2013. As nanofibras de PVA apresentaram cristalização à 186°C com entalpia de -57mJ/mg, similar ao reportado por HASSAN e PEPPAS, 2000. A nanofibra coaxial PC/PVA apresentou cristalização à 181°C com entalpia de -19,7mJ/mg referente ao PVA e cristalização à 12°C com entalpia de -15,5mJ/mg referente ao PCL.

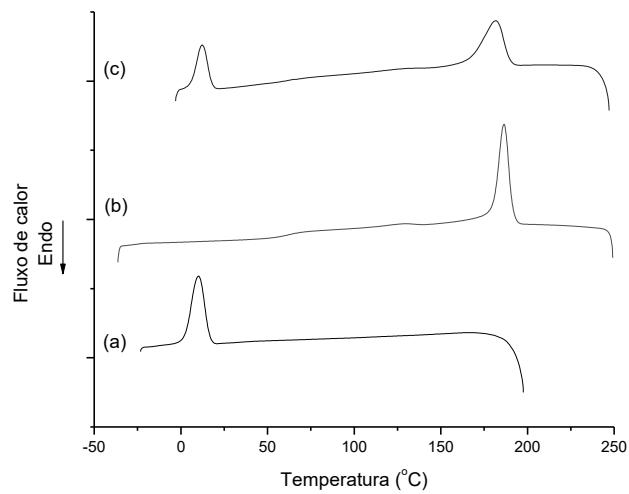


Figura 5.7 - Curvas do DSC para o resfriamento. Comparação das nanofibras a) PCL, b) PVA e c) coaxial.

No segundo aquecimento, Figura 5.8, as curvas DSC relativas a nanofibras de PCL e PVA apresentaram fusão do PCL e PVA em temperaturas aproximadas de 47°C e 223°C e entalpias de fusão de 32,3mJ/mg e 52,5mJ/mg, respectivamente (VOGELSANGERA *et al.*, 2003; ANDRADE *et.al.*, 2015). A nanofibra coaxial PCL/PVA apresentou dois eventos de fusão, um em 46°C com entalpia de 15,4mJ/mg referente ao PCL, e um outro em 219°C com entalpia de 23mJ/mg referente ao PVA. Não há eventos relativos à eliminação de voláteis, já que estes foram eliminados na primeira corrida.

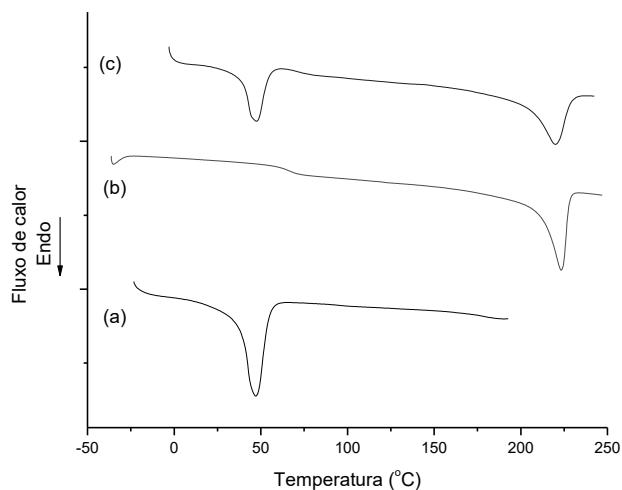


Figura 5.8 - Curvas DSC para o segundo aquecimento. Comparação das nanofibras a) PCL, b) PVA e c) coaxial.

### **5.2.2 Análise térmica das nanofibras PCL, PVA e Coaxial com as diferentes concentrações do Bevacizumabe.**

Na Tabela 3 estão listadas as temperaturas dos principais eventos encontrados na TG e DTG das nanofibras PCL, PVA e Coaxial, e das mesmas contendo 0,5%, 1%, 2% e 4% do Bevacizumabe.

Na Figura 5.9, são apresentadas as curvas TG dos três grupos contendo as concentrações do Bva. Foi observado que, para cada grupo, a decomposição do PCL, PVA e Bva começou na mesma faixa de temperatura. Gomes (2011) encontrou, para a amostra de Bevacizumabe liofilizado, uma perda de massa na temperatura entre 248,06 °C e 311,61 °C de 27,04% atribuída à decomposição parcial do fármaco, e uma segunda perda de massa de 14,49 % entre 311,61 °C e 373,66°C. Estas etapas de degradação não foram detectadas claramente nas curvas TG das nanofibras com Bva, devido, provavelmente, à baixa concentração do Bva nas nanofibras.

Tabela 3 - Resultados da TG e DTG das nanofibras de PCL, PVA e Coaxial e das nanofibras PCL, PVA e coaxial contendo Bevacizumabe.

Amostra	1a Etapa			2a Etapa			3a Etapa			4a Etapa		
	Temp. de Perda de Água (°C)	Temp. Máxima (°C)	Perda de Água %	Temp. de Decomposição (°C)	Temp. Máxima (°C)	Decomposição %	Temp. de Decomposição (°C)	Temp. Máxima (°C)	Decomposição %	Temp. de Decomposição (°C)	Temp. Máxima (°C)	Decomposição %
PCL	22-112	64	3,94	195- 362	337	19,88	373-505	423	67,23	-	-	-
PCL.Bva 0,5%	22-108	63	3,32	212-363	328	19,20	369-507	426	65,74	-	-	-
PCL.Bva 1%	24-108	63	3,47	218-360	331	19,36	367-482	422	67,32	-	-	-
PCL.Bva 2%	22-109	63	4,05	195-363	324	20,62	369-483	420	65,04	-	-	-
PCL.Bva 4%	25-112	70	4,64	198-361	320	22,82	368-486	422	60,59	-	-	-
PVA	23-119	53	7,18	182-347	274	70,67	391-495	430	14,56	-	-	-
PVA.Bva 0,05%	24-118	63	7,78	182-369	270	70,10	383-465	433	22,23	-	-	-
PVA.Bva 1%	22-122	57	6,59	181-367	281	69,45	383-496	434	14,70	-	-	-
PVA.Bva 2%	21-96	49	6,75	180-380	276	67,88	481-472	427	13,06	-	-	-
PVA.Bva 4%	20-110	51	6,93	181-386	298	64,91	392-498	432	14,06	-	-	-
Coaxial	38-117	67	3	189-363	324	22,30	367-534	422	62,8	-	-	-
Coaxial. Bva 0,5%	24-113	61	5,12	191-362	330	22,30	369-514	415	57,3	515-689	689	9,98
Coaxial. Bva 1%	24-115	68	5,36	216-360	331	24,40	363-443	401	51,09	445-518	451	12,12
Coaxial. Bva 2%	22-132	63	6,51	218-360	343	76,17	363-502	411	-	536-687	584	15,5
Coaxial. Bva 4%	22-115	63	5,30	212-362	331	27,29	365-518	410	57,94	-	-	-

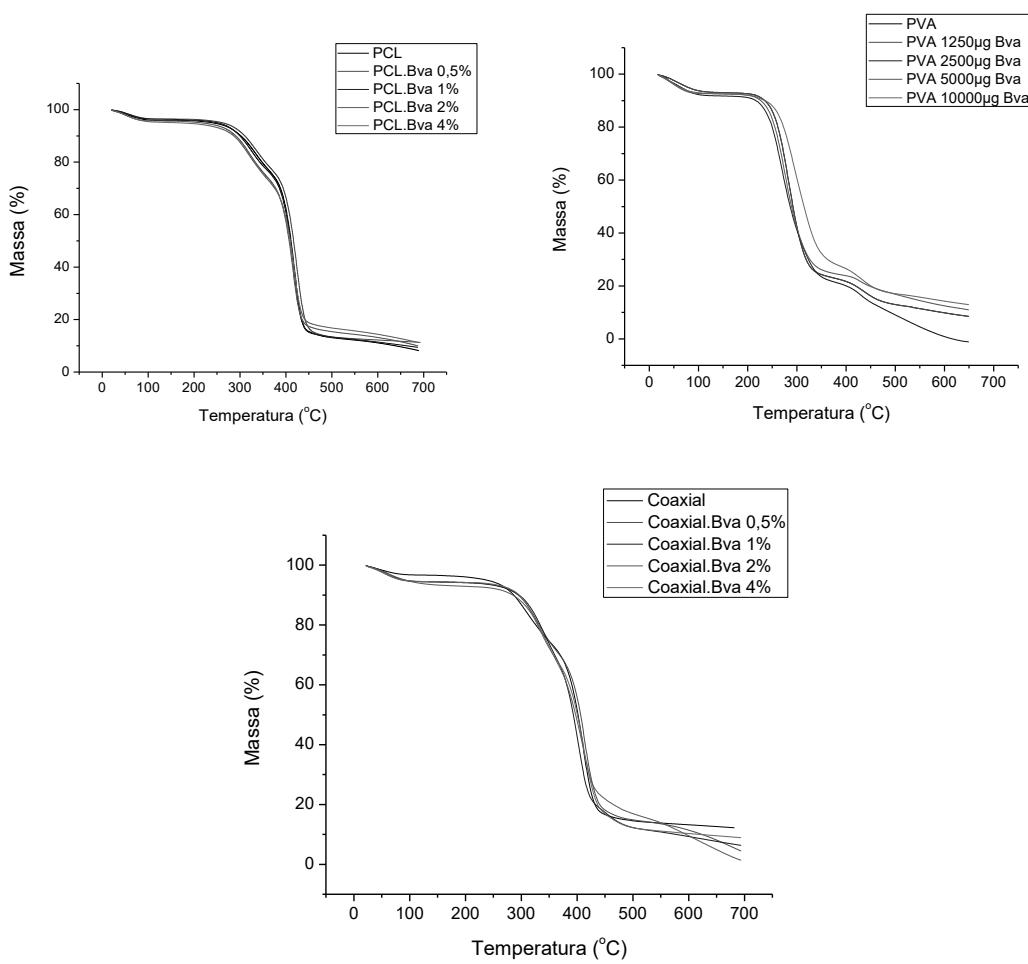


Figura 5.9 - Curvas da TG das nanofibras de PCL, PVA e Coaxial e das nanofibras PCL, PVA e coaxial contendo Bevacizumabe.

Na Tabela 4 e nas Figura 5.10, Figura 5.11 e Figura 5.12 são listados e representados os valores obtidos pelas curvas DSC no primeiro aquecimento, resfriamento e segundo aquecimento para as nanofibras PCL, PVA e coaxial e as mesmas contendo 0,5%, 1%, 2% e 4% do bevacizumabe. Não foi observada uma diferença significativa nos valores encontrados de temperatura e entalpia de eventos térmicos entre as nanofibras sem o Bva e as nanofibras com o Bva, provavelmente devido a baixa concentração de Bva nas nanofibras. Também não foi observado nenhum evento térmico específico para o Bevacizumabe. Gomes 2012 encontrou nas curvas DSC do Bevacizumabe liofilizado um fenômeno endotérmico em 145,63°C atribuído à fusão do fármaco, não sendo apresentada perda de massa na curva TG a essa temperatura. WANG 2000 relatou a dificuldade em identificar a Tg das proteínas em formulações, e TIAN *et al.*, 2006 a dificuldade de se identificar as transições de proteínas como o Bevacizumabe.

Tabela 4 - Valores da temperatura de transição vítreia (Tg), temperatura de fusão (Tm), entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ) e temperatura de cristalização (Tc) e entalpia de cristalização ( $\Delta H_c$ ) obtidos no 1º aquecimento, resfriamento e 2º aquecimento das curvas DSC das nanofibras de PCL/gelatina, PVA e coaxial e das nanofibras PCL/gelatina, PVA e coaxial contendo Bevacizumabe ((1)representa os valores do 1º aquecimento, (2) resfriamento e (3) 2º resfriamento).

