



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ELETROFIAÇÃO DA QUITOSANA E SUA APLICAÇÃO COMO
CURATIVO PARA FERIDAS**

Desirèe Tamara Scheidt

**Toledo – PR
2018**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ELETROFIAÇÃO DA QUITOSANA E SUA APLICAÇÃO COMO
CURATIVO PARA FERIDAS**

Desirée Tamara Scheidt

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Unioeste/*Campus* de Toledo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Química.

Orientador: Professor Dr. Douglas Cardoso Dragunski

**Toledo – PR
2018**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Essa é versão final da Dissertação de Mestrado em Química apresentada por Desirèe Tamara Scheidt em Julho de 2018.

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Douglas Cardoso Dragunski

Orientador

Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley

Membro 1

Prof. Dr. Dr. Cleber Antonio Lindino

Membro 2

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Scheidt, Desiree Tamara
Eletrofiação da Quitosana e sua aplicação como curativo para feridas / Desiree Tamara Scheidt; orientador(a), Douglas Cardoso Dragunski , 2018.
115 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Toledo, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2018.

1. Eletrofiação. 2. Quitosana . 3. Nanofibras. 4. Polímeros . I. Dragunski , Douglas Cardoso . II. Título.

**Dedico esse trabalho as pessoas de
bom coração, tão raras e tão
necessárias**

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Deus por ter me colocado nesse caminho e me mostrado que tudo é possível, desde que haja dedicação e comprometimento. Agradecer a Ele também por ter colocado pessoas no meu caminho que fizeram a diferença durante todo o percurso desse projeto, que foi o mestrado. O que seria das minhas idas ao laboratório sem a presença das minhas colegas de classe e amigas Vanessa e Cris. Vocês acompanharam tudo de perto, cada passo, cada dificuldade e cada resultado positivo, sempre me motivando e me ajudando da maneira que fosse possível. Preciso mencionar também a Janice, a Gabriela, a Ana e Ariane que colaboraram efetivamente para os resultados apresentados nesse trabalho e por se prontificarem em ajudar toda vez que foi preciso. Agradeço profundamente por toda a amizade que fiz na Unioeste, sem as quais este trabalho não teria chegado ao fim de forma favorável

Quero agradecer a minha família, que sem eles, eu nem estaria aqui. A cada passo que dou vocês estão do meu lado, mesmo quando estão longe. A agradecer aos meus amigos que me ouviram dois anos falando de algo que eles nem sabiam do que se tratava, mas escutavam com toda a paciência e me ajudavam a levar tudo com mais leveza.

Um agradecimento a Unioeste por todo auxílio e dedicação aos alunos.

Um imenso obrigada a todos os professores que fazem parte do programa de Mestrado em Química da Unioeste por todo o conhecimento passado e por se dedicarem tanto para fazer com que esse programa cresça cada vez mais. Um agradecimento especial ao professor Dr. Douglas Dragunski, meu orientador, que sempre me motivou, mesmo quando meus resultados não eram animadores. Ele sempre mostrou que os resultados negativos só estavam nos aproximando cada vez mais do resultado positivo, bastava persistir que ele iria chegar. Se um dia eu me tornar uma professora com 10% do seu entusiasmo, da sua dedicação a pesquisa, do seu conhecimento e sua visível paixão em lecionar, ficarei muito feliz.

Agradeço a FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA pelo bolsa concedida.

Agradeço a UEM pela colaboração na pesquisa.

“Saiba que onde quer que você esteja na vida, neste instante, é, ao mesmo tempo, temporário e exatamente onde deveria estar. Você chegou a este momento para aprender o que precisa aprender, para que possa se tornar a pessoa que precisa ser, para criar tudo que jamais desejou para sua vida”

Hal Elrod

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1.

Figura 1 Representação esquemática da estrutura da pele.....	20
Figura 2 Desacetilização da Quitina em Quitosana.....	24
Figura 3 Diagrama esquemático do aparelho de eletrofiação.....	27

Capítulo 2

Figura 1 Microfibras da Blenda de Quitosana/PEO 4%/2% (m/v) na proporção 90:10 v/v aumentada 400 vezes (direita) e 1000 vezes (esquerda).....	47
Figura 2 Microfibras da Blenda de Quitosana/PEO 4%/3% (m/v) na proporção 90:10 v/v aumentada 400 vezes (direita) e 1000 vezes (esquerda).....	47
Figura 3 Microfibras da Blenda de Quitosana/PEO 4%/4% (m/v) na proporção 90:10 v/v aumentada 400 vezes (direita) e 1000 vezes (esquerda).....	47
Figura 4 TGA e DTG da blenda 90/10 (v/v) Quitosana 4%/PEO 2% (m/v).....	52
Figura 5 TGA e DTG da blenda 90/10 (v/v) Quitosana 4%/PEO 3% (m/v).....	52
Figura 6 TGA e DTG da blenda 90/10 (v/v) Quitosana 4%/PEO 2% (m/v).....	52
Figura 7 Curvas de DSC dos componentes das nanofibras da blenda quitosana/PEO em diferentes concentrações de PEO.....	53
Figura 8 Difração de Raio-X para as amostras de Quitosana/PEO (90:10) em diferentes concentrações de PEO.....	55

Capítulo 3

Figura 1 Microscopia eletrônica de varredura para a blenda 90/10 (v/v) Quitosana 4%/PEO 4% (m/v) sem sulfato de neomicina.....	65
Figura 2 Microscopia eletrônica de varredura para a blenda 90/10 blenda 90/10 (v/v) Quitosana 4%/PEO 4% (m/v) com sulfato de neomicina depositado.....	65
Figura 3 Análise FTIR das amostras em pó da quitosana, PEO e sulfato de neomicina.....	66
Figura 4 FTIR (a) Quitosana (b) PEO e (C) Blenda 90/10 (v/v) Quitosana 4%/PEO 4% (m/v) sem sulfato de neomicina.....	67
Figura 5 FTIR (a) Blenda 90/10 (v/v) Quiotosana 4%/PEO 4% sem sulfato de neomicina (b) Sulfato de Neomicina puro (C) Blenda 90/10 (v/v) Quiotosana 4%/PEO 4% com sulfato de neomicina depositado.....	68
Figura 6 Análise DSC do pó da quitosana e do poli (óxido de etileno) – PEO.....	69
Figura 7 Análise DSC da blenda 90/10 (v/v) Quitosana 4%/PEO 4% (m/v).....	70
Figura 8 DSC da blenda 90/10 (v/v) Quitosna 4%/PEO 4% (m/v) com fármaco depositado	71
Figura 9 DSC da blenda 90/10 (v/v) Quitosna 4%/PEO 4% (m/v) sem fármaco e com fármaco depositado.....	71
Figura 10 TGA e DTG do poli (óxido de etileno).....	73
Figura 11 TGA e DTG da Quitosana.....	73

Figura 12 TGA e DTG do sulfato de Neomicina.....	73
Figura 13 TGA e DTG da blenda 90/10 (v/v) Quitosana 4%/PEO 4% (m/v) sem sulfato de neomicina.....	74
Figura 14 TGA e DTG da blenda 90/10 (v/v) Quitosana 4%/PEO 4% (m/v) com sulfato de neomicina depositado.....	74
Figura 15 DRX da Quitosana.....	76
Figura 16 DRX do poli(óxido de etileno).....	76
Figura 17 DRX do Sulfato de Neomicina.....	76
Figura 18 DRX das blendas 90/10 (v/v) Quitosana 4%/PEO 4% (m/v) sem fármaco e com fármaco depositado.....	77
Figura 19 Análise microbiana com bactérias Gram Positivas (<i>S. Aureus</i>) para a membranas 90/10 (v/v) Quitosana 4%/PEO 4% (m/v) sem fármaco e com fármaco depositado.....	78
Figura 20 Análise microbiana com bactérias Gram Negativas (<i>E. Coli</i>) para a membranas 90/10 (v/v) Quitosana 4%/PEO 4% (m/v) sem fármaco e com fármaco depositado.....	78
Figura 21 Varredura no espectro UV-vis para determinação do comprimento de onda de máxima absorção do sulfato de neomicina.....	79
Figura 22 Curva de calibração para sulfato neomicina.....	79
Figura 23 Teste de liberação do sulfato de neomicina depositado na blenda eletrofiada 90/10(v/v) Quitosana 4%/PEO 4% (m/v).....	80
Capítulo 4	
Figura 1 . Microscopia eletrônica de varredura para a blenda 80/20 (v/v) Quitosana 4%/PEO 2% (m/v) sem sulfato de neomicina.....	93
Figura 2 Microscopia eletrônica de varredura para a blenda 80/20 (v/v) Quitosana 4%/PEO 2% (m/v) com sulfato de neomicina eletrofiado.....	93
Figura 3 Microscopia eletrônica de varredura para a blenda 80/20 (v/v) Quitosana 4%/PEO 2% (m/v) com sulfato de neomicina depositado.....	93
Figura 4 Análise FTIR das amostras em pó da quitosana, PEO e sulfato de neomicina.....	94
Figura 5 FTIR (a) Quitosana (b) PEO e (C) Blenda 80/20 (m/v) Quitosana 4%/PEO 2% (m/v) sem sulfato de neomicina.....	95
Figura 6 FTIR (a) Blenda 80/20 (m/v) Quitosana 4%/PEO 2% (m/v) sem sulfato de neomicina (b) Sulfato de Neomicina puro (C) Blenda 80/20 (m/v) Quitosana 4%/PEO 2% (m/v) com sulfato de neomicina eletrofiado.....	96
Figura 7 FTIR da blenda 80/20 (m/v) Quitosana 4%/PEO 2% (m/v) sem sulfato de neomicina.....	97
Figura 8 FTIR da blenda 80/20 (m/v) Quitosana 4%/PEO 2% (m/v) sem sulfato de neomicina.....	97
Figura 9 Análise DSC do pó da quitosana e do poli (óxido de etileno) - PEO.....	98
Figura 10 Análise DSC da blenda 80/20 (v/v) Quitosana 4%/PEO 2% (m/v) sem fármaco.....	99
Figura 11 DSC do poli (óxido de etileno).....	100

Figura 12 DSC da Quitosana.....	100
Figura 13 TGA e DTG da blenda 80/20 (v/v) Quitosana 4%/PEO 2% (m/v) sem sulfato de neomicina, com sulfato de neomicina eletrofiado e com sulfato de neomicina depositado.....	100
Figura 14 TGA e DTG do poli (óxido de etileno).....	102
Figura 15 TGA e DTG da Quitosana.....	102
Figura 16 TGA e DTG do sulfato de Neomicina.....	102
Figura 17 TGA e DTG da blenda 80/20 sem sulfato de neomicina.....	103
Figura 18 TGA e DTG da blenda 80/20 com fármaco eletrofiado.....	103
Figura 19 TGA e DTG da blenda 80/20 com fármaco depositado.....	103
Figura 20 DRX da Quitosana.....	105
Figura 21 DRX do poli(óxido de etileno).....	105
Figura 22 DRX do Sulfato de Neomicina.....	105
Figura 23 DRX das blendas 82/20 (v/v) Quitosana 4%/PEO 2% (m/v) sem fármaco, com fármaco eletrofiado e com fármaco depositado	106
Figura 24 Análise microbiana com bactérias Gram positiva (<i>S. Aureus</i>) para as membranas eletrofiadas de quitosana/PEO sem fármaco, com fármaco eletrofiado e com fármaco depositado.....	107
Figura 25 Análise microbiana com bactérias Gram Negativas (<i>E. Coli</i>) para as membranas eletrofiadas de quitosana/PEO sem fármaco, com fármaco eletrofiado e com fármaco depositado.....	107
Figura 26 Varredura no espectro UV-vis para determinação do comprimento de onda de máxima absorção do sulfato de neomicina.....	109
Figura 27 Curva de calibração para sulfato neomicina.....	109
Figura 8 Teste de liberação do sulfato de neomicina depositado na blenda eletrofiada 80/20(v/v) Quitosana 4%/PEO 2% (m/v) realizado em duplicata.....	109

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1 Efeitos dos parâmetros de eletrofição na morfologia da fibra.....	31
---	----

Capítulo 2

Tabela 1 Condições experimentais utilizadas na preparação das blendas de Quitosana/PEO	44
---	----

Tabela 2 Parâmetros utilizados para a eletrofição das blendas.....	44
---	----

Tabela 3 Diâmetro das fibras em diversas proporções da blenda Quitosana/PEO (4%/2%) m/v.....	48
---	----

Tabela 4 Diâmetro das fibras em diversas proporções da blenda Quitosana/PEO (4%/3%) m/v.....	49
---	----

Tabela 5 Diâmetro das fibras em diversas proporções da blenda Quitosana/PEO (4%/4%) m/v	50
--	----

Tabela 6 Valores de fusão e recristalização para as blendas eletrofiadas.....	54
--	----

Capítulo 3

Tabela 1 Valores de fusão, recristalização e porcentagem cristalina das membranas de 90/10 (v/v) quitosana 4%/PEO 4% (m/v) sem fármaco e com fármaco depositado.....	72
---	----

Tabela 2 Medidas do halo de inibição das blendas 90/10 (v/v) Quitosana 4%/PEO4% (m/v) sem e com sulfato de neomicina eletrofiado.....	78
--	----

Capítulo 4

Tabela 1 Valores de fusão, recristalização e porcentagem cristalina das membranas de 80/20 (v/v) Quitosana 4%/PEO 2% (m/v) sem fármaco, com fármaco eletrofiado e com fármaco Depositado.....	101
--	-----

Tabela 2 Medidas do halo de inibição das blendas 90/10 (v/v) Quitosana 4%/PEO4% (m/v) sem e com sulfato de neomicina eletrofiado.....	107
--	-----

SUMÁRIO

Capítulo 1	17
1 Introdução.....	17
2 Objetivos.....	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3 Referencial Teórico.....	20
3.1 Curativo para feridas.....	20
3.2 Biomaterias.....	22
3.3 Quitosana.....	23
3.4 Eletrofiação.....	26
3.4.1 Parâmetros que afetam a eletrofiação.....	27
3.4.1.1 Efeito da Voltagem.....	27
3.4.1.2 Efeito da taxa de alimentação.....	28
3.4.1.3 Efeito da distância entre agulha e coletor e diâmetro da agulha.....	29
3.4.1.4 Efeito da concentração de polímero e da viscosidade da solução.....	29
3.4.1.5 Efeito da condutividade da solução.....	30
3.4.1.6. Papel do solvente na eletrofiação.....	30
3.4.1.7 Efeito da umidade.....	31
3.5 Blendas de Quitosana/PEO.....	31
3.6 Nanofibras de quitosana como curativo para feridas e liberação controlada de fármaco.....	32
3.7 Sulfato de Neomicina.....	34
4 Referências Bibliográficas.....	35
Capítulo 2.....	41
1 Introdução.....	41
2 Metodologia.....	43
2.1 Materiais.....	43
2.2 Métodos.....	43
2.2.1 Preparo das Soluções.....	43
2.2.2 Preparo das Blendas Poliméricas.....	43
2.2.3 Parâmetros para a eletrofiação.....	44
2.2.4 Microscopia Óptica (MO).....	45

2.2.5 Termogravimetria (TGA).....	45
2.2.6 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	45
2.2.7 Espectroscopia de raio x (DRX).....	45
3 Resultados e Discussões.....	46
3.1 Obtenção de Membrana Eletrofiada.....	46
3.2 Caracterização das Nanofibras.....	51
4. Conclusão.....	55
5. Referências Bibliográficas.....	56
Capítulo 3.....	59
1 Introdução.....	59
2 Metodologia.....	61
2.1 Materiais.....	61
2.2 Preparo das Soluções.....	61
2.3 Eletrofição.....	61
2.4 Incorporação do Fármaco à Membrana Eletrofiada.....	62
2.5 Caracterização das nanofibras.....	62
2.5.1 Morfologia e Diâmetro das Fibras.....	62
2.5.2 Espectroscopia Infravermelho com Transformada de Fourier-FTIR.....	62
2.5.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	62
2.5.4 Termogravimetria (TGA).....	63
2.5.5 Espectroscopia de Raio x (DRX).....	63
2.5.6 Análise Microbiana.....	63
2.5.7 Teste de Liberação de Fármaco.....	64
2.5.7.1 Construção da Curva de Calibração.....	64
2.5.7.2 Liberação <i>in vitro</i> do Sulfato de Neomicina.....	64
3. Resultados e Discussões.....	64
3.1 Caracterização das nanofibras.....	64
3.1.1 Morfologia e Diâmetro das Fibras.....	64
3.1.2 Espectroscopia Infravermelho com Transformada de Fourier-FTIR.....	65
3.1.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	69
3.1.4 Termogravimetria (TGA).....	72
3.1.5 Espectroscopia de Raio x (DRX).....	75
3.2 Análise Microbiana.....	77
3.3 Teste de Liberação de Fármaco.....	79

3.3.1 Construção da Curva de Calibração.....	79
3.1.2 Liberação <i>in vitro</i> do Sulfato de Neomicina.....	80
4. Conclusão.....	81
5. Referências Bibliográficas.....	81
Capítulo 4.....	86
1 Introdução.....	86
2 Metodologia.....	88
2.1 Materiais.....	88
2.2 Preparo das Soluções.....	88
2.3 Incorporação do Fármaco à blenda.....	88
2.3.1 Por eletrofiação.....	88
2.3.2 Por deposição.....	88
2.4 Eletrofiação.....	89
2.5 Caracterização das nanofibras.....	89
2.5.1 Morfologia e Diâmetro das Fibras.....	89
2.5.2 Espectroscopia Infravermelho com Transformada de Fourier-FTIR.....	89
2.5.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	90
2.5.4 Termogravimetria (TGA).....	90
2.5.5 Espectroscopia de Raio x (DRX).....	90
2.5.6 Análise Microbiana.....	90
2.5.7 Teste de Liberação de Fármaco.....	91
2.5.7.1 Construção da Curva de Calibração.....	91
2.5.7.2 Liberação <i>in vitro</i> do Sulfato de Neomicina.....	91
3. Resultados e Discussões.....	92
3.1 Caracterização das nanofibras.....	92
3.1.1 Morfologia e Diâmetro das Fibras.....	92
3.1.2 Espectroscopia Infravermelho com Transformada de Fourier-FTIR.....	94
3.1.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	97
3.1.4 Termogravimetria (TGA).....	101
3.1.5 Espectroscopia de Raio x (DRX).....	104
3.2 Análise Microbiana.....	106
3.3 Teste de Liberação de Fármaco.....	108
3.3.1 Construção da Curva de Calibração.....	108
3.3.2 Liberação <i>in vitro</i> do Sulfato de Neomicina.....	109

4. Conclusão.....	110
5. Referências Bibliográficas.....	110
CONSIDERAÇÕES FINAL	115

RESUMO

Nanofibras poliméricas podem ser produzidas utilizando o método de eletrofiação. Trata-se de uma técnica simples, econômica e versátil que utiliza um potencial elétrico para gerar fibras em escala nanométrica. Dentre os polímeros eletrofiados, pode-se destacar a quitosana, a qual é um polímero atóxico, biodegradável, biocompatível, obtido por meio de fontes naturais renováveis, que vem despertando o interesse de pesquisadores. No entanto, devido à dificuldade de eletrofiação desse material puro, tem-se buscado aliar o poli (óxido de etileno) PEO à matriz polimérica da quitosana, a fim de se facilitar o processo de obtenção de fibras. Nesse contexto, o objetivo inicial deste trabalho foi a obtenção de uma blenda polimérica contendo quitosana e PEO capaz de gerar nanofibras quando sujeitas ao processo de eletrofiação. O poli (óxido de etileno) mostrou-se excelente como auxiliador na fiação da quitosana, permitindo a obtenção de fibras com até 90% da mesma e o diâmetro médio obtido foi de 320nm. Os parâmetros de processo foram avaliados e os que mostraram melhor resultado foi uma concentração de 4% (m/v) de quitosana em ácido acético 90% (v/v) e 2% (m/v) de PEO em ácido acético 50% (v/v), tensão aplicada foi de 18kV e distância entre o coletor e agulha de 20cm. A incorporação do PEO à matriz polimérica de quitosana se mostrou, então, uma estratégia eficaz para a obtenção de nanofibras por meio do processo de eletrofiação. Seguiu-se então o estudo para a incorporação do fármaco sulfato de neomicina à matriz eletrofiada, com a finalidade de ampliar a atividade antimicrobiana do filme obtido. Membranas na proporção 90/10 (v/v) de quitosana/PEO 4%/4% (m/v), assim como membranas na proporção 80/20 (v/v) quitosana/PEO 4%/2% (m/v) foram estudadas como suporte para a incorporação do fármaco. Quando o sulfato de neomicina foi incorporado junto a solução e submetido a eletrofiação, o diâmetro das fibras obtidas foram ainda menores, com média de 258nm. As membranas obtidas foram sujeitas a análises físico-químicas, as quais comprovaram a miscibilidade dos polímeros quitosana e PEO assim como confirmaram a incorporação do sulfato de neomicina à blenda. A atividade antimicrobiana para as membranas com fármaco e sem fármaco foi investigada contra bactérias Gram positivas e Gram negativas e os halos de inibição registrados foram maiores ou próximo ao controle, demonstrando uma alta capacidade antimicrobiana. O teste de liberação do sulfato de neomicina indicou que o mesmo apresenta um perfil de liberação rápido, sendo que com apenas 120 minutos grande parte do fármaco já havia se desprendido do filme polimérico. Diante disso, as membranas desenvolvidas nesse estudo sugerem ser promissoras candidatas para a aplicação como um biomaterial na cicatrização de feridas, sendo ainda necessários estudos de viabilidade celular.

ABSTRACT

Nanofibers generated using polymers are generally produced by the electrospinning method. It is a simple, economical and versatile technique that uses an electric force to generate ultrafine fibers. Chitosan is a non-toxic, biodegradable, biocompatible polymer obtained from renewable natural sources that attracts the interest of researchers. However, due to the difficulty of electrospinning pure chitosan, it has been tried to ally the poly (ethylene oxide) PEO to the polymeric matrix of chitosan, in order to facilitate the process of obtaining fibers. In this context, the initial objective of this work was to obtain a polymeric blends containing chitosan and PEO capable of generating nanofibers when subjected to the electrospinning process. The poly (ethylene oxide) was excellent as a helper in chitosan spinning, allowing the obtaining of fibers with up to 90% of the same and the average diameter obtained was of 320nm. The process parameters were evaluated and the ones that showed the best result were a concentration of 4% of chitosan and 2% of PEO, applied tension of 18kv and distance between the collector and needle of 20cm. The incorporation of PEO into the polymeric matrix of chitosan proved to be an effective strategy for obtaining nanofibers by the electrophilic process. The study was then carried out for the incorporation of the drug neomycin sulfate into the electrophilic matrix. Membranes in the ratio of 90/10 (v / v) chitosan / 4% PEO / 4% (m / v), as well as membranes in the ratio 80/20 (v / v) chitosan / PEO (4% / 2%) were studied as support for the incorporation of the drug. When the neomycin sulfate was incorporated together with the solution and subjected to electrospinning, the diameter of the fibers obtained were even smaller, with a mean of 258nm. The obtained membranes were subjected to physico-chemical analysis, which proved the miscibility of the polymers chitosan and PEO as well as confirmed the incorporation of the neomycin sulfate to the blend. The antimicrobial activity for the drug and non-drug membranes was investigated against Gram positive and Gram negative bacteria and the registered inhibition halos were larger or near the control. The neomycin sulfate release test indicated that it had a rapid release profile, and with only 120 minutes, much of the drug had already been released from the polymer film. In view of this, the membranes developed in this study suggest to be promising candidates for the application as a biomaterial in wound healing.

CAPÍTULO 1

1- INTRODUÇÃO

Uma ferida é descrita como uma interrupção da continuidade de um tecido corpóreo, que pode ser causada por qualquer tipo de trauma físico, químico, mecânico ou até mesmo desencadeada por uma afecção clínica. Essas feridas são bastante perigosas para as pessoas, uma vez que o ferimento está sujeito à invasão de bactérias e à perda de fluidos corpóreos. Sob estas condições, o recobrimento rápido e efetivo dessas lesões é essencial para o tratamento da enfermidade. O papel dos curativos para feridas é proporcionar uma barreira física para prevenir contaminação e infecção e também para manter um ambiente que auxilia e acelere a cicatrização das mesmas [1, 2, 3]

Durante séculos, o tratamento de feridas evoluiu com o objetivo de obter melhores resultados cicatriciais em um menor tempo possível [3]. Surge então, nos últimos anos, diversas pesquisas utilizando materiais curativos à base de polímeros. Estes materiais apresentam boa absorvidade de fluidos liberados pela ferida e também são eficazes no controle da invasão bacteriana [4]. Dentre essa classe de materiais, os polímeros naturais se destacam na pesquisa desses novos curativos, pois são de fácil obtenção, possuem propriedades antimicrobianas e ainda aceleram a cicatrização devido a colaboração na proliferação celular [5].

Entre os materiais de curativos biológicos, a quitosana tem ganhado atenção de pesquisadores. Trata-se de um polissacarídeo natural, obtido da desacetilização parcial ou total da quitina, o segundo polissacarídeo natural mais abundante na natureza [8] É essencialmente produzida por fontes naturais renováveis, encontrada nos exoesqueletos dos crustáceos, nos insetos, nas algas diatomáceas e também na parede celular de alguns fungos. A fonte comercial mais utilizada são as cascas de crustáceos marinhos (camarões e caranguejos), devido às largas quantidades disponíveis como subprodutos da indústria de processamento alimentar [7]. Devido a sua alta biocompatibilidade, biodegradabilidade, capacidade hidratante, ação anti-inflamatória e propriedades antimicrobianas e cicatrizantes, a quitosana é considerada um material potente para aplicação como curativos para feridas [5].

Diferentes técnicas de processamento podem ser aplicadas para produzir membranas à base de quitosana, tais como fundição de solvente, *casting*, inversão de fase e pelo método de eletrofiação. O processo de eletrofiação se tornou muito atrativo devido a sua metodologia de baixo custo e sua capacidade de produzir nanofibras a partir de diversos materiais, de um modo simples, repetitivo e de fácil manipulação [8]. Além disso, as membranas produzidas por este método possuem alta porosidade, alta área de superfície específica, e são capazes de imitar a matriz extracelular natural, o que torna essas membranas excelentes candidatos para aplicações de biomateriais [9].

A unidade de eletrofição precisa de quatro componentes básicos, como uma seringa com agulha de metal, uma fonte de alta tensão, uma bomba infusora e um coletor metálico aterrado. Ao fornecer alta voltagem à agulha de metal, na faixa de 10 a 50 kV, a carga é induzida no polímero e um cone de Taylor é formado pelo equilíbrio da força elétrica e tensão superficial da solução. O cone de Taylor é lentamente esticado, à medida que a voltagem aumenta e um jato é formado a partir da gotícula deformada, que se move em direção ao coletor aterrado, e se transforma em nanofibras [10]

A quitosana pura, assim como a maioria dos polímeros naturais, é um material difícil de ser eletrofiado sozinho. Sua natureza policatiônica em solução, estrutura química rígida e interação de pontes de hidrogênio intermoleculares e intramoleculares restringem os enredamentos de cadeia, que é um pré-requisito essencial para a formação de nanofibras [11, 12]. A fim de melhorar a eletrofiabilidade da quitosana, polímeros sintéticos, os quais possuem uma facilidade de eletrofição muito maior, podem ser incorporados à matriz polimérica [13]. A biocompatibilidade e as boas propriedades mecânicas do poli (óxido de etileno), (PEO) incluindo alto alongamento e capacidade de orientar quando esticado, destacam este material para sua utilização como segunda fase polimérica na eletrofição da quitosana. O PEO pode fornecer ligações de hidrogênio adicionais e melhorar a interferência das cadeias de quitosana, o que leva a uma maior produção de nanofibras da mesma [12, 14]

A incorporação de agentes terapêuticos nesses materiais curativos e sua liberação controlada na área da ferida tem se mostrado uma excelente abordagem para controlar a inflamação, prevenir infecções e estimular a regeneração do tecido [5]. A neomicina, que é principalmente usada como sulfato, é um antibiótico aminoglicosídeo de grande amostragem, amplamente utilizado em forma de cremes e pomadas. É um composto solúvel em água e insolúvel em solventes orgânicos o qual consegue manter a sua eficácia em solução aquosa e outros veículos em comparação com outros antibióticos. Inibe o crescimento de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, especialmente microbactérias, mas não é ativa contra fungos [15, 16]

Mediante ao que foi exposto, este trabalho propõe a obtenção de um novo material curativo à base de quitosana, o qual será obtido pelo processo de eletrofição e posteriormente, ocorrerá incorporação do fármaco na membrana obtida e será avaliada a liberação controlada do mesmo. objetivos

2.1 - Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo central a preparar e caracterizar nanofibras como matrizes poliméricas a base de blendas de quitosana/PEO por meio do processo de eletrofiação e posterior incorporação do sulfato de neomicina à membrana.

2.2 - Objetivos específicos

- Produzir fibras poliméricas de Quitosana/PEO com e sem a associação do fármaco sulfato de neomicina à blenda utilizando o processo de eletrofiação;
- Caracterizar as fibras poliméricas preparadas investigando as propriedades de superfície por meio de análises físico-químicas;
- Estudar a atividade bacteriana das membranas com e sem fármaco contra bactérias Gram negativas e Gram positivas;
- Realizar testes de liberação de fármaco “*in vitro*”.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Curativo para feridas

A pele é o maior órgão do corpo humano e o principal sistema de defesa exterior no nosso organismo. É ela quem protege o sistema interno do corpo de ataques de microrganismos e contaminações, além de manter a hidratação e o controle da temperatura corporal [1, 17]. A pele é composta por três camadas principais, a epiderme, a derme e a hipoderme (Figura 1). As camadas superiores da epiderme, ou as camadas do estrato córneo, são as responsáveis em construir a barreira principal contra a penetração percutânea de qualquer invasão. Os queratinócitos são o tipo celular predominante na epiderme, constituindo 95% das células lá encontradas [18]. A camada da derme existe exatamente adjacente à epiderme e é constituída por uma matriz de tecidos conjuntivos que proporcionam a elasticidade e resistência de deformação para a pele. Além disso, a camada da derme contém os vasos sanguíneos que dão as camadas nutrientes e oxigênio. A hipoderme é a camada mais profunda da pele e é predominantemente composta de tecido adiposo. Proporcionam o isolamento térmico e a proteção mecânica para o corpo [17].

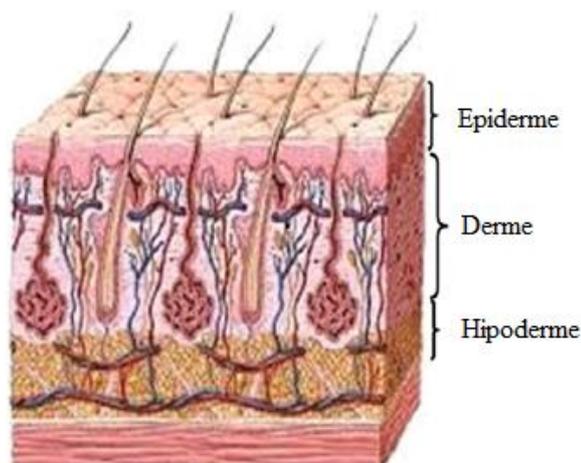


Figura 1 Representação esquemática da estrutura da pele

Fonte: Adaptada de (Kanmoun et al., 2017) [17].

Danos à pele provocam uma ruptura nessa barreira de proteção, através da qual as bactérias podem entrar, causando inflamações e infecções. Uma ferida é então descrita como um defeito ou uma ruptura na pele, resultante de danos físicos ou térmicos ou, até mesmo, como resultado da presença de uma condição médica ou fisiológica [1,19].

As feridas podem ser classificadas, com base na natureza do processo de reparo, em agudas e crônicas. A cicatrização da ferida aguda é, geralmente, um processo bem organizado que leva a um

reparo tecidual completo e previsível. Ao contrário das feridas agudas, que geralmente cicatrizam sem intervenções significativas, todos os tipos de feridas crônicas representam grandes desafios durante a cicatrização. A incapacidade da ferida crônica para cicatrizar é causada por anomalias celulares e moleculares que ocorrem dentro do leito da ferida [20].

As lesões são também classificadas com base no número de camadas cutâneas e área da pele afetada. As lesões que afetam a superfície da pele isoladamente são chamadas de feridas superficiais, enquanto lesões envolvendo a epiderme e as camadas cutâneas mais profundas são tidas como ferida de espessura parcial. Feridas de espessura total ocorrem quando a gordura subcutânea subjacente ou tecidos mais profundos são danificados, além da epiderme e camadas dérmicas [21].

A cicatrização de uma ferida é um processo complexo, o qual envolve uma sequência ordenada de eventos biológicos, que resultam na restauração da continuidade e funções anatômica da pele. Uma ferida idealmente curada é aquela que retornou à sua estrutura, função e aparências anatômicas normais [22]. Feridas com grandes quantidades de perda de pele exigem cobertura imediata com um curativo principalmente para proteger a ferida [18].

O papel dos curativos no tratamento de feridas é proporcionar uma barreira física para prevenir contaminação e infecção e para manter um ambiente de ferida que auxilia e acelera a cicatrização [1]. Os benefícios de um ambiente de ferida úmido que os curativos proporcionam incluem: prevenção da desidratação de tecidos e morte celular, angiogênese (processo de formação de vasos sanguíneos) acelerada, degradação aumentada de tecido morto e interação aumentada de fatores de crescimento com as suas células alvo. Além disso, a dor é significativamente reduzida quando as feridas são cobertas com um curativo oclusivo [18]. De acordo com Jones et al. (2006) [23] um curativo ideal deve ter as seguintes características:

- Ser capaz de manter uma elevada umidade no local da ferida enquanto se remove o excesso de exsudado (fluido inflamatório);
- Isentos de partículas e contaminantes tóxicos;
- Devem ser não tóxicos e não alérgicos;
- Ser capaz de proteger a ferida de outro trauma;
- Capaz de ser removido sem causar traumatismo à ferida;
- Ser impermeável às bactérias;
- Promover o isolamento térmico;
- Permitir trocas gasosas;
- Exigir apenas alterações pouco frequentes;
- Economicamente viáveis
- Longa vida de prateleira

Os curativos e dispositivos para ferida formam um importante segmento do mercado de assistência médica e farmacêutica em todo o mundo. No passado, curativos tradicionais, tais como bandagens naturais ou sintéticas, algodão, fiapos e gazes com diferentes graus de absorção foram utilizados para o tratamento de feridas. Sua principal função era manter a ferida seca, permitindo a evaporação dos exsudatos da ferida impedindo a entrada de bactérias nocivas na ferida. Foi agora demonstrado, no entanto, que tendo um ambiente quente e úmido a ferida realiza mais rápida e bem-sucedida a cicatrização de feridas. As duas últimas décadas tem testemunhado a introdução de muitos curativos, com novos tornando-se disponíveis a cada ano [19].

O desenvolvimento de novos materiais e a melhoria dos materiais existentes para promover regeneração da pele ocupam grandes áreas de pesquisa em biomateriais poliméricos [24].

