

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUIMICA

Silvia Vaz Guerra Nista

**Desenvolvimento e Caracterização de Nanofibras de Acetato
de Celulose para Liberação Controlada de Fármacos**

Campinas

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Faculdade de Engenharia Química – FEQ

Área de Concentração de Ciência e Tecnologia de Materiais – ACCTM

Departamento de Tecnologia de Polímeros – DTP

**Desenvolvimento e Caracterização de Nanofibras de Acetato
de Celulose para Liberação Controlada de Fármacos**

Autor: Silvia Vaz Guerra Nista

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Lucia Helena Innocentini Mei

Co-Orientador: Marcos Akira d'Ávila

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Campinas – São Paulo

Fevereiro de 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

N637d	<p>Nista, Silvia Vaz Guerra</p> <p>Desenvolvimento e caracterização de nanofibras de acetato de celulose para liberação controlada de fármacos / Silvia Vaz Guerra Nista. --Campinas, SP: [s.n.], 2012.</p> <p>Orientadores: Lucia Helena Innocentini Mei, Marcos Akira d'Ávila.</p> <p>Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.</p> <p>1. Eletrofição. 2. Acetato de celulose. 3. Liberação controlada. I. Mei, Lucia Helena Innocentini. II. d'Ávila, Marcos Akira. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.</p>
-------	---

Título em Inglês: Development and characterization of cellulose acetate nanofibers for controlled release of drugs

Palavras-chave em Inglês: Electrospinning, Cellulose acetate, Controlled release

Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Materiais

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Rosário Élica Suman Bretas, Elizabeth Ferreira Martinez

Data da defesa: 14-02-2012

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

FOLHA DE APROVAÇÃO

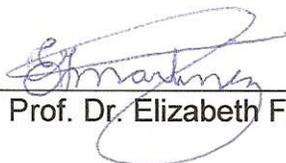
Dissertação de Mestrado defendida por Silvia Vaz Guerra Nista e aprovada em 14 de fevereiro de 2012 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof. Dr. Lucia Helena Innocentini Mei



Prof. Dr. Rosário Élda Suman Bretas



Prof. Dr. Elizabeth Ferreira Martinez

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
TESE/DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR SILVIA VAZ GUERRA NISTA, E
ORIENTADA PELO PROF.DR^a. LUCIA HELENA INNOCENTINI MEI



Prof. Dra^a. Lucia Helena Innocentini Mei

CAMPINAS, 2012

*Aos meus pais Ivandir e Sebastiana, ao meu marido Agnaldo
e ao meu filho Gabriel, pelo apoio, carinho e
atenção durante a elaboração
deste meu projeto.*

AGRADECIMENTOS

À Deus pela sua presença constante em minha vida me protegendo e me guiando em tudo o que faço. Por me dar forças e incentivar naqueles momentos difíceis, mas principalmente por me oferecer tantos momentos alegres.

Este trabalho é fruto da contribuição e esforço da minha família, à qual ofereço os mais sinceros agradecimentos, pois sem eles nada seria possível.

Agradeço ao meu marido Agnaldo pelo incentivo e apoio constante que me ajudou a concluir esta etapa da minha vida. Ao meu filho Gabriel por me alegrar a cada dia com seu lindo sorriso sapeca e me ajudar a querer ser uma pessoa melhor.

Aos meus pais, pelo amor, confiança, incentivo e apoio incondicional que sempre me dedicaram.

À minha orientadora, Profa. Dra. Lucia Helena Innocentini Mei pela oportunidade de realizar este trabalho, pela confiança, liberdade de atuação, orientação construtiva e valiosas contribuições no andamento do projeto.

Ao Prof. Dr. Marcos Akira D'Ávila, pelo suporte e contribuições no processo de pré-defesa de minha Tese.

A Maria Trindade Bizzaria e Karen Segala pela amizade e contribuição durante todo o projeto com informações valiosas.

A todas as amigas(os) do BIOMAT que direta ou indiretamente contribuíram com idéias, sugestões ou simplesmente com sua amizade.

Aos Professores Dra. Leila Peres da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp, Dr. Flávio Luiz Schmidt da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp e a Dra. Denise Freitas Siqueira Petri do Instituto de Química da USP, pelo empréstimo dos equipamentos para análise das soluções poliméricas.

À Professora Dra. Elizabeth F. Martinez do Instituto e Centro de Pesquisas "São Leopoldo Mandic", pelos ensaios de citotoxicidade e análises microbiológicas.

Ao apoio financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo), com a bolsa de Auxílio à pesquisa.

“Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho e sobre ele lança toda a força de sua alma, todo o universo conspira a seu favor.”

Johann Goethe

RESUMO

Este projeto foi desenvolvido em duas fases, usando a tecnologia de eletrofição. A primeira fase foi dedicada a obtenção de membranas eletrofiadas com acetato de celulose, as quais formaram nanofibras que foram carregadas com Sulfato de gentamicina, na segunda fase, para estudos da liberação controlada deste fármaco.

Na primeira fase as membranas de nanofibras de Acetato de Celulose, chamadas de nanomembranas, foram produzidas utilizando-se quatro misturas de solventes (Acido Acético/Água (75:25 m/m), Acetona/Água (85:15 m/m), Dimetilacetamida (DMAc)/Acetona (1:2 m/m), Dimetilacetamida/Acetona/Água (32/63/5 m/m)). Usando a ferramenta de planejamento de experimentos (DOE), foram definidos os melhores parâmetros para preparação das membranas nanoestruturadas, em cada sistema de solvente. Três variáveis, sendo a distância entre a agulha e o coletor, a concentração de acetato de celulose na solução e a tensão aplicada, em dois níveis (alto e baixo), foram estudadas em cada sistema. As respostas avaliadas para obtenção da melhor condição, em cada caso, foram o diâmetro médio da fibra obtida e aspecto da membrana formada. Foi realizado também, no sistema de solvente Acido Acético/Água (70:30 m/m), um comparativo entre fiação horizontal, utilizando-se uma taxa de alimentação controlada por uma bomba de infusão, e um sistema vertical onde o fluxo era governado pela gravidade e viscosidade da solução. Um estudo da influencia da taxa de alimentação no diâmetro e aspecto da membrana também foi realizado. Todas as soluções foram avaliadas quanto a sua viscosidade, tensão superficial e condutividade elétrica. Nas soluções de cada sistema de solvente, que apresentaram a melhor condição de processabilidade e melhor membrana, foi realizada uma avaliação do comportamento reológico com a construção de uma curva de Viscosidade *versus* Taxa de cisalhamento. As melhores membranas obtidas para cada sistema de solvente foram submetidas a um teste de Citotoxicidade para confirmar a biocompatibilidade e sua independência com os resíduos dos solventes utilizados.

Na segunda fase utilizaram-se as melhores condições obtidas para cada sistema de solvente e incorporou-se o fármaco Sulfato de Gentamicina em duas concentrações

6 e 60% em massa com base no acetato de celulose. Observou-se a influencia da concentração do fármaco no processo de eletrofiação, no aspecto da membrana formada bem como no diâmetro da nanofibra obtida. A melhor membrana obtida nesta etapa foi produzida a partir do sistema de solventes DMAc/Acetona/Água. As condições de processo utilizadas foram 1 ml/h de vazão, 10 cm de distância entre agulha-coletor e 15 kV de tensão e concentração de acetato de celulose de 15%. Este sistema apresentou-se como um processo bastante viável, não havendo alteração na qualidade da membrana e no processo com a variação da concentração do fármaco. À membrana obtida nestas condições, foi adicionado 50% do fármaco e realizado um teste de liberação com o objetivo de verificar o perfil de liberação do mesmo. Foi realizado um comparativo entre o perfil de liberação desta membrana com o de outras membranas preparadas por casting e com recobrimento de HPMC, Eudragit® L100 e nanofibra eletrofiada de acetato de celulose. O melhor perfil obtido, onde ocorreu uma redução no efeito burst, foi com a membrana revestida com nanofibra, onde foi obtido um ganho de liberação de 9 horas em relação às demais. A melhor membrana obtida também foi submetida a uma análise microbiológica, onde se verificou que o fármaco não perdeu suas propriedades com o processo de eletrofiação.

Palavras Chaves: eletrofiação, nanofibras, sulfato de gentamicina, liberação controlada

ABSTRACT

This project was developed in two phases, using the technology of electrospinning. The first phase was devoted to obtaining electrospun membranes with cellulose acetate, which formed nanofibers that were loaded with Gentamicin sulphate, in the second phase, for the studies of this drug release.

In the first step, these membranes were composed of electrospun nanofibers made of cellulose acetate, here called nanomembranes, using four solvents mixtures (acetic acid/water (75:25 w/w) acetone/water (85:15 w/w), dimethylacetamide(DMAC)/acetone (1:2 w/w), DMAc/acetone/water (32/63/5 w/w). Using the tool for design of experiment (DOE), the best parameters for preparation of nanostructured membranes in each solvent system were fixed. Three variables, such as the distance between the needle and the collector, the concentration of cellulose acetate in solution and the applied voltage, in two levels (high and low), were used in each system. The responses evaluated to obtain the best condition, in each case, were the average diameter of the fiber obtained and the aspect of the membrane formed. In the solvent system formed by acetic acid/water (70:30 w/w), a comparison was carried out between horizontal electrospinning, using an infusion pump to control the feed rate, and a vertical system, whose flow was governed by both gravity and viscosity of the solution. A study of the influence of feed rate on the diameter and aspect of the membranes was done. The viscosity, surface tension and electrical conductivity of all solutions were evaluated. For each system of solvent used, the best parameters of processing and the best membrane aspect obtained were the chosen for the studies of the rheological behavior of the system by plotting a curve of Viscosity *versus* Shear rate.

The best membranes obtained, for each mixture of solvent used, were submitted to a cytotoxicity test to confirm their biocompatibility and if the residues of any solvent could influence on this test.

In the second step of the project, the best conditions obtained for each solvent system were used to electrospun the membranes loaded with gentamicin sulfate in two

concentrations, i.e. 6 and 60 wt%, based on cellulose acetate. We observed the influence of the drug concentration in the electrospinning process, as well as the aspect of the membrane formed and the diameters of the nanofibers formed. The best membranes obtained in this step were produced using the solvent system DMAC/acetone/water. The process conditions used were 1 ml/h flow rate, 10 cm distance between needle-collector, 15 kV voltage and 15% cellulose acetate concentration in the solution. This system proved to be a quite feasible process, with no change in the membrane aspect or in the process, for several drug's concentration. To the membrane obtained in these conditions, 50% of the drug was added and the profile of its delivery was observed. A comparison of the releasing profile was also done among this membrane and other membranes prepared by casting and by coating with HPMC, Eudragit ® L100 and electrospun nanofibers of cellulose acetate. The best delivery profile obtained was the membrane coated with nanofiber of acetate solution in DMAC/acetone/water since there was a reduction in the burst effect and a gain in the releasing of 9 hours over the others. The best membrane obtained was also submitted to a microbiological analysis, in which it was verified that the drug did not lose its function during the electrospinning process.

Keywords: electrospinning, nanofiber, gentamicin sulphate, drug delivery.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	v
NOMENCLATURAS	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1. Eletrofiação.....	6
2.1.1. Processo	6
2.1.2. Fatores que influenciam o processo de eletrofiação	8
2.1.2.1. Parâmetros da solução	9
2.1.2.1.1. Viscosidade da solução e peso molecular	9
2.1.2.1.2. Tensão Superficial.....	10
2.1.2.1.3. Condutividade elétrica de soluções poliméricas.....	10
2.1.2.2. Parâmetros de Processo.....	11
2.1.2.2.1. Voltagem	11
2.1.2.2.2. Vazão	12
2.1.2.2.3. Efeito do coletor.....	12
2.1.2.2.4. Temperatura e diâmetro da agulha.....	12
2.1.2.2.5. Distância da agulha ao coletor.....	13
2.1.2.3. Parâmetros do ambiente	13
2.1.2.3.1. Umidade	13
2.1.2.3.2. Efeito da atmosfera e da pressão	14

2.2. Acetato de Celulose.....	14
2.3. Nanofibras de Acetato de Celulose.....	16
2.4. Liberação controlada de Fármacos.....	18
2.5. Nanofibras para Liberação Controlada de Fármacos.....	19
2.6. Planejamento Fatorial.....	21
2.7. Viscosidade de Soluções.....	22
2.7.1. Fluidos Newtonianos.....	24
2.7.2. Fluidos Não-Newtonianos.....	26
2.8. Condutividade da solução.....	28
2.9. Tensão Superficial.....	29
2.10. Citotoxicidade.....	31
2.11. O Fármaco Sulfato de Gentamicina.....	32
2.12. Curativos para lesões de pele.....	33
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	36
3.1. Materiais.....	36
3.2. Membranas de Acetato de Celulose sem Fármaco.....	36
3.2.1. Preparação das soluções poliméricas de Acetato de Celulose.....	36
3.2.1.1. Solução de Ácido Acético/Água.....	36
3.2.1.2. Solução de Acetona/Água.....	37
3.2.1.3. Solução de Dimetilacetamida(DMAc)/Acetona.....	37
3.2.1.4. Solução de Dimetilacetamida(DMAc)/Acetona/Água.....	37
3.2.2. Caracterização das soluções poliméricas de Acetato de Celulose.....	38
3.2.3. Eletrofição soluções.....	39
3.2.4. Caracterização das membranas eletrofiadas sem carga.....	40
3.2.5. Testes de Citotoxicidade.....	41

3.2.5.1.	Ensaio com células in vitro	41
3.2.5.2.	Plaqueamento celular nas membranas	41
3.2.5.3.	Proliferação Celular.....	42
3.2.5.4.	Análise da Morfologia e Adesão Celulares	42
3.3.	Membranas de Acetato de Celulose com Sulfato de Gentamicina.....	42
3.3.1.	Preparação das soluções poliméricas de Acetato de Celulose com Sulfato de Gentamicina	42
3.3.2.	Eletrofiação das soluções poliméricas de Acetato de Celulose com Sulfato de Gentamicina	43
3.3.3.	Caracterização das Membranas com Sulfato de Gentamicina.....	44
3.3.4.	Preparação das Membranas para Testes de Liberação Controlada	44
3.3.4.1.	Membrana de nanofibra com sulfato de Gentamicina 50%	45
3.3.4.2.	Membrana “casting” com Sulfato de Gentamicina 50%.....	45
3.3.4.3.	Membrana de nanofibras com sulfato de Gentamicina 50% revestida com nanofibras sem fármaco.....	45
3.3.4.4.	Membrana nanofibra com Sulfato de Gentamicina 50% revestida com Eudragit® L100.....	46
3.3.4.5.	Membrana eletrofiada com sulfato de Gentamicina revestida com HPMC	46
3.3.5.	Testes de Liberação Controlada de Sulfato de Gentamicina	47
3.3.5.1.	Teste de liberação de sulfato de Gentamicina: membrana de nanofibras versus membrana “casting”.....	47
3.3.5.2.	Testes liberação membrana de nanofibras de CA com sulfato de Gentamicina comparativos: revestida com nanofibra sem fármaco, revestida com HPMC e revestida com Eudragit® L100.....	48
3.3.6.	Quantificação do sulfato de Gentamicina.....	48
3.3.7.	Análise Microbiológica	49
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	51
4.1.	Membranas Acetato de Celulose sem fármaco.....	51

4.1.1. Planejamento de Experimentos com vários sistemas de solventes para eletrofiação de Acetato de Celulose.....	51
4.1.1.1. Eletrofiação de CA em Acido Acético/Água (75:25 m/m).....	51
4.1.1.1.1. Análise da Vazão em solução de Acido Acético/Água (70:30 m/m)	51
4.1.1.1.2. Análise da Influência da Concentração.....	56
4.1.1.1.3. Comparativo sistema vertical sem utilização da bomba com sistema horizontal utilizando vazão controlada.....	60
4.1.1.2. Eletrofiação de CA em Acetona/Água (85:15 m/m)	64
4.1.1.3. Eletrofiação de CA em Dimetilacetamida(DMAc)/Acetona (1:2 m/m).	69
4.1.1.4. Eletrofiação de CA em Dimetilacetamida/Acetona/Água (32/63/5 m/m)	72
4.1.2. Reologia das soluções de CA sem fármaco.....	76
4.1.3. Testes de Citotoxicidade.....	81
4.1.3.1. Ensaio de Citotoxicidade	81
4.1.3.2. Morfologia das Células.....	83
4.2. Membranas de CA com Fármaco Sulfato de Gentamicina.....	84
4.2.1. Eletrofiação das membranas com Sulfato de Gentamicina	84
4.2.2. Testes de Liberação Controlada de Sulfato de Gentamicina	91
4.2.2.1. Construção da Curva de Calibração.....	91
4.2.2.2. Comparativo: membrana nanofibras versus membrana “casting”.....	92
4.2.2.3. Teste de Liberação: Membranas nanofibras versus membranas revestidas	95
4.2.3. Análise Microbiológica	100
5. CONCLUSÕES.....	104
6. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	106
7. TRABALHOS PUBLICADOS	107
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	108
9. ANEXOS.....	120

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho esquemático do equipamento de eletrofição ¹	8
Figura 2: Unidade monomérica do acetato de celulose	15
Figura 3: Fluido viscoso entre placas, cisalhado por uma força aplicada na placa, onde B=distância entre placas, W=comprimento das placas e V_w =velocidade da placa superior. ⁸²	23
Figura 4: Classificação dos fluidos segundo comportamento reológico (fluxo). ⁸³	25
Figura 5: Representação gráfica do fluido Newtoniano (A) curva de tensão de cisalhamento x taxa de cisalhamento e (B) curva de viscosidade versus taxa de cisalhamento ⁸⁷	26
Figura 6: Curvas de fluxo de diferentes fluidos ⁸²	27
Figura 7: Estrutura química do sulfato de Gentamicina.	32
Figura 8: Foto do equipamento utilizado para eletrofição do Acetato de Celulose.	39
Figura 9: Foto do equipamento utilizado para eletrofição do Acetato de Celulose sem utilização da bomba de fluxo.	40
Figura 10: Gráfico de Pareto dos efeitos para nota da membrana obtida de soluções de Acetato de Celulose em ácido Acético/Água(70:30 m/m).	53
Figura 11: Gráfico de Pareto dos efeitos para diâmetro das fibras obtidas de soluções de Acetato de Celulose em ácido Acético/Água(70:30 m/m).....	54
Figura 12: Gráfico do efeito principal para diâmetro da fibra obtidas de soluções de Acetato de Celulose em ácido Acético/Água(70:30 m/m).....	54
Figura 13: Imagem MEV com aumento de 3000 vezes para membrana eletrofiada de Acetato de Celulose (CA) utilizando-se como solvente Acido Acético/Água(70:30), sendo (a) 17% de CA, D = 7 cm, V = 15kV e R = 3mL/h e (b) 17% de CA , D = 7 cm, V = 25kV e R = 1mL/h.....	55
Figura 14: Gráfico de Pareto dos efeitos para nota da membrana no sistema de solvente ácido Acético/Água(75:25 m/m).....	58
Figura 15: Gráfico dos efeitos principais para a nota média da membrana no sistema de solvente ácido Acético/Água(75:25 m/m).	58

Figura 16: Imagem MEV, com aumento de 5000 vezes, para membrana eletrofiada de Acetato de Celulose (CA) utilizando-se como solvente ácido Acético/Água(75:25) aumento de 5000 vezes, com: (a) 17% de CA, D = 7 cm, V = 25kV e R = 1mL/h; (b) 18% de CA, D = 7 cm, V = 25kV e R = 1mL/h; (c) 19% de CA, D = 7 cm, V = 25kV e R = 1mL/h.....	59
Figura 17: Gráfico de Pareto para nota média da membrana obtida da solução de Ácido Acético/Água (70:30 m/m) sistema vertical.....	62
Figura 18: Gráfico de interações para nota média da membrana obtida da solução de Ácido Acético/Água (70:30 m/m) sistema vertical.....	63
Figura 19: Imagem MEV, com aumento de 5000 vezes, para membrana eletrofiada de Acetato de Celulose (CA) utilizando-se como solvente Acido Acético/Água (75:25): (a) 17% de CA , D = 10 cm, V = 25kV, sistema vertical por gravidade; (b) 17% de CA , D = 10 cm, V = 25k, sistema horizontal com R = 1ml/h.	63
Figura 20: Imagem MEV, com aumento de 2000 vezes, para membrana eletrofiada de 17% de Acetato de Celulose , D = 7 cm, V = 25kV e R = 4mL/h, utilizando-se como solvente Acetona/Água(85:15).....	66
Figura 21: Gráfico de Pareto para os efeitos na largura média da fibra no sistema de solvente Acetona/Água(85:15).....	67
Figura 22: Gráfico dos efeitos principais para a largura média da fibra no sistema de solvente Acetona/Água(85:15).....	67
Figura 23: Imagem MEV, com aumento de 2000 vezes, para membrana eletrofiada de uma solução de 16% de Acetato de Celulose , D = 7 cm, V = 25kV e R = 4mL/h, utilizando-se como solvente Acetona/Água(85:15).....	68
Figura 24: Gráfico de Cubo para diâmetro médio da fibra no sistema de solvente Dimetilacetamida/Acetona (1:2 m/m).	70
Figura 25: Imagem MEV, com aumento de 2000 vezes, para membrana eletrofiada de 17% de Acetato de celulose , D = 10 cm, V = 25kV, R = 1mL/h, utilizando-se como solvente DMAc/Acetona(1:2).....	71
Figura 26: Gráfico de Pareto para os efeitos na nota média da membrana no sistema de solvente Dimetilacetamida/Acetona/Água (32/63/5 m/m).....	74
Figura 27: Gráfico de interação para o diâmetro média da fibra no sistema de solvente Dimetilacetamida/Acetona/Água (32/63/5 m/m).....	75
Figura 28: Imagem MEV, com aumento de 5000 vezes, para membrana eletrofiada de Acetato de Celulose (CA) utilizando-se como solvente DMAc/Acetona/Água (32:63:5) (a) 17% de CA , D	

= 10 cm, V = 15kV e R = 1mL/h; (b)15% de CA , D = 10 cm, V = 15kV e R = 1mL/h, condição otimizada.....	76
Figura 29: Comportamento reológico para solução de Acetato de Celulose 17% (m/m) em Ácido Acético/Água (70:30).	77
Figura 30: Comportamento reológico para solução de Acetato de Celulose a 18% (m/m) em Ácido Acético/Água (75:25).	78
Figura 31: Comportamento reológico para solução de Acetato de Celulose a 17% (m/m) em Acetona/Água (85:15).....	78
Figura 32: Comportamento reológico para solução de Acetato de Celulose a 15% (m/m) em Dimetilacetamida/Acetona/Água (32:63:5).....	79
Figura 33: Comportamento reológico para solução de Acetato de Celulose a 17% (m/m) em Dimetilacetamida/Acetona (1:2).....	79
Figura 34: Resultados de viabilidade celular após 24, 48 e 72 horas de incubação, conforme determinado pelo teste de exclusão com corante vital azul de Trypan. Viabilidade celular em poliestireno (Controle), e nas membranas de nanofibras de Acetato de Celulose preparadas através através de soluções de diferentes solventes, Ácido Acético/Água 75:25 (VC1), Acetona/Água 85:15 (VC2), DMAc/Acetona 1:2 (VC3) e DMAc/Acetona/Água 32:63:5 (VC4). As barras de erro representam o desvio-padrão.	82
Figura 35: Micrografias eletrônicas de varredura mostrando culturas de células MC3T3 em (a) poliestireno ,(b) membrana de nanofibra de acetato de celulose.....	83
Figura 36: Imagens de MEV das membranas de nanofibras, aumento de 5000x, obtidas a partir de soluções poliméricas de 18% de CA em Acido Acético/Água com incorporação de 6% (a) e 60% (b) de Sulfato de Gentamicina, nas condições idealizadas.....	85
Figura 37: Imagens de MEV das membranas de nanofibras, aumento de 5000x, obtidas a partir de soluções poliméricas de 17% de CA em Acetona/Água com incorporação de: (a) 6% de fármaco com V = 15 kV e D = 10 cm; (b) 60% de fármaco com V = 15 kV e D = 7 cm.	87
Figura 38: Imagens de MEV das membranas de nanofibras, aumento de 5000x, obtidas a partir de soluções poliméricas de 17% de CA em DMAc/Acetona com incorporação de: (a) 6% de fármaco com V = 15 kV e D = 10 cm. (b) 60% de fármaco com V = 10 kV e D = 7 cm.	88
Figura 39: Imagens de MEV das membranas de nanofibras, aumento de 10000x, obtidas a partir de soluções poliméricas de 15% de CA em DMAc/Acetona/Água com incorporação de 6% (a) e 60% (b) de Sulfato de Gentamicina, nas condições idealizadas.....	89

Figura 40: Curva de Calibração obtida por UV-Vis para o Sulfato de Gentamicina em solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,4.	92
Figura 41: Membranas de nanofibra de acetato de celulose com 50 % de sulfato de Gentamicina	93
Figura 42: Membrana de nanofibras de Acetato de Celulose com incorporação de 50% de Sulfato de Gentamicina, aumento de 10000x.....	93
Figura 43: Membranas “casting” de acetato de celulose com 50 % de sulfato de Gentamicina.	94
Figura 44: Curva de liberação para Sulfato de Gentamicina no teste comparativo entre membrana de nanofibra e membrana casting.	94
Figura 45: Membranas de nanofibras de acetato de celulose com 50 % de sulfato de Gentamicina revestidas com nanofibras sem fármaco, sendo: (a) membrana finalizada, (b) membrana parcialmente revestida.	96
Figura 46: Imagem da membranas de nanofibra de acetato de celulose com 50 % de sulfato de Gentamicina, revestida com HPMC.	96
Figura 47: Membrana de CA com 50% de sulfato de gentamicina revestida com HPMC, aumento de 5000x	97
Figura 48: Imagem de MEV da membrana de Nanofibra de CA com 50% de Sulfato de Gentamicina revestida com Eudragit® L100. (a) Imagem da parte superior da membrana, aumento de 1000 vezes e (b) detalhe da parte inferior da membrana mostrando as nanofibras recobertas com a massa do revestimento, aumento de 2000 vezes.....	97
Figura 49: Membranas de nanofibra de acetato de celulose com 50 % de sulfato de Gentamicina, revestida com Eudragit® L100.	98
Figura 50: Resultado do teste de liberação de sulfato de gentamicina das membranas de nanofibras de CA, com e sem revestimentos.	98
Figura 51: Halo de inibição <i>S Aureus</i> , nas membranas de nanofibras de CA incorporadas com 10% (1), 25% (2) e 50% de Sulfato de Gentamicina(3) comparadas com controle (nanofibra sem fármaco) (4 e 5).....	100
Figura 52: Halo de inibição <i>E. Coli</i> , nas membranas de nanofibras de CA incorporadas com 10% (1), 25% (2) e 50% de Sulfato de Gentamicina(3) comparadas com controle (nanofibra sem fármaco) (4 e 5).....	101
Figura 53: Halo de inibição <i>C. Albicans</i> , nas membranas de nanofibras de CA incorporadas com 10% (1), 25% (2) e 50% de Sulfato de Gentamicina(3) comparadas com controle (nanofibra sem fármaco) (4 e 5).....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Melhores condições de processamento, obtidas para as membranas de nanofibras de CA, em cada sistema de solvente.....	43
Tabela 2 - Parâmetros Experimentais utilizados para eletrofiação de nanofibras de 17% de Acetato de Celulose em ácido Acético/Água(70:30 m/m).....	52
Tabela 3 - Resultados Experimentais da análise da solução de acetato de celulose no solvente ácido Acético/Água(70:30 m/m).....	52
Tabela 4 - Parâmetros experimentais utilizados para eletrofiação de nanofibras de Acetato de Celulose em ácido Acético/Água(75:25 m/m).....	56
Tabela 5 - Resultados experimentais para análise da solução de Acetato de Celulose em ácido Acético/Água(75:25 m/m).....	57
Tabela 6 - Parâmetros experimentais utilizados para eletrofiação de nanofibras de acetato de Celulose em ácido Acético/Água (70:30 m/m) num sistema vertical.	61
Tabela 7 - Resultados experimentais das análises da solução de acetato de celulose no solvente Ácido Acético/Água (70:30 m/m).	61
Tabela 8 - Parâmetros experimentais utilizados para obtenção da membrana com a solução de acetato de Celulose em Acetona/Água (85:15 m/m).....	65
Tabela 9 - Resultados experimentais das análises da solução de acetato de celulose no solvente Acetona/Água (85:15 m/m).....	65
Tabela 10 - Parâmetros experimentais utilizados para eletrofiação de nanofibras de acetato de Celulose em Dimetilacetamida/Acetona (1:2 m/m).....	69
Tabela 11 - Resultados experimentais para análises da solução de acetato de celulose no solvente Dimetilacetamida/Acetona (1:2 m/m).	69
Tabela 12 - Parâmetros experimentais utilizados para eletrofiação de nanofibras de Acetato de Celulose em Dimetilacetamida/Acetona/Água (32/63/5 m/m).....	72
Tabela 13 - Resultados experimentais para análises da solução de acetato de celulose no solvente Dimetilacetamida/Acetona/Água (32/63/5 m/m).	73
Tabela 14 - Diâmetro médio das nanofibras de CA nas membranas após incorporação do fármaco.	84

Tabela 15 - Condutividade das soluções poliméricas de CA após incorporação do fármaco.	86
Tabela 16 - Tamanho do halo de inibição nos testes anti-microbianos em função da concentração de Fármaco.	102

NOMENCLATURAS

Abreviaturas:

CA	-	Acetato de Celulose
DMAc	-	N,N - Dimetilacetamida
DOE	-	Design of experiments
DS	-	Grau de Substituição
THF	-	Tetrahidrofurano
NMMO	-	N-metilmorfolina
TFE	-	Trifluoroetano
DMF	-	Dimetilformamida
PEG	-	Poliétileno glicol
NO ₂ SP	-	1',3',3'-trimetil-6-nitrospiro (2H-1-benzopirano-2, 2'-indoline)
PLA	-	Poliácido láctico
PVA	-	Acetato de polivinila
PDLLA	-	Poli-DL- ácido láctico
PLLA	-	Poli-L-ácido láctico
PLAGA	-	Lático-co-ácido glicólico
MEV	-	Microscopia Eletrônica de Varredura
ATCC	-	American Type Culture Collection
MEM	-	Meio Essencial Mínimo
HEPES	-	Ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etanossulfônico

PBS	-	Solução tampão fosfato
HPMC	-	Hidroxipropil metilcelulose
BHI	-	Brain Heart Infusion
DM	-	Diâmetro médio
NT	-	Nota membrana
Gent	-	Sulfato de gentamicina
Abs	-	Absorbância

Siglas:

τ	-	Tensão de cisalhamento
F	-	Força
A	-	Área
$\dot{\gamma}$	-	Taxa de cisalhamento
v	-	Velocidade
γ	-	Deformação
t	-	Tempo
μ	-	Viscosidade newtoniana
η_{ap}	-	Viscosidade aparente
K_i	-	Constante de ionização
C^+	-	Cátions
A^-	-	Ânions
M	-	Concentração molar

α	- Grau de ionização
σ	- Tensão superficial
l	- Comprimento
x	- Deslocamento
G	- Energia livre de Gibbs
T	- Temperatura
P	- Pressão
D	- Distância da agulha ao coletor
V	- Tensão aplicada
R	- Vazão
C	- Concentração
m	- Massa
δ	- Parâmetro de solubilidade de Hildebrand

1. INTRODUÇÃO

Nanofibras poliméricas podem ser processadas por um grande número de métodos, incluindo a separação de fase, o estiramento mecânico, a contra moldagem, a auto moldagem e a eletrofiação¹. O processo de eletrofiação se tornou muito atrativo devido a sua metodologia de baixo custo, produzindo nanofibras a partir de uma grande variedade de materiais, de um modo relativamente simples, repetitivo e de fácil construção. O desenvolvimento de nanofibras feitas de polímeros naturais², sozinhas ou na forma de blendas poliméricas^{3,4}, impregnados com nanopartículas ou medicamentos⁵, e precursores cerâmicos⁶, tem sido demonstrado com sucesso.

Quando os diâmetros das fibras são reduzidos de micrômetros a nanômetros, algumas características excepcionais aparecem. No setor comercial são aceitas como nanofibras, fibras com diâmetros menores que 500 nm. Elas se enquadram na categoria de elementos na escala nano de 1 dimensão, onde se encontram os nanotubos e nanopartículas¹. O diâmetro e a morfologia da fibra resultante, bem como a grande área de superfície, poros de pequenos tamanhos e a estrutura em escala nanométrica, com uma vasta possibilidade de funcionalização, fazem das nanofibras eletrofiadas candidatas a uma grande gama de aplicações de interesse⁷.

Na área de Biotecnologia e Engenharia Ambiental⁸, as mantas nanofibrílicas são excelentes materiais para preparação de membranas. Moléculas ligantes, ou células, podem ser ancoradas, ou hibridizadas nas mesmas, para aplicação em purificação de proteínas e tratamento de água, síntese ou catálise enzimática.

Na área de Segurança e Defesa⁹, militares, bombeiros e médicos necessitam de um alto grau de proteção enquanto lidam com agentes químicos e biológicos, no combate a problemas urbanos, na agricultura e na indústria. Nanoestruturas podem melhorar os equipamentos utilizados atualmente na detecção de agentes químicos/biológicos com alta sensibilidade/seletividade; em filtros para toxinas químicas/biológicas e para profilaxia *in vivo*¹⁰.

Na área de Geração de Energia¹¹ um grande esforço tem sido realizado para desenvolvimento de fontes de energia ambientalmente amigáveis para substituir as atuais. Devido sua alta porosidade e grande área de superfície, mantas de nanofibras eletrofiadas têm sido consideradas para desenvolvimento de baterias poliméricas, células fotovoltaicas e membranas de polímeros eletrólitos em células combustíveis¹².

Atualmente, a prática médica é baseada totalmente no tratamento de doenças¹³, entretanto a medicina do futuro será baseada na detecção antecipada e tratamento preventivo das doenças. Junto com a nanotecnologia, novas modalidades de tratamentos estão aparecendo com significativa redução dos custos médicos. Com os recentes desenvolvimentos da eletrofição, polímeros naturais e sintéticos têm sido produzidos com morfologia e funcionalidade controlada. Um grande potencial de aplicação destas nanofibras eletrofiadas tem sido observado na área de saúde, indústrias farmacêuticas e cosméticas. Por exemplo, elas podem ser utilizadas como reparadores e regeneradores de pele e órgãos¹⁴⁻¹⁷, vetores de liberação de medicamentos e terapias¹⁸⁻²¹, implantes biocompatíveis e biodegradáveis²², diagnóstico médico e instrumentação^{23,24}, tecidos protetores contra agentes infecciosos²⁵, cosméticos²¹, medicina molecular, suplementos para cuidado do corpo e aplicações na área de odontologia.

As nanofibras exibem inúmeras características e propriedades notáveis que as distinguem de estruturas unidimensionais fabricadas por outras técnicas. Por exemplo, depois de ejetada da agulha, a nanofibra eletrodepositada está altamente carregada, sendo possível controlar eletrostaticamente sua trajetória aplicando um campo elétrico externo.

Comparadas com as nanoestruturas sintetizadas, usando outros métodos físicos ou químicos, as nanofibras eletrodepositadas são extremamente longas²⁶. Como a eletrofição é um processo contínuo, as fibras poderiam ser tão longas quanto vários quilômetros. Esta escala de comprimento é comparável àquelas fibras fabricadas por técnicas convencionais de moldagem e fição. No processo de eletrofição, estas fibras longas podem ser arranjadas aleatoriamente, em uma matriz tridimensional, como resultado do ricocheteamento do jato da solução. As fibras eletrodepositadas têm

diâmetros reduzidos, e maior razão área por volume, em relação as fibras fabricadas usando processos de deposição ou de extrusão mecânica convencional.²⁷ A alta densidade dos poros é resultante do emaranhado das nanofibras.

A fabricação de fibras de biopolímeros tem atraído um grande interesse nos últimos anos por apresentarem biocompatibilidade²⁸ e biodegradabilidade superiores aos demais polímeros; serem geralmente não tóxicas, renováveis e de considerável baixo custo; e poderem ser funcionalizadas com antioxidantes, antimicrobianos e com enzimas. Como podem ser degradadas por enzimas, assim podem ser usadas em aplicações temporárias como implantes e tecidos base para liberação de drogas, sendo possível o controle de sua taxa de degradação por reticulações e outras modificações químicas. As proteínas que tem sido eletrofiadas incluem colágeno²⁹, gelatina³⁰, fibrinogênio³¹ e seda³². Dentre os polissacarídeos eletrofiados atualmente estão a celulose^{33,34,35}, o acetato de celulose^{34,36,37}, a quitina³⁸, a quitosana^{3,4,39}, o alginato⁴⁰, o ácido hialurônico⁴¹ e a dextrana⁴².