Amostras		PCL					PVA				
		Tg(°C)	Tm(°C)	$\Delta H_m$ (mJ/mg)	Tc(°C)	$\Delta H_c$ (mJ/mg)	Tg(°C)	Tm(°C)	$\Delta H_m$ (mJ/mg)	Tc(°C)	$\Delta H_c$ (mJ/mg)
PCL	(1)	-	50,7	46,9	-	-	-	-	-	-	-
	(2)	-	-	-	10,5	-28,6	-	-	-	-	-
	(3)	-	47,4	32,3	-	-	-	-	-	-	-
PCL.Bva 0,05%	(1)	-	49,4	22,4	-	-	-	-	-	-	-
	(2)	-	-	-	10,3	-26,1	-	-	-	-	-
	(3)	-	49,3	26,9	-	-	-	-	-	-	-
PCL.Bva 1%	(1)	-	49,7	33,7	-	-	-	-	-	-	-
	(2)	-	-	-	9,6	-28,9	-	-	-	-	-
	(3)	-	47,8	29,4	-	-	-	-	-	-	-
PCL.Bva 2%	(1)	-	49,8	30,2	-	-	-	-	-	-	-
	(2)	-	-	-	9,2	-24,8	-	-	-	-	-
	(3)	-	48,6	26,3	-	-	-	-	-	-	-
PCL.Bva 4%	(1)	-	50,8	31,1	-	-	-	-	-	-	-
	(2)	-	-	-	8,8	-25,7	-	-	-	-	-
	(3)	-	50,5	25,7	-	-	-	-	-	-	-
PVA	(1)	-	-	-	-	-	-	219,7	47,3	-	-
	(2)	-	-	-	-	-	71	-	-	186,8	-57
	(3)	-	-	-	-	-	-	223,6	52,5	-	-
PVA.Bva 0,05%	(1)	-	-	-	-	-	-	218,1	42,7	-	-
	(2)	-	-	-	-	-	73,5	-	-	189,4	-53,3
	(3)	-	-	-	-	-	71,3	225,3	50,3	-	-
PVA.Bva 1%	(1)	-	-	-	-	-	-	215,8	30,8	-	-
	(2)	-	-	-	-	-	70,7	-	-	186,2	-52,5
	(3)	-	-	-	-	-	69,4	222,9	51,0	-	-
PVA.Bva 2%	(1)	-	-	-	-	-	-	215,9	39,2	-	-
	(2)	-	-	-	-	-	70,5	-	-	184,4	-48,5
	(3)	-	-	-	-	-	70,8	221,3	47,8	-	-
PVA.Bva 4%	(1)	-	-	-	-	-	-	216,16	36,4	-	-
	(2)	-	-	-	-	-	75,2	-	-	181,6	-56,1
	(3)	-	-	-	-	-	73,3	218,3	50,7	-	-
Coaxial	(1)	-	47,4	18,5	-	-	222,8	19,2	-	-	-

	(2)	-	-	-	12,4	-15,4	67	-	-	181,5	-19,7
	(3)	-	46	15,4	-	-	-	219,8	23,0	-	-
	(1)	-	48	31,9	-	-	-	220,6	14,7	-	-
Coaxial.Bva 0,05%	(2)	-	-	-	11,5	-19,8	73,4	-	-	182,7	-15,9
	(3)	-	46,7	20,5	-	-	-	219,9	16,7	-	-
	(1)	-	48,4	20,7	-	-	-	217,9	13,2	-	-
Coaxial.Bva 1%	(2)	-	-	-	12,1	-12,1	66,9	-	-	177,5	-28,7
	(3)	-	46,9	11,2	-	-	-	219,9	30,6	-	-
	(1)	-	47,7	23,9	-	-	-	220,6	15,8	-	-
Coxial.Bva 2%	(2)	-	-	-	12,6	-16,8	73	-	-	181,4	-16,9
	(3)	-	47,4	18,8	-	-	-	219,9	18,7	-	-
	(1)	-	47,8	23,6	-	-	-	218,1	15,4	-	-
Coaxial.Bva 4%	(2)	-	-	-	12,9	-15,1	72,4	-	-	178,8	-19,4
	(3)	-	46,8	15,7	-	-	-	218,7	21	-	-

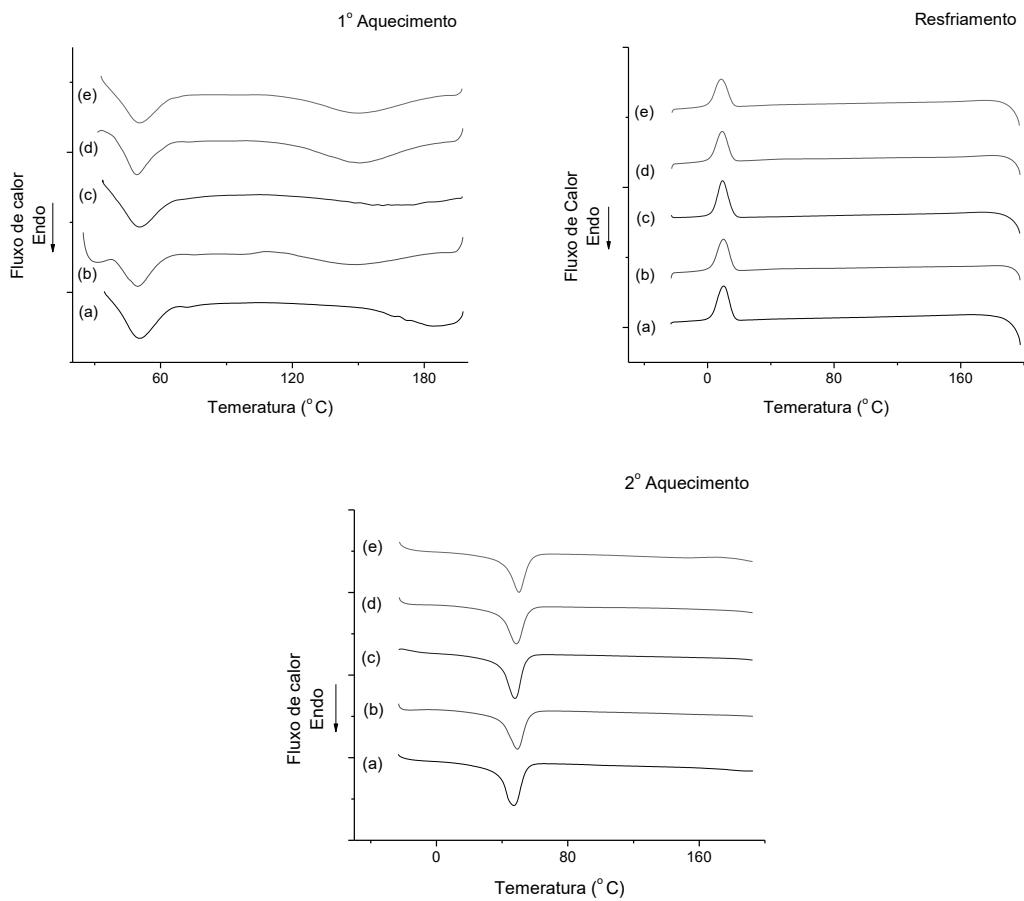
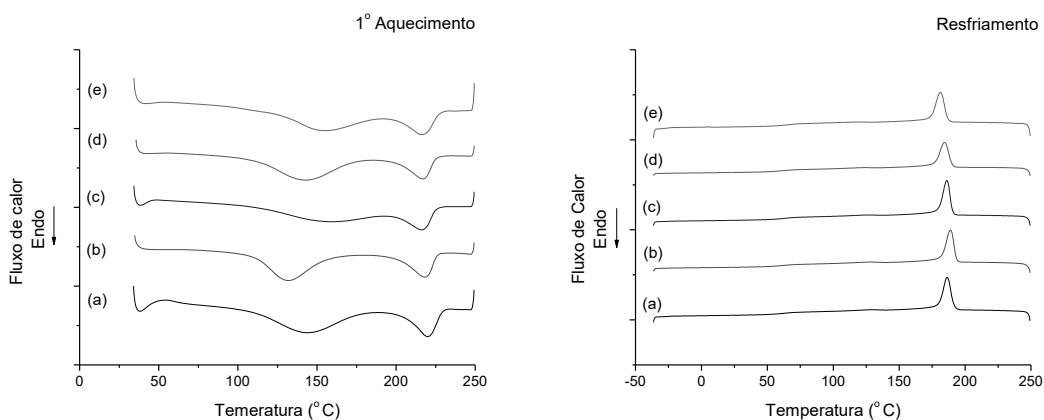


Figura 5.10 - Curvas de DSC para o 1º aquecimento, resfriamento e 2º aquecimento das nanofibras: (a) PCL, (b) PCL.Bva 0,5%, (c) PCL.Bva 1%, (d) PCL.Bva 2%, (e) PCL.Bva 4%.



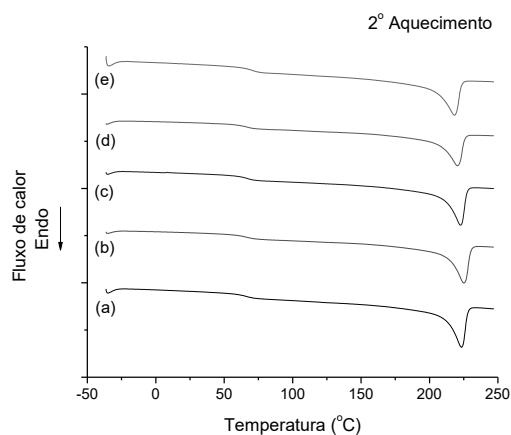


Figura 5.11 - Curvas de DSC para o 1º aquecimento, resfriamento e 2º aquecimento das nanofibras: (a) PVA, (b) PVA.Bva 0,5%, (c) PVA.Bva 1%, (d) PVA.Bva 2%, (e) PVA.Bva 4%.

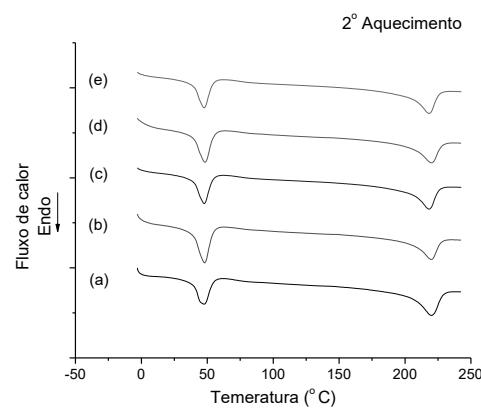
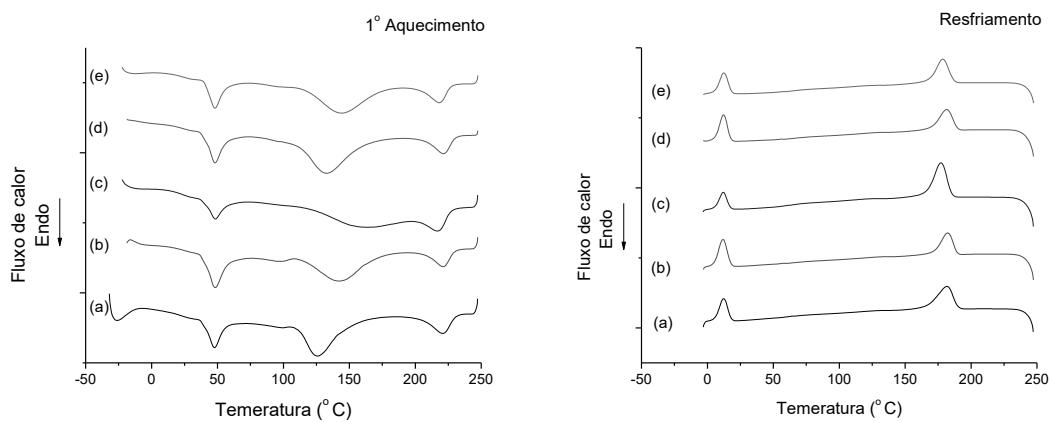


Figura 5.12 - Curvas de DSC para o 1º aquecimento, resfriamento e 2º aquecimento das nanofibras: (a) Coaxial, (b) Coaxial.Bva 0,5%, (c) Coaxial.Bva 1%, (d) Coaxial.Bva 2%, (e) Coaxial.Bva 4%.

