



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

**PRODUÇÃO DE FILMES DE PBAT/PLA POR**  
**ELETROFIAÇÃO PARA LIBERAÇÃO DE NITROFURAZONA**

**Leonardo de Souza Megliorini**

**Toledo – PR**  
**2018**



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

**PRODUÇÃO DE FILMES DE PBAT/PLA POR  
ELETROFIAÇÃO PARA LIBERAÇÃO DE NITROFUZZAZONA**

**Leonardo de Souza Megliorini**

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.

**Orientadora: Josiane Caetano Dragunski**

**Coorientador: Douglas Cardoso Dragunski**

**Toledo – PR  
2018**

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

Megliorini, Leonardo de Souza

Produção de filmes de PBAT/PLA por eletrofiação para liberação de nitrofurazona / Leonardo de Souza Megliorini; orientador(a), Josiane Caetano Dragunski; coorientador(a), Douglas Cardoso Dragunski, 2018.

73 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.

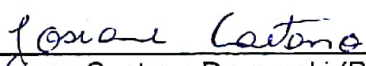
1. Nitrofural. 2. Nanofibras. 3. Perfil de dissolução. I. Dragunski, Josiane Caetano. II. Dragunski, Douglas Cardoso. III. Título.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Leonardo de Souza Megliorini**

**“Produção de filmes de PBAT/PLA por eletrofiação para liberação de nitrofurazona”.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química – Mestrado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química, pela Comissão Examinadora composta pelos membros:

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Josiane Caetano Dragunski (Presidente-Orientadora)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Maurício Ferreira da Rosa (Unioeste)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley (UEL)

Aprovada em: 27 de julho de 2018.

Local de defesa: Miniauditório do Gerpel – Unioeste/Campus de Toledo.

## SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	4
LISTA DE FIGURAS.....	6
LISTA DE TABELAS.....	8
CAPÍTULO 1.....	11
INTRODUÇÃO.....	11
1.1 – INTRODUÇÃO GERAL .....	11
1.2 – JUSTIFICATIVA .....	12
1.3 – OBJETIVOS .....	13
CAPÍTULO 2.....	14
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	14
2.1 – NITROFURAZONA.....	14
2.2 – POLÍMEROS, COPOLÍMEROS E FIBRAS POLIMÉRICAS.....	15
2.3 – ELETROFIAÇÃO .....	17
2.4 – PARÂMETROS IMPORTANTES NA ELETROFIAÇÃO .....	18
2.4.1 – Tensão aplicada.....	19
2.4.2 – Solvente e solução polimérica.....	19
2.4.3 – Fluxo aplicado .....	19
2.4.4 – Distância do coletor.....	20
2.5 – FIBRAS MONOLÍTICAS E CORE-SHELL .....	20
2.6 – LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS.....	21
CAPÍTULO 3.....	24
MATERIAL E MÉTODOS .....	24
3.1 – PRODUÇÃO DO FILME .....	24
3.2 – ESCOLHA DOS SOLVENTES .....	27
3.3 – PERFIL DE DISSOLUÇÃO.....	27
3.4 – VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	28
3.4.1 – Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação .....	28
3.4.2 – Precisão e exatidão.....	30
3.4.3 – Seletividade.....	31
3.4.4 – Intervalo de trabalho.....	32
3.5 – FILMES COMPARATIVOS.....	32
CAPÍTULO 4.....	33
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	33

4.1 – EXPERIMENTOS PRELIMINARES .....	33
4.2 – EXPERIMENTOS DE FORMAÇÃO DAS FIBRAS .....	34
4.2.1 – ALTERAÇÕES DO SOLVENTE E QUANTIDADE DE FÁRMACO .....	36
4.2.2 – AUMENTO DO FLUXO E DA CONCENTRAÇÃO DE NITROFUZAZONA / VARIÇÃO NO SOLVENTE .....	38
4.3 – CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES .....	39
4.3.1 – Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	39
4.3.2 – Análises termogravimétricas (TGA) .....	42
4.3.4 – Análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC) .....	44
4.4 – VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	46
4.4.1 – Linearidade .....	46
4.4.2 – Limites de detecção e de quantificação (LoD e LoQ) .....	54
4.4.3 – Precisão e exatidão.....	55
4.4.4 – Seletividade.....	59
4.4.5 – Faixa de trabalho.....	60
4.5 – PERFIL DE LIBERAÇÃO DO FÁRMACO .....	60
CAPÍTULO 6.....	63
CONCLUSÕES.....	63
REFERÊNCIAS .....	64

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Configurações de componentes da eletrofição [40]. (A) Eletrofição horizontalmente com bomba de infusão. (B) Eletrofição verticalmente com bomba de infusão. (C) Eletrofição verticalmente com a força da gravidade sem bomba de infusão. 18
- Figura 2 – Eletrofição coaxial [40]. A) formação do jato contendo uma solução interna e uma solução externa. B) formação das fibras coaxiais com uma substância interna (laranja) e uma externa (azul)..... 21
- Figura 3 – Técnicas de modificação de nanofibras eletrofiadas. (A) Tratamento com plasma e pelo método químico úmido. (B) Polimerização de enxerto de superfície. (C) Coeletrofição. [52]..... 22
- Figura 4 - Imagem da eletrofição para produção das fibras. 1) seringa de vidro; 2) agulha acoplada ao polo positivo da fonte; 3) bomba de serigas; 4) anteparo com polo negativo coberto por papel vegetal. .... 25
- Figura 5 - Aparato 5 - pá sobre disco. [62] ..... 28
- Figura 6 – Espectro de absorção da nitrofurazona na região do UV-Vis. .... 33
- Figura 7 - Resultados das fibras obtidas nos experimentos 1 a 15 variando (tensão, distância do coletor e fluxo) com ampliação de 100 vezes. 1 - (0,50 mL h<sup>-1</sup>; 18kV; 12cm). 2 - (0,50 mL h<sup>-1</sup>; 20 kV; 12cm). 3 - (0,50 mL h<sup>-1</sup>;10 kV;12cm). 4 - (0,50 mL h<sup>-1</sup>;15 kV;15cm). 5 - (0,50 mL h<sup>-1</sup>;12 kV;15cm). 6 - (0,50 mL h<sup>-1</sup>;20 kV;15cm). 7 - (0,50 mL h<sup>-1</sup>;15 kV;12cm). 8 - (0,50 mL h<sup>-1</sup>; 12 kV;12cm). 9 - (0,50 mL h<sup>-1</sup>;15 kV;18cm). 10 - (0,50 mL h<sup>-1</sup>;18 kV;21cm). 11 - (0,50 mL h<sup>-1</sup>;20 kV;21cm). 12 - (0,50 mL h<sup>-1</sup>;18 kV;9cm). 13 - (1,00 mL h<sup>-1</sup>;22 kV;18cm). 14 - (0,50 mL h<sup>-1</sup>;22 kV;18cm). 15 - (0,50 mL h<sup>-1</sup>;22 kV;21cm). .... 34
- Figura 8 - Imagem das fibras produzidas no experimento 17 com fluxo de 0,5 mL.h<sup>-1</sup>, 15 kV, 12 cm, dimetilformamida/clorofórmio (15:85), 15% ecovio®, 0,5% (m/m) nitrofurazona em relação ao ecovio®. .... 36
- Figura 9 - Imagem das fibras produzidas no teste 18 com fluxo de 0,5 mL.h<sup>-1</sup>, 15 kV, 12 cm, dimetilformamida/tetraidrofurano (15:85), 15% ecovio®, 0,3% (m/m) nitrofurazona em relação ao ecovio®. .... 37
- Figura 10 – Imagem do filme por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para os filmes obtidos com THF/DMF (A) e clorofórmio/DMF (B). Ambas com ampliação de 3000 vezes, sob alto vácuo, 15KV..... 38
- Figura 11 – Espectros vibracionais de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR-ATR) da nitrofurazona, do polímero e dos filmes formados. A, B e C mostram bandas que deixam de existir após a produção dos filmes. Aquisição por 15 varreduras de 4000 a 650 cm<sup>-1</sup>..... 40
- Figura 12 – Estrutura das moléculas de PBAT (A), sendo e de PLA (B). .... 41
- Figura 14 – Termogramas de análises termogravimétricas com temperatura de 30 a 750 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C.min<sup>-1</sup> e atmosfera de nitrogênio a 50 mL.min<sup>-1</sup>. (A) filme sem nitrofurazona. (B) Filme com nitrofurazona produzido com THF/DMF. (C) Filme com nitrofurazona produzido com clorofórmio/DMF. .... 43
- Figura 15 – Sobreposição de termogramas de calorimetria exploratória diferencial dos diferentes filmes. Faixa de 30 a 200 °C com taxa de aquecimento de 10 °C.min<sup>-1</sup> e de resfriamento de -10 °C.min<sup>-1</sup>. Atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL.min<sup>-1</sup>. Azul: Ecovio® puro. Preto: Ecovio® + nitrofurazona (THF/DMF). Vermelho: Ecovio® + nitrofurazona (clorofórmio/DMF). .... 45

Figura 16 – Gráfico de correlação entre concentração e absorvância.....	47
Figura 16 – Representação gráfica da distribuição de resíduos padronizados.....	53
Figura 17 – Distribuição de resíduos na ordem de coleta das soluções analisadas. ....	54
Figura 18 – Representação do teor de nitrofurazona liberado em função do tempo. ....	60



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Informações gerais referentes à substância nitrofurazona.	14
Tabela 2 - Representação dos parâmetros iniciais testados na eletrofiação, utilizando como solvente uma mistura THF/DMF (85:5) v/v em soluções a concentração de polímero na solução foi de 15% m/v	26
Tabela 3 – Proporções utilizadas na proporção de filmes para avaliação exatidão e precisão.	31
Tabela 4 – Resultados de diâmetro médio das fibras e a variabilidade da fibra apresentada como desvio padrão.	35
Tabela 5 – Resultados de diâmetro das fibras e teste de normalidade Shapiro-Wilk para os dois filmes produzidos.	39
Tabela 6 – Resultado da ANOVA para avaliação da significância do coeficiente angular da curva de absorvância em função da concentração.	48
Tabela 7 – Avaliação do impacto do coeficiente linear sobre a quantificação de nitrofurazona ao longo do intervalo do método.	49
Tabela 8 – Avaliação da qualidade do ajuste.	50
Tabela 9 – Resultados do teste de normalidade de resíduos de Anderson Darling.	50
Tabela 10 – Resultados do teste de homocedasticidade de Breusch Pagan.	51
Tabela 11 – Resumo dos resultados da análise de pontos extremos.	52
Tabela 12 – Resultados do teste de independência de Durbin-Watson.	53
Tabela 13 – Estimação do limite de detecção e de quantificação baseados no coeficiente angular e no desvio padrão dos resíduos.	55
Tabela 14 – Resultados da Precisão Primeiro dia e da exatidão.	56
Tabela 15 – Resultados da Precisão Segundo dia e da exatidão.	57
Tabela 16 – Resultado do teste F de comparação entre as variâncias para os diferentes dias e níveis de concentração.	58
Tabela 17 – Resultado do teste T de comparação entre as médias dos diferentes dias e níveis de concentração.	58
Tabela 18 – Resultado das leituras de verificação de impacto do polímero sobre a quantificação.	59

# PRODUÇÃO DE FILMES DE PBAT/PLA POR ELETROFIAÇÃO PARA LIBERAÇÃO DE NITROFUZONA

Leonardo de Souza Megliorini

## Resumo

A nitrofurazona é um fármaco utilizado no tratamento de queimaduras e em transplantes de pele. O medicamento é comercializado na forma de pomada e solução. O polímero ecovio® é composto de poli(ácido láctico)/poli(butileno adipato co-tereftalato) e é biocompatível. Neste trabalho foi produzido um filme com a combinação de ecovio® e nitrofurazona pela técnica de eletrofiação formando nanofibras. Dois filmes foram produzidos. O primeiro foi produzido com dimetilformamida/tetrahidrofurano (15:85 v/v) e foi capaz de liberar 100% da nitrofurazona de forma reprodutível no teste de perfil de dissolução avaliado por 300 minutos. O segundo filme foi produzido com dimetilformamida/clorofórmio (15:85 v/v) e liberou cerca de 90% da nitrofurazona, mas não apresentou resultados reprodutíveis no mesmo intervalo. Análises físico-químicas levam à conclusão de que a interação da nitrofurazona com o polímero ocorre principalmente entre os grupamentos mais polares. O teste de dissolução foi realizado seguindo parâmetros farmacopeicos. A quantificação da nitrofurazona liberada foi realizada por espectrofotometria na região do UV-Vis em 375 nm. O método utilizado foi validado e comprovou-se estatisticamente que é adequado, apresentando linearidade no intervalo de 0,25 a 12,50 mg.L<sup>-1</sup> com coeficiente de correlação de 0,9999, precisão elevada com desvio padrão relativo ≤ 1,6%, exatidão de 98,9 a 100,4%, seletividade e limite de quantificação de 0,4 mg.L<sup>-1</sup>.