No âmbito da saúde mundial, as feridas pós-cirúrgicas apresentam grande preocupação, pelo fato de serem consideradas alvos fáceis para a instalação de infecções, principalmente as hospitalares. No Brasil, estima-se que aproximadamente 10% das feridas pós-cirúrgicas apresentam infecções, cujo tratamento exige, além de maior tempo de internação do paciente, o uso de antibióticos de terceira geração que apresentam um custo elevado.⁴³

O desenvolvimento de um recobrimento de feridas eficiente tem um papel fundamental no tratamento das lesões de pele, na prevenção de infecções, bem como na melhoria da qualidade de vida dos pacientes e na redução dos gastos, especialmente do governo, com internações hospitalares e tratamentos.

Pesquisas desenvolvidas na área biomédica geraram várias opções comerciais de recobrimentos de feridas; tais como, Bioprocess®, Opsite® e Biobrane®, produzidos a partir de colágeno, ácido hialurônico e outros biomateriais. Entretanto, tais produtos apresentam alto custo, o que dificulta a aplicação e comercialização dos mesmos em países emergentes. Neste contexto, a busca por produtos econômicos e funcionalmente viáveis ainda é uma realidade nesta área de pesquisa⁴³. A incorporação

de fármacos ou de agentes antimicrobianos em uma membrana, capaz de matar ou inibir o crescimento dos microrganismos mais comumente encontrados nas feridas da pele, melhoraria ainda mais a eficiência destes materiais.

Com base nas informações citadas, e dando continuidade a trabalhos anteriormente desenvolvidos, propõe-se o seguinte OBJETIVO principal: “Desenvolvimento de mantas de nanofibras de acetato de celulose biocompatíveis, por eletrofiação, com a incorporação de fármacos para o tratamento de feridas, que se apresentem como uma opção interessante, com um futuro promissor devido ao baixo custo em relação as opções existentes atualmente.”

Para atingirmos o objetivo principal o trabalho foi dividido em duas etapas e teremos como meta os seguintes OBJETIVOS específicos:

Primeira Fase: membranas de acetato de celulose sem incorporação do fármaco

1. Testar a eletrofiação de várias soluções poliméricas de Acetato de Celulose em Ácido Acético/Água, Acetona/Água, DMAc/Acetona e DMAc/Acetona/Água.
2. Caracterizar as soluções poliméricas através da análise de viscosidade, tensão superficial e condutividade.
3. Construir uma curva de Viscosidade x Taxa de cisalhamento das soluções poliméricas, a fim de verificar o tipo de comportamento reológico.
4. Eletrofiar as membranas utilizando um DOE (*Design of Experiments*) com o objetivo de otimizar as condições de processo.
5. Testar Citotoxicidade das melhores membranas para confirmar sua biocompatibilidade.

Segunda Fase: membranas de CA com incorporação do fármaco Sulfato de Gentamicina

1. Incorporar o fármaco Sulfato de Gentamicina nas melhores membranas, de cada sistema de solvente, testado na Fase 1.
2. Testar diferentes concentrações do fármaco nas membrana para verificar a faixa de trabalho possível.
3. Testar a liberação controlada do Sulfato de Gentamicina, na melhor membrana obtida, com o objetivo de verificar o perfil de liberação do fármaco na mesma.

4. Testar diferentes tipos de revestimento na membrana para verificar a sua influência no perfil de liberação do fármaco.
5. Testar as membranas em uma análise microbiológica como o objetivo de verificar se o fármaco não perdeu suas propriedades durante o processo de eletrofiliação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Eletrofiação

Entre os métodos para gerar nanoestruturas na forma de fibras, a eletrofiação fornece a abordagem mais simples para formar nanofibras longas, com o interior sólido ou oco, com diâmetro uniforme e composição diversificada, bastando apenas que se conheça cada sistema em estudo e seja feita uma varredura das melhores condições de processamento de cada um. Portanto, dominar o processo e as variáveis do mesmo é de importância fundamental para se conseguir bons resultados.

2.1.1. Processo

O termo eletrofiação deriva de fiação eletrostática, e seu uso é relativamente recente (por volta de 1994); porém, a idéia fundamental foi gerada há aproximadamente 70 anos atrás⁸. Basicamente, eletrofiação é o processo para produzir fibras através de um jato induzido por uma carga elétrica, de uma solução de polímero ou polímero fundido.

De 1934 a 1944, Formhals⁴⁴ publicou uma série de patentes, descrevendo os fundamentos experimentais para produção de filamentos poliméricos usando força eletrostática⁴⁴. Nos anos 80, Larrondo e Manley⁴⁴ fizeram um trabalho com polímeros fundidos⁴⁴. Reneker e Chun⁴⁴, na década de 1990, retomaram o interesse nesta tecnologia, mostrando a possibilidade de fiação de uma gama de soluções poliméricas⁴⁴ nos anos 90.

A eletrofiação pode ser aplicada a uma gama de polímeros que são convencionalmente fiados como polioleofinas⁴⁵, poliamidas⁴⁶, poliésteres, aramidas,

acrílicos bem como biopolímeros como proteínas^{29,47}, DNA^{48,49}, polipeptídeos, polissacarídeos²⁹ dentre outros.

Os acessórios básicos de um aparato de eletrofiação (figura 1) incluem¹:

- 1- Um tubo capilar (uma seringa ou uma pipeta), com uma agulha de pequeno diâmetro;
- 2- Uma fonte de alta voltagem;
- 3- Um coletor de metal.

O processo baseia-se em um eletrodo conectado numa fonte de alta voltagem, que se estende até o tubo capilar contendo a solução polimérica; enquanto que, outro eletrodo é fixado em um coletor de metal (Figura 1), normalmente uma placa de cobre ou de alumínio⁴⁶. O tubo capilar e o coletor são geralmente mantidos a uma pequena distância um do outro e, durante os ensaios, a solução de polímero é forçada a escoar pelo êmbolo da seringa até a agulha, por gravidade ou por pressão de uma bomba dosadora no êmbolo. Inicialmente, como resultado da tensão de superfície, uma gota da solução fica pendente na ponta da agulha, com uma carga líquida diferente de zero devido à ação do campo elétrico. Por sua vez, cargas de repulsão, na superfície do coletor, causam uma força diretamente oposta a tensão de superfície. Com o aumento do campo elétrico a valores críticos, as forças eletrostáticas superam a tensão superficial dando origem a um jato cônico do fluido que é ejetado, conhecido como cone de Taylor. Ao contrário do processo convencional de fiação, o jato é estável somente próximo da ponta da agulha; depois disso, o jato apresenta instabilidade à caminho do coletor, com carga elétrica oposta. No tempo entre a saída da seringa e o depósito no coletor, o solvente apropriado evapora e fibras secas são depositadas². A fibra coletada normalmente se apresenta na forma de uma manta parecida com um não tecido. Alguns métodos permitem o alinhamento das fibras com vários graus de ordem e direção, tal como utilização de um coletor dinâmico⁵⁰⁻⁵³.

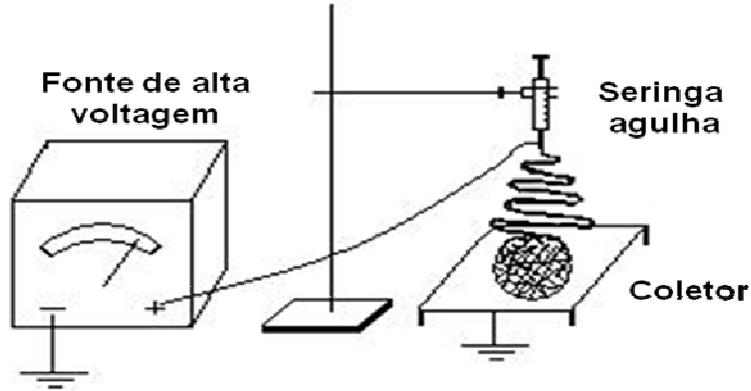


Figura 1: Desenho esquemático do equipamento de eletrofiação¹

Embora o princípio de funcionamento da eletrofiação seja simples, o processo é complexo devido ao grande número de parâmetros que influenciam o formato, o diâmetro e as dimensões da fibra resultante. Dentre estes parâmetros podemos citar a viscosidade da solução, a condutividade elétrica, a tensão superficial, a massa molecular do polímero e sua distribuição, a intensidade do campo elétrico, a natureza do contra eletrodo e a atmosfera do processamento⁵⁴.

2.1.2. Fatores que influenciam o processo de eletrofiação

Alguns parâmetros podem influenciar a transformação das soluções poliméricas em nanofibras, na eletrofiação; são eles: (a) propriedades da solução, tais como, viscosidade, condutividade elétrica e tensão de superfície; (b) condições de processo, como a força do campo elétrico aplicado, a distância entre a agulha e o coletor, e a taxa de vazão da solução polimérica; (c) parâmetros ambientais, tais como, temperatura da solução, umidade e velocidade do ar^{27,53}.

Considerando que o polímero é apto à formação de nanofibras, as características ideais que elas devem apresentar são: (1) diâmetros com valores estáveis e controláveis; (2) superfície da fibra livre de defeitos ou com defeitos controláveis e (3)

nanofibras contínuas.

2.1.2.1. Parâmetros da solução

2.1.2.1.1. Viscosidade da solução e peso molecular

Uma das condições necessárias para a eletrofição ocorrer com formação das fibras, é que um polímero em solução tenha peso molecular adequado, além da viscosidade da solução. Como o jato sai da ponta da agulha durante a eletrofição, a solução de polímero é estirada e viaja até o coletor plano. A eletrofição envolve um estiramento rápido do jato eletrificado e uma rápida evaporação do solvente. Deste modo, as cadeias poliméricas emaranhadas experimentam uma forte força de cisalhamento durante o processo de eletrodeposição e solidificam rapidamente quando atingem o coletor, impedindo sua volta às condições de equilíbrio¹.

O peso molecular do polímero, que pode ser representado pelo comprimento médio das cadeias poliméricas, tem um efeito direto na viscosidade da solução, já que esta será função do nível de emaranhamento das cadeias poliméricas no solvente.

Similarmente ao aumento do peso molecular, um aumento na concentração irá resultar em um maior entrelaçamento das cadeias poliméricas na solução, o que é necessário para manter a continuidade do jato durante o processo de eletrofição.

O jato eletrofiado, por sua vez, pode dividir-se em pequenas gotículas e resultar em contas ao longo da fibra, como efeito de uma instabilidade hidrodinâmica. À baixas viscosidades é comum encontrar contas depositadas ao longo das fibras, devido a uma grande quantidade de moléculas de solvente e poucas cadeias entrelaçadas, o que faz com que a tensão superficial seja o fator dominante do sistema ao longo do jato eletrofiado gerando instabilidade no mesmo. À viscosidades muito altas a solução pode secar na ponta da agulha, antes da eletrofição ser iniciada¹. Assim, um balanço é necessário para o sucesso da eletrofição.

Durante a eletrofição, pode ocorrer a formação de um segundo jato a partir do jato principal, o qual é estável o suficiente para produzir fibras de pequenos diâmetros a

uma dada viscosidade. Quando a viscosidade é alta o suficiente, a formação do segundo jato é pouco provável, sendo apenas o jato principal que irá contribuir para uma fibra com maior diâmetro.

2.1.2.1.2. Tensão Superficial

Na eletrofiação, as cargas da solução polimérica devem ser altas o suficiente para vencer a tensão superficial da solução. A tensão de superfície tem o efeito de diminuir a área da superfície, por unidade de massa de um fluido. Na eletrofiação, quando a concentração de moléculas livres no solvente é grande, existe uma grande tendência das moléculas do solvente se agregarem e tomarem a forma esférica, como resultado da tensão superficial. Neste caso, ocorrerá o fenômeno denominado electrospray onde a solução se agregará em gotas, ou ocorrerá a formação da nanofibra com a presença de contas¹.

Com o aumento da viscosidade da solução, ocorrerá uma interação maior entre o solvente e as moléculas do polímero e, assim, quando a solução for estirada pela influência das cargas, as moléculas do solvente que estão difundidas entre as moléculas do polímero, não conseguirão se agregar, reduzindo assim a influência da tensão superficial¹. Em outras palavras, teremos uma maior interação entre as moléculas evitando a formação da instabilidade do jato.

2.1.2.1.3. Condutividade elétrica de soluções poliméricas

Eletrofiação envolve estiramento da fibra causada por repulsão das cargas na sua superfície. Assim, se a condutividade elétrica da solução polimérica aumenta, mais cargas podem ser carregadas pelo jato. A condutividade da solução polimérica pode ser aumentada pela adição de íons. Pequenas quantidades de sal ou polieletrólitos podem ser adicionados à solução para aumentar as cargas e, como consequência, ocorrerá o estiramento da fibra sem a formação de contas e aumentará a probabilidade de fibras

com menor diâmetro. Assim, o aumento do estiramento da solução reduz o diâmetro das fibras, já que a presença de íons aumenta a condutividade da solução. Assim a voltagem crítica para ocorrer a eletrofiação diminui; entretanto, existe um limite para a redução no diâmetro das fibras. Outro efeito do aumento das cargas é a grande instabilidade formada, e como resultado temos um aumento na área de deposição das fibras¹.

2.1.2.2. Parâmetros de Processo

2.1.2.2.1. Voltagem

Um elemento crucial na eletrofiação é a aplicação de alta voltagem na solução. A alta voltagem irá induzir a carga necessária na solução e, junto com o campo elétrico externo, irá iniciar o processo de eletrofiação quando as forças eletrostáticas na solução superarem a tensão superficial. Geralmente, voltagens (positivas ou negativas) maiores que 6kV são suficientes para romper a gota e formar o cone de Taylor.

Se a voltagem aplicada é alta, uma grande quantidade de cargas irá causar uma aceleração rápida no jato e um maior volume de solução irá sair da ponta da agulha. Isto resulta em um cone de Taylor maior e menos estável¹. Assim, o suprimento de alta voltagem resulta em um campo elétrico que influenciará a morfologia da fibra obtida.

Na maioria dos casos, a alta voltagem irá levar ao maior estiramento da solução devido às grandes forças de Coulomb no jato. Esses feitos levam a redução do diâmetro da fibra e também garantem uma evaporação mais rápida do solvente e a secagem da mesma. Porém, alta voltagem pode gerar formação de contas, devido a um aumento da instabilidade do jato e o recuo do cone de Taylor para a agulha. Assim, o efeito da voltagem não somente é responsável pela aparência física da fibra, mas também pela sua cristalinidade. O campo elétrico formado pode causar maior ordem nas moléculas de polímero, durante a eletrofiação, induzindo à uma maior cristalinidade¹.

2.1.2.2.2. Vazão

A vazão irá determinar a quantidade de solução disponível para eletrofição. Para uma dada voltagem, existe uma vazão correspondente para manter um cone de Taylor estável. Quando a vazão é aumentada, existe um aumento correspondente no diâmetro da fibra ou pode ocorrer a formação de contas.

Quando um grande volume de solução é alimentado na ponta da agulha, o solvente depositado na fibra pode não ter tempo suficiente para evaporar totalmente, causando fibras fundidas com aspecto de uma teia. Portanto, a baixa vazão é desejada pois o solvente terá maior tempo para evaporar-se¹.

2.1.2.2.3. Efeito do coletor

A existência de um campo elétrico entre a fonte e o coletor é essencial para iniciar a eletrofição, sendo este o parâmetro mais importante. O coletor deve ser feito de um material condutor, como uma folha ou placa de alumínio ou cobre, eletricamente aterrado para que haja uma diferença de potencial estável entre a fonte e o coletor (vide Figura 1). Quando um coletor não condutor é utilizado, as cargas rapidamente se acumulam, resultando em poucas fibras depositadas. Para um coletor condutor, as cargas das fibras devem ser dissipadas para que o mesmo promova uma maior atração das mesmas¹.

Para um coletor condutivo, quando a velocidade de depósito é alta, e a malha da fibra é grossa ou suficiente, poderá ocorrer um alto acúmulo de carga residual nesta malha, já que polímeros geralmente não são condutores. Quando isso acontece, é comum se observar a olho nu, pequenas depressões na malha da fibra.

2.1.2.2.4. Temperatura e diâmetro da agulha

A temperatura tem o efeito de aumentar a taxa de evaporação do solvente e reduzir a viscosidade de uma solução polimérica. Com viscosidades mais baixas, devido ao aumento da temperatura, aumenta-se a mobilidade das moléculas de polímero, assim as forças eletrostáticas são capazes de exercer uma força maior sobre a solução, estirando mais a mesma e, conseqüentemente, resultando em fibras de menor diâmetro¹

Quanto ao diâmetro interno da agulha por onde flui a solução, este tem efeito no processo de eletrofiação. Diâmetros internos menores são procurados para reduzir o entupimento, devido a menor exposição do solvente à atmosfera durante o processamento, além de reduzir o diâmetro da fibra¹.

2.1.2.2.5. Distância da agulha ao coletor

Variando a distância entre a agulha e o coletor, teremos uma influência direta no tempo entre a saída da solução da ponta da agulha e seu depósito, e também no campo elétrico formado. Se o tempo de percurso da solução for grande, teremos uma secagem melhor da fibra; porém, se este for curto, a mesma poderá não secar e se depositar ainda úmida, gerando a fusão das fibras entre si. Diminuindo-se a distância, temos também o efeito do aumento do campo elétrico que, como dito anteriormente, pode aumentar a instabilidade do jato e propiciar a formação de contas¹.

2.1.2.3. Parâmetros do ambiente

2.1.2.3.1. Umidade

A umidade do ambiente pode ter influência na solução do polímero durante a eletrofiação, principalmente em polímeros hidrofóbicos. A alta umidade aumenta a facilidade de condensação de água na superfície da fibra, influenciando na sua morfologia. Esta umidade pode causar poros circulares na superfície da fibra, cujos tamanhos aumentam com o aumento da umidade, até a formação de estruturas não

uniformes. Isto ocorre porque o vapor de água condensa na superfície das fibras durante o jato, devido ao resfriamento das suas superfícies causado pela evaporação rápida dos solventes voláteis. Os poros são portanto formados, tanto quando a água ou o solvente evaporam¹. Para polímeros hidrofílicos, alta umidade pode dificultar a evaporação do solvente durante o processo de eletrofiação, dificultando ainda mais o processo podendo gerar fibras fundidas.

2.1.2.3.2. Efeito da atmosfera e da pressão

A composição do ar ambiente também tem efeito na eletrofiação, uma vez que diferentes gases têm diferentes comportamentos no campo eletrostático. Quando utilizamos atmosfera de gases com maior tensão de ruptura, como o freon, as fibras obtidas têm duas vezes o diâmetro das obtidas em outras condições¹. Por sua vez, a redução da pressão ao redor do jato de eletrofiação não melhora o processo, em geral. Quando a pressão atmosférica é baixa, a solução de polímero na seringa terá uma grande tendência de fluir para fora da agulha, causando instabilidade no jato inicial e, assim, impossibilitando a fiação devido à descarga direta das cargas elétricas¹.

2.2. Acetato de Celulose

Dentre as várias possibilidades de escolha do polímero a ser estudado, o acetato de celulose (CA) se mostra bastante interessante por ser um dos ésteres de celulose mais produzidos atualmente, e sua estrutura pode ser verificada na figura 2.⁵⁶

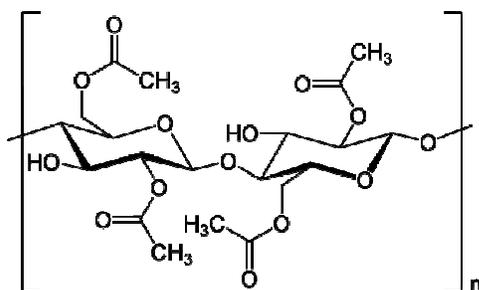


Figura 2: Unidade monomérica do acetato de celulose

Este foi primeiramente sintetizado por Schutzenberger, em 1865, pelo aquecimento da celulose com ácido acético, sob pressão. Em 1879, Franchimont⁵⁷ adicionou ácido sulfúrico como catalizador para promover a esterificação da celulose, sendo este o processo utilizado até os dias atuais⁵⁷. Ele apresenta-se como um polímero amorfo, atóxico e inodoro, com uma grande vantagem em relação à celulose, por ser apto à solubilização em vários solventes.⁵⁷ É resistente a ácidos fracos, estável em óleo mineral, e permeável ao vapor de água e de álcool.

As propriedades e aplicações do acetato de celulose são determinadas pela viscosidade de suas soluções, e pelo grau de substituição do polímero (DS). Acetatos de celulose que tenham grau de substituição (DS) entre 0,5-1 são solúveis em água. Este fenômeno é atribuído à ruptura das ligações de hidrogênio intra e intermoleculares dentro da estrutura do CA pela introdução do pequeno número de grupos acetil. Com o aumento do grau de substituição (DS), o acetato de celulose torna-se insolúvel em água, mas mostra boa solubilidade em uma variedade de solventes orgânicos, tais como tetraidrofurano (THF), acetona e N, N dimetilacetamida (DMAC).⁵⁸

Devido à facilidade de obtenção de filmes com estrutura porosa⁵⁹, o acetato de celulose é mais comumente usado para aplicações como membranas semi-permeáveis em diálises, ultra filtração e osmose reversa. Entretanto, o sucesso desta pesquisa passa pela escolha adequada do solvente do sistema a ser submetido à eletrofiliação.

2.3. Nanofibras de Acetato de Celulose

Eletrofiação de biopolímeros tem mostrado ser um grande desafio devido à limitada solubilidade destes na maioria dos solventes orgânicos, pouca flexibilidade molecular e facilidade para formar ligações de hidrogênio na estrutura tridimensional.

Dentre os polissacarídeos, a celulose é o polímero mais abundante e rapidamente renovável, além de ser conhecido ao longo da história da produção de fibras²; porém, seu processamento é restrito devido a sua limitada solubilidade em solventes comuns, e sua impossibilidade de fusão, devido à suas numerosas ligações de hidrogênio intra e intermolecular.

Nanofibras de celulose já foram obtidas diretamente pela eletrofiação da mesma em solução de óxido de N-metilmorfolina (NMMO). Porém, o processo realizado a altas temperaturas (80-130⁰C) gerou nanofibras pouco uniformes, que foram lavadas cuidadosamente com água para remover o solvente residual^{60,33}.

Como uma alternativa direta à eletrofiação da solução de celulose, a eletrofiação e, subsequente, desacetilação do acetato de celulose tem sido estudada, usando-se vários sistemas de solventes. Liu e Hsieh⁴⁵ estudaram a relação entre as propriedades da solução de acetato de celulose e a estrutura da nanofibra formada usando acetona, ácido acético e N,N-dimetilacetamida (DMAc), bem como suas misturas. Num outro trabalho desenvolvido por Liu et al.⁶¹ foram preparadas primeiramente nanofibras de acetato de celulose, que foram posteriormente tratadas com solução alcalina para remoção dos grupos acetil, rendendo celulose regenerada. O mesmo processo foi utilizado por Ma et al.⁶² adicionando um processo de tratamento térmico e funcionalizando as fibras com Cibracon Blue F3GA, onde foram estudadas suas propriedades de filtração como membrana de afinidade. Outro estudo foi realizado, usando como solventes cloreto de lítio (LiCl):DMAc com coagulação em banho de água, e depósito em coletores aquecidos⁶³. Xu et al.⁶⁴, eletrofiaram celulose em um sistema de solventes não voláteis (cloreto de 1-alil metilimidazolina) utilizando um coletor rotativo.

Adicionalmente, a celulose pode ser funcionalizada com reações envolvendo grupamentos hidroxil (-OH), gerando seus derivados: acetato de celulose, hidroxil-propil, e outros que também podem ser fiados³⁴.

Jaeger et al.⁶⁵ eletrofiaram acetato de celulose em solução de acetona, resultando em fibras com morfologia de contas, provavelmente resultado da gelatinização do polímero, baixa viscosidade da solução ou devido ao baixo ponto de ebulição da acetona. Baseada na inconsistência da morfologia das fibras encontradas por Jaeger, Liu e Hsieh⁶⁶ investigaram o uso de acetona, ácido acético e DMAc como solventes, seguindo os parâmetros de solubilidade de Hildebrand. As fibras mais consistentes foram obtidas em diâmetros na ordem de 100 nm a 1µm, com mistura de acetona/DMAc como solvente. Num outro trabalho Son et al.⁶⁷ testaram acetona/água como solventes, através do controle de pH, e tiveram bons resultados na eletrofiação. Ma et al.⁶² também eletrofiaram acetato de celulose em solução de acetona/DMF/trifluoroetanol(TFE), o que resultou em fibras com o diâmetro de 200 nm a 1µm.

Outros, como Chen et al.⁴⁶, num trabalho interessante, eletrofiaram um composto de polietileno glicol/acetato de celulose (PEG/CA), obtendo fibras termo reguladoras. Wang et al.⁶⁸, eletrofiaram acetato de celulose regenerada, utilizando acetona como solvente. Eles avaliaram os efeitos dos parâmetros de processamento com concentração, distância coletor-fieira e tensão aplicada, avaliando a morfologia e estrutura da fibra e comparando-as com acetato de celulose original. Shuiping et al.⁵⁹, produziram nanofibras de um complexo de acetato de celulose - 1',3',3'-trimetil-6-nitrospiro (2H-1-benzopirano-2, 2'-indoline) (NO2SP) pelo método de eletrofiação e suas propriedades fotocromáticas foram investigadas. Foi observada propriedade fotossensível reversível das nanofibras, com grande potencial para as aplicações em dispositivos ópticos e/ou biossensores. Greish et al.⁶⁹, produziram nanofibras de acetato de celulose e avaliaram os efeitos de tratamentos térmicos e químicos na estabilidade estrutural.

2.4. Liberação controlada de Fármacos

A tecnologia de liberação controlada de fármacos apresenta-se como um desafio interdisciplinar para farmacêuticos, engenheiros químicos, engenheiros de biomateriais e para a comunidade médica.⁷⁰ Desenvolvimento de polímeros para liberação controlada de fármacos vem tendo um forte crescimento desde a década de 60. Desde então, um extensivo progresso tem sido realizado na síntese e fabricação destes sofisticados sistemas poliméricos.⁷¹

Sistemas poliméricos para liberação controlada de fármacos têm inúmeras vantagens, comparadas às formas normais de dosagem²⁰. Nestes sistemas, os níveis de fármacos no plasma são continuamente mantidos em uma faixa terapêutica desejável, sendo que os efeitos colaterais nocivos observados na administração convencional podem ser reduzidos, ou eliminados, pela administração local. Fármacos com um tempo de vida curto *in vivo*, podem ser protegidos da degradação, e a administração contínua de pequenas quantidades de fármacos, pela liberação controlada, pode eliminar o desconforto da administração parenteral de várias doses do agente bioativo no paciente. Entretanto, existem muitos problemas a serem resolvidos na área de desenvolvimento e pesquisa, como por exemplo, a baixa eficiência do sistema de liberação controlada de fármacos e o efeito de disparo inicial de grande quantidade da droga no organismo (*burst release*)¹⁹.

Vários polímeros já foram testados em sistemas de liberação controlada, alguns por suas propriedades físicas, e outros por suas propriedades químicas.⁷¹

Os mecanismos que controlam a liberação de drogas em sistemas poliméricos podem ser classificados em⁷¹:

- Sistema de Difusão Controlada em suporte polimérico não degradável: O fármaco é dissolvido ou disperso homogeneamente na matriz polimérica hidrofóbica e é liberado por migração nos poros formados na matriz polimérica, a medida que o mesmo intumesce.

- Sistema de Dissolução Controlada em suporte polimérico degradável: Normalmente o fármaco em pó é comprimido juntamente com um polímero solúvel em água. O fármaco é liberado a medida que o polímero intumescce e dissolve no meio.

- Sistema de Liberação por Osmose: O sistema baseia-se em um reservatório do fármaco rodeado por uma membrana polimérica semipermeável. A liberação ocorre pela criação de um gradiente de pressão osmótica pela molécula do fármaco, provocando a difusão gradual de água em direção os reservatório e forçando o fármaco a sair por um orifício do sistema.

- Sistema por Troca Iônica: São normalmente utilizados em fármacos iônicos ou ionizáveis. Polieletrólitos são reticulados para formar resinas de troca iônica insolúveis em água. O fármaco é ligado ao grupo iônico pela formação de sal durante a absorção e depois a liberação ocorre pela substituição destes pelos íons carregados presentes no meio.

- Sistema Pró-Fármaco: neste sistema os grupos funcionais do polímero são ligados covalentemente as moléculas do fármaco e gradualmente elas são liberadas por ruptura hidrolítica ou enzimática.

2.5. Nanofibras para Liberação Controlada de Fármacos

A administração de fármacos aos pacientes de maneira mais fisiologicamente aceitável tem sido sempre uma preocupação da área médica. A liberação do fármaco com nanofibras de polímero é baseado no princípio que a taxa de dissolução da partícula do fármaco aumenta com o aumento da área superficial tanto do fármaco quanto da matriz.⁵³ O uso de fibras eletrofiadas, como agentes carreadores para fármacos, promete um futuro amplo em aplicações biomédicas. Comparado com outras formas farmacêuticas, existem várias vantagens em usar nanofibras eletrofiadas. Fármacos pode ser convenientemente incorporados aos polímeros antes ou durante a eletrofiação; enquanto que o perfil de liberação da droga pode ser projetado por uma

modulação da morfologia, da porosidade e da composição da membrana de nanofibras.⁷²

Supaphol et al.²¹ eletrofiaram uma solução de 16% de acetato de celulose, utilizando como sistema de solventes acetona/DMAc com as vitaminas A ou E incorporadas, para aplicação cosmética. Em outro evento, Supaphol et al.¹⁸ também eletrofiaram acetato de celulose e funcionalizaram o material para liberação tópica de medicamentos. Foram incorporados à solução de acetato de celulose, 4 medicamentos antiinflamatórios não esteróides, em fibras com diâmetro da ordem de 200 nm, as quais foram comparadas com filmes contendo vitaminas e drogas.

Kenawy et al.⁵ estudaram a liberação de 5% de hidrocloreto de tetraciclina em PLA, PVA e suas blendas. As taxas iniciais de liberação de todas as formulações foram altas (efeito burst) durante as primeiras 10-12h. Por sua vez, Zong et al.⁷³ eletrofiaram PDLLA contendo Mefoxin, mas observaram o efeito burst após 3h e completa liberação em 48h. Em ambos os casos foi observada a deposição dos fármacos na superfície da fibra. Em outro trabalho, Zeng et al.¹⁹ eletrofiaram PLLA adicionando vários surfactantes e Rifampin (fármaco utilizado para tuberculose, derivado da Rifamicina B). Foi observado que o fármaco foi encapsulado no interior da fibra, e a liberação do mesmo ocorreu continuamente, durante o processo de degradação da fibra, não sendo observado efeito *burst*.

Cao et al.⁷⁴ eletrofiaram um composto reticulado de poli (estireno-co-anidrido maleico de sódio) e hidrogel de celulose (SMA-Na/celulose), com o objetivo de obtenção de um novo sistema de liberação de fármaco com rápida resposta ao estímulo. Novamente, Supaphol et al.⁷⁵ eletrofiaram acetato de celulose, incorporando asiaticoside ou extrato de *Centella Asiática* em uma solução de água/acetona/dimetilacetamida, para aplicações como filmes tópicos/transdérmicos ou *patches* para recobrimento da pele com presença de asiaticoside. Outros, como Ignatova et al.⁷⁶, eletrofiaram materiais híbridos de quitosana e poliácido láctico (PLA) reticulado para aplicações em recobrimento da pele, os quais apresentaram uma eficiente inibição do crescimento de bactérias gram positivas e gram negativas. Outro trabalho muito interessante foi feito por Rodrigues Filho et al.⁷⁷, que desenvolveram

membranas de triacetato de celulose produzidas a partir de bagaço de cana como matriz, para liberação controlada de Doxiciclina para uso entérico e tópico.

Num trabalho interessante, Son et al.³⁶ adicionaram AgNO_3 em uma solução de 10% acetato de celulose, preparada em acetona/água. Após eletrofiação, as membranas foram irradiadas com luz UV a 245nm, e foi observado que as partículas de Ag ficaram predominantemente na superfície da fibra de acetato de celulose. As mantas obtidas dessas nanofibras foram testadas contra *S.aureus*, *E.coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, e todas provocaram redução de bactérias em torno de 99% após incubação.

Katti et al.⁷⁸ eletrofiaram poli ácido láctico-co-ácido glicólico (PLAGA) incorporando o antibiótico cefazolina para tratamento de feridas. Os parâmetros de processo que influenciavam a morfologia das fibras foram avaliados, porém não foi realizado um estudo sobre a liberação do fármaco.

Um trabalho com fibras co-axiais eletrofiadas foi desenvolvido por Huang et al.⁷² A policaprolactona foi usada como a camada externa, e dois fármacos, Resveratrol e Sulfato de Gentamicina, foram usados como as camadas internas. A morfologia, microestrutura e desempenho mecânico das fibras foram caracterizados. As taxas de degradação das membranas e o comportamento de liberação das drogas foram determinados.

2.6. Planejamento Fatorial

Como já discutido, embora o fundamento da eletrofiação seja simples, o processo é complexo pelo grande número de parâmetros que influenciam o formato, o diâmetro e as dimensões das fibras resultantes. Por isso, recorre-se a uma ferramenta útil na avaliação destes múltiplos fatores, ou seja, à análise estatística. Os trabalhos que incluem o Planejamento de Experimento ou “Design of Experiments” (DOE) para a eletrofiação são ainda raramente encontrados. O planejamento e otimização de experimentos, usando-se planejamento fatorial, apresenta-se atualmente como uma ferramenta de importância inigualável em projetos de pesquisa acadêmica, bem como

em aplicações industriais. Através dessa técnica é possível planejar o experimento, de forma a obter-se exatamente o tipo de informação desejada, num tempo e custo menores⁷⁹. Pelo planejamento fatorial pode-se determinar a influência de um ou mais parâmetros sobre uma outra variável de interesse, tornando possível observar efeitos de interação que não seriam possíveis de otimizar com estudos univariados. Deste modo, o efeito de parâmetros de fiação, tais como a concentração da solução, tensão, distância e velocidade de rotação, no diâmetro das fibras podem ser determinados com o auxílio de um DOE.

2.7. Viscosidade de Soluções

Define-se como fluido uma substância que se deforma continuamente, quando submetida a um esforço constante, independente de quão pequeno seja este esforço.⁸⁰

O tipo mais comum de deformação nos fluidos é causado por cisalhamento simples, que gera um escoamento caracterizado pelo movimento relativo das moléculas devido à ação de uma força externa.⁸⁰

De todas as propriedades dos fluidos, a viscosidade requer uma maior atenção no estudo do fluxo de um determinado fluido. Ela foi introduzida por Isaac Newton em 1687, o qual focou a atenção em líquidos, apresentando a hipótese associada com escoamento simples de fluidos entre duas placas paralelas. A viscosidade pode ser considerada a principal propriedade reológica de um fluido, e pode ser definida como sendo a resistência ao movimento de fluir de um material, (ou sinônimo de atrito interno). Assim, a viscosidade mede a resistência ao escoamento entre as camadas de moléculas de um fluido.⁸⁰

Em soluções poliméricas, a viscosidade de uma solução é relacionada ao emaranhamento das moléculas de polímero nesta solução. Em um estado sem tensões, normalmente em soluções, as cadeias poliméricas estarão em uma conformação aleatória em um bom solvente ou enovelada quando se trata de um não solvente. Este estado é determinado pela entropia do sistema, sendo que esta aumenta quando há um aumento na desordem. A medida que um polímero é deformado, devido a aplicação de

uma tensão, as cadeias tendem a ser alinhar, e o sistema se torna ordenado. Uma vez retirada a tensão, as cadeias de polímero tendem a retornar ao seu estado de equilíbrio termodinâmico, que é a conformação emaranhada. A quantidade de emaranhamentos e a interação do polímero com o solvente, dentre outros fatores, irá determinar a viscosidade da solução polimérica, já que estes influenciam diretamente a mobilidade das macromoléculas quando aplicada uma força. O grau de enovelamento das cadeias é um fator importante para o processo de eletrofição, pois durante o trajeto entre a agulha e o coletor, a força do campo elétrico irá estirar as cadeias dos polímeros ainda enoveladas, dando origem às fibras⁸¹.

Nesta altura, os conceitos de tensão de cisalhamento e taxa de cisalhamento tornam-se importantes, para que se possa entender melhor o conceito físico e matemático da viscosidade. Consideremos, então, um fluido entre duas placas, uma fixa e outra móvel. À medida que a placa móvel é deslocada, gera-se um gradiente de velocidade do fluido que vai desde zero na interface com a placa fixa até o valor máximo na interface da placa móvel. Quanto maior a força imposta na placa móvel, maior será o gradiente de velocidade do fluido.⁸⁰

A figura 3 apresenta as forças atuantes no fluido, após a força de cisalhamento aplicada à placa móvel.