### 5.3 Infravermelho FTIR-ATR

#### 5.3.1 Espectros infravermelho das nanofibras PCL/gelatina, PVA e Coaxial

A Figura 5.13 ilustra os espectros de infravermelho para o polímero PCL. Foram observadas duas bandas em  $2943\text{cm}^{-1}$  e  $2862\text{cm}^{-1}$  atribuídas às deformações axiais simétricas e assimétricas, respectivamente, do grupo  $\text{CH}_2$ . Uma intensa banda em  $1724\text{cm}^{-1}$ , atribuída ao sinal de deformação axial de carbonila ( $\text{C=O}$ ) do grupo éster, também foi observada. Uma banda em  $1246\text{cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento assimétrico  $\text{C-O-C}$ , e uma banda em  $1168\text{cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento simétrico  $\text{C-O-C}$  também podem ser notadas no espectro. (MOTIWALLA *et al.*, 2013; SWAIN *et al.*, 2015).

Além dessas bandas, foi observada a banda  $3288\text{ cm}^{-1}$  atribuída à vibração do grupo amina N-H relacionada a gelatina presente na nanofibra de PCL. Segundo (DASH e KONKIMALLA, 2012), o grupo N-H ocorre em um intervalo entre  $3400\text{-}3440\text{cm}^{-1}$ , mas é deslocada para frequências mais baixas, aproximando de  $3300\text{cm}^{-1}$  quando o grupo N-H dos peptídeos está envolvido em ligação de hidrogênio. Bandas em  $1642\text{cm}^{-1}$  do grupo Amida I e  $1530\text{cm}^{-1}$  do grupo Amida II (LU *et al.*, 2011, AGUDELO, 2015) relativos à gelatina também estão presentes no espectro das nanofibras PCL/gelatina e comprovam a presença deste componente no sistema.

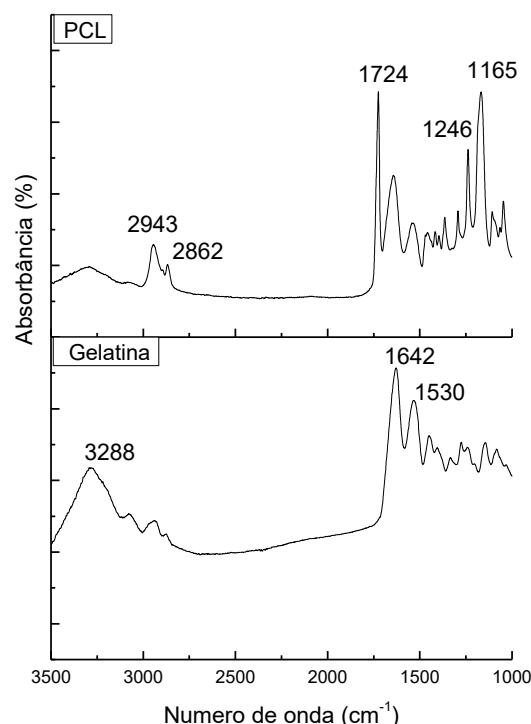


Figura 5.13 - Espectro FTIR-ART das nanofibras de PCL/gelatina e filme de gelatina.

O espectro do PVA, apresentado na Figura 5.14, mostrou uma banda entre as regiões 3600-3200 cm<sup>-1</sup> que corresponde à vibração de estiramento do grupo OH<sup>-</sup>. Há ainda, no espectro do PVA, uma banda de absorção em 2950 cm<sup>-1</sup> relacionada ao estiramento assimétrico do grupo –CH<sub>2</sub>, uma banda em 2902cm<sup>-1</sup> relacionada ao estiramento C-H e 1425 relacionada a CH<sub>2</sub>. Além dessas, uma banda de absorção em 1096cm<sup>-1</sup>, devido ao estiramento C-O-C (ISLAM e YEUM, 2013; TURAGA *et al.*, 2014), também pode ser observada.

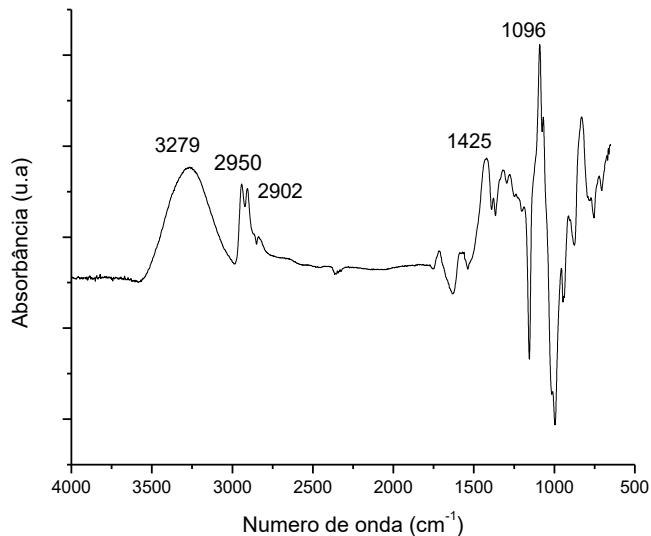


Figura 5.14 - Espectro do FTIR-ATR das nanofibras de PVA.

Para comprovar a presença do PCL e PVA na nanofibra coaxial, foi feita a dissolução da nanofibra coaxial e comparada com a nanofibra de PVA, sendo definida como o controle. Foi observado nos espectros apresentados na Figura 5.15 que, após lavar a nanofibra coaxial PCL/PVA com o TFE, ocorreu a dissolução e remoção do PCL, comprovada pela ausência das suas bandas 1724 cm<sup>-1</sup>, 1642 cm<sup>-1</sup> e 1530 cm<sup>-1</sup>, (SWAIN *et al.*, 2015). A presença residual das bandas 1425 cm<sup>-1</sup> e 1092 cm<sup>-1</sup> (ISLAM e YEUM, 2013), características do PVA, indicam apenas a sua presença quando comparado ao controle PVA.

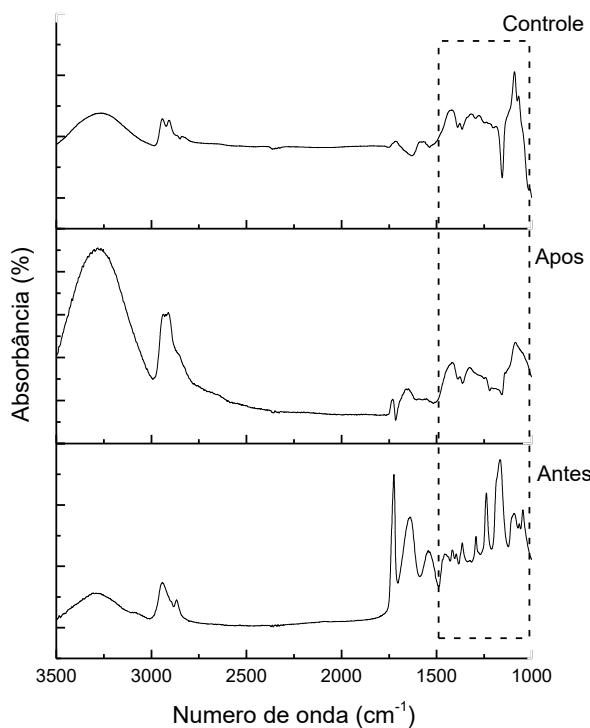


Figura 5.15 - Comparaçāo dos espectros de FTIR-ATR das nanofibras coaxial antes de ser lavada com TFE, aps ser lavada e a nanofibras de PVA como controle.

Após se lavar as nanofibras coaxial PCL/PVA com DMSO ocorreu a dissolução do PVA. Foi observada, pela Figura 5.16, a presença da banda  $1724 \text{ cm}^{-1}$  (SWAIN *et al.*, 2015) características do PCL, indicando a sua presença residual quando comparada ao controle PCL. Assim sendo, confirma-se mais uma vez a presença dos dois polímeros na nanofibra coaxial. As bandas características da gelatina nāo foram observadas aps a dissolução.

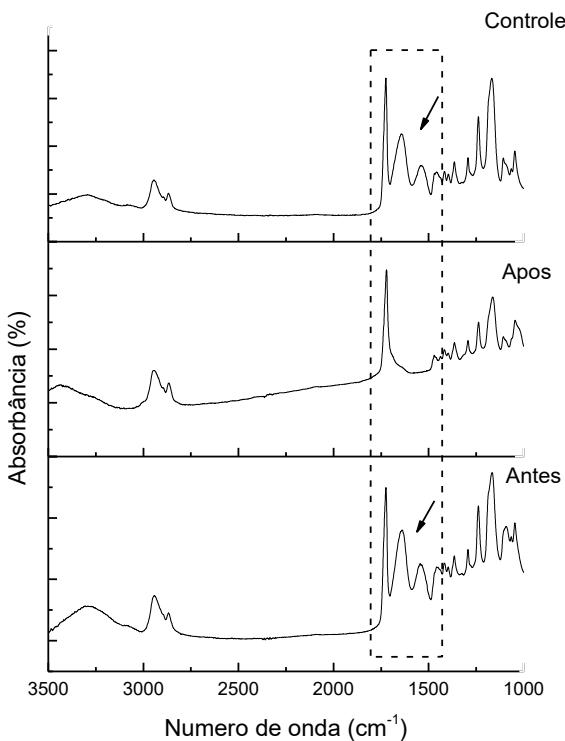


Figura 5.16 - Comparação dos espectros de FTIR-ATR da nanofibra coaxial PCL/PVA antes de ser lavada, após ser lavada e a nanofibra de PCL como controle.

### 5.3.2 Espectros infravermelho das nanofibras PCL/gelatina, PVA e Coaxial com a incorporação do Bevacizumabe

Os espectros infravermelho das nanofibras PCL/gelatina, PVA e Coaxial contendo 0,5%, 1%, 2% e 4% do Bva apresentaram as mesmas bandas específicas de cada polímero já citadas no tópico anterior, não havendo diferença dos espectros com as quatro concentrações do Bva. A Figura 5.17 apresenta os espectros das nanofibras com BVA 4%, sendo estes comparados com o espectro do Beva obtido a partir da secagem de uma solução contendo o fármaco.

No espectro do Bevacizumabe foi observada uma banda em  $3278\text{cm}^{-1}$  atribuída aos grupos N-H presentes na estrutura do fármaco. Essa banda da amina em se tratando de anticorpo é considerada complexa (KONG e YU, 2007), e se confunde com outras relacionadas com água e amina encontradas na gelatina e PVA.