3.2- Biomateriais

Biomaterial é qualquer substância ou combinações de substâncias, sintética ou derivada de fontes biológicas, que possa ser usada por um período de tempo, completa ou parcialmente como parte de um sistema que trate, aumente ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo. O uso de polímeros naturais para aplicações diversificadas tem sido de vital importância para os avanços das ciências e apresentam várias vantagens como ser de fácil obtenção, ser biocompatível e biodegradável. Os polissacarídeos, como uma classe de macromoléculas naturais, têm sua propensão extremamente bioativa, e são geralmente derivados de produtos agrícolas ou de crustáceos [25,26].

Os polissacarídeos constituem um importante componente da matéria da vida. Eles apresentam uma biocompatibilidade e uma biodegradabilidade perfeitas, que são as características básicas dos polímeros utilizados como biomateriais. Eles têm várias características não encontradas em outros polímeros naturais. Recentemente, foram descobertas propriedades específicas de antivirais, antitumorais, moduladores de genes, etc. para várias classes de polissacáridos [7].

Matrizes tridimensionais porosas, atualmente designadas *scaffolds*, à base de biomateriais são amplamente e intensivamente investigado para aplicações biomédicas, tais como na engenharia de tecidos para implantes assim como para curativo de ferida. Esses biomateriais precisam permitir um bom crescimento celular para seu uso biomédico, que depende fortemente da porosidade do *scaffold*, da extensão da superfície e da rugosidade. Para uma interação satisfatória entre biopolímeros e o sistema biológico, o *scaffold* deve imitar as funções da matriz extracelular (ECM) para assim promover a adesão e a proliferação celular. Os *scaffolds* construídos a partir de nanofibras biopoliméricas podem fornecer uma estrutura tridimensional com poros de interconexão, semelhantes

à matriz extracelular, favoráveis à regeneração tecidual [28]. Além disso, devido ao seu baixo custo, biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade e características físicas-químicas, biopolímeros tais como o poli(metacrilato de metilo), poliuretano, celulose e seus derivados, dextrano e alginato são atualmente utilizados na medicina clínica e o polissacarídeo quitosana tem sido cada vez mais avaliado para a regeneração dos tecidos cutâneos [6,25].

3.3 - Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo natural, obtido da desacetilização parcial ou total da quitina, o segundo polissacarídeo natural mais abundante na natureza, superada apenas pela celulose [6]. É essencialmente produzida por fontes naturais renováveis, encontrada nos exoesqueletos dos crustáceos (camarão, caranguejos, siri, lagosta e krill), nos insetos, nas algas diatomáceas e também na parede celular de alguns fungos. A fonte comercial mais utilizada são as cascas de crustáceos marinhos (camarões e caranguejos), devido às largas quantidades disponíveis como subprodutos da indústria de processamento alimentar [7].

Conforme mostra a Figura 2, a quitosana é um copolímero constituído por unidades *N-acetil-D-glucosamina* e *D-glucosamina* em proporções variáveis apresentando predominantemente unidades *D-glucosamina*. Quando a fração de unidades de *D-glucosamina* é superior a 50%, o polímero é chamado de quitosana e o número de unidades de *glucosamina* é denominado grau de desacetilização, ou DDA. A quitina, por outro lado, é o termo usado quando as unidades de *N-acetil-D-glucosamina* são superiores a 50% e o número de grupos acetamido é denominado grau de acetilação (DA). Nota-se que, quando grau de desacetilização da quitina atinge cerca de 50% ou mais (dependendo da origem do polímero e das condições de processamento), torna-se solúvel em meio ácido aquoso. A quitosana é insolúvel em solução aquosa acima de pH 7, na sua forma cristalina. No entanto, em ácidos diluídos (pH <6), os grupos amino livres protonados na *glucosamina* facilitam a solubilidade da molécula polimérica. Em meios ácidos, o polissacarídeo é convertido num polieletrólito. Um polieletrólito é um polímero que transporta grupos ionizáveis carregados positivamente ou negativamente [30].

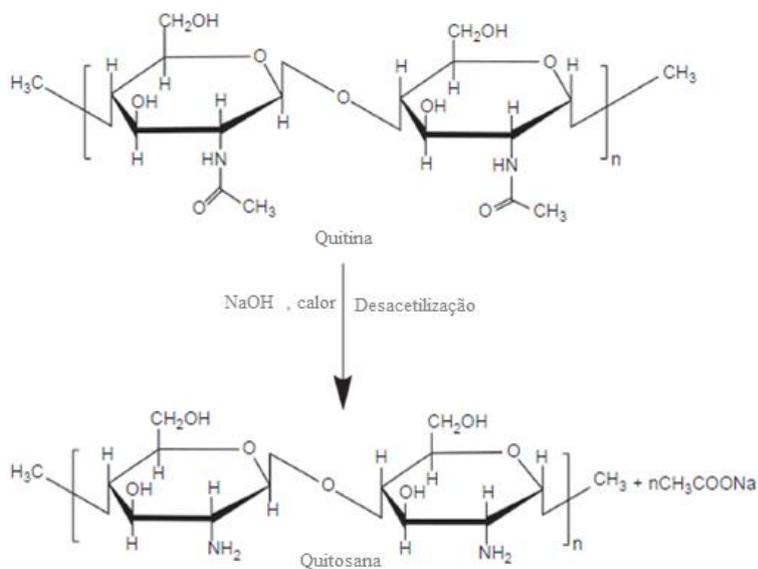


Figura 2 Desacetilização da Quitina em Quitosana

Fonte: Adaptada de Jennings et al, 2017 [30]

Trata-se de um polissacarídeo natural disponível em solução, floco, pó fino ou fibras. Por apresentar uma alta massa molecular, exibir uma carga positiva, demonstrar a capacidade de formar filmes e características de gelatina, esse material tem sido extensivamente usado em vários setores da indústria. Dentre elas estão a agricultura (mecanismos defensivos e adubo para plantas), tratamento de água (floculante para clarificação, remoção de íons metálicos, polímero ecológico e redução de odores), indústria alimentícia (fibras dietéticas, redutor de colesterol, conservante para molhos, fungicida e bactericida, recobrimento de frutas), indústria de cosméticos (esfoliante para a pele, tratamento de acne, hidratante capilar, creme dental) e biofarmacêutica (imunológico, antitumoral, hemostático e anticoagulante). Porém sua maior aplicação é na área biomédica [25, 30].

A abundância e baixo custo tornam a quitosana um biopolímero atraente para pesquisas em tecnologia e campos biomédicos [28]. Além disso, suas características biocompatíveis, biodegradáveis, não tóxicos, antimicrobianos e hidratantes mostram boa biocompatibilidade e efeitos positivos na cicatrização de feridas. Estudos anteriores demonstraram que os curativos à base de quitosana podem acelerar a reparação de diferentes tecidos, facilitar a contração das feridas e regular a secreção dos mediadores inflamatórios [31, 6].

Como já mencionado, várias propriedades notáveis da quitosana ofereceram oportunidades únicas para o desenvolvimento de aplicações biomédicas.

De acordo com He et al. (1997) [32] a presença do grupo amino protonável ao longo dos resíduos de D-glucosamina permite elucidar a maioria das propriedades da quitosana. A mucoadesão da quitosana, por exemplo, pode ser explicada pela presença de resíduos negativamente carregados (ácido sialico) na mucina - a glicoproteína que compõe o muco. Em meio ácido, os grupos amino da

quitosana são carregados positivamente e, portanto, podem interagir com a mucina. Esta mucoadesão está diretamente relacionada ao grau de desacetilação da quitosana. Se o aumento DDA da quitosana aumenta, o número de cargas positivas também aumenta, o que leva a propriedades mucoadesivas melhoradas.

Rao et al. (1997) [33] demonstrou que a atividade hemostática da quitosana também pode estar relacionada à presença de cargas positivas no *backbone* de quitosana. De fato, as membranas dos glóbulos vermelhos são carregadas negativamente e, portanto, podem interagir com a quitosana carregado positivamente. Além disso, a quitina mostra atividade hemostática menos eficaz do que a quitosana, o que tende a confirmar esta explicação.

Verificou-se também que, devido às suas cargas positivas, a quitosana pode interagir com a parte negativa da membrana das células, o que pode levar à reorganização e à abertura das proteínas de junção apertada, explicando a propriedade de aumento de permeação deste polissacarídeo. Se o quitosana DDA aumenta, a capacidade de permeação também aumenta [34].

O caso da atividade antimicrobiana de quitosana é um pouco mais complexo; Dois mecanismos principais foram relatados na literatura para explicar as atividades antibacterianas e antifúngicas de quitosana. No primeiro mecanismo proposto, a quitosana carregada positivamente pode interagir com grupos carregados negativamente na superfície das células e, como consequência, alterar sua permeabilidade. Isso evitaria que materiais essenciais entrassem nas células e/ou levassem ao vazamento de solutos fundamentais para fora da célula. O segundo mecanismo envolve a ligação da quitosana com o DNA celular (ainda através de grupos amino protonados), o que levaria à inibição da síntese de ARN microbiana. A propriedade antimicrobiana de quitosana pode, de fato, resultar de uma combinação de ambos os mecanismos [35, 36]

A natureza poliacetônica da quitosana também permite explicar os efeitos analgésicos da mesma. De fato, os grupos amino dos resíduos de D-glucosamina podem protonar na presença de íons de prótons que são liberados na área inflamatória, resultando em um efeito analgésico [37].

No que diz respeito a biodegradabilidade da quitosana, sua taxa de degradação é principalmente relacionada ao seu grau de desacetilação. Para explicar essa relação, é importante lembrar que a quitosana é um polímero semi-cristalino. A cristalinidade é máxima para um DDA igual a 0 ou 100% (quitina ou quitosana totalmente desacetilado, respectivamente) e diminui para DDA intermediário. No entanto, como a cristalinidade do polímero está inversamente relacionada à cinética de biodegradação, quando a quitosana DDA diminui (perto de 60%), sua cristalinidade também diminui, o que resulta em um aumento da taxa de biodegradação. Além disso, a distribuição de resíduos de acetilo ao longo do quitosana também afetará sua cristalinidade e consequentemente a taxa de biodegradação. Finalmente, pode-se razoavelmente assumir que as cadeias de quitosana

menores serão mais rapidamente degradadas em oligossacarídeos do que a quitosana com maior massa molecular [34].

Considerando todas as propriedades acima mencionadas, não é surpreendente que a quitosana tenha sido e seja testada em muitas aplicações biomédicas e farmacêuticas, principalmente para suturas, implantes dentários e ósseos e como curativo para feridas [36].

Diferentes técnicas de processamento podem ser aplicadas para produzir membranas à base de quitosana, tais como fundição de solvente, *casting*, inversão de fase e pelo método de eletrofiação. O processo de eletrofiação se tornou muito atrativo devido a sua metodologia de baixo custo e sua capacidade de produzir nanofibras a partir de diversos materiais, de um modo simples, repetitivo e de fácil manipulação [6].

3.4 - Eletrofiação

O processo de utilização de forças eletrostáticas para formar fibras sintéticas é conhecido há mais de 100 anos. Durante o processo de eletrofiação, um campo eletrostático forte é aplicado a uma solução de polímero mantida em uma seringa com uma saída capilar. A repulsão entre as cargas na superfície da gota na ponta capilar compete com a tensão superficial, que tende a estabilizar a queda. Quando a tensão ultrapassa um valor limite, a força elétrica supera a tensão superficial da gota e um jato carregado da solução é ejetado tomando uma forma cônica, conhecida como cone Taylor. À medida que o jato se move em direção ao coletor, o solvente evapora e uma matriz interconectada de pequenas fibras se forma no coletor aterrado. Os diâmetros das fibras de polímero estão ao redor de nanômetros, de poucas dezenas de nanômetros a micrômetros [39, 40].

A capacidade de produzir facilmente materiais nesta escala de tamanho biológico criou um renovado interesse em eletrofiação para aplicações em engenharia de tecidos e entrega de fármacos [41].

Uma configuração típica do aparelho de eletrofiação consiste em um capilar através do qual o líquido a ser eletrofiado é forçado; uma fonte de alta tensão com polaridade positiva ou negativa, que injeta carga no líquido e um coletor aterrado (Fig. 3). Uma bomba de seringa, é tipicamente utilizada para forçar o líquido através de um capilar de pequeno diâmetro formando uma gota pendente na ponta. Um eletrodo da fonte de alta tensão é ligado diretamente ao capilar utilizando-se uma agulha metálica. A fonte de tensão é então ligada e a carga é injetada na solução de polímero [42].

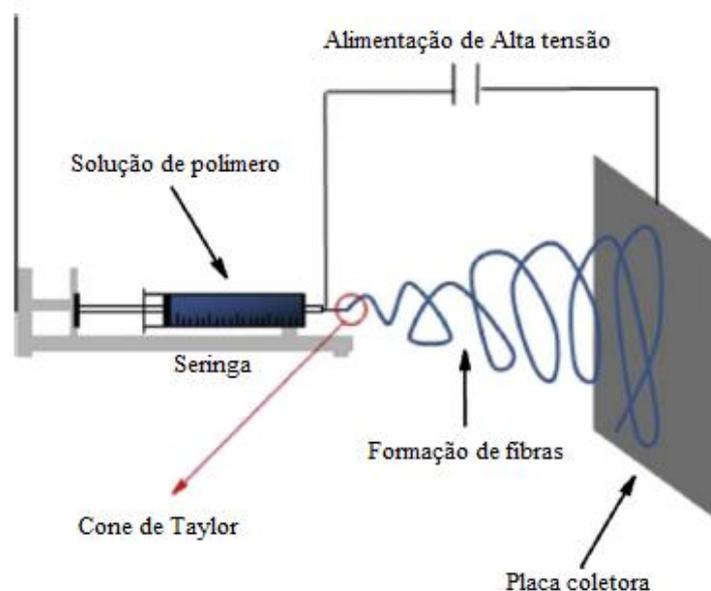


Figura 3 Diagrama esquemático do aparelho de eletrofição

Fonte: Adaptado de JENNINGS et al., 2017 [30]

3.4.1- Parâmetros que afetam a eletrofição

Existem vários fatores que afetam o processo de eletrofição. Estes fatores são classificados como parâmetros para a eletrofição, solução e parâmetros ambientais. Fazem parte dos parâmetros de eletrofição o campo elétrico aplicado, a distância entre a agulha e o coletor, a taxa de fluxo e o diâmetro da agulha. Os parâmetros da solução incluem o solvente, a concentração do polímero, a viscosidade e a condutividade da solução. Já os parâmetros ambientais dizem respeito à umidade relativa e a temperatura. Todos estes parâmetros afetam diretamente a geração de fibras de eletrofiadas lisas e livres de grânulos. Portanto, para obter uma melhor compreensão da técnica de eletrofição e fabricação de nanofibras poliméricas, é essencial para compreender completamente os efeitos de todos estes parâmetros de governo [41].

3.4.1.1- Efeito da voltagem aplicada

Sabe-se que no processo de eletrofição, a aplicação de um fluxo de corrente de alta tensão em uma solução polimérica por meio de uma agulha metálica, fará com que ocorra a formação de uma gota esférica, chamada cone de *Taylor*. Essa gota esférica resultará na produção de fibras ultrafinas quando atingida uma tensão crítica. Este valor crítico da tensão aplicada varia de polímero para polímero [41].

Jabur et al. (2015) [43] investigou o efeito da tensão aplicada nos diâmetros das fibras obtidas. Para isso, ele variou a tensão entre 5 a 25 kV quando eletrofiou uma solução de PVA e manteve sempre os outros parâmetros de processo constantes. Como resultado, pode-se verificar que o diâmetro das fibras diminuiu com o aumento do campo elétrico aplicado. A uma tensão de 5kV, o diâmetro médio obtido foi de aproximadamente 910 nm, sendo que a uma tensão de 25kV alcançou-se diâmetros médio de apenas 150nm.

A formação de nanofibras de menor diâmetro com um aumento na tensão aplicada é atribuída ao alongamento da solução polimérica, visto que há uma maior repulsão de carga dentro do jato. Porém, um aumento na tensão aplicada para além do valor crítico irá resultar na formação de *beads* ou nanofibras. A formação de *beads* com o aumento na tensão aplicada é atribuída à diminuição do tamanho do cone de Taylor e ao aumento na velocidade do jato [41].

3.4.1.2 Efeito da taxa de alimentação

O fluxo com que a solução polimérica atravessa a ponta da agulha metálica determina a morfologia das nanofibras eletrofiadas. Nanofibras uniformes e livre de *beads* podem ser preparadas quando encontrada a taxa de alimentação crítica de uma determinada solução polimérica. Este valor crítico varia com o sistema e o polímero. Aumentar a taxa de alimentação para além de um valor crítico pode não só levar ao aumento diâmetro médio das fibras, como também pode acarretar na formação de *beads* (devido à secagem incompleta do jato de nanofibras durante o “voo” entre a ponta da agulha e o coletor metálico) [41].

Para examinar o efeito da taxa de alimentação no diâmetro das nanofibras, Jabur et al. (2015) [43] realizou alguns experimentos. Uma solução contendo 10% em massa de PVA foi eletrofiada, variando-se a taxa de alimentação e mantendo constante as outras variáveis. Nesse caso, quando a taxa de alimentação foi aumentada para $0,10 \text{ mLh}^{-1}$ obteve-se nanofibras não uniformes, superficiais e ocorreu a formação de *beads*. Contudo, quando a taxa de alimentação foi aumentada para $0,2 \text{ mLh}^{-1}$, formaram-se nanofibras homogêneas e isentas de defeitos [43]. Uma vez que os aumentos e as diminuições da taxa de alimentação afetam a formação e diâmetro da nanofibra, é preferida uma taxa mínima que mantenha um equilíbrio entre a solução polimérica que sai e a substituição dessa solução por uma nova durante a formação do jato. Isto também permitirá a formação de um cone de *Taylor* estável.

3.4.1.3- Efeito da distância entre agulha e coletor e diâmetro da agulha

A distância entre a ponta da agulha e o coletor desempenha um papel essencial na determinação da morfologia de uma nanofibra eletrofiada. Semelhante ao campo elétrico, à viscosidade e a taxa de alimentação aplicada, a distância entre a ponta da agulha e o coletor também varia com o sistema polimérico. A morfologia da nanofibra pode ser facilmente afetada pela distância pois determinará o tempo que o solvente tem para evaporar antes da solução atingir o coletor. Assim, é necessário manter uma distância crítica para que seja possível obter nanofibras eletrofiadas lisas e uniformes, sendo que, quaisquer alterações em ambos os lados da distância crítica afetarão a morfologia das nanofibras [41].

Em um estudo realizado por Jaubor *et al* (2015) [43] pode-se observar que, quando se aumenta a distância entre a ponta da agulha e o coletor, o diâmetro médio da fibra tem uma leve tendência a diminuir. Em distâncias de 4 cm, por exemplo, obteve-se nanofibras com diâmetros médios de 875 nm, enquanto que a distâncias de 20 cm, obteve-se nanofibras com diâmetros de apenas 250 nm. Possivelmente, isso se deve ao fato de que, distâncias maiores aumentam o tempo de ejeção do jato até o coletor, dando tempo suficiente para o solvente evaporar completamente. Uma distância muito pequena pode fazer com que ainda fibras úmidas atinjam o coletor.

3.4.1.4- Efeitos da concentração de polímero e da viscosidade da solução

A concentração e a viscosidade da solução são dois fatores inter-relacionados na eletrofiação. Por meio da competição entre a viscosidade e a tensão superficial, o aumento do diâmetro com a concentração pode ser explicado. Quando a concentração da solução polimérica é baixa, o campo elétrico aplicado e a tensão superficial faz com que as cadeias poliméricas quebrem em fragmentos antes de alcançar o coletor. Estes fragmentos provocam a formação de *beads* ou nanofibras com *beads*. Aumentar a concentração da solução polimérica levará a um aumento na viscosidade, o que aumenta então o entrelaçamento das cadeias poliméricas. Estes entrelaçamentos superam a tensão superficial e, em última análise, resultam em nanofibras eletrofiadas sem *beads* e uniformes. Além disso, o aumento da concentração para além de um valor crítico (a concentração na qual são formadas nanofibras uniformes e sem *beads*) dificulta o fluxo da solução atravessar a ponta da agulha (a solução de polímero seca na ponta da agulha metálica e bloqueia-a) o que resulta em defeitos ou nanofibras com *beads* [44].

3.4.1.5- Efeito da condutividade da solução

A condutividade da solução não só afeta a formação do cone de Taylor, como também ajuda a controlar o diâmetro das nanofibras. Em soluções com menor condutividade, a superfície da gota não terá carga para formar um cone de Taylor, como resultado, não haverá eletrofiação. Aumentar a condutividade da solução para um valor crítico não só aumentará a carga na superfície da gota para formar o cone de Taylor, mas também causará uma diminuição no diâmetro da fibra. Aumentar a condutividade para além de um valor crítico irá novamente impedir a formação de cone de Taylor e a eletrofiação. A condutividade de uma solução de polímero pode ser controlada pela adição de um sal apropriado à solução. A adição de sal afeta o processo de eletrofiação de duas maneiras: (a) aumenta o número de íons na solução de polímero, o que resulta no aumento da densidade de carga superficial do fluido e da força eletrostática gerada pelo campo elétrico aplicado e (b) aumenta a condutividade da solução polimérica, o que resulta na diminuição do campo elétrico tangencial ao longo da superfície do fluido [41].

3.4.1.6- Papel do solvente na eletrofiação

A seleção do solvente é um dos fatores-chave para a formação de nanofibras de eletrofiadas uniformes e isenta de *beads*. Geralmente, duas coisas precisam ser mantidas em mente antes de selecionar o solvente. Em primeiro lugar, os solventes preferidos para o processo de eletrofiação são aqueles capazes de solubilizar completamente o polímero. Em segundo lugar, o solvente deve ter um ponto de ebulição moderado. Seu ponto de ebulição dá uma ideia sobre a volatilidade de um solvente. Geralmente, os solventes voláteis são preferidos, pois as suas elevadas taxas de evaporação estimulam a fácil evaporação do solvente das nanofibras durante o seu voo da ponta da agulha para o coletor. Contudo, os solventes altamente voláteis são maioritariamente evitados porque os seus pontos de baixa ebulição e as elevadas taxas de evaporação provocam a secagem do polímero na ponta da agulha. Esta secagem bloqueará a ponta da agulha e, portanto, impedirá o processo de eletrofiação. Da mesma forma, os solventes menos voláteis também são evitados porque os seus pontos de ebulição elevados impedem a sua secagem durante o voo de jato de nanofibras. A deposição de nanofibras que contêm solvente no coletor causará a formação de nanofibras com *beads* [41].

3.4.1.7 - Efeito da umidade

Além dos parâmetros de eletrofição e solução, recentemente, tem sido relatado que fatores ambientais como a umidade relativa também afeta o diâmetro e a morfologia das nanofibras. A umidade causa mudanças no diâmetro das nanofibras, controlando o processo de solidificação do jato carregado. Este fenômeno é, contudo, dependente da natureza química do polímero. Casper et al., (2004) [45] analisaram o efeito da umidade em uma solução a 35% em massa de poliestireno dissolvida em THF. Para isso, ele usou diferentes faixas de umidade, variando de 35% a 72%, sendo este o único fator alterado durante a eletrofição. Os dados obtidos mostraram que, à medida que a umidade aumenta, o diâmetro dos poros e a distribuição dos tamanhos dos poros também aumenta.

A Tabela 1 apresenta de forma resumida o efeito que possivelmente ocorrerá na morfologia da nanofibra quando altera-se as variáveis do processo.

Tabela 1. Efeitos dos parâmetros de eletrofição na morfologia da fibra

Parâmetro	Efeito na morfologia da fibra
Com o aumento da voltagem aplicada	Inicialmente diminui o diâmetro da fibra, em seguida aumenta
Com a diminuição da taxa de alimentação	Diminui o diâmetro da fibra (ocorrem <i>beads</i> se a taxa de alimentação é muito alta)
Com a diminuição da distância entre o capilar e o coletor	Aumenta o diâmetro da fibra (ocorrem <i>beads</i> se a distância ente o capilar e o coletor é muito pequena)
Elevada concentração do polímero (viscosidade)	Diâmetro da fibra aumenta (a uma distância adequada)
Com o aumento da condutividade da solução	Diminui o diâmetro da fibra
Quando o solvente apresenta alta volatilidade	As fibras exibem microestrutura (poros em suas superfícies, o que pode aumentar a área superficial)

Fonte: Adaptada de (SILL et al., 2008) [41]

3.5 Blendas de Quitosana/PEO

A modificação de polímeros existentes se desenvolveu bastante ao longo da última década devido aos menores custos e tempo envolvidos na obtenção de novos polímeros. Uma blenda pode ser definida como uma mistura preparada a partir de pelo menos dois polímeros estruturalmente diferentes que interagem sem formação de ligação covalente. Uma das principais vantagens desta abordagem é que são obtidos materiais com propriedades diferentes dos polímeros originais. A mistura pode ser formada por diferentes métodos: mistura física de dois polímeros em condições de

fusão, dissolução em um solvente comum ou polimerização *in situ* na qual ocorre a polimerização de monômeros na presença de um polímero [46].

O poli (óxido de etileno) (PEO) é um poliéter semi-cristalino, biocompatível, possui baixa toxicidade, é bastante solúvel em água devido as ligação de hidrogênio e um dos poucos polímeros sintéticos aprovados para uso interno em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos [47]. Além disso, devido à existência de ligações C-O em sua estrutura, este polímero pode se ligar facilmente a outros, dando origem a misturas poliméricas homogêneas [46, 48]

Embora a quitosana tenha muitas vantagens visíveis como biomaterial e alguns autores tenham tido sucesso em obter fibras eletrofiadas desse polímero puro, a eletrofiação da quitosana geralmente é limitada. Isso ocorre principalmente devido à sua natureza policatiônica na solução, estrutura química rígida e interações inter e intra-moleculares específicas. A formação de fortes ligações de hidrogênio pode impedir a livre circulação de segmentos da cadeia polimérica expostos ao campo elétrico, levando a quebra de jato durante o processo. Além disso, a força repulsiva entre os grupos iônicos no esqueleto do polímero dificulta a formação de emaranhados de cadeia suficientes para permitir a formação contínua de fibras durante o alongamento, chicoteamento e flexão do jato, geralmente resultando em nanobeads em vez de nanofibras [49, 48, 50].

Um dos métodos mais bem-sucedidos utilizados para melhorar a eletrofiação da quitosana misturando-a com uma segunda fase polimérica natural ou sintética. Este agente de cofiação é usualmente um polímero facilmente eletrofiável, como PEO. A segunda fase pode ser adicionada na gama de 10 e 90% em peso [47, 48].

Para a aplicações biomédicas dessas membranas, é preferível que se use a menor quantidade da segunda fase polimérica possível, com o intuito de se manter as propriedades particulares da quitosana, como sua capacidade antimicrobiana [47, 48]. Dessa forma, essas membranas poderão ser excelentes candidatas para aplicações em curativo para feridas.

3.6 Nanofibras de quitosana como curativo para feridas e liberação controlada de fármaco

As nanofibras produzidas pelo método de eletrofiação possuem alta porosidade, alta área superficial específica, e são capazes de imitar a matriz extracelular natural, o que as torna excelentes candidatos para aplicações de biomateriais. As membranas eletrofiadas à base de quitosana aparecem hoje como um biomaterial emergente em aplicações de cura para feridas [7].

Em um estudo realizado por Chen et al. (2008) [38] foi avaliada a capacidade de utilização da membrana eletrofiada da blenda de Quitosana/PEO como curativo para ferida. As matrizes mostraram excelente biocompatibilidade com a pele, sem citotoxicidade e mostraram ser um bom

suporte para a proliferação celular. Além disso, em comparação com curativos convencionais, o *scaffold* produzido apresentou melhor tempo de cicatrização e maior facilidade de produção.

Trinca et al. (2017) [6] produziu matrizes tridimensionais de camada dupla, constituídos por camadas eletrofiadas de PCL + Quitosana/PEO, sendo a blenda de Quitosana/PEO projetada para estar em contato direto com a pele e a matriz de PCL para melhorar as propriedades mecânicas desse *scaffold*. Verificou-se que a potencialidade de aplicação do *scaffolds* produzido para o tratamento de feridas na pele. As matrizes produzidas foram capazes de inchar até 370% sem qualquer perda mecânica ou estrutural devido à expansão, sendo esta característica atribuída à sua alta porosidade (aproximadamente 85%), que também contribuiu fortemente para a elevada taxa de permeação de vapor de água observada (cerca de 730 g/m²/dia), tornando-os adequados para o tratamento de feridas exsudativas. Mais importante, o ensaio de contato direto mostrou que os *scaffolds* produzidos não são citotóxicos para as células, uma vez que a percentagem de células viáveis permaneceu acima de 84%. Uma redução da viabilidade maior que 30% seria considerado um efeito citotóxico. Além disso, as propriedades mecânicas dos *scaffolds* desenvolvidos estavam em concordância com os requerimentos normais de pele.

Para além das várias características relevantes e atrativas encontradas nas matrizes produzidas com blendas de quitosana, é possível melhorar ainda mais o seu desempenho incorporando compostos farmacêuticos e outras moléculas bioativas. A incorporação de fármacos no *scaffold* de nanofibras pode proporcionar um sistema de administração de fármaco bastante eficiente com uma área superficial elevada para uma libertação controlada, dependendo do tamanho e densidade dos poros, bem como da taxa de degradação do biopolímero. De fato, materiais com propriedades cicatrizantes, antibacterianas e anti-inflamatórias podem ser incorporados em um *scaffold* com o objetivo de proporcionar uma liberação do fármaco diretamente no local do tecido lesado da forma mais fisiologicamente aceitável [28].

Em geral, quanto menor as dimensões do fármaco e o material de revestimento necessário para encapsular o medicamento, melhor o medicamento será absorvido pelo organismo humano. O fornecimento de fármaco com nanofibras de polímero baseia-se no princípio de que a taxa de dissolução de um fármaco em partículas aumenta com o aumento da área superficial tanto do fármaco como do transportador correspondente [51].

Devido a características excepcionais das nanofibras, como a relação superfície/volume extremamente alta, as nanofibras de polímero obtidas por meio de eletrofiação foram propostas para uma variedade de aplicações, especialmente nos sistemas de liberação de fármacos. Em comparação com outras formas de dosagem, foram reconhecidas várias vantagens de usar nanofibras de polímero eletrofiados. Os compostos terapêuticos podem ser convenientemente incorporados nos polímeros

transportadores utilizando a eletrofição. O perfil de liberação de fármaco pode ser finamente adaptado por uma modulação sobre a morfologia, porosidade e composição da membrana nanofibras. O diâmetro muito pequeno das nanofibras pode fornecer um curto comprimento de passagem de difusão. E a alta área de superfície é útil para uma transferência de massa e liberação eficiente de medicamentos [51].

Alavarse et al. (2017) [28] incorporou a tetraciclina em *scaffolds* eletrofiados de blendas de Quitosana/PVA. A incorporação do fármaco antibiótico nas nanofibras pelo processo de eletrofição não alterou sua atividade antibiótica nem as propriedades morfológicas da matriz eletrofiada, quando se comparou matrizes sem e com a tetraciclina. Verificou-se, por meio de testes de perfil de liberação de fármaco, que 80% da quantidade total de tetraciclina incorporada nas matrizes de nanofibras foi administrada ao longo de um intervalo de tempo de 24h, o que corresponde ao período de incubação para a análise do crescimento de bactérias. Essa quantidade de liberação foi suficiente para inibir o crescimento das bactérias. O efeito antibacteriano foi mais eficiente contra a *S.epidermidis* e *S.aureus Gram-positivas* do que para a *E.coli Gram-negativa*, principalmente devido à sua estrutura de parede celular diferente. Além disso, o tamanho sub-micrômetro dos poros apresentados nas matrizes tridimensionais eletrofiadas podem impedir que o tecido lesionado seja penetrado por qualquer bactéria exógena.

Um medicamento indicado para o tratamento de infecções da pele com pouco estudo quanto a sua aplicação junto a biomateriais é o sulfato de neomicina.

3.7 Sulfato de Neomicina

Os antibióticos aminoglicosídeos são parte importante do arsenal terapêutico antibacteriano desde seu descobrimento, na década de 40. Os estudos que culminaram com o descobrimento desta nova classe de antibióticos iniciaram-se em 1939, no Departamento de Microbiologia da Unidade de Agricultura Experimental da Universidade Rutgers, de New Jersey, nos Estados Unidos. Os aminoglicosídeos têm massa molecular que varia de 445 a 600 daltons, são altamente solúveis em água, estáveis em pH 6 a 8 e possuem estrutura polar catiônica, o que impede a sua absorção oral e dificulta sua penetração no espaço intracelular ou através da barreira hematoencefálica. Sua atividade antimicrobiana ocorre principalmente em meio aeróbio e em pH alcalino, pois necessita de oxigênio para transporte ativo nas células microbianas e é mais ativo em meio alcalino do que ácido. A farmacocinética de todos os aminoglicosídeos é bastante semelhante. Devido a sua natureza polar, são pouco absorvidos pelo trato gastrintestinal, sendo que menos de 1% da dose é absorvida após administração oral ou retal. A principal via de administração é, portanto, parenteral, com a droga

atingindo concentração plasmática máxima depois de 30-90 minutos da aplicação intramuscular, e 30 minutos após sua injeção intravenosa [52].

A neomicina, que é principalmente usada como sulfato, é um antibiótico aminoglicosídeo de grande amostragem, amplamente utilizado, produzido durante a fermentação de *Streptomyces fradiae*. É um composto básico, mais ativo em uma reação alcalina e termicamente estável. É solúvel em água e insolúvel em solventes orgânicos. Ele mantém a sua eficácia em solução aquosa e outros veículos em comparação com outros antibióticos. Inibe o crescimento de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, especialmente microbactérias, mas não é ativa contra fungos. O sulfato de neomicina é composto principalmente de uma mistura de neomicina B e seu estereoisômero neomicina C. A potência antimicrobiana da neomicina C é inferior à da neomicina B, exigindo um limite para a neomicina C em amostras comerciais. O sulfato de neomicina é usado em muitos medicamentos tópicos, como cremes, unguentos e colírios [53, 54, 55, 56].

Propõe-se no presente trabalho aliar as qualidades curativas da quitosana com a capacidade de combater bactérias do antibiótico sulfato de neomicina, eletrofiando o fármaco juntamente com a matriz polimérica e também depositando o mesmo nas membranas eletrofiadas, a fim de avaliar a capacidade dessas membranas como curativo para feridas.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Percival, Nicholas J. Classification of wounds and their management. **The Medicine Publishing Company Ltd.** v. 20, n. 5, p. 114-117, 2002. DOI: <http://dx.doi.org/10.1383/surg.20.5.114.14626>

[2] Rezende, Camila A., Lushesi C., Barbo, Maria de Louders P, Duek, Eliana A. R. Membranas de Poli (Ácido Lático-Co-Ácido Glicólico) como curativos para pele: Degradação *in vitro* e *in vivo*. **Polímeros e Tecnologia**, v. 15, n 3, p. 323-238, 2005.

[3] Blanes, L. Tratamento de feridas. Baptista-Silva JCC, editor. Cirurgia vascular: guia ilustrado. São Paulo: 2004.