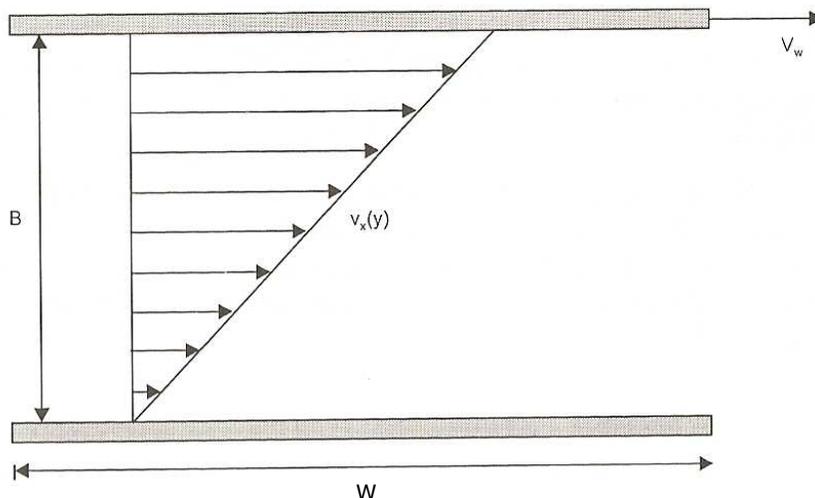


Figura 3: Fluido viscoso entre placas, cisalhado por uma força aplicada na placa, onde B =distância entre placas, W =comprimento das placas e V_w =velocidade da placa superior.⁸²

Tensão de cisalhamento (τ) - é a força por unidade de área cisalhante, necessária para manter o escoamento do fluido e é expressa segundo a equação 1, em N/m^2 ou dina/cm^2 ,

$$\tau = F/A \quad (\text{eq.1})$$

onde F é a Força necessária para provocar um deslocamento na placa (para o fluido escoar) e A é a área exposta ao cisalhamento.

Taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) - é o deslocamento relativo das partículas ou moléculas do fluido. A taxa de cisalhamento também pode ser denominada de grau de deformação ou gradiente de velocidade e pode ser descrita, matematicamente, pela equação 2. A dimensão da taxa de cisalhamento é s^{-1} e sua unidade mais comum é s^{-1} ,

$$\dot{\gamma} = \partial v / \partial y = \partial \gamma / \partial t \quad (\text{eq. 2})$$

onde:

$v \rightarrow$ velocidade

$\gamma \rightarrow$ deformação

$t \rightarrow$ tempo.

Os fluidos são classificados conforme seu comportamento reológico, conforme a figura 4.

2.7.1. Fluidos Newtonianos

As propriedades reológicas de fluidos newtonianos são independentes da taxa de cisalhamento e do histórico anterior de cisalhamento, e dependentes somente da composição e temperatura. Para um fluido newtoniano ideal, a tensão de cisalhamento

é uma função linear da taxa de cisalhamento, e a constante de proporcionalidade para esta relação μ é chamada de viscosidade newtoniana.⁸⁴⁻⁸⁶

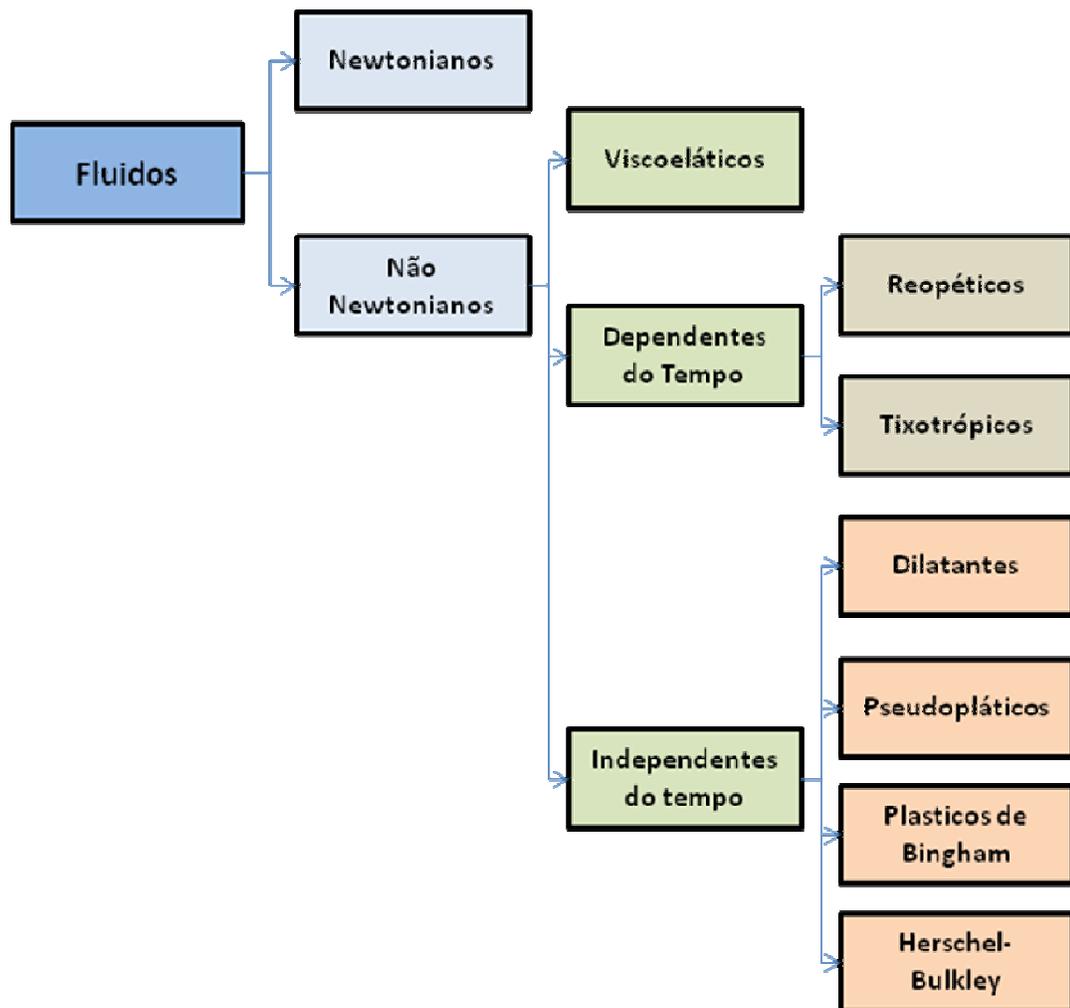


Figura 4: Classificação dos fluidos segundo comportamento reológico (fluxo).⁸³

A equação matemática que descreve a viscosidade é dada pela equação 3:
onde:

$$\mu = \tau / \dot{\gamma} \quad (\text{eq.3})$$

τ = tensão de cisalhamento ($\text{N.m}^{-2} = \text{Pa}$)

$\dot{\gamma}$ = taxa de cisalhamento (s^{-1})

μ = viscosidade newtoniana (Pa.s)

Todos os fluidos que obedecem à Equação 4 são denominados fluidos newtonianos, sendo então a viscosidade uma característica intrínseca que depende da temperatura e da pressão. A figura 5a mostra a linha de inclinação constante passando pela origem no gráfico $\dot{\gamma}$ versus τ . A figura 5b indica com uma linha horizontal a viscosidade constante com a taxa de cisalhamento.

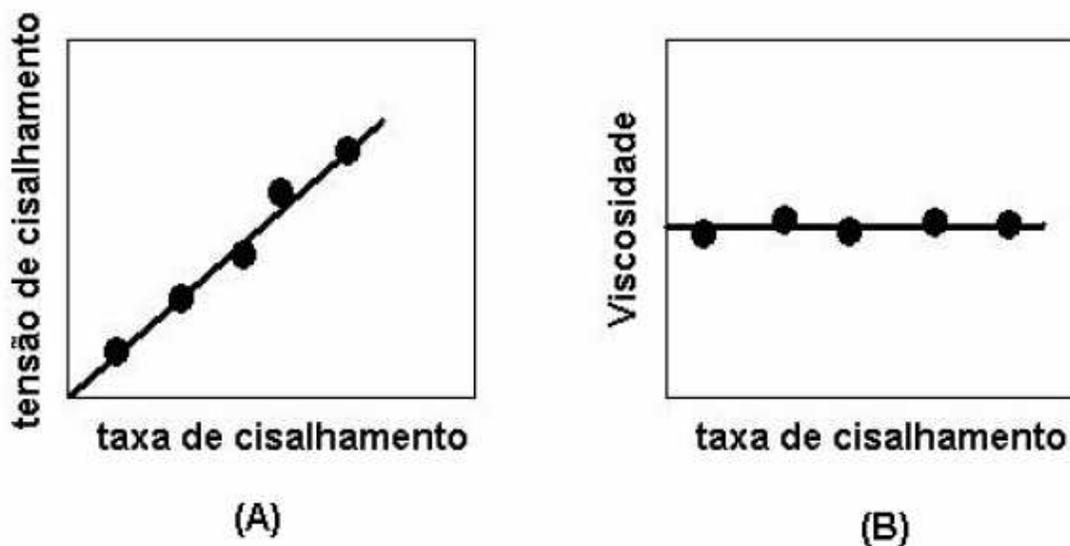


Figura 5: Representação gráfica do fluido Newtoniano (A) curva de tensão de cisalhamento x taxa de cisalhamento e (B) curva de viscosidade versus taxa de cisalhamento⁸⁷.

2.7.2. Fluidos Não-Newtonianos

Nas soluções conhecidas como não-newtonianas, a viscosidade é variável com a taxa de cisalhamento ou com a tensão de cisalhamento. Conforme ilustra a figura 6 os fluidos não-newtonianos não apresentam uma relação $\tau \times \dot{\gamma}$ linear. Neste caso, a

viscosidade da solução polimérica deixa de ser uma característica intrínseca do fluido e passa a depender da taxa de cisalhamento e de outros fatores tais como: características físicas das partículas na suspensão (distribuição granulométrica, densidade, forma) e tipo de interação entre as partículas na suspensão (repulsão, atração).⁸⁴⁻⁸⁶

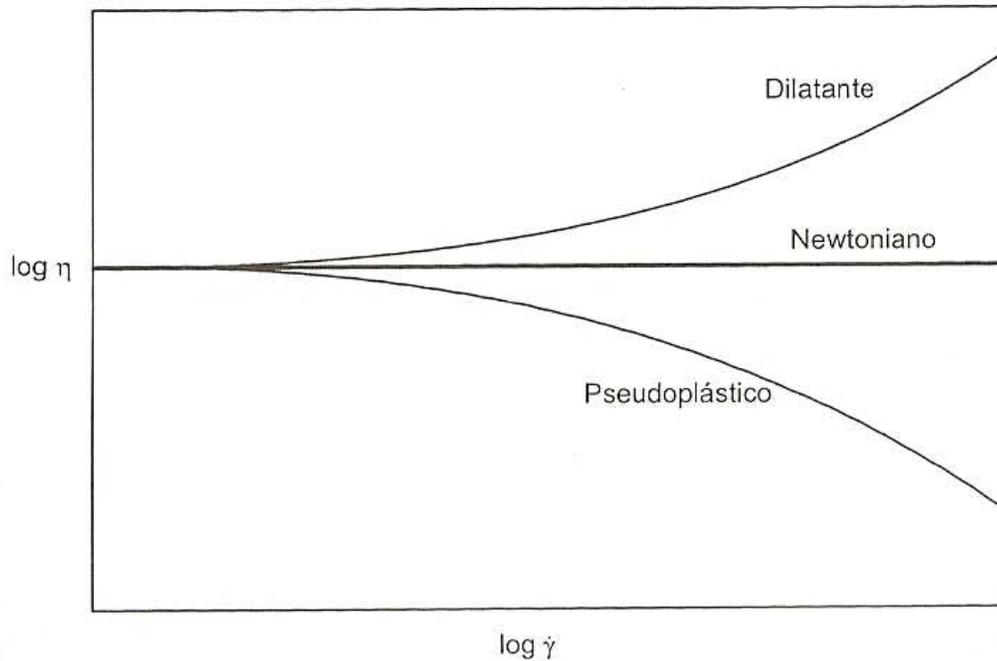


Figura 6: Curvas de fluxo de diferentes fluidos⁸².

Os fluidos não-newtonianos podem ser dependentes ou independentes do tempo. Para os fluidos não-newtonianos independentes do tempo, à temperatura e composição constantes, a viscosidade aparente depende da taxa ou da tensão de cisalhamento. Para tais fluidos, o termo viscosidade pode ser substituído por η_{ap} que é a viscosidade aparente e é função do gradiente de velocidade, (equação 4), onde:

$$\eta_{ap} = \tau / \dot{\gamma} \quad (\text{eq. 4})$$

η_{ap} = Viscosidade aparente (Pa.s)

τ = Tensão de cisalhamento ($\text{N.m}^{-2} = \text{Pa}$)

$\dot{\gamma}$ = Taxa de cisalhamento (s^{-1})

2.8. Condutividade da solução

A condutividade iônica é definida como a habilidade de uma substância de conduzir corrente elétrica, como resultado da soma das contribuições de todos os íons presentes, da concentração destes e da facilidade com que se movimentam na solução.

Segundo a teoria da dissociação eletrolítica de Arrhenius, quando uma substância se dissolve em água, ela vai se dividindo em partículas cada vez menores. Se essa divisão chega até as moléculas, a solução não conduzirá corrente elétrica; se, por outro lado, essa divisão for além das moléculas e estas se dividirem em partículas ainda menores, os íons, então a solução conduzirá corrente elétrica⁸⁸.

Segundo a Lei de diluição de Ostwald, Equação 6, quanto mais diluído for um eletrólito, maior será seu grau de ionização e, portanto a condutividade da solução.⁸⁸

$$K_i = \frac{[C^+].[A^-]}{[CA]} = M\alpha^2 / (1-\alpha) \quad (\text{eq. 6})$$

onde:

K_i = constante de ionização

$[C^+]$ = concentração dos cátions

$[A^-]$ = concentração dos ânions

$[CA]$ = concentração do composto não ionizado ou não dissociado

M = concentração molar em mol/L

α = grau de ionização

Se $\alpha \leq 5\%$, admite-se que $K_i = M\alpha^2$, pois o resultado de $(1 - \alpha)$ é aproximadamente

igual a 1.

Para soluções poliméricas, a condução da corrente elétrica depende dos fenômenos que podem ocorrer através do movimento de diferentes tipos de cargas elétricas livres no material, ou dos íons presentes nos solventes. Na maioria dos materiais poliméricos isolantes é muito difícil observar a condução de cargas pela ausência de íons livres no material.

A condutividade elétrica dos solventes orgânicos é muito baixa, porque eles contêm muito poucos íons que geralmente são os responsáveis pela condutividade iônica da solução. A presença de ácidos, bases, sais e/ou dióxido de carbono dissolvidos pode aumentar a condutividade do solvente. Para solventes ácidos orgânicos, a adição de uma pequena quantidade de água pode aumentar muito a condutividade dos mesmos, devido a ionização das suas moléculas.

2.9. Tensão Superficial

Superfícies líquidas tem a tendência a se contraírem e assumir uma área menor possível. Esse efeito já é de muito conhecido e se deve à tensão superficial.⁸⁹

Uma molécula no interior de um líquido é rodeada por moléculas vizinhas e é atraída igualmente por todos os lados por dispersão de London, orientação Keesom, indução de Debye e forças ácido base de Lewis. Assim a resultante de forças será praticamente nula. No entanto, uma molécula na superfície de uma solução é atraída apenas parcialmente, somente pelas moléculas laterais e inferiores à superfície provocando uma resultante de forças diferente de zero. Quanto mais forte for essa resultante de forças atrativas, maior será a tensão superficial⁸⁹, normalmente definida como uma força por unidade de comprimento e expressa em dinas/cm ou mN/cm.

O pré requisito geral para que haja uma interface entre duas fases (líquido-líquido, líquido-gás, líquido-sólido, sólido-gás) é que a energia livre para a formação da interface seja positiva, ao contrário teremos misturas miscíveis.

Podemos definir a tensão superficial imaginando um dispositivo simples que consiste de uma alça de arame com um lado móvel e supondo que este se comporta como um aparelho ideal sem atrito. Mergulhando a alça de arame em um líquido ocorre a formação de uma película do líquido. A tensão superficial faz com que o fio móvel deslize na direção à diminuir a área do filme, se não for aplicada uma força de oposição. Esta força, F , opera ao longo da borda inteira do filme e varia linearmente com o comprimento l do fio móvel, tendo um valor característico para cada líquido. Se σ representa uma propriedade intrínseca da superfície do líquido, o aparelho mede a tensão superficial como:

$$\sigma = F/2l \quad (\text{eq. 7})$$

porque o filme tem dois lados.

Podemos escrever o trabalho (ω) associado com a expansão da área interfacial como:

$$d\omega = F dx = \sigma 2l dx = \sigma dA \quad (\text{eq. 8})$$

onde:

σ = tensão superficial

F = força

l = comprimento do fio móvel

x = deslocamento do fio móvel

A = área

Em temperatura e pressão constantes o trabalho para aumentar a área contribui para o diferencial de energia livre de Gibbs. Agora é possível relacionar a equação 8 a quantidades termodinâmica e escrever:

$$dG = \sigma dA \quad (\text{eq. 9})$$

sendo:

G = energia livre de Gibbs

Podemos reescrever esta expressão relacionando a tensão superficial com o aumento da energia livre de Gibbs por unidade de incremento na área como:⁹⁰

$$\sigma = (G/A)_{T,P} \quad (\text{eq. 10})$$

onde:

T=temperatura

P=pressão

2.10. Citotoxicidade

Desde 1930, uma grande variedade de resinas foram introduzidas em tratamentos médicos e odontológicos. Para garantir a segurança desses materiais, testes de citotoxicidade têm sido desenvolvidos para avaliar a biocompatibilidade do material. A biocompatibilidade pode ser definida como a capacidade de um material de exercer suas funções específicas quando aplicado em tecidos vivos de determinado hospedeiro, sem, contudo, causar danos ou prejuízo ao mesmo.⁹¹

O uso de animais de laboratório em testes *in vivo* apresenta um controle cada vez mais rigoroso, assim há a necessidade de se desenvolver e padronizar testes *in vitro* que possam detectar a toxicidade de materiais, sem causar reações adversas e nem lesar o organismo do paciente.⁹²

De acordo com o Órgão Internacional de Padronização ISO (International Standard Organization), o ensaio de citotoxicidade *in vitro* pela norma ISO 10993, é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos. Somente quando é comprovada a sua não toxicidade, o estudo da biocompatibilidade do produto pode ter continuidade, realizando-se os ensaios

necessários em animais de laboratório. Vários métodos *in vitro*, para avaliar a toxicidade de biomateriais, foram padronizados utilizando-se culturas celulares.⁹²

Existe uma variedade de diferentes modelos *in vitro* para teste de Citotoxicidade de biomateriais. Estas incluem: testes de “contato direto”, onde os contatos do biomaterial com o sistema de célula é direto, sem barreiras; testes de “contato Indireto”, onde há uma barreira entre o biomaterial e o sistema de célula, ou seja, uma camada de agar ou um filtro Millipore; e, finalmente, testes com “extratos” onde eluentes de biomateriais são expostos à células.⁹³

Os métodos *in vitro* apresentam vantagens em relação aos *in vivo*, pois podem limitar o número de variáveis experimentais, obter dados significativos mais facilmente além do período de teste ser, em muitos casos, mais curto.⁹²

Estudos com estes métodos demonstraram que os testes com culturas celulares podem ser utilizados com sucesso, pois são reprodutíveis, rápidos, sensíveis e financeiramente acessíveis para a execução do estudo de biocompatibilidade *in vitro*.⁹²

2.11. O Fármaco Sulfato de Gentamicina

Dentre os agentes antimicrobianos disponíveis, a gentamicina (Figura 7) é um antibiótico pertencente à família dos aminoglicosídeos, produzida por cepas de *Micromonospora purpurea*, isolada em 1963 e utilizada desde então no tratamento de diversas infecções, devido ao seu baixo custo e ampla faixa de atividade antibacteriana, através do mecanismo de inibição da síntese protéica.

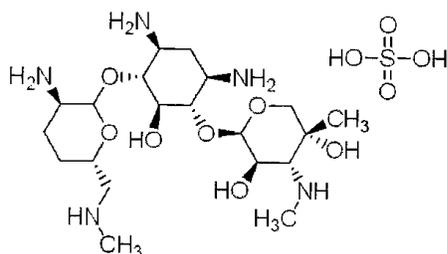


Figura 7: Estrutura química do sulfato de Gentamicina.

O sulfato de gentamicina é altamente solúvel em água, moderadamente solúvel em etanol, metanol, acetona e praticamente insolúvel em benzeno e hidrocarbonetos halogenados. É indicado para septicemia, infecções cutâneas, dentre outras, causadas por *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Serratia*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella enterobacter*. As concentrações mínimas de gentamicina para a inibição do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* variam de 0,06 a 8 µg/ml e para *Staphylococcus aureus* de 0,12 a 1,0 µg/ml.

Muitos estudos têm sido realizados avaliando-se novas formas de aplicação do Sulfato de Gentamicina. Gornukhina et al⁹⁴, desenvolveram um novo material hospitalar modificando quimicamente a superfície do polipropileno com Gentamicina, obtendo um material com alto grau de atividade antibacteriana e ação antimicrobiana.

Cobertura de Alginato de cálcio e gelatina, desenvolvidas por Xiao et al⁹⁵, foram usadas em implantes de Ti₆Al₄V como sistema de liberação controlada de gentamicina, com o objetivo de prevenir infecções ósseas e facilitar a adesão dos ossos aos tecidos. Belcarz et al⁹⁶, desenvolveram uma cobertura de queratina/gentamicina em matrizes de hidroxiapatita para implantes, os quais apresentaram uma alta atividade antibacteriana, favorecendo a proliferação do osteoblasto. Campos et al⁹⁷, desenvolveram filmes de quitosana com gentamicina para proteção e tratamento de infecções de pele, com excelentes resultados.

2.12. Curativos para lesões de pele

Historicamente, o tratamento de feridas tem como objetivo a proteção das lesões contra a ação de agentes externos físicos, mecânicos ou biológicos. É um meio terapêutico que consiste na aplicação de uma cobertura sobre uma ferida limpa. Até o século 20, os recobrimentos de feridas eram considerados produtos passivos, com mínima influência no processo de cicatrização.⁹⁸

A pele é a primeira linha de defesa contra o ataque de patógenos no corpo humano. Quando esta barreira é rompida, seja por trauma, cirurgia, ou outros

procedimentos invasivos, o corpo se torna vulnerável à invasão microbiana⁹⁸. O tratamento de feridas de pele, na maioria dos casos, exige a aplicação de um medicamento antimicrobiano para evitar ou combater a infecção, devido a grande exposição da pele ao meio externo, onde o contato com os microrganismos é constante e inevitável⁹⁹.

O recobrimento de ferida ideal deve substituir as funções da pele perdida, bem como proteger a ferida da perda de fluidos e proteínas, prevenir a invasão de bactérias, dissipar o estresse mecânico externo, bem como melhorar e estimular a cicatrização in vivo (feridas). Além disso, o material deve ser biocompatível para evitar rejeição e apresentar um custo acessível para que sua utilização seja economicamente viável.

Como já citado, pesquisas desenvolvidas na área biomédica geraram várias opções comerciais de recobrimentos de feridas, entretanto tais produtos apresentam alto custo, o que dificulta a aplicação e comercialização dos mesmos em países emergentes.

O conceito de incorporação de fármacos em uma membrana, para utilização como recobrimentos para feridas, melhorando a eficiência destes materiais, iniciou-se com a pesquisa pioneira de Winter¹⁰⁰, na década de 60, onde foi considerado o envolvimento ativo do recobrimento com a ferida, com a finalidade de estabelecer e manter um ambiente ótimo para a cicatrização da mesma¹⁰⁰. No grupo de pesquisa da Orientadora deste trabalho, pesquisas com membrana cicatrizantes já foram anteriormente desenvolvidos e publicados por Campos et al.^{43, 97}

Os microrganismos mais comumente encontrados em feridas de pele são o *Staphylococcus aureus* e a *Pseudomonas aeruginosa*⁴³, gram positivo e gram negativo, respectivamente. Dessa forma, seria interessante utilizar um agente antimicrobiano capaz de matar ou inibir o crescimento de pelo menos essas duas espécies de bactérias.

Deste modo, nanofibras poliméricas tem se mostrado promissoras para o tratamento de de feridas ou queimaduras de pele humana, bem como para utilização como dispositivos hemostáticos com algumas características únicas. Membranas de nanofibras para curativos geralmente têm tamanhos de poros que variam de 500 nm a

1 mm, pequeno o suficiente para proteger a ferida da penetração bacteriana e elevada área superficial de 500-100 m² / g que é extremamente eficiente para a absorção de líquidos e liberação por via cutânea⁵³.

Em infecções crônicas, o fornecimento de sangue é pobre na área infectada e, por sua vez, é difícil de se obter uma concentração suficiente de antibióticos no local da infecção. Liberação controlada de antibióticos no local do ferimento é uma nova estratégia a ser empregada no tratamento de infecções. Sistemas de liberação localizados, com base em polímeros biodegradáveis, são capazes de liberação rápida no início (efeito burst) e de manter uma liberação lenta e controlada do fármaco por um período de tempo necessário, para controlar a infecção. A grande vantagem destes sistemas é a liberação constante e prolongada dos antibióticos diretamente no tecido infectado, sem toxicidade sistêmica. Além disso, nenhuma intervenção cirúrgica ou procedimentos são necessários para a sua remoção¹⁰¹.

Por todos os benefícios que os sistemas de liberação controlada oferecem, esses sistemas estão hoje sob intensa investigação em todo mundo. Portanto, um dos nossos objetivos neste trabalho é colaborar com nossas pesquisas no desenvolvimento de dispositivos funcionais à base de nanofibras poliméricas que possam carregar princípios ativos e liberá-los de maneira sistemática no local desejado.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiais

Os materiais utilizados neste trabalho foram: Acetato de Celulose (CA; pó branco; Mn = 29000; grau de substituição = 40%) (Sigma-Aldrich); N,N Dimetilacetamida PA (DMAc) (Merck) (P.e =166°C, $\delta=22,1 \delta/\text{MPa}^{1/2}$)^{102,103}; Ácido Acético Glacial PA (Merck) (P.e =118°C, $\delta=20,7 \delta/\text{MPa}^{1/2}$)^{102,103}; Acetona PA (Synth) (P.e =56,2°C, $\delta=20,2 \delta/\text{MPa}^{1/2}$)^{102,103}; Água Deionizada (P.e =100°C, $\delta=47,9 \delta/\text{MPa}^{1/2}$)^{102,103}; Sulfato de Gentamicina (Pharmaceutical Group Hualuan Co. Ltd.) (ponto de fusão 218-237°C)¹⁰⁴; Solução Tampão Fosfato 0,1 M pH 7,4 (PBS) (Dinâmica); Eudragit® L100 (Evonik); Hidroxipropil Metilcelulose (HPMC) (Dow Corning), Polietilenoglicol (Sigma-Aldrich), Alcool Isopropílico PA (Quimesp), Ninhidrina PA (Sigma-Aldrich)

3.2. Membranas de Acetato de Celulose sem Fármaco

3.2.1. Preparação das soluções poliméricas de Acetato de Celulose

Foram preparadas soluções poliméricas, pela mistura de Acetato de Celulose com 4 diferentes sistemas de solventes, como descrito a seguir:

3.2.1.1. Solução de Ácido Acético/Água

Preparou-se uma solução de ácido acético e água, na proporção de 75:25 m/m. A seguir, preparou-se duas soluções com concentração de 13% e 17% m/m de acetato de celulose dissolvido na solução de ácido acético/água (75:25). Esta solução foi mantida sob agitação por aproximadamente 2 horas para a completa homogeneização. A concentração de 17% de CA foi definida com base nos trabalhos de Han et. al.³⁷,

como a viscosidade da solução era muito alta fixou-se esta como ponto máximo e 13 % como ponto mínimo, pois concentrações menores apresentavam uma solução com viscosidade mais fácil de processar.

3.2.1.2. Solução de Acetona/Água

Preparou-se uma solução de acetona e água, na proporção de 85:15 m/m. A seguir, preparou-se duas soluções com concentração de 17% e 19% m/m de acetato de celulose dissolvido na solução de acetona/água(85:15). Esta solução foi mantida sob agitação por aproximadamente 2 horas para a completa homogeneização. A concentração de 17% de CA foi definida com base nos trabalhos de Son et. al.⁶⁷ Fixou-se 17% como ponto mínimo e 19 % como ponto máximo, pois acreditava-se que quanto maior a viscosidade melhores seriam os resultados, já que maiores viscosidades reduzem a formação de contas nas fibras, conforme verificado na literatura, nos trabalhos de Ramakrishna et. al.¹.

3.2.1.3. Solução de Dimetilacetamida(DMAc)/Acetona

Preparou-se uma solução de DMAc e acetona na proporção de 1:2 m/m. A seguir, preparou-se duas soluções com concentração de 17% e 19% m/m de acetato de celulose dissolvido na solução de DMAc/acetona(1:2). Esta solução foi mantida sob agitação por aproximadamente 2 horas para a completa homogeneização. A concentração de 17% de CA foi definida com base nos trabalhos de Taepaiboon et. al.²¹ Fixou-se 17% como ponto mínimo e 19 % como ponto máximo, pois idem ao item 3.2.1.2. acreditava-se que quanto maior a viscosidade melhores seriam os resultados, já que maiores viscosidades reduzem a formação de contas nas fibras¹.

3.2.1.4. Solução de Dimetilacetamida(DMAc)/Acetona/Água

Preparou-se uma solução de DMAc, acetona e água na proporção de 32:63:5 m/m. A seguir, preparou-se duas soluções com concentração de 14% e 17% m/m de acetato de celulose dissolvido na solução de DMAc/acetona/água(32:63:5). Esta solução foi mantida sob agitação por aproximadamente 2 horas para a completa homogeneização. A concentração de 17% foi definida com base nos resultados obtidos para as soluções de DMAc/Acetona, onde verificou-se que concentrações de CA menores (no caso 17% em comparação a 19%) apresentavam melhores resultados. Fixou-se 17% como ponto máximo e 14 % como ponto mínimo, pois acreditava-se que a tendência obtida no caso anterior seria repetida neste caso, já que as soluções eram muito parecidas.

3.2.2. Caracterização das soluções poliméricas de Acetato de Celulose

Todas as soluções poliméricas foram caracterizadas através das análises de viscosidade, tensão superficial e condutividade. Utilizou-se um Programmable Rheometer da marca Brookfield, Modelo DVIII, de tensão controlada ou CS, tipo cilindro coaxial no sistema ISO/DIN, com um spindle (haste) nº 27 e cápsula 13RP, acoplado a um banho ultratermostatizado Markoni modelo MA184 para análise de viscosidade. Para análise de tensão superficial foi utilizado um Tensiômetro da Kruss, modelo K6, e para análise de condutividade um condutímetro da Analion, modelo C708 plus. Todas as medidas foram realizadas em triplicata a 25°C.

Construiu-se curva de Tensão de deformação x Taxa de cisalhamento, para as soluções poliméricas de cada solvente, nas condições otimizadas sendo 17% de CA (m/m) em Ácido Acético/Água (70:30), 18% de CA (m/m) em Ácido Acético/Água (75:25) , 17% de CA (m/m) em Acetona/Água (85:15), 15% de CA (m/m) em Dimetilacetamida/Acetona/Água (32:63:5) e 17% de CA (m/m) em Dimetilacetamida/Acetona (1:2). Utilizou-se nesta determinação um reômetro HAAKE Rheostress 1, com uma geometria Z20 DIN acoplado a um banho termostatizado MAK F8, e os dados foram tratados pelo software Rheowin. As medidas foram realizadas a 25°C.

3.2.3. Eletrofiação soluções

As soluções de Acetato de celulose preparadas foram eletrofiadas na temperatura (25°C) e umidade (50%UR), utilizando-se uma seringa de vidro de 20 ml, com uma agulha metálica de 4 cm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro interno. O polo positivo de uma fonte de alta tensão, projetada para trabalhar na faixa de 2 a 32 kV, foi conectado a agulha metálica da seringa, enquanto que o eletrodo terra foi utilizado para aterrar a placa coletora de cobre, com as dimensões de 30x40 cm. A vazão foi controlado por uma bomba marca KdScientific, modelo 100, conectada a seringa. A distância da agulha ao coletor variou entre 7 e 10 cm, a tensão aplicada entre 15 e 25 kV e vazão entre 1 e 4 ml/h, dependendo do DOE. Nas figuras apresentadas neste trabalho citaremos a distância da agulha ao coletor como “D”, a tensão aplicada como “V” e vazão como “R” com o objetivo de melhorar a visualização da legenda. As amostras das membranas nanoestruturadas foram coletadas em folhas de papel alumínio, as quais revestiam a placa de cobre durante os experimentos. Em cada teste foram eletrofiados aproximadamente 5 ml de solução polimérica. Na figura 8 é possível observar fotos do equipamento utilizado na eletrofiação.



Figura 8: Foto do equipamento utilizado para eletrofiação do Acetato de Celulose.

Foi também realizado um teste para fins comparativos, sem a utilização da bomba de fluxo, mas apenas utilizando a gravidade para movimentação do fluxo da solução. Neste caso foi colocada a agulha na vertical e a placa coletora abaixo da mesma, como indicado na figura 9.

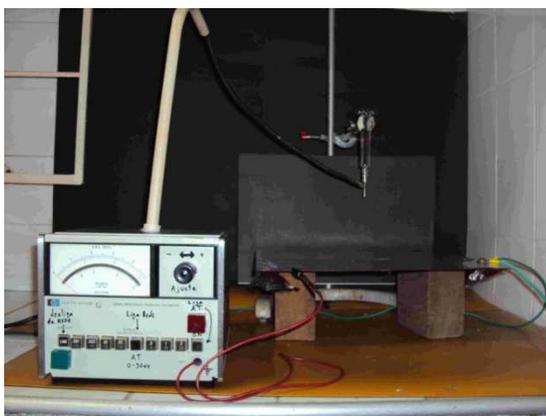


Figura 9: Foto do equipamento utilizado para eletrofição do Acetato de Celulose sem utilização da bomba de fluxo.

3.2.4. Caracterização das membranas eletrofiadas sem carga

As amostras das membranas nanoestruturadas foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), com o objetivo de conhecer a morfologia e a distribuição das fibras obtidas, o diâmetro das mesmas, sua variação e a presença de contas, dentre outros aspectos. Para as análises de MEV utilizou-se dois equipamentos, um microanalisador eletrônico (Electron Probe Microanalyser) da JEOL, modelo JXA-840A e um microscópio eletrônico de varredura Leica LEO 440i .

Para cada amostra foram obtidas 8 imagens, com diferentes aumentos, as quais foram analisadas utilizando-se o software Image Tool para a medida do diâmetro médio de 50 medidas por amostra. Gerou-se uma régua de notas para avaliação do aspecto das membranas, com valores de 1 a 10. A nota 1 significava ausência de fibras, nota 5 significava formação de fibras com muitos defeitos grosseiros e nota 10 correspondia às fibras com boa uniformidade e distribuição de diâmetro. Foram avaliadas 2 fotos, por

amostra, por três pessoas independentes, onde as mesmas não tiveram acesso às notas dos demais. No Anexo 1 é possível verificar um modelo da régua de notas utilizada para avaliação das membranas nanoestruturadas.

3.2.5. Testes de Citotoxicidade

Os testes de citotoxicidade foram realizados no Instituto e Centro de Pesquisas São Leopoldo Mandic (Campinas, São Paulo), como segue.

As amostras foram esterilizadas com óxido de etileno na empresa Acecil (Campinas, São Paulo) e deixadas em repouso por 15 dias antes do início dos testes.

3.2.5.1. Ensaio com células in vitro

Células pré-osteoblásticas de rato (MC3T3) foram obtidas a partir da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EUA). As células foram cultivadas em Meio Essencial Mínimo modificado (α -MEM) com L-glutamina e HEPES (LGC, Campinas, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos. As células foram cultivadas a 37 °C com 5% de CO₂, e após sub-confluência foram tripsinizadas, contadas e plaqueadas na membrana para os experimentos à seguir.

3.2.5.2. Plaqueamento celular nas membranas

As membranas foram previamente cortadas em discos com aproximadamente 13mm de diâmetro, e esterilizadas em óxido de etileno. Em seguida, foram colocadas dentro de uma placa padrão de 24 poços e lavadas primeiramente com água destilada estéril e, finalmente, com meio de cultura. As células foram plaqueadas sobre as amostras na densidade de $1,8 \times 10^4$ células/mm², sendo adicionado 1 ml do meio de cultura para recobrimento das amostras. O meio de cultura foi trocado a cada três dias. O poliestireno foi utilizado como controle para o teste de proliferação.

3.2.5.3. Proliferação Celular

Para o ensaio de citotoxicidade, as células cultivadas sobre a membrana foram analisadas após 24, 48 e 72 horas de cultura. Em seguida, o meio foi removido e as células foram lavadas, com solução de PBS, e incubadas com solução de tripsina (LGC, Campinas, Brasil) por 5 minutos a 37°C. A concentração de células foi determinada por teste de exclusão por corante vital azul de Trypan, usando a câmara de Neubauer para contagem celular.

Os precipitados celulares foram ressuspensos em 1,0 mL PBS e, 10 µL desta suspensão foram misturados com 10 µL de azul de Trypan (Sigma). Posteriormente, 10 µL desta mistura foi transferida para a câmara de Neubauer, levada ao microscópio de fase (Eclipse, Nikon Japão) para a realização da contagem do número de células.