A banda encontrada em  $1636\text{ cm}^{-1}$ , atribuída a amida I, é característica do Bevacizumabe (PAUL *et al.*, 2012, FERREIRA, 2014), mas nos espectros das nanofibras ela não se destaca uma vez que a região das bandas amida I (1700-1600

$\text{cm}^{-1}$ ) coincide com bandas de absorção presentes na gelatina, PCL e PVA (KONG e YU, 2007). Além disso, deve-se ressaltar que a baixa concentração do fármaco nas nanofibras dificulta a identificação das suas bandas de absorção.

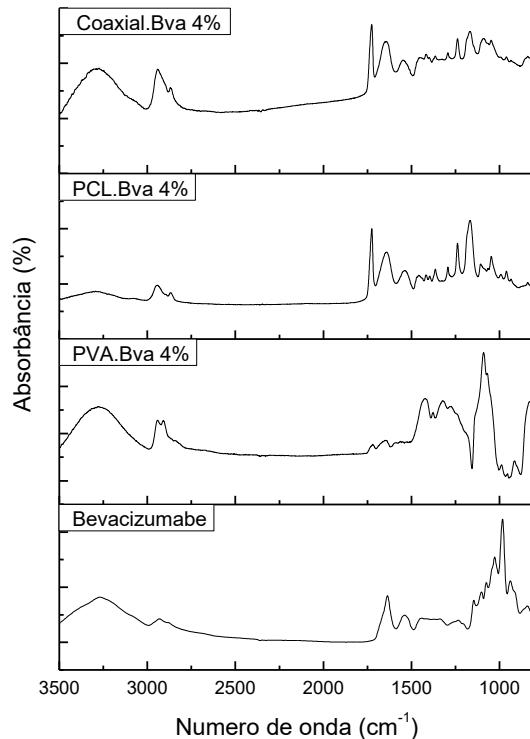


Figura 5.17 - Espectro da solução do Bevacizumabe, e das nanofibras PCL, PVA e Coaxial contendo Bva 10%.

## 5.4 Ensaios biológicos

### 5.4.1 Avaliação da atividade do Bevacizumabe pelo teste ELISA indireto

Com o intuito de se quantificar o Bevacizumabe nas nanofibras de PVA.Bva a 2 e 4% e Coaxial.Bva contendo também 2 e 4% de Bva, foi desenvolvido um ensaio imunoenzimático baseado na interação do anticorpo (Anti-Human IgG) com seu antígeno, onde foi definida uma curva padrão para o Bevacizumabe e posteriormente as concentrações do Bva liberado das nanofibras. Na Figura 5.18, a solução amarela em cada poço representa onde ocorreu a interação anticorpo-antígeno do Bva após adicionar a solução reveladora.

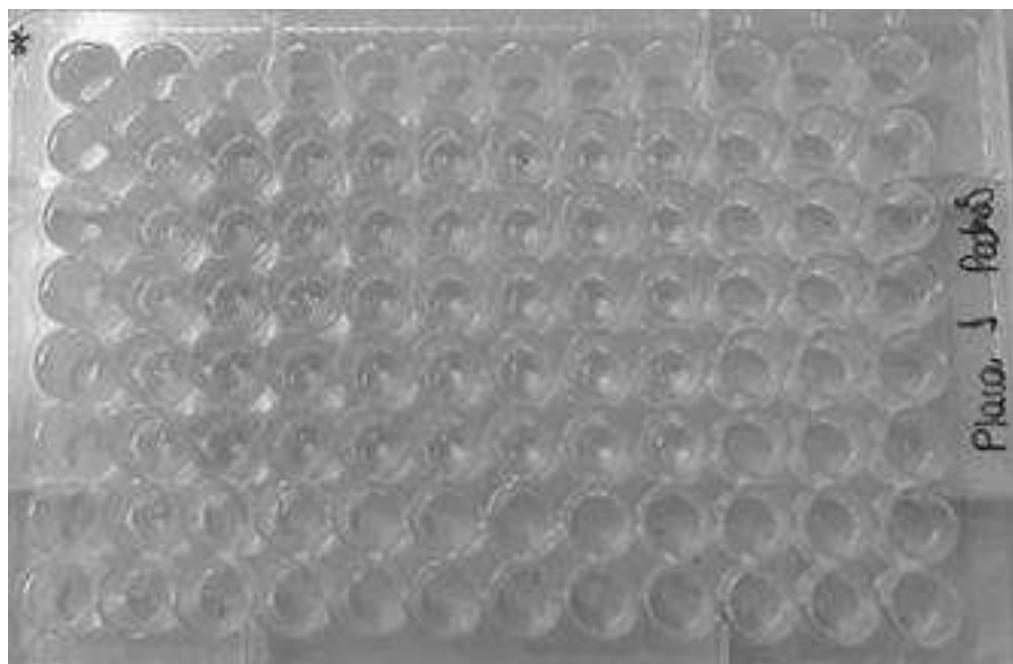


Figura 5.18 - Representação da interação anticorpo antígeno das concentrações do Bva para a curva padrão.

Para a determinação da linearidade do método, a curva padrão foi construída a partir dos valores obtidos nas corridas de seis diferentes concentrações do Bva ( $0,78\mu\text{g/ml}$ ;  $0,39\mu\text{g/ml}$ ;  $0,195\mu\text{g/ml}$ ;  $0,098\mu\text{g/ml}$ ;  $0,049\mu\text{g/ml}$ ;  $0,024\mu\text{g/ml}$ ). A curva obtida, assim como o coeficiente de correlação linear e a equação da reta são apresentados na Figura 5.19.

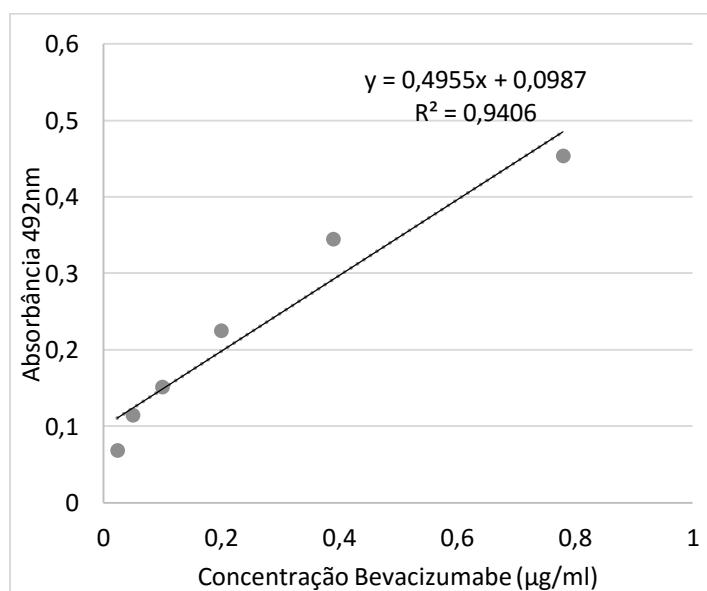


Figura 5.19 - Curva padrão do Bevacizumabe.

Para fins de demonstração do perfil de liberação encontrado nas nanofibras de PVA.Bva 2% e 4%, e das nanofibras Coaxial.Bva 2% e 4%, Figura 5.20, a amostra PVA.Bva 4% foi adotada como referência para valor máximo de 100% liberação de fármaco, uma vez que essa amostra apresentou uma maior quantidade de Bva liberado.

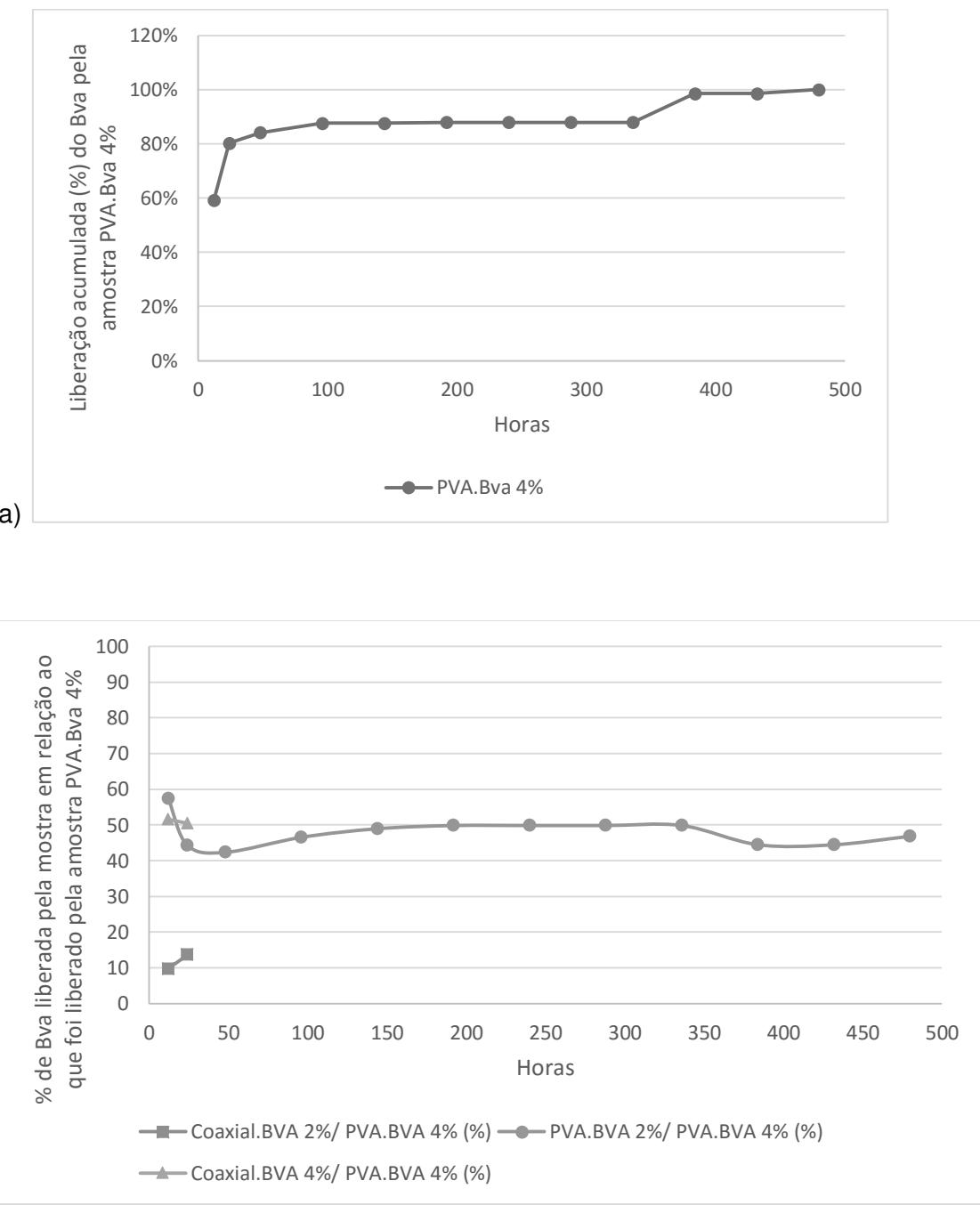


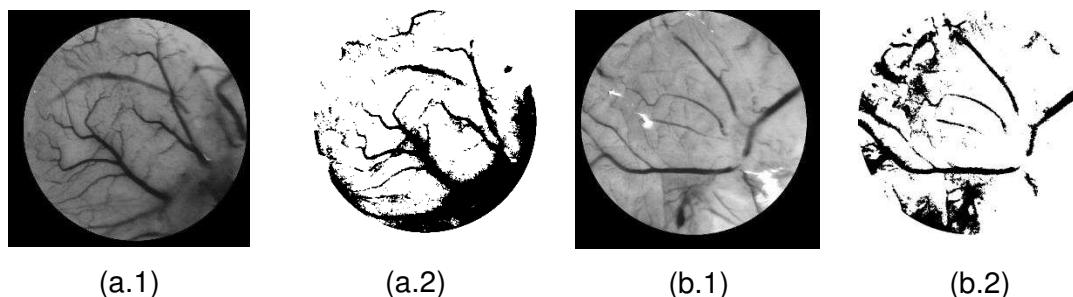
Figura 5.20 - (a) Liberação acumulada (%) da Bva na amostra PVA.Bva 4%. (b) Perfil de liberação do Bva das nanofibras em relação a amostra PVA.Bva 4%.