**Palavra-chave:** nitrofural, nanofibras, perfil de dissolução.

# PRODUÇÃO DE FILMES DE PBAT/PLA POR ELETROFIAÇÃO PARA LIBERAÇÃO DE NITROFUZAZONA

Leonardo de Souza Megliorini

## Abstract

Nitrofurazone is a drug used to treat burns and skin transplants. The drug product is salled in cream and solution form. The ecovio® polymer is composed of poly(lactic acid) / poly(butylene adipate co-teraphtalate) and is biocompatible. In this work a film with the combination of ecovio® and nitrofurazone was produced by the electrospinning technique forming nanofibers. Two films were produced. The first was produced with dimethylformamide / tetrahydrofuran (15:85 v / v) and was capable of releasing 100% of the nitrofurazone reproducibly in the dissolution profile test evaluated for 300 minutes. The second film was produced with dimethylformamide/chloroform (15:85 v/v) and released about 90% of the nitrofurazone. But did not show reproducible results in the same range. Physical-chemical analyzes lead to the conclusion that the interaction of nitrofurazone with the polymer occurs mainly among the more polar groups. The dissolution test was performed following pharmacopoeial parameters. The quantitation of the released nitrofurazone was performed by UV-Vis spectrophotometry at 375 nm. The method used was validated and proved to be adequate, showing linearity in range 0.25 - 12.50 mg.L<sup>-1</sup> with correlation coefficient 0.9999, high precision with relative standard deviation ≤ 1.6%, accuracy 98.9 - 100.4%, selectivity and limit of quantification 0.4 mg.L<sup>-1</sup>.

**Keywords:** nitrofurazone, nanofibers, dissolution profile.

## **1.1 – INTRODUÇÃO GERAL**

Lesões por queimaduras sempre foram motivação para pesquisas em diversos ramos da ciência e da saúde. Devido à difícil cicatrização, diversos tratamentos são propostos e muitos fármacos utilizados nos mesmos. Segundos após a lesão, o organismo libera células e proteínas defensivas, principalmente para remoção de células necrosadas e combater as bactérias. Em função disso, os tratamentos de queimaduras, usualmente utilizam-se bactericidas, auxiliando o sistema imunológico. Segundo Moncrief *et al* (1966), um tratamento ideal é aquele capaz de inibir o crescimento bacteriano, remover células desativadas e estimular o crescimento do novo tecido.[1]

Um dos vários tratamentos é o uso de curativos úmidos. Em que gazes umedecidas com solução fisiológica são trocadas várias vezes ao dia. Em alguns casos a cada duas horas. Quando há contaminação na lesão antibióticos são utilizados na solução. Pelos mesmos princípios uma membrana polimérica pode ser utilizada em substituição às gazes. Em função disso vários estudos são direcionados para a produção e utilização de membranas poliméricas contendo antibiótico. [2]

Membranas poliméricas podem ser produzidas com alta resistência e alta porosidade; permitindo trocas gasosas, protegendo a lesão e mantendo a umidade na região lesionada. Uma das técnicas mais utilizadas para produção de membranas poliméricas é a eletrofiação, onde um ou mais polímeros geram fibras que formam filmes (membranas).

Em 1920 foi publicada a primeira teoria envolvendo o que depois seriam tratados como polímeros, quando Hermann Staudinger propôs que alguns tipos de materiais possuem, na verdade, moléculas de grande peso molecular iguais unidas por ligações covalentes. A teoria foi comprovada através de reações de polimerização. Desde então polímeros têm sido utilizados para produção de fibras por eletrofiação, aplicados a diversos segmentos da saúde, como a regeneração e cicatrização de feridas. [3]

Uma boa cicatrização depende muito da utilização de um tratamento adequado, com curativos, procedimentos e medicamentos adequados à lesão. O curativo ideal para feridas deve obter cicatrização rápida com hemostasia, atividade

antimicrobiana e manutenção de um revestimento úmido para a ferida. O filme polimérico atende aos requisitos descritos para a cicatrização de feridas, por meio de estruturas microfibrosas que proporcionam um ambiente adequado para cicatrização de feridas. Neste estudo busca-se a produção de fibras de poli(ácido láctico) e poli(butileno adipato co-tereftalato) (PLA/PBAT) contendo nitrofurazona. Curativos realizados com um filme composto destas fibras têm atividade antibacteriana satisfatória contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Assim como o creme dermatológico de nitrofurazona é considerado não tóxico, as fibras com nitrofurazona também devem ser consideradas, uma vez que a blenda PLA/PBAT (polímero suporte) não é tóxica e é biocompatível. O filme proposto pode fornecer um candidato promissor para acelerar a cicatrização de feridas e queimaduras, visto que atualmente a nitrofurazona já é utilizada no tratamento de lesões graves por queimaduras juntamente com gazes. [4, 5, 10, 84]

O material produzido pode melhorar um tratamento substituindo gazes umedecidas com soluções ou pomadas que precisam ser substituídas diversas vezes, causando desconforto, dor e possíveis lesões durante as trocas. Este material constitui um filme bioativo e biocompatível.

## **1.2 – JUSTIFICATIVA**

Atualmente a nitrofurazona é comercializada na forma de creme ou solução contendo 0,2% de princípio ativo e excipientes constituídos por macrogol (polietilenoglicol). Em casos de utilização diária do fármaco em grandes feridas ou queimaduras, ocorre absorção excessiva de macrogol, causando insuficiência renal progressiva. A substituição dos excipientes macrogol pelo copolímero PLA/PBAT elimina os problemas renais causados por absorção de macrogol. [6-7]

Nos tratamentos são utilizadas gazes para proteção da região afetada que posteriormente devem ser removidas, muitas vezes de forma dolorosa. O material proposto é constituído de nitrofurazona e PLA/PBAT. O fármaco tem função antimicrobiana e a blenda polimérica possui a capacidade de proteger a região de interesse permitindo trocas gasosas devido à alta porosidade intrínseca das fibras. O PLA/PBAT (composto majoritário) é biocompatível. Desta forma não se faz necessária a remoção do filme.

Há trabalhos envolvendo a nitrofurazona associada a diversos polímeros gerando géis ou filmes. Porém, não foram encontrados trabalhos abordando materiais com nitrofurazona produzidos por eletrofiliação. [8-9]

A grande vantagem na produção da fibra é que a mesma pode ser produzida com pequena quantidade de fármaco, visto que a atividade da nitrofurazona é tão intensa que a concentração do medicamento comercializado é de 0,2%. Além disso, a nitrofurazona é ativa para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas por inibição enzimática, levando à versatilidade do fármaco, que é indicado para queimaduras de 2° e 3° graus, para casos de resistência a outros antibióticos e em transplantes de pele. Outro fator importante é que a absorção de nitrofurazona pela pele é praticamente escassa, mas em contato com os microrganismos presentes na pele lesionada ou em feridas expostas a atividade é conhecida e comprovada. [10 11 12 13]

### **1.3 – OBJETIVOS**

Produzir filmes de nitrofurazona incorporada ao copolímero de poli(ácido láctico) (PLA) e poli(butileno adipato co-tereftalato) (PBAT).

Realizar o estudo de liberação do fármaco em função do tempo *in vitro* pelo teste de dissolução, realizando a quantificação de nitrofurazona por espectrofotometria.

Validar o método analítico utilizado para a quantificação de nitrofurazona liberada.

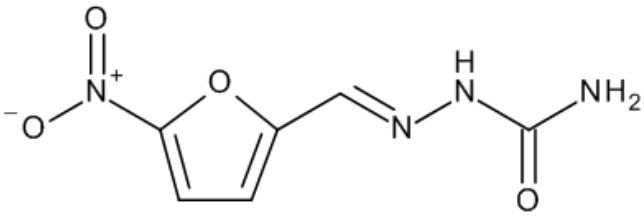
Determinar o perfil de liberação de nitrofurazona pelo filme produzido e comparar com o filme produzido por simples evaporação do solvente.

## CAPÍTULO 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 – NITROFUZZAZONA

Na tabela 1 encontram-se algumas informações acerca da nitrofurazona. [14 - 21]

Tabela 1 - Informações gerais referentes à substância nitrofurazona.

Fórmula estrutural	
Fórmula molecular	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>
Massa molar	198,136 g.mol <sup>-1</sup>
Nome químico	5-nitro-2-furfural semicarbazona
Registro de Denominação Comum Brasileira (DCB)	06437
Registro no Chemical Abstract Service (CAS)	59-87-0
Fórmula física	Cristal branco a amarelo claro
Propriedades físico-químicas	Em solução aquosa saturada apresenta pH entre 6,0 e 6,5. Em solução alcalina torna-se laranja escura. Ponto de fusão entre 242 e 244 °C. 1 g de material é solúvel em 4200 mL de água, 590 mL de álcool, 350 mL de propilenoglicol e praticamente insolúvel em clorofórmio. Estável quando protegido da luz. Termosensível.
Sinônimo	Nitrofural

A nitrofurazona, ou nitrofural, é um antimicrobiano conhecido também pelo nome *Furacin*®. No mercado, o produto é comercializado na forma de pomada e de solução para uso dermatológico em uma concentração de 0,2% e em uma formulação a base de macrogol (polietilenoglicol). A substância é um derivado de nitrofuranos com atividade contra a maioria dos agentes infecciosos; dentre eles o *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus ssp.*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Aerobacter aerogenes* e *Proteus ssp.* [6 - 7]

Estudos realizados por Webber *et al*, no tratamento ambulatorial de 84 pacientes em emergência por sofrerem queimaduras de segundo grau, compararam

a eficácia da nitrofurazona, sulfadiazina de prata e iodo-povidona. Após análise estatística, a conclusão foi que os pacientes tratados com nitrofurazona tiveram resultados superiores à sulfadiazina de prata em termos de tempo de granulação do tecido, secagem das feridas e quantidade de cicatrização em duas semanas. Excluindo os casos mais complexos, os resultados com iodo-povidona foram equivalentes aos resultados com nitrofurazona. Dentre os pacientes, aqueles tratados com nitrofurazona tiveram menos dor que os tratados com sulfadiazina de prata e os pacientes tratados com iodo-povidona não tiveram diferença significativa na dor em relação aos tratados com nitrofurazona ou sulfadiazina de prata. [10]

Apesar da comprovada eficácia da nitrofurazona quando comparada a outros fármacos, estudos recentes de Özkaya e Kiliç revelam que uma parcela significativa da população apresenta sensibilidade ao polietilenoglicol (PEG), constituinte majoritário na formulação dos medicamentos comercializados. O estudo foi realizado com 836 pacientes na Turquia entre 1996 e 2015 e, dentre eles, 35 (4,2%) apresentaram reação ao PEG. Dentre eles, 10% apresentaram reação alérgica ao contato de vários medicamentos/formulações contendo polietilenoglicol e/ou propilenoglicol. [22]

## **2.2 – POLÍMEROS, COPOLÍMEROS E FIBRAS POLIMÉRICAS**

As substâncias poliméricas são caracterizadas por longas cadeias compostas por pequenas moléculas repetidamente através de ligações covalentes. Polímeros podem ser naturais ou sintéticos. Os mais conhecidos são formados por compostos orgânicos, existindo também polímeros inorgânicos. Quando mais de um polímero está associado o material é chamado de copolímero [23].

Polímeros biodegradáveis atraíram a atenção de diversos ramos da indústria, pesquisa e, principalmente, áreas relacionadas à medicina, farmácia e engenharia de tecidos devido às inúmeras possibilidades de aplicações multidimensionais [24].