O número de células foi determinado pela equação 11.

$$N^{\circ} \text{ total de células} = \frac{n^{\circ} \text{ células contadas} \times \text{volume inicial} \times \text{diluição} \times 10^4}{n^{\circ} \text{ quadrados usados na contagem}} \quad (\text{eq.11})$$

3.2.5.4. Análise da Morfologia e Adesão Celulares

Após 72 horas de cultura, as células foram fixadas durante 1 h em temperatura ambiente, em solução de paraformaldeído 4% + glutaraldeído 0,1% tamponado com cacodilato de sódio, pH 7,2, e preparados para análise de MEV conforme rotina.

Antes da análise MEV todas as amostras foram revestidas com uma fina camada de ouro, por pulverização catódica, para lhes conferir condutividade.

3.3. Membranas de Acetato de Celulose com Sulfato de Gentamicina

3.3.1. Preparação das soluções poliméricas de Acetato de Celulose com Sulfato de Gentamicina

As soluções poliméricas de acetato de celulose, que apresentaram melhores resultados no teste de eletrofiação sem fármaco, em cada sistema de solvente, foram: Solução de Ácido Acético/Água (75:25), 17% m/m CA; Acetona/Água (85:15), 18% m/m CA; DMAC/Acetona (1:2), 17% m/m CA; e DMAC/Acetona/Água (32:63:5), 15% m/m CA. Estas soluções foram preparadas conforme descrito no item 3.2.1. A estas soluções prontas foram adicionados 6 e 60% de Sulfato de Gentamicina, com base no acetato de celulose, sendo esta mantida sob agitação por 2 horas para a completa homogeneização.

3.3.2. Eletrofiação das soluções poliméricas de Acetato de Celulose com Sulfato de Gentamicina

Para eletrofiação das membranas de nanofibras de Acetato de Celulose com incorporação do fármaco sulfato de Gentamicina, utilizou-se como base as melhores condições obtidas nos testes iniciais sem fármaco, em cada sistema de solvente e podem ser verificados na tabela 1. As duas soluções com 6 e 60% de fármaco (com base no CA), de cada sistema de solvente, foram fiadas inicialmente nestas condições, mantendo-se a concentração sempre fixa.

Tabela 1 - Melhores condições de processamento, obtidas para as membranas de nanofibras de CA, em cada sistema de solvente.

Condições Processo			
Solução polimérica	Concentração CA (%)	Voltagem (kV)	Distância agulha-coletor (cm)
Acido Acético/Água (75:25)	18	25	7
Acetona/Água (80:30)	17	25	7
DMAc/Acetona (1:2)	17	25	10
DMAc/Acetona/Água (32:63:5)	15	15	10

As soluções de acetato de celulose com sulfato de Gentamicina, preparadas conforme item 3.3.1, foram eletrofiadas a temperatura e umidade ambientes, utilizando-se uma seringa de vidro de 20 ml, com uma agulha metálica de 4 cm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro. O polo positivo de uma fonte de alta tensão foi conectado a agulha metálica da seringa; enquanto que, o eletrodo terra foi utilizado para aterrar a placa coletora de cobre, com as dimensões de 30x40 cm. A vazão de 1 ml/h foi controlado por uma bomba marca KdScientific, modelo 100, conectada à seringa. As amostras das membranas nanoestruturadas foram coletadas em folhas de papel alumínio, as quais revestiam a placa coletora de cobre durante os experimentos. Em cada teste foram eletrofiados aproximadamente 5 ml de solução polimérica.

3.3.3. Caracterização das Membranas com Sulfato de Gentamicina

As amostras das membranas nanoestruturadas de CA com sulfato de Gentamicina foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Avaliou-se a morfologia e a distribuição das fibras obtidas, o diâmetro das mesmas, sua variação e a presença de contos, dentre outros aspectos. Para as análises de MEV, utilizou-se um microscópio eletrônico de varredura Leica LEO 440i.

Para cada amostra foram obtidas 8 imagens, com diferentes aumentos, as quais foram analisadas utilizando o software Image Tool para a medida do diâmetro médio de 50 medidas por amostra. As melhores membranas, em cada sistema de solvente, foram escolhidas pela análise comparativa das fotos avaliando-se a morfologia e aspecto da membrana e das fibras formadas, bem como o diâmetro da fibra.

3.3.4. Preparação das Membranas para Testes de Liberação Controlada

Para o teste de liberação controlada da Gentamicina escolheu-se apenas a melhor membrana entre todos os sistemas de solvente testados. Além desta, foram

preparadas membranas “casting” e com revestimento de HPMC, Eudragit® L100 e nanofibras sem carga. Abaixo pode-se verificar como cada membrana foi preparada.

3.3.4.1. Membrana de nanofibra com sulfato de Gentamicina 50%

A melhor membrana obtida nos testes iniciais, e escolhida para o teste de liberação, foi no sistema de solvente DMAC/Acetona/Água (32:63:5) com 15% m/m de CA, eletrofiada com alimentação de 1 ml/h, tensão de 15 kV e distância entre agulha e coletor de 10 cm. A concentração de sulfato de Gentamicina foi mantida em 50% sobre o CA, apesar dos testes iniciais serem realizados com 6 e 60%. Essa concentração foi definida porque a concentração de 60% mostrou um excesso de fármaco disperso na solução, assim evitaríamos possíveis interferências devido a este fator. As amostras foram cortadas em círculos com 20 mm de diâmetro.

3.3.4.2. Membrana “casting” com Sulfato de Gentamicina 50%

A mesma solução que foi utilizada na eletrofição da membrana de nanofibras, foi depositada em um molde circular e colocada em secagem por 120 horas em dessecador com sílica gel. Após secas, as amostras foram cortadas em círculos com diâmetro de aproximadamente 20 mm.

3.3.4.3. Membrana de nanofibras com sulfato de Gentamicina 50% revestida com nanofibras sem fármaco.

A membrana obtida no item 3.3.2. foi cortada com um diâmetro de aproximadamente 20 mm e presa em um papel alumínio, o qual foi colocado no coletor do equipamento de eletrofição. Foi eletrofiado uma solução de 15% de CA em DMAC/Acetona/Água (32:63:5) sem fármaco, nas mesmas condições citadas no item 3.3.2 sobre esta membrana, revestindo-a com uma camada de nanofibras.

A amostra foi retirada do papel alumínio, colocada novamente com a parte não revestida para cima, e o processo foi repetido, garantindo o revestimento dos dois lados da membrana. Esta membrana revestida foi cortada com um diâmetro de 35 mm, garantindo a proteção das bordas da mesma com o revestimento. O revestimento representou uma massa média de 65% do total da membrana.

3.3.4.4. Membrana nanofibra com Sulfato de Gentamicina 50% revestida com Eudragit® L100

O Eudragit® é um copolímero derivado do ácido metacrílico e metilmetacrílico, e é bastante utilizado na área farmacêutica na concepção de sistemas pH-dependentes, para fórmula molecular verificar Anexo. A liberação do fármaco a partir de formas farmacêuticas revestidas por Eudragit® são dependentes do pH do meio de dissolução e da espessura do revestimento. O Eudragit® L100 utilizado neste teste tem dissolução em pHs acima de 6,0.¹⁰⁵

Preparou-se uma solução em álcool propílico, com 20% de Eudragit® L100, e com 5% de PEG. Deixou-se em agitação por 4 horas, seguido de repouso por 24 horas. O Eudragit® L100 é um revestimento muito usado em indústria farmacêutica.

Esta solução foi pingada sobre a membrana obtida no item 3.3.4.1. que foi cortada previamente com um diâmetro de 20 mm, revestindo-a completamente. Deixou-se secar por 120 horas em dessecador com sílica gel. O revestimento representou uma massa média de 75% do total da membrana. Imagem de MEV foi realizada para verificar a estrutura da membrana após o revestimento.

3.3.4.5. Membrana eletrofiada com sulfato de Gentamicina revestida com HPMC

Preparou-se uma solução com 0,1 g de hidroxipropil metilcelulose (HPMC) em 35 ml de água a 85°C.

Esta solução foi borrifada sobre a membrana com um diâmetro de aproximadamente 20 mm obtida no item 3.3.4.1., revestindo-a completamente com 3

jetos para cada membrana. Deixou-se secar por 120 horas em dessecador com sílica gel. O revestimento representou uma massa média de 65% do total da membrana. Imagem de MEV foi realizada para verificar a estrutura da mesma após o revestimento.

3.3.5. Testes de Liberação Controlada de Sulfato de Gentamicina

Foram realizados 2 testes comparativos de liberação do fármaco sulfato de Gentamicina. No primeiro comparou-se a liberação do Sulfato de Gentamicina na membrana de nanofibras, com uma membrana “casting”, e no segundo comparou-se a liberação ocorrida na membrana de nanofibras com a mesma membrana revestida com Eudragit® L100, com HPMC e com nanofibras sem fármaco.

3.3.5.1. Teste de liberação de sulfato de Gentamicina: membrana de nanofibras versus membrana “casting”.

Uma amostra da membrana de nanofibras e uma da membrana “casting” foram colocadas em tubos de ensaio e adicionados 20 ml de solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 em cada tubo, os quais foram deixados em estufa de cultura bacteriológica (mod 410N, Nova Ética), com temperatura controlada a 37°C. Toda a solução foi retirada e substituída por uma nova em períodos pré-determinados (intervalo de 2 h nas 4 primeiras alíquotas, 16 h na 5ª alíquota, 24 h nas alíquotas de 6 a 8). Alíquotas foram retiradas destas soluções para análise quantitativa de sulfato de Gentamicina, conforme descrito no item 3.3.6. e a construção da curva de liberação foi feita após coletar os dados. O teste foi realizado em triplicata.

3.3.5.2. Testes liberação membrana de nanofibras de CA com sulfato de Gentamicina comparativos: revestida com nanofibra sem fármaco, revestida com HPMC e revestida com Eudragit® L100.

Foram colocadas em tubos de ensaio, duas amostras de cada membrana de nanofibras de CA com sulfato de Gentamicina a ser testada: sem revestimento, revestidas com nanofibra sem fármaco, com HPMC e com Eudragit® L100. Adicionou-se 20 ml de solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,4. Os tubos foram deixados em estufa de cultura e bacteriologia (mod 410N, Nova Ética) com temperatura controlada a 37°C. Em períodos pré-determinados (intervalo de 1 h nas 5 primeiras alíquotas, 2 h nas 6ª e 7ª, 18 h na 8ª e 24 h na 9ª alíquota), uma alíquota de 5 ml da solução foi retirada e substituída por uma nova. Alíquotas foram retiradas destas soluções para análise quantitativa de sulfato de Gentamicina conforme descrito no item 3.3.6, e a construção da curva de liberação, foi feita após coletar os dados. O teste foi realizado em triplicata.

3.3.6. Quantificação do sulfato de Gentamicina

A quantificação do sulfato de Gentamicina foi feita através de medida indireta no UV-Vis. Realizou-se a reação de uma alíquota contendo o fármaco com uma solução aquosa de ninhidrina (1,25% m/v), por 15 minutos a 95°C, em banho maria (Tipo Dubnoff, mod MA095, marca Marconi). Em seguida, determinou-se a absorbância na região do ultravioleta, em 400 nm, utilizando -se um espectrofotômetro UV Visível (mod Cary 1G, Varian), conforme método estabelecido na literatura.¹⁰⁶

O método baseia-se na reação da ninhidrina com as aminas primárias e secundárias, tais como aquelas presentes no sulfato de gentamicina¹⁰⁷, produzindo soluções de diferentes colorações de acordo com a concentração; ou seja, púrpura para altas concentrações até amarela para soluções diluídas. O espectro de UV-Vis da solução de gentamicina reagida com a ninhidrina produz três picos de absorção, em 315, 400 e 550 nm¹⁰⁶. Segundo Frutos et al.¹⁰⁶, o pico a 400nm mostra-se mais estável e é atribuído a um complexo derivativo da ninhidrina-gentamicina. Utilizando a leitura,

da mistura ninhidrina-gentamicina, neste comprimento de onda, foi possível obter uma relação linear com a concentração de gentamicina em uma faixa de até 120µg/ml.¹⁰⁶

Para a construção da curva de calibração, as soluções de sulfato de gentamicina, em concentrações conhecidas, foram preparadas em solução tampão fosfato 0,1M pH 7,4. Foi construída uma curva na faixa de 5 a 100 µg/ml, para utilização na quantificação do fármaco nas alíquotas do teste de liberação. Para cada solução de concentração conhecida foram retiradas três amostras para reação com ninhidrina e leitura da absorbância.

3.3.7. Análise Microbiológica

Os testes para análise antimicrobiana das membranas foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Instituto e Centro de Pesquisas São Leopoldo Mandic (Campinas, São Paulo), como segue.

As amostras foram esterilizadas com óxido de etileno na empresa Acecil (Campinas, São Paulo) e deixadas em repouso por 15 dias antes do início dos testes.

Testes microbiológicos foram realizados com três cepas-padrão ATCC para o controle dos procedimentos nos testes de sensibilidade das membranas de nanofibras com possível atividade antimicrobiana. A atividade antimicrobiana das nanofibras de CA com sulfato de Gentamicina foi avaliada através da utilização da bactéria Gram positivo, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 25923.2, e bactéria Gram negativo, *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 25922 e do fungo *Candida albicans* (*C. albicans*) ATCC 10231, com aproximadamente $1,5 \times 10^8$ microrganismos/ml (Fator nº1 da escala McFarland, NEFELOBAC[®], Brasil) em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*), e plaqueadas uniformemente com auxílio de alça Drigalski em Ágar BHI.

As placas foram identificadas, e as membranas com concentrações de 10, 25 e 50% de Sulfato de Gentamicina, bem como duas membranas sem fármaco (teste branco), com aproximadamente 13 mm de diâmetro foram colocadas com o auxílio de uma pinça estéril em pontos eqüidistantes. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica à 37°C, por 48 horas para posterior interpretação e leitura dos resultados.

A avaliação foi realizada, verificando-se a presença ou ausência dos halos de inibição ao redor dos discos, contra um fundo preto. O diâmetro do halo foi medido com um paquímetro em mm, para posterior avaliação dos resultados. Os testes foram realizados em triplicata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Membranas Acetato de Celulose sem fármaco

4.1.1. Planejamento de Experimentos com vários sistemas de solventes para eletrofição de Acetato de Celulose

Para otimizar as condições de obtenção de membranas de acetato de celulose, fez-se um planejamento fatorial 2^3 (3 fatores em 2 níveis) para cada sistema de solvente utilizado: Acido Acético/Água (75:25 m/m), Acetona/Água (85:15 m/m), Dimetilacetamida (DMAc)/Acetona (1:2 m/m), DMAc/Acetona/Água (32/63/5 m/m)). Para tanto, utilizou-se o DOE (Design of Experiments) para a avaliação dos múltiplos fatores a serem contemplados neste tipo de trabalho. Como resposta, escolheu-se o diâmetro e o aspecto da membrana nanoestruturada, considerando-se como fatores a concentração do acetato de celulose, a voltagem aplicada e a distância entre a ponta da agulha e o coletor. Tais fatores, variados em dois níveis (alto e baixo) como indicado nas tabelas 2, 4, 6 e 8, foram escolhidos por serem fáceis de controlar no processo de eletrofição. Utilizou-se o software Minitab para análise estatística dos dados.

Abaixo seguem os resultados obtidos para cada sistema de solvente.

4.1.1.1. Eletrofição de CA em Acido Acético/Água (75:25 m/m)

4.1.1.1.1. Análise da Vazão em solução de Acido Acético/Água (70:30 m/m)

Primeiramente foi realizado um DOE para se estimar a melhor vazão da solução de CA a ser utilizada para os demais testes, visto que esta era uma variável que deveria se manter fixa. Na tabela 2 apresenta-se os resultados obtidos cada um dos experimentos realizados para obtenção de nanofibras derivadas de solução com 17% de acetato de celulose, em ácido acético/água (70:30). Os resultados obtidos na análise

da solução polimérica em termos de viscosidade, condutividade e tensão superficial estão apresentados na tabela 3.

Tabela 2 - Parâmetros Experimentais utilizados para eletrofição de nanofibras de 17% de Acetato de Celulose em ácido Acético/Água(70:30 m/m).

Corrida	Vazão (mL/h)	Potencial (kV)	Distância agulha- coletor (cm)	Diâmetro médio da fibra (nm)	Aspecto da membrana (nota média)
1	1	25	7	190±75	3,7±2,1
2	1	25	10	185±55	3,0±1,7
3	3	25	10	200±55	2,7±2,1
4	1	15	7	170±50	3,0±1,0
5	3	15	10	145±45	3,0±1,7
6	3	25	7	215±75	3,0±2,6
7	3	15	7	205±85	3,7±1,5
8	1	15	10	180±60	3,0±1,7
Melhor Condição	1	25	7	190±75	3,7±2,1

Tabela 3 - Resultados Experimentais da análise da solução de acetato de celulose no solvente ácido Acético/Água(70:30 m/m).

% CA	Viscosidade (mPas)	Condutividade (μ S)	Tensão Superficial (mN/m)
17	5300	191,9	38,1

Podemos observar que o diâmetro médio da fibra, obtido nos experimentos, foi da ordem de 200 nm ou menos; porém, o aspecto da membrana apresentou notas muito baixas, indicando a presença de muitos defeitos. Observou-se um grande número de contas e pouca formação de fibras. Dessa forma, nenhum experimento apresentou um resultado satisfatório dentro do esperado, para a nota mínima desejada para a membrana, que seria 7.

Nas figuras 10 e 11 podemos observar os gráficos de Pareto para os efeitos, que nos mostram a significância de cada fator na resposta obtida, para a nota da membrana, e para o diâmetro da fibra, respectivamente.

O gráfico de Pareto dos efeitos é usado para comparar a magnitude relativa e a significância estatística dos efeitos principais e suas interações. Os efeitos são plotados em ordem decrescente do valor absoluto e uma linha de referência é definida utilizando um valor de $\alpha=0,05$, ou seja, a probabilidade de se fazer um erro tipo I (quando você conclui que existe uma diferença que não há) e é referida como o nível de significância. Qualquer efeito que se estende além desta linha de referência é significativo.

Verificamos nas figuras 10 e 11, que nenhum dos fatores estudados (A, B e C) foi significativo, tanto isolado como em grupo, pois todos estiveram abaixo da linha do valor de α . A figura 12 representa o gráfico dos efeitos principais para o diâmetro médio da fibra. Ele mostra como os efeitos afetam individualmente os parâmetros de saída, indicados pela inclinação das linhas em cada quadrante.

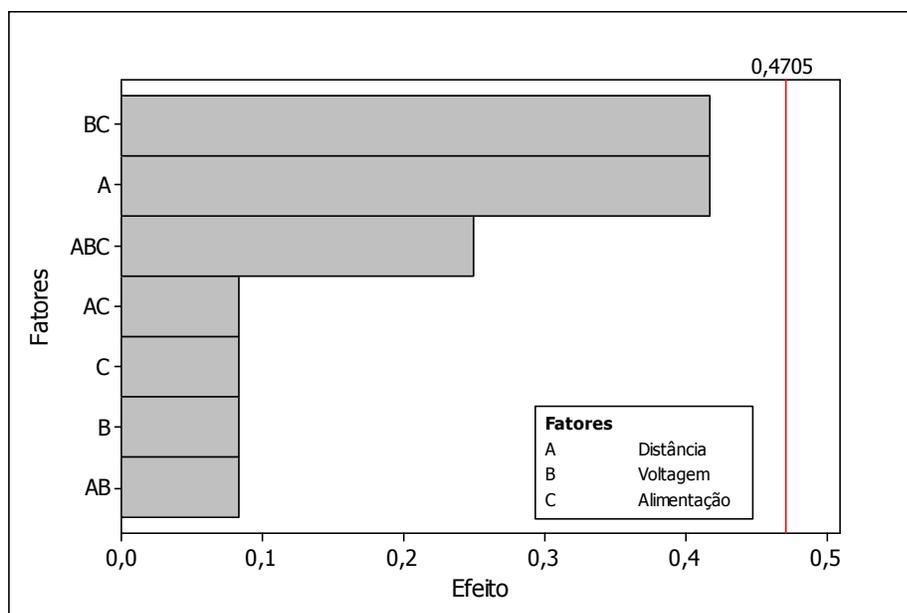


Figura 10: Gráfico de Pareto dos efeitos para nota da membrana obtida de soluções de Acetato de Celulose em ácido Acético/Água(70:30 m/m).

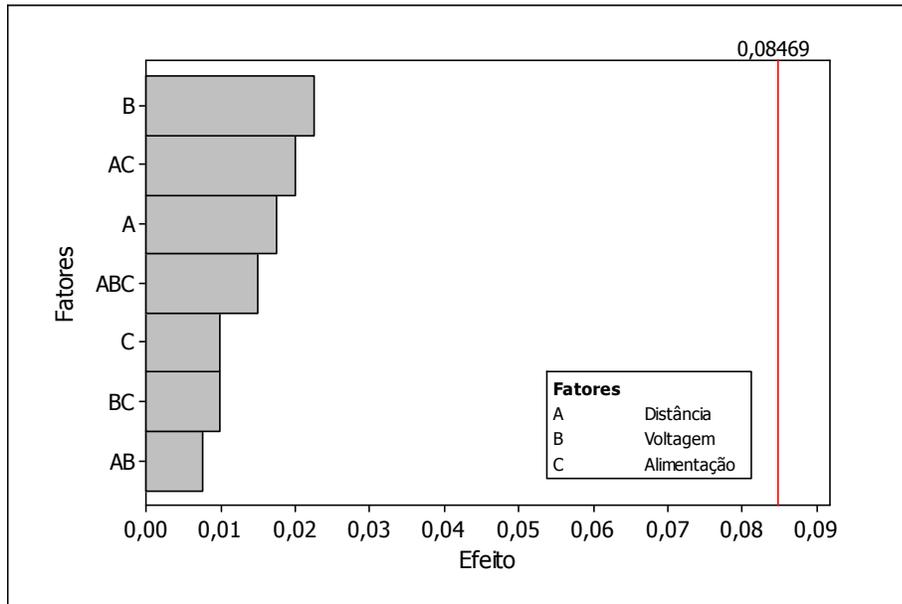


Figura 11: Gráfico de Pareto dos efeitos para diâmetro das fibras obtidas de soluções de Acetato de Celulose em ácido Acético/Água(70:30 m/m).

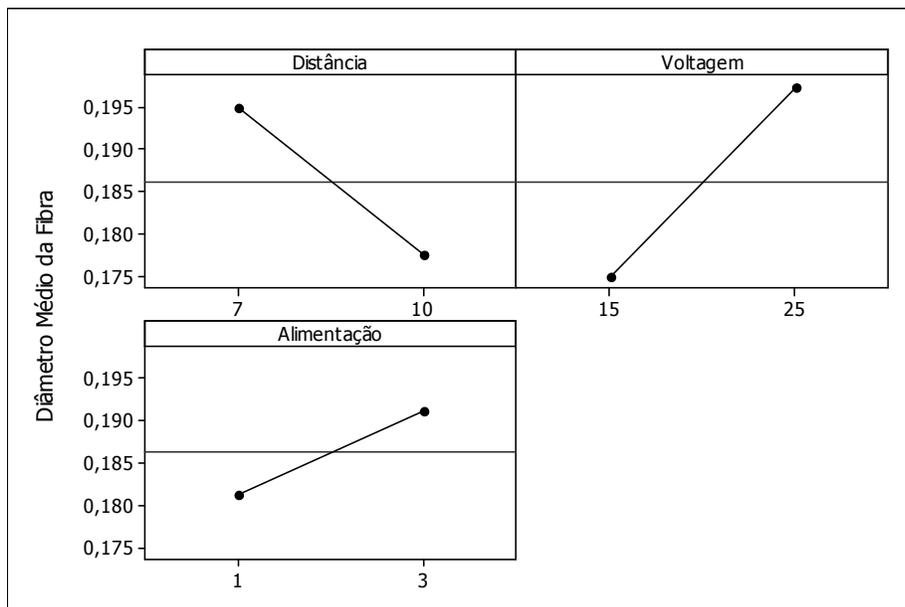


Figura 12: Gráfico do efeito principal para diâmetro da fibra obtidas de soluções de Acetato de Celulose em ácido Acético/Água(70:30 m/m).

O gráfico de efeitos principais é utilizado para visualizar o efeito dos fatores sobre a resposta e comparar a magnitude relativa dos mesmos. Uma linha de referência é desenhado na média geral. Verificando a linha que liga os níveis dos fatores podemos visualizar os efeitos principais. Se a linha é horizontal (paralela ao eixo x), não há efeito principal presente, ou seja, a média de resposta não muda dependendo do nível de fator. Entretanto, se a linha não é horizontal, existe um efeito principal presente, e a média de resposta muda dependendo do nível de fator. Quanto maior a inclinação da linha, mais forte será o efeito.

Apesar dos valores obtidos não serem significativos, observando o gráfico da figura 12 podemos notar que diminuindo-se a vazão, tende-se a diminuir o diâmetro da fibra conforme verificado na literatura¹. Se compararmos a figura 13(a) e 13(b), obtidas para as melhores condições com vazão de 3mL/h e 1mL/h, respectivamente, observa-se uma pequena melhora na aparência da membrana com aglomerados poliméricos menores no segundo caso. Assim por estes resultados pode-se estabelecer que a variação do diâmetro da fibra é função inversa da vazão.

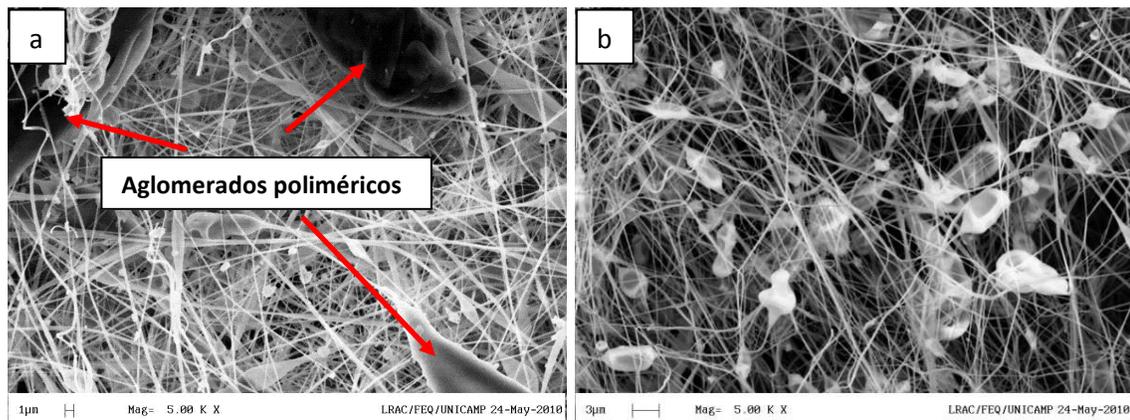


Figura 13: Imagem MEV com aumento de 3000 vezes para membrana eletrofiada de Acetato de Celulose (CA) utilizando-se como solvente Acido Acético/Água(70:30), sendo (a) 17% de CA, D = 7 cm, V = 15kV e R = 3mL/h e (b) 17% de CA , D = 7 cm, V = 25kV e R = 1mL/h.

Portanto com nossos estudos, definiu-se que a vazão será mantida fixa em 1 mL/h, com o intuito de se obter fibras com diâmetros menores e menos colapsadas.

4.1.1.1.2. Análise da Influência da Concentração

A tabela 4 apresenta os resultados para o diâmetro médio da fibra e aspecto da membrana, obtidos para cada um dos experimentos realizados, para obtenção de nanofibras de acetato de celulose, em ácido Acético/Água(75:25), variando-se a porcentagem de CA, potencial e distância da agulha ao coletor. A tabela 5 apresenta os resultados obtidos para a viscosidade, condutividade e tensão superficial na análise da solução.

Tabela 4 - Parâmetros experimentais utilizados para eletrofiação de nanofibras de Acetato de Celulose em ácido Acético/Água(75:25 m/m).

Corrida	% CA	Potencial (kV)	Distância agulha-coletor (cm)	Diâmetro médio da fibra (nm)	Aspecto da membrana (nota)
1	13	15	7	60±10	1,7±0,6
2	13	25	10	60±20	1,7±0,6
3	13	15	10	90±30	1,7±0,6
4	13	25	7	80±20	1,7±0,6
5	17	15	10	180±60	2,7±1,2
6	17	15	7	170±50	3,0±1,0
7	17	25	10	190±60	2,7±1,2
8	17	25	7	190±80	3,3±1,5
Melhor Condição	18	25	7	171±52*	5,2±1,2
	19	25	7	230±70	6,8±0,6

*Verificar histograma em Anexos.

Tabela 5 - Resultados experimentais para análise da solução de Acetato de Celulose em ácido Acético/Água(75:25 m/m).

% CA	Viscosidade (mPas)	Condutividade (μ S)	Tensão Superficial (mN/m)
13	1650	116,7	35,8
17	5400	81,6	36,5
18	6575	79,4	38,6
19	8800	74,8	39,0

Podemos observar que o diâmetro médio obtido para a fibra ficou abaixo de 200 nm; porém, as notas atribuídas foram muito baixas, indicando a presença de muitos defeitos, com um grande número de contas e pouca formação de fibras. Dessa forma, nenhum experimento apresentou um resultado satisfatório, dentro do esperado, para a nota mínima 7 desejada.

Na tabela 5 nota-se que com o aumento da concentração de acetato de celulose, no sistema de ácido acético / água, a viscosidade aumenta muito rapidamente e a condutividade diminui significativamente, enquanto a tensão superficial não varia muito. Nos outros sistemas estudados, que serão vistos na sequência, esses parâmetros não variaram na mesma proporção, embora os resultados sejam significativos para a viscosidade. No que diz respeito à tensão de superfície e condutividade dos outros sistemas, os valores permaneceram na mesma ordem.

Na figura 14 encontra-se o gráfico de Pareto para os efeitos, que nos mostra a significância de cada fator (distância, voltagem e concentração) na resposta obtida para nota da membrana, conforme já citado anteriormente. Verificamos que o fator de maior relevância, e o único significativo, correspondeu a concentração do acetato de celulose na solução, cujo valor de Efeito foi maior que 0,471 (linha de referência). A figura 15 representa o gráfico dos efeitos principais, para a nota média da membrana. Por este gráfico, nota-se como os efeitos afetam individualmente as respostas, indicados pela inclinação das linhas em cada quadrante, como já comentado anteriormente. Pode-se constatar que a curva de maior inclinação é a da concentração, eleita o fator de maior influência em relação aos demais, conforme visto no gráfico de Pareto mostrado na

figura 14. Observa-se também que um aumento na concentração, acarreta num aumento na nota da membrana.

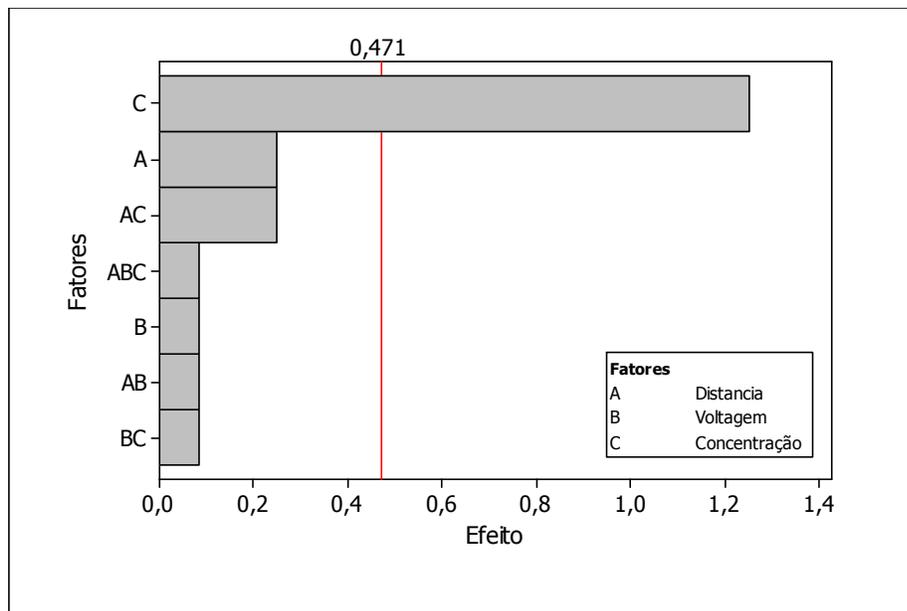


Figura 14: Gráfico de Pareto dos efeitos para nota da membrana no sistema de solvente ácido Acético/Água(75:25 m/m).

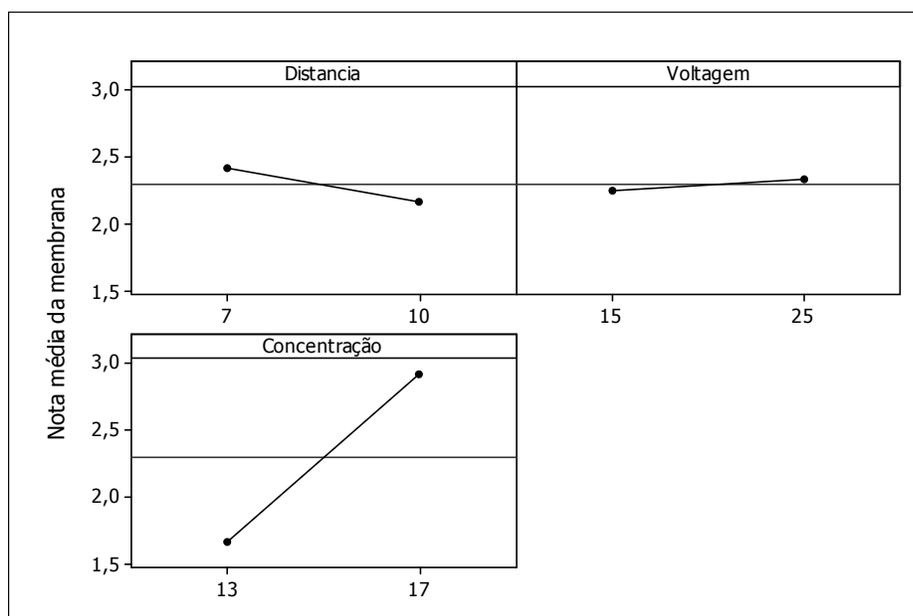


Figura 15: Gráfico dos efeitos principais para a nota média da membrana no sistema de solvente ácido Acético/Água(75:25 m/m).

Com base nestes resultados, realizou-se um novo experimento extrapolando os resultados obtidos, a partir de soluções com concentrações de 18% e 19% de acetato de celulose. Mantiveram-se as demais variáveis; isto é distância e voltagem, nas mesmas condição da primeira rodada de experimentos, visto que não são significativos para o processo.

A figura 16(a) mostra a imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV) obtida para a melhor condição da primeira rodada de experimentos; ou seja, para distância do eletrodo de 7 cm, voltagem de 25kV, utilizando-se como solvente ácido Acético/Água (3:1) e uma vazão da solução de 1mL/h. As figuras 16(b) e 16(c) são imagens das amostras obtidas com as soluções de 18 e 19% de acetato de celulose, respectivamente.

É evidente comparando-se as figuras 16 (a-c), que ocorreu uma melhora significativa do aspecto da membrana com redução no número e no tamanho das contas, quando aumentou-se a concentração. Assim, o melhor resultado obtido para o aspecto da membrana foi com a concentração de 19%; porém, a viscosidade muito alta da solução dificultou a processabilidade, devido a entupimentos constantes da agulha e interrupção do experimento.

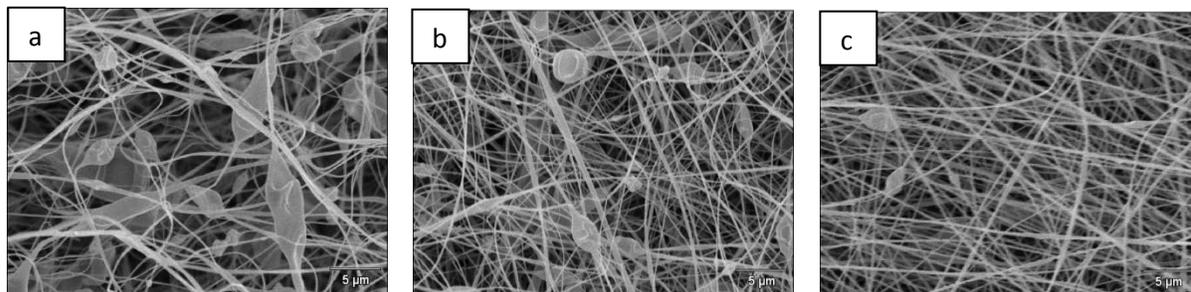


Figura 16: Imagem MEV, com aumento de 5000 vezes, para membrana eletrofiada de Acetato de Celulose (CA) utilizando-se como solvente ácido Acético/Água(75:25) aumento de 5000 vezes, com: (a) 17% de CA, D = 7 cm, V = 25kV e R = 1mL/h; (b) 18% de CA, D = 7 cm, V = 25kV e R = 1mL/h; (c) 19% de CA, D = 7 cm, V = 25kV e R = 1mL/h.