A Figura 5.20-a mostra que aproximadamente 60% da liberação do fármaco ocorreu nas primeiras 12 horas do ensaio. O restante do fármaco foi liberado de maneira lenta e regular até o final dos 21 dias de teste (em média, a manta de PVA 4% de 8mm x 8mm liberou 0,1 µg de Bva por dia após as primeiras 50 horas de ensaios). Como referência, em um tratamento comum de DMRI, injeta-se 1,25mg de Bva a cada três meses (equivalente a 13µg/dia) no olho afetado.

A Figura 5.20-b compara o comportamento em relação à liberação do Bva da amostra PVA.Bva 4% com as amostras PVA.Bva 2% e Coaxial.Bva 4%. Percebe-se que o padrão de liberação da manta de PVA com 2% de Bva é o mesmo que o da manta de PVA com 4% de Bva (ou seja, liberação rápida no início e lenta a partir das primeiras 50 horas). Além disso, pode-se notar que o valor liberado da manta com 2% de Bva é aproximadamente 50% daquele da manta com 4% de Bva, o que confirma a expectativa em relação ao efeito da concentração de Bva na manta na quantidade liberada (a quantidade de Bva na manta 2% é a metade daquela na manta com 4%). Quanto à comparação com a manta Coaxial 2%, pode-se observar que os valores liberados são bem menores que aqueles liberados pelas mantas de PVA (as quantidades liberadas a partir do terceiro dia de ensaios são tão pequenas que não foram capazes de serem quantificadas pelo método usado). Este resultado confirma a hipótese que a casca de PCL/gelatina reduz a taxa de liberação do fármaco concentrado no núcleo de PVA. Vale mencionar que o PVA é um polímero que apresenta grande afinidade com água, o que leva a ele apresentar grande expansão em meio aquoso que acelera a liberação das moléculas incorporadas.

#### **5.4.2 Avaliação da angiogênese utilizando o modelo Membrana Corioalantóica (CAM) de embrião de galinha**

A Figura 5.21 ilustra os vasos das membranas dos grupos PBS, solução comercial de Bevacizumabe e das nanofibras, e suas respectivas imagens em pixels, onde foram contabilizados a redução dos vasos.



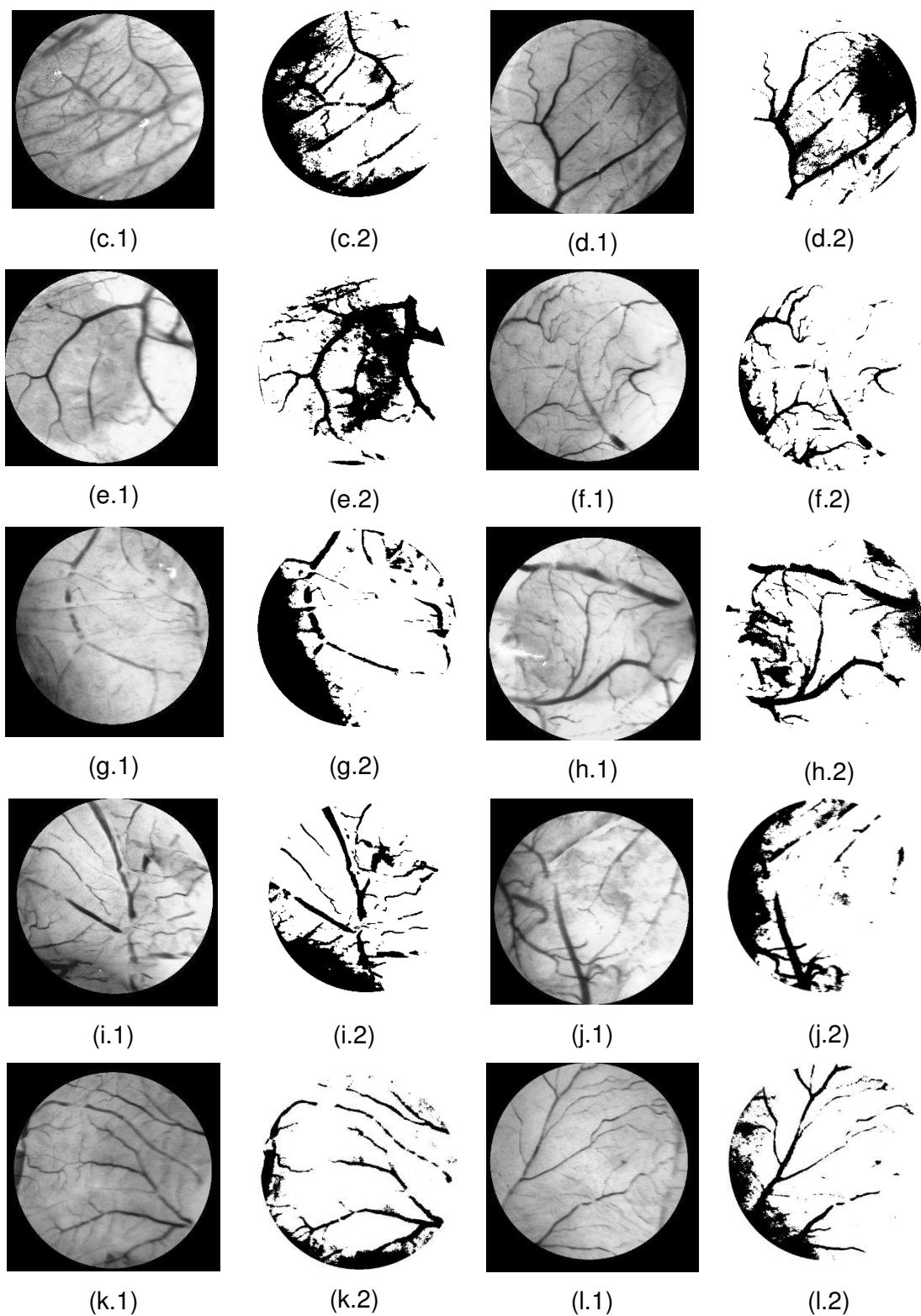
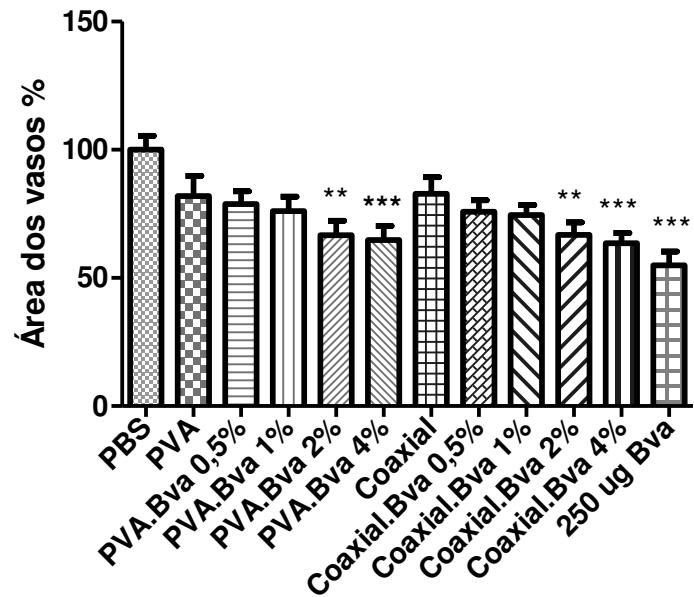


Figura 5.21 - Imagens dos vasos e respectivos pixels dos grupos: (a) PBS; (b) 250 $\mu$ g Bva; nanofibras: (c) Pva, (d)PVA.Bva 0,5%, (e)PVA.Bva 1%, (f)PVA.Bva 2%, (g) PVA.Bva 4%, (h)Coaxial (i) Coaxial.Bva 0,5%, (j) Coaxial.Bva 1%, (k) Coaxial.Bva 2%, (l) Coaxial.Bva 4%.

A Figura 5.22 apresenta os resultados obtidos da redução dos vasos após a aplicação dos grupos nos ovos de galinha.



### Tratamentos

Figura 5.22 - Redução dos vasos sanguíneos das amostras em relação ao controle (PBS).

Foi observada uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) dos vasos no grupo contendo 250 $\mu$ g do Bevacizumabe, como também das nanofibras de PVA.Bva 2% e 4% e Coaxial.Bva 2% e 4% em relação ao grupo controle (PBS). NOWAK-SLIWINSKA *et al.*, (2012) utilizaram diferentes doses de Bevacizumabe e observaram que a redução da angiogênese na CAM é proporcional à concentração aplicada de Bevacizumabe. Não houve diferença estatisticamente significante na resposta obtida entre as nanofibras de PVA.Bva 0,5% e 1% e coaxial. Bva 0,5% e 1% em relação ao controle (PBS).

Além disso, após a aplicação das nanofibras sobre a membrana corioalantóica, o aspecto da CAM não foi alterado, não foi observada neovascularização ou resposta inflamatória, indicando que tanto as nanofibras sem o Bva quanto as nanofibras contendo o Bva não apresentaram sinais de toxicidade nas membranas avaliadas.

### 5.4.3 Avaliação da citotoxicidade pela redução do MTT

Os resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA Two-way) onde  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significante. O experimento foi realizado em triplicata biológica e experimental e as medidas foram realizadas após 24 e 72 horas (Figura 5.23 e Figura 5.24).

Ressaltando, os poços com o Bva foram preenchidos com 10, 17.8, 32, 56, 100 e 178 $\mu$ g do Bva, e as amostras, 4x4mm, das nanofibras PCL.Bva 4%, Pva.Bva 4% e coaxial.Bva 4% possuíam aproximadamente 23  $\mu$ g do Bva.

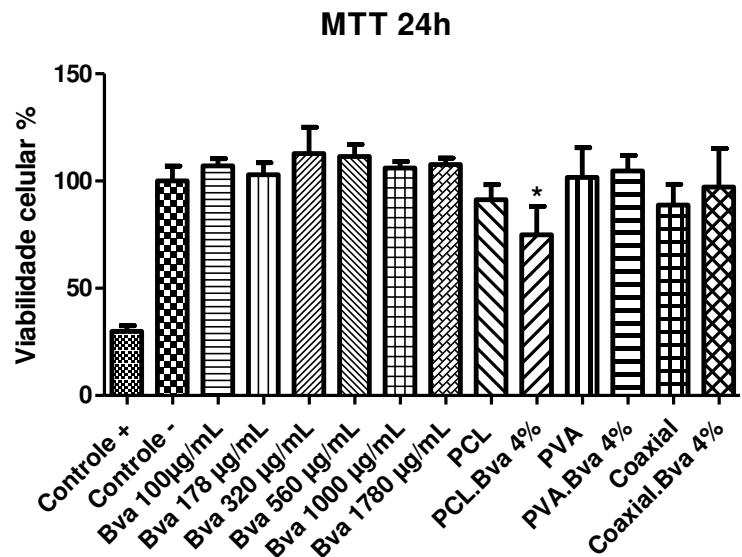


Figura 5.23 - Viabilidade celular em 24 horas através do ensaio MTT.