[4] Ashfaq M., Verma N., Khan S. Highly effective Cu/Zn-carbon micro/nanofiber-polymer nanocomposite-based wound dressing biomaterial against the *P. aeruginosa* multi-and extensively drug-resistant strains. **Material Science & Engineering**. 2017.
DOI: [10.1016/j.msec.2017.03.187](https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.187)

[5] Gunes S., TIHMNHUOGLU, Funda. *Hypericum perforatum* Incorporated Chitosan Films as Potential Bioactive Wound Dressing Material. **Biological Macromolecules**, 2017
DOI: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.04.080>

- [6] Belini M. Z., Pires A. L.R., Vasconcelos M. O., Moraes A. M. Comparison of the properties of compacted and porous lamellar chitosan-xanthan membranes as dressings and scaffolds for the treatment of skin lesions. **Journal of Applied Polymer Science**. Wiley Periodicals, Inc. p. 1-11, 2012
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.199>
- [7] Dumitriu, Severian. **Polymeric Biomaterials**. 2º Edição. Sherbrooke, Quebec, Canada. Marcel Dekker, Inc., 2002
- [8] Trinca R. B., Westin C. B., Fracassi-da-Silva J. A. F., Moraes A. M. Electrospun multilayer chitosan scaffolds as potential wound dressings for skin lesions. **European Polymer Journal**. Elsevier. v. 88, p. 161-170, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.01.021>
- [9] Crosier F., Jeromo C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. **European Polymer Journal**. Elsevier. v. 49, n. 4, p. 780-792, 2013
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2012.12.009>
- [10] Nune S. K., Rama K. S., Dirisala V. D., Chavali M. Y. Electrospinning of collagen nanofiber scaffolds for tissue reparation and regeneration. **Chapter 11: Nanostructures for novel therapy**, p. 281-311, 2017
- [11] Pilehrood M. K., Dilamian M, Mirian M., Sadeghi-Aliabadi H., Maleknia L., Nousiainem P., Harlin A. Nanofibrous Chitosan-Polyethylene Oxide Engineered Scaffolds: A comparative Study between simulated structural characteristics and cells viability. **BioMed Research International**. 2014
- [12] Yuan T.T., Jnekins P. M., Foushe A. M. D., Jockheck-Clark A.R., Stahl J., Electrospun Chitosan/Polyethylene oxide nanofibrous scaffolds with potential antibacterial wound dressing applications. **Journal of Nanomaterials**, 2016. Doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/6231040>
- [13] Garcia-Orue I, Gainza, G., Gutierrez F. B., Arguirre J. J., Evora C., Pedraz J. L., Hernandez R. M., Deslgado A., Igartua M. Novel nanofibrous dressing containing rgEGF and aloe vera for wound healing application. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 523, p. 556-566, 2017
Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.11.006>
- [14] Fazli Y., Shariatina, Z. Controlled release of cefazolin sodium antibiotic drug from electrospun chitosan-polyethylene oxide nanofibrous mats. **Materials Science e engineering**, 2016. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.10.048>
- [15] Gowda A. D. V., Gowrav M. P., Srivastava A., Osmani R. A. M. A study of chitosan nanofibers containing neomycin sulfate for wound healing activity. **Der Pharmacia Lettre**, v. 8, p. 128-139, 2016

[16] Nitanan T., Akkaramongkolporn P, Rojanarta T., Ngawhirunpat T., Opanasopit P. Neomycin-loaded poly(styrene sulfonic acid-co-maleic acid) (PSSA-MA)/polyvinyl alcohol (PVA) ion exchange nanofibers for wound dressing materials. **International journal of pharmaceutics**, v. 448, p. 71-78, 2013

[17] Kamoun E. A., Kenawy E. S., Chen X. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. **Journal of Advanced Research**, Cairo University. v. 8, p. 217-233, 2017.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.01.005>

[18] Neves N. M. **Electrospinning for advanced biomedical applications an therapies**. 1^o Edição. United Kingdom. Smithers Rapra Technology Ltd, 2002.

[17] Boateng J. S., Matthews K. H., Stevens H. N.E., Eccleston G. M. Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 97, n. 8, p. 2892-2923, 2008.
DOI: 10.1002/jps.21210

[20] demidova-Rice T. N., Hamblin M. R., Herman I. M. Acute and impaired wound healing: Pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic wounds: Biology, Causes, and Approches to Care. **Wound Care Journal: Advances in Skin and Wound Care**. v. 25, n. 7, p. 304-314, 2012.
DOI:10.1097/01.ASW.0000416006.55218.d0

[21] Bolton L., Rijswijk L. V. Wound dressings: Meeting clinical and biological needs. **Dermatology Nursing**. v. 3, n. 1, p. 146-161, 1991.

[22] Lazarus G. S., Cooper D. M., Knighton D. R., Margolis D. J. Pecoraro R. E., Redeaheaver G., Robson M. C. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. **Arch Dermatol**. v. 130, p. 489-493, 1994.
DOI: 10.1001/archderm.1994.01690040093015

[23] Jones V., Grey J. E., Harding K. G. ABC of Wound healing: Wound dressings. **Journal BMJ**, v. 332, p. 777-780, 2006
DOI: 10.1136/bmj.332.7544.777

[24] Seal B.L., Oter T.C., Panitch A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration: Review. **Reports: A review Journal: Materials Science and Engineering R**. Elsevier. v. 34, p. 147-230, 2001
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0927-796X\(01\)00035-](https://doi.org/10.1016/S0927-796X(01)00035-)

- [25] Azevedo V.V.C., Chaves S. A., Bezerra D. C., Lia-Fook M. V., Costa A. C. F., Quitina e Quitosana: Aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**. v. 2, n. 3, p. 27-34, 2007
- [26] Griffith L. G., Polymeric Biomaterials. **Acta Materialia**. Pergamon. v. 48, p. 263-277, 2000
DOI: [https://doi.org/10.1016/S1359-6454\(99\)00299-2](https://doi.org/10.1016/S1359-6454(99)00299-2)
- [27] Alavarse A. C., Silva F. W. O.; Colque J. T., Silva T. P., Venancio E. C., Bonvent J. J. Tetracycline hydrochloride-loaded electrospun nanofibersmats based on PVA and chitosan for wound dressing. **Materials Science and Engineering**. Elsevier. v.77, p. 271-281, 2017 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.199>
- [28] Jennings A J., Bumgardner J. D. Chitosan Based Biomaterials. **WP – Woodhead Publishing**. Elsevier. v. 1, p. 1-325, 2017.
- [29] Jayakumar R., Prabakaran M., Kumar P. T., Nair S.V., Tamura H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. **Biotechnology Advances**. Elsevier Inc. v. 29, p. 322-337, 2011.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.005>
- [30] He P., Davis S. S., Illum L. In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**. Elsevier. v. 166, p. 75-68, 1998
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(98\)00027-1](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(98)00027-1)
- [31] Rao S. B., Sharma C. Use of chitosan as a biomaterial: Studies on its safety and hemostatic potencial. **Journal of Biomedical Materials Research**. v. 34, p. 21-28, 1997
DOI: 10.1002/(SICI)1097-4636(199701)34:1<21::AID-JBM4>3.0.CO;2-P
- [32] Smith J., Wood E., Dornish M. Effect of chitosan on epithelial cell tight junctions. **Pharmaceutical Research**. v. 21, n. 1, 2004
DOI: DOI: 10.1023/B:PHAM.0000012150.60180.e3
- [33] Sudarshan N.R., Hooper D.G., Knorr D. Antibacterial action of chitosan. **Food Biotechnology**. v. 6. n. 3, p. 257-272, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/08905439209549838>
- [34] Chung Ying-Chien, Chen, Chih-Yu. Antibacterial characteristics and activity of acid of acid-soluble chitosan. **Bioresource Technology**. Elsevier. v. 99, p. 2806-2814, 2008.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.044>
- [35] Okamoto Y., Kawakami K., Miyatake K., Morimoto M., Shigemasa Y., Minami S. Analgesic effects of chitin e chitosan. **Carbohydrate Polymers**. v. 49, p. 249-252, 2002.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(01\)00316-2](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(01)00316-2)

- [36] Chen Jyh-Ping, Chang Gwo-Yun, Chen, Jan-Kan. Electrospun collagen/chitosan nanofibrous membrane as wound dressing. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**. Elsevier. p. 313-314, 2008
DOI:10.1016/j.colsurfa.2007.04.129
- [37] Macagnano A., Zampetti E., Kny E. **Electrospinning for High Performance Sensors**. Springer International Publishing Switzerland, 2015
DOI: 10.1007/978-3-319-14406-1
- [38] Zeng, J. Z., Chen X., Liang Q., Bian X., Yang L., Jing X. Biodegradable electrospun fibers for drug delivery. **Journal Controlled Release**. Elsevier. v. 92, p. 227-231, 2003.
- [39] Sill T. J., Recum H. A. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. **Biomaterials**. Elsevier. v. 29, p. 1989-2006, 2008.
DOI:10.1016/j.biomaterials.2008.01.011
- [40] Wendorff J. H., Agarwal S., Greiner A. **Electrospinning**. Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, Boschstr, 2012.
- [41] Jabur A., Abbas L. K., Muhi S. M. The Effects of Operating Parameters on the Morphology of Electrospun Poly vinyl Alcohol Nanofibres. **Journal of University of kerbala**. p. 35-46, 2015
- [42] Mousavi R., Sharif F. Investigation Of Effect Of Electrospinning Parameters On Morphology Of Polyacrylonitrile/Polymethyl Methacrylate Nanofibers. **Journal of Macromolecular Science Part B**. 2015
DOI: 10.1080/00222348.2015.1042628
- [43] Casper C. L., Stephens J. S., Tassi N. G., Chase B. D. Rabolt J. F. Controlling Surface Morphology of Electrospun Polystyrene Fibers: Effect of Humidity and Molecular Weight in the Electrospinning Process. **Macromolecules**. American Chemical Society. v. 37, n. 2, p. 573-578, 2004
DOI: 10.1021/ma0351975 CCC
- [44] Neto C. G. T., Dantas, T. N. C., Fonseca, J. L. C., Pereira, M. R. Permeability studies in chitosan membranes. Effects of crosslinking and poly(ethylene oxide) addition. **Carbohydrate Research**. V. 340, p. 2630-2636, 2005
- [45] Bhattarai N., Edmondson D., Veiseh O., Matsen F. A., Zhang, M. Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility. **Biomaterials**. v. 26, p. 6176-6184, 2005.
- [46] Pakravan M., Heuzey Marie-Claude, Ajji A. A fundamental study of chitosan/PEO electrospinnig. **Polymer**. 52(2011) 1813-4824.

[47] Bostan M. S., Mutlu E. C., Comprehensive characterization of chitosan/PEO/levan ternary blend films. **Carbohydrate Polymers** (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.096>

[48] Sedghi R., Shaabani A., Mohammadi Z., Samadi E. I. Biocompatible electrospinning chitosan nanofibers: A novel delivery system with superior local cancer therapy. **Carbohydrate Polymers**, v. 159, p 1-10, 2017.

[49] Huang Z.; Zhang Y.; Kotaki M.; Ramakrishna S. "A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites", **Comp. Sci. Technol.** v. 63, p. 2223-2253, 2003

[50] Oliveira J. F., Cipullo J. P., Burdmann E. A. Neurotoxicidade dos aminoglicosídeos. **Braz J Cardiovasc Surge.** v. 12, issue 4, p. 444-452, 2006

[51] Adams E., Liu L., Dierick K., Guyimard S., Nabet P., Rico S., Louis P., Roets E., Hoogmartens J. Neomycin: microbiological assay or liquid chromatography? **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 17, p. 757-766, 1998

[52] Wwaksman S. A., Lechevalier H. A. Neomycin, a new antibiotic active against streptomycin-resistant bacteria, including tuberculosis organisms. **Science.** V. 109, p. 305-305, 1949.

[53] Stypulkowka, K., Blazewicz, A., Fijalek, Z., Warowna-Grzeskiewicz, M., Srebrzynska, K., Determination of neomycin and related substances in pharmaceutical preparations by reversed-phase high performance liquid chromatography with mass spectrometry and charged aerosol detection. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 76, p. 207-214, 2013

[54] Sehrish Jabeen, Atif Islam, Abdul Ghaffar, Nafisa Gull, Ayesha Hameed, Anbreen Bashir, Tahir Jamil, Tousif Hussain, Development of a novel pH sensitive silane crosslinked injectable hydrogel for controlled release of neomycin sulfate, **International Journal of Biological Macromolecules**. DOI [doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.014](http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.014)

[55] Andrade, Sônia Maria Belísio. **Eletrofição e caracterização de membranas biopoliméricas a base de quitosana extraídas dos exoesqueletos de crustáceos**. 128f. Trabalho de conclusão de curso (Tese) – Engenharia mecânica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012

[56] Sato, Tabata Prado. Obtenção e caracterização de nanofibras eletrofiadas via solução de quitosana com e sem inclusão de hidroxiapatita. 89f. Trabalho de conclusão de curso (Dissertação) – Odontologia, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2015.

CAPÍTULO 2

INCORPORAÇÃO DE PEO EM QUITOSANA PARA OBTENÇÃO DE NANOFIBRAS POLIMÉRICAS POR ELETROFIAÇÃO

RESUMO: As nanofibras podem ser produzidas pelo método de eletrofiação, uma técnica simples, econômica e versátil que utiliza uma força elétrica para gerar fibras nanométricas a partir de uma solução polimérica. A quitosana é um polímero atóxico, biodegradável, biocompatível, obtido por meio de fontes naturais renováveis que vem despertando o interesse de pesquisadores. No entanto, devido à dificuldade de eletrofiação desse material puro, tem-se buscado aliar o poli (óxido de etileno) PEO à matriz polimérica da quitosana, a fim de se facilitar o processo de obtenção de fibras. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar diferentes proporções de quitosana e PEO nas soluções poliméricas a fim de se obter nanofibras eletrofiadas contendo a menor quantidade possível de PEO na blenda. Os parâmetros de processo também foram avaliados e os que mostraram melhor resultado foi uma concentração de 4% (m/v) de quitosana e 2% (m/v) de PEO, tensão aplicada de 18kV e distância entre o coletor e agulha de 20cm. O poli (óxido de etileno) mostrou-se excelente como auxiliador na fiação da quitosana, sendo possível obter fibras contendo somente 10% (v/v) de PEO na blenda, sendo que as mesmas apresentaram diâmetro médio de apenas 900nm. As nanofibras obtidas foram caracterizadas por meio de análises físico químicas, as quais mostraram que a mistura desses polímeros alterou suas propriedades naturais como estabilidade térmica, ponto de fusão e cristalinidade. A incorporação de pequenas quantidades de PEO à matriz polimérica de quitosana se mostrou, então, uma estratégia eficaz para a obtenção de nanofibras por meio do processo de eletrofiação.

Palavras chaves: Nanomateriais, Fibras poliméricas, Biopolímeros

1. INTRODUÇÃO

A eletrofiação é um método simples e eficaz para produzir membranas em escala nanométrica a partir de polímeros de origem natural e sintética. Esta técnica ganhou muita atenção devido à sua versatilidade, reprodutibilidade e elevada área superficial específica que os materiais fabricados por essa técnica produzem [1, 2]

Uma unidade de eletrofiação é composta por uma seringa conectada a uma agulha de metal, uma fonte de alta tensão, uma bomba infusora e um coletor metálico aterrado. Durante o

processo de formação de nanofibras, um campo elétrico é aplicado a uma solução polimérica mantida na seringa. A bomba infusora irá empurrar a solução a uma velocidade previamente determinada, ocorrendo a formação de uma gota na ponta da agulha. A repulsão entre as cargas na superfície da gota, devido a tensão aplicada, compete com a tensão superficial da solução, que tende a estabilizar a queda. Quando a tensão ultrapassa um valor limite, a força elétrica supera a tensão superficial da gota e um jato carregado da solução é ejetado tomando uma forma cônica, conhecida como cone Taylor. À medida que o jato se move em direção ao coletor, o solvente evapora e uma matriz interconectada de pequenas fibras se forma no coletor aterrado. [3, 4, 5]. A produção de nanofibras por eletrofiação é dependente de parâmetros de processo, tais como tipo de solvente, polímero, viscosidade da solução, concentração de polímero, condutividade, tensão superficial, interações intra / intermoleculares, tensão, vazão, distância do coletor e diâmetro da agulha [6].

Diferentes tipos de polímeros naturais e sintéticos tem sido usado no processo de eletrofiação. A quitosana, derivada N-desacetilado da quitina obtida de cascas de crustáceos por desacetilação alcalina, é um polímero natural que tem recebido atenção especial devido às suas propriedades notáveis, como não-toxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade, atividade hemostática e antibacteriana [7, 8]. Embora a quitosana tenha muitas vantagens visíveis como biomaterial, a eletrofiação desse polímero é limitada principalmente devido à sua natureza policatiônica na solução, estrutura química rígida e interações inter e intramoleculares específicas. A formação de fortes ligações de hidrogênio impede a livre circulação de segmentos da cadeia polimérica expostos ao campo elétrico, levando a quebra de jato durante o processo. Além disso, a força repulsiva entre os grupos iônicos no esqueleto do polímero dificulta a formação de emaranhados de cadeia suficientes para permitir a formação contínua de fibras durante o alongamento, chicoteamento e flexão do jato, geralmente resultando em nanobeads em vez de nanofibras [9, 10, 11]

O poli (óxido de etileno) (PEO) é um poliéter semi-cristalino, biocompatível, possui baixa toxicidade, é bastante solúvel em água através de ligação de hidrogênio e um dos poucos polímeros sintéticos aprovados para uso interno em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos [12]. Além disso, devido à existência de ligações C-O em sua estrutura, este polímero pode se complexar com outros, dando origem a misturas poliméricas homogêneas [13, 14]. Essas características têm levado à escolha desse material como segunda fase polimérica para a eletrofiação da quitosana.

Mediante ao que foi exposto, esse trabalho tem como objetivo o estudo de diferentes soluções poliméricas onde as proporções de quitosana e PEO serão avaliadas com o intuito de se obter nanofibras eletrofiadas contendo a menor quantidade possível de PEO na blenda. Os parâmetros de eletrofiação serão avaliados a fim de se determinar as melhores condições de processo e a membrana obtida será caracterizada por meio de análises físico-químicas.

2. METODOLOGIA

2.1 MATERIAIS

Uma amostra de quitosana com grau de desacetilação de 85% foi utilizada para a preparação da solução polimérica. A amostra de poli(óxido de etileno) empregado na elaboração da blenda foi doada pela UEM (Universidade Estadual de Maringá).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 PREPARO DAS SOLUÇÕES

Soluções de quitosana nas concentrações de 1%, 2%, 3%, 4% e 5% (m/v) foram preparadas com o intuito de se determinar a concentração ótima para o processo de eletrofição. Utilizou-se como solvente uma solução aquosa de ácido acético 90% (v/v). As amostras foram pesadas, diluídas e ficaram sob agitação em um agitador magnético durante 24 horas, para garantir completa dissolução do polímero. Posteriormente, foram preparadas soluções de poli (óxido de etileno) (PEO) nas concentrações de 2%, 3% e 4% (m/v) utilizando-se como solvente o ácido acético 50% (v/v). Da mesma forma, essas soluções ficaram sob agitação por 24 horas, para garantir completa dissolução do soluto. Após determinar-se a concentração de quitosana que apresentou as melhores propriedades para ser eletrofiada, a mistura desse polímero com o PEO foi avaliada.

2.2.2 PREPARAÇÃO DAS BLENDS POLIMÉRICAS

As blends de Quitosana/PEO foram preparadas partindo-se das soluções dos polímeros puros, respeitando-se as proporções, em v/v, indicadas na Tabela 1, ou seja, na razão (Quitosana:PEO) de 90:10, 80:20, 70:30, 60:40 e 50:50 para cada concentração prepara de PEO, mantendo-se a concentração de Quitosana constante. As misturas dessas soluções foram deixadas sob agitação magnética por mais 15 minutos, sendo em seguida submetidas ao processo da eletrofição nas condições de processo indicadas na Tabela 2.

Tabela 1. Condições experimentais utilizadas na preparação das blendas de Quitosana/PEO

Concentração da Quitosana (%)	Concentração do PEO (%)	Proporção Quitosana/PEO (v/v)
4	2	90:10
		80:20
		70:30
		60:40
		50:50
	3	90:10
		80:20
		70:30
		60:40
		50:50
	4	90:10
		80:20
		70:30
		60:40
		50:50

2.2.3 PARÂMETROS PARA A ELETROFIAÇÃO

Os experimentos de eletrofiação foram realizados à temperatura ambiente e a umidade relativa foi mantida entre 30 a 45%. A solução de polímero foi transferida em uma seringa de 3 mL com uma ponta capilar de diâmetro interno 0,6 mm. Um fio de cobre conectado ao eletrodo positivo foi acoplado ao capilar. Utilizou-se uma placa metálica como coletor e o mesmo foi conectado à terra. Empregou-se então uma fonte de alimentação de alta tensão para gerar o campo elétrico. A fim de obter-se uma fibra livre de *beads* e com o menor diâmetro possível, os parâmetros distância do coletor à agulha, tensão aplicada e taxa foram variados, como mostra a Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros utilizados para a eletrofiação das blendas.

Taxa de alimentação (mL.h ⁻¹)	Tensão Aplicada (kV)	Distância entre a ponta do capilar e o coletor (cm)
0,5	18	15
		18
		20
	20	15
		18
		20
	23	15
		18
		20

2.2.4 MICROSCOPIA ÓPTICA (MO)

As membranas foram analisadas utilizando-se o microscópio óptico aproximado 400x e 1000x e imagens da superfície foram registradas, o que nos permitiu avaliar se ocorreu ou não a formação de *beads* e determinar o diâmetro média das fibras obtidas.

2.2.5 TERMOGRAVIMETRIA (TGA)

As curvas de TGA e suas primeiras derivadas (DTG) foram obtidas em um aparelho da Perkin Elmer, modelo STA 6000 com taxa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, intervalo de temperatura entre 30°C e 600°C sob atmosfera de nitrogênio com vazão de $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. As massas de corpos de prova utilizadas foram de aproximadamente 10 mg para as membranas resultantes das blendas eletrofiadas

2.2.6 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

As curvas de DSC foram obtidas em um aparelho da Shimadzu, modelo DSC-60, sob taxa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, em um intervalo de temperatura entre 30°C e 200°C em cadinho de alumínio (tampa furada) com massas de corpos de prova aproximadas de 10 mg. As amostras foram submetidas ao seguinte ciclo térmico: aquecimento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 200°C e mantidos nesta temperatura por 3 min e resfriamento com a mesma taxa até 30°C .

2.2.7 DIFRATOMETRIA DE RAIOS X (DRX)

As análises de difração de raios X foram conduzidas a temperatura ambiente em aparelho da Bruker, mod. D2 Phaser, utilizando radiação $K\alpha$ do cobre ($1,5418\text{ \AA}$), tensão de 40kV e corrente 30mA. As membranas foram examinadas em um intervalo de 2θ entre 1,5 e 30,0 graus a uma velocidade de $1^{\circ}\cdot\text{min}^{-1}$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 OBTENÇÃO DA MEMBRANA ELETROFIADA

Os materiais em escalas nanométricas são promissores para aplicações biomédicas, em especial quando esses materiais são produzidos utilizando-se polímeros naturais. Muitos trabalhos encontrados na literatura obtiveram êxito ao eletrofiar a quitosana pura [14, 15, 16, 17,3]. No entanto, estes resultados são difíceis de serem reproduzidos, visto que a massa molar desse polímero interfere diretamente na sua capacidade de ser eletrofiado e o grau de desacetilação é o único fator controlável quando se adquire a quitosana por meio de empresas especializadas. Dessa forma, buscou-se uma metodologia que otimizasse a obtenção das nanofibras contendo quitosana, a qual não dependesse de uma massa molar específica e que os fatores de processo fossem facilmente ajustáveis. Optou-se então em trabalhar com uma blenda contendo quitosana e poli (óxido de etileno) (PEO), onde essa segunda fase polimérica auxiliaria no processo de eletrofiação (Duan et al. (2004) [18]. Como o intuito deste trabalho foi aproveitar ao máximo as propriedades que os polímeros naturais apresentam, estudou-se diferentes proporções da mistura de quitosana e PEO, a fim de se obter uma membrana eletrofiada que contivesse a menor quantidade possível de PEO na blenda.

As soluções poliméricas foram preparadas separadamente e depois misturadas em diversas proporções. Os solventes mais reportados na literatura para a dissolução da quitosana são o ácido trifluoracético e o ácido acético concentrado. Optou-se por trabalhar com o ácido acético como solvente, como propôs Geng et al. (2005) [16] devido aos efeitos nocivos que o ácido trifluoracético apresenta. Da mesma forma, utilizou-se uma solução de ácido acético para a dissolução do PEO.

Tendo estas informações, avaliou-se o comportamento de uma amostra de quitosana quando solubilizada em ácido acético nas concentrações de 1% a 5% (m/v), a fim de se avaliar qual solução apresentaria as características ideais para o processo de eletrofiação. Em concentrações inferiores a 4% (m/v) as soluções mostraram-se pouco viscosas e inviável para ser eletrofiada. Já na concentração de 5% (m/v), a mesma apresentou uma viscosidade muito elevada e também não pode ser processada com eficiência. Optou-se então em trabalhar com a concentração de 4% (m/v) de quitosana, visto que essa ofereceu a viscosidade ideal para ser submetida a eletrofiação.

Em seguida, preparou-se soluções de PEO nas concentrações de 2%, 3% e 4% (m/v) e as mesmas foram incorporadas em diferentes proporções à solução de quitosana previamente selecionada (4% m/v), como definido na metodologia. Essas blendas foram então submetidas ao processo de eletrofiação, onde a capacidade de formação de fibras das mesmas foi avaliada. Por meio das imagens obtidas pelo microscópio óptico (marca) pode-se concluir que houve a formação de

fibras (Figura 1, 2 e 3) e após eletrofiar uma maior quantidade de solução, a formação de membrana também foi obtida com sucesso.

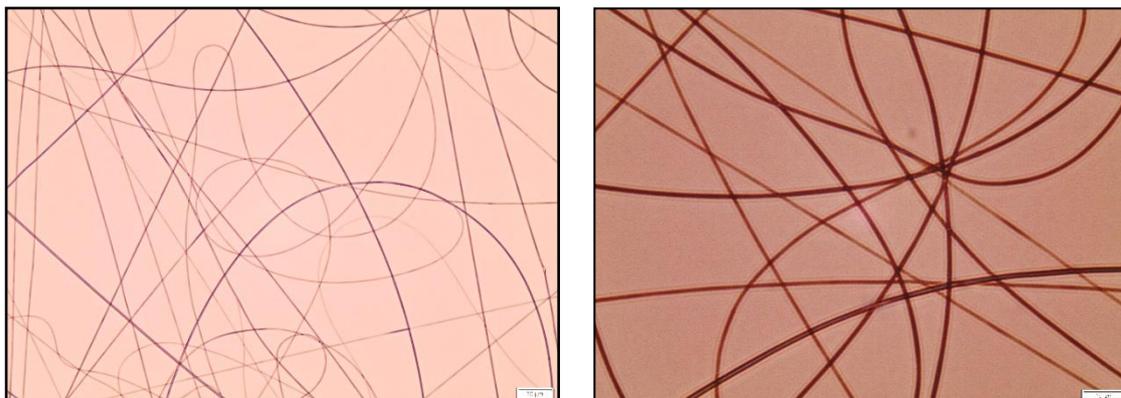


Figura 1. Microfibras da Blenda de Quitosana/PEO 4%/2% (m/v) na proporção 90:10 v/v aumentada 400 vezes (direita) e 1000 vezes (esquerda)

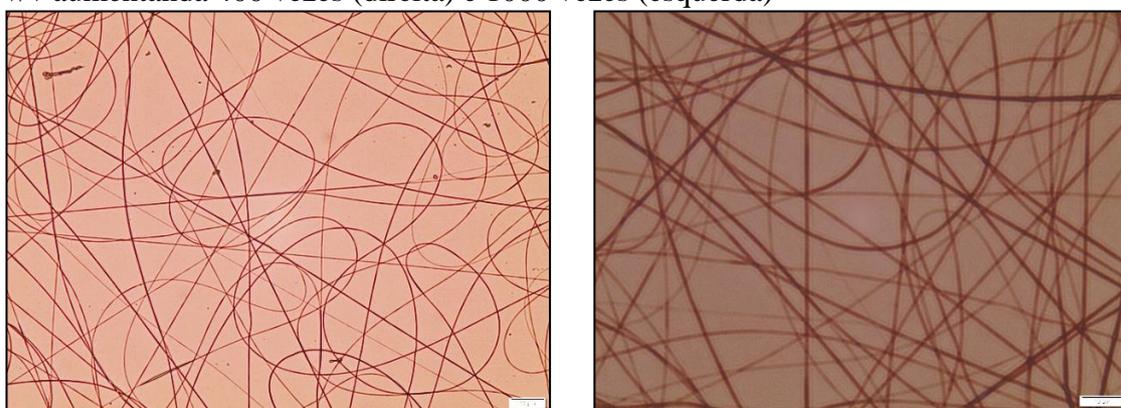


Figura 2. Microfibras da Blenda de Quitosana/PEO 4%/3% (m/v) na proporção 90:10 v/v aumentada 400 vezes (direita) e 1000 vezes (esquerda)

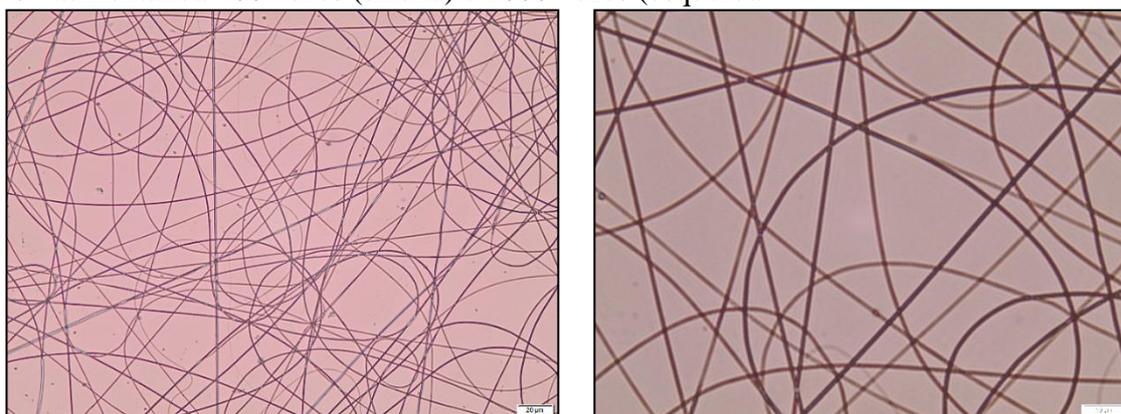


Figura 3. Microfibras da Blenda de Quitosana/PEO 4%/4% (m/v) na proporção 90:10 v/v aumentada 400 vezes (direita) e 1000 vezes (esquerda)

Por meio das imagens obtidas no microscópio óptico, foi possível calcular o diâmetro médias das fibras obtidas utilizando o programa “*Quantikov Image Analyzer*”. Esses dados são apresentados nas Tabelas 3, 4 e 5.

Tabela 3. Diâmetro das fibras em diversas proporções da blenda Quitosana/PEO (4%/2%) m/v

Proporção Quitosana/P EO	Tensão (kv)	Distância (cm)	Média (μm)	Desvio Padrão (μm)	Menor Diâmetro (μm)	Maior Diâmetro (μm)
90/10	18kv	15	0,954	0,134	0,681	1,275
		18	0,895	0,097	0,690	1,158
		20	0,955	0,099	0,730	1,246
	20kv	15	0,842	1,034	0,612	1,269
		18	0,934	0,106	0,731	1,202
		20	0,905	0,110	0,682	1,178
	23kv	15	0,929	0,096	0,767	1,156
		18	0,921	0,088	0,654	1,111
		20	0,816	0,116	0,588	1,104
80/20	18kv	15	0,899	0,112	0,551	1,177
		18	0,927	0,114	0,591	1,186
		20	0,888	0,097	0,695	1,110
	20kv	15	0,933	0,102	0,772	1,224
		18	0,890	0,097	0,698	1,178
		20	0,911	0,113	0,662	1,313
	23kv	15	0,867	0,096	0,548	1,097
		18	0,897	0,119	0,599	1,142
		20	0,924	0,096	0,693	1,120
70/30	18kv	15	0,897	0,090	0,681	1,210
		18	0,892	0,115	0,641	1,184
		20	0,896	0,123	0,577	1,217
	20kv	15	0,968	0,104	0,736	1,241
		18	0,912	0,096	0,702	1,134
		20	0,903	0,116	0,673	1,217
	23kv	15	0,868	0,086	0,699	1,124
		18	0,870	0,079	0,690	1,125
		20	0,932	0,103	0,702	1,261
60/40	18kv	15	0,857	0,109	0,641	1,121
		18	0,854	0,105	0,591	1,134
		20	0,876	0,101	0,643	1,089
	20kv	15	0,885	0,109	0,645	1,156
		18	0,787	0,075	0,627	1,037
		20	0,834	0,079	0,608	1,028
	23kv	15	0,819	0,115	0,608	1,103
		18	0,883	0,131	0,635	1,184
		20	0,923	0,088	0,713	1,141
50/50	18kv	15	0,900	0,113	0,631	1,177
		18	0,968	0,104	0,712	1,202
		20	0,956	0,095	0,793	1,241
	20kv	15	0,942	0,129	0,645	1,296
		18	0,965	0,102	0,785	1,246
		20	0,987	0,133	0,674	1,332
	23kv	15	0,920	0,121	0,717	1,273
		18	0,969	0,100	0,777	1,198
		20	0,988	0,093	0,736	1,205

Tabela 4. Diâmetro das fibras em diversas proporções da blenda Quitosana/PEO (4%/3%) m/v

Proporção Quitosana/P EO	Tensão (kv)	Distância (cm)	Média (μm)	Desvio Padrão (μm)	Menor Diâmetro (μm)	Maior Diâmetro (μm)
90/10	18kv	15	0,788	0,109	0,527	1,113
		18	0,862	0,118	0,591	1,197
		20	0,936	0,125	0,721	1,231
	20kv	15	0,845	0,129	0,608	1,184
		18	0,844	0,079	0,662	1,020
		20	0,871	0,102	0,635	1,163
	23kv	15	0,949	0,110	0,695	1,233
		18	1,143	0,127	0,837	1,537
		20	0,930	0,082	0,719	1,147
80/20	18kv	15	0,884	0,107	0,637	1,134
		18	0,721	0,095	0,721	1,177
		20	0,939	0,088	0,780	1,148
	20kv	15	0,957	0,134	0,584	1,253
		18	0,987	0,123	0,637	1,241
		20	0,903	0,102	0,721	1,220
	23kv	15	0,930	0,111	0,712	1,232
		18	0,859	0,092	0,649	1,075
		20	0,992	0,118	0,717	1,306
70/30	18kv	15	0,941	0,106	0,640	1,197
		18	0,907	0,085	0,712	1,156
		20	0,897	0,093	0,693	1,139
	20kv	15	0,982	0,112	0,695	1,277
		18	0,876	0,094	0,669	1,231
		20	0,910	0,084	0,690	1,081
	23kv	15	0,888	0,093	0,648	1,177
		18	0,894	0,088	0,721	1,121
		20	0,899	0,078	0,708	1,071
60/40	18kv	15	0,874	0,099	0,690	1,156
		18	0,937	0,073	0,760	1,125
		20	0,912	0,109	0,681	1,237
	20kv	15	0,920	0,088	0,717	1,117
		18	0,893	0,075	0,669	1,092
		20	0,891	0,096	0,641	1,120
	23kv	15	0,917	0,104	0,690	1,179
		18	0,920	0,095	0,717	1,208
		20	0,929	0,089	0,759	1,121
50/50	18kv	15	0,929	0,103	0,721	1,232
		18	0,915	0,087	0,726	1,127
		20	0,912	0,076	0,740	1,156
	20kv	15	1,044	0,127	0,788	1,368
		18	0,962	0,079	0,811	1,178
		20	0,929	0,077	0,731	1,231
	23kv	15	1,039	0,132	0,821	1,390
		18	1,010	0,089	0,798	1,246
		20	1,058	0,092	0,836	1,268

Tabela 5. Diâmetro das fibras em diversas proporções da blenda Quitosana/PEO (4%/4%) m/v

Proporção Quitosana/P EO	Tensão (kv)	Distância (cm)	Média (μm)	Desvio Padrão (μm)	Menor Diâmetro (μm)	Maior Diâmetro (μm)
90/10	18kv	15	0,878	0,116	0,577	1,127
		18	0,889	0,075	0,660	1,037
		20	0,961	0,080	0,780	1,136
	20kv	15	0,898	0,066	0,748	1,060
		18	0,981	0,081	0,798	1,190
		20	0,922	0,073	0,721	1,060
	23kv	15	0,936	0,076	0,765	1,192
		18	0,890	0,095	0,660	1,162
		20	0,946	0,078	0,772	1,120
80/20	18kv	15	0,845	0,094	0,681	1,089
		18	0,882	0,099	0,698	1,303
		20	0,889	0,085	0,681	1,057
	20kv	15	0,922	0,094	0,721	1,164
		18	0,919	0,088	0,712	1,112
		20	0,955	0,145	0,623	1,358
	23kv	15	0,840	0,102	0,641	1,186
		18	0,849	0,092	0,644	1,027
		20	0,861	0,085	0,609	1,050
70/30	18kv	15	0,895	0,118	0,609	1,179
		18	0,879	0,108	0,645	1,182
		20	0,920	0,076	0,752	1,103
	20kv	15	0,847	0,092	0,652	1,156
		18	0,888	0,083	0,721	1,083
		20	0,902	0,086	0,693	1,081
	23kv	15	0,966	0,128	0,690	1,259
		18	0,955	0,086	0,721	1,156
		20	0,918	0,112	0,641	1,185
60/40	18kv	15	13,070	4,024	3,226	19,622
		18	1,280	0,422	0,836	4,169
		20	1,155	0,119	0,912	1,563
	20kv	15	4,344	5,277	0,937	17,724
		18	4,127	4,948	0,927	18,007
		20	1,331	0,329	0,978	2,782
	23kv	15	6,133	5,782	0,850	19,651
		18	3,676	3,363	1,118	15,223
		20	5,042	6,017	1,169	22,363
50/50	18kv	15	7,523	6,628	1,024	18,007
		18	2,503	2,078	0,989	7,696
		20	1,330	0,315	0,934	2,756
	20kv	15	4,240	5,337	0,813	25,423
		18	4,028	4,216	0,940	16,131
		20	1,581	0,261	1,164	2,913
	23kv	15	4,087	4,924	0,965	17,775
		18	3,674	4,464	0,861	16,143
		20	10,646	5,226	0,930	18,965

As diversas soluções preparadas tiveram como intuito avaliar a capacidade de formação de nanofibras mesmo em pequenas quantidades de PEO, assim como analisar se a proporção desse polímero afetaria a viscosidade e o diâmetro das fibras obtidas. Houve a formação de fibras em todas as blendas preparadas. Mudanças significativas na viscosidade só foram observadas em maior concentração de PEO (4% m/v) e nas blendas em que ele estava em maiores proporções (60/40 e 50/50) Quitosana/PEO (v/v). Nesse caso, houve dificuldade de processamento quando submeteu-se essas soluções ao processo de eletrofição e as fibras obtidas resultaram em diâmetros muito maiores que as demais soluções. Nos casos restantes, não houve mudanças relevantes no diâmetro das fibras obtidas.