Em resumo, pode-se dizer que mesmo conseguindo obter a nota próxima da mínima desejada para a membrana com acetato de celulose a 19% em ácido Acético/Água (75:25), não foi possível adotar esse sistema devido às dificuldades de fluidez desta solução, durante o processo. Pode-se dizer que por conseqüência, foi eleita uma condição ótima correspondente a 18% de Acetato de Celulose para este sistema de solvente. Neste caso, para a distância entre agulha e coletor de 7 cm, tensão aplicada de 25kV e vazão de 1mL/h, nanofibras com diâmetro médio de 170 nm foram obtidas e a nota 5,2 foi atribuída para a membrana nanoestruturada.

4.1.1.1.3. Comparativo sistema vertical sem utilização da bomba com sistema horizontal utilizando vazão controlada.

Com a intenção de se verificar como a vazão da solução poderia interferir na obtenção de nanofibras, realizou-se a eletrospinação com a seringa na vertical, com a gravidade agindo sobre a gota, e na horizontal com fluxo constante. A tabela 6 apresenta os resultados obtidos para cada um dos experimentos realizados, com acetato de celulose em ácido Acético/Água(70:30), sistema vertical; e a tabela 7 apresenta os resultados obtidos na análise da solução polimérica.

Podemos observar que os diâmetros das poucas fibras obtidas nos experimentos, estão na faixa de 100 nm a 200 nm; porém, o aspecto da membrana apresentou notas muito baixas devido a presença de muitos defeitos como o grande número de contas e a pouca formação de fibras. Nenhum experimento apresentou um resultado satisfatório, estipulado em 7, para a nota da membrana; porém, a corrida número 6, entre todas, apresentou uma boa formação na estrutura da membrana e obteve nota 6.

Na figura 17 podemos observar o gráfico de Pareto para os efeitos, que nos mostra a significância de cada fator na resposta obtida, como já comentado anteriormente. Verificamos que o fator de maior relevância é a voltagem, enquanto que o segundo fator significativo é a interação entre a voltagem e a concentração de acetato de Celulose na solução.

Tabela 6 - Parâmetros experimentais utilizados para eletrofição de nanofibras de acetato de Celulose em ácido Acético/Água (70:30 m/m) num sistema vertical.

Corrida	% CA	Potencial (kV)	Distância agulha-coletor (cm)	Diâmetro médio da fibra (nm)	Aspecto da membrana (nota)
1	17	15	10	Não fiou	-
2	15	15	10	115±30	4,0±0,0
3	15	25	7	115±30	3,5±0,4
4	17	15	7	Não fiou	-
5	15	25	10	120±30	4,0±0,6
6	17	25	10	170±25	6,0±0,5
7	17	25	7	160±50	5,0±0,5
8	15	15	7	130±35	3,0±0,4
Melhor Condição	17	25	10	170±25	6,0±0,5

Tabela 7 - Resultados experimentais das análises da solução de acetato de celulose no solvente Ácido Acético/Água (70:30 m/m).

% CA	Viscosidade (mPas)	Condutividade (µS)	Tensão Superficial (mN/m)
15	3000	137,5	37,0
17	5300	191,9	38,1

A figura 18 representa o gráfico de interação dos efeitos principais para a nota média da membrana. O gráfico de interações é utilizado para visualizar o efeito da interação de dois fatores sobre a resposta e comparar a importância relativa dos efeitos. A indicação é dada pela inclinação das duas linhas em cada quadrante. Se as linhas são paralelas entre si, não há interação, o cruzamento entre as linhas significa algum tipo de interação. Quanto maior a inclinação da linha, mais forte será o efeito.

Podemos observar que uma maior inclinação das curvas e um cruzamento entre as linhas pode ser verificado no quadrante da concentração e voltagem, que são os fatores determinantes na nota da membrana e tem uma influencia muito maior do que

os demais fatores como visto no gráfico de Pareto (figura 17). Observa-se, porém, que quando a concentração aumenta, tem-se um aumento na nota da membrana.

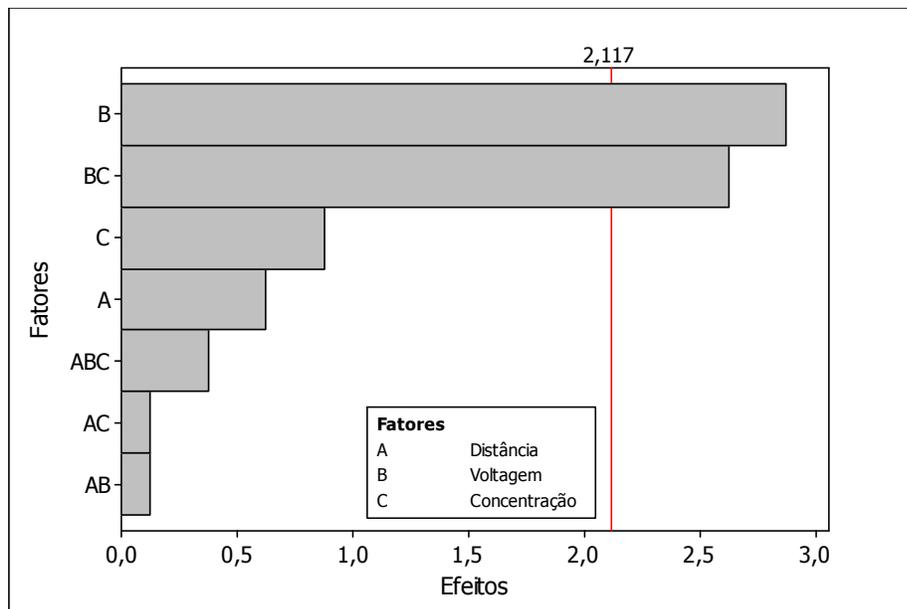


Figura 17: Gráfico de Pareto para nota média da membrana obtida da solução de Ácido Acético/Água (70:30 m/m) sistema vertical.

A figura 19(a) é a imagem realizada de microscopia eletrônica de varredura (MEV), obtida para a melhor condição nesta rodada de experimentos. A figura 19(b) é a imagem da amostra obtida nas mesmas condições, porém no sistema horizontal e com a utilização de bomba e controle da vazão da solução, em 1 ml/h, item 4.1.1.1.2. Neste caso na figura 19(a) apenas a gravidade atua como força sobre a gota na ponta da agulha e no caso da figura 19 (b) temos a força cisalhamento aplicada pela bomba de fluxo.

Observa-se, comparando as figuras 19(a) e 19(b), uma melhora significativa do aspecto da membrana, com redução no número e no tamanho das contas quando o sistema utilizado foi o vertical (figura 19a), sem utilização da bomba. Isto provavelmente ocorre devido a vazão, que neste caso, foi menor que 1ml/h por causa da alta viscosidade da solução e a não utilização da bomba, possibilitando uma fiação mais lenta e um fluxo de solução menor. Em outras palavras, a ação da gravidade sobre o

fluxo, resultou em melhores resultados para acetato de celulose neste sistema de solvente.

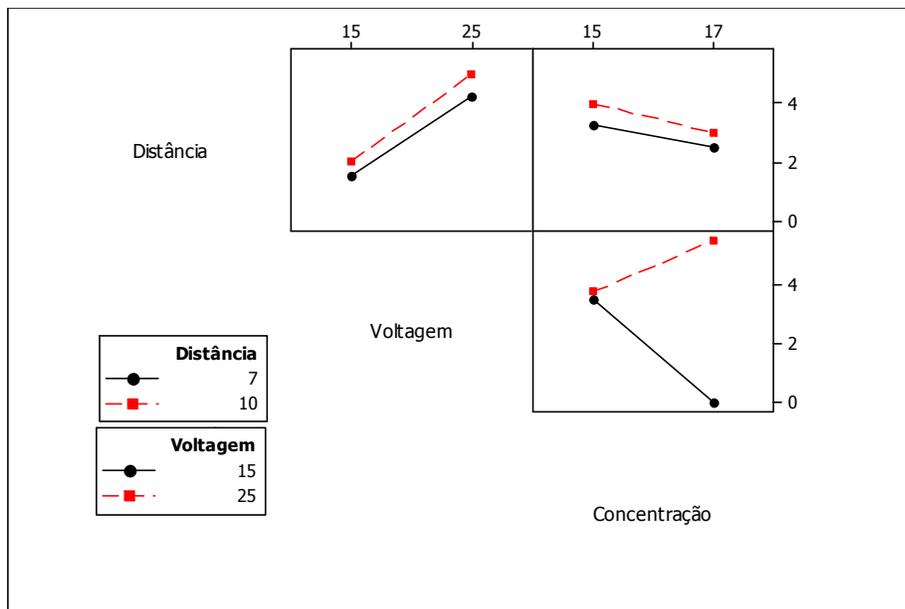


Figura 18: Gráfico de interações para nota média da membrana obtida da solução de Ácido Acético/Água (70:30 m/m) sistema vertical.

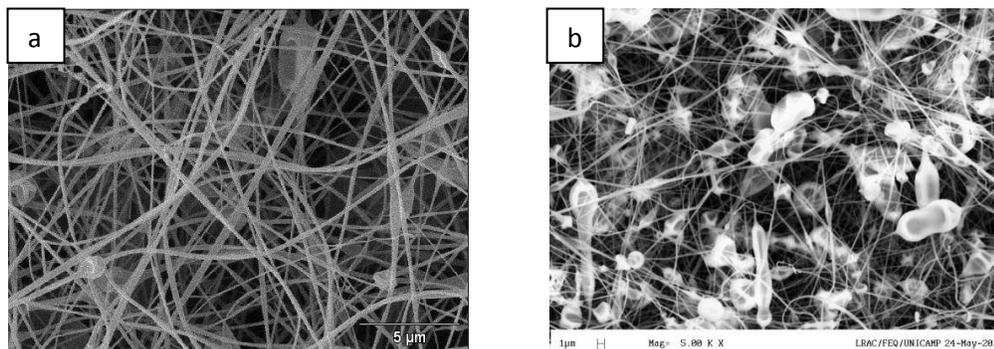


Figura 19: Imagem MEV, com aumento de 5000 vezes, para membrana eletrofiada de Acetato de Celulose (CA) utilizando-se como solvente Acido Acético/Água (75:25): (a) 17% de CA, D = 10 cm, V = 25kV, sistema vertical por gravidade; (b) 17% de CA, D = 10 cm, V = 25k, sistema horizontal com R = 1ml/h.

O grande problema encontrado neste método é o constante entupimento da agulha devido a secagem da solução na ponta da mesma. A introdução de uma variável

a mais também deve ser avaliada, devido a impossibilidade de controle do fluxo que torna inviável a utilização deste método.

Não foi possível realizar uma otimização neste sistema, porque seria necessário um aumento na concentração da solução de acetato de celulose, como comprovado pela melhora na nota da membrana, no sistema horizontal (item 4.1.1.1.2). Entretanto, isto seria inviável neste sistema, devido a impossibilidade de fiação de viscosidades maiores que a utilizada. Como conclusão, pode-se comentar que ao se trabalhar no sistema horizontal com bomba de fluxo, com uma vazão menor que 1 ml/h, talvez seja possível uma melhora no aspecto da membrana.

4.1.1.2. Eletrofiação de CA em Acetona/Água (85:15 m/m)

Quando mudou-se o solvente orgânico para Acetona/Água na proporção de (85:15 m/m), respectivamente, obteve-se os resultados apresentados na tabela 8 para cada um dos experimentos realizados para nanofibras e os resultados obtidos para a análise da solução, resumidos na tabela 9.

Em todos os ensaios observou-se a formação abundante de fibras, com uma estrutura preferencial em forma de fitas, como mostra a figura 20 obtida por MEV, da melhor condição obtida (corrida 6), dentro do planejamento de experimento. Dessa forma, optou-se por indicar nas tabelas os valores da largura das mesmas, ao invés do diâmetro. Na medida da largura tomou-se o cuidado em medir somente as fibras que estavam com a face maior de frente na imagem. Apesar de a difusão de um fármaco em uma estrutura em forma de fita ser comandado pela espessura da mesma, optou-se por medir a largura devido ao conceito de estrutura nanométrica.

Segundo a literatura¹, as estruturas obtidas em forma de fita ocorrem devido às viscosidades de certas soluções, que impedem a evaporação do solvente na fibra, durante seu caminho até o coletor. No caso da solução utilizada aqui, foi necessária adotar-se uma vazão alta (4 ml/h), pois com taxas menores a solução secava na ponta da agulha, entupindo a mesma e não sendo possível a eletrofiação da solução, devida a rápida evaporação do solvente.

Tabela 8 - Parâmetros experimentais utilizados para obtenção da membrana com a solução de acetato de Celulose em Acetona/Água (85:15 m/m).

Corrida	% CA	Potencial (kV)	Distância agulha-coletor (cm)	Largura média da fibra (μm)	Aspecto da membrana (nota)
1	17	25	10	2,3 \pm 0,3	7,0 \pm 1,0
2	17	15	10	2,3 \pm 0,4	8,3 \pm 2,1
3	17	15	7	2,4 \pm 0,4	7,7 \pm 1,2
4	19	15	7	3,6 \pm 0,6	8,0 \pm 1,7
5	19	25	10	3,2 \pm 0,4	8,0 \pm 1,7
6	17	25	7	1,7 \pm 0,3	8,7 \pm 1,5
7	19	15	10	3,4 \pm 0,5	8,0 \pm 2,0
8	19	25	7	3,2 \pm 0,5	7,3 \pm 1,5
Melhor Condição	17	25	7	1,7 \pm 0,3*	8,7 \pm 1,5

*Verificar histograma em Anexos

Tabela 9 - Resultados experimentais das análises da solução de acetato de celulose no solvente Acetona/Água (85:15 m/m).

% CA	Viscosidade (mPas)	Condutividade (μS)	Tensão Superficial (mN/m)
16	400	13,1	31,1
17	450	13,8	31,7
19	875	12,6	32,3

Podemos observar na tabela 8 que a largura das fibras nos experimentos foram da ordem de 2 a 3 μm , e as membranas resultantes dessas fibras recebeu notas altas devido à homogeneidade apresentada.

Dentro da primeira rodada de experimentos, o melhor resultado foi com a corrida número 6, embora a largura obtida não tenha ficado abaixo de 500 nm, como desejado.

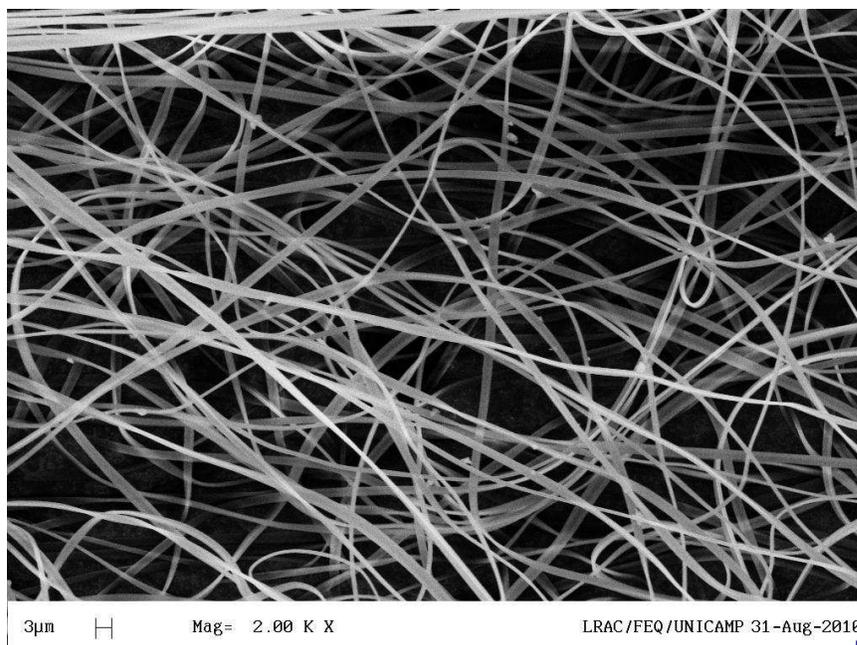


Figura 20: Imagem MEV, com aumento de 2000 vezes, para membrana eletrofiada de 17% de Acetato de Celulose , D = 7 cm, V = 25kV e R = 4mL/h, utilizando-se como solvente Acetona/Água(85:15).

O gráfico de Pareto para os efeitos na largura média da fibra, na figura 21, mostra a significância de cada fator na resposta obtida, conforme já citado anteriormente. Verificamos que o fator de maior relevância, e também o único significativo, foi a concentração de acetato de Celulose na solução. A figura 22 representa o gráfico dos efeitos principais para a largura média da fibra. Nota-se que a maior inclinação das curvas está na linha da concentração, que é o fator determinante na largura das fibras e tem uma influência muito maior do que os demais fatores, conforme gráfico de Pareto (figura 21). Importante notar que diminuindo a concentração, a largura da fibra tende a diminuir.

Com base nestes resultados, realizou-se um novo experimento extrapolando os resultados obtidos, utilizando-se uma solução com concentração de 16% de Acetato de

celulose; porém, manteve-se as mesmas variáveis obtidas na melhor condição da primeira rodada de experimentos, visto que não são significativos para o processo.

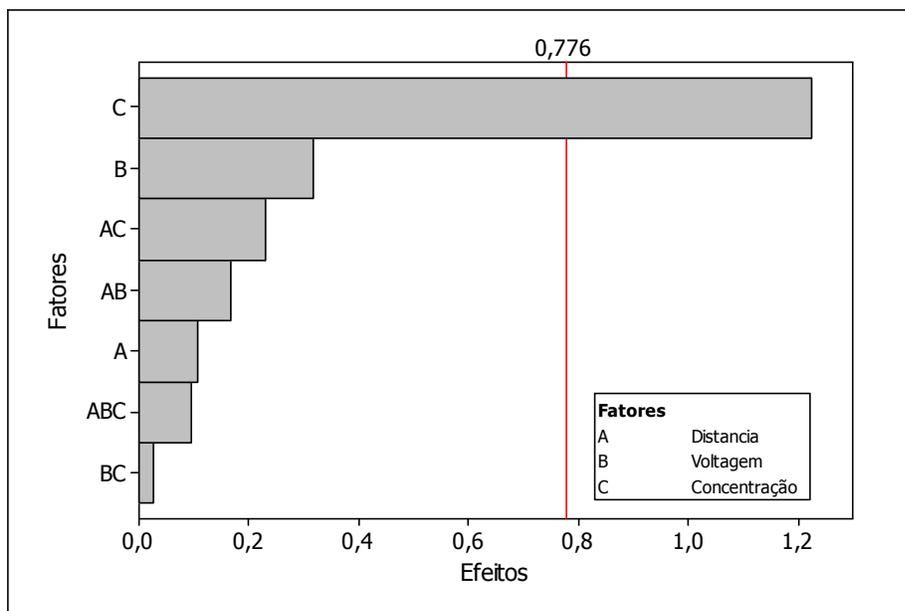


Figura 21: Gráfico de Pareto para os efeitos na largura média da fibra no sistema de solvente Acetona/Água(85:15).

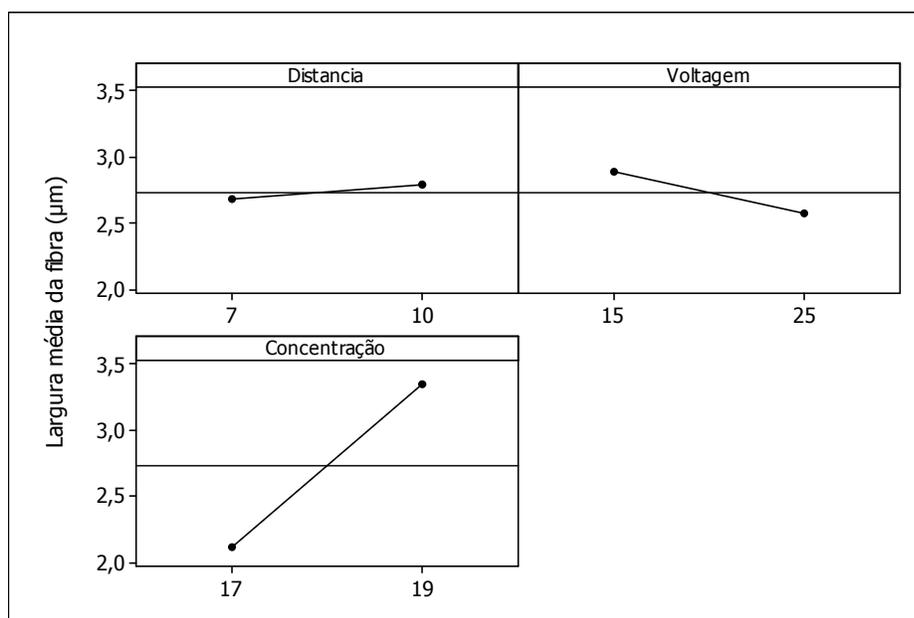


Figura 22: Gráfico dos efeitos principais para a largura média da fibra no sistema de solvente Acetona/Água(85:15).

Como mostra o resultado da figura 23, e por comparação com a figura 20, observa-se que quando diminuiu a concentração de acetato de celulose de 17% para 16%, obteve-se um aumento na largura média da fibra de 1,7 μm para 3,1 μm , respectivamente. Este resultado foi muito importante para que se tivesse uma idéia da ordem de concentração da solução de acetato de celulose, necessária para garantir a produção de fibras preferencialmente às fitas. Como verificado dentro dos experimentos realizados, a tendência observada não pode ser extrapolada, neste caso, além dos limites testados.

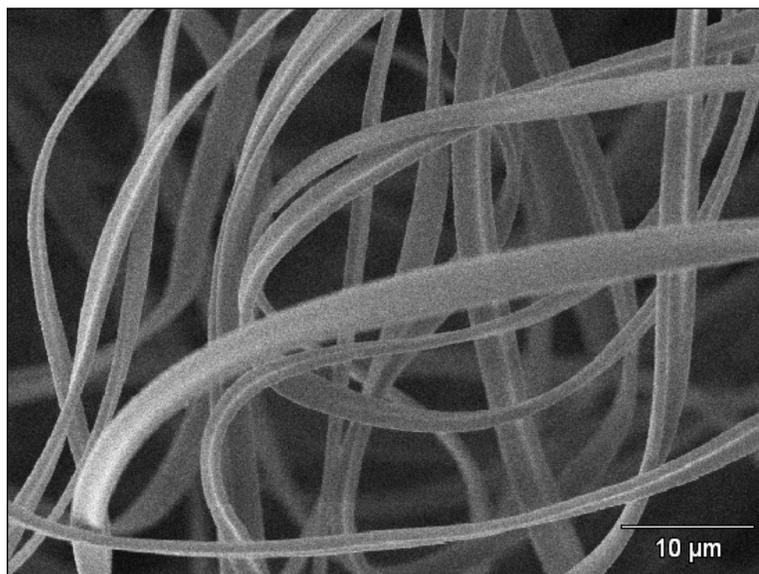


Figura 23: Imagem MEV, com aumento de 2000 vezes, para membrana eletrofiada de uma solução de 16% de Acetato de Celulose, $D = 7 \text{ cm}$, $V = 25\text{kV}$ e $R = 4\text{mL/h}$, utilizando-se como solvente Acetona/Água(85:15).

Para este sistema de solvente, o ponto ótimo encontrado foi com 17% de Acetato de Celulose, em Acetona/Água (85:15), com distância entre agulha e coletor de 7 cm, tensão aplicada de 25kV e vazão de 4 mL/h. Como resultado, obteve-se fibras com diâmetro médio de 1,7 μm e nota 8,7 para a membrana nanoestruturada.

4.1.1.3. Eletrofiação de CA em Dimetilacetamida(DMAc)/Acetona (1:2 m/m).

Utilizando-se como sistema de solvente Dimetilacetamida(DMAc)/Acetona (1:2 m/m), e concentração de CA de 17 e 19%, obteve-se valores de diâmetro médio da fibra e aspecto da membrana mostrados na tabela 10 para cada um dos experimentos realizados e os resultados mostrados na tabela 11 para a análise das soluções.

Tabela 10 - Parâmetros experimentais utilizados para eletrofiação de nanofibras de acetato de Celulose em Dimetilacetamida/Acetona (1:2 m/m).

Corrida	% CA	Potencial (kV)	Distância agulha-coletor (cm)	Diâmetro médio da fibra (nm)	Aspecto da membrana (nota)
1	17	15	7	415±200	9,0±1,0
2	19	15	10	595±200	8,0±1,7
3	17	25	10	363±228	9,0±1,4
4	19	25	10	480±200	8,3±1,2
5	19	25	7	1010±500	3,3±1,5
6	17	25	7	435±200	4,0±1,0
7	17	15	10	405±200	8,3±1,2
8	19	15	7	535±200	9,0±0,0
Melhor Condição	17	25	10	363±228*	9,0±1,4

*Verificar histograma em Anexos

Tabela 11 - Resultados experimentais para análises da solução de acetato de celulose no solvente Dimetilacetamida/Acetona (1:2 m/m).

% CA	Viscosidade (mPas)	Condutividade (µS)	Tensão Superficial (mN/m)
17	550	7,6	28,9
19	925	7,4	30,3

Podemos observar que ocorreu uma grande variação no diâmetro médio das fibras, obtido nos experimentos, que variou de 300 nm a 1 µm e boas notas para o

aspecto da membrana. As fibras apresentaram-se levemente achatadas e com um grande desvio no diâmetro da fibra.

Na figura 24 podemos observar o gráfico de cubo para o diâmetro médio da fibra. O gráfico de cubo é usado para mostrar a relação entre fatores e uma resposta. Podemos verificar nos vértices do cubo as respostas, (diâmetro das nanofibras) para a combinação dos fatores (concentração, voltagem, distância entre agulha e coletor) representados nas arestas que compõem cada vértice. Assim, seguindo as arestas que nos levam aos fatores que compõem o vértice podemos encontrar as condições que geraram esta resposta. Avaliando-se a figura 24, verifica-se o ponto ótimo obtido dentro da rodada de experimentos (corrida 3 na tabela 9) correspondendo a um diâmetro médio de fibra de 363 nm com nota 9 para aspecto da membrana. Isto indicou uma boa formação e uniformidade entre as fibras obtidas neste sistema de solvente. Para o diâmetro médio da fibra, nenhum efeito ou combinação deles apresentou-se como significativo; porém, para a nota da membrana, a distância, a voltagem e a combinação delas mostraram-se significantes. Assim, quanto maior a distância, e menor a voltagem, menor será o diâmetro da fibra neste sistema otimizado.

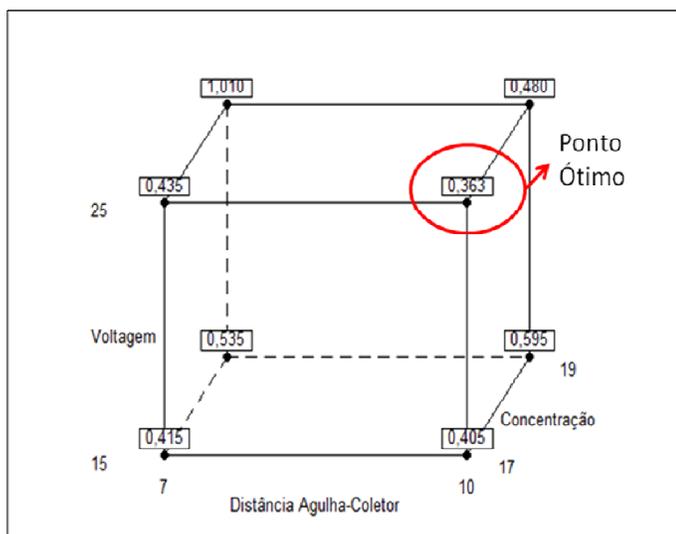


Figura 24: Gráfico de Cubo para diâmetro médio da fibra no sistema de solvente Dimetilacetamida/Acetona (1:2 m/m).

Na figura 25 observa-se a imagem de MEV obtida para a condição ótima da eletrofição do Acetato de Celulose em DMAc/Acetona (1:2 m/m).

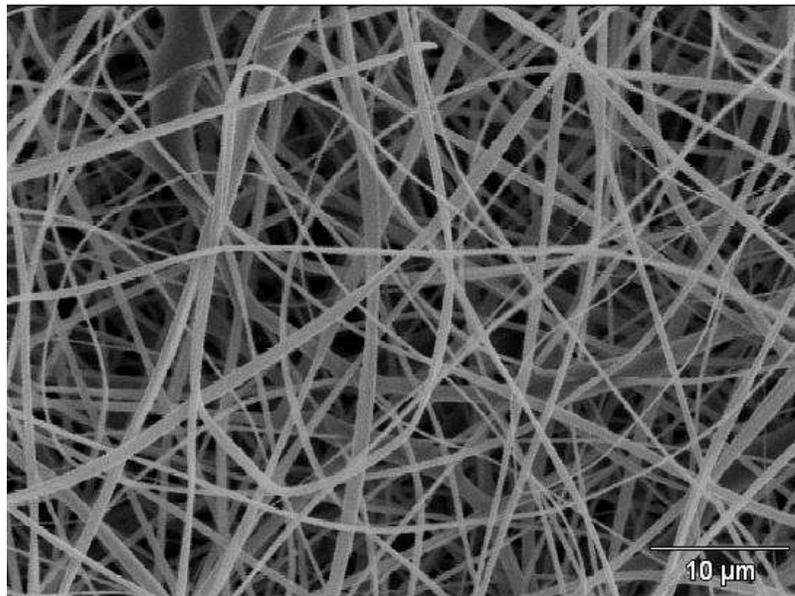


Figura 25: Imagem MEV, com aumento de 2000 vezes, para membrana eletrofiada de 17% de Acetato de celulose , D = 10 cm, V = 25kV, R = 1mL/h, utilizando-se como solvente DMAc/Acetona(1:2).

Quanto ao ponto ótimo para este sistema de solvente, este foi encontrado com a solução de 17% de acetato de Celulose em DMAc/Acetona (1:2); distância entre agulha e coletor de 10 cm, tensão aplicada de 25kV e vazão de 1 mL/h.

Para o ponto ótimo, foi gerada a equação 12, que representa o comportamento desta solução no processo de eletrofição. Assim, temos:

$$DM = 19,808 - 2,092D + 1,267V + 1,168C + 0,126DV + 0,127DC + 0,0764CV - 0,008DVC$$

(eq 12)

Onde DM=diâmetro médio

D=distância entre ponta da agulha e coletor

C=concentração de Acetato de Celulose

V=voltagem aplicada

Tal equação pode ser utilizada para otimização do processo e obtenção de diâmetros menores caso desejado, permitindo um controle maior sobre a taxa de liberação controlada de fármacos que depende da área de contato da membrana com o meio, dentre outros fatores.

4.1.1.4. Eletrofição de CA em Dimetilacetamida/Acetona/Água (32/63/5 m/m)

Continuando nossas pesquisas com misturas de solventes, quando o sistema de solvente utilizado foi DMAc/Acetona/Água(32:63:5), obteve-se os resultados apresentados na tabela 12, para cada um dos experimentos realizados, para a obtenção de nanofibras de acetato de Celulose; e na tabela 13 encontram-se os resultados obtidos na análise das soluções.

Tabela 12 - Parâmetros experimentais utilizados para eletrofição de nanofibras de Acetato de Celulose em Dimetilacetamida/Acetona/Água (32/63/5 m/m).

Corrida	% CA	Potencial (kV)	Distância agulha-coletor (cm)	Diâmetro médio da fibra (nm)	Aspecto da membrana (nota)
1	14	15	10	310±100	5,6±0,6
2	17	15	10	575±100	9,0±0,0
3	17	25	7	325±200	5,3±0,6
4	14	25	7	420±100	3,0±0,0
5	17	25	10	595±200	7,3±0,5
6	17	15	7	605±200	8,7±0,6
7	14	15	7	340±100	4,7±0,5
8	14	25	10	400±100	3,7±0,5
Melhor Condição	15	15	10	356±106*	8,5±0,6

*Verificar histograma em Anexos

Tabela 13 - Resultados experimentais para análises da solução de acetato de celulose no solvente Dimetilacetamida/Acetona/Água (32/63/5 m/m).

% CA	Viscosidade (mPas)	Condutividade (μ S)	Tensão Superficial (mN/m)
14	275	7,9	29,6
15	375	8,7	30,0
17	625	8,0	31,1

Podemos observar na tabela 12 que os diâmetros das fibras obtidas nos experimentos, variaram entre 300 a 600 nm, e o aspecto da membrana apresentou notas com grande variação; porém, o valor médio está dentro do desejado.

Na figura 26 temos o gráfico de Pareto para os efeitos, que nos mostra a significância de cada fator na resposta obtida, conforme comentado anteriormente. Verificamos que a concentração do acetato de celulose na solução e a voltagem aplicada, são os dois efeitos de maior relevância e significância para nota média da membrana. A figura 27 representa o gráfico de interação entre os parâmetros e seus efeitos no diâmetro médio da fibra avaliada pela inclinação das duas linhas em cada quadrante e pelo cruzamento das linhas, conforme citado anteriormente. Nota-se que a maior inclinação das curvas apresenta-se na linha da concentração e voltagem, que são os fatores determinantes no diâmetro da fibra, e tem uma influencia muito maior que a distância entre a ponta da agulha e o coileto. Verifica-se também que existe uma interação entre todos os fatores, pois, as linhas nos três quadrantes se cruzam.

Utilizando-se o software Minitab, foi possível otimizar o processo de eletrofiação de acetato de celulose neste sistema de solventes através das equações 13 e 14, para o diâmetro médio da fibra e a nota média da membrana, respectivamente. Assim, temos:

$$DM = -8,168 + 0,662D + 0,489V + 0,607C - 0,045DV - 0,048DC - 0,035CV + 0,003DCV \quad (\text{eq 13})$$

$$NT = -66,592 + 6,204D + 2,867V + 5,019C - 0,322DV - 0,407DC - 0,211CV + 0,022DVC \text{ (eq 14)}$$

Para estas equações:

DM=diâmetro médio

NT=nota membrana

D=distância entre ponta da agulha e coletor

C=concentração de Acetato de Celulose

V=voltagem aplicada

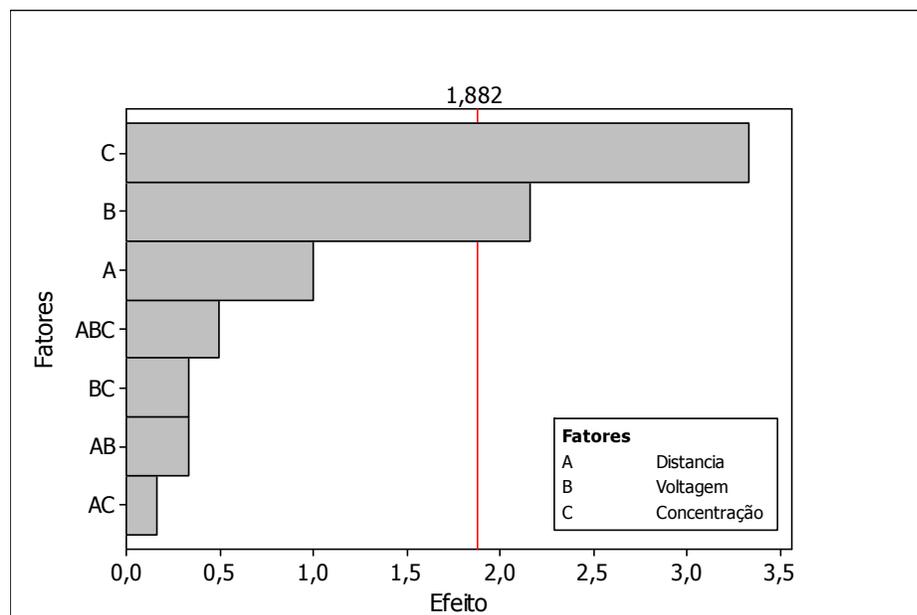


Figura 26: Gráfico de Pareto para os efeitos na nota média da membrana no sistema de solvente Dimetilacetamida/Acetona/Água (32/63/5 m/m).

Utilizando-se as equações 13 e 14, o software Minitab gerou uma nova condição otimizada para o processo, prevendo uma nota de membrana dentro do desejado, com menores diâmetros de fibra. Ou seja, deve-se utilizar uma concentração de Acetato de Celulose intermediária (15%) à utilizada na primeira rodada de experimentos com distância entre agulha e coletor de 10 cm, tensão aplicada de 15 kV e vazão de 1mL/h.

Dessa forma foi realizado um experimento considerando esta condição ótima indicada pelo software conforme indicado na tabela 12.