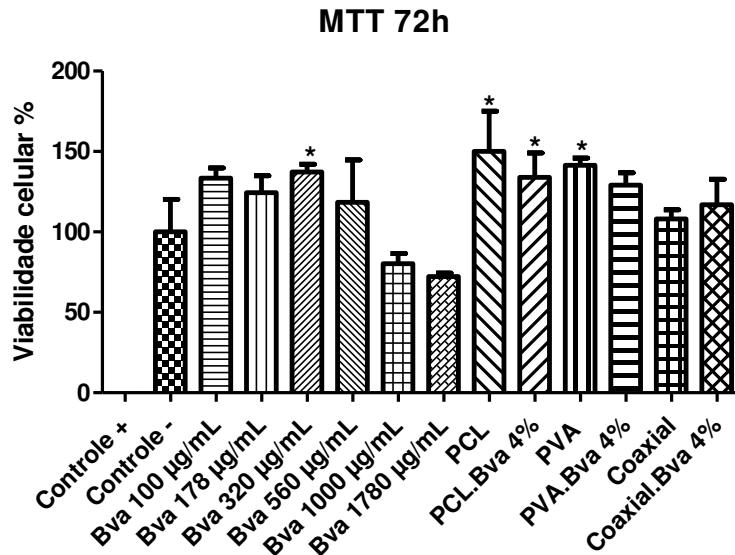


Figura 5.24 - Viabilidade celular em 72 horas através do ensaio MTT.

No intervalo de 24 horas, os resultados mostraram que o grupo controle negativo e os grupos contendo a solução do Bevacizumabe, nas diversas concentrações, não apresentaram redução na viabilidade celular. KREMPPEL, 2015 evidenciou que o Bva nas concentrações de 250 e 500 $\mu$ g/mL não foi tóxico para as células. As nanofibras de PCL, PVA, Coaxial e as nanofibras de PVA e Coaxial contendo Bva apresentaram uma pequena redução da viabilidade celular, mas não apresentaram efeito citotóxico significante ( $P < 0,05$ ) comparado ao controle negativo. A nanofibra de PCL contendo o Bva apresentou uma redução significativa em relação ao controle negativo. Essa citotoxicidade pode ser um artefato de manuseio da amostra durante o procedimento, uma vez que não foi observada citotoxicidade em nenhuma amostra contendo solução de Bva, e a quantidade de Bva presente na nanofibra se enquadra no intervalo dessas concentrações, e na nanofibra de PCL. Além disso, no intervalo de 72 horas, não foi observada essa redução de viabilidade celular.

No intervalo de 72 horas, os resultados mostraram uma redução da viabilidade celular do grupo contendo 1000 e 1780 $\mu$ g/mL de Bva, mas não sendo significativo quando comparado ao controle negativo. SPITZER *et al.*, 2006 não encontraram citotoxicidade nas células ARPE nas concentrações de Bevacizumabe até 800  $\mu$ g/mL, mas uma redução moderada com a concentração 2500  $\mu$ g/mL após as 24horas. As nanofibras não apresentaram redução da viabilidade celular quando comparadas ao grupo controle, não apresentando nenhum efeito tóxico.

O grupo contendo Bva e algumas nanofibras apresentaram proliferação celular (SOUTO *et al.*,2011), sendo significativo ( $P < 0,05$ ) para o grupo contendo Bva 320 µg/mL, nanofibras PCL, PCL.Bva 4% e nanofibras de PVA quando comparado ao grupo controle negativo. A presença da gelatina na nanofibra de PCL melhora a superfície da nanofibra quanto a hidrofilia facilitando a interação da célula com o meio e favorecendo a sua proliferação. (SAFAEIJAVAN *et al.*, 2014)

## Capítulo 6: Conclusão

A técnica de electrospinning se mostrou uma ferramenta adequada para a obtenção de fibras poliméricas com diâmetros nanométricos e aspecto homogêneo. Esta técnica permitiu também a formação de nanofibras com estrutura *core-shell*: PCL/gelatina como formador da casca, enquanto o núcleo foi formado pelo PVA contendo o fármaco.

As imagens de MEV não demonstraram grandes diferenças morfológicas entre as nanofibras de PCL/gelatina e PVA quando comparadas as nanofibras coaxial. E as diversas nanofibras conservaram a mesma morfologia com a presença do Bevacizumabe.

Resultados de FTIR e análises térmicas indicaram a presença dos dois polímeros (PVA e PCL) e gelatina nas nanofibras obtidas por eletrofiação coaxial. Os espectros de infravermelho não variaram com a presença do Bevacizumabe, como também o comportamento térmico.

Através do ensaio imunoenzimático ELISA, foi revelada a presença do Bevacizumabe nas nanofibras de PVA e Coaxial PCL/PVA de 2% e 4% sobre o conjugado Anti-Human IgG (Fc specific). Foi possível perceber uma liberação mais lenta do Bevacizumabe da nanofibra coaxial quando comparada com a nanofibra de PVA.

A viabilidade celular não foi reduzida na presença do Bevacizumabe e nas nanofibras com e sem o Bevacizumabe, sugerindo que as nanofibras não apresentaram citotoxicidade.

Estudos empregando o modelo da CAM sugeriram que o Bevacizumabe manteve a sua atividade antiangiogênica quando incorporado nas nanofibras.

## **Capítulo 7: Sugestões para trabalhos futuros**

O foco desse trabalho foi o desenvolvimento de um sistema de liberação controlada contendo Bevacizumabe para tratamento da DMRI.

Como perspectiva pretende-se melhorar o sistema em relação ao tempo de liberação do fármaco, apesar de também ser interessante uma concentração mais elevada do Bevacizumabe. Em seguida aprimorar com estudos de liberação in vivo, inserindo um implante na retina revestido com essa nanofibra, permitindo veicular diferentes tipos de fármaco.

## Referências Bibliográficas

- AGARWAL S, WENDORFF JH, GREINER A. *Use of electrospinning technique for biomedical applications*. Polymer, Elsevier, v.49, n.26, p5603-5621, dez. 2008.
- AGUDELO RR. Preparação E Caracterização de Matrizes De Liberação Controlada De Doxiciclina À Base De Nanofibras De Policaprolactona E Gelatina Carreadas Com Nanopartículas De Hidroxiapatita. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais, 2015, 88p. (Dissertação, Mestrado em Química Inorgânica).
- ALCOBIA DS. *Produção de Nanofibras Alinhadas de Polímeros Biodegradáveis Para Crescimento e Regeneração de Células Neurais*. São Paulo: Universidade de São Paulo Instituto de química, 2013. 128p (Dissertação, mestrado em Química Orgânica).
- ANDERSON OA, BAINBRIDG JWB, SHIMA DT. *Delivery of anti-angiogenic molecular therapies for retinal disease*. Drug Discovery Today, Elsevier, v.15, n.7-8, p272-282, abril 2010.
- ARANHA IB, LUCAS EF. *Poli (Álcool Vinílico) Modificado com Cadeias Hidrocarbonadas: Avaliação do Balanço Hidrófilo/Lipófilo*. Polímeros, v.11, n.4, p174-181, 2001.
- BAJI A, MAI YW, WONG SC, ABTAHI M, CHEN P. *Electrospinning of polymer nanofibers: Effects on oriented morphology, structures and tensile properties*. Compositites Science and Technology, Elsevier, v.70, n.5, p703-718, maio 2010.
- BHARDWAJ N, KUNDU SC. *Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique*. Biotechnology Advances, Elsevier, v.28, n.3, p325-347, jan. 2010.
- CAMPOS A, MARCONATO JC, FRANCHETTI SMM. *Biodegradation of Blend Films PVA/PVC, PVA/PCL in Soil and Soil with Landfill Leachate*. Brazilian Archives Of Biology And Technology, v.54, n.6, p1367-1378, dez. 2011.
- CASARIN SA. Blendas de PHBV e PCL Para Uso Em Dispositivos em Osteossíntese. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2010, 187p (Tese, Doutorado em Ciências e Engenharia de Materiais).

- CHEN YH, WU PC, SHIEA J, LO LH, WU YC, KUO HK. *Evaluation of the Sterility, Stability, and Efficacy of Bevacizumab Stored in Multiple-Dose Vials for 6 Months.* Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics, v.25, n.1, p65-70, fev. 2009.
- COLLINS G, FEDERICI J, IMURA Y, LUIZ H, CATALANI LH. *Charge generation, charge transport, and residual charge in the electrospinning of polymers: A review of issues and complications.* Journal of Applied Physics, Melville, v.111, n.4, p719-724, fev. 2012.
- CONLEY SM, NAASH MI. *Nanoparticles for retinal gene therapy.* Progress in Retinal and Eye Research, Elsevier, v.29, n.5, p376-397, set. 2010.
- COSTA, VP. Câmara Técnica de Oftalmologia do CFM defende regularização do uso de bevacizumabe no tratamento da DMRI. Jornal Oftalmológico Jota Zero, Medicamentos, p41, Out.2011.
- COSTA RGF, OLIVEIRA JE, PAULA GF, PICCIANI PHS, MEDEIROS ES, RIBEIRO C, MATTOSO LHC. *Eletrofiação de Polímeros em Solução. a: Fundamentação Teórica.* Polímeros, Artigo Técnico Científico, v.22, n2, p170-177, 2012.
- COSTA RGF, OLIVEIRA JE, PAULA GF, PICCIANI PHS, MEDEIROS ES, RIBEIRO C, MATTOSO LHC. *Eletrofiação de Polímeros em Solução. a: Aplicações e Perspectivas.* Polímeros, Artigo Técnico Científico, v.22, n2, p178-185, 2012.
- CROWTHER, J., The ELISA Guidebook; Methods In Molecular Biology. Second. Humana Press, ed., 2000.149p.
- CUNHA TF. *Aplicação do Poli (ε-Caprolactona) com Estrutura Estrelada Para Obtenção de Microesferas Biorreabsorvíveis.* São Paulo: Universidade de São Paulo, 2012. 91p (Dissertação, Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear).
- CUNHA C, PANSERI S, ANTONINI S. *Emerging Nanotechnology Approaches in Tissue Engineering for Peripheral Nerve Regeneration.* Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, Elsevier, v.7, n.1, p50-59, fev. 2011.
- DASH TK, KONKIMALLA VB. *Poly-ε-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review.* Journal of Controlled Release, Elsevier, v.158, n.1, p15-33, fev. 2012.
- DEMIR MM, YILGOR I, YILGOR E, ERMAN B. *Electrospinning of polyurethane fibers.* Polymer, Elsevier, v.43, n.11 p3303-3309, maio 2002.