Os polímeros e copolímeros produzidos por materiais oriundos de fontes renováveis, como vegetais e animais, são considerados biopolímeros. Estes materiais são muito atrativos do ponto de vista ambiental. [25]

Quando comparados, os polímeros biodegradáveis, como o PBAT e o PLA apresentam cinéticas e mecanismos de degradação diferentes. Além disso, blendas de PBAT/PLA apresentam degradabilidade ainda diferente dos dois polímeros separados. Contudo, apesar dos diferentes níveis de degradação quando



comparados, ambos são facilmente degradados. Essa facilidade em serem degradados, juntamente com a biocompatibilidade de alguns polímeros trouxe a possibilidade de serem utilizados como veículo de medicamentos em diversos estudos, com diversos resultados de grande relevância positiva, sendo o PLA o pioneiro e mais promissor no mercado de bioplásticos com custo baixo, alta disponibilidade oriunda de fontes renováveis, biocompatível e pelas propriedades biológicas. As propriedades de um polímero podem ser exploradas para que um fármaco seja liberado onde não chegaria sozinho. Fármacos hidrofóbicos, por exemplo, dispersos em fibras hidrofílicas podem ser levados à regiões hidrofílicas do organismo com facilidade e liberando de forma controlada o princípio ativo de forma praticamente linear com o tempo para terapias tumorais. [26 - 28]

Na maioria das aplicações é importante que as fibras apresentem boa resistência para que não sejam facilmente destruídas. Em estudos mecânicos variando a composição de blendas de PLA e PBAT foram obtidos resultados de maximização de resistência em blendas de PLA contendo 25% de PBAT associados como copolímero. [29]

Outro fator importantíssimo é que a técnica de eletrospinning pode ser considerada de baixo custo, eficiente, simples e capaz de gerar fibras de alta pureza e uniformidade [30]. Além disso, as nanofibras possuem uma enorme variedade de aplicações e têm sido largamente utilizadas, em especial, em sensores, catalisadores, farmácia e medicina. Pelo processo de eletrospinning as nanofibras podem ser produzidas com eficiência, possuindo diâmetros de menos de 10 nanômetros à vários micrometros por polimerização *in situ*. As nanofibras geradas possuem extrema flexibilidade e resistência axial. Além disso, elas podem ser funcionalizadas simplesmente pela composição dos polímeros da fibra ou por incorporação de nanopartículas ou moléculas com propriedades específicas. [31]

Essas fibras vêm sendo largamente estudadas. Aruan *et al* (2017), por exemplo, produziram fibras por eletrospinning compostas de PVA com adição de 8 a 14%(m/m) de SLE<sup>1</sup> na solução utilizando uma diferença de potencial de aproximadamente 8 kV, fluxo de 0,2 mL.h<sup>-1</sup> e coletor a 12 cm do injetor de *spray*

---

<sup>1</sup> SLE: *soursop leaves extract*, do inglês "extrato de folhas de graviola".

produziu fibras de aproximadamente 125nm de diâmetro médio contendo alcaloides e flavonoides; resultando em atividade antibacteriana para *Staphylococcus aureus*. [32]

Outros fármacos, como a vancomicina,  $\beta$ -caroteno, progesterona e a aspirina, foram produzidos associados a polímeros ou nanofibras poliméricas gerando diversas vantagens no encapsulamento, nos mecanismos de liberação, na funcionalidade e atividade e compatibilidade com células. Além dos fármacos imobilizados em polímeros, há também estudos de utilização de polímeros contendo veículos de fármacos. Em alguns casos, somente a combinação do fármaco e o polímero não gera os resultados esperados. Nesses casos é necessária também a presença de um veículo, como as ciclodextrinas, que podem ser associadas ao polímero e ao fármaco de interesse. Estas ciclodextrinas possuem estruturas cíclicas de unidades de glicoses, formando uma espécie de ciclos poliméricos de glicose. [33 – 36]

Uma técnica que vem surgindo para auxiliar na liberação controlada de fármaco é a eletrofiação.

### **2.3 – ELETROFIAÇÃO**

Na técnica de eletrofiação uma diferença de potencial é aplicada entre uma agulha metálica e uma fonte de potencial. Esta agulha é situada na saída de uma seringa na qual a solução polimérica se encontra. A solução polimérica é composta de um solvente volátil e o material que irá compor as fibras produzidas. Durante o processo a solução é dispensada da seringa, impulsionada por uma bomba e passando pela agulha em um fluxo constante. Quando as gotas de solução polimérica chegam à ponta da agulha, as cargas elétricas da solução se orientam no sentido do campo elétrico que existe devido à ddp e a solução passa a ser carregada com o fluxo de elétrons entre a agulha e a fonte. Com isso, a solução perde a estabilidade da tensão superficial da gota, causando uma deformação na mesma e gerando o chamado cone de Taylor. Com isso, a gota forma um estiramento devido ao fato das cargas elétricas da solução estarem direcionadas pelo campo elétrico e, conseqüentemente, um jato carregado é formado com dimensões reduzidas. Este jato direcionado, que compõe a solução polimérica a ser eletrofiada, ainda sofre um espalhamento antes de chegar à placa coletora. Dependendo das dimensões podem ser formadas nanofibras por eletrofiação, que são direcionadas até a placa coletora, localizadas a uma distância da agulha, que é escolhida para cada eletrofiação. [37 – 39]

A figura 2 ilustra a o funcionamento simples do processo de eletrofiação, que pode ter variações, como as apresentadas a seguir:

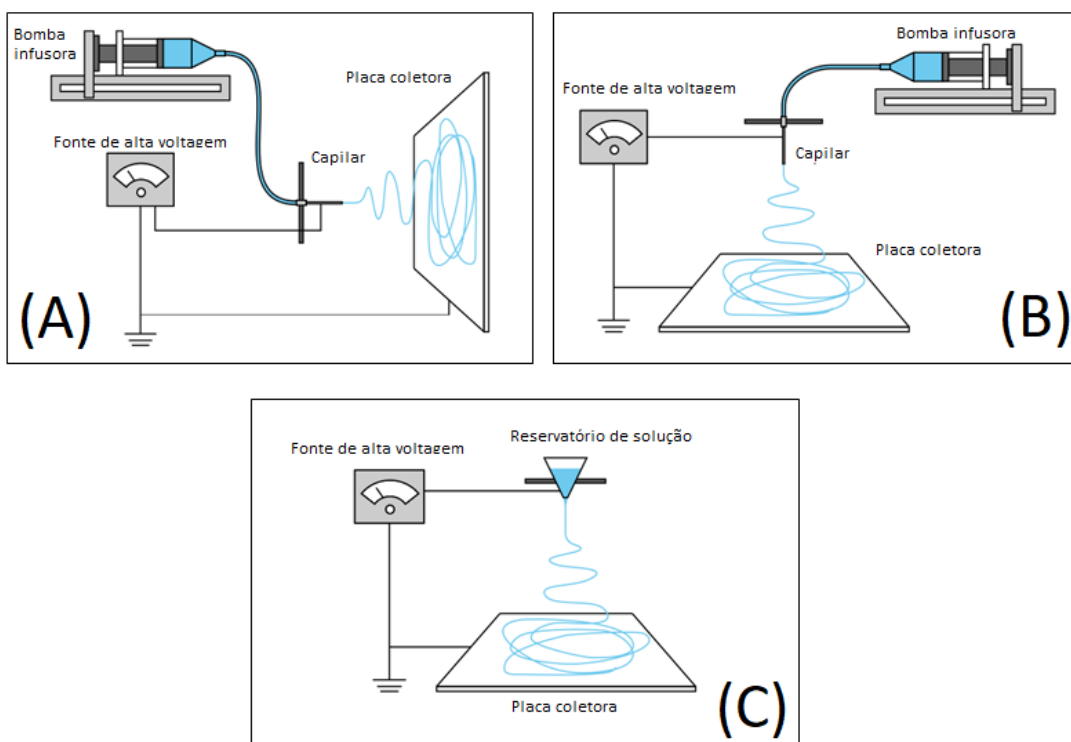


Figura 1 – Configurações de componentes da eletrofiação [40]. (A) Eletrofiação horizontalmente com bomba de infusão. (B) Eletrofiação verticalmente com bomba de infusão. (C) Eletrofiação verticalmente com a força da gravidade sem bomba de infusão.

Fármacos, como o cloridrato de tetraciclina, foram coeletrofiados com PEVA, formando filmes extremamente maleáveis e resistentes com atividade antimicrobiana. [41]

## 2.4 – PARÂMETROS IMPORTANTES NA ELETROFIAÇÃO

Vários parâmetros devem ser ajustados para que a eletrofiação seja eficiente. Dentre eles estão a diferença de potencial utilizada, o solvente utilizado, o diâmetro de saída da agulha, a distância entre a agulha e o coletor, A condutividade do polímero, a umidade do ambiente, o fluxo aplicado; a viscosidade e a concentração da solução polimérica. Não há condições absolutas e ótimas para serem aplicadas em qualquer processo de eletrofiação. Os fatores com maiores possibilidades e facilidade de variação são mais explicados a seguir.

### **2.4.1 – Tensão aplicada**

Este é um dos parâmetros mais estudados, em parte por ser fácil variar a voltagem e em parte porque os efeitos são muito impactantes sobre as fibras produzidas. A tensão aplicada deve ser suficiente para superar a tensão superficial da solução polimérica. Com o aumento da tensão aplicada à agulha metálica, a solução presente na gota (contendo cargas) começa a se afinar devido à repulsão existente na solução, que deforma a gota em um cone denominado *cone de Taylor*, culminando em um jato de polimérico extremamente fino. Fibras mais finas são formadas quando potenciais maiores são aplicados. Porém, existe uma tensão crítica e tensões superiores a esse valor resultam em grânulos na fibra, conhecidos também como *beads*. Esse efeito pode ser explicado pelo fato de que em potenciais maiores o jato ganha energia cinética e se move aleatoriamente para as bordas da agulha. Este efeito acarreta pequenas concentrações de material, formando grânulos. [42 – 45]

### **2.4.2 – Solvente e solução polimérica**

A escolha de um solvente inapropriado pode produzir fibras de péssima qualidade. Um solvente para eletrofição deve ser capaz de solubilizar bem o polímero e formar a solução polimérica. A polaridade e a condutividade também são importantes. Quanto maiores elas forem, mais fácil será a polarização da solução na ponta da agulha, facilitando a formação do jato. Além disso, o solvente ideal é volátil ao ponto de evaporar enquanto as fibras estão flutuando em direção ao coletor, mas não tão volátil ao ponto de evaporar antes de sair da ponta da agulha. O solvente secando na ponta da agulha formará grânulos, já que nesta região o volume de solução polimérica é maior. Já os solventes que chegam até o coletor sem evaporarem, causarão grânulos pelo contato de várias fibras ainda molhadas, que podem se unir. Semelhantemente, uma solução muito concentrada em polímeros será muito viscosa e pode secar antes de sair da agulha, causando grânulos. Já soluções muito diluídas, ao secarem formam fragmentação antes de chegar ao coletor. [39, 44-46]

### **2.4.3 – Fluxo aplicado**

Quanto maior o fluxo, maior a porosidade e o diâmetro da fibra. As fibras que chegarem muito rápido ao coletor chegarão com muito solvente, que ao evaporar tende a formar poros. Além disso, um fluxo muito alto gera um jato largo que resulta

geralmente em fibras largas. Porém, mais uma vez existe um valor crítico de fluxo. Fluxos acima do valor crítico podem causar grânulos no jato. Além disso, caso a secagem seja incompleta, as fibras acumuladas no coletor formarão nós (pontos onde diferentes fibras convergem por estarem ligadas). Caso o fluxo seja muito baixo, os jatos podem ser intermitentes, formando grânulos. O fluxo está diretamente ligado à estrutura, à uniformidade, ao diâmetro e à morfologia da fibra em geral [47].

#### **2.4.4 – Distância do coletor**

Os fatores já citados estão diretamente ligados à distância do coletor, já que o tempo para que as nanofibras cheguem até o coletor depende diretamente da distância, além dos fatores relacionados acima. Como já citado, é necessário tempo suficiente para as fibras secarem e se depositarem. Porém, tempo maior que o necessário começa a gerar instabilidade nas fibras ainda durante o movimento em direção ao coletor [48]

### **2.5 – FIBRAS MONOLÍTICAS E CORE-SHELL**

Dentre as fibras formadas por eletrofiação, existem duas categorias bem distintas. As fibras monolíticas são aquelas mais convencionais, onde uma única solução polimérica é injetada pela seringa, podendo conter diversos componentes, mas todos em uma única solução. Já as fibras *core-shell* são mais recentes e possuem duas soluções para formar a eletrofiação. Neste caso, a segunda solução é levada até o interior da solução externa. Estas duas soluções formam fibras com dupla composição arranjadas de forma coaxial. Este processo propicia uma maior proteção da substância interna que é protegida pela substância mais externa. A figura 3 mostra o processo de eletrofiação de fibras coaxiais [41]:

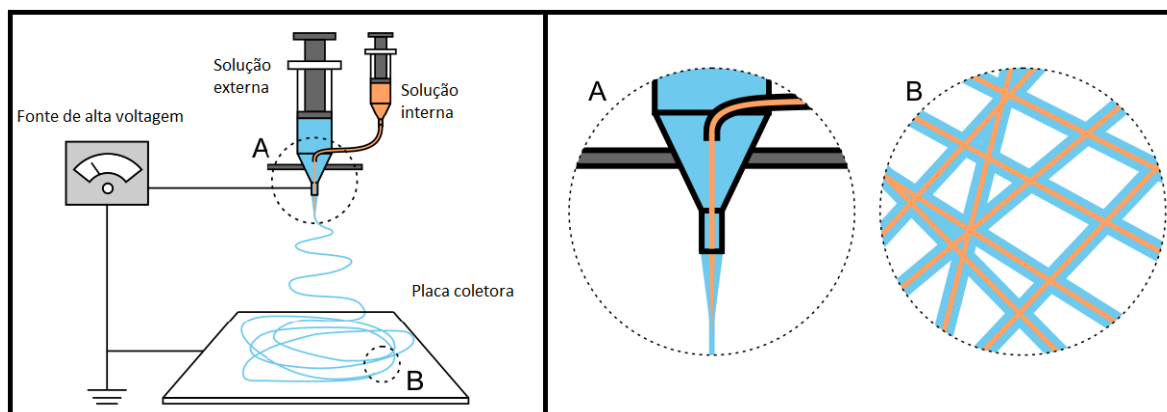


Figura 2 – Eletrofiação coaxial [40]. A) formação do jato contendo uma solução interna e uma solução externa. B) formação das fibras coaxiais com uma substância interna (laranja) e uma externa (azul).

A ampliação de (A) mostra que é possível formar fibras coaxiais a partir de duas soluções quando são ejetadas de forma apropriada. O sistema é mais complexo, mas pode gerar fibras com características distintas na superfície e no interior.