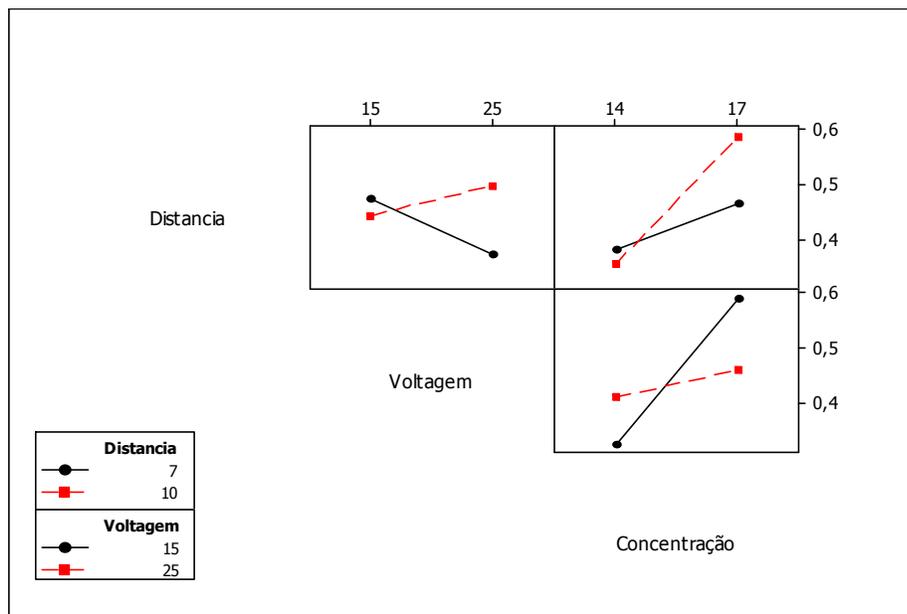


Figura 27: Gráfico de interação para o diâmetro médio da fibra no sistema de solvente Dimetilacetamida/Acetona/Água (32/63/5 m/m).

A figura 28(a) mostra a imagem de MEV para a melhor condição obtida dentro da rodada de experimentos (corrida 2 na tabela 12) e a figura 28(b) a imagem da condição otimizada com concentração de acetato de celulose de 15%. Comparando-se os resultados obtidos para as duas concentrações testadas, nota-se uma redução significativa no diâmetro da fibra de 37% (de 575 nm para 356nm) quando a concentração diminuiu de 17% para 15%. Porém, manteve-se a nota para a membrana de 8,5, indicando que alcançamos o ponto ótimo para este sistema de solvente.

Diminuindo-se a concentração além deste valor observa-se uma redução na nota da membrana devido ao aparecimento de defeitos, conforme pode ser verificado na tabela 12 (corrida 1).

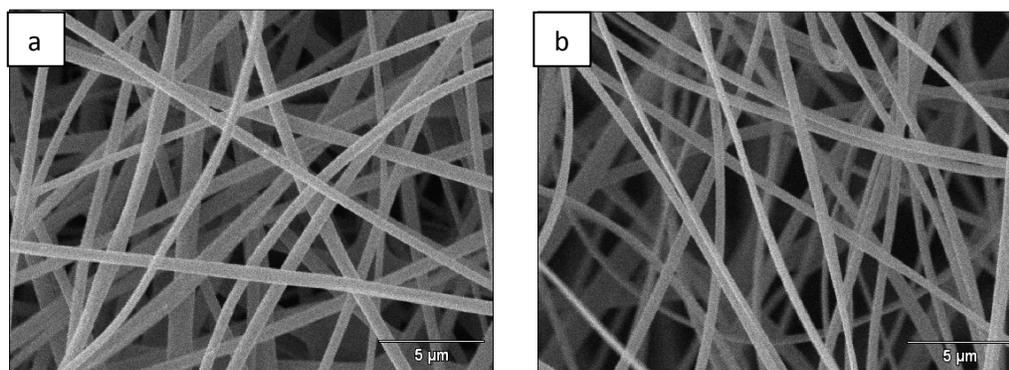


Figura 28: Imagem MEV, com aumento de 5000 vezes, para membrana eletrofiada de Acetato de Celulose (CA) utilizando-se como solvente DMAc/Acetona/Água (32:63:5) (a) 17% de CA , D = 10 cm, V = 15kV e R = 1mL/h; (b)15% de CA , D = 10 cm, V = 15kV e R = 1mL/h, condição otimizada.

Para este sistema de solvente o ponto ótimo encontrado foi com 15% de acetato de celulose em DMAc/Acetona/Água (32:63:5), com distância entre agulha e coletor de 10 cm, tensão aplicada de 15kV e vazão de 1 mL/h. Como resultado, obteve-se fibras com diâmetro médio de 360 nm e nota 8,5 para a membrana nanoestruturada.

4.1.2. Reologia das soluções de CA sem fármaco

Para as soluções que forneceram as melhores condições de cada sistema, ou seja, nanofibras uniformes, menores diâmetros de fibras e melhor aspecto da membrana, realizaram-se a construção de uma curva de Tensão de cisalhamento x Taxa de cisalhamento com o objetivo de conhecer o comportamento reológico das mesmas.

Avaliando-se os gráficos de Viscosidade x Taxa de cisalhamento, na escala logarítmica, para todas as soluções, figuras 29 a 33, nota-se um comportamento Newtoniano para as soluções de Acetona/Água, DMAc/Acetona e DMAc/Acetona/Água onde a viscosidade apresenta um comportamento constante com o aumento da taxa de cisalhamento. Para as soluções de Ácido Acético/Água, porém, verifica-se que a viscosidade não se mantém constante, decaindo com o aumento da taxa de cisalhamento e apresentando, assim, um comportamento reológico pseudoplástico,

além de valores de viscosidade muito superiores as soluções citadas anteriormente. No caso das soluções de ácido acético, os valores de viscosidade se mantiveram acima de 4500 mPas (figuras 29 e 30) em comparação com valores inferiores a 550 mPas das demais soluções (figuras 31 e 33).

Esta diferença no comportamento reológico das soluções de Ácido Acético/Água, em comparação com as demais, pode justificar a diferença obtida nas membranas eletrofiadas. Nenhuma das membranas obtidas, com as soluções de Ácido Acético/Água, apresentaram bons resultados dentro da faixa de estudo utilizado no DOE. As membranas apresentaram muitos defeitos denominados contas, não sendo possível, nem com a otimização do processo, obter membranas sem defeitos. Para estas soluções talvez a faixa de variação dos efeitos (concentração, distância agulha-coletor e tensão aplicada) não foi suficiente para mostrar a melhor condição otimizada, devido a diferença no comportamento reológico desta em comparação com as demais soluções, onde foi possível otimizar o processo e obter membranas sem defeitos com o diâmetro da fibra aceitável.

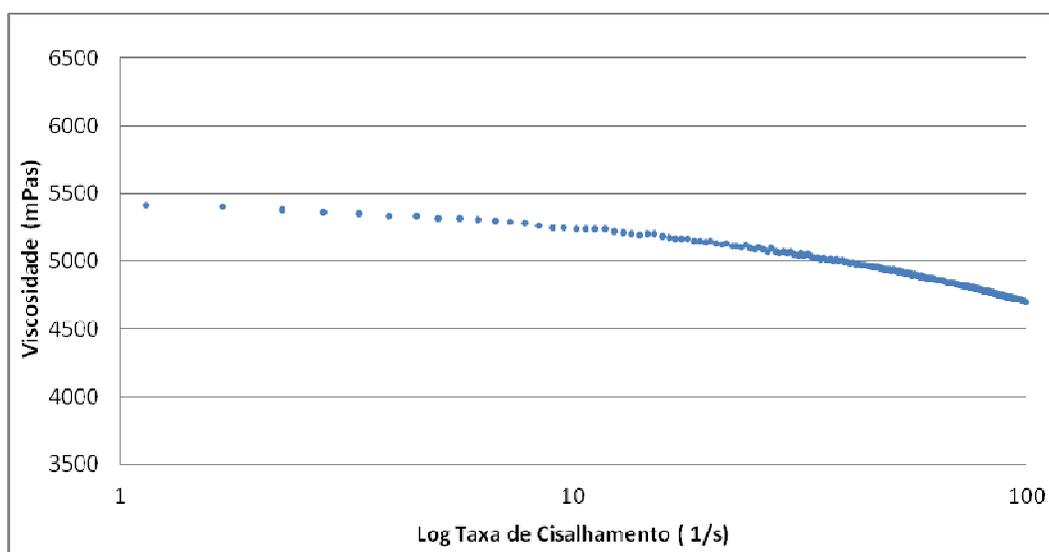


Figura 29: Comportamento reológico para solução de Acetato de Celulose 17% (m/m) em Ácido Acético/Água (70:30).

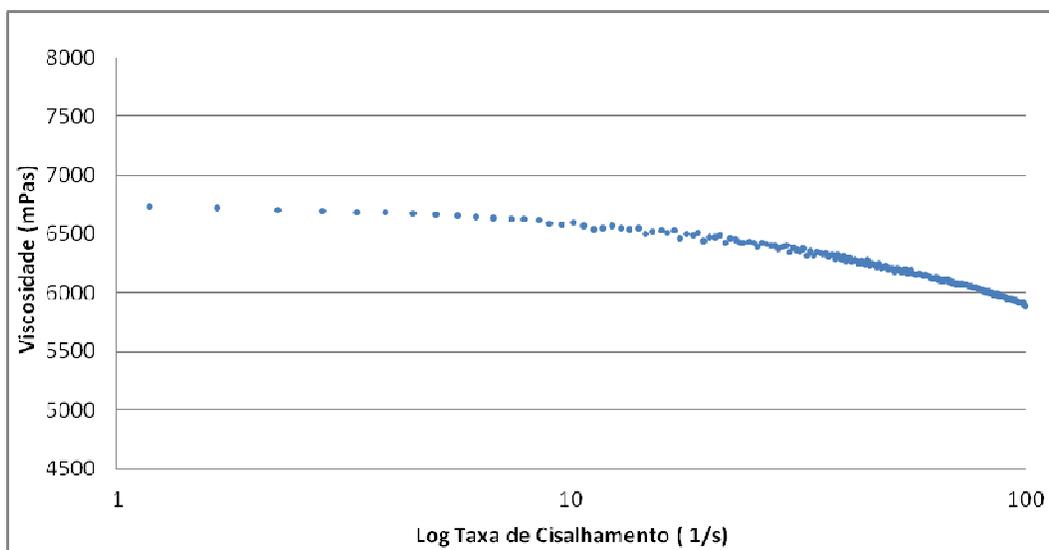


Figura 30: Comportamento reológico para solução de Acetato de Celulose a 18% (m/m) em Ácido Acético/Água (75:25).

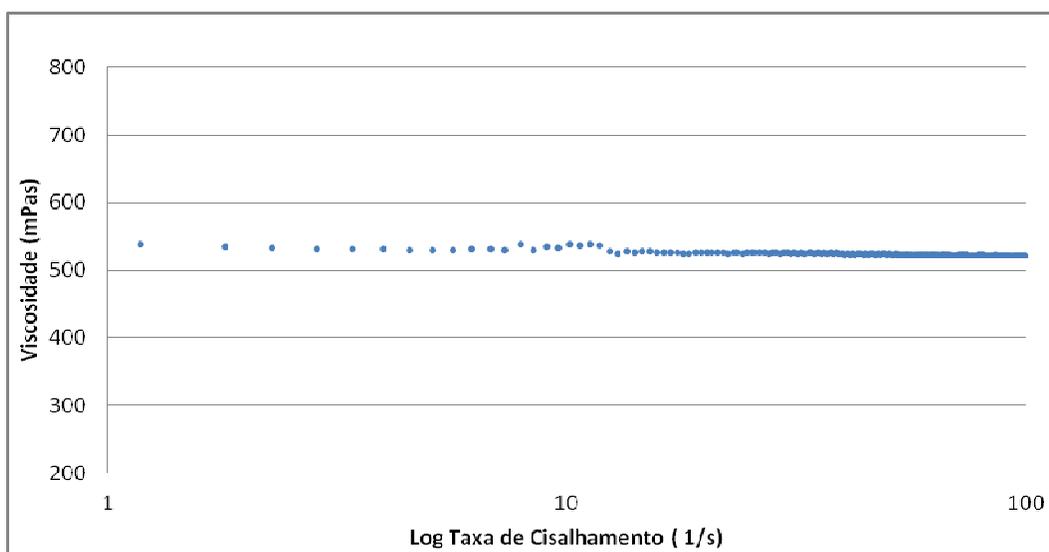


Figura 31: Comportamento reológico para solução de Acetato de Celulose a 17% (m/m) em Acetona/Água (85:15).

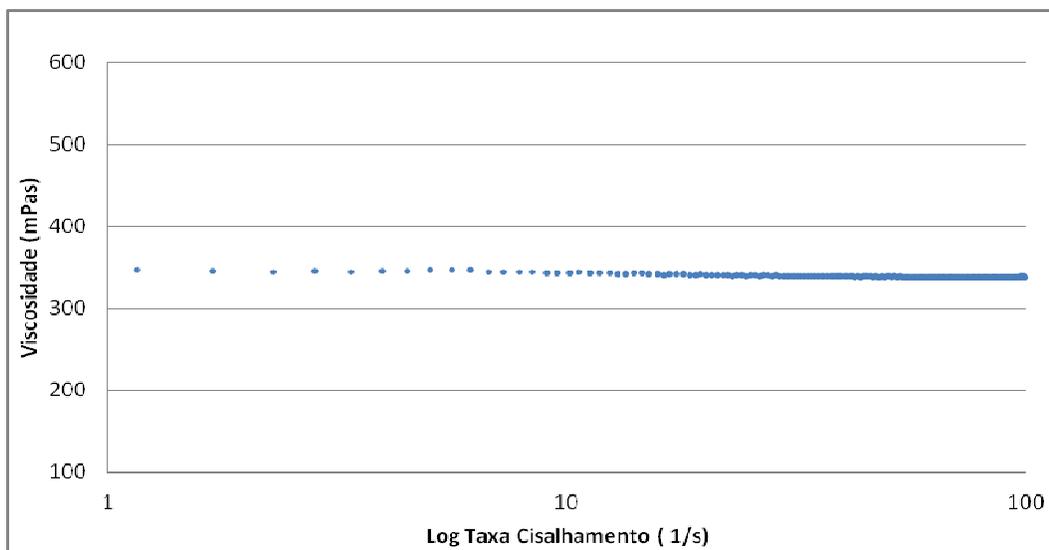


Figura 32: Comportamento reológico para solução de Acetato de Celulose a 15% (m/m) em Dimetilacetamida/Acetona/Água (32:63:5).

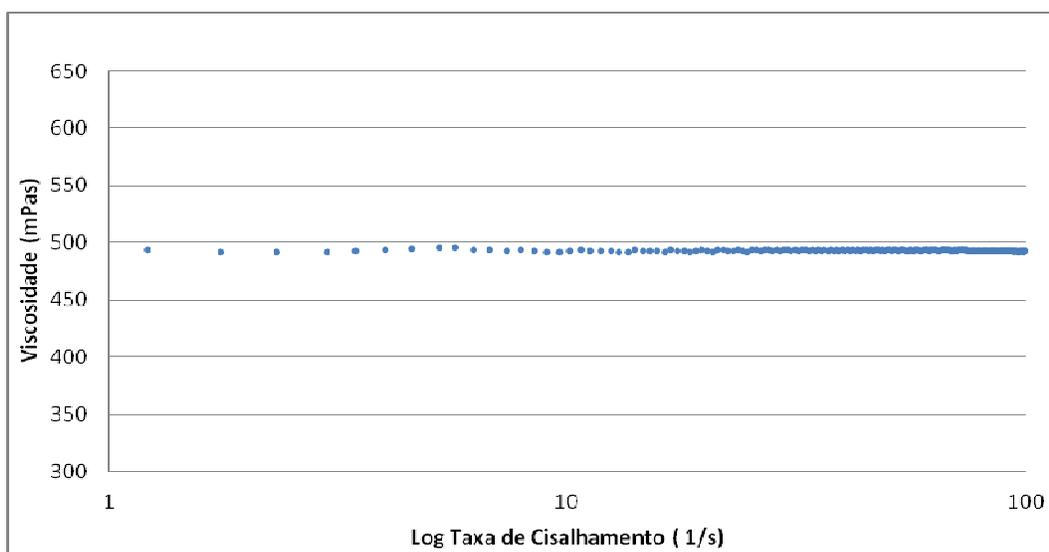


Figura 33: Comportamento reológico para solução de Acetato de Celulose a 17% (m/m) em Dimetilacetamida/Acetona (1:2).

O comportamento reológico diferente observado, caracterizado pelas altas viscosidades e pseudoplasticidade para a solução de CA em ácido Acético/Água, em comparação aos demais solventes, provavelmente deve-se a uma específica interação entre o CA e o solvente, que não ocorre nos demais casos.

O acetato de celulose é uma celulose acetilada em que os grupos hidroxila ao longo da cadeia são totalmente ou parcialmente acetilados. O acetato de celulose utilizado neste estudo apresenta um grau de substituição de 40%, ou seja 2,65, pela conversão encontrada na literatura^{108,109}.

A maioria dos CA é produzida utilizando um processo de solução, onde linters de algodão ou madeira macia são utilizados como matéria-prima. A acetilação ocorre em solução de ácido acético glacial, quer sozinho ou em combinação com cloreto de metileno, e a reação é catalisada com ácido sulfúrico⁵⁷.

As propriedades das soluções de acetato de celulose foram bem estudadas e foi mostrado que são influenciadas pelo grau médio de substituição e pela distribuição de substituintes ao longo da cadeia, sendo que as propriedades estruturais do CA afetam a reologia das soluções. Acetatos de celulose que tenham grau de substituição (DS) entre 0,5-1 são solúveis em água. Este fenômeno é atribuído à ruptura de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares dentro do sistema de celulose após a introdução de alguns grupos acetil. Aumentando o grau de substituição, o acetato de celulose torna-se insolúvel em água, mas mostra boa solubilidade em uma variedade de solventes orgânicos, tais como tetrahidrofurano (THF), acetona e N,N-dimetilacetamida (DMAC)^{57,110}.

Portanto, o uso de solventes específicos podem provocar mudanças estruturais na solução, dependendo da quantidade de grupos acetil e hidroxila em cadeias parcialmente substituídas de CA. Em alguns casos isso leva à separação de fase e / ou gelificação em uma variedade de sistemas solventes para CA⁵⁷.

Assim o comportamento reológico observado para a solução de CA em ácido Acético/Água pode ser explicado pela interação entre o CA e o solvente que pode ter aumentado o grau de acetilação do CA, acarretando em uma solução de alta viscosidade e comportamento pseudoplástico.

Vale ressaltar que o comportamento viscoelástico linear em regime oscilatório de baixa amplitude das soluções não foi medido devido às limitações no equipamento utilizado.

4.1.3. Testes de Citotoxicidade

4.1.3.1. Ensaios de Citotoxicidade

A figura 34 ilustra os resultados de biocompatibilidade obtidos com o teste de exclusão com corante vital azul de Trypan. Os grupos experimentais testados foram as membranas de nanofibras de Acetato de Celulose, preparadas através de soluções de diferentes solventes, Ácido Acético/Água 70:30 (VC1), Acetona/Água 85:15 (VC2), DMAc/Acetona 1:2 (VC3) e DMAc/Acetona/Água 32:63:5 (VC4). Os resultados deste estudo demonstram um aumento no número de população viável de células em todos os grupos experimentais, quase igual ao do grupo controle (poliestireno) indicando que as membranas de nanofibras de Acetato de Celulose são biocompatíveis independente do solvente utilizado na eletrofiação.

Observa-se que existe uma variação no número de células “viáveis”, provavelmente devido a variação da área de superfície da amostra para o crescimento celular, bem como à variação de diâmetro das fibras.

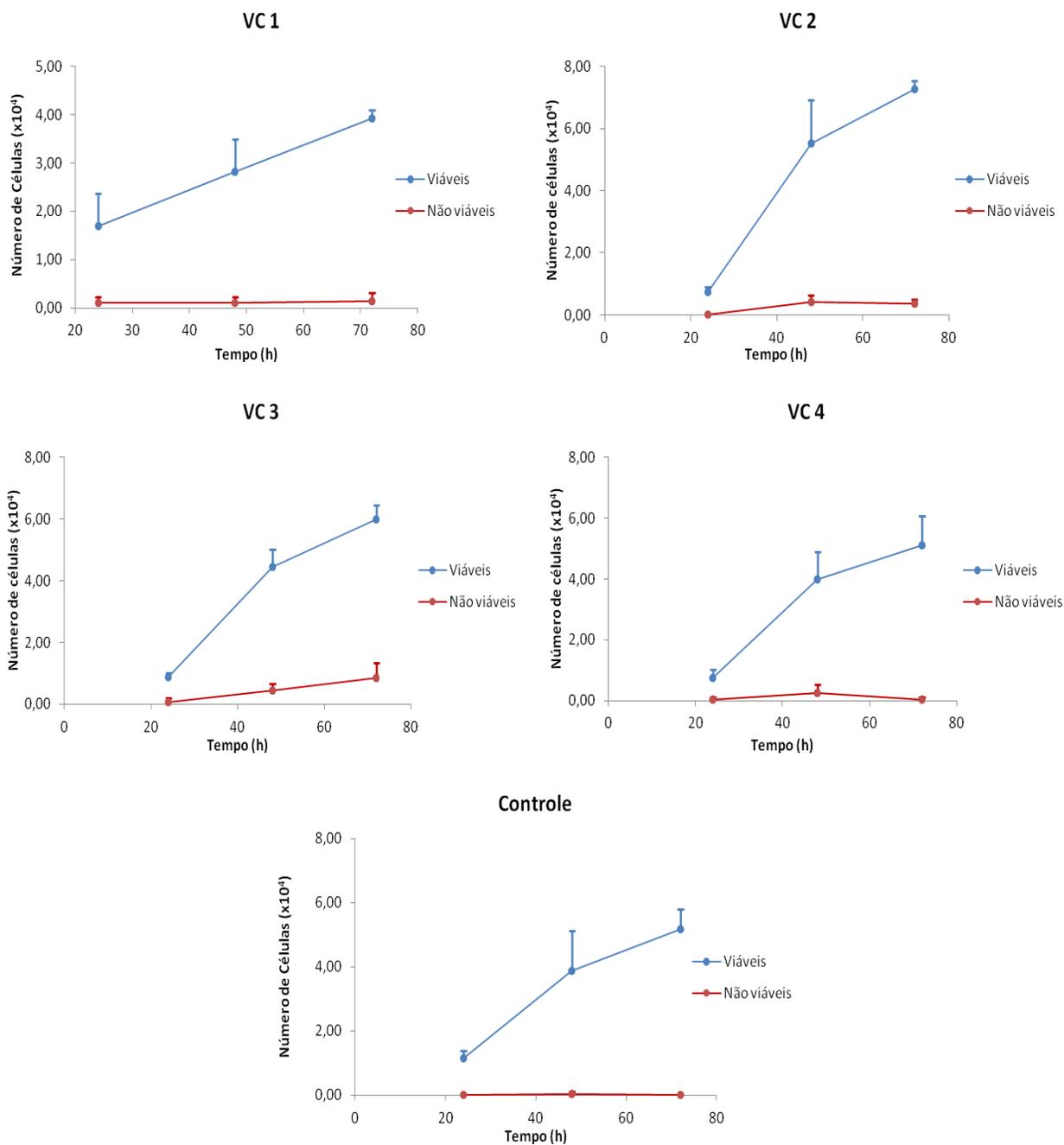


Figura 34: Resultados de viabilidade celular após 24, 48 e 72 horas de incubação, conforme determinado pelo teste de exclusão com corante vital azul de Trypan. Viabilidade celular em poliestireno (Controle), e nas membranas de nanofibras de Acetato de Celulose preparadas através através de soluções de diferentes solventes, Ácido Acético/Água 75:25 (VC1), Acetona/Água 85:15 (VC2), DMAc/Acetona 1:2 (VC3) e DMAc/Acetona/Água 32:63:5 (VC4). As barras de erro representam o desvio-padrão.

4.1.3.2. Morfologia das Células

A morfologia das células MC3T3 pré-osteoblásticas de rato, principais responsáveis pela formação da matriz mineralizada do tecido ósseo¹¹¹, que foram cultivadas sobre o poliestireno (Controle) e sobre as membranas de nanofibras de acetato de celulose, eletrofiadas a partir de soluções de CA em Ácido Acético/Água (VC1), pode ser visualizada através das fotomicrografias obtidas por MEV (figura 35).

A figura 35 é uma imagem representativa de 72 horas de exposição do material em cultura de células, mostrando a aderência das mesmas na superfície da membrana. Em particular, as células apresentaram maior rendimento na superfície da amostra de acetato de celulose (figura 35b) do que na superfície do poliestireno (figura 35a). Em todas as membranas, as células apresentaram-se aderidas a superfície com morfologia poliédrica.

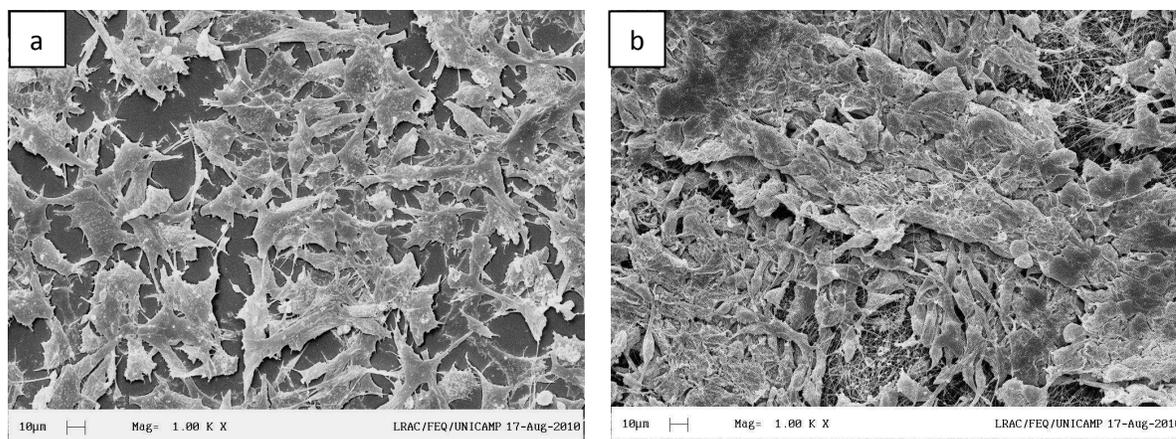


Figura 35: Micrografias eletrônicas de varredura mostrando culturas de células MC3T3 em (a) poliestireno ,(b) membrana de nanofibra de acetato de celulose.

Na membrana de acetato de celulose (figura 35b), a topografia da superfície não foi homogênea e apresentou rugosidade quando comparado com o controle de poliestireno. Provavelmente isto ocorreu devido a membrana de acetato de celulose apresentar uma superfície irregular devido a rede de fibras.

4.2. Membranas de CA com Fármaco Sulfato de Gentamicina

4.2.1. Eletrofiação das membranas com Sulfato de Gentamicina

Na tabela 14 podemos verificar os melhores resultados obtidos para o diâmetro das nanofibras, incorporadas com o fármaco e preparadas conforme as condições da tabela 1 (vide materiais e métodos).

Tabela 14 - Diâmetro médio das nanofibras de CA nas membranas após incorporação do fármaco.

Solução	Diâmetro médio (nm)	
	6% Gentamicina	60% Gentamicina
18% CA em Ácido Acético/Água (75:25 m/m)	170±50	400±70
17% CA em Acetona/Água (85:15 m/m)	3400±710	920±640
17% CA em DMAc/Acetona (1:2 m/m)	510±140	410±150
15% CA em DMAc/Acetona/Água (32:63:5 m/m)	490±170	400±120

Avaliando-se os resultados da tabela 14, pode-se verificar que para as soluções de ácido Acético/Água e Acetona/Água a concentração de gentamicina teve uma grande influência nos resultados de diâmetro médio da nanofibra em comparação com os resultados obtidos para as soluções de DMAc/acetona e DMAc/Acetona/Água. Neste segundo caso, a concentração de sulfato de Gentamicina não apresentou grande influência no diâmetro médio da nanofibra obtida. Estas variações serão explicadas com maiores detalhes a seguir.

A membrana obtida com a solução polimérica de 18% de CA com Ácido Acético/Água e 6% de fármaco pode ser verificada na figura 36(a), e com 60% na figura 36(b).

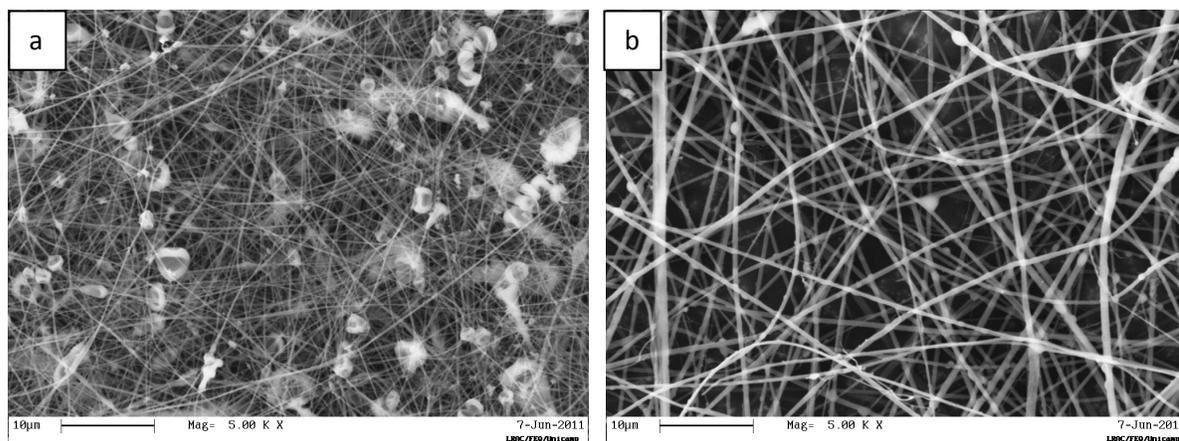


Figura 36: Imagens de MEV das membranas de nanofibras, aumento de 5000x, obtidas a partir de soluções poliméricas de 18% de CA em Acido Acético/Água com incorporação de 6% (a) e 60% (b) de Sulfato de Gentamicina, nas condições idealizadas.

Observando-se a figura 36 podemos verificar que com o aumento da concentração de sulfato de gentamicina na membrana, obtivemos uma redução no número de contos e defeitos. Também se verifica que um aumento na concentração do fármaco foi acompanhado de um aumento no diâmetro das fibras, porém manteve-se o valor abaixo de 500 nm, que é o limite máximo desejado neste trabalho. Interessante notar que as membranas com o fármaco apresentaram-se melhores que as membranas sem a incorporação do mesmo, com pequeno número de defeitos como observado na figura 36(b).

Para entendermos os resultados obtidos com a incorporação do sulfato de Gentamicina mediu-se a condutividade das soluções poliméricas com fármaco, o que pode ser verificado na tabela 15.

Tabela 15 - Condutividade das soluções poliméricas de CA após incorporação do fármaco.

Solução	Condutividade (μS)		
	Sem Gentamicina	6% Gentamicina	60% Gentamicina
18% CA em Ácido Acético/Água (75:25 m/m)	56,1	101,4	306,0
17% CA em Acetona/Água (85:15 m/m)	12,9	17,9	20,8
17% CA em DMAc/Acetona (1:2 m/m)	8,1	8,1	6,2
15% CA em DMAc/Acetona/Água (32:63:5 m/m)	8,7	8,0	7,6
Água Deionizada	1,8	1830,0	8510,0

Através dos dados da tabela 15, verifica-se que a adição de sulfato de Gentamicina aumenta significativamente a condutividade da solução de CA em ácido Acético/Água. Este aumento na condutividade justifica a melhora na membrana após a incorporação do fármaco. Conforme citado na literatura por Ramakrishna et al.¹, se a condutividade da solução polimérica aumenta, mais cargas podem ser carregadas pelo jato e, como consequência, ocorrerá maior estiramento da fibra com menor formação de contas.

Na figura 37, podemos observar as amostras de membranas obtidas com a solução polimérica de 17% de CA em Acetona/Água e incorporação do fármaco em 6 e 60%. Neste sistema de solvente, nas condições descritas na tabela 1, não foi possível fiar em nenhuma das duas concentrações do fármaco, não se obtendo formação de membrana. Dessa forma, manteve-se a concentração de CA constante, e realizou-se pequenos ajustes na voltagem aplicada e distância agulha-coletor, até observar-se a formação da membrana.

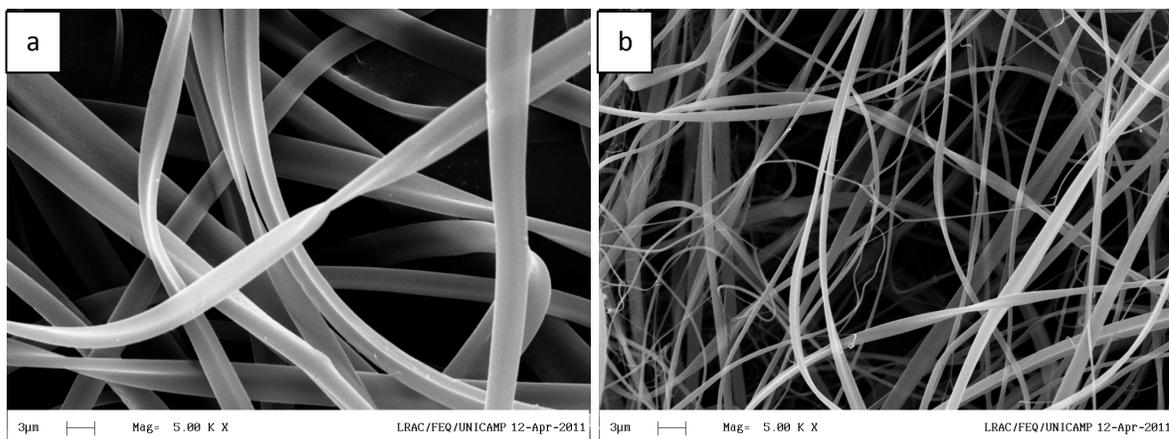


Figura 37: Imagens de MEV das membranas de nanofibras, aumento de 5000x, obtidas a partir de soluções poliméricas de 17% de CA em Acetona/Água com incorporação de: (a) 6% de fármaco com $V = 15$ kV e $D = 10$ cm; (b) 60% de fármaco com $V = 15$ kV e $D = 7$ cm.

Observando-se a figura 37, pode-se verificar que com o aumento da concentração de sulfato de Gentamicina na membrana, obteve-se uma redução significativa na largura das nanofibras, que passaram de uma média de $3,14\mu\text{m}$ para $0,92\mu\text{m}$, ou seja uma redução de 71%. Porém, o aspecto da membrana (presença de defeitos) e a homogeneidade no diâmetro das fibras não foram mantidos, o que significa um decréscimo na qualidade do material.

Através dos dados de condutividade da solução de CA em Acetona/Água, verificados na tabela 15, nota-se que a adição do fármaco também incrementou os valores de condutividade da mesma, porém não tanto quanto para a solução de ácido Acético/Água. Este aumento, porém foi o suficiente para alterarmos o comportamento da solução e conseqüentemente a característica da membrana. Novamente conforme citado na literatura por Ramakrishna et al.¹, se a condutividade da solução polimérica aumenta, mais cargas podem ser carregadas pelo jato e, como conseqüência, ocorrerá maior estiramento da fibra e aumentará a probabilidade de fibras com menor diâmetro. Segundo o mesmo autor¹, a voltagem crítica para ocorrer a eletrofiação diminui quando aumentamos a condutividade. Esta afirmação foi verificada no nosso experimento, pois

não foi possível iniciar a eletrofiação com a voltagem de 25 kV como foi determinado no teste sem fármaco, e sim reduzi-la para 15kV.

Outro efeito do aumento das cargas, também citado na literatura pelos mesmos autores acima, é a grande instabilidade no cone de Taylor formada devido ao aumento da condutividade da solução; como resultado temos um aumento na área de deposição das fibras. Este fator pode ter contribuído para que as nanofibras obtidas não apresentassem homogeneidade no diâmetro.

Quando se utilizou a solução polimérica de 17% de CA em DMAc/Acetona, obteve-se as membranas ilustradas na figura 38. Neste caso também foi necessário alterar as condições iniciais descritas na tabela 1, pois nestas condições não ocorreu formação de fibras. Deste modo, manteve-se a concentração de CA em 17% e alterou-se a voltagem e a distância agulha-coletor até observar-se o início de formação das membranas.

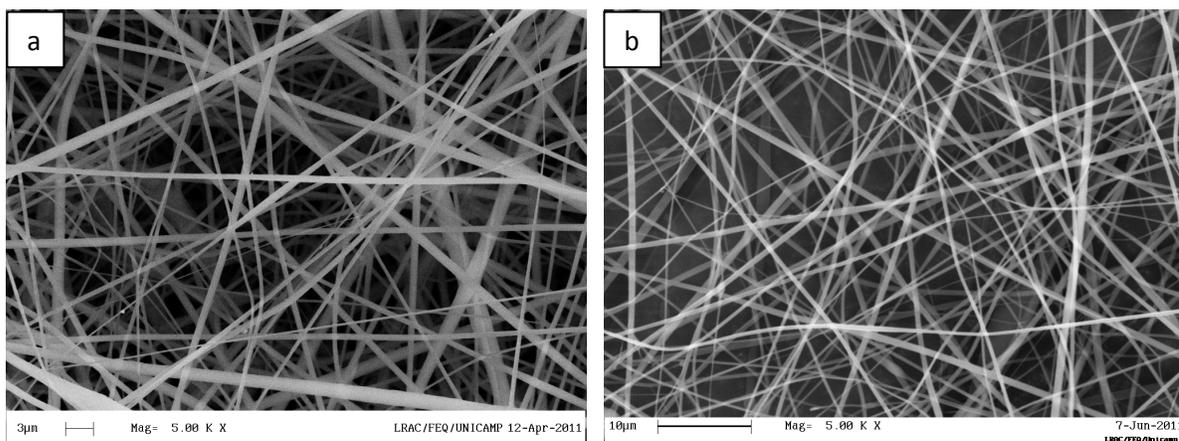


Figura 38: Imagens de MEV das membranas de nanofibras, aumento de 5000x, obtidas a partir de soluções poliméricas de 17% de CA em DMAc/Acetona com incorporação de: (a) 6% de fármaco com $V = 15$ kV e $D = 10$ cm. (b) 60% de fármaco com $V = 10$ kV e $D = 7$ cm.