No que diz respeito aos parâmetros de processo avaliados, tais como tensão aplicada e distância entre o coletor e a agulha, pode-se perceber que os mesmos não influenciaram diretamente a formação de fibras, sendo que foi possível obtê-las em todos os diferentes parâmetros analisados. Da mesma forma, não houve uma interferência considerável no diâmetro das fibras eletrofiadas. Esses resultados são positivos, visto que em uma produção em larga escala esses fatores não representariam um desafio à ser controlado.

Visto que mesmo em quantidade muito pequenas de PEO na blenda foi possível obter fibras, seguiu-se o estudo avaliando-se como a concentração do mesmo afetaria a morfologia das membranas obtidas, trabalhando-se com a menor proporção em cada concentração de PEO na mistura (90:10 v/v). Assim, foram preparadas 3 membranas, mantendo-se constante a concentração de quitosana (4% m/v) e a proporção das misturas (90:10 v/v) e variou-se a concentração de PEO em cada membrana (2%, 3%, 4% m/v). Como as variáveis de processo não foram fatores muito relevantes na formação de fibras ou no diâmetro das mesmas, optou-se por trabalhar com a menor tensão (18kv) e a maior distância (20 cm). As membranas adquiridas foram então submetidas a testes de caracterização.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOFIBRAS

Análises de DSC e TGA foram realizadas com o intuito de avaliar o comportamento térmico das blendas de Quitosana/PEO preparadas e averiguar se houve alguma diferença nas propriedades térmicas quando se variou a concentração de PEO nas mesmas. As Figuras 4, 5 e 6 mostram as curvas termogravimétricas e as derivadas das curvas (DTGA) das blendas contendo PEO nas concentrações 2%, 3% e 4% (m/v), respectivamente, todas na proporção 90/10 de Quitosana/PEO (v/v)

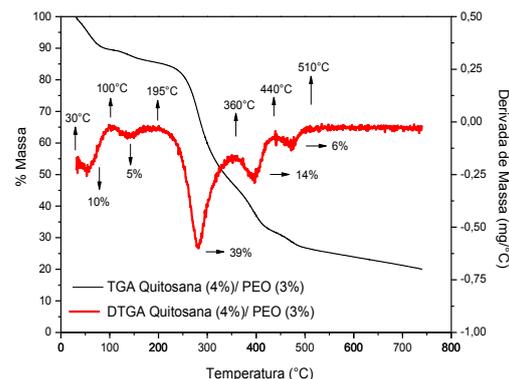
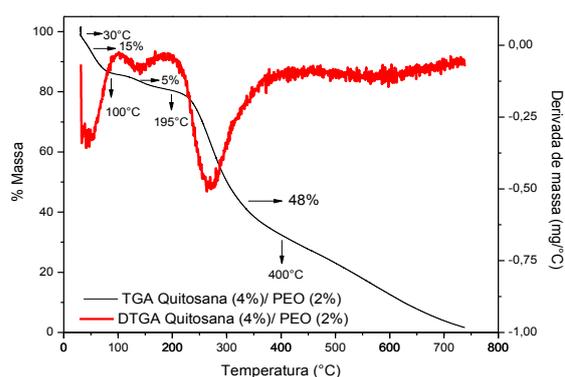


Figura 4. TGA e DTG da blenda 90/10 (v/v) Quitosana 4%/PEO 2% (m/v)

Figura 5. TGA e DTG da blenda 90/10 (v/v) Quitosana 4%/PEO 3% (m/v)

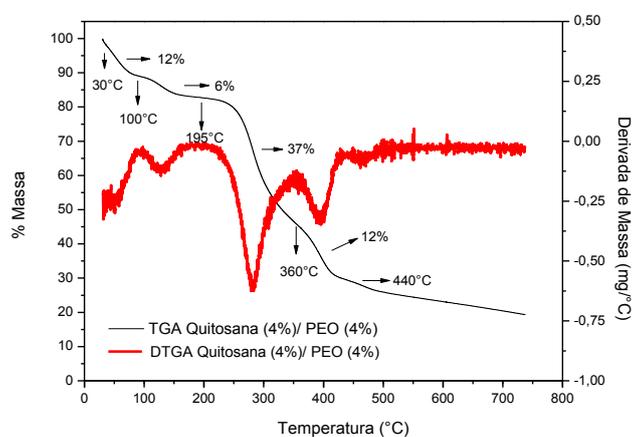


Figura 6. TGA e DTG da blenda 90/10 (v/v) Quitosana 4%/PEO 4% (m/v)

Analisando a Figura 4, pode-se perceber que houve perda de massa de 15% entre as temperaturas de 30°C e 100°C. Essa perda de massa diz respeito a evaporação da água e também do solvente ácido acético presente na blenda, visto que os mesmos possuem ponto de ebulição de 100°C e 118°C, respectivamente. Ocorre ainda pequena perda de massa de 5% entre as temperaturas de 100°C e 200°C, que corresponde a evaporação do solvente remanescente na blenda. Bonardd et al. (2016) [19] realizaram a análise de TGA para a quitosana pura e constatou que entre as temperaturas de 200°C e 380°C ocorre a perda de massa da mesma. Observando a análise realizada no presente trabalho, observa-se uma perda de massa de 45% exatamente na temperatura descrita na literatura. Podemos concluir então que nessa faixa de temperatura ocorreu a perda de massa da quitosana. Da mesma forma, Bonardd et al. (2016) [19] obtiveram o gráfico de TGA para o PEO puro e concluí que a perda de massa para esse polímero ocorre apenas em temperaturas acima de 400°C, mostrando-se um material muito estável abaixo dessa temperatura. Visto isso, pode-se dizer que a perda de massa de 34% que ocorre acima de 380°C corresponde a perda de massa do PEO.

Na Figura 5, nota-se também uma perda de massa correspondente a evaporação da água entre 30°C e 100°C, assim como uma perda de massa subsequente que diz respeito a evaporação do solvente. Assim como ocorreu como amostra anterior, houve uma perda de massa significativa entre as temperaturas de aproximadamente 200°C e 360°C que implica na decomposição da quitosana. Devido a maior concentração de PEO nessa blenda, observa-se um pico de maior intensidade em aproximadamente 400°C, que corresponde a perda de massa desse polímero, podendo-se observar picos menores subjacentes que implicam na continua perda de massa do PEO. Os mesmos picos são observados da Figura 6, sendo que a perda de massa do PEO é ainda mais perceptível, tendo seu ápice em aproximadamente 400°C, que é explicada pela maior concentração de PEO na blenda (4% m/v).

A análise DSC pode ser utilizada como um método para avaliar as alterações na cristalinidade do polímero, que geralmente é alterada como consequência da mistura de mais de um polímero [20].

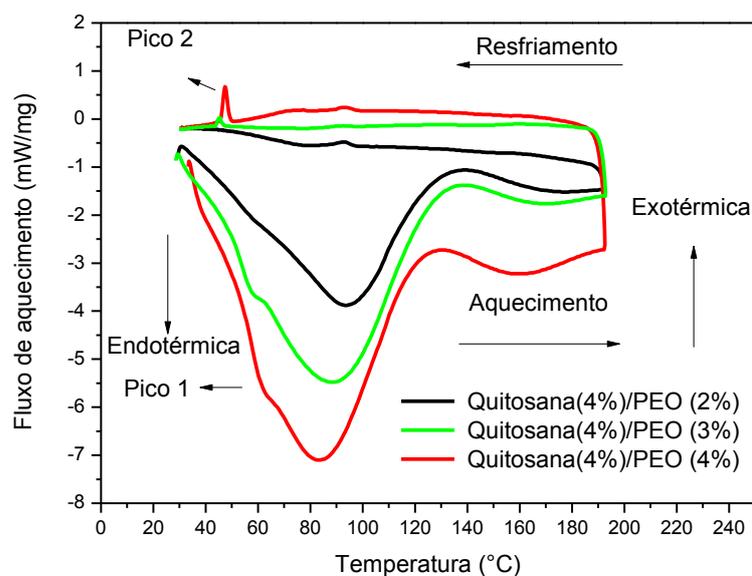


Figura 7. Curvas de DSC dos componentes das nanofibras da blenda quitosana/PEO (90:10 v/v) em diferentes concentrações de PEO

De acordo com a literatura, [18, 19] a quitosana pura, assim como grande parte dos polissacarídeos, não exibe ponto de fusão em análise de DSC. Devido às fortes forças intermoleculares que derivam de seus grupos hidroxilas, acetaminas e aminas, quando submetida a temperaturas severas, a quitosana sofre degradação térmica, decompondo-se sem que a temperatura de fusão cristalina seja atingida. Dessa forma, os valores do calor de fusão nas blendas foram obtidos à partir do pico de fusão do PEO. A cristalinidade (X_c) do PEO nas blendas foi calculada a partir de dados DSC de acordo com a equação 1 [18, 19]

$$X_c = \frac{\Delta H_f - \Delta H_c}{\Delta H_f^o} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Na qual ΔH_f^o é calor de fusão do PEO cristalino (213 J.g^{-1}) [19], ΔH_f é o calor de fusão da amostra na blenda e ΔH_c o calor de cristalização da amostra na blenda. As curvas de DSC para as mesmas amostras submetidas à TGA são apresentadas na Figura 9 e os dados obtidos estão resumidos na Tabela 6.

Tabela 6. Valores de fusão e recristalização para as blendas eletrofiadas

Amostra	Pico 1		Pico 2		X_c
	T_f (°C)	ΔH_f (J/g)	T_c (°C)	ΔH_c (J/g)	
Quitosana (4%)/PEO (4%)	57,19	3,02	47,37	-4,77	0,821
Quitosana (4%)/PEO (3%)	53,71	1,74	45,34	- 1,94	0,094
Quitosana (4%)/PEO (2%)	-	-	-	-	-

De acordo com a literatura [21, 13], o PEO puro apresenta um pico endotérmico por volta de 70°C , o qual diz respeito ao seu ponto de fusão. Como pode-se observar na Figura 7, existe um pico endotérmico em $57,19^\circ\text{C}$ e $53,71^\circ\text{C}$ para as blendas contendo concentrações de 4% e 3% de PEO, respectivamente. Esses picos são referentes a fusão do PEO que, quando está em uma mistura, é deslocado para temperaturas mais baixas, como mostram outros estudos (Nista et al., 2016 [21]; Neto et al., 2005 [13]), claramente mostrando a interferência da quitosana na cristalização do mesmo. Os picos endotérmicos amplos, próximos de 100°C , são correlacionados com perda de água de associação dos grupos hidroxílicos dos polímeros [21,18]. A temperatura de cristalização para o PEO puro encontra-se por volta de 43°C [19]. No caso das blendas, os picos nas curvas de resfriamento foram deslocados para temperaturas um pouco mais altas ($57,19^\circ\text{C}$ e $53,71^\circ\text{C}$), o que comprova que a quitosana altera a cristalinidade do PEO. Para a blenda contendo a menor concentração de PEO (2%) tanto o pico de fusão quanto o de cristalização são praticamente imperceptíveis. A alteração da cristalinidade do PEO quando o mesmo está em mistura com a quitosana também pode ser observada pela porcentagem cristalina. Quando a concentração de PEO na blenda foi de 4%, o valor da porcentagem cristalina foi superior em comparação com a blenda contendo 3% de PEO. Ou seja, quanto maior a quantidade de quitosana em comparação com a de PEO na blenda, maior a alteração na porcentagem cristalina na membrana.

A análise de DRX foi realizada para verificar se ocorreu uma diferença de cristalinidade, quando se compara as membranas com diferentes concentrações de PEO (2%, 3% e 4%). A Figura 8 mostra os difratogramas obtidos para cada membrana.

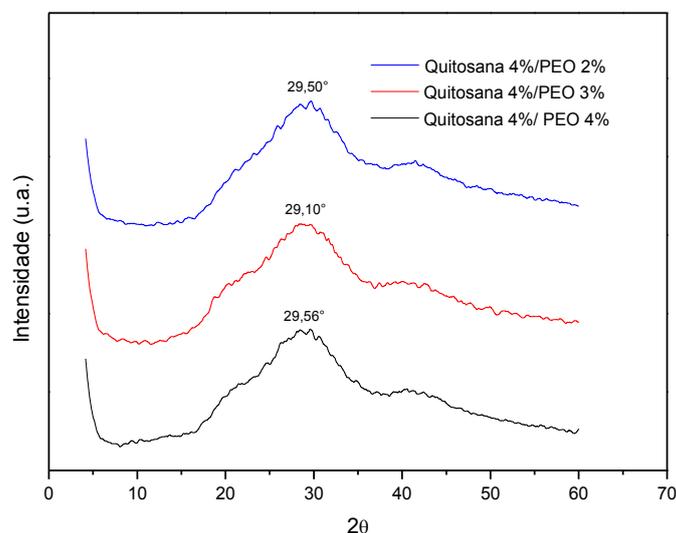


Figura 8. Difração de Raio-X para as amostras de Quitosana/PEO (90:10) em diferentes concentrações de PEO.

Tanto a quitosana pura quanto o PEO exibem um comportamento predominantemente amorfo, ou seja, apresentam baixa cristalinidade. Dessa forma, seus difratogramas não mostraram picos muito definidos. De acordo com trabalhos encontrados na literatura, a quitosana apresenta um pico em $2\theta = 20^\circ$, porém com intensidade muito baixa [21, 22, 23]. O PEO por sua vez, apresenta picos em $2\theta = 19^\circ$ e $2\theta = 23^\circ$ [57]. No estudo realizado nesse trabalho, todas as membranas exibiram apenas um pico mais intenso por volta de $2\theta = 29$, mostrando que não há diferenças consideráveis na cristalinidade das membranas eletrofiadas nas diferentes concentrações de PEO.

4. CONCLUSÃO

Ao incorporar o poli (óxido de etileno) à matriz polimérica de quitosana, foi possível obter fibras ultrafinas, de aproximadamente 900nm, livre de *beads* e uniformes, mesmo em quantidades menores de PEO na blenda. Os parâmetros de processo foram investigados e a concentração da solução polimérica se mostrou um fator importante na fabricação de fibras eletrofiadas. Em quantidades muito alta de PEO na blenda, a solução ficou muito viscosa e dificultou o processo de obtenção das fibras. Dessa forma, optou-se por trabalhar com blendas contendo a menor quantidade

de PEO estudada, apenas 10% em volume na solução. As membranas eletrofiadas foram submetidas a testes de caracterização, os quais mostraram que as características individuais dos polímeros, tais como estabilidade térmica, ponto de fusão e cristalinidade, foram afetadas quando ocorreu a mistura de quitosana e PEO, o que pode ser um indício da miscibilidade dos mesmos. Dado os resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que o poli(óxido de etileno) é um excelente polímero a ser usado como segunda fase polimérica na eletrofição da quitosana, obtendo-se fibras em escalas nanométricas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Felgueiras, H. P., Amorin, A. P. Functionalization of electrospun polymeric wound dressing with antimicrobial peptides. **Colloids and surfaces**, 2017. Doi: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.colsurfb.2017.05.001>

[2] Majd, S.A., Khorasgani, M. R., Moshtaghian, S.J., Tabei, A., Khezri, M. Application of chitosan/PVA nanofiber as a potential wound dressing for streptozotoin-induced diabetic rats. **Biological Macromolecules**, 2016
Doi: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.06.035>

[3] Andrade, Sânia Maria Belísio. **Eletrofição e caracterização de membranas biopoliméricas a base de quitosana extraídas dos exoesqueletos de crustáceos**. 128f. Trabalho de conclusão de curso (Tese) – Engenharia mecânica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012

[4] Sato, Tabata Prado. Obtenção e caracterização de nanofibras eletrofiadas via solução de quitosana com e sem inclusão de hidroxiapatita. 89f. Trabalho de conclusão de curso (Dissertação) – Odontologia, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2015.

[5] Nune, S. K., Rama, K. S., Dirisala, V. D., Chavali, M. Y. Electrospinning of collagen nanofiber scaffolds for tissue reappair and regeneration. **Chapter 11: Nanostrutures for novel therapy**, p. 281-311, 2017,

[6] Yuan, T.T., Jnekins, P. M., Foushe, A. M. D., Jockheck-Clark, A.R., Stahl, J., Electrospun Chitosan/Polyethylene oxide nanofibrous scaffolds with potential antibacterial wound dressing applications. **Journal of Nanomaterials**, 2016. Doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/6231040>

[7] Mendes, A.C., Gorzenlanny, C., Halter, N., Scheider, S.W>, Chronalis, J.S. Hybrid electrospun chitosana-phospholopids nanofibers for transdermal drug delivery. **Internacional Journal of Phamaceutics**, 2016
Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.06.016>

- [8] Lin, Hsin-Yi, Kuo, Yu-Jen, Chang, Shih-Hsin, Ni, Tsung-sheng. Characterization of electrospun nanofiber matrices made of collagen blends as potential skin substitutes. **Biomedical Materials**, v. 8, 2013.
Doi 10.1088/1748-6041/8/2/025009
- [9] Pakravan, M., Heuzey, M., Aji, A. A fundamental study of chitosan/PEO electrospinning. **Polymer**. 52(2011) 1813-4824.
- [10] Bostan, M. S., Mutlu, E. C., Comprehensive characterization of chitosan/PEO/levan ternary blend films. **Carbohydrate Polymers (2013)**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.096>
- [11] Sedghi, Roya, SHAABANI, Alireza, MOHAMMDI, Zohreh. SAMADI, Elham I. Biocompatible electrospinning chitosan nanofibers: A novel delivery system with superior local cancer therapy. **Carbohydrate Polymers**, v. 159, p 1-10, 2017.
- [12] Bhattarai, N., Edmondson, D., Veiseh, O., Matsen, F. A., Zhang, Mi. Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility. **Biomaterials**. v. 26, p. 6176-6184, 2005.
- [13] Neto, C. G. T., Dantas, T. N. C., Fonseca, J. L. C., Pereira, M. R. Permeability studies in chitosan membranes. Effects of crosslinking and poly(ethylene oxide) addition. **Carbohydrate Research**. V. 340, p. 2630-2636, 2005
- [14] De-Vrieze, S., Westbroek, P., Van-Camp, T., Van-Langenhove, L.. Electrospinning of chitosan nanofibers structures: feasibility study. **Polymer Fibers**. v. 42, p. 8029-8034, 2006.
- [15] Homayoni, H., Ravandi, S. A. H., Valizadeh, M.. Electrospinning of chitosan nanofibers: Processing optimization. **Carbohydrate Polymers**. v. 77, p. 656-661, 2009.
- [16] Geng, X., Kwon, O., Jang, J.. Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution. **Biomaterials**. v. 26, p. 5427-5432, 2007
- [17] Ohkawa, K., Cha, D; Kim, H., Mishia, A., Amamoto, H. Electrospinning of chitosan. **Macromolecular Rapid Communications**. v. 25, p. 1600-1605, 2004
- [18] Duan, B., Dong, C., Yuan, X., Yao, K.. Electrospinning of chitosan solutions in acetic acid with poly(ethylene oxide). **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 15(6). P. 797-811, 2004.

[19] Bonarrrd, S., Schmidt, M., Saavedra-Torres, M., Leiva, A., Radic, D. Saldías, C., Thermal and morphological behavior of chitosan/PEO blends containing gold nanoparticles. Experimental and theoretical studies. **Carbohydrate Polymers** <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.02.071>

[20] Grkovic, M., Stojanovic, D. B., Pavlovic, V. B., Rajilic-Stojanovic, M., Bjelovic, M., Uskokovic, P. S. Improvement of mechanical properties and antibacterial activity of crosslinked electrospun chitosana/poly (ethylene oxide) nanofibers

[21] Nista, Sílvia Vaz Guerreira. Membranas de nanofibras com alta adesão para liberação bucal de fármacos [tese]. Campinas – Universidade Estadual de Campinas, curso de engenharia Química, 2016.

[22] Cardoso, M. J. B., Barbosa, R. C., Fidelis, A. Ries, Fook, M.V.L. Ensaios Físico-Químicos e Mecânicos de Membranas de Quitosana com Cobre, Zinco e Magnésio. **Revista eletrônica de Materiais e Processos**, v. 7, issue 1, p. 1-6, 2012.

[23] Stulzer, H. K., Tagliari, M. P., Silva, M. A.S, Laranjeira, M.C.M. Desenvolvimento, avaliação e caracterização de micropartículas constituídas de aciclovir/quitosana desenvolvidas pela técnica de *spray-drying*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, issue 6, p. 866-71, 2007

CAPÍTULO 3

AUMENTO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FILMES ELETROFIADOS COM QUITOSANA E PEO CONTENDO SULFATO DE NEOMICINA

Resumo: A eletrofição tem sido reconhecida como uma técnica eficiente para a fabricação de materiais poliméricos em escala nanométricas. Assim, este trabalho visou a produção e caracterização de um biomaterial baseado em membranas eletrofiadas de quitosana e posterior incorporação do sulfato de neomicina. Devido à dificuldade encontrada na eletrofição da quitosana pura, utilizou-se o poli (óxido de etileno) PEO como polímero auxiliar. Preparou-se uma blenda de quitosana/PEO na proporção 90:10 (m/v), respectivamente, utilizando como solvente o ácido acético 90% (v/v) para a quitosana e a 50% (v/v) para o PEO. Os parâmetros de eletrofição foram determinados e os que melhores se adequaram foi a tensão de 18Kv, distância de 20cm e taxa de alimentação de 0,5 mL.h⁻¹. O diâmetro médio obtido foi de 320nm. As análises físico-químicas comprovaram a miscibilidade dos polímeros quitosana e PEO assim como confirmaram a incorporação do sulfato de neomicina à blenda. A atividade antimicrobiana para as membranas com fármaco e sem fármaco foi investigada contra bactérias Gram positivas e Gram negativas e os halos de inibição registrados foram maiores ou próximo ao controle. O teste de liberação do sulfato de neomicina indicou que o mesmo apresenta um perfil de liberação rápido, sendo que com apenas 120 minutos grande parte do fármaco já havia se desprendido do filme polimérico. Diante disso, as membranas desenvolvidas nesse estudo sugerem ser promissoras candidatas para a aplicação como um biomaterial na cicatrização de feridas.

Palavras-chave: Nanofibras; Biomaterial, Antibióticos

1. INTRODUÇÃO

A eletrofição é uma técnica largamente utilizada para a produção de membranas fibrosas que apresentam alta área superficial específica e porosidade, características as quais fazem com que essas membranas imitem muito bem a matriz extracelular natural da pele [1, 2, 3]. Devido a essas vantagens, a eletrofição emergiu como uma das técnicas mais amplamente utilizadas para a fabricação de materiais biomédicos, tais como curativo para feridas e suporte para a liberação controlada de fármacos. Na eletrofição, um campo elétrico de alta tensão (isto é, 10 a 30 kV) é usado para gerar um jato de polimérico que viaja da ponta da agulha até um coletor aterrado a uma distância previamente selecionada [4, 3, 5].

Diversos tipos de polímeros, tanto naturais como sintéticos, podem ser empregados no processo de eletrofição. No entanto, em se tratando da fabricação de materiais biomédicos, os polímeros naturais se destacam por possuir vantagens como o reconhecimento biológico e o potencial comportamento bioativo [2, 4]. A quitosana, o derivado desacetilado da quitina obtida de cascas de crustáceos e fungos por desacetilação alcalina, é um polímero que tem sido amplamente utilizado em aplicações de cicatrização de feridas devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, efeitos antibacterianos e propriedades hemostáticas [5]. No entanto, a eletrofição de soluções de quitosana é dificultada devido a sua carga policatiônica e ligações de hidrogênio intermolecular e intramolecular, as quais dificultam os enredamentos de cadeia, que é um pré-requisito essencial para a formação de nanofibras [7, 8, 9]. Para melhorar a eletrofiabilidade da quitosana, polímeros sintéticos, os quais possuem uma facilidade de eletrofição muito maior, podem ser incorporados à matriz polimérica [10]. A biocompatibilidade e as boas propriedades mecânicas do poli (óxido de etileno), (PEO) incluindo alto alongamento e capacidade de orientar quando esticado, destacam este material para sua utilização como segunda fase polimérica na eletrofição da quitosana. O PEO pode fornecer ligações de hidrogênio adicionais e melhorar a interferência das cadeias de quitosana, o que leva a uma maior produção de nanofibras da mesma [4, 11].

Para melhorar as propriedades antimicrobianas já encontrada na quitosana e assim acelerar a cicatrização das feridas, têm-se utilizado a deposição de agentes antibacterianos orgânicos nesses materiais antibacterianos naturais [12, 13]. Neste estudo, o sulfato de neomicina foi o fármaco selecionado para carregar as membranas eletrofiadas. Trata-se um antibiótico aminoglicosídeo muito utilizado em medicamentos tópicos, tais como cremes, pomadas e colírios o qual possui excelente atividade contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas [14]. Espera-se que a combinação do sulfato de neomicina com a quitosana exiba propriedades cicatrizante bastante elevada e com notável atividade biológica [15].

Mediante ao que foi exposto, o objetivo desse estudo foi fabricar membranas nanofibrosas por meio do processo de eletrofição carregadas com sulfato de neomicina como intuito de aumentar a atividade antibacteriana desse biomaterial e melhorar a cicatrização de feridas. A morfologia e diâmetro das nanofibras eletrofiadas foram analisadas utilizando o microscópio eletrônico de varredura (MEV) e houve a caracterização das membranas por meio de análises físico-químicas. O teste de liberação do sulfato de neomicina depositado na membrana foi realizado, assim como o registro da atividade antibacteriana desse material contra representantes de bactérias Gram positivas e Gram negativas também.

2. METODOLOGIA

2.1 MATERIAIS

Uma amostra de quitosana com grau de desacetilação de 85% foram utilizadas para a preparação da solução polimérica. A amostra de poli(óxido de etileno) empregado na elaboração da blenda foi doada pela UEM (Universidade Estadual de Maringá). O fármaco Sulfato de Neomicina foi adquirida em uma farmácia de manipulação, localizada na cidade de Toledo, Paraná.

2.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES

A solução de quitosana foi preparada na concentração de 4% (m/v) utilizando o ácido acético glacial a 90% (v/v) como solvente. Da mesma forma, preparou-se a solução de PEO na concentração de 4% (m/v) e empregou-se o ácido acético glacial a 50%. Essas soluções ficaram sob agitação em um agitador magnético separadamente por um período de 24 horas para garantir completa dissolução do soluto. Em seguida, ocorreu a mistura dos polímeros na razão 90/10 (v/v), e então agitou-se essa nova solução por mais 15-20 minutos para que houvesse uma completa. Logo após, essa solução foi submetida ao processo de eletrofiação.

2.3 ELETROFIAÇÃO

As nanofibras foram fabricadas usando o esquema de eletrofiação composto por uma bomba infusora, uma fonte de alta tensão e uma placa coletora metálica. Transferiu-se a solução polimérica previamente preparada para uma seringa de 5mL acoplada a uma agulha de metal com 0,6mm de diâmetro interno. Uma tensão de 18kV foi aplicada à essa solução e a placa coletora de metal foi aterrada e a distância empregada entre a ponta a agulha e o coletor foi de 20cm. A bomba infusora empurrou a solução polimérica a uma taxa de alimentação de $0,5\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$. Todos os experimentos foram realizados à temperatura ambiente (25°C) e a umidade relativa do ar foi mantida entre 30 e 40%.

2.4 INCORPORAÇÃO DO FÁRMACO À MEMBRANA ELETROFIADA

Após o preparo e eletrofição da solução polimérica contendo quitosana e PEO, uma massa de fármaco correspondente a 200% da massa total membrana eletrofiada foi diluída em água destilada e depositada sobre o filme. Para isso, utilizou-se como auxílio uma pipeta de *pasteur* e, cuidadosamente, a solução foi transferida para superfície da membrana. Em seguida, a blenda com o fármaco foi colocada no dessecador para que houvesse a evaporação da água.

2.5 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOFIBRAS

2.5.1 MORFOLOGIA E DIÂMETRO DAS FIBRAS

A morfologia das nanofibras foram investigadas usando um microscópio eletrônico de varredura (MEV) em um equipamento QUANTA 250 para que fosse possível avaliar visualmente a eletrofiabilidade e a existência de *beads* na membrana. Para esse processo, uma pequena seção da membrana foi expelida com uma fina camada de ouro, em um equipamento da BAL-TEC – SCD 050, antes da observação no MEV. As amostras foram observadas em uma ampliação de 20.000 mil vezes (5 μ m) em relação ao seu tamanho original. Por meio dessas imagens, também foi possível determinar o diâmetro médio das fibras obtidas utilizando o *software* de processamento de imagem *Quantikov Image Analyzer*.

2.5.2 ESPECTROSCOPIA INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER – FTIR

A estrutura química dos materiais puros, assim como das fibras, foi caracterizada utilizando um espectrofotômetro infravermelho com transformada de Fourier da Perkin Elmer. As medições foram realizadas nos números de onda entre 500 e 4000 cm^{-1} no modo de transmissão. Para a realização das análises, as membranas foram colocadas diretamente no aparato e as amostras em pó foram manipuladas em forma de pastilhas. A resolução utilizada no equipamento foi de 2 cm^{-1} .

2.5.3 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL – DSC

As curvas de calorimetria diferencial exploratório (DSC) foram obtidas em um aparelho Shimadzu, mod. DSC-60, sob taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ e um intervalo de temperatura entre

30°C e 200°C. Utilizou-se como aparato um cadinho de alumínio com massas de corpos de prova de aproximadamente 10mg. As amostras foram aquecidas de 30 até 200°C e em seguida resfriada de 200 a 30°C.

2.5.4 TERMOGRAVIMETRIA – TGA

As curvas de TGA e suas primeiras derivadas (DTG) foram obtidas em um aparelho da PerkinElmer, mod. STA 6000, afim de se investigar as propriedades térmicas dos materiais puros e das membranas obtidas. Para isso, empregou-se uma taxa de aquecimento de 10°C.min⁻¹, no intervalo de temperatura entre 30 e 700°C, sob atmosfera de nitrogênio a uma vazão de 50mL.min⁻¹. Os parâmetros operacionais foram mantidos constantes para todas as amostras, a fim de obter dados comparáveis.

2.5.5 ESPECTROSCOPIA DE RAIOS X – DRX

As análises de difração de raios x foram obtidas em condições ambientes em um difratômetro de raios x da Bruker, mod. D2 Phaser com uma fonte de radiação K α do cobre (1,5418 Å), tensão 40kV e corrente 30mA. As membranas foram montadas em um suporte e examinadas em um intervalo de 2 θ entre 1,5 e 30,0 graus a uma velocidade de 1°.min⁻¹.

2.5.6 ANALISE MICROBIANA

A atividade bacteriana dos filmes de quitosana/PEO sem fármaco e quitosana/PEO com fármaco depositado foram determinados contra bactérias gram positivas (*S. aureus*) e gram negativas (*E. coli*) pelo método de difusão em placa de ágar Discos de papel de filtro com penicilina foram utilizados como controles. A cultura foi mantida a uma temperatura de 33°C por um período de 24 horas. Cada amostra de filme foi medida por sua zona de inibição, que é a área ao redor do disco que não teve crescimento bacteriano. Uma câmera digital foi usada para fotografar as culturas de ágar resultantes e suas zonas de inibição.