## 2.6 – LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS

Medicamentos de liberação controlada tiveram início na década de 1960. Inicialmente voltados para aplicação em mucosas (como olho e vagina), na pele e como cápsulas ingeríveis. Hoje, inúmeros fármacos conhecidos e vastamente utilizados utilizam a combinação do princípio ativo associado a polímeros. O septopal, por exemplo, é um eficaz medicamento utilizado no tratamento de tecidos na prevenção ou combate de infecções. O medicamento em questão é constituído de sulfato de gentamicina suportado pelo copolímero metacrilato de metila/acrilato de metila. Esferas do copolímero contendo fármaco são implantadas subcutâneas ou intramusculares. O fármaco é liberado com o tempo, mas o polímero utilizado não é biodegradável, gerando a necessidade de remoção através de cirurgia. Esta última etapa poderia ser evitada caso fosse possível a utilização de um polímero ou copolímero biodegradável e biocompatível [49].

Ainda na década de 1960, Schmitt e Polistina (1967) chegaram à síntese de um polímero com estrutura biodegradável de poli (ácido glicólico), conhecido como PGA [50].

Trabalhos realizados por Cui *et al* (2010) mostraram que nanofibras mineralizadas por tratamento com hidroxilas, carboxilas e grupamentos amino são

promissoras para o tratamento de tecidos duros por regeneração. Os estudos levaram à conclusão de que a carga superficial nas nanofibras potencializam o processo de cristalização das fibras na formação de tecidos duros [51].

Além disso, fibras formam compostos com elevada relação superfície/volume tiveram muito destaque no que se diz respeito a aplicações biomédicas. Com elevada superfície as fibras são facilmente funcionalizadas pela adsorção de moléculas bioativas por processos superficiais quando são produzidas por eletrofiação. Esse incremento nas fibras pode ser feito também pelo método químico úmido, por tratamento com plasma e por polimerização superficial ou então pelo processo de coeletrofiação de agentes tensoativos e polímeros. A figura 4 abaixo ilustra estes processos, que de formas distintas chegam à funcionalização superficial das nanofibras [52]:

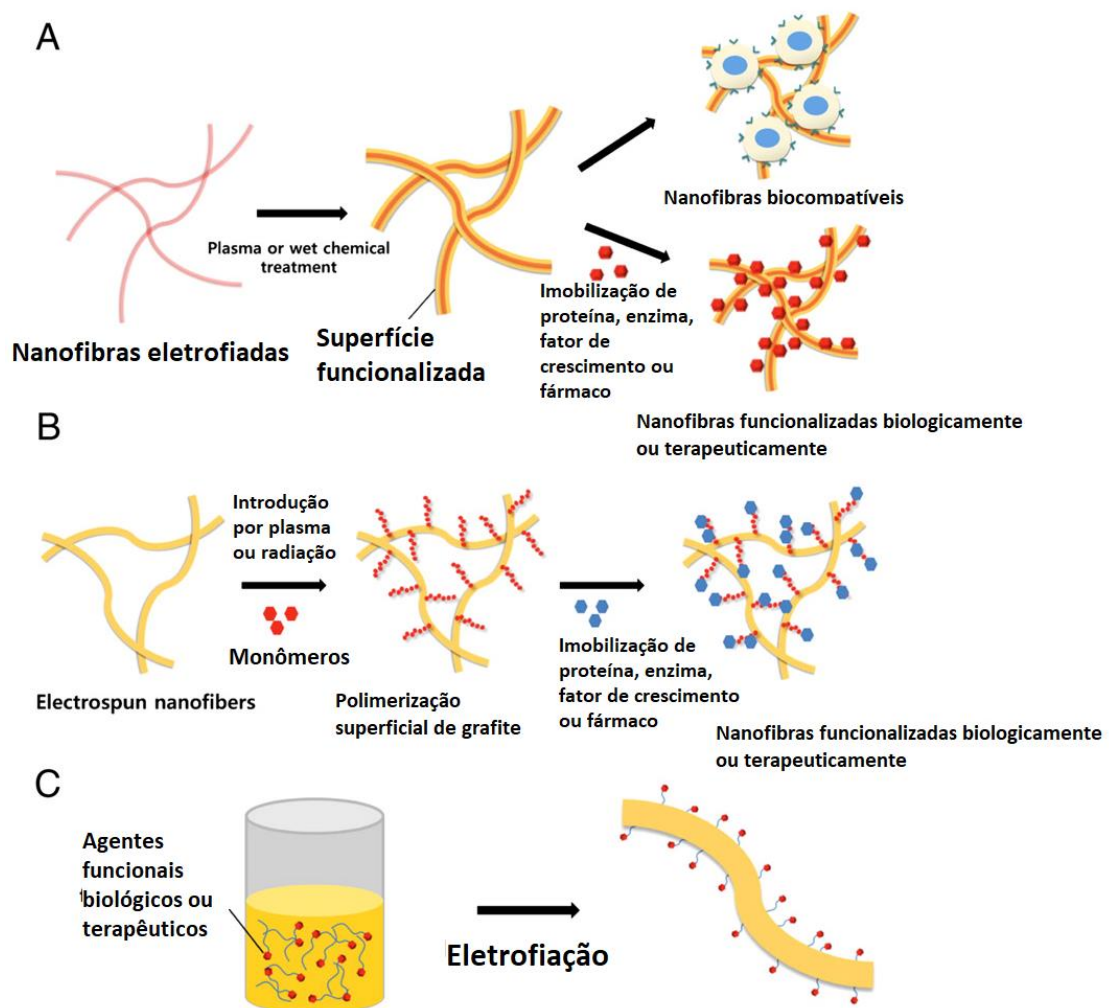


Figura 3 – Técnicas de modificação de nanofibras eletrofiadas. (A) Tratamento com plasma e pelo método químico úmido. (B) Polimerização de enxerto de superfície. (C) Coeletrofiação. [52]

Nos últimos anos, diversos esforços se deram no sentido da utilização da eletrofiação para produção de materiais com propriedades especiais, gerando produções em várias áreas. Pôde-se obter vidro bioativo a partir de polímeros da proteína da soja. Ao longo de anos e até hoje há muitos trabalhos envolvendo a área de engenharia de tecidos, como por exemplo tecido neural, tecido nervoso, tecido ósseo, vaso sanguíneo, tecido do esôfago. [53 – 60]

Existem ainda compostos que, por serem muito hidrofílicos, apresentam dificuldades na liberação controlada por técnicas convencionais, como os peptídeos, algumas proteínas e alguns fármacos. Para esses casos, a técnica denominada *core-shell*, onde a eletrofiação ocorre com soluções poliméricas diferentes ao mesmo tempo. O cloridrato de metoclopramida, por exemplo, pode ter sua liberação controlada de diversas formas, como Tiwari *et al* (2010) apresentaram comparando o fármaco associado a polímeros hidrofílicos e polímeros hidrofóbicos monolíticos (sem a associação de um polímero externo a um polímero interno coaxiais). Além de fibras *core-shell* PCL, PLLA e 80/20 utilizadas como polímeros de revestimento externo. Os resultados foram diferentes perfis de liberação em cada polímero monolítico utilizado e nos diferentes sistemas coaxiais preparados com mesmos polímeros que foram utilizados isoladamente. A técnica *core-shell* mostra resultados potenciais para a utilização de diferentes matrizes para diferentes perfis de liberação de fármacos. Contudo, a técnica é muito recente e difícil de ser controlada. [40,41]



## CAPÍTULO 3

### MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo estão descritos os procedimentos realizados para a produção do filme, teste de liberação, método analítico para quantificação da liberação do fármaco e procedimentos realizados para a validação do método analítico utilizado.

#### 3.1 – PRODUÇÃO DO FILME

Durante o desenvolvimento do projeto foram realizados testes para a determinação das condições otimizadas do sistema de eletrofição utilizando o copolímero de poli(ácido láctico) e poli(butileno adipato co-tereftalato) PBAT/PLA (55:45 m/m) comercializado como ecovio® da BASF. O polímero foi associado ao fármaco nitrofurazona da Sigma-Aldrich (lote LRAA9012) em uma solução.

A solução composta de polímero, fármaco e solventes foi transferida para uma seringa reutilizável de vidro neutro de 10 mL da marca *Arti Glass* com ponta metálica de rosca intercambiável contendo uma agulha descartável de 0,70 mm de diâmetro e 25 mm de comprimento da marca *Descarpack*. Inicialmente a proporção utilizada foi de 0,75 g de polímero e 3,75 mg de nitrofurazona dissolvidos em uma mistura composta de 4,25 mL de tetraidrofurano (THF) e 0,75 mL de N,N-dimetilformamida (DMF). Posteriormente, as proporções foram otimizadas para 2,25 g de polímero, 56,25 mg de nitrofurazona dissolvidos em uma mistura de 11,25 mL de THF e 3,75 mL de DMF. A seringa contendo a solução foi acoplada a uma bomba de seringas modelo *SP100I syringe pump* da marca *World Precision Instruments, Inc.* O polo positivo de uma fonte de alta tensão foi conectado à agulha, enquanto o fio terra e o polo negativo foram ligados à placa coletora. Nesta placa foi presa uma folha de papel vegetal 90 da marca *Canson* de gramatura de 95g.m<sup>-2</sup> no formato A2 (420mmx594mm), pH 7. Com o sistema montado, a bomba foi acionada com o fluxo ajustado conforme cada experimento e a fonte de alta tensão ligada. Lentamente a diferença de potencial foi aumentada até o valor referente a cada. A figura 4 na próxima página ilustra o processo de eletrofição descrito:

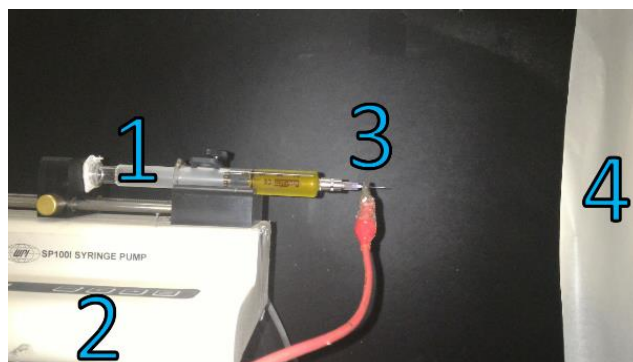


Figura 4 - Imagem da eletrofiação para produção das fibras. 1) seringa de vidro; 2) agulha acoplada ao polo positivo da fonte; 3) bomba de serigas; 4) anteparo com polo negativo coberto por papel vegetal.

Primeiramente foram variados os parâmetros distância entre a agulha e a placa coletora (9 a 21 cm), a diferença de potencial aplicada (10 a 22 KV), os solventes da solução polimérica (THF e DMF) e o fluxo de ejeção da solução (0,5 a 1,0 mL.h<sup>-1</sup>). Posteriormente, outras alterações foram realizadas.

Nos 15 primeiros experimentos realizados foi utilizada uma solução contendo 15% (m/v) de polímero com solventes tetraidrofurano (THF) e N,N-dimetilformamida (DMF) (85:15). Na mesma solução foi adicionada nitrofurazona, de forma que a concentração do fármaco fosse de 0,5% (m/m) em relação à massa de polímero. Para isso, 0,75g de polímero e 3,75mg de nitrofurazona foram dissolvidos utilizando 5mL de uma mistura de THF e DMF 85:15 (v/v). A mistura foi mantida sob agitação a 1500 rpm por 15 horas a temperatura ambiente e ao abrigo de luz em uma placa de agitação IKA® modelo *RCT basic safety control*. Com esta solução foram variados o fluxo, a diferença de potencial e a distância entre a agulha e a placa coletora. A partir dos resultados desses testes, outras alterações foram feitas. As primeiras alterações foram com os testes 16 a 18. Os dados dos experimentos 1 a 18 são apresentados na tabela 2:

Tabela 2 – Parâmetros iniciais avaliados na eletrofiação, utilizando como solvente 5 mL de uma mistura THF/DMF (85:15) v/v em soluções a concentração de polímero na solução foi de 15% m/v.

Experimento	Fluxo (mL h <sup>-1</sup> )	Ddp (KV)	Distância do coletor (cm)
1	0,50	18	12
2	0,50	20	12
3	0,50	10	12
4	0,50	15	15
5	0,50	12	15
6	0,50	20	15
7	0,50	15	12
8	0,50	12	12
9	0,50	15	18
10	0,50	18	21
11	0,50	20	21
12	0,50	18	9
13	1,00	22	18
14	0,50	22	18
15	0,50	22	21

Primeiramente as imagens foram analisadas visualmente para avaliação da quantidade de *beads*. Em seguida foram determinados o diâmetro médio das fibras e o respectivo desvio padrão pelo software *Quantikov*. Além disso, para cada experimento, foi avaliada a distribuição dos diâmetros pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk (30 amostras), no nível de significância de 0,05 (5%), com o software *BioEstat versão 5.3*. Para isso, em cada experimento, o diâmetro foi medido 30 vezes em posições aleatórias das imagens. Os resultados de diâmetro médio e de homogeneidade das fibras na forma de desvio padrão, assim como o resultado do p-valor para o teste de normalidade são apresentados no capítulo 4.