Quando analisamos a figura 38 verificamos que com o aumento da concentração do fármaco ocorreu uma redução no diâmetro das nanofibras, mantendo-se o aspecto da membrana sem defeitos e com boa homogeneidade na distribuição de valores de diâmetro. Neste caso ocorreu uma diminuição no diâmetro da fibra de 19%.

Observando-se os resultados da tabela 15, a condutividade da solução de CA em DMAc/Acetona diminuiu com um aumento significativo da quantidade do fármaco. Esta diminuição da condutividade pode ser resultado da barreira física criada pelo sulfato de Gentamicina nesta solução com concentração de 60%, já que o mesmo não se solubiliza na solução (é insolúvel nestes solventes, e solúvel apenas em água) e sim apenas se dispersa. Assim, a redução da condutividade ajudou na obtenção de fibras com menores diâmetros.

Comparando-se a membrana com o fármaco (figura 38) e a preparada anteriormente sem o mesmo (figura 25) observa-se que ocorreu um aumento no diâmetro da fibra que era de 0,29 μm sem fármaco e passou a 0,41 μm com fármaco, porém mantendo-se dentro do desejado deste trabalho. Como já citado anteriormente, foi verificado na literatura de Ramakrishna et al.¹, que se a condutividade da solução polimérica diminui, menos cargas podem ser carregadas pelo jato e, como consequência, ocorrerá menor estiramento da fibra e aumentará a probabilidade de fibras com maior diâmetro, que foi verificado no experimento realizado.

Quando se utilizou a solução polimérica de 15% de CA em DMAc/Acetona/Água, membranas com boa formação foram obtidas conforme mostrado na figura 39. Neste caso foi possível manter as condições idealizadas, apresentadas na tabela 1, não sendo necessário nenhum ajuste dos parâmetros.

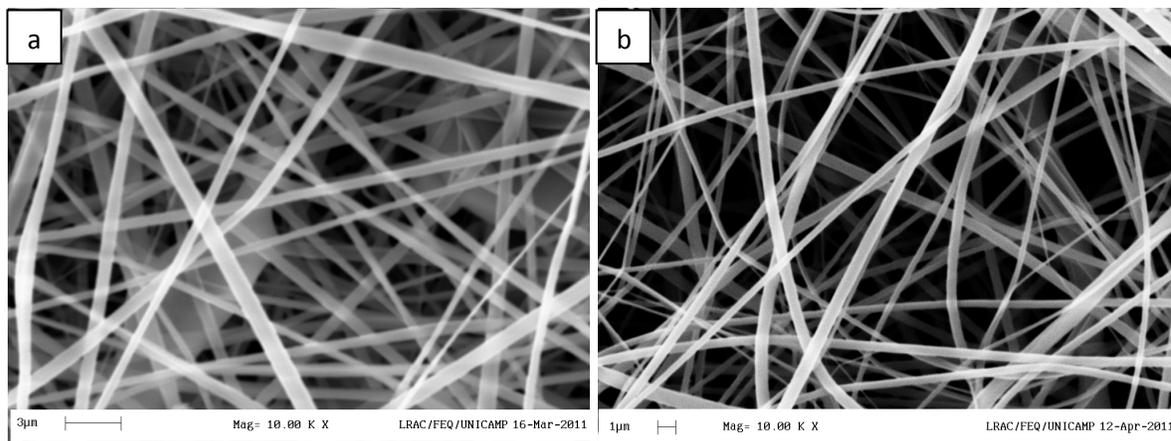


Figura 39: Imagens de MEV das membranas de nanofibras, aumento de 10000x, obtidas a partir de soluções poliméricas de 15% de CA em DMAc/Acetona/Água com incorporação de 6% (a) e 60% (b) de Sulfato de Gentamicina, nas condições idealizadas.

Através dos resultados apresentados na tabela 14, e comparando-se as imagens da figura 39, pode-se observar que com o aumento da concentração do fármaco não se obteve grandes variações no aspecto da membrana, no diâmetro e na homogeneidade das nanofibras. Isto demonstra que este sistema apresenta-se estável, onde podemos variar a concentração do fármaco sem perdermos a qualidade do material. Este aspecto é muito importante dentro do objetivo desejado do trabalho, pois poderemos ter flexibilidade na faixa de trabalho do material, sem prejuízo das características do mesmo.

Novamente confrontando estes resultados com os obtidos para a condutividade da solução, tabela 15, nota-se que a condutividade também diminuiu com a adição do fármaco, porém em proporção menor que a ocorrida para a solução de DMAc/Acetona. Este comportamento pode ser resultado da barreira física criada pelo sulfato de Gentamicina nesta solução, já que este fármaco não se solubiliza em solventes orgânicos, mas é altamente solúvel em água. Temos uma pequena quantidade de água neste sistema (5%) e uma grande quantidade de sulfato de gentamicina, dessa forma a quantidade de água não é suficiente para solubilizar todo o fármaco. Dessa forma o excesso do fármaco cria essa barreira física dificultando a condutividade. O efeito na condutividade neste caso foi menor, devido à pequena proporção de água no sistema de solvente (5%) que ajudou a equilibrar o efeito de barreira do fármaco com o efeito do aumento da condutividade, devido a pequena parte deste solubilizado em água. Portanto, a variação da condutividade não foi significativa a ponto de alterar as características da solução e, conseqüentemente, da membrana formada.

Comparando-se estas membranas (figura 39) com as iniciais sem adição do fármaco (figura 28) observa-se um aumento no diâmetro médio da fibra de 0,36 μm para 0,41 μm , o que não se apresenta significativo, devido ao desvio observado em cada caso. Também, neste caso, não se observa prejuízo no aspecto da membrana que se manteve homogêneo e sem a presença de defeitos. Dessa forma, neste sistema, a adição do sulfato de Gentamicina não alterou as características do mesmo.

Com base nos resultados apresentados neste item, escolheu-se o sistema com 15% de CA em DMAc/Acetona/Água para preparação das membranas utilizadas nos

testes de liberação controlada. Este sistema apresentou-se estável, não tendo influências no processo de eletrofição relacionada a concentração do fármaco, apresentou diâmetro das nanofibras dentro do esperado menores que 500nm e membranas com boa formação e fácil manuseio.

4.2.2. Testes de Liberação Controlada de Sulfato de Gentamicina

Como já citado anteriormente para o teste de liberação controlada de sulfato de Gentamicina nas membranas de acetato de Celulose, escolheu-se a solução polimérica de 15% de CA em DMAc/Acetona/Água (32:63:5), utilizando-se como condições de processo 15kV de tensão aplicada, 10 cm de distância entre agulha e coletor e vazão de 1 ml/h. Definiu-se 50% como concentração desejada de fármaco na membrana (com base no CA), devido a limitações na análise de determinação quantitativa da gentamicina.

4.2.2.1. Construção da Curva de Calibração

Antes do início do teste de liberação controlada, foi necessário o desenvolvimento de um método de análise para determinação quantitativa do fármaco sulfato de Gentamicina. Reproduziu-se um método já estabelecido na literatura por Frutos et al.¹⁰³ A análise baseia-se em uma medida indireta através de determinação da absorbância em UV Vis conforme já citado anteriormente.

A curva de calibração obtida pode ser verificada na figura 40, onde nota-se uma relação linear da concentração de sulfato de Gentamicina com a absorbância na faixa de 5 a 100 µg/ml. A equação da reta obtida pode ser descrita como (Eq. 15):

$$[\text{Gent}] = 0,0038 * \text{Abs} + 0,0011 \quad (\text{Eq. 15})$$

Onde :

[Gent] = Concentração de sulfato de Gentamicina (%)

Abs= Absorbância

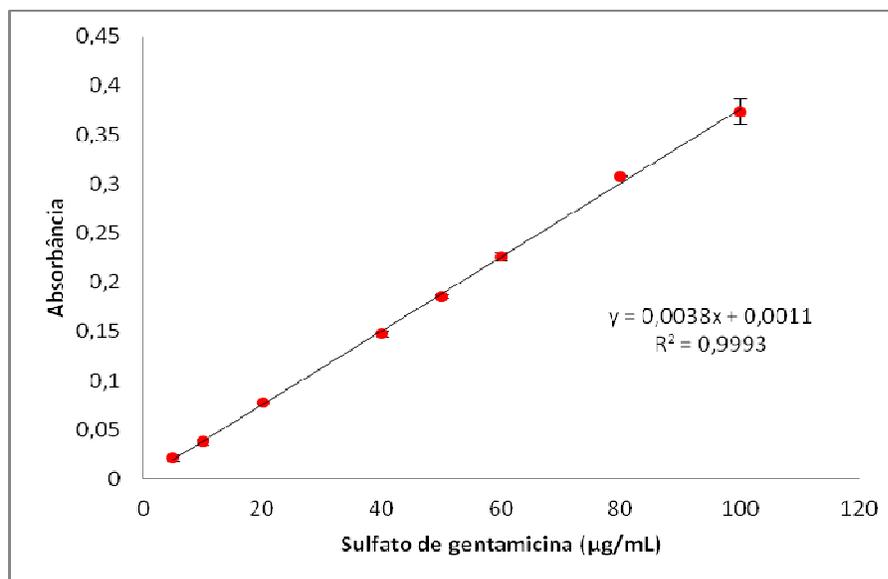


Figura 40: Curva de Calibração obtida por UV-Vis para o Sulfato de Gentamicina em solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,4.

Esta equação obtida foi utilizada para a determinação quantitativa do fármaco, no teste de liberação das membranas de nanofibras, como será visto nos próximos itens. O valor de R^2 obtido de 0,9993, para esta curva, nos indica que a equação pode ser utilizada com confiabilidade no teste de liberação dentro desta faixa de concentração.

4.2.2.2. Comparativo: membrana nanofibras versus membrana “casting”

A imagem da membrana de nanofibra de acetato de celulose com 50% de sulfato de gentamicina utilizada para o teste de liberação pode ser verificada na figura 41 e a imagem de MEV da mesma para pode ser verificada na figura 42. Esta membrana foi a utilizada em todos os testes de liberação controlada e resultante dos estudos anteriores para a determinação das melhores condições para obtenção das nanofibras. Pode se verificar que a mesma apresenta uma boa distribuição das nanofibras, sem a presença de defeitos e com valor de diâmetro dentro do desejável, cujo valor médio foi de 260 nm.



Figura 41: Membranas de nanofibra de acetato de celulose com 50 % de sulfato de Gentamicina

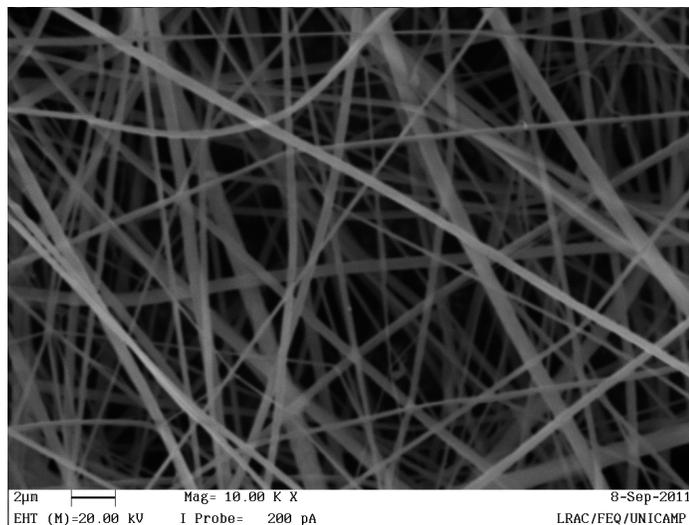


Figura 42: Membrana de nanofibras de Acetato de Celulose com incorporação de 50% de Sulfato de Gentamicina, aumento de 10000x.

Com o intuito de se analisar a influência do método de obtenção das membranas na liberação do fármaco foi realizado um teste de liberação comparativo entre a membrana de nanofibra e uma membrana “casting”. Na figura 43 pode ser verificado a membrana casting que foi utilizada no teste de liberação. A curva de liberação obtida para este caso pode ser verificado na figura 44.



Figura 43: Membranas “casting” de acetato de celulose com 50 % de sulfato de Gentamicina.

Pode-se verificar observando a figura 44 que não houve diferença no perfil de liberação entre a membrana de nanofibra eletrofiada e a membrana “casting”. Em ambos os casos podemos observar um efeito burst nas primeiras 2 horas, com uma liberação de aproximadamente 50% do total de fármaco adicionado à membrana. Provavelmente isto ocorreu por ser o fármaco altamente solúvel em água, o que facilitou sua migração da matriz para o meio aquoso.

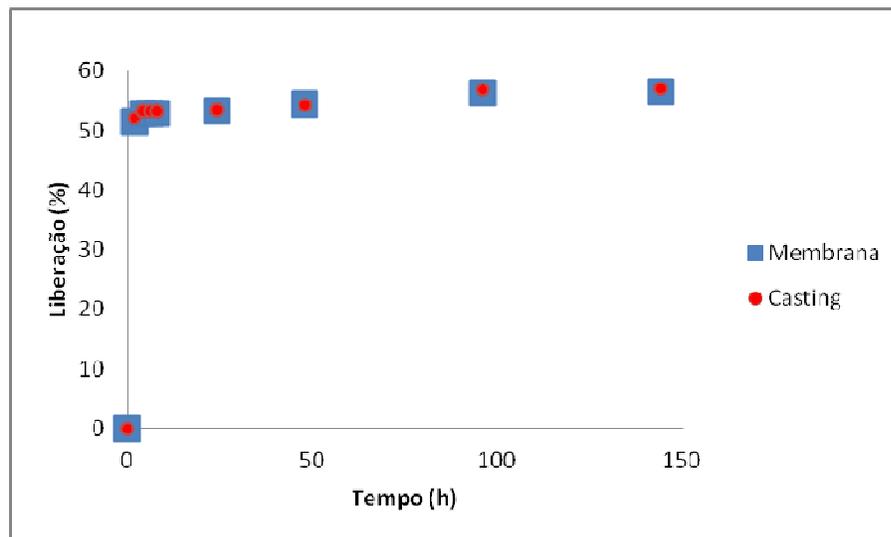


Figura 44: Curva de liberação para Sulfato de Gentamicina no teste comparativo entre membrana de nanofibra e membrana casting.

O comportamento semelhante nestes dois casos nos mostra que a difusão do fármaco foi independente do método de obtenção da membrana e de suas morfologias, por se tratar de uma molécula de baixo peso molecular e por não ter afinidade com a matriz. Assim, as características de liberação da droga ficam mais dependentes de quão bem o fármaco é encapsulado dentro da nanofibras resultante. Portanto, o efeito burst foi verificado nos dois casos, o que motivou a seqüência de estudos com membranas revestidas, como abordado no próximo item.

4.2.2.3. Teste de Liberação: Membranas nanofibras versus membranas revestidas

As membranas de nanofibras de acetato de celulose com fármaco sulfato de Gentamicina foram revestidas com 3 materiais, conforme já descrito no item 3.3.4, Eudragit® L100, HPMC e nanofibra sem fármaco. Imagens de MEV das membranas foram realizadas com o objetivo de verificar se as nanofibras não colapsaram e mantiveram-se na estrutura inicial, bem como verificar se o revestimento modificou a morfologia das membranas.

Na figura 45 pode ser verificado a imagem da membrana de nanofibra de acetato de celulose com 50 % de sulfato de Gentamicina, revestida com nanofibra que foi utilizada no teste de liberação.

Na figura 46 pode-se verificar a imagem da membrana revestida com HPMC e na figura 47 a imagem de MEV da mesma. Observa-se que a estrutura da fibra foi mantida, porém a membrana se mostrou mais compacta que aquela não revestida, como na figura 28.

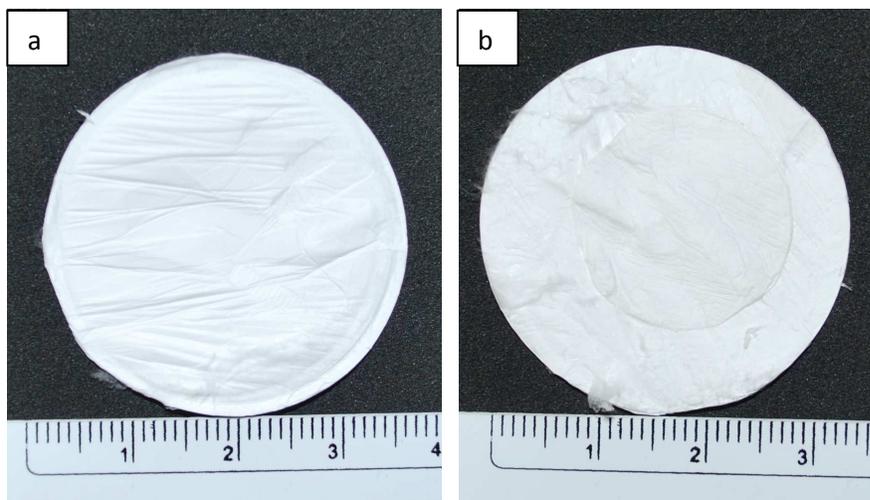


Figura 45: Membranas de nanofibras de acetato de celulose com 50 % de sulfato de Gentamicina revestidas com nanofibras sem fármaco, sendo: (a) membrana finalizada, (b) membrana parcialmente revestida.



Figura 46: Imagem da membranas de nanofibra de acetato de celulose com 50 % de sulfato de Gentamicina, revestida com HPMC.

O revestimento com Eudragit® L100, como visto na figura 48, apresentou um recobrimento espesso e completo da membrana, com a formação de uma camada homogênea na superfície da mesma. Entretanto, para surpresa as nanofibras não colapsaram como pode ser visto da figura 48(b). Um corte na membrana seguido de análise por MEV mostra a estrutura das nanofibras imersas na massa do revestimento

compacto. Na imagem da figura 49 podemos verificar a membrana revestida com Eudragit® L100 que foi utilizada para a imagem de MEV e neste teste de liberação.

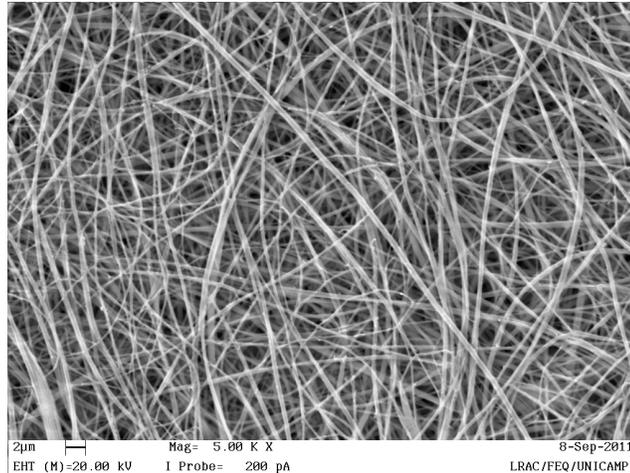


Figura 47: Membrana de CA com 50% de sulfato de gentamicina revestida com HPMC, aumento de 5000x .

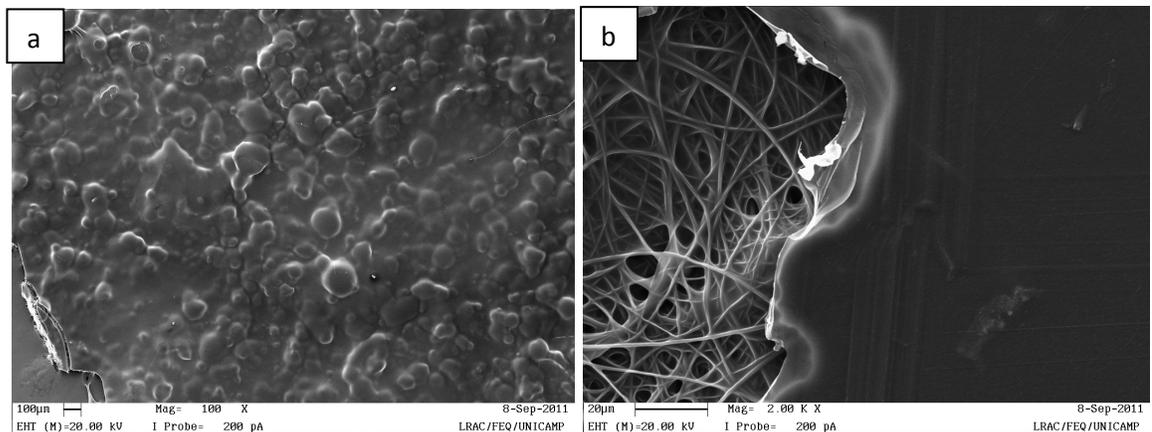


Figura 48: Imagem de MEV da membrana de Nanofibra de CA com 50% de Sulfato de Gentamicina revestida com Eudragit® L100. (a) Imagem da parte superior da membrana, aumento de 1000 vezes e (b) detalhe da parte inferior da membrana mostrando as nanofibras recobertas com a massa do revestimento, aumento de 2000 vezes.



Figura 49: Membranas de nanofibra de acetato de celulose com 50 % de sulfato de Gentamicina, revestida com Eudragit® L100.

A curva de liberação obtida neste teste comparativo pode ser verificada na figura 50.

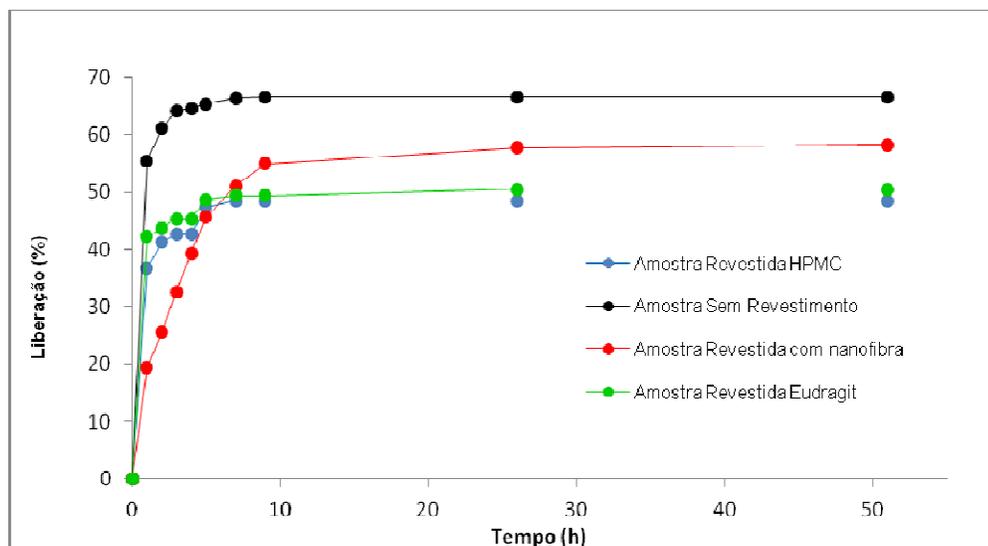


Figura 50: Resultado do teste de liberação de sulfato de gentamicina das membranas de nanofibras de CA, com e sem revestimentos.

Observando-se a figura 50 pode-se verificar que a membrana sem revestimento apresentou o maior efeito burst com liberação de aproximadamente 55% do total do fármaco na primeira hora do teste. As membranas revestidas com HPMC e com Eudragit® L100, apresentaram um efeito burst menor, com liberação de

aproximadamente 40% do fármaco na primeira hora do teste. Porém, para a membrana revestida com a própria nanofibra sem fármaco, na primeira hora do teste ocorreu a liberação de apenas 20% do total do fármaco. A liberação de 50% do total do fármaco ocorreu nas primeiras 10 horas, sendo que nas outras membranas este valor foi obtido no máximo nas 2 primeiras horas do testes. Este resultado, considerado excelente, mostrou que é possível reduzir o efeito burst, de acordo com o tipo de revestimento utilizado, abrindo uma oportunidade para se desenvolver dispositivos de liberação controlada programada para cada caso.

O melhor resultado obtido, provavelmente se deve, a boa barreira formada pela membrana de nanofibra sem fármaco, que atuou como um filtro físico, retardando a difusão das moléculas do fármaco para o meio. Este filtro apresentou-se mais eficiente que os demais revestimentos utilizados e foi o escolhido para a continuação desta pesquisa.

O HPMC é solúvel em água a 80°C e o teste foi realizado a 37°C, portanto a uma temperatura abaixo da sua completa solubilização, assim, essa solubilização parcial do HPMC foi responsável pela sua baixa eficiência. O retardo do efeito burst na primeira hora do teste (aproximadamente 10%) comparado a membrana sem revestimento, provavelmente se deve ao tempo de atuação do HPMC como revestimento, antes da sua completa solubilização.

O Eudragit® L100, por sua vez, apresenta dissolução em pHs acima de 6, e o teste foi conduzido em solução tampão fosfato pH=7,4. Este tipo de revestimento cobriu totalmente a membrana, como pode ser verificado na figura 49. Dessa forma, esperava-se que ele se apresentasse como um revestimento eficiente. Entretanto a barreira física do revestimento foi solubilizada rapidamente pelo pH da solução no qual o teste foi realizado (pH 7,4), o que justificaria um efeito semelhante ao obtido com o HPMC, já que os valores de liberação na primeira hora são muito próximos, sendo a do Eudragit® L100 um pouco menor, provavelmente pela espessura maior do revestimento comparado com HPMC. Esperava-se uma dissolução mais lenta do revestimento retardando a liberação do fármaco.

A membrana revestida com nanofibra apresenta-se, como um material de grande flexibilidade quanto ao tempo de retenção do fármaco. Provavelmente, será possível controlar o tempo de liberação do mesmo, pela espessura da camada de nanofibra do revestimento. Com isso, dependendo do tempo de atuação desejado para o fármaco, podemos modular a membrana para o fim desejado.

4.2.3. Análise Microbiológica

Para confirmar a ação do fármaco na membrana, e garantir que o processo de eletrofiação não inibiu a eficácia do mesmo foi realizado um teste utilizando-se uma bactéria gram-positiva, uma gram-negativa e um fungo.

Os resultados obtidos para a inibição do crescimento das bactérias podem ser verificados nas figuras 51, 52 e 53, para a *S aureus*, *E. Coli* e *C. Albicans*, respectivamente. Nas figuras 51 e 52 pode-se verificar o halo de inibição formado. Como era de se esperar para a *C. albicans*, figura 53, o resultado foi negativo não ocorrendo a formação do halo de inibição, pois o sulfato de Gentamicina não apresenta ação antifúngica e sim bactericida.

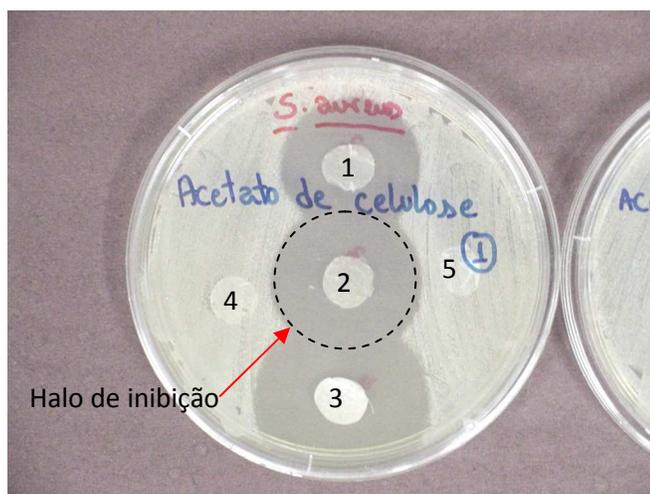


Figura 51: Halo de inibição *S Aureus*, nas membranas de nanofibras de CA incorporadas com 10% (1), 25% (2) e 50% de Sulfato de Gentamicina(3) comparadas com controle (nanofibra sem fármaco) (4 e 5).

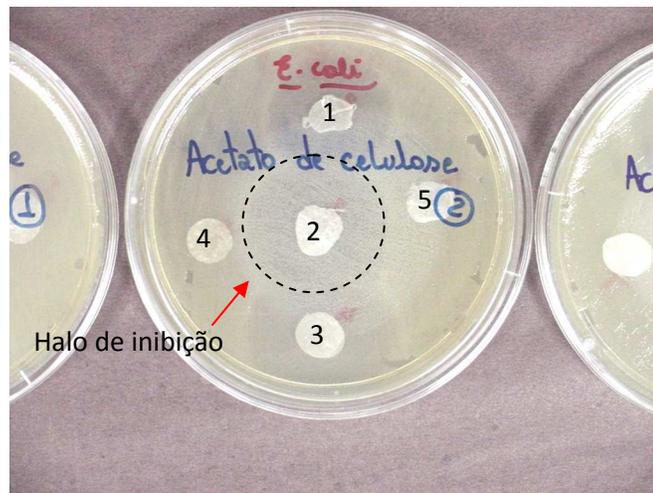


Figura 52: Halo de inibição *E. Coli*, nas membranas de nanofibras de CA incorporadas com 10% (1), 25% (2) e 50% de Sulfato de Gentamicina(3) comparadas com controle (nanofibra sem fármaco) (4 e 5).



Figura 53: Halo de inibição *C. Albicans*, nas membranas de nanofibras de CA incorporadas com 10% (1), 25% (2) e 50% de Sulfato de Gentamicina(3) comparadas com controle (nanofibra sem fármaco) (4 e 5).

O halo de inibição para bactéria *S. aureus* é mais evidente que o verificado para a bactéria *E. coli*. Esta característica é devido ao sulfato de gentamicina apresentar uma característica bactericida para o *S. aureus* que é uma bactéria gram-positiva, assim o fármaco apresentou um efeito letal para a bactéria. No caso da bactéria *E. coli*

(gram-negativa) o sulfato de gentamicina apresentou uma ação bacteriostática apenas inibindo seu crescimento e sua duplicação mas não provoca a sua destruição.

A célula de uma bactéria gram-positiva é circundada pela parede celular onde se encontra o peptidoglicano. O peptidoglicano é formado por cadeias dissacarídicas, ligadas entre si através de pontes peptídicas. Internamente à parede celular existe a membrana plasmática formada por dupla camada de fosfolipídios e proteína, onde toda a energia da célula é produzida¹¹², verificar em Anexos a estrutura da parede celular de uma bactéria gram-positiva.

A célula de uma bactéria gram-negativa além de apresentar as estruturas da gram-positiva, possui uma membrana externa à parede celular com dupla camada de lipídios, contendo proteína, semelhante à membrana plasmática, possuindo também polissacarídeos que diferem nas diferentes cepas de bactérias. Entre a membrana externa e a membrana plasmática existe o espaço periplasmático que contém enzimas e outros componentes¹¹², verificar em Anexos a estrutura da parede celular de uma bactéria gram-negativa.

Portanto, a complexidade da membrana externa da bactéria gram-negativa também dificulta a penetração de antibióticos, sendo que alguns destes são menos ativos contra gram-negativos do que contra gram-positivos, o que explica a diferença na ação bactericida e bacteriostática do Sulfato de Gentamicina para as duas bactérias testadas.

Tabela 16 - Tamanho do halo de inibição nos testes anti-microbianos em função da concentração de Fármaco.

Quantidade Fármaco na membrana	Tamanho médio do Halo de Inibição (mm)	
	S. Aureus	E. Coli
10% Gentamicina	29,38	20,26
25% Gentamicina	30,96	23,07
50% Gentamicina	34,48	25,17

Pode se verificar visualmente nas figuras 51 e 52, e também na tabela 16, um aumento no diâmetro do halo de inibição com o aumento da concentração de sulfato de Gentamicina na membrana, indicando o aumento da eficiência da membrana com o aumento da concentração do fármaco.

Com base nos resultados obtidos, pode-se verificar que as membranas de CA, incorporadas com o fármaco sulfato de Gentamicina, apresentaram a ação antibacteriana esperada. O processo de eletrofição não influenciou na forma de atuação do fármaco, já que o mesmo manteve-se eficaz após ter sido submetido à altas voltagens utilizadas no processo.

5. CONCLUSÕES

- Em todas as condições de processamento e sistemas de solventes testados foi possível obter-se fibras como mostram as imagens de MEV, porém com diferentes diâmetros e estruturas.
- Nas membranas sem incorporação do fármaco, verificou-se que os menores diâmetros da fibra e os melhores aspectos da membrana nanoestruturada foram obtidos com as soluções de DMAc/Acetona (1:2) e DMAc/Acetona/Água (32:63:5).
- As mesmas apresentaram condutividades mais baixas, indicando que para a faixa de parâmetros estudado, uma menor condutividade proporcionou melhores resultados quanto ao diâmetro da fibra e ao aspecto das membranas.
- A tensão superficial e a viscosidade não se mostraram significativas nestes resultados, comparando-se sistemas diferentes.
- A concentração das soluções se mostrou muito significativa em comparação aos demais fatores estudados, dentro de cada sistema de solvente. Em alguns casos a extrapolação dos resultados para valores fora do estudado foi possível, com a obtenção de melhores resultados.
- Estudo reológico realizado tornou possível observar que as soluções que apresentaram melhor formação de membrana dentro da faixa trabalhada, foram as que mostraram viscosidades menores e perfil mais próximo do Newtoniano. Os testes de Citotoxicidade mostraram que as membranas produzidas apresentam-se biocompatíveis podendo ser utilizados na área da saúde como membranas intra e extracorpóreas.
- Para as membranas com incorporação do fármaco, a solução de 15% de CA em DMAc/Acetona/Água eletrofiadas com vazão de 1ml/h, 15 kV e 10 cm de distância entre agulha e coletor, apresentou-se como um sistema estável. Neste sistema a concentração do sulfato de Gentamicina não influenciou no processo de

eletrofiação produzindo membranas com boa homogeneidade e diâmetro das nanofibras menores que 500nm como desejado.

- O processo de eletrofiação não inibiu a eficácia do fármaco, conforme comprovado no teste antimicrobiano, ocorrendo a formação do halo de inibição tanto na bactéria gram-positiva como na gram-negativa.
- No teste de liberação controlada do fármaco após 10 horas de teste, as membranas revestidas com nanofibras apresentaram-se mais eficazes do que os demais revestimentos testados, reduzindo o efeito burst na primeira hora, de 50% para 20% de liberação do fármaco.

Com este estudo, pode-se obter um conhecimento completo do funcionamento de cada sistema de solvente, na eletrofiação de membranas nanoestruturadas de Acetato de Celulose; e dependendo do fármaco o qual se deseja incorporar na membrana, será possível escolher o sistema de solvente mais adequado quanto a solubilidade e a interação química e quanto a estrutura da membrana desejada.

O material final obtido neste trabalho apresenta-se eficaz como agente liberador de Sulfato de Gentamicina, podendo ser modulado conforme a necessidade da aplicação. Várias concentrações do fármaco podem ser utilizadas e o tempo de liberação do mesmo pode ser variado dependendo da espessura do revestimento de nanofibra utilizado.

6. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

- Fazer estudo comparativo das características das soluções com e sem Sulfato de Gentamicina.
- Verificar relação entre a espessura do recobrimento de nanofibra na membrana com fármaco e o perfil de liberação do mesmo.
- Desenvolver membrana com concentração ideal de Sulfato de Gentamicina para aplicação tópica.
- Realizar teste *in vivo* da eficácia da membrana no tratamento de lesões de pele.
- Realizar incorporação de outros ativos na membrana de acetato de celulose.

7. TRABALHOS PUBLICADOS

- “Nanostructured membranes based on cellulose acetate obtained by electrospinning. Part I – Study of the best solvents and conditions by design of experiments”, Journal of Applied Polymer Science. Aprovado, no prelo.
- “Electrospinning preparation of cellulose nanostructured membranes for controlled release of drugs used to treat skin wounds”, Abstracts of Papers, 241st ACS National Meeting & Exposition, Anaheim, CA, United States, March 27-31, 2011 , CELL-98, Publicado
- “Nanostructured membranes based on cellulose acetate obtained by electrospinning. Part II - Study of the controlled release profile and the microbiological behaviour”, Submetido, Journal of Nanoscience and Nanotechnology.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ramakrishna,S.; Fujihara, K.; Teo,W. ; Lim,T.; Ma,Z. “An Introduction to Electrospinning and Nanofibers” , World Scientific, Singapore, 2005.
2. Schiffman, J.; Schauer, C. “A Review: Electrospinning of Biopolymer Nanofibers and their Application”, *Polymer Reviews* 2008, 48, 317-352.
3. Du, J.; Hsieh, Y. “Cellulose/chitosan hybrid nanofibers from electrospinning of their ester derivatives”, *Cellulose* 2009, 19, 247-260.
4. Vondran, J. L.; Sun, W.; Schauer, C. L. “Crosslinked, electrospun chitosan-poly(ethylene oxide) nanofiber mats”, *J. Appl. Polym. Sci.* 2008 , 109, 968-975.
5. Kenawy, E.; Bowlin, G. L.; Mansfield, K.; Layman, J.; Simpson, D. G.; Sanders, E. H.; Wnek, G. E. “Release of tetracycline hydrochloride from electrospun poly(ethylene-co-vinylacetate), poly(lactic acid), and a blend”, *J. Control Release* 2002, 81, 57-64.
6. Ramaseshan, R.; Sundarrajan, S; Jose, R.; Ramakrishna, S. “Nanostructured ceramics by electrospinning”, *Journal of Applied Physics* 2007, 102(11), 111101/1-111101/17
7. Ramakrishna, S.; Fujihara, K.; Teo, W.; Yong, T.; Ma, Z., Ramashesan, R. “Electrospun nanofibers: solving global issues”, *Mater. Today* 2006, 9, 3.
8. Uyar, T.; Havelund, R. ; Hacaloglu, J. ; Zhou, X. ; Basenbacher, F. ; Kingshott, P. “ The formation and characterization of cyclodextrin functionalized polystyrene nanofibers produced by electrospinning”, *Nanotechnology* 2009, 20(12), 125605/1-125605/14.