- DÍAZ JE, BARRERO A, MÁRQUEZ M, LOSCERTALES IG. *Controlled Encapsulation of Hydrophobic Liquids in Hydrophilic Polymer Nanofibers by Co-electrospinning.* Advanced Functional Materials, v.16, n.16, p2110-2116, out.2006.
- DO CV, NGUYEN TTT, PARK JS. *Fabrication of Polyethylene Glycol/Polyvinylidene Fluoride Core/Shell Nanofibers Via Melt Electrospinning and Their Characteristics.* Solar Energy Materials and Solar Cells, Elsevier, v. 104, p131-139, set. 2012.
- EICHHORN SJ, SAMPSON WW. *Sampson Statistical Geometry of Pores and Statistics of Porous Nanofibrous Assemblies.* Journal of the Royal Society Interface, n.2, p309-318, maio 2005.
- FERREIRA AER. *Desenvolvimento De Sistema Biodegradável Contendo Bevacizumabe Para Inibição Da Neovascularização Da Córnea.* Belo Horizonte: Universidade Federal de Belo Horizonte, 2014. 122p. (Tese, doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas).
- FLETCHER EC, LADE RJ, ADEWOYIN T, CHONG NV. *Computerized Model Of Cost-Utility Analysis For Treatment Of Age- Related Macular Degeneration.* Ophthalmology, Elsevier, v.115, n.12, p 2192-2198, dez. 2008.
- FOOD E DRUG ADMINISTRATION, Department of Health & Human Service. AVASTIN<sup>TM</sup> Rockville2004, 9p, fev 2004.
- FORMHALS A. *Process And Apparatus For Preparing Artificial Threads.* US 1975504 A. 5 dez. 1930; 2 out.1934. 7p.
- FRANZ S, RAMMELT S, SCHARNWEBER D, SIMON JC. *Immune Responses To Implants – A Review Of The Implications For The Design Of Immunomodulatory Biomaterials.* Biomaterials, Elsevier, v.32, n. 28, p6692-6709, out. 2011.
- GARG K, BOWLIN GL. *Electrospinning Jets And Nanofibrous Structures.* Biomicrofluidics, v.5, n.1, 13403, março 2011.
- GAUDANA R, JWALA J, BODDU SH, MITRA AK. *Recent Perspectives In Ocular Drug Delivery.* Pharmaceutical Research, v.26, n.5, p1197-1216, maio 2009.
- GOMES ECL, JÚNIOR ASC. *Development And Validation Of An Analytical Method For Quantitation Of The Drug Bevacizumab By High Performance Liquid Chromatography.* Quim. Nova, v.35, n.3, p608-611, 2012.

GONÇALVES RP, SILVA FFF, PICCIANI PHS, DIAS ML. *Morphology and Thermal Properties of Core-Shell PVA/PLA Ultrafine Fibers Produced by Coaxial Electrospinning.* Materials Sciences and Applications, v.6, p189-199, fev.2015.

GREINER A, WENDORFF JH, YARIN AL, ZUSSMAN E. *Biohybrid Nanosystems With Polymer Nanofibers And Nanotubes.* Appl Microbiol Biotechnol., v.71, n.4, p387-393, jun.2010

GUIMARÃES HC; GERENUTTI M. *Alternativas Terapêuticas Para O Tratamento Da Degeneração Macular Relacionada À Idade: Um Desafio Para A Saúde Pública.* Rev. de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v.35, n.4, p459-468, 2013.

GUIRGUIS OW, MOSELHEY MTH. *Thermal And Structural Studies Of Poly (Vinyl Alcohol) And Hydroxypropyl Cellulose Blends.* Natural Science, v.4, n.1, p57-67, 2012.

HANTASH J, JOAQUIM T. *The development and validation of an ultra-sensitive double antigen ELISA method for the determination of bevacizumab (Avastin®) in human serum.* Tandem Labs, Laboratory Corporation of America® Holdings, 7p, 2014.

HASSAN CM, PEPPAS NA. *Structure And Applications Of Poly (Vinyl Alcohol) Hydrogels Produced By Conventional Crosslinking Or By Freezing/Thawing Methodos.* Advances in Polymer Science, Springer-Verlag Berlin Heidelberg v.153, p38-65, 2000.

HERNÁNDEZ RM, ORIVE G, MURUA A, PEDRAZ JL. *Microcapsules And Microcarriers For In Situ Cell Delivery.* Advanced Drug Delivery Reviews, Elsevier, v.62, n.7-8, p711-730,jun.2010.

HUANG ZM, ZHANG YZ, KOTAKI M, RAMAKRISHNA S. *A Review On Polymer Nanofibers By Electrospinning And Their Applications In Nanocomposites.* Composites Science and Technology, Elsevier, v.63, n.15, p2223-2253, nov. 2003.

ISLAM MDS, YEUM JH. *Electrospun Pullulan/Poly (Vinyl Alcohol)/Silver Hybrid Nanofibers: Preparation And Property Characterization For Antibacterial Activity.* Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, Elsevier, v.436, p279– 286, jul.2013.

JANG JH, CASTANO O, KIM HW. *Electrospun Materials As Potential Platforms For Bone Tissue Engineering.* Advanced Drug Delivery Reviews, Elsevier, v.61, n.12, p1065-1083, out. 2009.

JIANG H, WANG L, ZHU K. *Coaxial Electrospinning For Encapsulation And Controlled Release Of Fragile Water-Soluble Bioactive Agents*. Journal of Controlled Release, Elsevier, nov 2014.

JÚNIOR JA, ÁVILA AF, TRIPPLETT MH. *Caracterização Morfológica de Nanomembranas de Poliamida-66 Dopadas com Grafeno Obtidas por Electrospinning*. Polímeros, Artigo Técnico Científico, v.23, n.1, p74-81, 2013.

KAI D, LIOW SS, LOH XJ. *Biodegradable Polymers For Electrospinning: Towards Biomedical Applications*. Materials Science and Engineering: C, Elsevier, 12p, 2014.

KERNT M, NEUBAUER AS, KAMPIK A. *Intravitreal Bevacizumab (Avastin) Treatment Is Safe In Terms Of Intraocular And Blood Pressure*. Acta Ophthalmol Scand, v.85, n.1, p119-120, 2007.

KONG J, YU S. *Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures*. Acta Biochimica Biophysica Sinica, v.39, p549-559, abril 2007.

KREMPEL PG. *Análise imunocitoquímica e de expressão gênica de efeitos do bevacizumabe em explantes de ratos lister e em linhagem celular de glia de Muller humana*. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2015, 139p. Tese (Doutorado em Ciências).

KULKARNI A, BAMBOLE VA, MAHANWAR PA. *Electrospinning of Polymers, Their Modeling and Applications*. Polymer-Plastics Technology and Engineering, v.49, n.5, p427-441, abril 2010.

LARSEN G, SPRETZ R, VELARDE-ORTIZ R. Use of Coaxial Gas Jackets to Stabilize Taylor Cones of Volatile Solutions and to Induce Particle-to-Fiber Transitions. Advanced Materials, v.12, n.2, p166-169, jan.2004.

LI F, HURLEY B, LIU Y, LEONARD B, GRIFFITH M. *Controlled Release of Bevacizumab Through Nanospheres for Extended Treatment of Age-Related Macular Degeneration*. The Open Ophthalmology Journal, v. 6, p54-58, 2012.

LI F, ZHAO Y, SONG Y. *Core-Shell Nanofibers: Nano Channel and Capsule by Coaxial Electrospinning*. Nanofibers, Ashok Kumar, Intech, 438p, fev. 2010.

LI Y. *Electrospinning of Core-shell Collagen Nanofibers*. The University of Western Ontario, 2013. 126p. (Master of Engineering Science).

- LU A, ZHU J, ZHANG G, SUN G. *Gelatin Nanofibers Fabricated By Extruding Immiscible Polymer Solution Blend And Their Application In Tissue Engineering.* Journal Of Materials Chemistry, v.21, p8674-18680, 2011.
- LU S, ANSETH KS. *Release Behavior of High Molecular Weight Solutes from Poly(ethylene glycol) - Based Degradable Networks.* Macromolecules, v.33 n.7, p2509-2515, mar. 2000.
- MCEACHIN Z, LOZANO K. *Production and Characterization of Polycaprolactone Nanofibers via Forcespinning<sup>TM</sup> Technology.* Journal of Applied Polymer Science, v.126, p473-479, abril 2012.
- MEDEIROS ES, GLENN GM, KLAMCZYNSKI AP, ORTS WJ, MATTOSO LHC. *Solution Blow Spinning: A New Method to Produce Micro- and Nanofibers from Polymer Solutions.* Journal of Applied Polymer Science, p2322-2330, abril 2009.
- MEINEL AJ, GERMERSHAUS O, LUHMANN T, MERKLE HP, MEINEL L. *Electrospun matrices for localized drug delivery: Current technologies and selected biomedical applications.* European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics, v.81, n.1, p1-13, 2012.
- MELO EJMVCF. *Preparação de Nanofibras de Compósitos Poliméricos por Eletrofiação e sua Caracterização.* Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2012. 125p. (Dissertação, Mestrado em Química).
- MESQUITA et al. *Inibidores Da Angiogênese Para O Tratamento Da Degeneração Macular Relacionada À Idade.* Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde. Ano III, n.6, dez. 2008.
- MOSMANN T. *Rapid Colorimetric Assay For Cellular Growth And Survival: Application To Proliferation And Cytotoxicity Assays.* Journal of Immunological Methods, Elsevier, v.65, n.1-2, p55-63, dez. 1983.
- MOTIWALLA MJ, PUNYARTHI PP, MEHTA MK, D'SOUZA JS, KELKAR-MANE V. *Studies on degradation efficiency of polycaprolactone by a naturally-occurring bacterium.* Journal of Environmental Biology, v.34, p43-49, jan. 2013.
- NAIK R, MUKHOPADHYAY A, GANGULI M. *Gene Delivery To The Retina: Focus On Non- Viral Approaches.* Drug Discovery Today, Elsevier, v.14, n.5-6, p306-315, mar. 2009.

NATTA VFJ, HILL JW, CAROTHERS WH. *Studies of Polymerization And Ring Formation. XXIII.  $\epsilon$ -Caprolactone And Its Polymers.* Journal of the American Chemical Society, Elsevier, v.56, n.2, p455-457, fev.1934.

NEHEMY MB. *Degeneração Macular Relacionada À Idade: Novas Perspectivas.* Arq. Brasileiro de Oftalmologia, v. 69, n. 6, p955-958, 2006.

OLIVEIRA JE, MATTOSO LHC, ORTS WJ, MEDEIROS ES. *Structural and Morphological Characterization of Micro and Nanofibers Produced by Electrospinning and Solution Blow Spinning: A Comparative Study.* Hindawi Publishing Corporation, 15p, abr.2013.

ORÉFICE RL, PEREIRA MM, MANSUR HS. *Biomateriais; Fundamentos e Aplicações.* 1.ed., 1. reimpr. Rio de Janeiro: Cultura Médica: Guanabara Koogan, 2012. 538p.

PARANHOS FRL, COSTA RA, MEIRELLES R, SIMÕES R. *Guidelines in focus: Age-Related Macular degeneration.* Rev. da Associação Médica Brasileira, Elsevier, v.59, n.2, p106-111, 2013.

PARK JS, PARK JW, RUCKENSTEIN E. *Thermal And Dynamic Mechanical Analysis Of PVA/MC Blend Hydrogels.* Polymer, Elsevier, v.42, n.9, p4271-4280, abril 2001.

PARPARITA E, CHEABURU CN, VASILE C. *Morphological, Thermal And Rheological Characterization Of Polyvinyl Alcohol/Chitosan Blends.* Cellulose Chemistry And Technology, v.46, n. 9-10, p571-581, 2012.

PARRA DF, RODRIGUES JAFR, LUGÃO AB. Biodegradable Polymeric Films Of PHB From Burkholderia Saccaria In Presence Of Polyetilenoglycol. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, v.8, n.7, p1041, 2005.