Após os testes 1 a 15, foi necessário avaliar de forma mais cuidadosa os resultados obtidos para então tomar a decisão dos demais testes subsequentes, que serão apresentados e discutidos no capítulo 4.

Além dos filmes obtidos por eletrofiação, foi preparado um filme por *casting*. Para isso o polímero e o fármaco foram solubilizados em dimetilformamida/tetrahidrofurano (15:85 v/v). A solução foi preparada de forma que a concentração de polímero fosse 15 % (m/v) e de fármaco 0,375% (m/v) na mesma solução. Após a completa solubilização, o solvente foi evaporado.

### 3.2 – ESCOLHA DOS SOLVENTES

Na eletroforação o solvente deve evaporar durante o fluxo que vai da seringa até a placa coletora. Além disso, deve possuir boa condutividade elétrica para viabilizar o movimento da solução de um polo elétrico ao outro. Desta forma, geralmente utiliza-se uma mistura de solventes. Usualmente a N,N-dimetilformamida (DMF) é utilizada como cossolvente, já que apresenta uma constante dielétrica de 38,25 e ponto de ebulição 153 °C. O outro solvente utilizado foi o tetraidrofurano (THF), que possui ponto de ebulição 65 °C e baixa constante dielétrica. Além de ser volátil, o tetraidrofurano tende a solubilizar bem furanos, como a nitrofurazona. Outro fator importante é que o THF tem larga faixa de miscibilidade com diversos solventes, inclusive a DMF. [61]

Posteriormente, o clorofórmio, que possui ponto de ebulição de 61,2 °C, juntamente com a DMF, foi testado como solvente. Como consta na sessão 2.1, a nitrofurazona é praticamente insolúvel em clorofórmio. Como a concentração de nitrofurazona é bem baixa e como há também o cossolvente dimetilformamida na mistura, foi possível solubilizar o fármaco para eletroforar. [61]

### 3.3 – PERFIL DE DISSOLUÇÃO

Após a determinação dos parâmetros adequados para a eletroforação, foi realizada a avaliação do perfil de liberação do fármaco em dissolutor. Para esse teste foi utilizado o aparato 5 (aparato da pá sobre discos na farmacopeia americana), que é também reconhecido pelas farmacopeias britânica e europeia. Este equipamento é indicado para testes de liberação transdérmica de fármacos, com rotação indicada entre 50 e 100 rpm e pH entre 5 e 6. Desta forma, foram utilizados 500 mL do meio de dissolução tampão acetato/ácido acético 15 mmol.L<sup>-1</sup> com pH de 5,5. A rotação escolhida foi de 75 rpm e a temperatura mantida em 32,0±0,5°C. Para eliminar interferência do solvente, o mesmo tampão foi o diluente das soluções padrão utilizadas na quantificação da nitrofurazona. Abaixo está representada uma imagem do aparato 5 na figura 5. [61 – 63]



Figura 5 - Aparato 5 - pá sobre disco. [62]

Antes de começar o teste de dissolução o meio de dissolução foi aquecido até 41 °C para eliminar possíveis bolhas. Em seguida, o meio foi mantido a  $32,0 \pm 0,5$  °C; temperatura na qual o teste foi realizado. As coletas foram feitas a cada 15 minutos, até 150 minutos. Após 150 minutos as coletas foram realizadas de 30 em 30 minutos, até chegar ao tempo final de 300 minutos.

Foram comparados os resultados do perfil de dissolução com dois filmes eletrofiados e um filme produzido por evaporação dos solventes. Com cada um dos três filmes foi avaliado o perfil de dissolução em triplicata.

A quantificação de nitrofurazona no meio foi realizada pela técnica de espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta e visível. As soluções amostra coletadas do teste de dissolução foram avaliadas frente a uma curva de calibração construída com soluções padrão preparada por diluições utilizando o meio de dissolução como diluente na faixa de concentração de 0,25 a 12,5 mg.L<sup>-1</sup>.

### **3.4 – VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO**

A validação do método analítico para determinação de nitrofurazona liberada por espectrofotometria foi realizada avaliando-se linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação e seletividade do método analítico utilizado para quantificação de nitrofurazona. Todos os parâmetros da validação foram delineados levando em consideração as concentrações das soluções geradas pelo perfil de dissolução. [65 – 66]

#### **3.4.1 – Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação**

A linearidade foi testada por 8 pontos em triplicata a partir de 3 curvas de calibração nas concentrações nominais de 0,25; 0,50; 2,50; 4,50; 6,50; 8,50; 10,50 e 12,50 mg.L<sup>-1</sup>. As concentrações escolhidas abrangem a faixa de trabalho do método

e foram preparadas com padrão de nitrofurazona Sigma-Aldrich (lote LRAA9012) com 99,4% de pureza. Levando em consideração que o máximo de nitrofurazona que poderia ser liberado (100%) está na faixa de 10 mg.L<sup>-1</sup>, as concentrações utilizadas de 0,25 a 12,50 mg.L<sup>-1</sup> abrangem as liberações na faixa de 2,5 a 125%. A partir dos resultados das curvas, foram realizados testes estatísticos para verificação da linearidade. Ainda com as curvas de linearidade, foram estimados os limites de detecção (LoD) e de quantificação (LoQ) do método. Para a estimação dos limites de detecção e quantificação foram utilizados os mesmos níveis testados na análise de linearidade. As fórmulas utilizadas são apresentadas a seguir:

$$LoD = 3,3 \times \frac{DP_{res}}{b} \quad \text{Equação 1}$$

LoD é o limite de detecção do método; DP<sub>res</sub> é o desvio padrão dos resíduos da regressão linear utilizada para avaliação da linearidade; b é o coeficiente angular determinado a partir das curvas.

$$LoQ = 10 \times \frac{DP_{res}}{b} \quad \text{Equação 2}$$

LoQ é o limite de quantificação do método; DP<sub>res</sub> é o desvio padrão dos resíduos da regressão linear utilizada para avaliação da linearidade; b é o coeficiente angular determinado a partir das curvas.

Cada ponto utilizado na regressão linear possui uma concentração conhecida (X<sub>i</sub>) e uma resposta analítica (y<sub>i</sub>). Com todos os pontos da regressão se obtém uma equação que correlaciona a concentração (X<sub>i</sub>) e a resposta analítica (Y<sub>i</sub>). Desta forma, cada concentração possui a resposta analítica estimada pela equação (Y<sub>i</sub>) e a resposta analítica obtida experimentalmente (y<sub>i</sub>). O resíduo de cada ponto é a diferença entre y<sub>i</sub> – Y<sub>i</sub>. [64]

Estes resultados de limite de detecção e limite de quantificação levam a valores estimados, que orientam o LoD e o LoQ. Para confirmação do limite de quantificação, devem ser atestadas a exatidão e a precisão do método no nível de concentração determinado. Como as análises são quantitativas, não há necessidade de se determinar o limite de detecção, desta forma só será avaliado o limite de quantificação, considerando que não será realizado um ensaio limite. [65 – 66]

### 3.4.2 – Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão do método foram avaliadas em concentração definidas a partir do perfil de dissolução do fármaco. Conhecendo a faixa de concentração de nitrofurazona dissolvida do início ao fim do teste de dissolução, foram escolhidos os níveis de 0,5; 6,5; 10,0 e 12,5 mg.L<sup>-1</sup> para avaliação da precisão e da exatidão. Para isso foi utilizado o filme originalmente produzido e foram preparados 3 filmes adicionais com quantidades diferentes de nitrofurazona de forma que, ao ser liberada completamente na cuba de 500 mL, a nitrofurazona gerasse soluções em concentrações 0,5; 6,5; 10,0 e 12,5 mg.L<sup>-1</sup>, que simulam 5,0; 65,0; 100,0 e 125,0% de liberação da nitrofurazona presente no filme original.

Cada um dos 3 novos filmes e o filme original foram analisados em triplicata. Os filmes foram analisados no dissolutor sob mesmas as condições utilizadas na análise de perfil de dissolução. Para garantir que, no momento da quantificação, todo o material estivesse liberado no meio de dissolução, somente o tempo final de 300 minutos no dissolutor foi quantificado. Caso fosse utilizada uma solução em que a nitrofurazona não estivesse completamente dissolvida no meio, a precisão e a exatidão do método seriam subestimadas. Os resultados seriam baixo e dispersos não pela falta de precisão ou exatidão do método, mas pela variabilidade da amostra não dissolvida completamente. Por esses motivos a precisão e a exatidão do método foram avaliadas somente após 300 minutos sob dissolução, quando a completa liberação já havia sido atingida.

Tabela 3 – Proporções utilizadas na produção de filmes para avaliação exatidão e precisão.

Eletrofiação				Dissolução		
Filme	massa polímero (g)	Massa NFZ <sup>2</sup> (g)	Massa total (g)	massa de filme no dissolutor (g)	razão NFZ/filme (m/m)	Concentração final NFZ teórica (mg.L <sup>-1</sup> )
1	2,2617	0,0028	2,2645	0,2054	0,00124	0,5094
				0,2049		0,5082
				0,2061		0,5111
2	2,2657	0,0371	2,3028	0,2051	0,01611	6,6083
				0,2055		6,6212
				0,2048		6,5987
3	2,2513	0,0563	2,3076	0,2055	0,02440	10,0284
				0,2051		10,0089
				0,2059		10,0479
4	2,2586	0,0706	2,3292	0,2053	0,03031	12,4453
				0,2061		12,4938
				0,2050		12,4271

Utilizando os mesmos filmes descritos acima uma segunda avaliação da precisão do método foi realizada nos mesmos 4 níveis descritos acima, em um segundo dia. Em cada dia foi avaliada a repetibilidade e, com os dois resultados em conjunto foi avaliada a precisão inter-dia. Ambos os resultados foram comparados em termos de desvio padrão relativo (coeficiente de variação) e através dos seguintes testes estatísticos: *Teste F* e *Teste t de Student*. Os resultados e critérios de aceitação são apresentados no capítulo 4.

### 3.4.3 – Seletividade

A seletividade do método foi testada para verificar se a quantificação de nitrofurazona sofre interferência de algum dos componentes da matriz ou se o resultado é confiável e referente à somente a nitrofurazona. Neste caso, a solução amostra quantificada pode conter em sua composição a própria nitrofurazona, o

<sup>2</sup> NFZ: nitrofurazona.



polímero ecovio® e o meio de dissolução composto por uma solução tampão de acetato/ácido acético.

A avaliação da seletividade foi realizada através da avaliação da interferência da presença do polímero na quantificação. Para isso, foram comparadas duas soluções. A primeira solução sendo o meio de dissolução sem nenhum tratamento e a segunda solução sendo o meio de dissolução após passar pelo dissolutor contendo 3 g de ecovio® por 300 minutos e nas mesmas condições utilizadas para análises de perfil de dissolução. Pela comparação dessas soluções buscou-se verificar se durante a análise de dissolução o ecovio® é dissolvido no meio de dissolução de forma a interferir na quantificação de nitrofurazona. A solução tampão foi utilizada para zerar a absorvância como branco. Em seguida a solução retirada do dissolutor que estava em presença do ecovio® foi lida. Em nenhum dos experimentos o ecovio® foi dissolvido visualmente, então esta avaliação foi realizada para confirmar que, se alguma parcela do polímero fosse dissolvida, não impactaria na análise.

Como tampão está presente tanto na solução amostra quanto nas soluções padrão, não foi necessário avaliar se há impactos gerados pela presença do tampão.

#### **3.4.4 – Intervalo de trabalho**

O intervalo de trabalho do método foi estabelecido pela confirmação da linearidade, precisão e exatidão em todo o intervalo avaliado.

### **3.5 – FILMES COMPARATIVOS**

Dois filmes foram produzidos apenas para comparação de resultados. Um deles seguiu o mesmo processo de obtenção do filme otimizado com THF/DMF (85:15) v/v contendo polímero na concentração de 15%. Este filme não continha nitrofurazona e foi eletrofiado para ser utilizado como parâmetros durante a avaliação das características dos filmes produzidos. Um outro filme produzido para comparação foi um filme cuja solução polimérica foi preparado de forma exatamente igual ao procedimento otimizado, inclusive contendo nitrofurazona na concentração de 2,5% (m/m) em relação ao polímero. Este segundo filme não foi eletrofiado. Mas sim produzido por evaporação do solvente contido na solução polimérica.