2.5.7 TESTE DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACO

2.5.7.1 Construção da Curva de Calibração

Para a construção da concentração, utilizou-se uma solução padrão de 50 g.L⁻¹ de Sulfato de Neomicina em tampão fosfato pH 5,5. A partir desta solução, foram realizadas diluições para obter soluções do fármaco nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 g.L⁻¹. Estas amostras foram avaliadas empregando-se espectrofotômetro de UV-Vis SHIMAZU – UV-1800 no comprimento de onda de 309nm, onde ocorre a máxima absorção do fármaco estudado.

2.5.7.2 Liberação *in vitro* do Sulfato de Neomicina

Os estudos de liberação *in vitro* foram realizados imergindo as membranas carregadas com sulfato de neomicina em um *erlenmeyer* contendo 10mL de solução tampão (pH 5,5). O *erlenmeyer* foi então colocado em um agitador orbital da LAB-LINE INSTRUMENTS INC. modelo 3545 contendo água à uma temperatura de $32 \pm 1^\circ\text{C}$ sob agitação de 140 rpm. Em intervalos de tempo previamente determinados (10, 20, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420 e 480 minutos) retirou-se uma alíquota da solução do meio de liberação e fez-se a leitura da mesma em um espectrofotômetro ultravioleta SHIMAZU – UV-1800. A alíquota retirada para cada leitura era devolvida ao *erlenmeyer* de modo a se obter um volume constante e não alterar a concentração da solução. Os dados obtidos foram analisados para determinar as quantidades cumulativas de sulfato de neomicina liberado em cada ponto de tempo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOFIBRAS

3.1.1 MORFOLOGIA E DIÂMETRO DAS FIBRAS

A técnica de eletrospiação se mostrou um método eficiente na fabricação de nanofibras poliméricas contendo 90% de quitosana e 10% de poli (óxido de etileno) (v/v), ambas preparadas na concentração de 4% (m/v). As membranas resultantes foram analisadas utilizando-se a microscopia eletrônica de varredura a fim de se determinar o diâmetro médio das fibras obtidas, assim como verificar se houve a formação de *beads* nas mesmas e a imagem obtida é mostrada na Figura 1. O

diâmetro das fibras foi calculado utilizando o programa computacional “*Quantikov Image Analyzer*”, o qual mostrou que as fibras eletrofiadas apresentaram diâmetros em escala nanométrica, com uma média de $320 \pm 0,08\text{nm}$. Além disso, por meio da imagem capturada, pode-se observar que as nanofibras eletrofiadas não apresentaram defeitos (*beads*). Comparando os resultados obtidos com os trabalhos encontrados na literatura, constata-se que há uma concordância no diâmetro médio das fibras eletrofiadas. Alguns exemplos, como os trabalhos de Fazli Y., Shariatinia, Z (2016) [11], Cheng, F. et al (2015) [5], Dilamian, M., et al (2013) [16], Pilehrood, M.K., et al (2014) [8] e Young, T.T., et al, (2016) [17] mostram que o diâmetro médio das fibras eletrofiadas, para diferentes misturas de quitosana e PEO, são de aproximadamente 190, 310, 272, 320 e 360nm, respectivamente.

Da mesma forma, o filme com fármaco depositado também foi analisado por meio da microscopia eletrônica de varredura, a fim de se avaliar se as fibras eletrofiadas foram completamente cobertas com o sulfato de neomicina. A imagem mostrada na Figura 2 confirma que a técnica de deposição foi eficiente para a incorporação do fármaco à fibra.

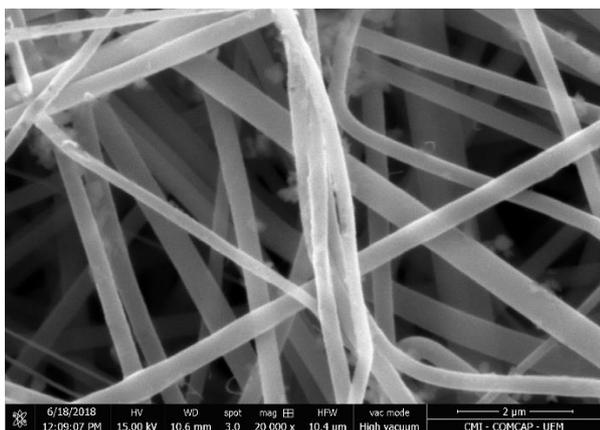


Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura para a blenda 90/10 (v/v) Quitosana 4%/PEO 4% (m/v) sem sulfato de neomicina aumentada 20000 vezes.

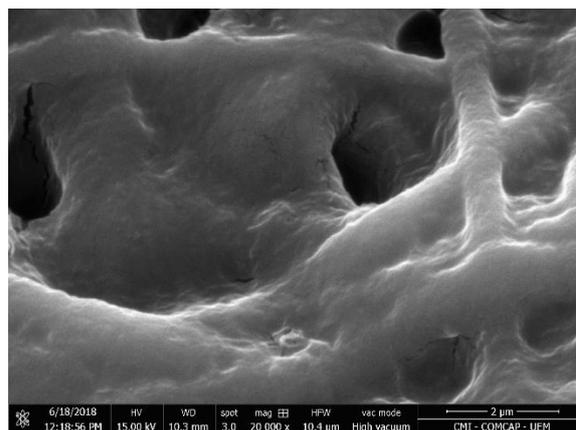


Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura para a blenda 90/10 blenda 90/10 (v/v) Quitosana 4%/PEO 4% (m/v) com sulfato de neomicina depositado aumentada 20000 vezes.

3.1.2 ESPECTROSCOPIA INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER – FTIR

A espectroscopia no infravermelho é uma ferramenta muito importante na caracterização das nanofibras pois permite avaliar, por meio da análise da presença dos grupos funcionais relevantes de cada composto, se houve ou não a interação entre duas matrizes poliméricas. Da mesma forma, essa técnica permite avaliar se houve a incorporação de outros compostos nessas blendas. Os espectros infravermelho dos materiais quitosana, poli (óxido de etileno) e sulfato de neomicina foram

obtidos com um espectrofotômetro na região de número de onda entre 4000 e 500 cm^{-1} e são mostrados na figura 3,

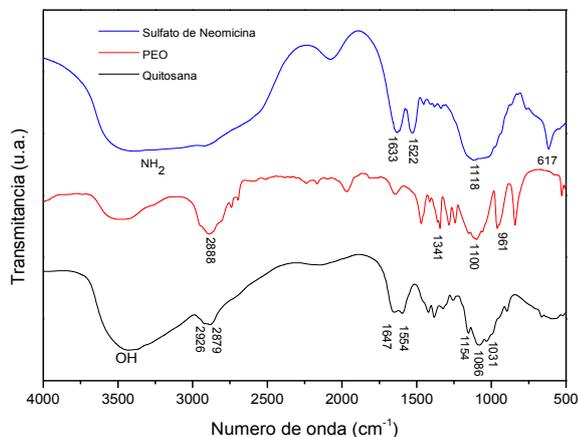


Figura 3. Análise FTIR das amostras em pó da quitosana, PEO e sulfato de neomicina utilizadas para a preparação das soluções

Por meio da análise do espectro do pó da quitosana pode-se constatar as bandas típicas de absorção desse polímero, observadas a 1647 e 1554 cm^{-1} , que diz respeito aos grupos amida primária e secundária da quitosana, respectivamente [18, 19]. Uma banda ampla e forte por volta de 3400 cm^{-1} refere-se às vibrações OH, assim como aos modos de estiramento NH, que estão sobrepostos a essa forte banda [20, 21]. As bandas observadas a 1154 cm^{-1} (estiramento assimétrico da ligação C-O-C) e a 1086 e 1031 cm^{-1} (vibrações envolvendo o estiramento C-O) são características dos polissacarídeos [18, 19]. Duas bandas fracas encontradas à 2926 e 2879 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento CH e as que são mostradas a 1386 e 1323 cm^{-1} foram conferidas à deformação CH do grupo metila [21]

Analisando-se o espectro do poli (óxido de etileno) pode-se verificar a presença da sua banda característica a 1100 cm^{-1} , a qual refere-se ao estiramento vibratório do grupo éter (C-O-C) [22]. As bandas a 961 cm^{-1} (dobramento assimétrico no plano e estiramento CH_2) 1341 cm^{-1} (estiramento simétrico dentro do plano CH_2) e 2888 cm^{-1} (estiramento CH_2) também confirma identidade desse polímero [23].

O espectro FT-IR do sulfato de neomicina apresentou suas bandas típicas a 1633, 1522 e 1118 cm^{-1} correspondendo ao estiramento de NH, estiramento C-N e frequências de éter, respectivamente. As bandas próximas a 2930 cm^{-1} pertencem ao estiramento simétrico e assimétrico do grupo metileno e por volta de 3500 cm^{-1} observa-se a banda atribuída ao estiramento NH_2 do grupo amina. Ainda,

em uma faixa próxima a 617 cm^{-1} encontra-se a banda referente ao estiramento N-H fora do plano da neomicina [24, 15].

Quando ocorre a mistura de mais de um polímero, assim como a incorporação de um outro composto à blenda, as bandas características desses materiais podem ser deslocadas ou até desaparecem no espectro, revelando que ocorreu a interação dessas substâncias. A figura 4 exibe o FT-IR da mistura dos polímeros quitosana e PEO em comparação com seus espectros puros.

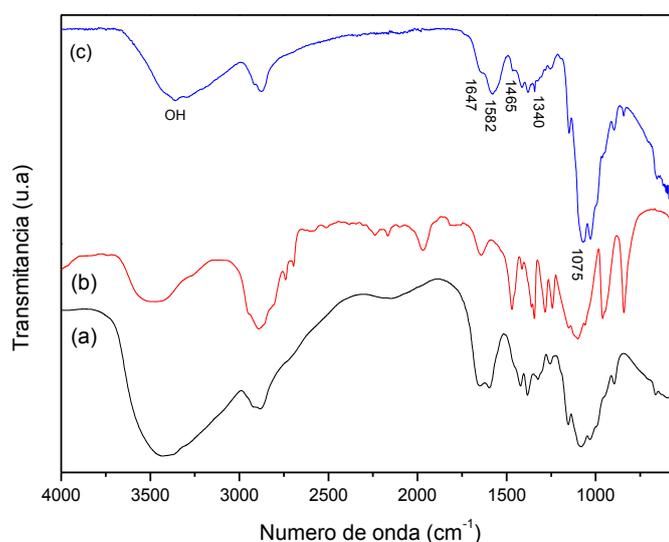


Figura 4. FTIR (a) Quitosana (b) PEO e (C) Blenda 90/10 (v/v) Quitosana 4%/PEO 4% (m/v) sem sulfato de neomicina

Durante a formação da mistura de quitosana e PEO, a principal interação entre os polímeros ocorre por meio de ligações de hidrogênio [26]. Os grupos funcionais da quitosana, em especial o grupamento amina, pode formar ligações intra ou intermoleculares com o PEO, assim como o grupamento poliéter do PEO também pode interagir com a quitosana por meio de ligações de hidrogênio [22]. A banda característica do grupamento amina primária e secundária da quitosana foram deslocados para comprimentos de onda maiores (1647 cm^{-1} e 1582 cm^{-1}). O mesmo ocorreu com as bandas correspondentes ao dobramento e estiramento das ligações CH, que ficavam entre 1320 e 1420 cm^{-1} , e deslocaram-se para número de ondas maiores (entre 1340 e 1465 cm^{-1}). Houve também uma mudança na intensidade e na largura da banda na região hidroxila/amina (3000 - 3800 cm^{-1}) da quitosana. Além disso, a banda característica do PEO correspondente ao estiramento vibratório do grupo éter (a 1100 cm^{-1}), muda gradualmente para números de onda mais baixo, por volta de 1075 cm^{-1} quando tem quitosana nas nanofibras. De acordo com Pakravan, M. et al. (2016) [22], essas mudanças descritas ocorrem devido à formação de ligações ente o hidrogênio encontrado

no grupamento amina da quitosana e o oxigênio proveniente do grupo poliéter do PEO. Dessa forma, fortes interações entre quitosana e PEO podem prevalecer a partir da formação dessas ligações de hidrogênio, comprovando a miscibilidade desses polímeros.

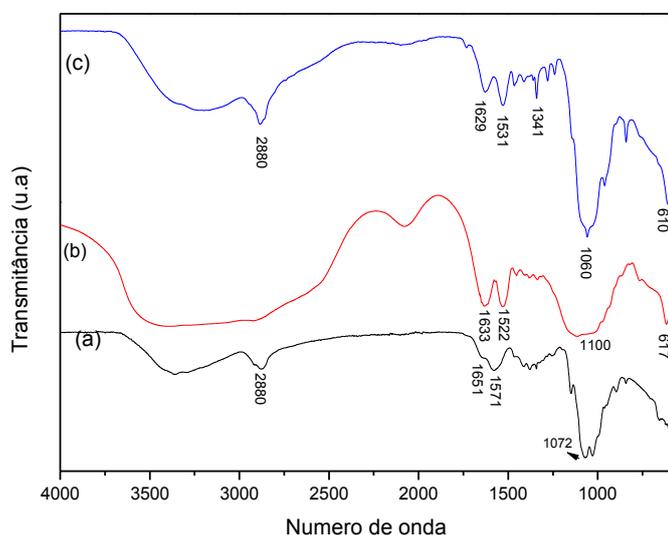


Figura 5. FTIR (a) Blenda 90/10 (v/v) Quitosana 4%/PEO 4% sem sulfato de neomicina (b) Sulfato de Neomicina puro (C) Blenda 90/10 (v/v) Quiotosana 4%/PEO 4% com sulfato de neomicina depositado

Quando ocorre a incorporação do sulfato de neomicina na blenda polimérica, pode-se notar algumas mudanças no espectro resultante, como mostra a Figura 5. No entanto, por se tratar de substâncias com grupos funcionais semelhantes, alguns picos podem ter sido sobrepostos. De acordo com Merlusca, et al. 2016 [26] a interação da estrutura do sulfato de neomicina com uma matriz polimérica leva ao deslocamento de alguns picos para comprimento de onda mais baixo e ocorre uma diminuição das intensidades de algumas bandas. A mudança mais significativa entre a membrana sem fármaco e a com fármaco depositada foi o aparecimento de duas novas bandas, por volta de 1629 e 1531 cm^{-1} . Essas bandas são típicas do estiramento NH e estiramento C-N do sulfato de neomicina, respectivamente. As bandas características da quitosana encontrada no espectro sem fármaco foram provavelmente sobrepostas devido à proximidade do número de onda com as novas bandas mencionadas. A banda correspondente a ligação C-O-C, típica do grupamento éter do PEO, mas também encontrada nos espectros da quitosana e do sulfato de neomicina, foi deslocada para número de onda menores (1060 cm^{-1}) quando ocorreu a mistura das três substâncias, além de ter se tornado uma banda mais estreita e sem o aparecimento das bandas próximas correspondentes ao estiramento C-O. observou-se também uma pequena mudança na intensidade da banda encontrada a 2880 cm^{-1} , correspondente ao dobramento CH, que no espectro contendo o fármaco apareceu mais forte. As mudanças acima discutidas comprovam a interação dos polímeros com o sulfato de neomicina, que

de acordo com Merlusca et al. 2017 [22], pode ocorrer por meio da formação de ligação de hidrogênio ou por ligações iônicas se os parceiros estiverem carregando cargas de sinais opostos.

3.1.3 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL - DSC

Por meio da análise de calorimetria diferencial exploratória pode-se avaliar as alterações nas propriedades físico-químicas dos polímeros, que geralmente é alterada como consequência da mistura de mais de um material [55]. A Figura 6 mostra os gráficos DSC do pó da quitosana e do poli(óxido de etileno), utilizados para a preparação a blenda.

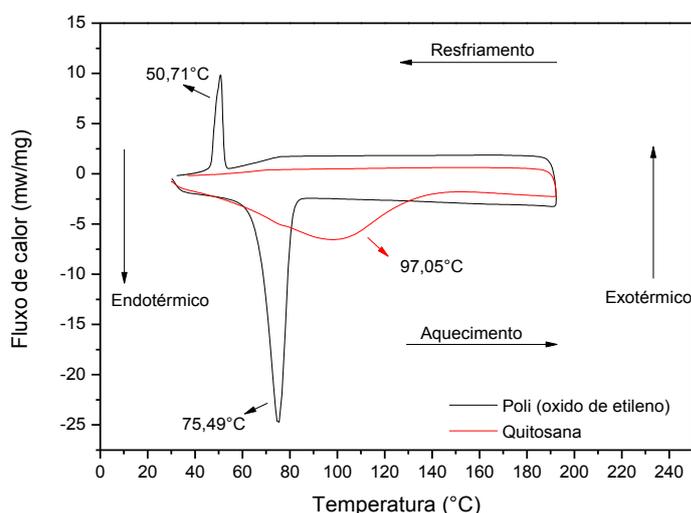


Figura 6. Análise DSC do pó da quitosana e do poli (óxido de etileno) - PEO

Analisando-se o termograma da quitosana pura, observa-se apenas um deslocamento endotérmico, em torno de 97,05°C, referente à perda de água intrínseca presente na quitosana. Ou seja, a análise DSC não registrou o ponto de fusão desse polímero. De acordo com a literatura [27, 28], a quitosana, assim como grande parte dos polissacarídeos não apresentam pontos de fusão. Ao invés disso, esses materiais sofrem degradação térmica quando submetidos a temperaturas severas, decompondo-se sem que a temperatura de fusão seja atingida. Isso ocorre devido às fortes forças intermoleculares que derivam de seus grupos hidroxilas, acetaminas e aminas. Diferentemente da quitosana, o termograma do PEO puro apresenta um pico bem definido em 75,49°C, o qual corresponde ao pico de fusão cristalina. Um pico exotérmico, também bastante evidente, apareceu em 50,71°C e representa a recristalização desse polímero. Esses dados corroboram com os encontrados na literatura para os polímeros puros [30, 28]. Perante ao que foi exposto, o valor de

calor de fusão da blenda quitosana/PEO eletrofiada (Figura 7) foi obtido a partir do pico de fusão do PEO. A cristalinidade (X_c) da blenda foi então calculada utilizando os dados DSC de acordo com a equação 1 [27, 28].

$$X_c = \frac{\Delta H_f - \Delta H_c}{\Delta H_f^0} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Sendo que ΔH_0 é calor de fusão por grama de PEO 100% cristalino (213 J.g^{-1}) [27], w é a fração em peso de PEO e ΔH é o calor de fusão da amostra na blenda.

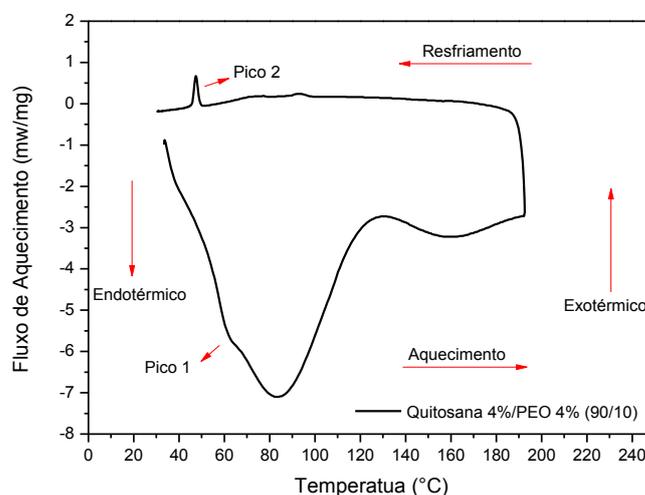


Figura 7. Análise DSC da blenda 90/10 (v/v) Quitosana 4%/PEO 4% (m/v)

Analisando-se o gráfico DSC da blenda quitosana/PEO sem fármaco (Figura 7) pode-se verificar um pico endotérmico, por volta de $57,19^\circ\text{C}$ que diz respeito a fusão cristalina do PEO na blenda. Quando compara-se esse dado como pico de fusão do PEO puro ($75,95^\circ\text{C}$) nota-se que houve um deslocamento de $18,76^\circ\text{C}$ no pico. Essa variação na posição do pico é provavelmente resultado das interações entre os componentes da mistura, que levou a mudanças físicas e moleculares dos compostos [26]. Outros autores também estudaram o efeito da interação entre os polímeros quitosana e PEO em análise DSC e concluíram que, quando está em misturas, o PEO é deslocado para temperaturas de fusão mais baixas, o que comprova a interferência da quitosana na cristalização desse polímero e a miscibilidade dos mesmos [29, 30]. O pico endotérmico amplo, próximo de 100°C , é correlacionado com perda de água de associação dos grupos hidroxílicos dos polímeros [30,28]. O pico relacionado a recristalização do PEO (por volta de $50,71^\circ\text{C}$ para o polímero puro) também é

deslocado para temperaturas mais baixas, em torno de $47,37^{\circ}\text{C}$, o que reafirma que a quitosana altera a cristalinidade do PEO.

Após a incorporação do sulfato de neomicina à blenda, estudou-se a possível interação entre o fármaco e os polímeros por meio estudos de DSC. Os resultados foram comparados com os observados no termograma da blenda sem fármaco. Os gráficos obtidos são apresentados nas figuras 8 e 9.

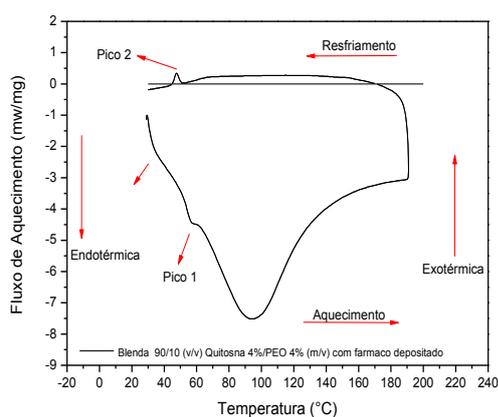


Figura 8. DSC da blenda 90/10 (v/v) Quitosana 4%/PEO 4% (m/v) com fármaco depositado

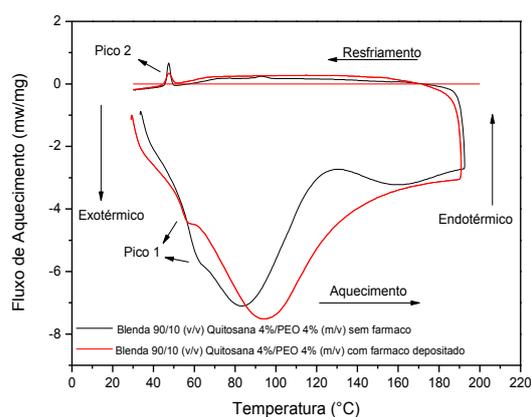


Figura 9. DSC da blenda 90/10 (v/v) Quitosana 4%/PEO 4% (m/v) sem fármaco e com fármaco depositado

O termograma da blenda com fármaco depositado (Figura 8) apresentou um pico endotérmico em $51,73^{\circ}\text{C}$ e um pico exotérmico em $47,74^{\circ}\text{C}$. Novamente esses picos devem ser atribuídos à presença do PEO na blenda, que com a adição do fármaco, foi novamente deslocada para temperaturas mais baixas em relação ao polímero PEO puro. Ao comparar as análises DSC das blendas sem fármaco e com fármaco depositado, não se observa diferenças consideráveis. A mudança mais notável foi no pico de fusão cristalina, que se desloca para temperaturas mais baixas, indicando uma menor estabilidade térmica da membrana. Os dados acima citados, assim como as entalpias de fusão e cristalização e o grau de cristalinidade calculado das blendas sem fármaco e com fármaco, são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Valores de fusão, recristalização e porcentagem cristalina das membranas de 90/10 (v/v) quitosana 4%/PEO 4% (m/v) sem fármaco e com fármaco depositado.

Amostra	Pico 1		Pico 2		X _c
	T _f (°C)	ΔH (J/g)	T _c (°C)	ΔH (J/g)	
PEO	75,5	163,82	50,71	- 111,16	24,72
Quitosana (4%)/PEO (4%)	57,19	3,02	47,37	- 4,77	0,821
Quitosana (4%)/PEO (4%) com fármaco depositado	51,73	3,02	47,74	- 2,74	0,131

É sabido que os termogramas das nanofibras com e sem fármaco apresentaram deslocamentos endotérmicos e exotérmicos quando comparado ao PEO puro. De acordo com Kuntzler et. al., 2018 [19] a menor temperatura de fusão de entalpia encontrada nas nanofibras pode ser devido às interações das cadeias de PEO, quitosana e do fármaco. Do mesmo modo, a temperatura de fusão e entalpia, a cristalinidade das nanofibras também foi menor do no PEO puro. Kuntzler et.al. 2018 [19] também associa essa diferença na cristalinidade com a orientação eletricamente forçada das cadeias poliméricas durante a eletrofiação, que as transforma em estruturas emaranhadas orientadas, ou seja, menos cristalinas.

3.1.4 TERMOGRAVIMETRIA - TGA

As análises TG e DTG analisam a variação da massa de uma amostra em função da temperatura, permitindo compreender as alterações que o aquecimento e/ou resfriamento podem provocar na massa do material. As curvas termogravimétricas fornecem informações quanto à estabilidade térmica dessas amostras [31, 32]. As Figuras 10, 11, e 12 apresentam as curvas TG e DTG para os materiais puros quitosana, PEO e sulfato de neomicina.

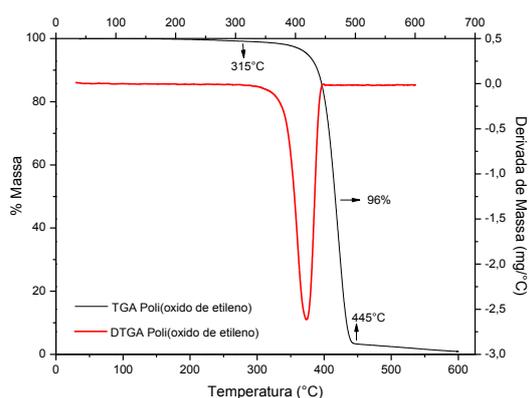


Figura 10. TGA e DTG do poli (óxido de etileno) em pó puro utilizado para a preparação das soluções poliméricas.

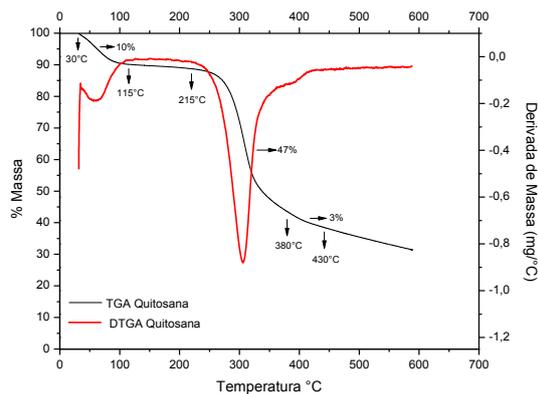


Figura 11. TGA e DTG da Quitosana em pó pura utilizada para a preparação das soluções poliméricas.

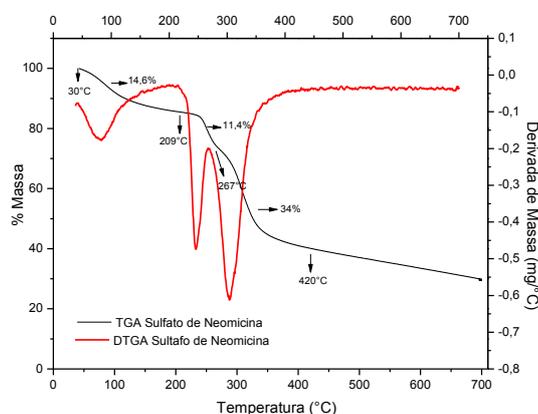


Figura 12. TGA e DTG do Sulfato de Neomicina em pó puro utilizado para a preparação da solução depositada na membrana 90/10 (v/v) quitosana 4%/PEO 4% (m/v) eletrofiada.

As curvas de perda de massa dos componentes puros indicaram características térmicas significativamente diferentes. A quitosana apresenta uma curva de decomposição que inicia-se a 215°C e termina por volta de 380°C. Em contrapartida, o PEO tem uma temperatura de decomposição substancialmente maior, entre 315 e 445°C, o que indica que esse polímero é termicamente mais estável quando comparado com a quitosana. O sulfato de neomicina apresentou dois picos de degradação, o primeiro por volta de 209°C e o segundo entre 267 e 420°C.

A comparação entre os termogramas dos materiais puros e das blends permite a obtenção de informações quanto a presença ou ausência de interações moleculares e como estas podem afetar a estabilidade térmica das membranas, como mostram as Figuras 13 e 14.

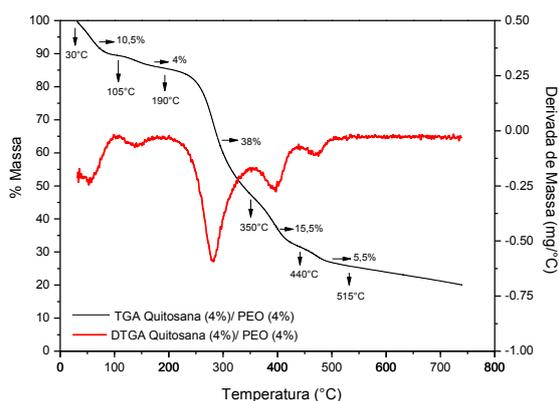


Figura 13. TGA e DTG da blenda 90/10 (v/v) Quitosana 4%/PEO 4% (m/v) sem sulfato de neomicina

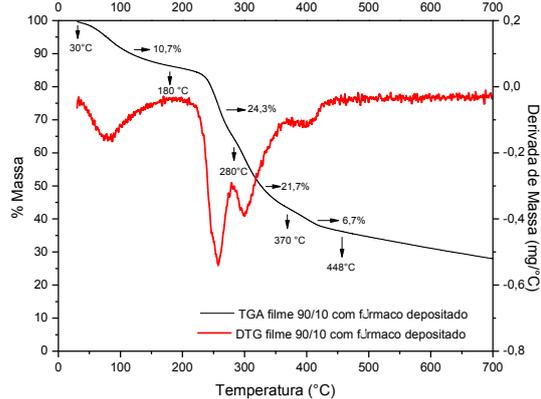


Figura 14. TGA e DTG da blenda 90/10 (v/v) Quitosana 4%/PEO 4% (m/v) com sulfato de neomicina depositado

Avaliando primeiramente a blenda sem adição de fármaco, observa-se uma perda de massa de 10,5% nas temperaturas de 30 a 105°C referente a evaporação da água. Entre 108°C e 188°C ocorre uma pequena perda de massa (4%), que está relacionada com a evaporação do solvente ácido acético (ponto de ebulição 118°C) remanescente na blenda. Em seguida, verifica-se a uma perda de massa mais significativa, de 38% que diz respeito a degradação da quitosana. Nota-se que as interações intermoleculares reduziram a estabilidade térmica da quitosana que, em sua forma pura ocorria entre 215 e 380°C e na blenda foi para 188 e 340°C. No caso do PEO, a estabilidade térmica aumentou, iniciando sua degradação acima de 350°C. De acordo com Bostan et al., (2013) [33] isso ocorre devido ao aumento do número de interações intermoleculares cadeia de PEO com a quitosana, as quais reduziram significativamente a estabilidade térmica da quitosana e aumentaram a do PEO. Estes resultados são evidências convincentes adicionais que ocorrência de interações intermoleculares, provavelmente vindo das ligações de hidrogênio, como confirmado pelos resultados do FTIR e DSC [33].

Para a blenda com fármaco depositado, nota-se um primeiro evento térmico entre as temperaturas de 30 e 180°C, com uma perda de massa de 10,7% que diz respeito a evaporação da água, do solvente remanescente na blenda e a remoção da água intrínseca [26]. Logo após observa-se a presença de mais 3 eventos térmicos. O primeiro evento diz respeito a perda de massa da quitosana, que foi observado entre 180°C e 280°C. Em seguida, houve o surgimento de um novo evento, o qual não apareceu na blenda sem fármaco, mas que pode ser visto na análise térmica do sulfato de neomicina puro. Dessa forma, atribui-se a perda de massa nas temperaturas de 280° a 370°C à degradação térmica do sulfato de neomicina presente na blenda. O PEO novamente aparece com uma maior estabilidade, iniciando sua degradação na temperatura de 370°C. Pode-se constatar então que o fármaco proporcionou uma maior estabilidade térmica ao filme eletrofiado. Se

desconsiderarmos a retirada de água, a perda de massa na blenda com fármaco foi menor do que a sem fármaco (52,7% e 59%, respectivamente). De acordo com Merlusca, et al. (2017) esse dado confirma a inclusão do medicamento na blenda.

3.1.5 ESPECTROSCOPIA DE RAIOS X – DRX

Os padrões de raios X dos componentes puros e das membranas foram registrados com o intuito de se avaliar a morfologia desses materiais e investigar como a mistura desses compostos podem afetar a tendência cristalina das blendas. O difratograma do pó da quitosana (Figura 15) apresenta dois picos de difração amplos encontrados a $2\theta = 10,6^\circ$ e 20° . De acordo com Wan et al. (2006) [21], a quitosana possui sempre aproximadamente 5% de água ligada à sua estrutura. A incorporação dessas moléculas de água à rede cristalina, as quais são denominados cristais hidratados, dão origem a estruturas predominantemente polimorfas que são detectados por picos cristalinos amplos nos padrões de raio x. Dessa forma, pode-se dizer que o pico amplo encontrado por volta de $10,6^\circ$ no padrão da quitosana diz respeito à estrutura hidratada desse polímero [21] Outro pico registrado próximo a 20° é relatado como sendo a indicação da rede cristalina relativamente regular (110,040) da quitosana.

O difratograma do PEO (Figura 16) exhibe dois picos fortemente refletidos em $2\theta = 18,97^\circ$ e 23° que indica que esse polímero possui uma estrutura predominantemente cristalina, diferentemente da quitosana. Os valores encontrados, tanto para o PEO quanto para a quitosana, concordam com os apresentados na literatura (Kuntzler, et al. 2018 [19]; Zhang et al., 2005 [34]; Mauricio-Sanches et al. [20], 2017; Wan et al., 2006 [21]). No caso do sulfato de neomicina, o padrão de raios X (Figura 17) indicou que o mesmo possui uma estrutura predominantemente amorfa, com picos cristalinos amplos em torno de $2\theta = 19,46$ e $23,64$. Huang et al. (1999) [35] também analisou o difratograma no sulfato de neomicina e encontrou os mesmos dados apresentados nesse estudo.