PAUL M, VIEILLARD V, ROUMI E, CAUVIN A, DESPIAU MC, LAURENT M, ASTIER A. *Long-Term Stability Of Bevacizumab Repackaged In 1ml Polypropylene Syringes For Intravitreal Administration.* Annales pharmaceutiques françaises, v.70, n.3, p.139–54, 2012.

PORTO LC. Filmes Formados Por Gelatina E Poli(Acrilamida-Co-Ácido Acrílico): Efeito Da Composição, Do Plastificante E Agente Reticulante Nas Propriedades Térmicas, Mecânicas E Absorção De Água. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2007. 95p. (Dissertação, Mestrado em Química).

- PRESTES RC. *Colágeno e Seus Derivados: Características e Aplicações em Produtos Cárneos.* UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde, v.15, n.1, p65-74, 2013.
- QUEIROZ JM, QUEIROZ JR JM, QUEIROZ FJC. *Degeneração Macular Relacionada À Idade: Considerações Histopatológicas.* Rev. Bras. Oftalmol. v.69, n.6, p400-406, nov. 2010.
- RAMAKRISHNA S, FUJIHARA K, TEO WE, LIM TC, MA Z. *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers.* Singapure: Word Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.: Copyrigth: jun. 2005, 396p.
- RIORDAN-EVA P, CUNNINGHAM ET. *Vaughan & Asbury's General Ophthalmology.* 18.ed., McGraw-Hill Professional: Lange Clinical Medicine, 2011. 504p.
- RODRIGUES EB, FARAH ME, MAIA M, PENHA FM, REGATIERI C, MELO GB, PINHEIRO MM, ZANETTI CR. *Therapeutic Monoclonal Antibodies In Ophthalmology.* Progress in Retinal and Eye Research, Elsevier, v.28, n.2, p117–144, mar. 2009.
- SALLES THC. *Eletrofiação de Nanofibras de Blendas de Gelatina/PVP (POLI (Vinil Pirrolidona) a Partir de Soluções de Água e Ácido Acético.* Campinas: Universidade Estadual de Campinas Faculdade de Engenharia Mecânica, 2013. 66p (Dissertação, Mestrado em Engenharia Mecânica).
- SARAF A, LOZIER G, HAESSLEIN A, KASPER FK, RAPHAEL RM, BAGGETT LS, MIKOS AG. *Fabrication of nonwoven coaxial fiber meshes by electrospinning.* Tissue Engineering, v.15, n.3, p333-344, set. 2009.
- SATO JAP. *Fabricação e Caracterização de Sistemas Poliméricos Nanoestruturados Obtidos por Meio do Uso da Técnica De Eletrofiação.* Santo André: Universidade Federal do ABC, 2011. 109p. (Dissertação, Mestrado em Nanociências e Materiais Avançados).
- SCHIFFMAN JD, SCHAUER CL. *A Review: Electrospinning of Biopolymer Nanofibers and their Applications.* Polymer Reviews, v.48, n.2, p317-352, maio 2008.
- SCHRIEBER R, GAREIS H. *Gelatine Handbook: Theory and Industrial Practice.* Weinheim: Wiley-vch, 334 p, 2007.
- SCHREUDER GHL, GIBSON PW SENECA K, SENNETT M, WALKER J, YEOMANS W. *Protective Textile Materials Based On Electrospun Nanofibers.* Journal of Advanced Materials, v.34, n.3, p44-45, Jul. 2002.

- SCHUEREN LV, MOLLET T, CEYLAN O, CLERCK K. *The Development of Polyamide 6.6 Nanofibres With A Ph-Sensitive Function By Electrospinning*. European Polymer Journal, Elsevier, v.46, n.9, p2229-2239, dez. 2010.
- SELL SA, MCCLURE MJ, GARG K, WOLFE PS, BOWLIN GL. *Electrospinning Of Collagen/Biopolymers For Regenerative Medicine And Cardiovascular Tissue Engineering*. Advanced Drug Delivery Reviews, v.61, n.12, p1007-1019, 2009.
- SERRA D, ANGELUCCI R, SUGANO D, SAMPAIO PR, REHDER JR. *Análise Epidemiológica dos Pacientes Acometidos por Degeneração Macular Relacionada À Idade, Atendidos no Setor de Retina da Faculdade de Medicina do ABC*. Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde, v.33, n.1, p20-23, mar.2008.
- SILL TJ, RECUM HA. *Electrospinning: Applications In Drug Delivery And Tissue Engineering*. Biomaterials, Elsevier, v.29, n.13, p1989-2006, maio 2008.
- SILVA RSG, BANDEIRA SF, PETRY FC, PINTO L A A. *Extração De Gelatina A Partir Das Peles De Cabeças De Carpa Comum*. Ciência Rural, v.41, n.5, p904-909, mai. 2011.
- SILVA AB, SANTOS JPF, BRETAS RES. 12° CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS (12°CBPOL), 2013, Florianópolis, SC. *Sistemas Poliméricos Nanoestruturados Baseados em Mantas de Nanofibras Condutoras*. 2013. 4p.
- SINAPIS CI, ROUTSIAS JG, SINAPIS AI, SINAPIS DI, AGROGIANNIS GD, PANTOPOULOU A, THEOCHARIS SE, BALATZIS S, PATSOURIS E, PERREA D. *Pharmacokinetics of intravitreal bevacizumab (Avastin®) in rabbits*. Clinical Ophthalmology, v.5, p697–704, maio 2011.
- SOUTO AC, MARICATO JT, DENAPOLI PMA, SALLUM JMF, HAN SW. *Comparison of anti-angiogenic effect in vitro between ranibizumab and bevacizumab*. Arq Bras Oftalmol., v.74, n.5, p338-342, 2011.
- SPITZER MS, WALLENFELS-THILO B, SIERRA A, YOERUEK E, PETERS S, HENKE-FAHLE S, BARTZ-SCHMIDT KU, SZURMAN P. *Antiproliferative and cytotoxic properties of bevacizumab on different ocular cells*. Jornal Ophthalmol, v.90, p1316-1321, 2006.
- STEVENS MP. Polymer Chemistry: An Introduction. Oxford University Press, p551, 1999.

- SUN J, HONG Z, YANG L, TANG Z, CHEN X, JING X. *Study On Crystalline Morphology Of Poly (L-Lactide) - Poly (Ethylene Glycol) Diblock Copolymer*. Polymer, Elsevier, v. 45, n.17, p 5969–5977, ago. 2004.
- SWAIN PK, DAS M, NAYAK PL. *Biodegradation Studies of Chitosan-Polycaprolactone (PCL) Nanocomposite In Soil Burial Test*. Middle-East Journal of Scientific Research, v.23, n.2, p253-258, 2015.
- TAYLOR G. *Disintegration of Water Drops in an Electric Field*. Poceedings of the Royal Society of London, Series A, Mathematical and Physical Sciences, v.280, n.1382, p383-397, jul. 1964.
- TIAN F, SANE S, RYTTING JH. *Calorimetric investigation of protein/amino acid interactions in the solid state*. International Journal Of Pharmaceutics, Elsevier, v.310, n. 1-2, p175–186, mar. 2006.
- TIWARI SK, VENKATRAMAN SS. *Importance of Viscosity Parameters In Electrospinning: Of Monolithic And Core–Shell Fibers*. Materials Science and Engineering: C, Elsevier, v. 32, n. 5, p1037-1042, julho 2012.
- TORRES RJA, MAIA M, MUCCIOLI C, WINTER G, SOUZA GK, PASQUALOTTO LR, LUCHINI A, PRÉCOMA DB. *Fatores Modificáveis De Degeneração Macular Relacionada A Idade*. Arq. Brasileiro de Oftalmologia, v.72, n.3, p406-412, 2009.
- TURAGA U, SINGH V, BEHRENS R, KORZENIEWSKI C, JINKA S, SMITH E,† KENDALL RJ, RAMKUMAR S. Breathability of Standalone Poly (vinyl alcohol) Nanofiber Webs. Industrial e Engineering Chemistry Research, v.53, p6951–6958, abril, 2014.
- VATANKHAH E, PRABHAKARAN MP, JIN G, MOBARAKEH LG, RAMAKRISHNA S. *Development of nanofibrous cellulose acetate/gelatin skin substitutes for variety wound treatment applications*.v.28, n.6, p909-930, fev. 2014.
- VOGELSANGERA N, FORMOLOA MC, PEZZINA APT, SCHNEIDERA ALDS, FURLANA SA, BERNARDOA HP, PEZZINB SH, PIRESC ATN, DUEKD EADR. *Blendas Biodegradáveis de Poli (3-Hidroxibutirato)/Poli ( $\epsilon$ -Caprolactona):Obtenção e Estudo da Miscibilidade*. Materials Research, v.6, n.3, p359-265, 2003.
- WANG HF, JIA HZ, CHENG SX, FENG J, ZHANG XZ, ZHUO RX. PEG-Stabilized Micellar System with Positively Charged Polyester Core for Fast pH-Responsive Drug Release. Pharmaceutical Research, v.29, n.6, p1582-1594, jun.2012.

- WANG M, JIN HJ, KAPLAN DL, RUTLEDGE GC. *Mechanical Properties of Electrospun Silk Fibers*. Macromolecules, v. 37, n.18, p6856-6864, jun. 2004.
- WANG W. *Lyophilization And Development Of Solid Protein Pharmaceuticals*. International Journal of Pharmaceutics, Elsevier, v.203, n.1-2, p1-60, ago. 2000.
- WANG T, TURHAN M, GUNASEKARAN S. *Selected Properties Of Ph-Sensitive, Biodegradable Chitosan-Poly (Vinyl Alcohol) Hydrogel*. Polymer Internacional, v.53, p911-918, maio 2004.
- WANG X, DING B, LI B. *Biomimetic Electrospun Nanofibrous Structures For Tissue Engineering*. Materials Today, v.16, n.6, p229-241, junho 2013.
- WANNATONG L, SIRIVAT A, SUPAPHOL P. *Effects of Solvents on Electrospun Polymeric fibers: Preliminary Study On Polystyrene*. Polymer International, v.53, p1851-1859, jun. 2004.
- WATSON PG, YOUNG RD. *Scleral Structure, Organisation and Disease. A review*. Experimental Eye Research, Elsevier, v.78, n.3, p609-623, mar. 2004.
- WON JJ, NIRMALA R, NAVAMATHAVAN R, KIM HY. *Electrospun Core-Shell Nanofibers From Homogeneous Solution Of Poly (Vinyl Alcohol)/Bovine Serum Albumin*. International Journal of Biological Macromolecules, Elsevier, v.50, p1292-1298, abr. 2012.
- WOODRUFF MA, HUTMACHER DW. *The Return of A Forgotten Polymer - Polycaprolactone In The 21st Century*. Progress in Polymer Science, Elsevier, v.35, n.10, p1217-1256, out. 2010.
- YAMADA Y, MIYAMURA N, SUZUMA K, KITAOKA T. *Long- Term Follow-Up of Full Macular Translocation For Choroidal Neovascularization*. American Journal of Ophthalmology, Elsevier, v.149, n.3, p453-457, mar. 2010.
- ZONARI, A.A.C. *Avaliação Da Adesão, Proliferação e Diferenciação Endotelial de Células-Tronco Humanas Cultivadas em Nanofibras de Polihidroxibutirato*. Belo Horizonte: Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG, 2010. 100p (Dissertação mestrado).
- ZOU L, LAI H; ZHOU Q, XIAO F. *Lasting Controversy on Ranibizumab and Bevacizumab*. Theranostics, v.1, n.1, p395-402, 2011.