### 4.1 – EXPERIMENTOS PRELIMINARES

Para verificar a viabilidade da quantificação por espectrofotometria na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) durante o teste de liberação foi realizado um teste preliminar, com uma solução de nitrofurazona a  $13,21 \text{ mg.L}^{-1}$  ( $6,667 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ ) no meio de dissolução de pH 5,5 e analisada de 190 a 600 nm. O espectro produzido está presente na figura 6:

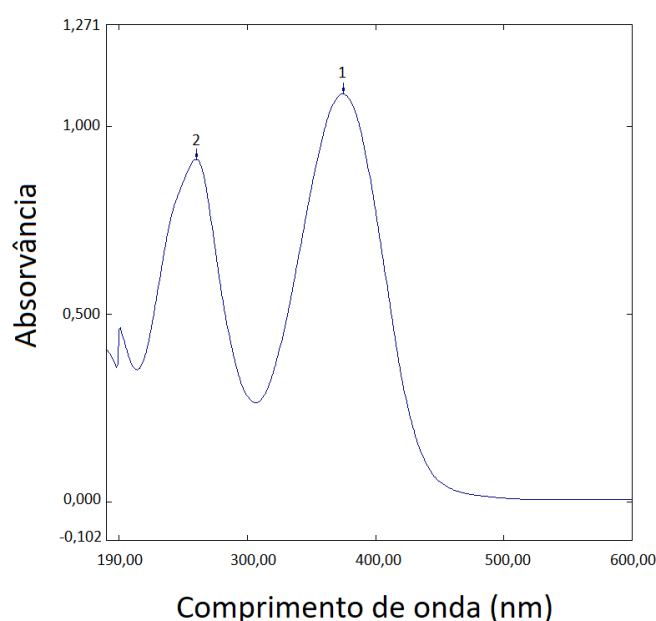


Figura 6 – Espectro de absorção da nitrofurazona na região do UV-Vis.

Pode-se observar duas bandas com máximos de absorção em 375 nm ( $\epsilon = 16289,013 \text{ L.cm}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ ) e em 260 nm ( $\epsilon = 13664,17 \text{ L.cm}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ ). O resultado demonstrou que mesmo uma solução bastante diluída, na concentração de  $13,21 \text{ mg.L}^{-1}$  a nitrofurazona gera um sinal analítico intenso, remetendo a uma boa sensibilidade da técnica para a quantificação de nitrofurazona, com máximos de absorção em 375 e 260 nm, representados por 1 e 2 na figura, respectivamente.

Dois fatores foram determinantes para a escolha do comprimento de onda de 375 nm na quantificação de nitrofurazona. Um deles é a alta absorvidade molar, que confere boa sensibilidade. O outro é o fato de que a 375 nm há menos chances de interferentes, visto que quanto menores os comprimentos de onda, mais moléculas

absorvem na região do UV-Vis. Assim, tanto a sensibilidade quanto a seletividade foram maximizadas.

## 4.2 – EXPERIMENTOS DE FORMAÇÃO DAS FIBRAS

Primeiramente são apresentados os resultados dos 15 primeiros experimentos que foram realizados utilizando uma solução polimérica contendo 15% de polímero em relação ao volume de solventes THF e DMF. Os solventes por sua vez foram utilizados em uma proporção de THF/DMF 85:15 (v/v) e a nitrofurazona adicionada em relação ao polímero foi de 0,5% (m/m).

Os produtos à base de nitrofurazona disponíveis hoje no mercado apresentam-se em uma concentração de 0,2% na forma de creme. Entretanto, a primeira proposta foi a utilização da concentração de 0,5%. Essa escolha foi feita devido ao fato de que no filme o fármaco está em um substrato sólido e, em um maior estado de agregação, a liberação é menos facilitada que na forma de creme (forma comercial). As imagens das fibras obtidas encontram-se na figura 6 com ampliação de 100 vezes:

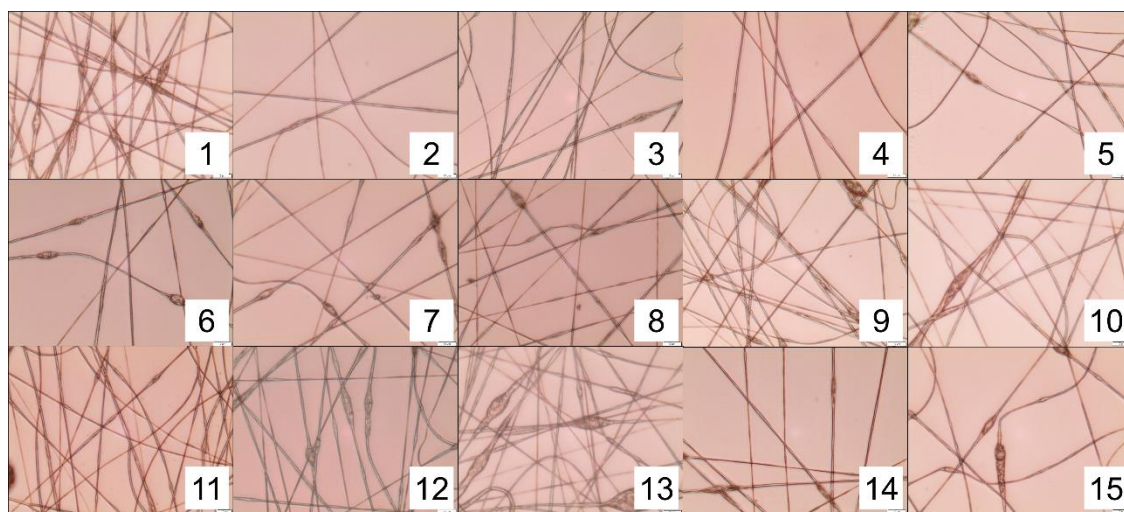


Figura 7 - Resultados das fibras obtidas nos experimentos 1 a 15 variando (tensão, distância do coletor e fluxo) com ampliação de 100 vezes. 1 - (0,50 mL h<sup>-1</sup>; 18kV; 12cm). 2 - (0,50 mL h<sup>-1</sup>; 20 kV; 12cm). 3 - (0,50 mL h<sup>-1</sup>;10 kV;12cm). 4 - (0,50 mL h<sup>-1</sup>;15 kV;15cm). 5 - (0,50 mL h<sup>-1</sup>;12 kV;15cm). 6 - (0,50 mL h<sup>-1</sup>;20 kV;15cm). 7 - (0,50 mL h<sup>-1</sup>;15 kV;12cm). 8 - (0,50 mL h<sup>-1</sup>; 12 kV;12cm). 9 - (0,50 mL h<sup>-1</sup>;15 kV;18cm). 10 - (0,50 mL h<sup>-1</sup>;18 kV;21cm). 11 - (0,50 mL h<sup>-1</sup>;20 kV;21cm). 12 - (0,50 mL h<sup>-1</sup>;18 kV;9cm). 13 - (1,00 mL h<sup>-1</sup>;22 kV;18cm). 14 - (0,50 mL h<sup>-1</sup>;22 kV;18cm). 15 - (0,50 mL h<sup>-1</sup>;22 kV;21cm).

Uma análise visual da figura 8 na página anterior mostra que as fibras obtidas nos experimentos 1, 10, 12, 13 e 15 apresentam *beads* proeminentes e longos em grande quantidade, que podem dificultar a liberação do fármaco por apresentarem menor área superficial e formar filmes de baixa resistência física.

Após a análise visual, o diâmetro médio das fibras e o respectivo desvio padrão assim como o resultado do p-valor para o teste de normalidade são apresentados a seguir, na tabela 4.

Tabela 4 – Resultados de diâmetro médio das fibras e a variabilidade da fibra apresentada como desvio padrão.

Experimento	Diâmetro médio (µm)	Desvio padrão (µm)	n	Normalidade (p-valor)
1	1,489	0,196	30	0,8668
2	1,280	0,155	30	0,0199
3	1,387	0,097	30	0,2845
4	1,366	0,147	30	0,8793
5	1,148	0,118	30	0,5223
6	1,322	0,165	30	0,0457
7	1,214	0,119	30	0,5304
8	1,292	0,125	30	0,8487
9	1,299	0,109	30	0,0229
10	1,335	0,149	30	0,2826
11	1,240	0,094	30	0,5913
12	1,223	0,083	30	0,4054
13	1,390	0,139	30	0,0784
14	1,149	0,105	30	0,9900
15	1,393	0,157	30	0,3104

Os resultados não são muito diferentes para o diâmetro da maioria das fibras. Contudo, o teste de normalidade mostra que nos testes 2, 6 e 9 não possuem distribuição normal dos diâmetros das fibras, caracterizando que muitas fibras têm diâmetro muito maiores ou muito menores que o diâmetro médio determinado para as fibras do teste. Nestes resultados o valor de *p* foi inferior a 0,05; indicando distribuição não normal para um nível de significância de 5%.

A partir de todos os resultados anteriores, verifica-se que valores entre 12 e 15 kV e entre 12 e 15 cm apresentaram resultados mais promissores, uma vez que os melhores resultados foram gerados pelos testes 4, 5, 7 e 8.

Assim, optou-se por obter a membrana com os parâmetros do experimento 7, ou seja, fluxo de 0,5 mL h<sup>-1</sup>, tensão de 15 kV e distância de 12 cm. Entretanto, apesar

das fibras obtidas apresentarem baixo diâmetro e quantidade de *beads*, o filme foi de difícil obtenção devido à dispersão demasiada das fibras formadas. Com isso, houve uma grande área de deposição das fibras e a quantidade de solução polimérica não foi suficiente para a formação de um filme espesso o bastante, sendo de difícil remoção da placa coletora.

No intuito da redução na dispersão das fibras, foram realizadas mudanças de proporção e de solvente, já que esta dispersão possivelmente ocorra devido à rápida secagem do solvente enquanto a solução ainda está na ponta da agulha. Isso provoca uma concentração de material na ponta da agulha que gera múltiplos jatos e carece de repetitivas limpezas da ponta da agulha. Desta forma, novos testes foram realizados para obtenção de um filme que possibilite os testes de liberação.

#### 4.2.1 – ALTERAÇÕES DO SOLVENTE E QUANTIDADE DE FÁRMACO

Inicialmente realizou-se a troca do solvente, sendo usado uma mistura de clorofórmio:dimetilformamida (85:15) (v:v) (Experimento 16). A imagem das fibras obtidas está representada na figura 8.



Figura 8 - Imagem das fibras produzidas no experimento 17 com fluxo de  $0,5 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ , 15 kV, 12 cm, dimetilformamida/clorofórmio (15:85), 15% ecovio®, 0,5% (m/m) nitrofurazona em relação ao ecovio®.

As fibras formadas neste experimento praticamente não formaram *beads* e foram bastante homogêneas e finas; com diâmetro médio de  $1,226\pm 0,396 \mu\text{m}$ . Contudo, após várias horas de eletrofiação também ocorreu a formação de material parcialmente seco na ponta da agulha. Com isso, novamente aumentou a aleatoriedade dos jatos formados e a área de deposição aumentou. Assim, não foi possível formar um filme espesso o suficiente para ser retirado do coletor.

Para tentar evitar o acúmulo de sólido na ponta da agulha com o passar do tempo, optou-se por realizar a diminuição da concentração de nitrofurazona na solução. Como no experimento 16 só houve ressecamento de material na agulha após horas de eletrofiação, manteve-se a mesma mistura de solvente, diminuindo apenas a quantidade do fármaco (experimento 17). As fibras formadas resultaram em uma grande quantidade de *beads*, como pode ser visto na figura 9:

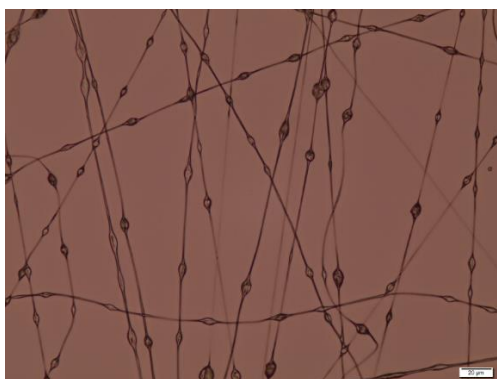


Figura 9 - Imagem das fibras produzidas no teste 18 com fluxo de  $0,5 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ , 15 kV, 12 cm, dimetilformamida/tetraidrofurano (15:85), 15% ecovio®, 0,3% (m/m) nitrofurazona em relação ao ecovio®.

Com a diminuição na concentração de nitrofurazona foi observado um filme de coloração amarela (característico da nitrofurazona). Entretanto, ainda não foi obtido um filme de fácil remoção e boa espessura. Dessa forma, com a diminuição na concentração, além de não melhorar a obtenção do filme, teve um aumento considerável no número de *beads*.

Assim, os problemas de secagem parcial da solução eletrofiada na ponta da agulha apontam primeiramente para duas possibilidades de contorno. Uma delas é otimizar o sistema para realizar a eletrofiação mais rapidamente com um fluxo mais alto de forma a evitar que ocorra a formação do material seco na ponta da agulha que torna as fibras mais heterogêneas, pois aumentar o fluxo do processo diminui o tempo de eletrofiação, diminuindo também a possibilidade de uma possível alteração nas propriedades da solução polimérica, levando em conta que a secagem do material só começa a ocorrer depois de algumas horas sob eletrofiação. Uma segunda opção foi trabalhar na composição da solução polimérica em termos de concentrações, proporções ou solventes utilizados, no intuito de favorecer uma solução mais homogênea e estável.

Com indícios de que a baixa concentração de nitrofurazona gerou resultados negativos, optou-se por utilizar uma concentração mais alta de nitrofurazona. Além disso, se faz necessário o aumento da concentração de nitrofurazona no filme para que não seja necessária uma quantidade demasiadamente grande de filme para realizar os testes de dissolução. Como o espaço da cuba é limitado, não haveria como utilizar uma quantidade muito grande de material.