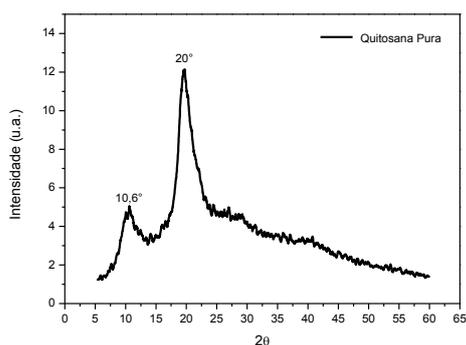


Figura 15. DRX da Quitosana em pó pura utilizada para a preparação das soluções poliméricas

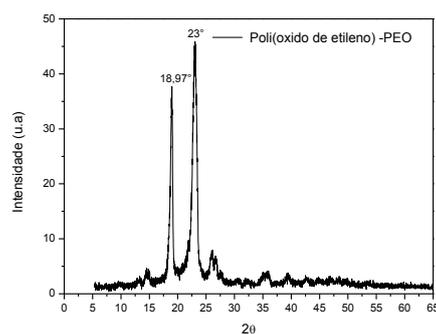


Figura 16. DRX do poli(óxido de etileno) em pó puro utilizado para a preparação das soluções poliméricas

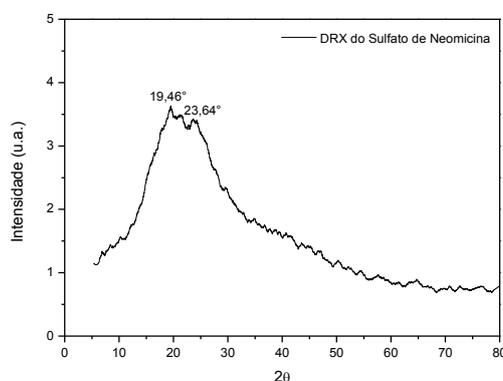


Figura 17. DRX do Sulfato de Neomicina em pó puro utilizado para a preparação da solução depositada na membrana 90/10 (v/v) quitosana 4%/PEO 4% (m/v) eletrofiada.

O difratograma da blenda eletrofiada de quitosana e PEO (Figura 18) exibiu apenas um halo amorfo e de baixa intensidade, por volta de $2\theta = 29,56^\circ$. De acordo com Kuntzler et al. (2018) [19] esse resultado pode ser devido ao processo de eletrofição, que com a aplicação de uma alta tensão promoveu uma reorganização nas cadeias poliméricas gerando um material amorfo. A diminuição da cristalinidade do PEO na blenda também pode ser explicada pela interação do PEO com a quitosana via ligações de hidrogênio, o que corrobora com os dados encontrados nas análises anteriores [33]

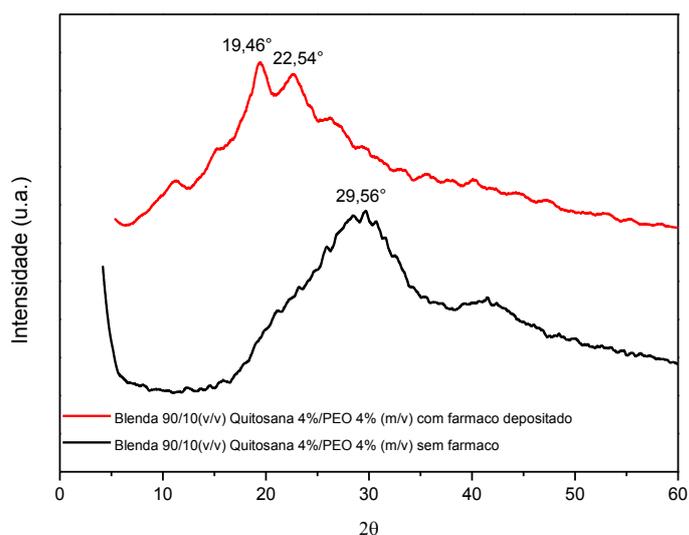


Figura 18. DRX das blendas 90/10 (v/v) Quitosana 4%/PEO 4% (m/v) sem fármaco e com fármaco depositado

Com a adição do sulfato de neomicina à blenda, não pode se notar mudanças significativas na cristalinidade da mesma (Figura 18). Esse resultado era de se esperar, visto que o fármaco em questão possui uma natureza predominantemente amorfa e, portanto não poderia influenciar na cristalinidade da membrana de forma efetiva. No entanto, os halos amorfos que aparecem na blenda contendo fármaco é diferente do presente na membrana contendo apenas os polímeros. Os picos para essa membrana aparecem por volta de $2\theta = 19,46$ e $22,54^\circ$ e podem estar relacionados a estrutura do fármaco. Como o sulfato de neomicina foi depositado na superfície da membrana, o DRX pode registrar os picos do fármaco, que apareceram com mais evidência no difratograma da blenda.

3.2 ANALISE MICROBIANA

A neomicina é um antibiótico aminoglicosídeo que possui excelente atividade contra bactérias Gram-negativas e atividade parcial contra bactérias Gram-positivas [14]. A atividade antibacteriana das membranas com e sem fármaco foi determinada pelo método de difusão em placa de ágar. O efeito bactericida desses filmes foi determinado contra bactérias gram positivas (*S. aureus*) e bactérias gram negativas (*E. coli*). Após a incubação, a inibição do crescimento pode ser vista como uma zona clara ao redor de cada placa de Petri. A zona de inibição é examinada e medida com a ajuda de escala. Os resultados estão representados abaixo nas Figuras 19 e 20 e na Tabela 2.

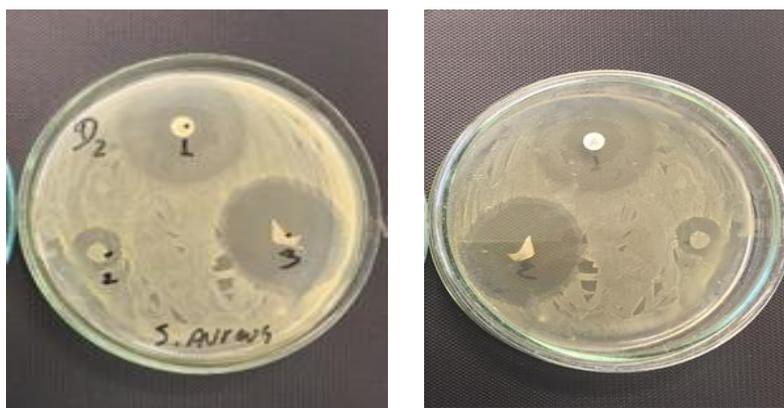


Figura 19. Análise microbiana com bactérias Gram Positivas (*S. Aureus*) para a membranas 90/10 (v/v) Quitosana 4%/PEO 4% (m/v) sem fármaco e com fármaco depositado

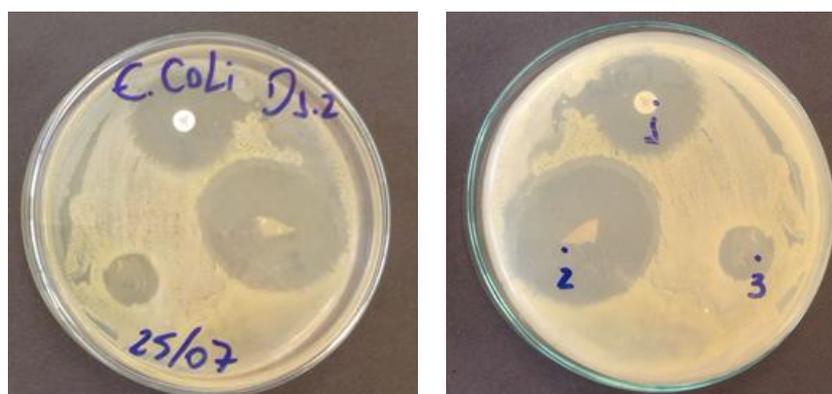


Figura 20. Análise microbiana com bactérias Gram Negativas (*E. Coli*) para a membranas 90/10 (v/v) Quitosana 4%/PEO 4% (m/v) sem fármaco e com fármaco depositado

Tabela 2. Medidas do halo de inibição das blendas 90/10 (v/v) Quitosana 4%/PEO4% (m/v) sem e com sulfato de neomicina eletrofiado

Identificação das Placas	<i>E. Coli</i> D.2.2 (cm)	<i>S. Aureus</i> D. 2.0 (cm)
1 Controle (Penicilina G 10U)	1,3	0,5
3 Blenda 90/10 Quitosana 4%/PEO 4% sem fármaco	0,5	0,5
4 Blenda 90/10 Quitosana 4%/PEO 4% com fármaco depositado	1,5	1,4

Sabe-se que a quitosana é um polímero natural que apresenta características antibacterianas por si só, como reportado em trabalhos encontrados na literatura (Zhou et. *all* 2017 [36] ; Paul, W., Sharma, C.P., 2004 [37] ; Lin et. *all*, 2013 [38]; Mendes et. *all*, 2016 [13]; Mi et. *all*,

2001 [39]). Sendo assim, a atividade antibacteriana da membrana eletrofiada sem o sulfato de neomicina foi avaliada. Tanto para a bactéria gram positiva *S. Aureus* como para a bactéria gram negativa *E. Coli* a blenda contendo 90% de quitosana apresentou um halo de inibição de 0,5cm. Essa ação bacteriana foi a mesma apresentada pelo controle realizado com a penicilina, o que comprava a ação antibacteriana da quitosana pura. Para o filme contendo sulfato de neomicina depositado na membrana, o halo de inibição foi superior à membrana sem fármaco, de 1,5cm para a bactéria gram negativa e 1,4cm para a bactéria gram positiva. Esse resultado confirma que o sulfato de neomicina foi incorporado à membrana de forma eficiente e que o mesmo aumentou a atividade antimicrobiana do filme eletrofiado consideravelmente, como era esperado.

3.3 TESTE DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACO – *INVITRO*

3.3.1 CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO

Para a construção da curva analítica, primeiramente fez-se uma varredura no espectro UV-Vis utilizando-se uma solução contendo 50 g.L⁻¹ de sulfato de neomicina a fim de se determinar o comprimento de onda de maior absorção do fármaco. Determinou-se que o sulfato de neomicina apresenta seu máximo de absorção a 309nm, como mostra a Figura 21, o qual está de acordo com o relatado na literatura [15]. Esse comprimento de onda foi selecionado para a realização da curva de calibração e posteriores análises. Partindo-se de uma solução padrão de 50 g.L⁻¹, preparou-se soluções nas concentrações entre 0,5 a 50 g.L⁻¹ utilizando água destilada como solvente e a varredura no espectro ultravioleta foi realizada. A curva de calibração traçada apresentou um coeficiente de determinação (r^2) de 0,9989, como apresentado na Figura 22.

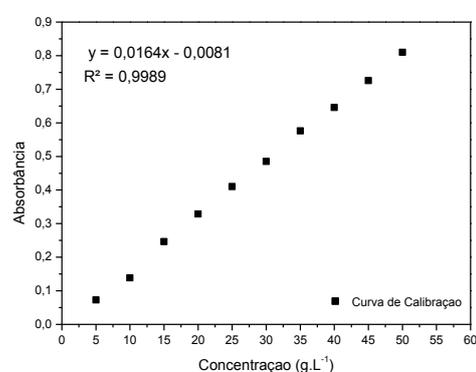
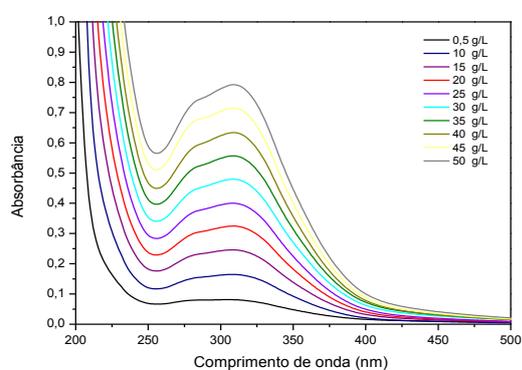


Figura 21 Varredura no espectro UV-vis para determinação do comprimento de onda de máxima absorção do sulfato de neomicina

Figura 22 Curva de calibração para sulfato de neomicina utilizado para a preparação das soluções de fármaco

3.3.2 LIBERAÇÃO *IN VITRO* DO SULFATO DE NEOMICINA

O perfil de liberação do sulfato de neomicina incorporada na membrana eletrofiada é mostrado na Figura 23. Para que os fatores externos chegassem o mais próximo das condições da pele humana, durante o teste a temperatura do rotator orbital foi mantida a 32°C e a solução tampão usada no meio de liberação foi preparada a pH de 5,5.

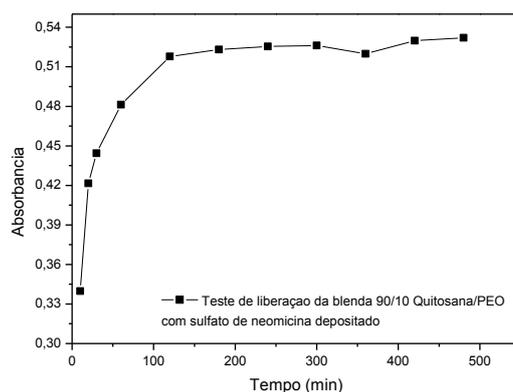


Figura 23. Teste de liberação do sulfato de neomicina depositado na blenda eletrofiada 90/10(v/v) Quitosana 4%/PEO 4% (m/v)

O perfil de liberação do fármaco no meio tamponado revelou que a neomicina é rapidamente transportada da membrana para a solução. No período de 120 minutos já havia ocorrido a liberação de 32,43g.L⁻¹, que corresponde a praticamente todo o fármaco incorporado na membrana. Nota-se que após o período de aproximadamente 200 min o sistema se mantém constante, indicando que todo o fármaco já foi transferido para o meio de liberação. Após um intervalo de tempo de 480 min 33,33g.L⁻¹ de fármaco haviam sido liberada, o que se aproxima a quantidade máxima de fármaco incorporado à membrana. Em um estudo realizado por Nitanam et al. (2013) [14] os resultados encontrados para perfil de liberação do sulfato de neomicina foram muito semelhantes. Nitanam et al. (2013) utilizou blendas eletrofiadas de poly(styrene sulfonic acid-co-maleic acid)(PSSA-MA)/polyvinyl alcohol (PVA) como suporte para a liberação de sulfato de neomicina. Seus resultados indicaram que em apenas 10 minutos grande parte do fármaco já havia sido liberada no meio e após 480 min a liberação de aproximou de 100%.

A elevada área superficial e a estrutura porosa da membrana nanofibrosa pode ter facilitado a difusão do fármaco no meio tamponado fazendo com que ocorresse a liberação de forma eficiente. Além disso, a elevada afinidade do sulfato de neomicina com a água pode ter colaborado com a rápida liberação do mesmo.

4 CONCLUSÃO

Neste trabalho, nanofibras livres de defeitos e com diâmetro médio de 320nm foram obtidas a partir de uma blenda polimérica contendo 90% de quitosana e 10% de PEO por meio do processo de eletrofição. Quando submetidas a análises FTIR, a blenda apresentou bandas deslocadas quando comparadas com o gráfico dos materiais puros, o que indica que houve a interação dos polímeros durante a formação da blenda. Os dados obtidos no DSC corroboram com esse resultado, visto que houve mudanças no ponto de fusão do PEO na blenda para temperaturas menores, característica comum desse polímero quando está presente em misturas miscíveis. Da mesma forma, os termogramas apresentaram diferenças na estabilidade térmica da quitosana e do PEO presentes na blenda e o difratograma confirmou a mudança na cristalinidade da membrana. Quando o sulfato de neomicina foi incorporado à blenda, houve novamente mudanças nas análises físico-química da blenda, indicando a presença do fármaco nas mesmas. A análise antibacteriana contra bactérias gram positivas e gram negativas indicaram que a quitosana apresenta atividade bacteriana, confirmando os dados encontrados na literatura. Do mesmo modo, a membrana carregada com sulfato de neomicina apresentou excelente ação contra as bactérias analisadas, confirmando mais uma vez a efetiva incorporação desse antibiótico na blenda. Por fim, o teste de liberação indicou que o sulfato de neomicina é rapidamente liberado no meio tamponado, levando apenas 120 minutos para que uma concentração de $38,43\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ estivesse disponível no meio de liberação, o que representa quase todo o conteúdo de fármaco incorporado na blenda. Mediante ao que foi exposto, as membranas eletrofiadas contendo o polímero quitosana, assim como àquela com fármaco incorporado, sugerem ser biomateriais atraentes para pesquisas no tratamento de feridas.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Majd, S.A., Khorasgani, M. R., Moshtaghian, S.J., Tabeli, A., Khezri, M. Application of chitosan/PVA nanofiber as a potencial wound dressing for streptozotoin-induced diabetic rats. **Biological Macromolecules**, 2016

Doi: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.06.035>

[2] Nune, S. K., Rama, K. S., Dirisala, V. D., Chavali, M. Y. Electrospinning of collagen nanofiber scaffolds for tissue reappear and regeneration. **Chapter 11: Nanostructures for novel therapy**, p. 281-311, 2017,

- [3] Grkovic, M., Stojanovic, D. B., Pavlovic, V., B., Rajilic-Stojanovic, M., Bjelovi, M., Uskokovic, P. S., Improvement of mechanical properties and antibacterial activity of crosslinked electrospun chitosan/poly (ethylene oxide) nanofibers. **Composites**, 2017. Doi 10.1016/j.compositesb.2017.03.024
- [4] Young, T.T., Jnekins, P. M., Foushe, A. M. D., Jockheck-Clark, A.R., Stahl, J., Electrospun Chitosan/Polyethylene oxide nanofibrous scaffolds with potential antibacterial wound dressing applications. **Journal of Nanomaterials**, 2016. Doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/6231040>
- [5] Cheng, F., Gao, J., Wang, L., Hu, X. Composite chitosan/poly(ethylene oxide) electrospun nanofibers mats as novel wound dressing matrixes for the controlled release of drugs. **Journal of Applied Polymer Science**. 2015. Doi: 10.1002/APP.42060
- [6] Mi, F., Wu, Y., Shyu, S., Schoung, J., Huang, Y., Tsai, Y., Hao, Y. Control of wound infections using a bilayer chitosan wound dressing with sustainable antibiotic delivery. p. 438-449, 2001
- [7] An, J., Zhang, H., Zhang, J., Zhao, Y., Yuan, X., Preparation and antibacterial activity of electrospun chitosan/poly(ethylene oxide) membranes containing silver nanoparticles. **Colloid Polym Sci**, v. 287, p. 1425-1324, 2009. Doi: DOI 10.1007/s00396-009-2108-y
- [8] Pilehrood, M. K., Dilamian, M, Mirian, M., Sadeghi-Aliabadi, H., Maleknia, L., Nousiainem, P., Harlin, A. Nanofibrous Chitosan-Polyethylene Oxide Engineered Scaffolds: A comparative Study between simulated structural characteristics and cells viability. **BioMed Research International**. 2014
- [9] Paul, W., Sharma, C.P., Chitosan and Alginate wound dressings: A short review. **Trends Biomaterial and Artificial Organs.**, v. 18, p. 13-23, 2004
- [10] Garcia-Orue, I, Gainza, G., Gutierrez, F. B., Arguirre, J. J., Evora, C., Pedraz, J. L., Hernandez, R. M., Deslgado, A., Igartua, M. Novel nanofibrous dressing containing rgEGF and aloe vera for wound healing application. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 523, p. 556-566, 2017 Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.11.006>
- [11] Fazli, Y., Shariatina, Z. Controlled release of cefazolin sodium antibiotic drug from electrospun chitosan-polyethylene oxide nanofibrous mats. **Materials Science e engineering**, 2016. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.10.048>
- [12] Taepaibonn, 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. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, p. 387-397, 2007.

- [13] Mendes, A.C., Gorzenlanny, C., Halter, N., Scheider, S.W>, Chronalis, J.S. Hybrid electrospun chitosana-phospholopids nanofibers for transdermal drug delivery. **Internacional Journal of Phamaceutics**, 2016
Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.06.016>
- [14] Nitanan, T., Akkaramongkolporn, P., Rojanarta, T., Ngawhirunpat, T., Opanasopit, P. Neomycin-loaded poly(styrene sulfonic acid-co-maleic acid) (PSSA-MA)/polyvinyl alcohol (PVA) ion exchange nanofibers for wound dressing materials. **International journal of pharmaceutics**, v. 448, p. 71-78, 2013
- [15] Gowda, A. D. V., Gowrav, M. P., Srivastava, A., Osmani, R. A. M. A study of chitosan nanofibers containing neomycin sulfate for wound healing activity. **Der Pharmacia Lettre**, v. 8, p. 128-139, 2016
- [16] Dilamian, M., Montazer, M., Mamoumi, J. Antimicrobial electrospun membranes of chitosan/poly(ethylene oxide) incorporating poly(hexamethylene biguanide) hydrochloride. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, p. 364-371, 2013. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.059>
- [17] Young, T.T., Jnekins, P. M., Foushe, A. M. D., Jockheck-Clark, A.R., Stahl, J., Electrospun Chitosan/Polyethylene oxide nanofibrous scaffolds with potential antibacterial wound dressing applications. **Journal of Nanomaterials**, 2016. Doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/6231040>
- [18] De-Vasconcelos, C. L., Bezerril, P. M., Dos-Santos, D. E. S., Dantas, T. N. C., Pereira, M. R., Fonseca, J. L. C., Effect of Molecular Weight and ionic strenght on the formation of polyelectrolyte complexes based on poly(methacrylic acid) and chitosan. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 1245-1252, 2006
- [19] Kuntzler, S.G., Costa, J., A., V., Greque-de-Morais, M. Development of electrospun nanofibers containing chitosan/PEO blend and phenolic compounds with antibacterial activity. **Biological Macromolecules**. 2018
doi: :10.1016/j.ijbiomac.2018.05.224
- [20] Maurício-Sánchez, R. A., Salazar, J., Luna-Bárceñas, G., Mendoza-Gálván, A., FTIR spectroscopy studies on the spontaneous neutralization of chitosan acetate films by moisture conditioning. **Vibrational Spectroscopy**.
DOI: 10.1016/j.vibspec.2017.10.005
- [21] Wan, Y., Wu, H., Yu, A., Wen, D., Biodegradable polylactide/chitosan blend membranes. **Biomacrolomecules**, v. 7, p. 1362-1372, 2006
- [22] Pakravan, M., Heuzey, M., Ajjji, A. A fundamental study of chitosan/PEO eletrospinning. **Polymer**, v. 52, p. 4813-4824, 2011. DOI: 10.1016/j.polymer.2011.08.034

[23] Lu, C. Chiang, S., W., Du, H., Li, J., Gan, L., Zhang, X., Chu, X., Yao, Y., Li, B., Kang, F. Thermal conductivity of electrospinning chain-aligned polyethylene oxide (PEO). **Polymer**. v. 115, p. 52-59, 2017.

[24] Hashemnia, S., Mokhtari, Z., Tashkhourian, J., Moosavi-Movahedi, A.A. Effect of covalent attachment of neomycin on conformational and aggregation properties of catalase. **Indian J. Biochem. Biophys.**, v. 52, p. 189-195, 2015.

[26] Merlusca, I. P., Maitut, D. S., Lisa, G., Sillion, M., Gradinaru, L., Oprea, S., Popa, I.M., Preparation and characterization of chitosan-poly(vinyl alcohol)-neomycin sulfate films. **Polym. Bull.** 2017

[27] Bonardd, Sebasti´an., Schmidt, Mathias., Saavedra-Torres, Mario., Leiva, Angel., Radic, Deodato., & Sald´ias, C´esar., Thermal and morphological behavior of chitosan/PEO blends containing gold nanoparticles. Experimental and theoretical studies. **Carbohydrate Polymers** <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.02.071>

[28] DUAN, Bin, DONG, Cunhai, YUAN, Xiaoyan, YAO, Kangde. Electrospinning of chitosan solutions in acetic acid with poly(ethylene oxide). **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 15(6). P. 797-811, 2004.

[29] NETO, C. G. T., DANTAS, T. N. C., FONSECA, J. L. C., PEREIRA, M. R. Permeability studies in chitosan membranes. Effects of crosslinking and poly(ethylene oxide) addition. **Carbohydrate Research**. V. 340, p. 2630-2636, 2005

[30] NISTA, Sílvia Vaz Guerreira. Membranas de nanofibras com alta adesão para liberação bucal de fármacos [tese]. Campinas – Universidade Estadual de Campinas, curso de engenharia Química, 2016.

[31] ANDRADE, Sânia Maria Belísio. **Eletrofição e caracterização de membranas biopoliméricas a base de quitosana extraídas dos exoesqueletos de crustáceos**. 128f. Trabalho de conclusão de curso (Tese) – Engenharia mecânica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012

[32] SATO, Tabata Prado. Obtenção e caracterização de nanofibras eletrofiadas via solução de quitosana com e sem inclusão de hidroxiapatita. 89f. Trabalho de conclusão de curso (Dissertação) – Odontologia, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2015.

[33] Bostan, M. S., Mutlu, E. C., Kazak, H., Keskin, S. S., Oner, E. T., Eroglu, M. S. Comprehensive characterization of chitosan/PEO/levan ternary blend films. **Carbohydrate Polymers**. 2013. DOI: dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.096

[34] Huang, L., Taylor, H., Gerber, M., Orndorff, P.E., Horton, J.R., Tonelli, A., Formation of antibiotic, aiodegradable/bioabsorbable polymers by processing with neomycin sulfate and its inclusion compound with β -cyclodextrin. **Formation of antibiotic polymers**. 1999

[35] Zhou, Y., Dong, Q., Yang, H., Liu, X., Yin, X., Tao, Y., Bai, Z., Xu, W., Photocrosslinked maleited chitosan/methacrylated poly (vinyl alcohol) bicomponent nanofibrous scaffolds for use a potential wound dressings. **Carbohydrate Polymers**, v. 168, p. 220-226, 2017

[36] Paul, W., Sharma, C. Chitosana and Alginate wound dressings: A short review. **Trends in Biomaterials and Artificial Organs**, v. 18, p. 18-23, 2004

[37] Lin, Hsin-Yi, Kuo, Yu-Jen, Chang, Shih-Hsin, Ni, Tsung-sheng. Characterization of electrospun nanofiber matrices made of collagen blends as potencial skin substitutes. **Biomedical Materials**, v. 8, 2013.

Doi 10.1088/1748-6041/8/2/025009

[38] Mi, F., Shyu, S., Wu, Y., Lee, S., Shyong, J., Huang, R. N. Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing. **Biomaterials**, v., 22, p. 165-173, 2001.

CAPÍTULO 4

AValiação DA FORMA DE INCORPORAÇÃO DO SULFATO DE NEOMICINA EM NANOFIBRAS DE QUITOSANA E PEO

Resumo: A quitosana é um polissacarídeo derivado da quitina que tem despertado interesse na área de regeneração tecidual devido as suas características como biodegradabilidade, biocompatibilidade e atividade antimicrobiana. A técnica de eletrofiação é amplamente conhecida por sua capacidade de obtenção de materiais nanométricos empregando soluções poliméricas. Sendo assim, este trabalho visou a produção e caracterização de um biomaterial baseado em membranas eletrofiadas de quitosana e, subsequentemente duas formas de incorporação do sulfato de neomicina: na solução eletrofiada; depositado sobre a membrana após a eletrofiação. O poli (óxido de etileno) foi utilizado como polímero auxiliar na eletrofiação da quitosana. A blenda polimérica contendo 80% de quitosana e 20% de PEO apresentou um diâmetro médio de 299nm e quando o fármaco foi eletrofiado juntamente com a solução polimérica o diâmetro obtido foi de 258nm. As análises físico químicas comprovaram a miscibilidade dos polímeros e a incorporação do fármaco à blenda, tanto pelo método de eletrofiação como por deposição. As membranas também apresentaram excelentes atividade bacteriana contra as bactérias *S.Aureus* e *E. Coli* com um halo de inibição maior ou próximo ao controle. O teste de liberação do sulfato de neomicina indicou que o mesmo apresenta um perfil de liberação rápido, sendo que com apenas 120 minutos grande parte do fármaco já havia se despreendido do filme polimérico. Em conclusão, as membranas poliméricas carregadas com sulfato de neomicina mostram ter grande potencial para sua aplicação como biomaterial em curativo para feridas.

Palavras-chave: Membranas nanofibrosas; Feridas; Biopolímero.

1. INTRODUÇÃO

A eletrofiação é largamente conhecida como um método eficaz e versátil para a produção de fibras em escala nanométrica a partir de polímeros de origem natural ou sintética [1, 2, 3, 4]. Devido à sua alta área superficial específica e porosidade, as nanofibras geradas por essa técnica exibem uma característica arquitetônica que imitam a estrutura tridimensional da pele. Essa similaridade permite a esses materiais uma maior penetração, diferenciação e adesão celular, o que

leva a aceleração na cicatrização de feridas [5, 4, 6, 7]. Sendo assim, as nanofibras eletrofiadas vem sendo amplamente aplicada como curativo para feridas e liberação controlada de fármaco.

Polímeros de origem natural, como a quitosana, colágeno e o alginato, possuem a vantagem do reconhecimento biológico e do potencial comportamento bioativo [4, 7]. Dentre os polímeros naturais, a quitosana é uma das biomacromoléculas mais promissoras para aplicação como curativo, devido às suas excelentes contribuições biológicas para a ferida. Trata-se de um polissacarídeo derivado da quitina composta de unidades N-actetil-D-glucosamina que possui características extraordinárias, como não toxicidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade e atividade antibacteriana [8, 1, 9]. No entanto, a sua natureza policatiónica em solução, estrutura química rígida e interação de pontes de hidrogênio restringem os enredamentos de cadeia, que é um pré-requisito essencial para a formação de nanofibras, e dificulta a eletrofição desse polímero puro [1, 10]. Para melhorar a eletrofiabilidade da quitosana, o mecanismo de formação das fibras deve ser facilitado pela mistura com polímeros sintéticos, os quais são considerados materiais eficientes para a eletrofição [10, 4]. Devido a sua boa biocompatibilidade, baixa toxicidade, viabilidade e versatilidade para eletrofição, o poli (óxido de etileno) ou PEO tem sido amplamente empregado como segunda fase polimérica na eletrofição da quitosana [1, 11, 12, 10, 7]

Para melhorar as propriedades antimicrobianas das nanofibras usadas na cicatrização de feridas, têm-se considerado a introdução de agentes antibacterianos orgânicos nesses materiais antibacterianos naturais [13,6]. Neste estudo, a droga catiónica sulfato de neomicina foi selecionada para carregar as membranas eletrofiadas. O sulfato de neomicina é um antibiótico aminoglicosídeo, amplamente utilizado em muitos medicamentos tópicos, como cremes, pomadas e colírios e possui excelente atividade contra bactérias Gram-negativas e bactérias Gram-positivas [14]. A combinação de sulfato de neomicina com a quitosana poderá exibir propriedades cicatrizante bastante promissoras com notável atividade biológica [15].

Mediante ao que foi exposto, o objetivo desse estudo foi fabricar membranas nanofibrosas por meio do processo de eletrofição carregadas com sulfato de neomicina para aumentar atividade desse biomaterial como agente antibacteriano e melhorar a cicatrização de feridas. A morfologia e diâmetro das nanofibras eletrofiadas foram analisadas utilizando o microscópio eletrônico de varredura (MEV) e as membranas foram caracterizadas por meio de FTIR, DSC, TGA e DRX. A liberação do fármaco a partir da membrana carregada com sulfato de neomicina e a atividade antibacteriana contra representantes de bactérias Gram positivas e Gram negativas também foram avaliadas.

2. METODOLOGIA

2.1 MATERIAIS

Uma amostra de quitosana com grau de desacetilação de 85% foram utilizadas para a preparação da solução polimérica. A amostra de poli(óxido de etileno) empregado na elaboração da blenda foi doada pela UEM (Universidade Estadual de Maringá). O fármaco Sulfato de Neomicina foi adquirida em uma farmácia de manipulação, localizada na cidade de Toledo, Paraná.

2.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES

As soluções de quitosana e PEO foram preparadas separadamente a uma concentração de 4% e 2%, respectivamente. Utilizou-se como solvente o ácido acético a 90% para a quitosana e 50% para o PEO. A mistura da solução foi realizada em temperatura ambiente, utilizando um agitador magnético, por um período de 24 horas para garantir a completa dissolução dos solutos e a obtenção de soluções homogêneas. As soluções preparadas foram então misturas na proporção quitosana 80% /PEO 20% e deixadas sob agitação por aproximadamente mais 20 minutos. Em seguida essa solução foi submetida ao processo de eletrofiação.

2.3 INCORPORAÇÃO DO FÁRMACO À BLENDA

2.3.1 POR ELETROFIAÇÃO

Após o preparo da blenda polimérica contendo quitosana e PEO, uma massa de fármaco correspondente a 20% da massa total de polímero na mistura foi pesada e diluída em 0,5mL de água destilada. Essa dissolução foi então transferida para a solução de quitosana/PEO previamente preparada. Utilizou-se o ultrassom na temperatura de 40°C por um período de 30 minutos para que houvesse uma melhor incorporação do sulfato de neomicina à blenda. Logo após, essa solução ficou sob agitação magnética por mais 30 min e então foi eletrofiada.

2.3.2 POR DEPOSIÇÃO

Após a eletrofiação da blenda quitosana/PEO, uma massa de fármaco correspondente a 200% da massa do filme obtido foi pesada e diluída em água destilada. Em seguida, com a ajuda de

uma pipeta de *pasteur*, depositou-se cuidadosamente essa diluição sobre a blenda eletrofiada. Logo após, a blenda com o fármaco foi colocada no dissecador para que houvesse a evaporação da água.

2.4 ELETROFIAÇÃO

A eletrofição foi realizada utilizando uma configuração horizontal contendo uma fonte de alimentação de alta tensão, uma bomba infusora e uma placa metálica estática. A solução preparada foi transferida para uma seringa de vidro de 5mL fixada a uma agulha de diâmetro interno de 0,6mm. Um fio de cobre conectado ao eletrodo positivo foi acoplado ao capilar e a placa coletora foi aterrada. As condições de processo foram previamente estudadas e definiu-se os seguintes parâmetros: Para a blenda de quitosana/PEO uma distância entre o coletor e a agulha de 20cm, tensão aplicada de 18kv e taxa de alimentação de 0,5 mL.h⁻¹. Para a solução contendo o sulfato de neomicina, a distância e a taxa de alimentação usada foram as mesmas, porém a tensão aplicada foi de 20kv. Todos os experimentos foram realizados à temperatura ambiente e a umidade relativa do ar foi mantida entre 30 e 40%.

2.5 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOFIBRAS

2.5.1 MORFOLOGIA E DIÂMETRO DAS FIBRAS

A morfologia da superfície das nanofibras foram caracterizadas por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV) no equipamento QUANTA 250. Antes da observação no MEV, uma pequena amostra da membrana foi expelida com uma fina camada de ouro em um equipamento da BAL-TEC – SCD 050. As amostras foram observadas em uma ampliação de 20.000 vezes (5µm) em relação ao seu tamanho original para que fosse possível avaliar visualmente a eletrofiabilidade e a existência de *beads* na membrana. Por meio dessas imagens, também foi possível determinar o diâmetro médio das fibras obtidas utilizando o *software* de processamento de imagem *Quantikov Image Analyzer*.

2.5.2 ESPECTROSCOPIA INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER – FTIR

Os espectros FTIR dos materiais puros, assim como das membranas obtidas, foram registrados com um espectrofotômetro da Perkin Elmer. As medições foram realizadas no comprimento de onda entre 500 e 4000cm⁻¹ no modo de transmissão. Para a realização das análises,

as membranas foram colocadas diretamente no aparato e as amostras em pó foram manipuladas em forma de pastilhas. A resolução utilizada no equipamento foi de 2cm^{-1} .

2.5.3 COLORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL – DSC

As medidas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram realizadas no DSC Shimadzu, mod. DSC-60. As curvas foram obtidas aquecendo-se as amostras desde a temperatura de 30°C até à temperatura de 200°C , em um cadinho de alumínio, a uma taxa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ sob uma atmosfera de Nitrogênio. Em seguida, houve o resfriamento das amostras desde até temperatura de 200°C até 30°C .