9. McCreery, M. J. "Topical Skin Protectants", US Patent 5, 607, 979, 1997.
10. Speck, J. C., Polychloro-7,8-Disubstituted-2,5-Di-imino Glycoluril for use as an anti-vesicant, U.S. Patent 2, 885, 305, 1959.
11. Choi, S. W.; Jo, S. M.; Lee, W. S.; Kim, Y. "An electrospun poly(vinylidene fluoride) nanofibrous membrane and its battery applications", *Advanced Materials* 2003, 15(23), 2027-2032
12. Ji, L. ; Zhang, Xi. "Fabrication of porous carbon nanofibers and their application as anode materials for rechargeable lithium-ion batteries", *Nanotechnology* 2009, 20, 155705(7).
13. Venugopal, J.; Ramakrishna, S. "Application of Polymer Nanofibers in Biomedicine and biotechnology", *Appl. Biochem. Biotech.* 2005, 125, 147-157
14. Corey, J. M.; Gertz, C.C.; Wang, B.; Birrell, L. K.; Johnson, S. L.; Martin, D. C.; Feldman, E. L. "The design of electrospun PLLA nanofiber scaffolds compatible with serum-free growth of primary motor and sensory neurons", *Acta Biomaterialia* 2008, 4, 863-875.
15. Fertala, A.; Han, W. B.; Ko, F. K. "Mapping critical sites in collagen II for rational design of gene-engineered proteins for cell-supporting materials", *J. Biomed. Mater. Res.* 2001, 57, 48-58.
16. Huang, L.; McMillan, R.A.; Apkarian, R. P.; Pourdeyhimi, B.; Conticello, V. P.; Chaikof, E. L. "Generation of synthetic elastin-mimetic small diameter fibers and fiber networks", *Macromolecules* 2000, 33(8), 2989-2997.
17. Spasova, M.; Stoilova, O.; Manolova, N.; Rashkov, I. "Preparation of PLLA/PEG nanofiber by electrospinning and potencial application", *J. Bioact. Compat. Polym.* 2007, 22, 62-76.

18. Tungprapa, S.; Jangchud, I.; Supaphol, P. "Release characteristics of four model drugs from drug-loaded electrospun cellulose acetate fiber mats", *Polymer* 2007, 48, 5030-5041.
19. Zeng, J.; Xu, X.; Chen, X.; Liang, Q.; Bian, X.; Yang, L.; Jing, X. " Biodegradable electrospun fibers for drug delivery", *J. Control. Release* 2003, 92, 227-231.
20. Verreck, G.; Chun, I.; Rosenblatt, J.; Peeters, J.; Dijck, A. V.; Mensch, J.; Noppe, M.; Brewster, M. E. " Incorporation of drugs in an amorphous state into electrospun nanofibers composed of a water-insoluble, nonbiodegradable polymer", *J. Control. Release* 2003, 92, 349-360.
21. Taepaiboon, P.; Rungsardthong, U.; Supaphol, P. "Vitamin-loaded electrospun cellulose acetate nanofiber mats as transdermal and dermal therapeutic agents of vitamin A acid and vitamin E", *Eur. J. Pharm Biopharm .* 2007, 67, 387-397.
22. Inanç, B. ; Arslan, Y. E.; Seker, S.; Elçin, A. E.; Elçin, Y.M. "Periodontal ligament cellular structures engineered with electrospun poly(DL-lactide-co-glycolide) nanofibrous membrane scaffolds", *J. Biom. Mat. Research. Part A* 2009, 90(1), 186-195.
23. Wang, X.; Drew, C.; Lee, S. H.; Senecal, K. J.; Kumar, J.; Samuelson, L. A. "Electrospun nanofibrous membranes for highly sensitive optical sensors", *Nano Letters* 2002, 11, 1273-1275.
24. Gouma, P. I. "Nanostructured polymorphic oxides for advanced chemosensors", *Rev. Adv. Matr. Sci.* 2003, 5, 147-154.
25. Gibson, P.; Gibson, H. S.; Rivin, D. "Transport properties of porous membranes based on electrospun nanofibers, *Colloid Surf. A : Physichem. Eng. Aspect* 2001, 187/188, 469-481.

26. Reneker, D.H.; Chun, I. "Nanometer diameter fibers of polymer produced by electrospinning", *Nanotechnology* 1996, 7, 216-223.
27. Li, D.; Xia, Y. "Electrospinning of nanofibers, reinventing the wheel ?", *Advanced Material* 2004, 16, 1151-1170.
28. John, M. J.; Thomas, S. " Biofibres and biocomposites", *Carbohydrate Polym.* 2008, 71, 342-364.
29. Matthews, J. A.; Wnek, G. E.; Simpson, D. G.; Bowlin, G. L. "Electro spinning of collagen nanofibers", *Biomacromolecules* 2002, 3, 232-238.
30. Chen, H.; Jao, W; Yang, M. "Characterization of gelatin nanofibers electrospun using ethanol/formic acid/water as solvent", *Polym. Adv. Technol.* 2009, 20, 98-103.
31. Wnek, G. E.; Carr, M. E.; Simpson, D. G.; Bowlin, G. L. "Electrospinning of nanofibers fibrinogen structures", *Nano Letters* 2003, 3, 213-216.
32. Jin, H. J.; Fridrikh, S. V.; Rutledge, G. C.; Kaplan, D. L. "Electrospinning bombyx mori silk with poly(ethylene oxide)", *Biomacromolecules* 2002, 3, 1233-1239.
33. Kim, C.; Kim, D.; Kang, S.; Marquez, M.; Joo, Y. L. "Structural studies of electrospun cellulose nanofibers", *Polymer* 2006, 47, 5097-5107.
34. Frey, M. W. "Electrospinning cellulose and cellulose derivatives", *Polym. Review* 2008, 48, 378-391.
35. Frenot, A.; Henriksson, M. W.; Walkenstrom, P. "Electrospinning of cellulose-based nanofibers", *J. Applied Polym. Sci.* 2007, 103, 1473-1482.
36. Son, W. K.; Youk, J. H.; Park, W. H. "Antimicrobial cellulose acetate nanofibers containing silver nanoparticle", *Carbohydrate Polym.* 2006, 65, 430-434.
37. Han, S. H.; Youk, J. H.; Min, K. D.; Kang, Y. O.; Park, W. H. "Electrospinning of cellulose acetate nanofibers using a mixed solvent of acetic acid/water: Effects of solvent composition on the fiber diameter", *Materials Letters* 2008, 62, 759-762.

38. Park, K. E.; Jung, S. Y.; Lee, S. J.; Min, B.; Park, W. H. "Biomimetic nanofibrous scaffolds: Preparation and characterization of chitin/silk fibroin blend nanofibers", *Int. J. Biol. Macromol.* 2006, 38, 165-173.
39. Kriegel, C.; Kit, K. M.; McClements, D. J.; Weiss, J. "Electrospinning of chitosan-poly(ethylene oxide) blend nanofibers in the presence of micellar surfactant solution" *Polymer* 2009, 50, 189-200.
40. Moon, S; Farris, R. "Electrospinning of heated gelatin-sodium alginate-water solution", *Polym. Eng. Sci.* 2009, 49(8),1616-1620.
41. Okamoto, A.; Chu, B. "Electro-spinning and electro-blowing of hyaluronic acid", *Biomacromolecules* 2004,5,1428-1436.
42. Jiang, H.; Fang, D.; Hsiao, B. S.; Chu, B.; Chen, W. "Optimization and characterization of dextran membranes prepared by electro spinning", *Biomacromolecules* 2004, 5, 326-333.
43. Campos, M. G. N. "Desenvolvimento e caracterização de membranas de quitosana para recobrimento de feridas e liberação controlada de fármacos", 2007, Tese (Doutorado), faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
44. Frenot, A.; Chronakis, I. "Polymer nanofibers assembled by electrospinning", *Curr. Opin. Colloid Inter. Sci.* 2003, 8, 64-75.
45. Uyar, T.; Besenbacher, F. "Electrospinning of cyclodextrin functionalized polyethylene oxide (PEO)", *Eur. Polym. J.* 2009, 45, 1032-1037.
46. Li, L.; Bellan, L.M.; Craighead, H.G.; Frey, M.W. "Formation and properties of nylon-6 and nylon-6/montmorillonite composite nanofibers", *Polymer* 2006, 47, 6208-6217.
47. Yao, C.; Li, X.; Song, T.; Li, Y.; Pu, Y. "Biodegradable nanofibrous membrane of zein/silk fibroin by electrospinning", *Polym. Int.* 2009, 58, 396-402.

48. Takahashi, T.; Taniguchi, M.; Kawai, T. "Fabrication of DNA nanofibers on a planar surface by electrospinning", *Jpn. J. Appl. Phys., Part 1* 2005, 44, L860-L862.
49. Liu, Y.; Chen, J.; Misoska, V.; Wallace, G. G. "Preparation of novel ultrafine fibers based on DNA and poly(ethylene oxide) by electrospinning from aqueous solutions", *React. Funct. Polym.* 2007, 67, 461-467
50. Wannatong, L.; Sirivat, A.; Supaphol, P. "Effects of solvents on electrospinning polymeric fibers: Preliminary study on polystyrene", *Polym. Int.* 2004, 53, 1851-1859.
51. Kenawy, E. R.; Layman, J. M.; Watkins, J. R.; Bowlin, G. L.; Matthews, J. A.; Simpson, D. G.; Wnek, G. E. "Electrospinning of poly(ethylene-co-vinyl alcohol) fibers", *Biomaterials* 2003, 24, 907-913.
52. Inai, R.; Kotaki, M.; Ramakrishna, S. "Structure and properties of electrospun PLLA single nanofibres", *Nanotechnology* 2005, 16, 208-213.
53. Huang, Z.; Zhang, Y.; Kotaki, M.; Ramakrishna, S. "A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites", *Comp. Sci. Technol.* 2003, 63, 2223-2253.
54. Gensheimer, M.; Becker, M.; Brandis-Heep, A.; Wendorff, J. H.; Thauer, R. K.; Greiner, A. "Novel Biohybrid materials by electrospinning: Nanofibers of Poly(ethylene oxide) and Living Bacteria", *Advanced Materials* 2007, 19, 2480-2482.
55. Youkb, J.; Leec, T. S.; Parkc, W. H. Sona, W. K. "The effects of solution properties and polyelectrolyte on electrospinning of ultrafine poly(ethylene oxide) fibers", *Polymer* 2004, 45, 2959-2966
56. Buchanan, C. M.; Gedon, S.C.; White, A.L.; Wood, M.D. " Cellulose acetate proprionate and poly(tetramethylene glutarate) blends", *Macromolecules* 1993, 26 (11), 2963-2967

57. Oliveira Jr, A. R. "Obtenção e caracterização de acetato de celulose modificado com organosilano", 2002, 74 f, Tese (Mestrado), Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
58. Appaw, C. "Rheology and microstructure of cellulose acetate in mixed solvent systems", 2004, 209f, Tese (Doutorado), Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Graduate Faculty of North Carolina State University, North Carolina
59. Shuiping, L.; Lianjiang, T.; Weili, H.; Xiaoqiang, L.; Yanmo, C. "Cellulose acetate nanofibers with photochromic property: Fabrication and characterization", *Materials Letters* 2010, 64, 2427–2430
60. Kulpinsk, P. "Cellulose nanofibers prepared by the N-methylmorpholine-N-oxide method", *J. Appl. Polym. Sci.* 2005, 98 (4), 1855-1859.
61. Liu, H.; Hsieh, Y."Surface methacrylation and graft copolymerization of ultrafine cellulose acetate fibers", *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.* 2003, 41, 953-964
62. Ma, Z.; Kotaki, M.; Ramakrishna, S. "Electrospun cellulose nanofiber as affinity membrane", *J. Membr. Sci.* 2005, 265, 115-123
63. Frenot, A.; Henriksson, M. W.; Walkenstrom, P. "Electrospinning of submicron-scale, electrospun cellulose fibers via direct dissolution", *J. Polym. Sci.* 2007, 103 (3), 1473-1482
64. . Xu, S.; Zhang, J.; He, A.; Li, J.; Zhang, H.; Han, C.C. "Electrospinning of native cellulose from nonvolatile solvent system", *Polymer* 2008, 2911-2917
65. Jaeger, R.; Bergshoef, M. M.; Batlle, C. M.; Schoenherr, H.; Vansco, G. J. "Electrospinning of ultra thin polymer fibers", *Macromol. Symp.* 1998, 127, 141-150.
66. Liu, H.; Hsieh, Y. L. "Ultrafine fibrous cellulose membranes from electrospinning of cellulose acetate", *J. Polym. Sci., Part B, Polym. Phys.* 2002, 40, 2119-2129.

67. Son, W. K.; Youk, J. H.; Lee, T. S.; Park, W. H. "Electrospinning of ultrafine cellulose acetate fibers: Studies of a new solvent system and deacetylation of ultrafine cellulose acetate fibers", *J. Polym. Sci., Part B, Polym. Phys.* 2004, 42, 5-11.
68. Wang, H., Qin, X., Cao, J. "Study on Structures of Electrospinning Cellulose Acetate nanofibers", *Advanced Materials Research* 2011, 175-176, 242-246.
69. Greish, Y., E.; Meetani, M. A.; Matroushi, E. A.; Shamsi, B. A. "Effects of thermal and chemical treatments on the structural stability of cellulose acetate nanofibers", *Carbohydrate Polymers* 2010, 82 569–577
70. Sivakumar, M.; Rao, K. P. "Preparation, characterization and in vitro release of gentamicin from coralline hydroxyapatite-gelatin composite microspheres", *Biomaterials* 2002, 23, 3175-3181.
71. Park, H., Park, K. "Polymers in Pharmaceutical Products In: Polymer of Biological and Biomedical Significance", Washington, American Chemical Society, 1993, 540, 1, 3-15.
72. Huang, Z.; He, C.; Yang, A.; Zhang, Y.; Han, X.; Yin, J.; Wu, Q. "Encapsulating drugs in biodegradable ultrafine fibers through co-axial electrospinning", *J. Biomed Mater. Res A* 2006, 77, 1, 169-179.
73. Zong, X. H.; Kim, K.; Benjamin, C. "Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes", *Polymer* 2002, 43, 4403.
74. Cao, S.; Hu, B.; Liu, H. "Synthesis of pH-responsive crosslinked poly[styrene-co-(maleic sodium anhydride)] and cellulose composite hydrogel nanofibers by electrospinning", *Polym. Int.* 2009, 58, 545-551.
75. Suwanton, O.; Ruktanonchai, U. Supaphol, P. "Electrospun cellulose acetate fiber mats containing asiaticoside or Centella Asiatica crude extract and the release characteristics of asiaticoside", *Polymer* 2008, 49, 4239-4247.

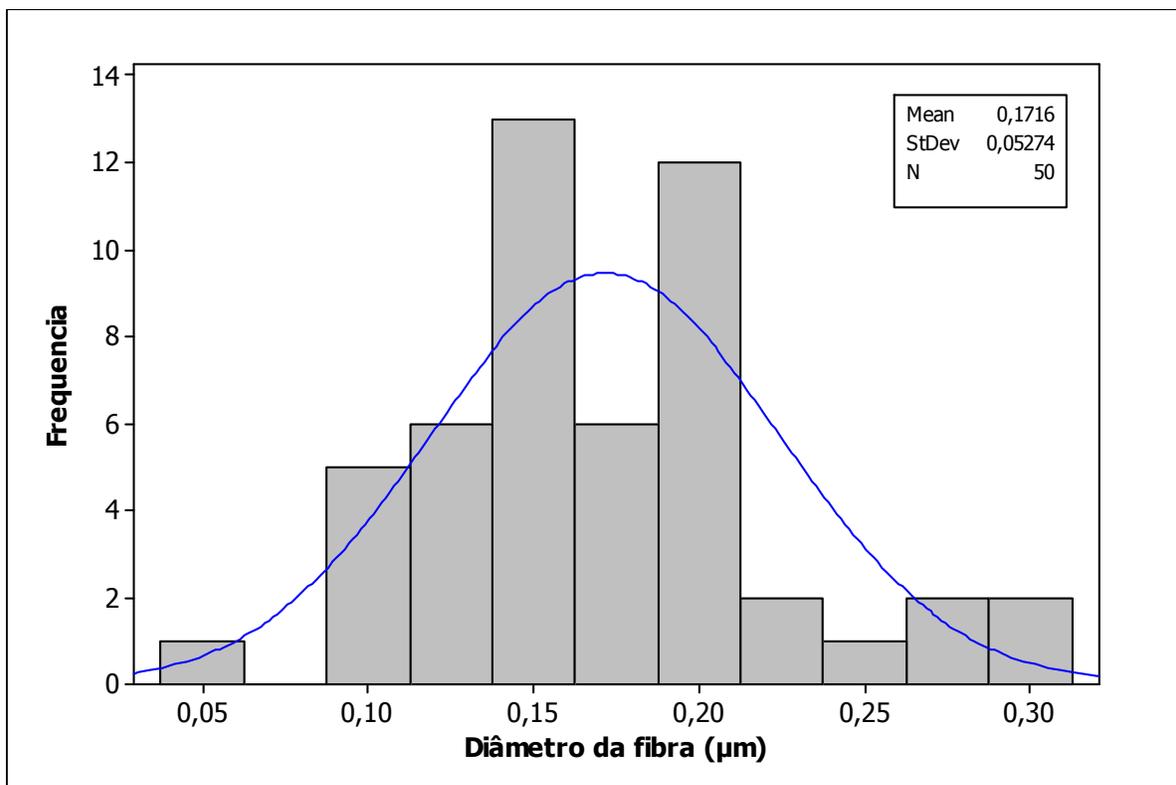
76. Ignatova, M.; Manolova, N.; Markova, N.; Rashkov, I. "Electrospun non-woven nanofibrous hybrid mats based on chitosan and PLA for wound-dressing application", *Macromol. Biosci.* 2009, 9, 102-111.
77. Rodrigues Filho, G.; Toledo, L. C.; Silva, L. G.; Assunção, R. M. N.; Meireles, C. S.; Cerqueira, D. A.; Ruggiero, R. "Membranes of cellulose triacetate produced from sugarcane bagasse cellulose as alternative matrices for doxycycline incorporation", *J. Appl. Polym. Sci.* 2009, 113, 3544-3549.
78. Katti, D. S.; Robinson, K. W.; Ko, F. K.; Laurencin, C. T. "Bioresorbable nano-based systems for wound healing and drug delivery: Optimization of fabrication parameters", *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2004; 70B, 286 –296
79. Benício, B.N.; Scarminio, I.S.; Bruns, R.E., "Como fazer experimentos", Editora da Unicamp, Campinas, 2001.
80. Schramm, G., "Reologia e Reometria, Fundamentos Teóricos e Práticos", 2Ed., São Paulo, Artliber, 2006.
81. Canevarolo, S. V., "Ciência dos Polímeros", 2ª Ed, São Paulo, Artliber, 2006.
82. Bretas, R. E. S., D'Àvila, M.A., "Reologia de Polímeros Fundidos, São Carlos, SP, Brasil, EduFSCar, 2000.
83. Steffe, J. F. "Rheological Methods in Food process Engineering", 2ª Ed., East Lansing, Michigan State, USA, Freeman Press, 1992.
84. Clegg, D.W.; Collyer, A.A., "Rheological Measurement", 2Ed, London, Chapman & Hall, 1998.
85. Macosko, C. W., "Rheology Principles, Measurements and Applications", USA, Wiley-VCH, 1994.
86. Lenk, R.S., "Polymer Rheology", London, Applied Science Publishers Ltda, 1978.

87. Bueche, F., "Physical properties of Polymers", London, Interscience Publishers, 1962.
88. Atkins, P.W., "Physical Chemistry", 5Ed, Oxford, Oxford University Press, 1994
89. Birdi, K.S., "Handbook of Surface and Colloid Chemistry", New York, CRC Press, 1997.
90. Evans, F., Wennerström, H., "The Colloidal Domain – Where Physics, Chemistry, Biology, and Technology Meet", New York, Wiley-VCH, 1994.
91. Tang, T. H.; Li, J.; Ekstrand, J.; Liu, Y. "Cytotoxicity tests of in situ polymerized resins: Methodological comparisons and introduction of a tissue culture insert as a testing device", *J Biomed Mater Res A* 1999, 45, 3, 214-222.
92. Rogero, S. O.; Lugão, A. B.; Ikeda, T. I.; Cruz, A. S. "Teste in vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias", *Mater. Res* 2003, 6, 3, 317-320,
93. Cao, T.; Saw, T. Y.; Heng, B. C.; Liu, H.; Yap, A. U. J.; Ng, M. L. "Comparison of different test models for the assessment of cytotoxicity of composite resins", *J. Appl. Toxicol.* 2005; 25: 101–108
94. Gornukhima, O. V.; Vershinina, I. A.; Golubchicov, O. A. "Surface modification of polypropylene by gentamicin", *Russ. J. Appl. Chem.* 2009, 82, 4, 683-687.
95. Xiao, J.; Zhu, Y.; Liu, Y.; Zeng, Y.; Xu, F. "A composite coating of calcium alginate and gelatin particles on Ti₆Al₄V implant for the delivery of water soluble drug", *J. Biom. Mat. Appl. Part B* 2009, 89 B(2), 543-550.
96. Belcarz, A.; Ginalska, G.; Zalewska, J.; Rzeski, W.; Slosarczyk, A.; Kowalczyk, D.; Godlewski, P.; Niedzwiadek, J. "Covalent coating of hydroxyapatite by keratin stabilizes gentamicin release", *J. Biom. Mat. Research Part B* 2009, 89B(1), 102-113.

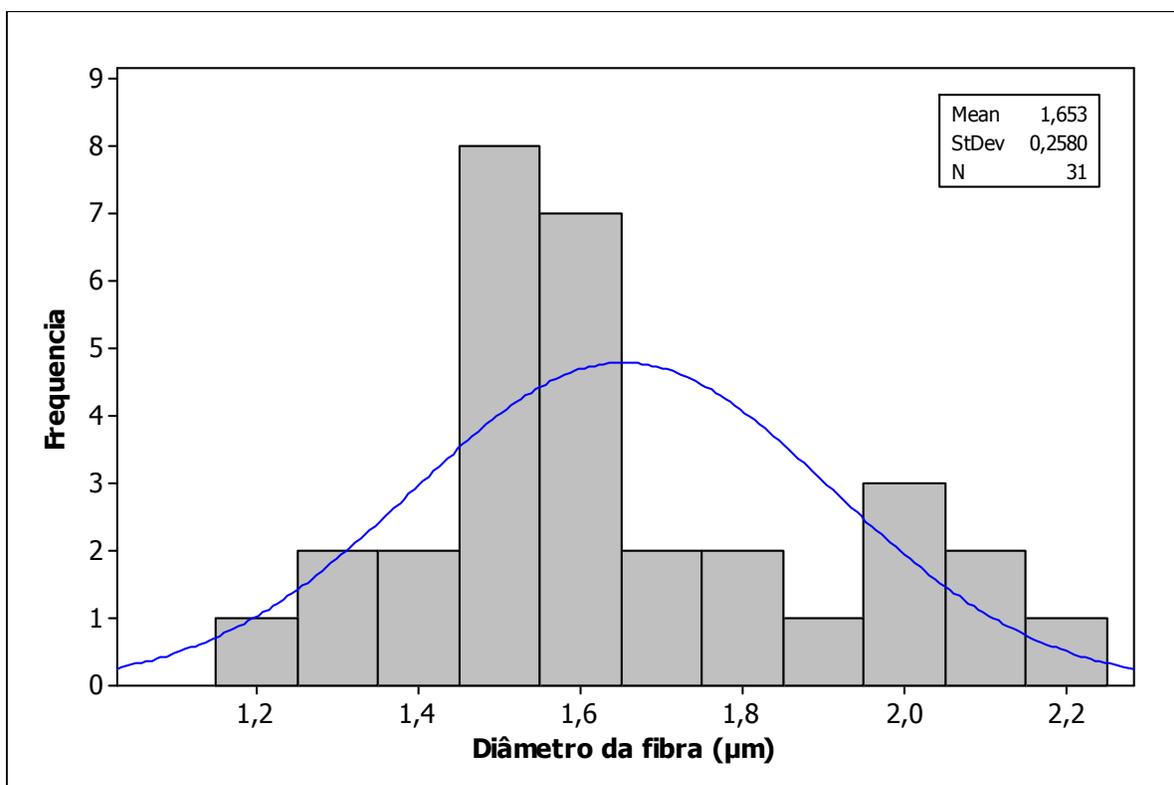
97. Campos, M. G. N.; Rawls, H. R.; Innocentini-Mei, L. H.; Satsangi, N. "In vitro gentamicin sustained and controlled release from chitosan cross-linked films", *J. Mater. Sci. Mater. Med* 2009, 20, 537-542
98. Sec. Saúde Prefeitura Municipal de Ribeirão Preto, "Manual Assistência Integral as pessoas com Feridas Crônicas", 2004, Ribeirão Preto.
99. Dealey, C. "Cuidando de feridas: um guia para enfermeiras", São Paulo: Atheneu, 1996.
100. Chen, C.; Wang, L.; Huang, Y. "Electrospinning of thermo-regulating ultrafine fibers based on polyethyleneglycol/cellulose acetate composite", *Polymer* 2007, 48, 5202-5207.
101. Changeza, M.; Burugapallia, K.; Koula, V.; Choudharyc, V. "The effect of composition of poly(acrylic acid)-gelatin hydrogel on gentamicin sulphate release: in vitro", *Biomaterials* 2003, 24, 527-536.
102. Hawley, G. G. "The Condensed Chemical Dictionary", 8 ed., New York, Van Nostrand Reinhold Company, 1971
103. Barton, A. F. M. "Handbook of Solubility Parameters and other Cohesion Parameters", 4 ed., Boca Raton-Flórida, CRC Press, 1988.
104. Windholz, M. "The Index Merck", 10 ed., USA, Merck & CO. Inc., 1983.
105. Freire, A.C.; Podczeck, F.; Sousa, J.; Veiga, F. " Liberação específica de fármacos no cólon por via oral. II – Tipos de sistemas utilizados", *Braz. J. Pharm. Sci.* 2006, 42, 3, 337-355.
106. Frutos, P.; Torrado, S.; Perez-Lorenzo, M. E.; Frutos, G. "A validated quantitative colorimetric assay for gentamicin", *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2000, 21(6), 1149-1159.

107. Friedman, M. "Application of the Ninhydrin Reaction for Analysis of Amino Acids, Peptides, and Proteins to Agricultural and Biomedical Science", *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 385-406.
108. Puleo, A.C.; Paul, D. R.; Kelley, S. S. "The effect of degree of acetylation on gas sorption and transport behavior in cellulose acetate", *J. Membrane Sci.* 1989, 47, 301-302.
109. Meireles, C. S. "Síntese e caracterização de membranas de acetato de celulose, obtidos do bagaço de cana de açúcar, e blendas de acetato de celulose compolietileno de copos plásticos descartados", 2007, 80f, Tese Mestrado, Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
110. Heinze, T., Liebert, T. "Chemical characteristics of cellulose acetate" *Macromol. Symp.* 2004, 208, 167-237.
111. Katchburian, E., Arana, V. "Histologia e Embriologia Oral", 2nd, edn Brasil, Editorial Médica Panamericana, Guanabara Koogan, 2005.
112. Jawetz, E., Melnick, J. L., Adelberg, E. A., Brooks, G.F., Butel, J. S. , Ornston, L.N. "Microrbiologia Médica" 20 ed., Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan S.A., 1998.

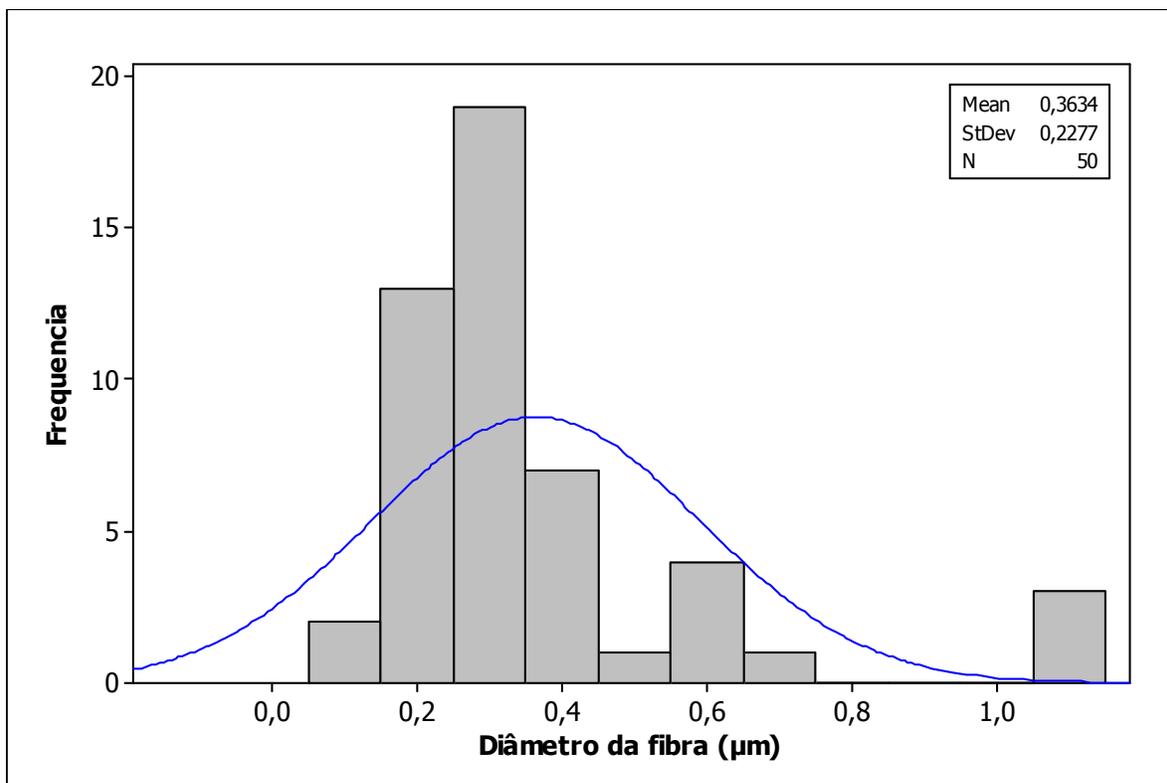
Anexo 2- Histograma para distribuição do diâmetro das nanofibras produzidas a partir da solução de 18% de Acetato de Celulose em Ácido Acético/Água (75:25)



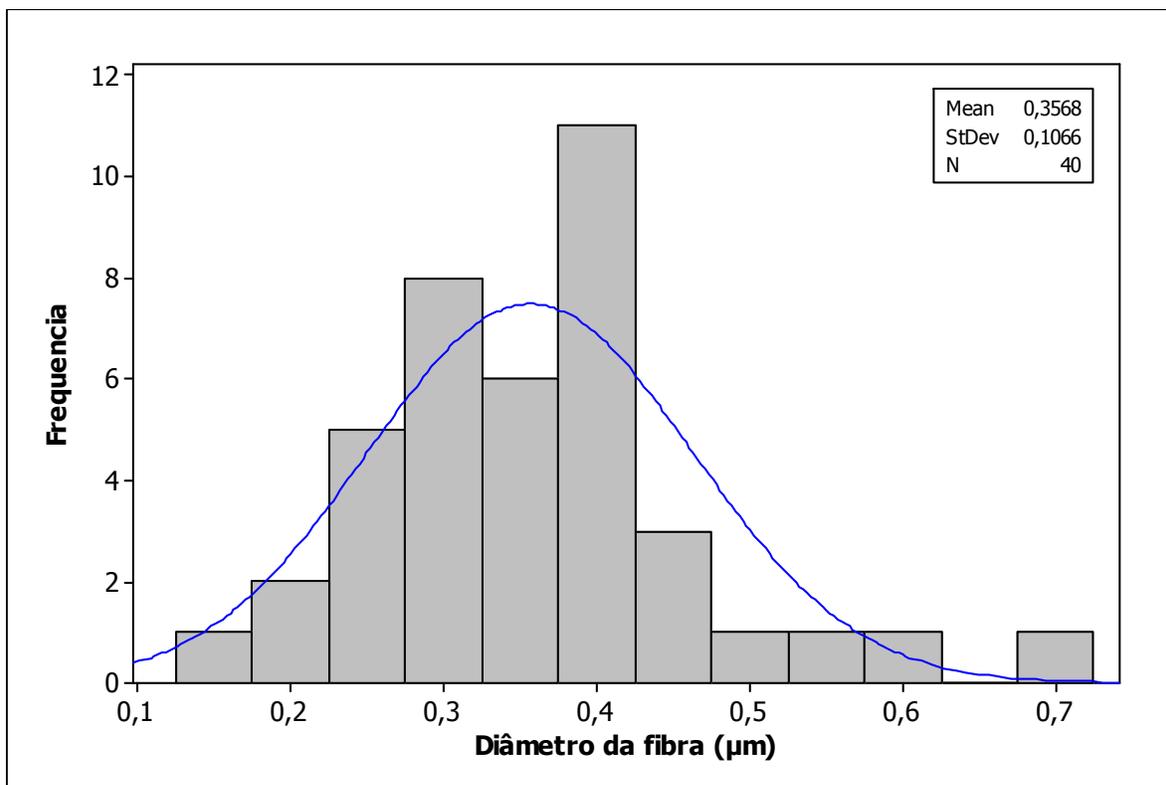
Anexo 3- Histograma para distribuição do diâmetro das nanofibras produzidas a partir da solução de 17% de Acetato de Celulose em Acetona/Água (85:15)



Anexo 4- Histograma para distribuição do diâmetro das nanofibras produzidas a partir da solução de 17% de Acetato de Celulose em DMAc/Acetona (1:2)

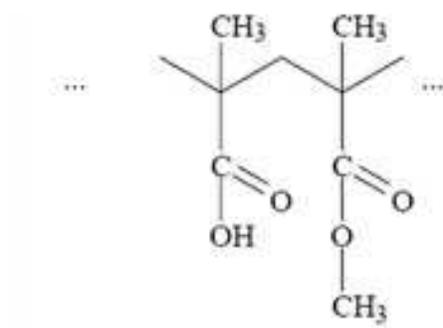


Anexo 5- Histograma para distribuição do diâmetro das nanofibras produzidas a partir da solução de 15% de Acetato de Celulose em DMAc/Acetona/Água (32:63:5)

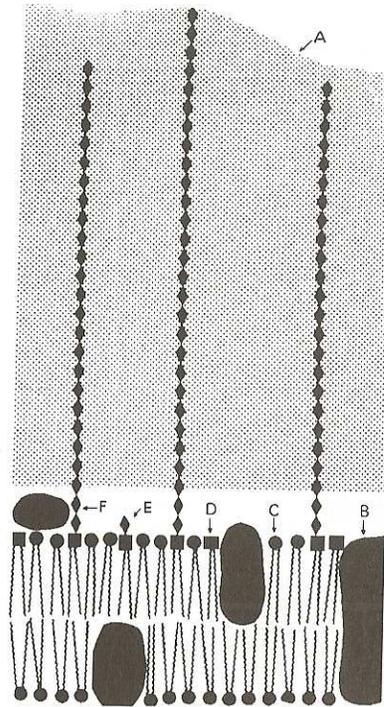


Anexo 6- Fórmula molecular do Eudragit L100® .

(Fonte: <http://eudragit.evonik.com/product/eudragit/en/products-services/eudragit-products/enteric-formulations/l-100/pages/default.aspx>)



Anexo 7- Modelo da parede celular e da membrana de uma bactéria gram-positiva (A: parede celular, B: proteína, C: fosfolípido, D: glicolípido, E: fosfatidil glicolípido, F: ácido lipoteicóico).
(Fonte: Jawetz et al. (1998))¹¹²



Anexo 8 - Organização molecular da membrana externa de bactérias gram-negativas (LPS: lipossacarídeo, A: proteína OmpA, PP: proteína do poro, LP: lipoproteína, PL: proteína de ligação de nutrientes, EPP: espaço periplasmático, PG: peptídeo glicano, PT: proteína transportadora, MC: membrana citoplasmática). (Fonte: Jawetz et al. (1998))¹¹²