#### 4.2.2 – AUMENTO DO FLUXO E DA CONCENTRAÇÃO DE NITROFURAZONA / VARIAÇÃO NO SOLVENTE

Tanto a concentração de nitrofurazona em relação ao polímero quanto o fluxo foram aumentados para 2,5% (m/m) de concentração e 2,5 mL.h<sup>-1</sup> de fluxo. A concentração de polímero na solução polimérica foi mantida em 15 % (m/v), para as duas misturas de solvente THF/DMF (Figura 10 A) e clorofórmio/THF (Figura 10 B).

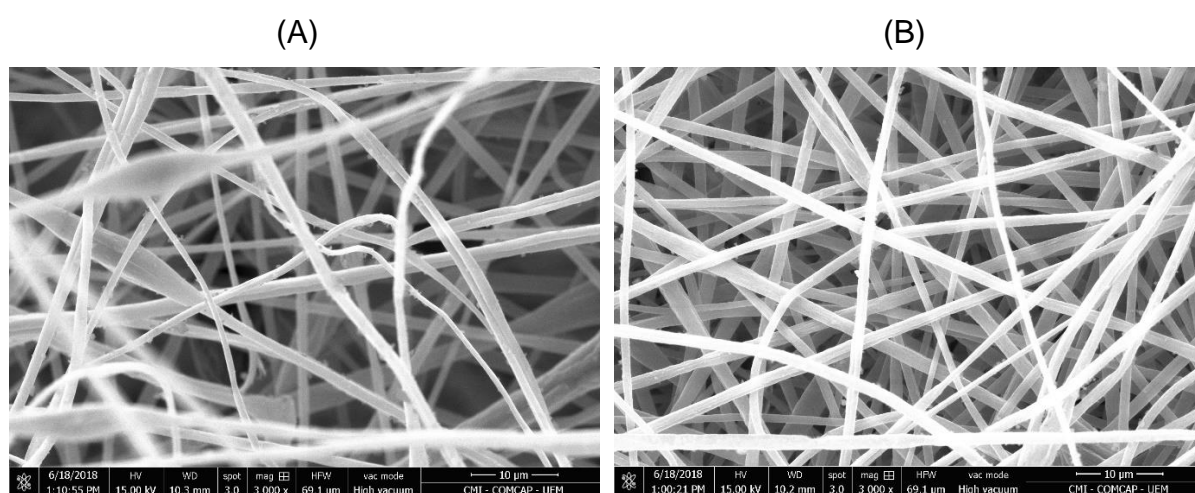


Figura 10 – Imagem do filme por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para os filmes obtidos com THF/DMF (A) e clorofórmio/DMF (B). Ambas com ampliação de 3000 vezes, sob alto vácuo, 15KV.

Observa-se que na Figura 10 B, as fibras apresentam-se mais homogêneas e com menor quantidade de *beads*, entretanto a Figura 10 A também apresenta baixa presença de *beads*. Os diâmetros obtidos e a normalidade dos resultados podem ser vistos na Tabela 5.

Tabela 5 – Resultados de diâmetro das fibras e teste de normalidade Shapiro-Wilk para os dois filmes produzidos.

Filme	Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	p-valor normalidade
THF/DMF	1,0923 $\pm$ 0,2470	0,3174
Clorofórmio/DMF	1,2902 $\pm$ 0,2320	0,7891

Os filmes apresentaram distribuição normal de diâmetro das fibras. Nota-se também que em ambos os casos o diâmetro e o número de *beads* foi baixo. Desta forma, foi realizado o teste de liberação no dissolutor para os dois filmes.

### 4.3 – CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

Os filmes foram caracterizados com o intuito de se obter maiores informações acerca das características dos mesmos e para avaliar se há e como ocorreu a incorporação do fármaco no filme.

#### 4.3.1 – Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

O polímero puro (ecovio®) foi comparado com os 3 filmes gerados e com a nitrofurazona pura. Os resultados das análises de espectroscopia na região do infravermelho são apresentados na figura 11 a seguir:



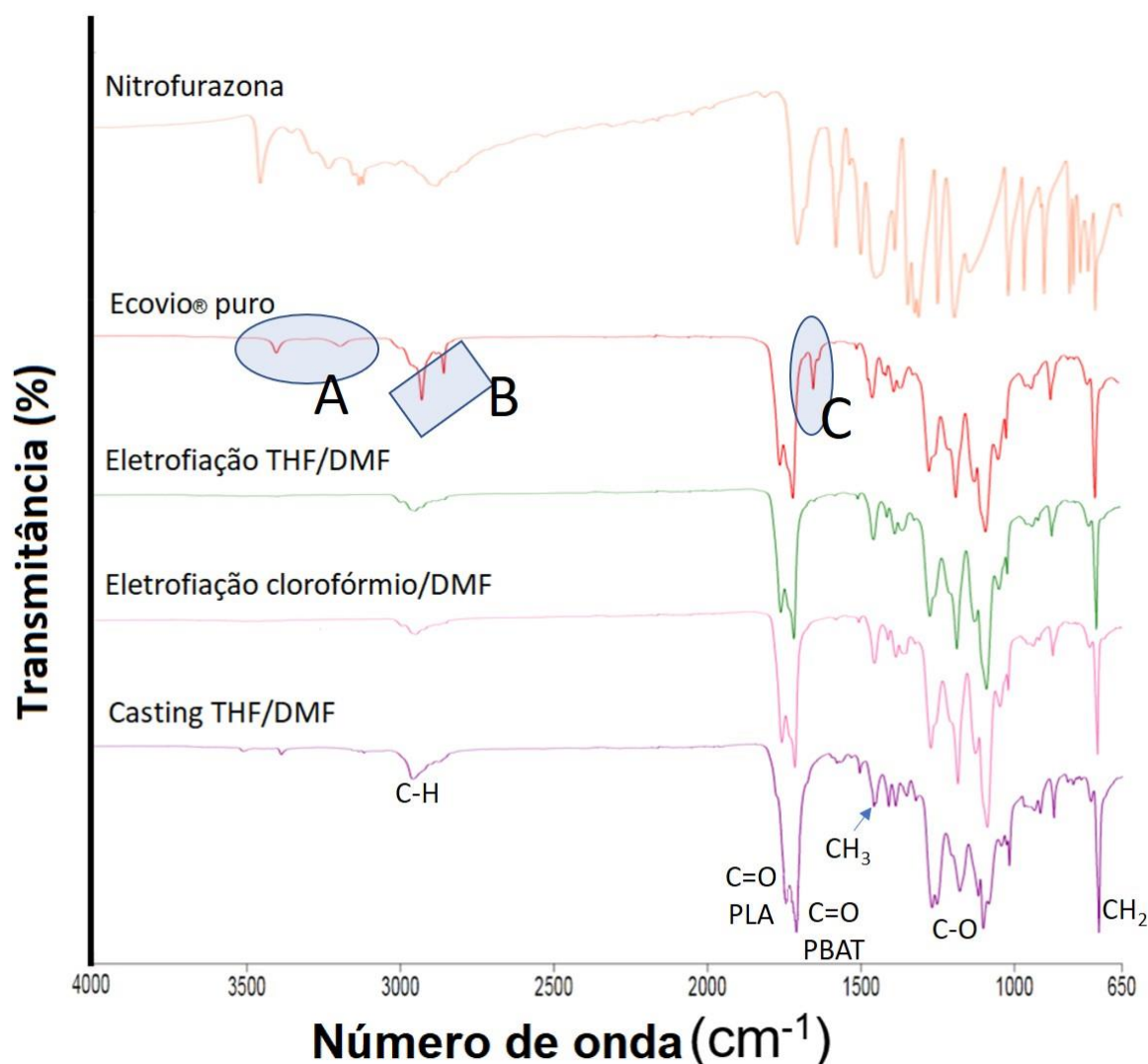


Figura 11 – Espectros vibracionais de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR-ATR) da nitrofurazona, do polímero e dos filmes formados. A, B e C mostram bandas que deixam de existir após a produção dos filmes. Aquisição por 15 varreduras de 4000 a 650  $\text{cm}^{-1}$ .

Nos filmes produzidos, pôde-se perceber que algumas bandas deixaram de existir quando comparado com o polímero puro. O pico em  $1646,25 \text{ cm}^{-1}$  (destacado pela letra C na figura) não é atribuído aos polímeros PBAT ou PLA, mas é conhecido como um agente compatibilizante utilizado na produção do copolímero. Muitos trabalhos envolvendo PBAT, PLA ou ecovio® não apresentam as bandas destacadas em (A). Mofokeng *et al* (2011) e Silva (2016) associam essas bandas a hidroxilas “livres” (não associadas) de moléculas do polímero. Por tratar-se de polímero, hidroxilas livres não são previstas, mas uma parte das moléculas pode não

estar polimerizada, possuindo então hidroxilas não associadas. Estas bandas podem moléculas parcialmente degradadas. Entretanto, durante a produção do filme moléculas responsáveis por essas bandas são eliminadas [85-89].

Após a incorporação do fármaco nas fibras obtidas por eletrofiação, não foi possível observar diferença entre os espectros, indicando que possivelmente o fármaco encontra-se no interior delas, isso ocorre possivelmente durante o estiramento dos fios, causando o encapsulamento do fármaco. Entretanto, no filme produzido por *casting*, houve alteração nas bandas entre 1500 e 1000  $\text{cm}^{-1}$ , isso pode ter ocorrido, pois mesmo que ocorra interação entre o polímero e o fármaco, este encontra-se disperso no filme, não apenas no interior. Para entender melhor as bandas obtidas nos espectros, a Figura 12 mostra as moléculas dos polímeros PBAT e PLA [73].

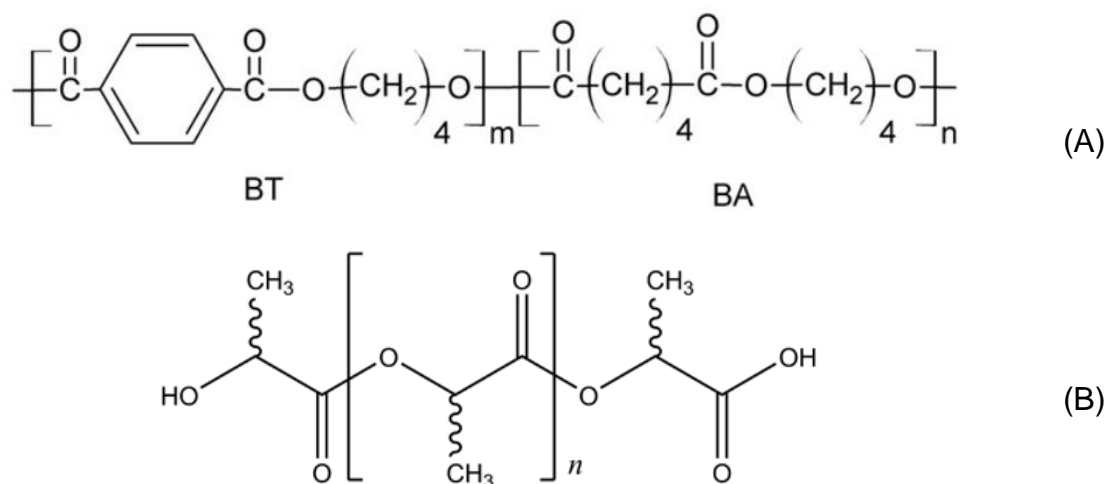


Figura 12 – Estrutura das moléculas de PBAT (A), sendo e de PLA (B).

Entre 1300 e 1000  $\text{cm}^{-1}$  há três bandas que se destacam e podem ser atribuídas a ligações C-O de éster, que estão presentes nas 3 moléculas que compõem o polímero. Em 728,23  $\text{cm}^{-1}$  pode-se verificar a presença da banda que indica  $\text{CH}_2$  a partir de 4 unidades consecutivas. Cada uma delas é apresentada na tabela 6. [73 –77]

Tabela 6 – Atribuição das principais bandas do espectro dos filmes produzidos. [73 –77]

$\nu(\text{cm}^{-1})$	Atribuição
2920,79	Deformação axial C–H. $\text{CH}_2$ alifático.
2849,24	Deformação axial C–H. $\text{CH}_2$ alifático.
1754,75	Deformação axial C=O. Éster (PLA).
1712,18	Deformação axial C=O. Éster (PBAT)
1646,25	Referente ao agente compatibilizante.
1269,11 e 1043,95	Deformação axial C–O. Éster aromático (PBAT).
1453,30	Deformação angular $\text{CH}_3$ (PLA).
1181,58	Deformação axial C–O. Éster alifático (PLA).
1085,17	Deformação axial C–O. Éster alifático (PBAT).
873,23	Deformação angular fora do plano C–H. Benzeno 1, 4 dissubstituído (PBAT).
728,23	Deformação angular (rocking) $-(\text{CH}_2)_4-$ (PBAT)

As bandas em 1181,58 e 1085,17  $\text{cm}^{-1}$  foram atribuídas ao PLA e ao PBAT, respectivamente, pelo fato de o PBAT ter 4  $\text{CH}_2$  em cada lado dos grupamentos ésteres alifáticos. Desta forma, o maior deslocamento foi atribuído para o PLA, que possui cadeias alifáticas menores entre os grupamentos de éster, deslocando o sinal para maior número de onda. [73 –77]

#### 4.3.2 – Análises termogravimétricas (TGA)

As análises de TGA, foram realizadas no intuito de avaliar as possíveis alterações causadas no polímero pela presença da nitrofurazona (NFZ). A figura 13 A mostra os termogramas de um filme produzido sem nitrofurazona com a mistura de solvente THF/DMF e as Figuras 13B e 13C, mostram os termogramas para os filmes obtidos por eletrofiliação contendo nitrofurazona em diferentes misturas de solvente THF/DMF e clorofórmio/DMF, respectivamente.