2.5.4 TERMOGRAVIMETRIA – TGA

As propriedades térmicas dos materiais utilizados, assim como dos filmes, foram investigadas por análise termogravimétrica (TGA) no aparelho da PerkinElmer, mod. STA 6000, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio, a vazão de $50\text{ mL}/\text{min}$, a uma taxa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ na faixa de temperatura de 30 a 700°C . Os parâmetros operacionais foram mantidos constantes para todas as amostras, a fim de obter dados comparáveis.

2.5.5 ESPECTROSCOPIA DE RAIOS X – DRX

Os padrões de difração de raios x foram obtidos em condições ambientes num difratômetro de raios x da Bruker, mod. D2 Phaser com uma fonte de radiação $K\alpha$ do cobre ($1,5418\text{ \AA}$). A tensão e a corrente fornecidas foram ajustadas para 40kV e corrente 30mA , respectivamente. As amostras foram montadas em um suporte de amostra e as intensidades de difração foram examinadas em um intervalo de 2θ entre $1,5$ e $30,0$ graus a uma velocidade de $1^{\circ}.\text{min}^{-1}$.

2.5.6 ANALISE MICROBIANA

A atividade antibacteriana foi determinada pelo método de difusão em placa de ágar. O efeito bacteriano dos filmes de quitosana/PEO sem fármaco, quitosana/PEO com fármaco eletrofiado e quitosana/PEO com fármaco depositado foram determinados contra bactérias gram positivas (*S.*

aureus) e gram negativas (*E. coli*). Discos de papel de filtro com penicilina foram utilizados como controles. A cultura foi mantida em estufa a 33 ° C durante 24 h; cada amostra de filme foi medida por sua zona de inibição, que é a área ao redor do disco que não teve crescimento bacteriano. Uma câmera digital foi usada para fotografar as culturas de ágar resultantes e suas zonas de inibição.

2.5.7 TESTE DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACO

2.5.7.1 Construção da Curva de Calibração

Para a construção da curva analítica, utilizou-se uma solução padrão de 50 g/L de Sulfato de Neomicina em tampão fosfato pH 5,5. A partir desta solução, realizou-se diluições nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 g/L de sulfato de neomicina por litro de solução tampão. Estas amostras foram avaliadas empregando-se espectrofotômetro de UV-Vis SHIMAZU – UV-1800 no comprimento de onda de 309nm, no qual ocorre a máxima absorção do fármaco estudado.

2.5.7.2 Liberação *in vitro* do Sulfato de Neomicina

Para o estudo de liberação *in vitro*, emergiu-se as membranas carregadas com sulfato de neomicina em um *erlenmeyer* contendo 10mL de solução tampão fosfato (pH 5,5). Logo após, o *erlenmeyer* contendo a membrana foi colocado um agitador orbital da LAB-LINE INSTRUMENTS INC. modelo 3545 contendo água à uma temperatura de $32 \pm 1^\circ\text{C}$ e sob agitação de 140 rpm. Em intervalos de tempo previamente determinados (10, 20, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420 e 480 minutos) retirou-se uma alíquota da solução contendo o fármaco liberado e fez-se a leitura da mesma em um espectrofotômetro ultravioleta SHIMAZU – UV-1800. Cada alíquota retirada era devolvida ao *erlenmyer* afim de se obter um volume constante e não alterar a concentração da solução. Os dados obtidos foram analisados para determinar as quantidades cumulativas de sulfato de neomicina liberado em cada pondo de tempo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOFIBRAS

3.1.1 MORFOLOGIA E DIÂMETRO DAS FIBRAS

Por meio do processo de eletrofiação, foi possível obter com sucesso uma blenda polimérica contendo 80% de quitosana e 20% de poli (óxido de etileno) (v/v) nas concentrações de 4 e 2% (m/v), respectivamente, como descrito na metodologia. As blendas eletrofiadas foram analisadas utilizando-se a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a imagem obtida é apresentada figura 1. O diâmetro das fibras foi calculado por intermédio do programa computacional “*Quantikov Image Analyzer*”, comprovando que os diâmetros das fibras estão em escala nanométrica, com uma média de $299 \pm 0,04\text{nm}$. Além disso, não foi observado defeitos (*beads*) nas nanofibras obtidas. Os trabalhos encontrados na literatura reportaram resultados parecidos no que se diz respeito ao diâmetro médio das fibras eletrofiadas de blendas de quitosana e PEO. Alguns exemplos, como os trabalhos de Fazli Y., Shariatinia, Z (2016) [11], Cheng, F. et al. (2015) [1], Dilamian, M., et al. (2013) [12], Pilehrood, M.K., et al. (2014) [10] e Yuan, T.T., et al. (2016) [7] mostram que o diâmetro médio das fibras obtidas, para diferentes misturas de quitosana e PEO, são de aproximadamente 190, 310, 272, 320 e 360nm, respectivamente.

Partindo-se da mesma blenda acima descrita, incorporou-se o sulfato de neomicina à essa solução, na proporção de 20% em relação a massa total de polímero. Como descrito na metodologia, diluiu-se previamente o fármaco em água, em seguida transferiu-se essa diluição à solução contendo os polímeros Quitosana/PEO. No entanto, devido à baixa solubilidade desse fármaco em meio ácido (utiliza-se ácido acético no preparo da solução polimérica), essa proporção foi a maior quantidade possível de fármaco incorporada à blenda, visto que, mesmo após sônicar a solução por 30 minutos e agita-la por mais 30 min, ainda assim não houve a completa dissolução do sulfato de neomicina. Apesar das dificuldades encontradas para o preparo da solução, foi possível eletrofiar a blenda de quitosana/PEO contendo o fármaco. A Figura 2 mostra a imagem obtida pelo MEV. Da mesma forma, o diâmetro médio das fibras foi calculado e foi possível obter fibras eletrofiadas em escala nanométrica, com uma média de diâmetro de $258 \pm 0,04\text{nm}$. O diâmetro das fibras contendo fármaco foi ainda menor que à membrana isenta de sulfato de neomicina. Por se tratar de um sal, a adição do sulfato de neomicina à blenda resulta em uma maior densidade de carga na solução, o que faz com que a condutividade da mesma aumente. Assim, quando se aplica a tensão, o jato de polímero é mais

facilmente atraído à placa coletora aterrada, fazendo com que o mesmo se estique e fique mais fino, rendendo fibras com menores diâmetros [12].

Visto que a quantidade de fármaco incorporada à blenda foi muito baixa, inferior ao limite de detecção desse composto no espectrofotômetro ultravioleta, não foi possível realizar o teste de liberação de fármaco para essa membrana. Dessa forma, buscou-se uma nova maneira de incorporar o fármaco à blenda. Optou-se pelo método de deposição, onde diluiu-se o fármaco na proporção de 200% em relação à massa de polímero e, em seguida, depositou-se essa solução na blenda Quitosana/PEO 80/20 previamente eletrofiada. A figura 3 mostra as imagens obtidas pelo MEV. Pela imagem, pode-se observar que houve a deposição do fármaco nanofibra, adquirindo o formato das mesmas e mostrando um material entrelaçado.

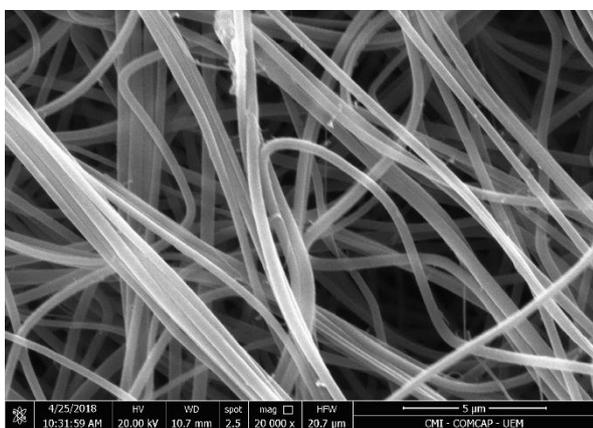


Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura para a blenda 80/20 (v/v) Quitosana 4%/PEO 2% (m/v) sem sulfato de neomicina aumentada 20000 vezes

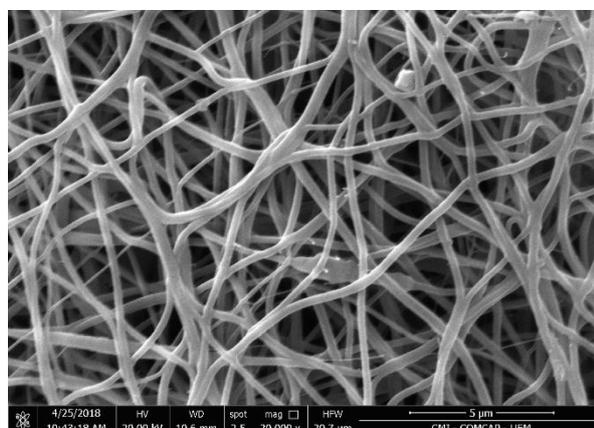


Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura para a blenda 80/20 (v/v) Quitosana 4%/PEO 2% (m/v) com sulfato de neomicina eletrofiado aumentada 20000 vezes

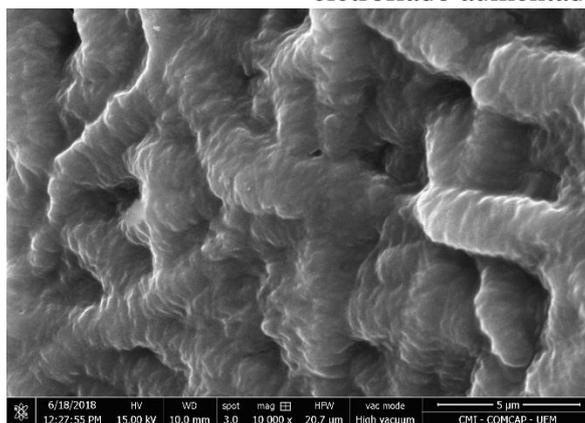


Figura 3. Microscopia eletrônica de varredura para a blenda 80/20 (v/v) Quitosana 4%/PEO 2% (m/v) com sulfato de neomicina depositado aumentada 20000 vezes

3.1.2 ESPECTROSCOPIA INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER - FTIR

A espectroscopia FT-IR é uma ferramenta muito importante na investigação das nanofibras, pois determina a ocorrência de complexação e/ou interação entre duas matrizes poliméricas, assim como serve de ferramenta para avaliar a incorporação de outros compostos nessas blendas. Os espectros infravermelho dos materiais quitosana, poli (óxido de etileno) e sulfato de neomicina foram obtidos com um espectrofotômetro na região de número de onda entre 4000 e 500 cm^{-1} e são mostrados na figura 4,

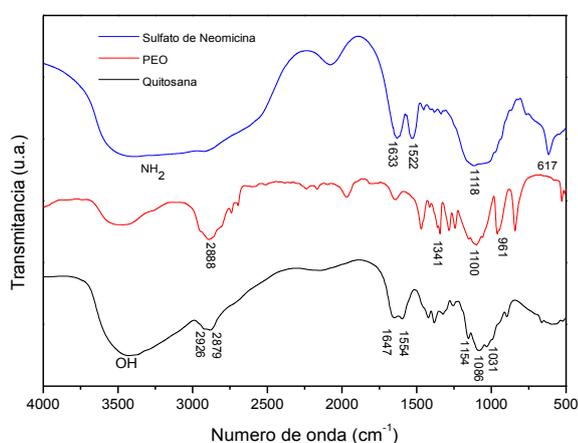


Figura 4. Análise FTIR das amostras em pó da quitosana, PEO e sulfato de neomicina puros utilizados para o preparo das soluções

O espectro do pó da quitosana utilizado para a preparação do filme mostra as bandas de absorção típicas desse polímero, observadas a 1154 cm^{-1} (estiramento assimétrico da ligação C-O-C) e a 1086 e 1031 cm^{-1} (vibrações envolvendo o estiramento C-O). Esses picos são característicos dos polissacarídeos [16, 17]. Uma banda ampla e forte em torno de 3400 cm^{-1} diz respeito às vibrações OH, assim como aos modos de estiramento NH, que estão sobrepostos a essa forte banda [18, 19]. Duas bandas fracas encontradas a 2926 e 2879 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento CH e as que são mostradas a 1386 e 1323 cm^{-1} foram conferidas à deformação CH do grupo metila. As bandas típicas das amidas primária e secundária da quitosana são encontradas a 1647 e 1554 cm^{-1} , respectivamente [16, 17]. O espectro do poli (óxido de etileno) mostrou sua banda característica a 1100 cm^{-1} , a qual corresponde ao estiramento vibratório do grupo éter (C-O-C) [20]. Outros picos típicos do PEO podem ser encontrados a 961 cm^{-1} (dobramento assimétrico no plano e estiramento CH_2) 1341 cm^{-1} (estiramento simétrico dentro do plano CH_2) e 2888 cm^{-1} (estiramento CH_2) [20]. Já o espectro de FT-IR do sulfato de neomicina mostrou bandas em torno de 1630 , 1535 e 1118 cm^{-1} correspondendo

ao estiramento de NH, estiramento C=C e frequências de éter, respectivamente. [21, 15]. As bandas perto de 2930 cm^{-1} pertencem ao estiramento simétrico e assimétrico do grupo metileno e por volta de 3500 cm^{-1} foi observada a banda de estiramento NH_2 do grupo amina. Além disso, uma faixa próxima a 670 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento fora do plano N-H da neomicina [21, 22].

Quando ocorre a formação de uma blenda polimérica, assim como a incorporação de um fármaco à essa blenda, os picos característicos desses materiais são deslocados ou até mesmo desaparecem, mostrando que ocorreu a interação dessas substâncias. A Figura 5 ilustra o FT-IR da blenda de Quitosana/PEO, em comparação com os polímeros em sua forma pura.

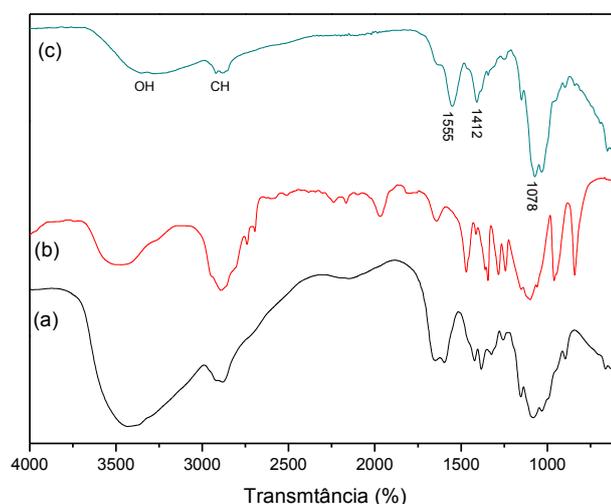


Figura 5. FTIR (a) Quitosana (b) PEO e (C) Blenda 80/20 (m/v) Quitosana 4%/PEO 2% (m/v) sem sulfato de neomicina

De acordo com Merlusca et al. (2017) [23], as principais interações dentro de um complexo Quitosana/PEO acontecem por meio de ligações de hidrogênio. Os grupos funcionais da quitosana, em especial o grupamento amina, podem formar ligações de hidrogênio intra ou intermoleculares com o PEO, assim como os grupos poliéter do PEO também podem formar ligações de hidrogênio com a quitosana [20]. O pico característico do dobramento NH_2 da quitosana é deslocado a número de ondas menores quando tem PEO nas nanofibras (de 1595 a 1555 cm^{-1}). O mesmo acontece com o dobramento CH_2 da quitosana, que é encontrado a 1467 cm^{-1} no polímero puro, mas desloca-se a número de ondas mais baixos (1412 cm^{-1}) quando ocorre a formação da blenda [17]. Houve também uma mudança na intensidade e na largura da banda na região hidroxila/amina (3000 - 3800 cm^{-1}) da quitosana. O pico de absorção observado em 1100 cm^{-1} no PEO puro, típico do estiramento vibratório do grupo éter, muda gradualmente para números de onda mais baixos (1078 cm^{-1}) quando tem quitosana nas nanofibras. Essas mudanças acima descritas, podem ser atribuídas à formação de pontes de hidrogênio entre o oxigênio do poliéter encontrado no PEO e o hidrogênio da

amina encontrado na quitosana. Portanto, fortes interações entre quitosana e PEO podem prevalecer a partir da formação dessas ligações de hidrogênio, comprovando a miscibilidade desses polímeros [20].

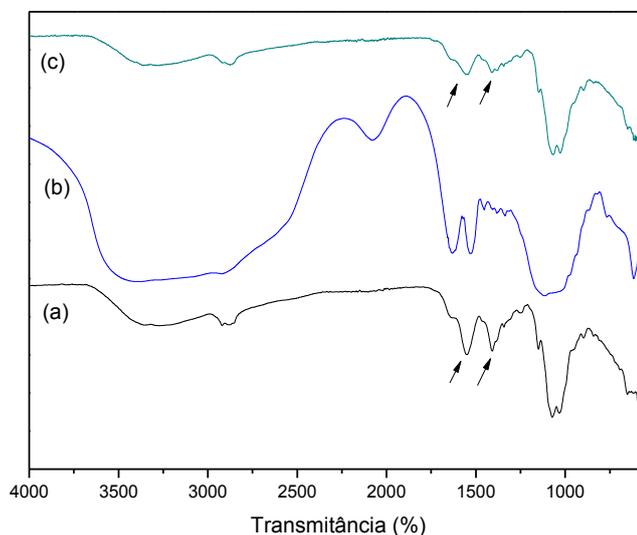


Figura 6. FTIR (a) Blenda 80/20 (m/v) Quitosana 4%/PEO 2% (m/v) sem sulfato de neomicina (b) Sulfato de Neomicina puro (C) Blenda 80/20 (m/v) Quitosana 4%/PEO 2% (m/v) com sulfato de neomicina eletrofiado

Quando ocorre a incorporação do sulfato de neomicina durante a eletrofição da blenda polimérica, pode-se notar algumas mudanças no espectro resultante (Figura 6). Por outro lado, por se tratar de substâncias com grupos funcionais semelhantes, alguns picos podem ter sido sobrepostos. A interação da estrutura da droga com a matriz polimérica leva ao deslocamento de alguns picos para comprimento de onda mais baixo e ocorre uma diminuição das intensidades de algumas bandas [23]. A mudança mais significativa ocorreu com as bandas características da quitosana (dobramento NH_2 e CH_2 a 1555 e 1412 cm^{-1} , respectivamente). Essas bandas não foram deslocadas, porém mudaram consideravelmente de intensidade. O pico caracterizante do PEO encontrado na blenda no comprimento de onda de 1076 cm^{-1} , foi sutilmente deslocado para 1068 cm^{-1} . Essas mudanças no FT-IR após a adição do sulfato de neomicina, comprova a interação dos polímeros com o mesmo, que de acordo com Merlusca et al. (2017) [23], pode ocorrer através da formação de ligação de hidrogênio ou por ligações iônicas se os parceiros estiverem carregando cargas de sinais opostos. Duas bandas da quitosana a 1150 cm^{-1} , envolvendo o estiramento assimétrico da ligação C-O-C e a 1031 cm^{-1} , mostrando as vibrações envolvendo o estiramento C-O, aparecem sem deslocamentos na blenda com fármaco.

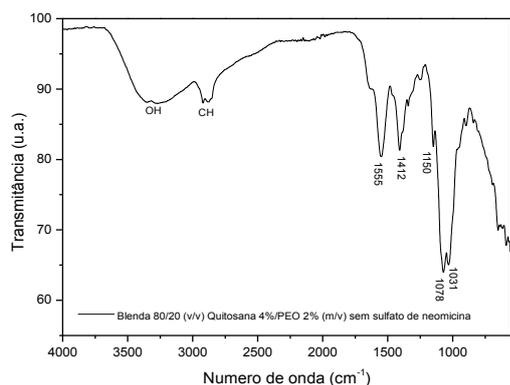


Figura 7. FTIR da blenda 80/20 (m/v) Quitosana 4%/PEO 2% (m/v) sem sulfato de neomicina

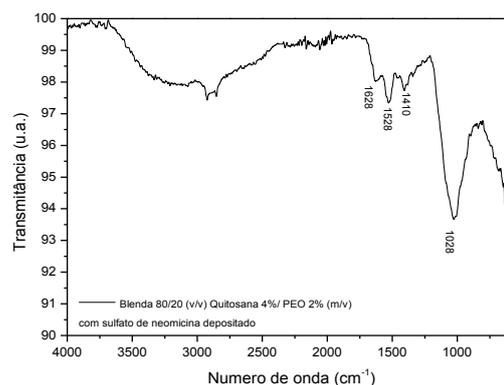


Figura 8. FTIR da blenda 80/20 (m/v) Quitosana 4%/PEO 2% (m/v) com sulfato de neomicina depositado

No entanto, quando foi realizada a incorporação do sulfato de neomicina à blenda por meio de deposição, diferentes bandas apareceram, em comparação com a blenda sem fármaco, como mostram as Figuras 7 e 8. Uma banda a 1628 cm^{-1} que não aparece na blenda sem fármaco ou na blenda com fármaco eletrofiado, pode ser atribuída ao estiramento N-H da neomicina [21]. Duas bandas fracas por volta de 1528 e 1410 podem ser conferidas ao estiramento fora do plano das ligações CH e CH₂ da quitosana, que foram deslocadas para comprimentos de ondas menores [17, 18]. De acordo com Merlusca et al. (2017) [23], as mudanças na intensidade de absorção no comprimento de onda entre 3000 e 3800 cm^{-1} relevam que os grupos OH e NH₂ da quitosana podem formar ligações de hidrogênio com os grupos OH e NH₂ do fármaco. A banda por volta de 1028 cm^{-1} aparece mais alargada se comparada com o espectro da blenda com fármaco eletrofiado e as bandas característicos da quitosana a 1150 e 1031 cm^{-1} desaparecem. Essa banda pode ser atribuída à frequência éter do sulfato de neomicina que, por ser mais alargada, acabou sobrepondo o estiramento do grupo éter do PEO. O aparecimento mais evidente das bandas correspondentes ao sulfato de neomicina na blenda pode ser explicado pela forma como o mesmo foi incorporado à membrana. Como o fármaco foi depositado na superfície do filme, e não foi incorporado internamente nas fibras, suas bandas características maior forte puderam ser mais facilmente detectadas pelo equipamento.

3.1.3 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL - DSC

A análise DSC pode ser utilizada como um método para avaliar as propriedades físico-químicas dos polímeros, que geralmente é alterada como consequência da mistura de mais de um material [55]. A Figura 9 mostra os termogramas de DSC do pó da quitosana e do poli(óxido de etileno), utilizados para a preparação a blenda.

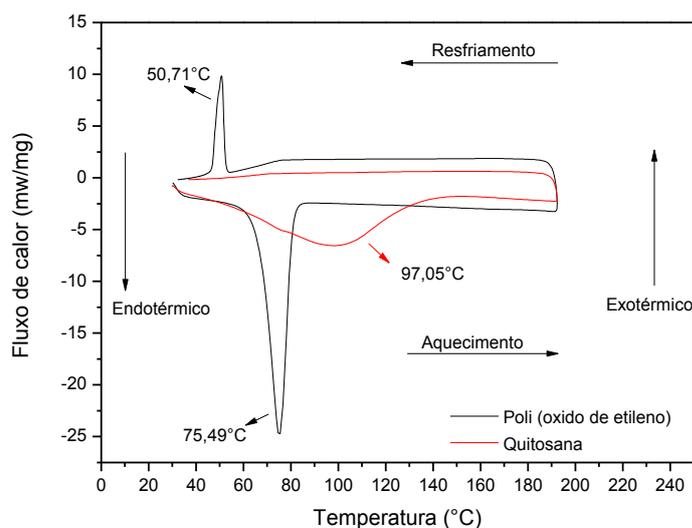


Figura 9. Análise DSC do pó da quitosana e do poli (óxido de etileno) – PEO puros utilizados para a preparação das soluções poliméricas

O termograma da quitosana pura mostrou apenas um deslocamento na curva endotérmica por volta de 97,05 ° C, correspondente à desidratação do material. De acordo com a literatura, [24, 25] a quitosana, assim como grande parte dos polissacarídeos, não exibe ponto de fusão em análise de DSC. Devido às fortes forças intermoleculares que derivam de seus grupos hidroxilos, acetaminos e aminos, quando submetida a temperaturas severas, a quitosana sofre degradação térmica, decompondo-se sem que a temperatura de fusão cristalina seja atingida. No entanto, avaliando o termograma do PEO puro, constatou-se um pico bem claro por volta 75,49°C, correspondendo o seu pico de fusão cristalina e outro a 50,71°C, que representa o pico de recristalização desse polímero. Esses dados corroboram com os encontrados na literatura [26, 27].

Dessa forma, o valor de calor de fusão na blenda Quitosana/PEO sem o fármaco (figura 10) foi obtido a partir do pico de fusão do PEO. A cristalinidade do mesmo (X_c) foi calculada a partir de dados DSC de acordo com a equação 1 [24, 25]

$$X_c = \frac{\Delta H_f - \Delta H_c}{\Delta H_f^0} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Sendo que ΔH_0 é calor de fusão por grama de PEO 100% cristalino (213 J.g⁻¹) [27], w é a fração em peso de PEO e ΔH é o calor de fusão da amostra na blenda.

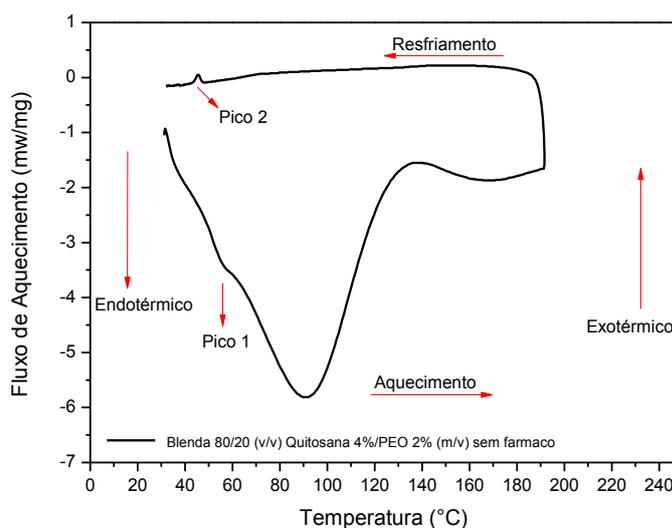


Figura 10. Análise DSC da blenda 80/20 (v/v) Quitosana 4%/PEO 2% (m/v) sem fármaco

A Figura 10 apresentou um pico endotérmico não muito forte, por volta de $50,6^{\circ}\text{C}$ que diz respeito a fusão cristalina do PEO na blenda. Comparando com o pico fusão do PEO puro ($75,95^{\circ}\text{C}$) nota-se um deslocamento de $25,35^{\circ}\text{C}$ no pico endotérmico. A variação da posição do pico é provavelmente devido às mudanças físicas e moleculares, como resultado das interações entre os componentes da mistura [23]. Como mostram outros estudos de Neto et al. (2005) [26] e Nista et al. (2016) [27], o PEO é deslocado a temperaturas de fusão mais baixas quando está em misturas, claramente mostrando a interferência da quitosana na cristalização do mesmo. O pico endotérmico amplo, próximo de 100°C , é correlacionado com perda de água de associação dos grupos hidroxílicos dos polímeros [26, 27]. Sabe-se que a temperatura de cristalização para o PEO puro encontra-se por volta de $50,71^{\circ}\text{C}$. No caso da blenda, o pico na curva de resfriamento foi deslocado para uma temperatura mais baixa, em torno de $45,6^{\circ}\text{C}$, o que comprova que a quitosana altera a cristalinidade do PEO.

Após a incorporação do sulfato de neomicina à blenda (pelo método de eletrofiação e por deposição) estudou-se a possível interação entre o fármaco e os polímeros por meio estudos de DSC para as nanofibras carregadas com o mesmo. Os termogramas DSC obtidos são apresentados nas Figuras 11, 12 e 13.

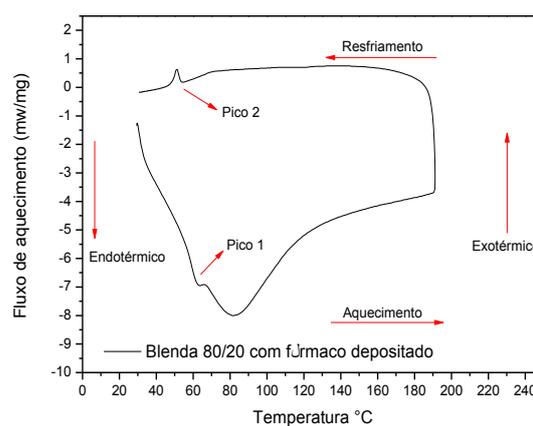
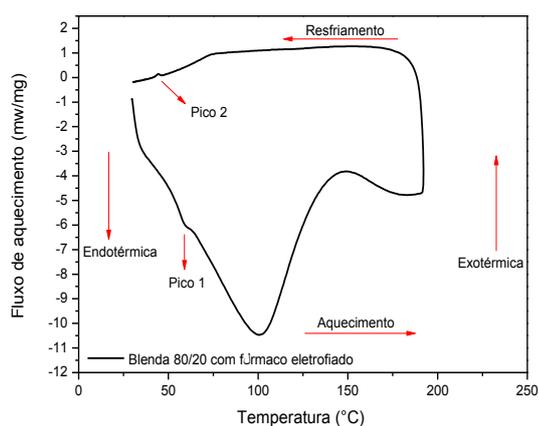


Figura 11. DSC do poli (óxido de etileno) em pó puro utilizado para a preparação das soluções poliméricas
 Figura 12. DSC da Quitosana em pó pura utilizada para a preparação das soluções poliméricas

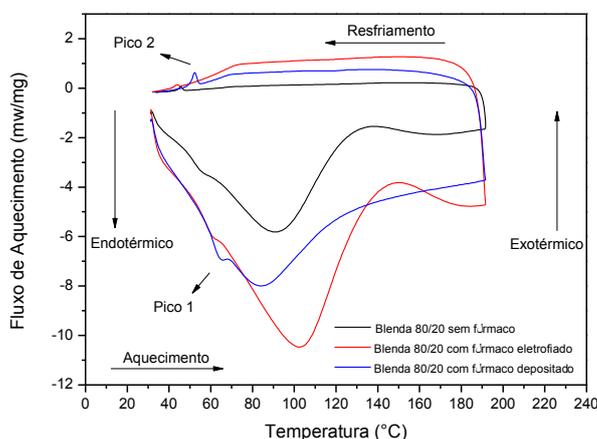


Figura 13. TGA e DTG da blenda 80/20 (v/v) Quitosana 4%/PEO 2% (m/v) sem sulfato de neomicina, com sulfato de neomicina eletrofiado e com sulfato de neomicina depositado

Comparando as blendas sem fármaco, com fármaco eletrofiado e com fármaco depositado, não se observou diferenças significativas no gráfico DSC. Para a blenda com fármaco eletrofiado, o pico de fusão apareceu em 56,10 °C e o pico de cristalização em torno de 44,5°C. Pode-se atribuir os picos de fusão e cristalização encontrados na blenda à presença do PEO. Ao adicionarmos o fármaco à mistura, os picos foram novamente deslocados, no entanto para temperaturas mais altas no pico endotérmico e um pouco mais baixo no pico exotérmico. No caso da blenda com fármaco depositado, tanto o pico de fusão quanto o de cristalização, ficaram mais evidentes e apareceram nas temperaturas de 57,07°C e 51,10°C, respectivamente. Novamente, houve mudanças nas temperaturas de fusão e cristalização, deslocando o pico para temperaturas mais altas. Os dados acima citados, assim como as entalpias de fusão e cristalização e o grau de cristalinidade calculado, são apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Valores de fusão, recristalização e porcentagem cristalina das membranas de 80/20 (v/v) Quitosana 4%/PEO 2% (m/v) sem fármaco, com fármaco eletrofiado e com fármaco depositado.

	T_f (°C)	ΔH_f (J/g)	T_c (°C)	ΔH_c (J/g)	X_c
PEO	75,5	163,82	50,71	- 111,16	24,72
Blenda s/ Fármaco	50,6	2,99	45,6	- 2,00	0,465
Blenda c/ Fármaco Eletrofiado	56,10	1,32	44,5	- 0,55	0,361
Blenda c/ Fármaco Depositado	57,07	3,34	51,10	- 2,81	0,249

Os termogramas das nanofibras com e sem fármaco apresentaram deslocamentos endotérmicos e exotérmicos quando comparado ao PEO puro. De acordo com Kuntzler et al. (2018) [23], a menor temperatura de fusão e de entalpia nas nanofibras do que no polímero puro, pode ser devido às interações das cadeias de PEO, quitosana e do fármaco. Assim como a temperatura de fusão e entalpia, a cristalinidade das nanofibras também foi menor comparada ao PEO puro. Essa diferença pode estar associada à orientação eletricamente forçada das cadeias poliméricas durante a eletrofição, transformando-as em estruturas emaranhadas orientadas [23].

3.1.4 TERMOGRAVIMETRIA - TGA

As análises TG e DTG foram utilizadas para avaliar a estabilidade térmica e determinar a temperatura de decomposição dos materiais puros e dos filmes. Como mostram as figuras 14, 15 e 16, as curvas de perda de massa dos componentes puros indicaram características térmicas significativamente diferentes. A quitosana mostra uma curva de decomposição entre 215 e 380°C enquanto que o PEO tem substancialmente uma maior temperatura de decomposição entre 315 e 445°C. O sulfato de neomicina apresentou dois picos de degradação, o primeiro por volta de 209°C e o segundo entre 267 e 420°C.

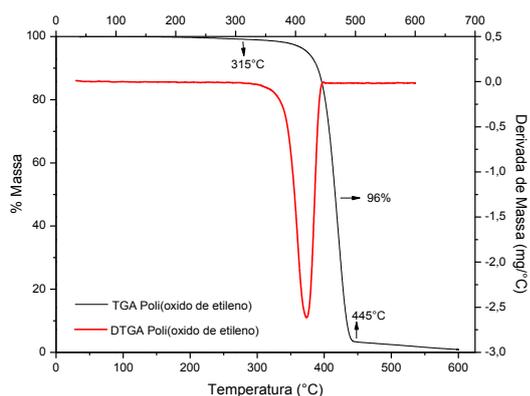


Figura 14. TGA e DTG do poli (óxido de etileno) em pó puro utilizado para a preparação das soluções poliméricas

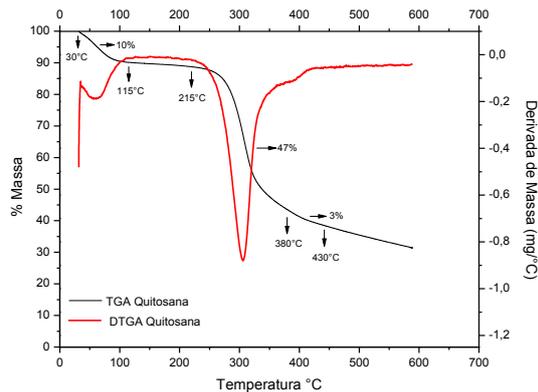


Figura 15. TGA e DTG da Quitosana em pó pura utilizada para a preparação das soluções poliméricas

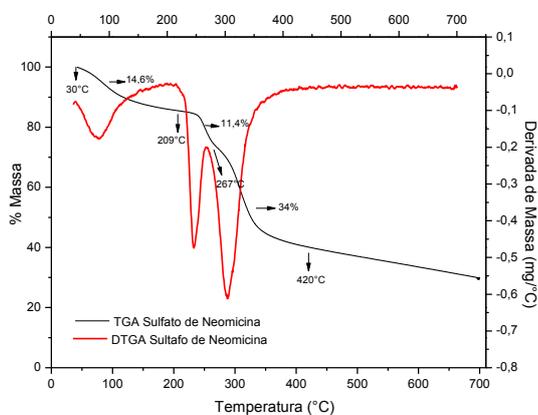


Figura 16. TGA e DTG do sulfato de Neomicina utilizado para a preparação da solução de fármaco eletrofiada juntamente à blenda 80/20 (v/v) Quitosana 4%/PEO 2% (m/v) e depositada na membrana 80/20 (v/v) Quitosana 4%/PEO 2% (m/v) eletrofiada

Por meio da comparação das temperaturas de decomposição entre os materiais puros e as blendas com e sem fármaco, pode-se obter informações sobre como as interações intermoleculares afetaram a estabilidade térmica das mesmas, como apresentam as figuras 17, 18 e 19.

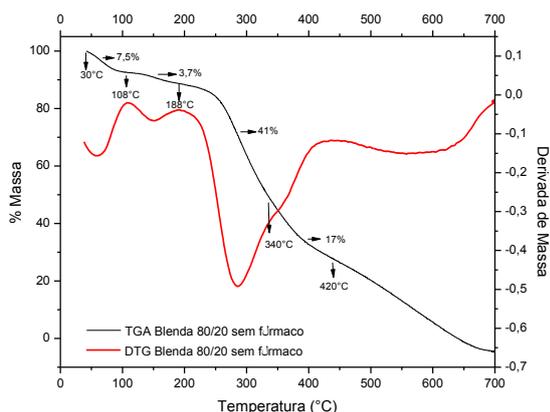


Figura 17. TGA e DTG da blenda 80/20 (v/v) Quitosana 4%/PEO 2% (m/v) sem sulfato de neomicina

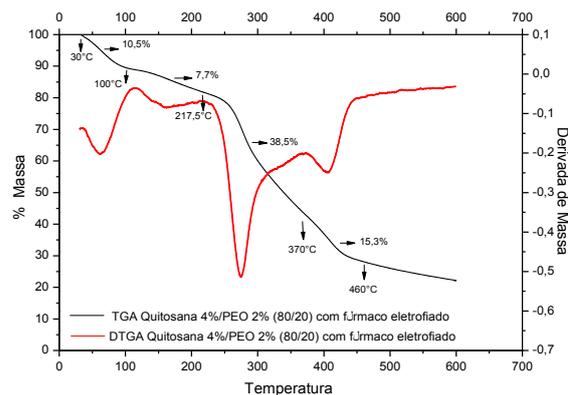


Figura 18. TGA e DTG da blenda 80/20 (v/v) Quitosana 4%/PEO 2% (m/v) com fármaco eletrofiado

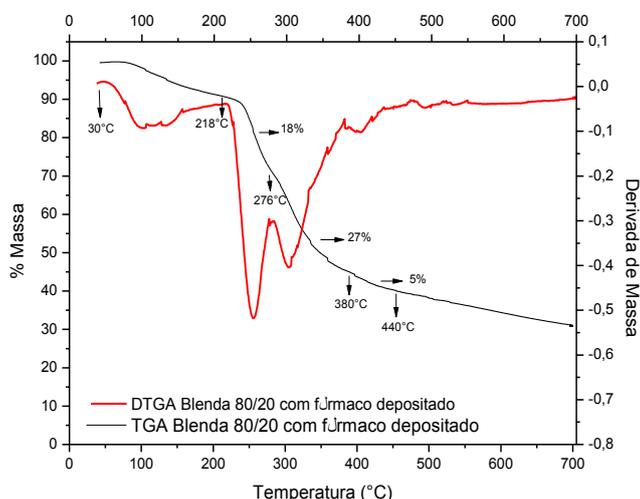


Figura 19. TGA e DTG da blenda 80/20 (v/v) Quitosana 4%/PEO 2% (m/v) com fármaco depositado

Avaliando primeiramente a blenda sem adição de fármaco, observa-se uma perda de massa de 7,5% nas temperaturas de 30 a 108°C referente a evaporação da água. Entre 108°C e 188°C ocorre uma pequena perda de massa, que está relacionada com a evaporação do solvente ácido acético (ponto de ebulição 118°C) remanescente na blenda. Em seguida, verifica-se a uma perda de massa mais significativa, de 41% que diz respeito a degradação da quitosana. Nota-se que as interações intermoleculares reduziram a estabilidade térmica da quitosana que, em sua forma pura ocorria entre 215 e 380°C e na blenda foi para 188 e 340°C. No caso do PEO, a estabilidade térmica aumentou, iniciando sua degradação acima de 340°C. De acordo com Bostan et al. (2013) [28] durante a formação da blenda o número de interações intermoleculares cadeia de PEO com a quitosana aumenta, o que leva a uma redução significativa na estabilidade térmica da quitosana e um aumento na estabilidade térmica do PEO. Estes resultados são evidências convincentes adicionais que

ocorrência de interações intermoleculares, provavelmente vindo das ligações de hidrogênio, como confirmado pelos resultados do FTIR e DSC [28].

Para a blenda com fármaco eletrofiado, nota-se um primeiro evento térmico entre as temperaturas de 30 e 100°C, também devido a evaporação da água. Entre 100 e 217°C ocorre um novo evento, com uma perda de 7,7% de massa, possivelmente relacionado à evaporação do solvente remanescente na blenda e a remoção da água intrínseca [23]. Em seguida, ocorre a degradação térmica da quitosana, entre as temperaturas de 217°C e 370°C, com uma perda de massa de 38,5% e, logo após, inicia-se a degradação do PEO puro, equivalendo a uma perda de 15,3% de massa. No caso da blenda com o fármaco eletrofiado, não houve uma diminuição na estabilidade térmica da quitosana, que se iniciou praticamente na mesma temperatura do polímero puro, a 217°. Além disso, a estabilidade do PEO aumentou ainda mais, se comparado com a blenda sem o fármaco. Pode-se constatar então que o fármaco proporcionou uma maior estabilidade térmica ao filme eletrofiado. Se desconsiderarmos a retirada de água, a perda de peso na blenda com fármaco, foi menor que a sem fármaco (53,8% e 58%, respectivamente) De acordo com Merlusca et al. (2017)[23] esse dado confirma a inclusão do medicamento na blenda.

Analisando o gráfico da blenda com o fármaco depositado, podemos observar que houve 3 eventos térmicos, retirando a evaporação da água e a água intrínseca, que ocorreu entre as temperaturas de 30 e 218°C. O primeiro evento diz respeito a perda de massa da quitosana, que foi observado entre 218°C e 276°C. Em seguida, houve o surgimento de um novo evento, o qual não apareceu nas blendas sem fármaco e com fármaco eletrofiado, mas que pode ser visto na análise térmica do fármaco puro. Dessa forma, atribui-se a perda de massa nas temperaturas de 276° a 380°C à degradação térmica do sulfato de neomicina presente na blenda. O PEO novamente aparece com uma maior estabilidade, iniciando sua degradação na temperatura de 380°C. Assim como na blenda contendo fármaco eletrofiado, a perda de massa foi menor, em comparação com a blenda sem a adição de sulfato de neomicina (50%) e podemos concluir que houve a inclusão do medicamento ao filme.

3.1.5 DIFRATOMETRIA DE RAIOS X – DRX

Foram registrados os padrões de Raios X dos componentes puros, assim como das blendas, afim de se investigar a morfologia dos filmes e determinar o efeito das composições na tendência cristalina desses materiais. O difratograma do pó da quitosana é mostrado na Figura 20. Como pode ser notado, a quitosana mostra dois picos de difração a $2\theta = 10,6^\circ$ e 20° . Sabe-se que a quitosana possui sempre água ligada à sua estrutura (aproximadamente 5%), mesmo que tenha sido extremamente seca. De acordo com Wan et al. (2006) [19], a incorporação dessas moléculas de água

à rede cristalina, denominados cristais hidratados, dá origem a uma estrutura predominantemente polimorfa que normalmente é detectado por um pico cristalino amplo no padrão de raios X. Portanto, o pico cristalino centrado em cerca de $10,6^\circ$ é atribuído à estrutura cristalina hidratada da quitosana. Outro pico registrado próximo a 20° é relatado como sendo a indicação da rede cristalina relativamente regular (110,040) desse polímero. O difratograma do PEO (Figura 21) apresenta dois picos fortemente refletidos em $2\theta = 18,97^\circ$ e 23° o qual nos mostra que o mesmo possui uma estrutura predominantemente cristalina, diferentemente da quitosana. Os valores encontrados, tanto para o PEO quanto para a quitosana, concordam com os apresentados na literatura por Kuntzler, et al. 2018 [17]; Zhang et al. 2005 [29]; Mauricio-Sanches et al. 2017 [18]; Wan et al. 2006 [19]. O padrão DRX do Sulfato de Neomicina (figura 22) apresenta dos picos amplos em torno de $2\theta = 19,45^\circ$ e $23,64^\circ$, o que indica que esse fármaco possui uma estrutura amorfa. Huang et al. (1999) [30] também analisaram o difratograma no sulfato de neomicina e encontrou os mesmos dados apresentados nesse estudo.

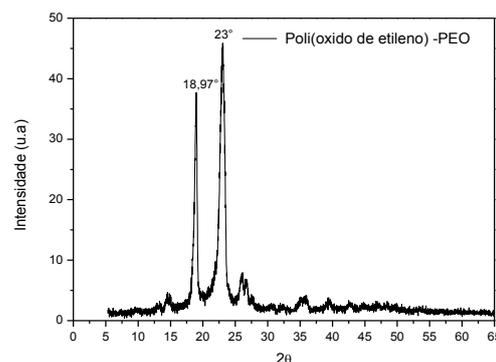
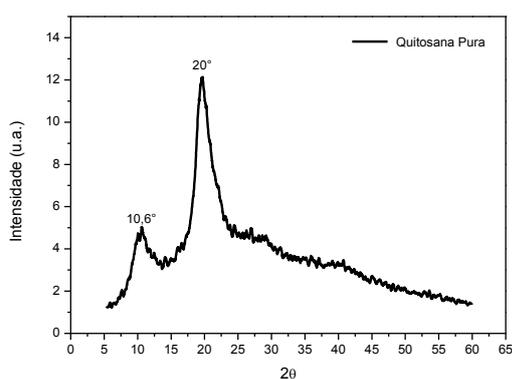


Figura 20. DRX da Quitosana em pó pura utilizada para a preparação das soluções poliméricas

Figura 21. DRX do poli(óxido de etileno) em pó puro utilizado para a preparação das soluções poliméricas

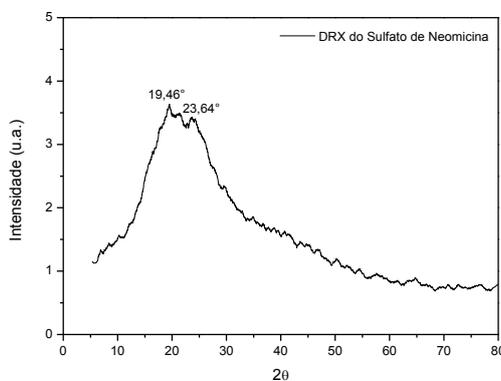


Figura 22. DRX do Sulfato de Neomicina utilizado para a preparação da solução de fármaco eletrofiada juntamente à blenda 80/20 (v/v) Quitosana 4%/PEO 2% (m/v) e depositada na membrana 80/20 (v/v) Quitosana 4%/PEO 2% (m/v) eletrofiada

Após a eletrofição da mistura do PEO com a quitosana, o difratograma das amostras das nanofibras exibiram halos amorfos e de baixa intensidade, como mostra a Figura 23. De acordo com Kuntzler et al. (2018) [17] esse resultado pode estar relacionado com a aplicação da tensão durante o processo de eletrofição, que pode ter reorganizado as cadeias poliméricas de modo a deixar o material mais amorfo. Além disso, o não aparecimento dos picos cristalinos característicos do PEO na blenda, pode ser considerado como uma prova adicional da supressão da sua cristalinidade via ligações de hidrogênio com a quitosana, comprovando os dados obtidos nas análises anteriores [28]

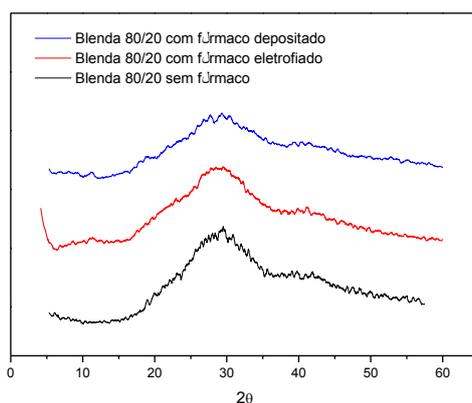


Figura 23. DRX das blendas 80/20 (v/v) Quitosana 4%/PEO 2% (m/v) sem fármaco, com fármaco eletrofiado e com fármaco depositado

Após a adição do sulfato de neomicina às blendas, tanto por meio do processo de eletrofição, como por deposição, não se notou mudanças significativas na cristalinidade das mesmas (Figura 23). Esse resultado era de se esperar, visto que o fármaco em questão possui uma natureza predominantemente amorfa, portanto não poderia influenciar na cristalinidade das membranas obtidas.

3.2 ANALISE MICROBIANA

A neomicina é um antibiótico aminoglicosídeo que possui excelente atividade contra bactérias Gram-negativas e atividade parcial contra bactérias Gram-positivas [14]. A atividade antibacteriana das membranas com e sem fármaco foi determinada pelo método de difusão em placa de ágar. O efeito bactericida desses filmes foi determinado contra bactérias gram positivas (*S. aureus*) e bactérias gram negativas (*E. coli*). Após a incubação, a inibição do crescimento pode ser vista como uma zona clara ao redor de cada placa de Petri. A zona de inibição é examinada e medida com a ajuda de escala. Os resultados estão representados abaixo nas Figuras 24 e 25 e na Tabela 2

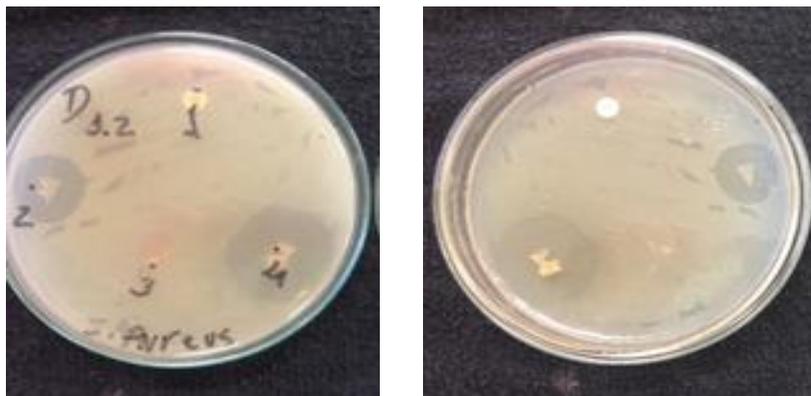


Figura 24. Análise microbiana com bactérias Gram positiva (*S. Aureus*) para as membranas eletrofiadas de quitosana/PEO sem fármaco, com fármaco eletrofiado e com fármaco depositado



Figura 25. Análise microbiana com bactérias Gram Negativas (*E. Coli*) para as membranas eletrofiadas de quitosana/PEO sem fármaco, com fármaco eletrofiado e com fármaco depositado

Tabela 2. Medidas do halo de inibição das blendas 80/20 (v/v) Quitosana 4%/PEO 2% (m/v) sem e com sulfato de neomicina eletrofiado

Identificação das Placas	S. Aureus	E. Coli
	D 1.0 (cm)	D 1.2 (cm)
1 Controle (Penicilina G 10U)	0,6	0,5
2 80/20 com fármaco eletrofiado	0,7	0,7
3 80/20 sem fármaco	0,4	0,4
4 80/20 com fármaco depositado	1,1	1,0

A quitosana é um polímero natural que apresenta características antibacterianas por si só, como reportado em outros trabalhos (Zhou et al. 2017 [8] ; Paul, W., Sharma, C.P., 2004 [31] ; Lin et al., 2013 [9]; Mendes et al. 2016 [13]; Mi et al. 2001 [32]). Dessa forma, analisou-se a atividade antibacteriana da membrana eletrofiada sem o sulfato de neomicina e os resultados comprovaram os

dados encontrados na literatura. A membrana sem fármaco apresentou halo de inibição de 0,4cm, tanto para a bactéria gram positiva, quanto para a gram negativa. Essa ação bacteriana ficou muito próximo do controle realizado com a penicilina, que foi de 0,6 e 0,5 cm para as bactérias gram positiva e gram negativa, respectivamente.

Para o filme contendo sulfato de neomicina eletrofiado na membrana, o halo de inibição foi um pouco superior à membrana sem fármaco, de 0,7cm para ambas bactérias. Esse resultado confirma que o sulfato de neomicina foi incorporado à membrana pelo processo de eletrofição com sucesso. No caso da membrana contendo fármaco depositado, o halo de inibição foi ainda superior, de 1,1cm para as bactérias gram positiva e gram negativa. A membrana com fármaco depositado teve uma maior atividade antibacteriana. Isso pode ser explicado pela forma que o fármaco foi incorporado à blenda. No caso da membrana eletrofiada com fármaco, o mesmo pode estar internamente ligado às fibras, ou seja, está mais no interior e pode demorar mais para ser liberado, além de que, está em menor quantidade na nanofibra, apenas 20% em relação à massa do polímero. A membrana contendo fármaco depositado possui uma quantidade superior incorporada, de 200% em relação a massa do polímero. Ademais, o sulfato de neomicina encontra-se mais na superfície da membrana por ter sido depositado após da eletrofição dos polímeros, podendo ter agido de uma forma mais rápida e/ou mais eficiente.

3.3 TESTE DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACO – *IN VITRO*

3.3.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO

O sulfato de neomicina apresenta seu comprimento de máxima absorção a 309nm, como mostra a Figura 26, o qual está de acordo com o encontrado na literatura [15]. Esse comprimento de onda foi selecionado para a realização da curva de calibração e posteriores análises. A partir de uma solução padrão de 50g.L⁻¹, soluções com concentrações entre 0,5 a 50g.L⁻¹ foram preparadas em água e a varredura no espectro ultravioleta foi realizada. A curva de calibração traçada apresentou um coeficiente de determinação (r^2) de 0,9989, como apresentado na Figura 27.

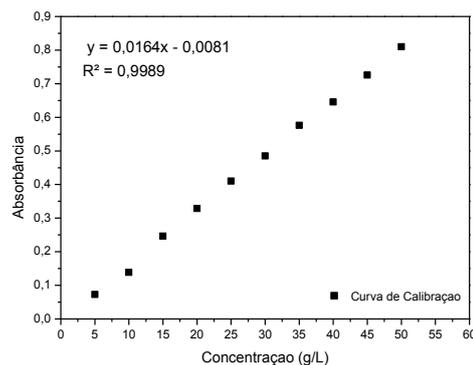
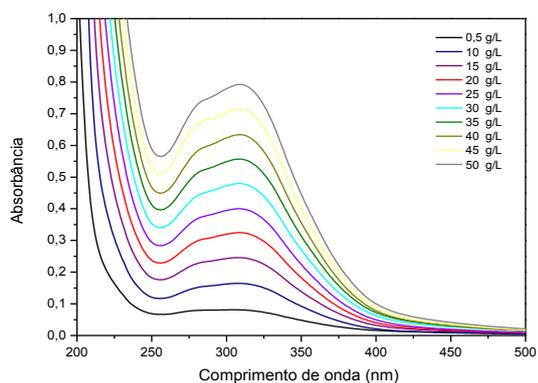


Figura 26 Varredura no Espectro UV-Vis para determinação do comprimento de onda de máxima absorção do sulfato de neomicina

Figura 27 Curva de calibração para sulfato de neomicina puro

3.3.2 LIBERAÇÃO *IN VITRO* DO SULFATO DE NEOMICINA

O perfil de liberação do sulfato de neomicina incorporada na membrana eletrofiada é mostrado na Figura 28. Afim de se proporcionar um ambiente parecido com as condições da pele humana, durante o teste a temperatura do rotator orbital foi mantida a 32°C e a solução tampão usada no meio de liberação foi preparada a um de pH de 5,5,

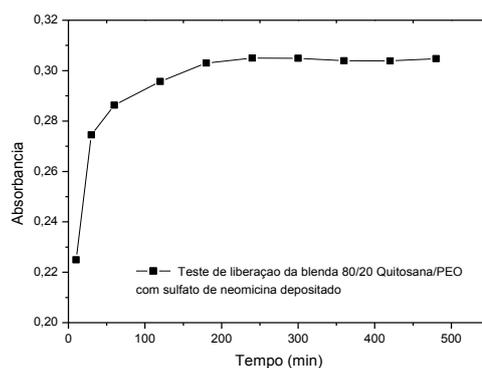


Figura 28. Teste de liberação do sulfato de neomicina depositado na blenda eletrofiada 80/20(v/v) Quitosana 4%/PEO 2% (m/v) realizado em duplicata

O perfil de liberação do fármaco no meio tamponado revelou que a neomicina é rapidamente transportada da membrana para a solução. No período 120 minutos já havia ocorrido a liberação de 18,37g.L⁻¹, que corresponde a grande parte do fármaco incorporado na membrana. Após

o período de aproximadamente 200 min não houve um aumento significativo na concentração do fármaco no meio de liberação, sendo que em um intervalo de tempo de 480 min, $18,95\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de fármaco haviam sido liberada, o que se aproxima a quantidade máxima de fármaco incorporado à membrana. Em um estudo realizado por Nitnam et al. (2013) [14] os resultados encontrados para perfil de liberação do sulfato de neomicina foram muito semelhantes. Utilizando-se blendas eletrofiadas de poly(styrene sulfonic acid-co-maleic acid)(PSSA-MA)/polyvinyl alcohol (PVA) como suporte para a liberação de sulfato de neomicina, seus resultados indicaram que em apenas 10 minutos grande parte do fármaco já havia sido liberada no meio e após 480 min a liberação de aproximou de 100%.

A elevada área superficial e a estrutura porosa da membrana eletrofiada pode ter facilitado a difusão do fármaco no meio tamponado, o que levou a uma liberação eficiente do sulfato de neomicina. Além disso, a elevada afinidade desse fármaco com a água pode ter colaborado com a rápida liberação do mesmo.

4. CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi possível obter nanofibras livres de defeitos e com diâmetro médio de 299nm contendo 80% de quitosana e 20% de PEO por meio do processo de eletrofiação. Ao incorporar o sulfato de neomicina à blenda durante o processo de eletrofiação, o diâmetro médio das fibras foi ainda menor, de apenas 258nm. Quando submetidas a análises FTIR, a blenda sem fármaco apresentou bandas deslocadas quando comparadas com o gráfico dos materiais puros, o que indica que houve a interação dos polímeros durante a formação da blenda. Da mesma forma, os dados obtidos no DSC corroboram com esse resultado, visto que houve mudanças no ponto de fusão do PEO na blenda para temperaturas menores, característica comum desse polímero quando está presente em misturas miscíveis. Os termogramas também mostraram alterações na estabilidade térmica dos polímeros na mistura e o difratograma confirmou a mudança na cristalinidade da membrana. Quando o sulfato de neomicina foi incorporado à blenda, tanto pelo método de eletrofiação como por deposição, houve novamente mudanças nas análises físico-química da blenda, indicando a presença do fármaco nas mesmas. A análise antibacteriana contra bactérias gram positivas e gram negativas indicaram que a quitosana apresenta atividade bacteriana, confirmando os dados encontrados na literatura. Do mesmo modo, a membrana carregada com sulfato de neomicina apresentou excelente ação contra as bactérias analisadas, confirmando mais uma vez a efetiva incorporação desse antibiótico na blenda. Por fim, o teste de liberação de fármaco indicou que o sulfato de neomicina é facilmente liberado no meio tamponado, levando um período de apenas 120 minutos para que

praticamente todo o conteúdo de fármaco depositado tenha se desprendido da membrana. Mediante ao que foi exposto, as membranas eletrofiadas contendo o polímero quitosana, assim como àquela com fármaco incorporado, mostraram ser biomateriais atraentes para pesquisas no tratamento de feridas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Cheng, F., Gao, J., Wang, L., Hu, X. Composite chitosan/poly(ethylene oxide) electrospun nanofibers mats as novel wound dressing matrixes for the controlled release of drugs. **Journal of Applied Polymer Science**. 2015. Doi: 10.1002/APP.42060

[2] Felgueiras, H. P., Amorin, A. P. Functionalization of electrospun polymeric wound dressing with antimicrobial peptides. **Colloids and surfaces**, 2017. Doi: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.colsurfb.2017.05.001>

[3] Majd, S.A., Khorasgani, M. R., Moshtaghian, S.J., Tabeli, A., Khezri, M. Application of chitosan/PVA nanofiber as a potencial wound dressing for streptozotoin-induced diabetic rats. **Biological Macromolecules**, 2016 Doi: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.06.035>

[4] Nune, S. K., Rama, K. S., Dirisala, V. D., Chavali, M. Y. Electrospinning of collagen nanofiber scaffolds for tissue reappear and regeneration. **Chapter 11: Nanostrutures for novel therapy**, p. 281-311, 2017

[5] Garcia-Orue, I, Gainza, G., Gutierrez, F. B., Arguirre, J. J., Evora, C., Pedraz, J. L., Hernandez, R. M., Deslgado, A., Igartua, M. Novel nanofibrous dressing containing rgEGF and aloe vera for wound healing application. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 523, p. 556-566, 2017 Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.11.006>

[6] Mendes, A.C., Gorzenlanny, C., Halter, N., Scheider, S.W>, Chronalis, J.S. Hybrid electrospun chitosana-phospholopids nanofibers for transdermal drug delivery. **Internacional Journal of Phamaceutics**, 2016 Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.06.016>

[7] Yuan, T.T., Jnekins, P. M., Foushe, A. M. D., Jockheck-Clark, A.R., Stahl, J., Electrospun Chitosan/Polyethylene oxide nanofibrous scaffolds with potential antibacterial wound dressing applications. **Journal of Nanomaterials**, 2016. Doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/6231040>

[8] Zhou, Y., Dong, Q., Yang, H., Liu, X., Yin, X., Tao, Y., Bai, Z., Xu, W., Photocrosslinked maleited chitosan/methacrylated poly (vinyl alcohol) bicomponent nanofibrous scaffolds for use a potencial wound dressings. **Carbohydrate Polymers**, v. 168, p. 220-226, 2017

[9] Lin, Hsin-Yi, Kuo, Yu-Jen, Chang, Shih-Hsin, Ni, Tsung-sheng. Characterization of electrospun nanofiber matrices made of collagen blends as potential skin substitutes. **Biomedical Materials**, v. 8, 2013.

Doi 10.1088/1748-6041/8/2/025009

[10] Pilehrood, M. K., Dilamian, M, Mirian, M., Sadeghi-Aliabadi, H., Maleknia, L., Nousiainem, P., Harlin, A. Nanofibrous Chitosan-Polyethylene Oxide Engineered Scaffolds: A comparative Study between simulated structural characteristics and cells viability. **BioMed Research International**. 2014

[11]Fazli, Y., Shariatina, Z. Controlled release of cefazolin sodium antibiotic drug from electrospun chitosan-polyethylene oxide nanofibrous mats. **Materials Science e engineering**, 2016. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.10.048>

[12] Dilamian, M., Montazer, M., Mamoumi, J. Antimicrobial electrospun membranes of chitosan/poly(ethylene oxide) incorporating poly(hexamethylene biguanide) hydrochloride. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, p. 364-371, 2013. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.059>

[13] Taepaibonn, 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. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, p. 387-397, 2007.

[14] Nitanan, T., Akkaramongkolporn, P, Rojanarta, T., Ngawhirunpat, T., Opanasopit, P. Neomycin-loaded poly(styrene sulfonic acid-co-maleic acid) (PSSA-MA)/polyvinyl alcohol (PVA) ion exchange nanofibers for wound dressing materials. **International journal of pharmaceutics**, v. 448, p. 71-78, 2013

[15] Gowda, A. D. V., Gowrav, M. P., Srivastava, A., Osmani, R. A. M. A study of chitosan nanofibers containing neomycin sulfate for wound healing activity. **Der Pharmacia Lettre**, v. 8, p. 128-139, 2016

[16] De-Vasconcelos, C. L., Bezerril, P. M., Dos-Santos, D. E. S., Dantas, T. N. C., Pereira, M. R., Fonseca, J. L. C., Effect of Molecular Weight and ionic strength on the formation of polyelectrolyte complexes based on poly(methacrylic acid) and chitosan. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 1245-1252, 2006

[17] Kuntzler, S.G., Costa, J., A., V., Greque-de-Morais, M. Development of electrospun nanofibers containing chitosan/PEO blend and phenolic compounds with antibacterial activity. **Biological Macromolecules**.2018

doi: :10.1016/j.ijbiomac.2018.05.224

- [18] Maurício-Sánchez, R. A., Salazar, J., Luna-Bárceñas, G., Mendoza-Gálván, A., FTIR spectroscopy studies on the spontaneous neutralization of chitosan acetate films by moisture conditioning. **Vibrational Spectroscopy**. DOI: 10.1016/j.vibspec.2017.10.005
- [19] Wan, Y., Wu, H., Yu, A., Wen, D., Biodegradable polylactide/chitosan blend membranes. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 1362-1372, 2006
- [20] Pakravan, M., Heuzey, M., Aiji, A. A fundamental study of chitosan/PEO eletrospinning. **Polymer**, v. 52, p. 4813-4824, 2011. DOI: 10.1016/j.polymer.2011.08.034
- [20] Lu, C. Chiang, S., W., Du, H., Li, J., Gan, L., Zhang, X., Chu, X., Yao, Y., Li, B., Kang, F. Thermal conductivity of electrospinning chain-aligned polyethylene oxide (PEO). **Polymer**. v. 115, p. 52-59, 2017.
- [21] Hashemnia, S., Mokhtari, Z., Tashkhourian, J., Moosavi-Movahedi, A.A. Effect of covalent attachment of neomycin on conformational and aggregation properties of catalase. **Indian J. Biochem. Biophys.**, v. 52, p. 189-195, 2015.
- [22] Grace, A., N., Pandian, K., Antibacterial efficacy of aminoglycosidic antibiotics protected gold nanoparticles – A brief study. **Colloids And Surfaces A**, v. 297, p. 63-70, 2007. doi:10.1016/j.colsurfa.2006.10.024
- [23] Merlusca, I. P., Maitut, D. S., Lisa, G., Sillion, M., Gradinaru, L., Oprea, S., Popa, I.M., Preparation and characterization of chitosan-poly(vinyl alcohol)-neomycin sulfate films. **Polym. Bull.** 2017
- [24] Bonardd, Sebasti´an., Schmidt, Mathias., Saavedra- Torres, Mario., Leiva, Angel., Radic, Deodato., & Sald´ias, C´esar., Thermal and morphological behavior of chitosan/PEO blends containing gold nanoparticles.Experimental and theoretical studies.**Carbohydrate Polymers** <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.02.071>
- [25] DUAN, Bin, DONG, Cunhai, YUAN, Xiaoyan, YAO, Kangde. Electrospinning of chitosan solutions in acetic acid with poly(ethylene oxide). **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edtion**, v. 15(6). P. 797-811, 2004.
- [26] NETO, C. G. T., DANTAS, T. N. C., FONSECA, J. L. C., PEREIRA, M. R. Permeability studies in chitosan membranes. Effects of crosslinking and poly(ethylene oxide) addition. **Carbohydrate Research**. V. 340, p. 2630-2636, 2005

[27] NISTA, Sílvia Vaz Guerreira. Membranas de nanofibras com alta adesão para liberação bucal de fármacos [tese]. Campinas – Universidade Estadual de Campinas, curso de engenharia Química, 2016.

[28] Bostan, M. S., Mutlu, E. C., Kazak, H., Keskin, S. S., Oner, E. T., Eroglu, M. S. Comprehensive characterization of chitosan/PEO/levan ternary blend films. **Carbohydrate Polymers**. 2013. DOI: dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.096

[29] Zhang, Y., Xue, C., Xue, Y., Gao, R., Zhang, X. Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 1914-1917, 2005. DOI: 10.1016/j.carres.2005.05.005

[30] Huang, L., Taylor, H., Gerber, M., Orndorff, P.E., Horton, J.R., Tonelli, A., Formation of antibiotic, aiodegradable/bioabsorbable polymers by processing with neomycin sulfate and its inclusion compound with β -cyclodextrin. **Formation of antibiotic polymers**. 1999

[31] Paul, W., Sharma, C. Chitosana and Alginate wound dressings: A short review. **Trends in Biomaterials and Artificial Organs**, v. 18, p. 18-23, 2004

[32] Mi, F., Shyu, S., Wu, Y., Lee, S., Shyong, J., Huang, R. N. Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing. **Biomaterials**, v., 22, p. 165-173, 2001.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, buscou-se em um primeiro momento a obtenção de fibras eletrofiadas utilizando-se apenas a quitosana. No entanto, devido à dificuldade de processamento desse material puro durante a eletrofição, procurou-se uma nova metodologia que facilitasse a formação de fibras desse polímero. Visto isso, aplicou-se o poli (óxido de etileno) como segunda fase polimérica e a mistura desses dois polímeros se mostrou excelente na formação de nanofibras, com diâmetros médios entre 299nm a 320nm. As membranas puderem ser fabricadas com uma proporção muito pequena de PEO na blenda, apenas 10%, e os parâmetros de processo foram ajustados. Subsequentemente, estudou-se a utilização dessas membranas como suporte para a incorporação do sulfato de neomicina. Quando uma solução desse fármaco foi incorporada à blenda polimérica contendo 90% de quitosana e 10% de PEO, não se obteve sucesso na produção de membranas, visto que a adição do fármaco alterou de forma significativa a viscosidade da mistura. Dessa forma, buscou-se melhorar a viscosidade da blenda aumentando a quantidade de PEO. Quando as quantidades de polímero foram alteradas para 80% de quitosana e 20% de PEO, obteve-se sucesso na eletrofição dessa membrana juntamente como sulfato de neomicina. Além da incorporação do fármaco por eletrofição, estudou-se a deposição de soluções de sulfato de neomicina nas membranas, tanto nas blendas contendo 90% de quitosana, como para a que foi preparada com 80% desse polímero. As análises físico-químicas comprovaram a miscibilidade dos polímeros, assim como a eficiente incorporação do fármaco à membrana. As análises antimicrobianas mostraram que ambas membranas possuem ação bacterianas contra bactérias gram positivas e gram negativas e o teste liberação indicou que o sulfato de neomicina possui um perfil de liberação rápida. De modo geral, pode-se concluir que os resultados obtidos foram muito satisfatórios e sugerem que as nanofibras de quitosana e PEO contendo sulfato de neomicina são excelentes candidatas para a aplicação como biomaterial.

Uma das características dos polímeros naturais durante o processo de eletrofição é a dificuldade que a solução desse polímero tem de se espalhar na placa coletora. Sugere-se, então, que em trabalhos futuros sejam utilizados coletores rotativos, os quais facilitariam a produção de membranas maiores e mais uniformes.