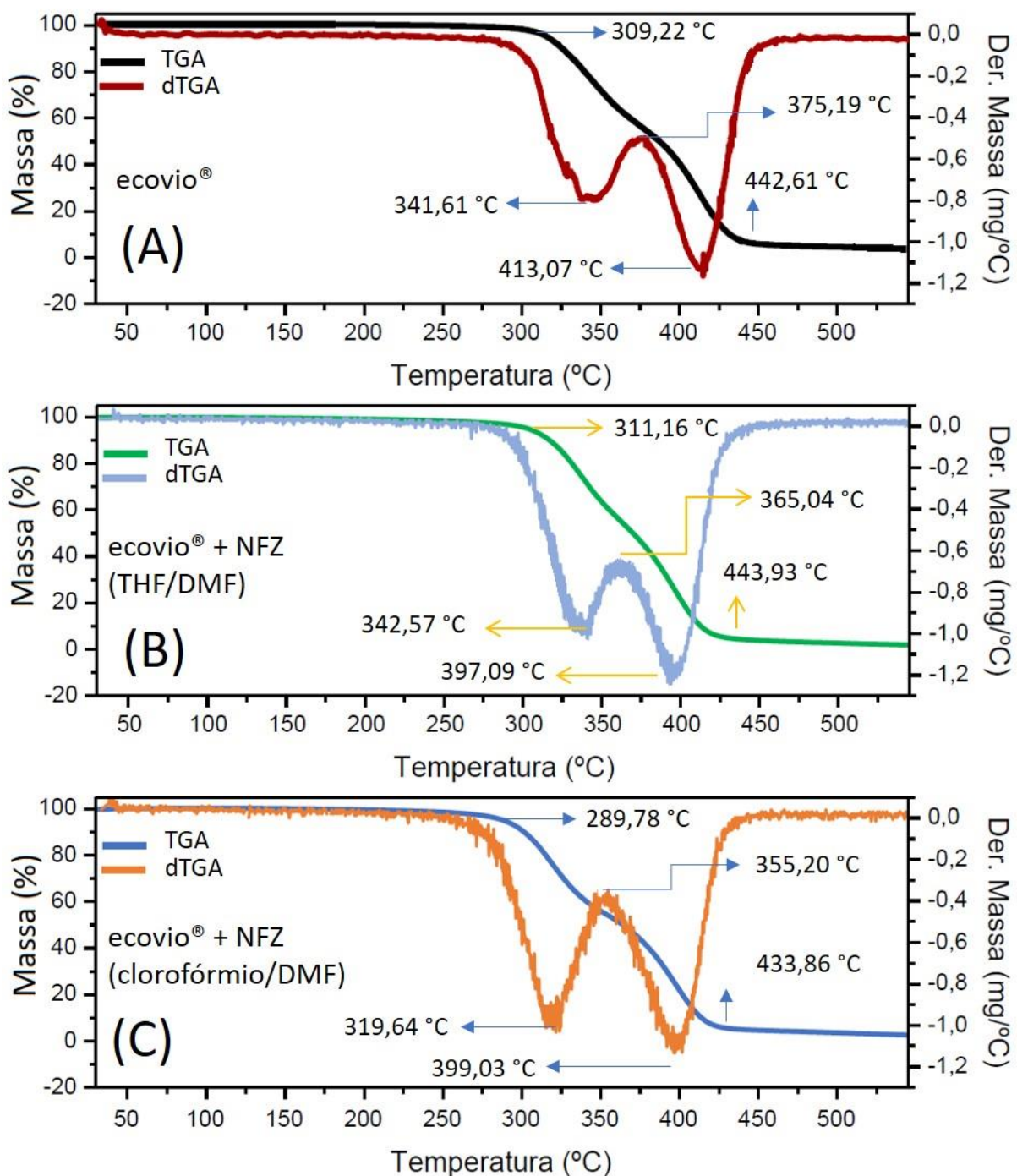


Figura 13 – Termogramas de análises termogravimétricas com temperatura de 30 a 750 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C.min<sup>-1</sup> e atmosfera de nitrogênio a 50 mL.min<sup>-1</sup>. (A) filme sem nitrofurazona. (B) Filme com nitrofurazona produzido com THF/DMF. (C) Filme com nitrofurazona produzido com clorofórmio/DMF.

Pode-se perceber que há dois eventos térmicos com perda de massa parcialmente sobrepostos. Segundo PILLA *et al*, o PLA tem alta sensibilidade térmica, de forma que no processo de polimerização deve-se manter a temperatura abaixo de

aproximadamente 180 °C. Assim, considera-se que o primeiro evento de degradação térmica ocorre com o PLA. Pode-se observar na degradação do PLA, que a variação do solvente acarretou uma alteração na temperatura de degradação para os filmes contendo NTZ<sup>3</sup>, já que o  $T_{\text{onset}}$  (início da degradação) do PLA levou à degradação em temperatura mais baixa quando utilizado o clorofórmio. Para o solvente THF/DMF, houve um aumento na temperatura de degradação do PLA, indicando uma maior estabilidade térmica, quando comparado com a mistura clorofórmio/DMF. Mesmo comportamento ocorreu para o segundo evento térmico. Desta forma, constatou-se que a escolha do solvente interfere na estabilidade térmica do filme.

Além disso, ao comparar os filmes obtidos com THF/DMF, pode-se observar diferenças nas temperaturas de degradação, principalmente para o PBAT, que diminuiu em aproximadamente 16,52°C, indicando interação entre a NTZ e o polímero.

#### **4.3.4 – Análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC)**

Para avaliar as características dos filmes produzidos, foi realizada também a análise de calorimetria exploratória diferencial. Os resultados são apresentados na figura 14.

---

<sup>3</sup> Nitrofurazona.

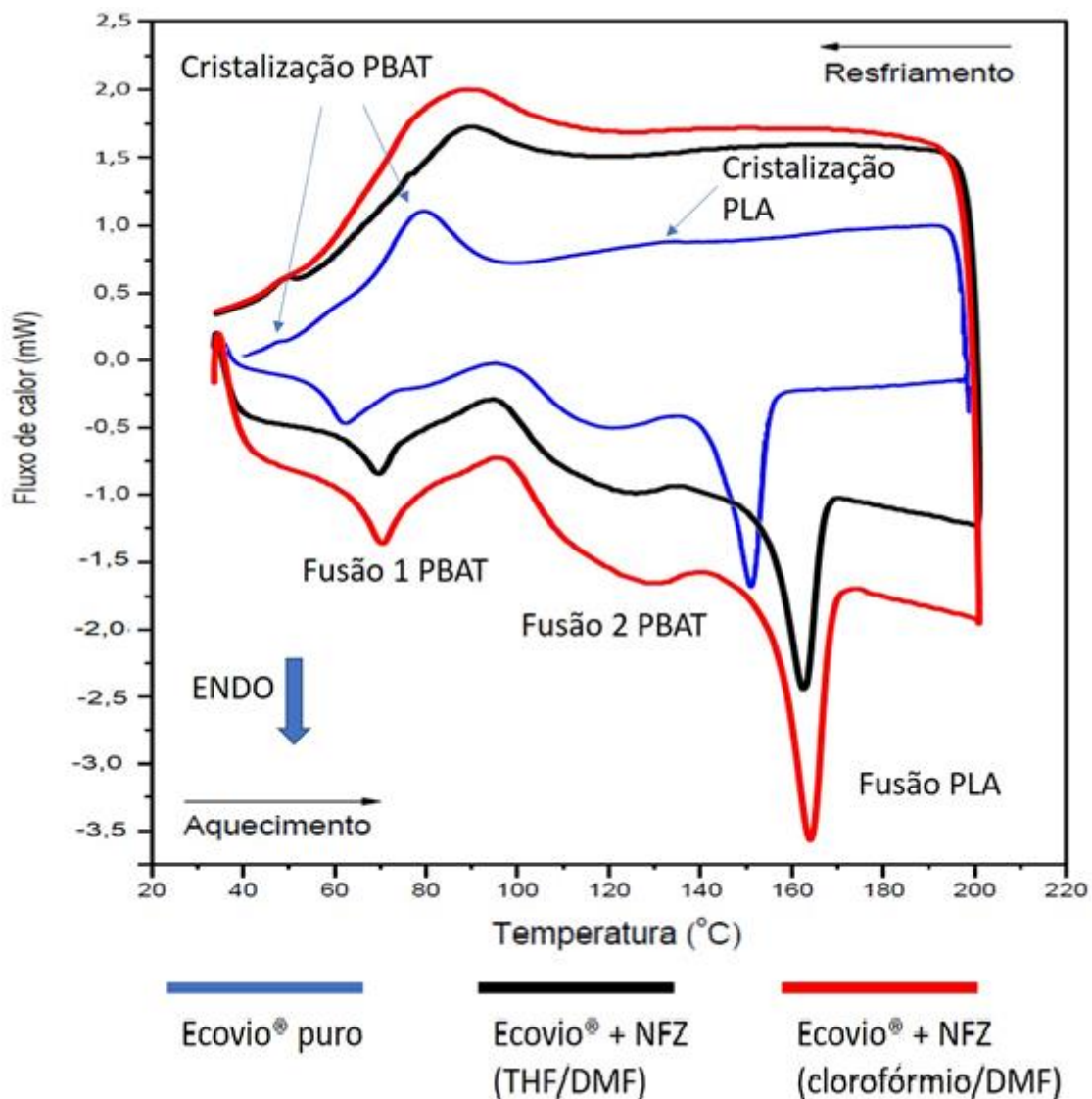


Figura 14 – Sobreposição de termogramas de calorimetria exploratória diferencial dos diferentes filmes. Faixa de 30 a 200 °C com taxa de aquecimento de 10 °C.min<sup>-1</sup> e de resfriamento de -10 °C.min<sup>-1</sup>. Atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL.min<sup>-1</sup>. Azul: Ecovio® puro. Preto: Ecovio® + nitrofurazona (THF/DMF). Vermelho: Ecovio® + nitrofurazona (clorofórmio/DMF).

Nota-se que para ambos solventes na presença de NTZ ocorreu um aumento na temperatura de fusão quando comparado com o ecovio® puro, além disso, na recristalização o fenômeno foi semelhante para ambos solventes na presença de NTZ, ou seja, ocorreu em um meio mais energético quando comparado com o ecovio® puro.

Desta forma, pode-se perceber que tanto fusão quanto cristalização ocorreram em maiores temperaturas quando na presença de nitrofurazona, indicando

que o fármaco e as fibras interagem quimicamente, corroborando com as análises de infravermelho e TGA.

#### **4.4 – VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO**

O método utilizado para determinação da concentração do fármaco liberado se deu por espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta e visível, desta forma, foi realizada a validação do mesmo a fim de atestar a confiabilidade dos resultados por ele gerados. Assim, garante-se que o perfil de liberação obtido é representativo.

Segundo a ANVISA, pela resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017, métodos de dissolução devem ser validados numa faixa de concentração que contemple -20% da menor concentração observada no perfil de dissolução a +20% da maior concentração observada. Porém, a menor concentração observada no perfil de dissolução é aproximadamente 10%, já que a liberação ocorre rapidamente. 20% abaixo disso leva a uma liberação de -10%. A mesma resolução prevê ainda que em alguns casos a validação deve avaliar o limite de quantificação do método (LoQ). Em geral, métodos de dissolução não necessitam de avaliação do LoQ, já que normalmente as soluções de trabalho estão em concentrações muito acima do limite de quantificação. Contudo, para o método utilizado no presente trabalho considerou-se necessária a verificação do LoQ do método. [65]

##### **4.4.1 – Linearidade**

A linearidade do método foi verificada para atestar que a resposta analítica é diretamente proporcional à concentração de nitrofurazona e varia de forma linear no intervalo de 0,25 a 12,5 mg.L<sup>-1</sup>. Tanto a RDC166/2017 quanto o Manual de Garantia da Qualidade Analítica (2011) do MAPA definem como necessário utilizar, no mínimo 5 níveis de concentração em triplicata. Para a análise da linearidade, 3 soluções estoque foram preparadas e, a partir delas, diluições foram realizadas para chegar nas concentrações 0,25; 0,50; 2,50; 4,50; 6,50; 8,50; 10,50 e 12,50 mg.L<sup>-1</sup> de nitrofurazona diluídas no meio de dissolução (tampão acetato 15 mmol.L<sup>-1</sup> pH 5,5). Desta forma, cada um dos 8 níveis foi preparado em triplicata. A figura 16 mostra o diagrama de dispersão, que permite visualizar uma possível associação entre as variáveis.

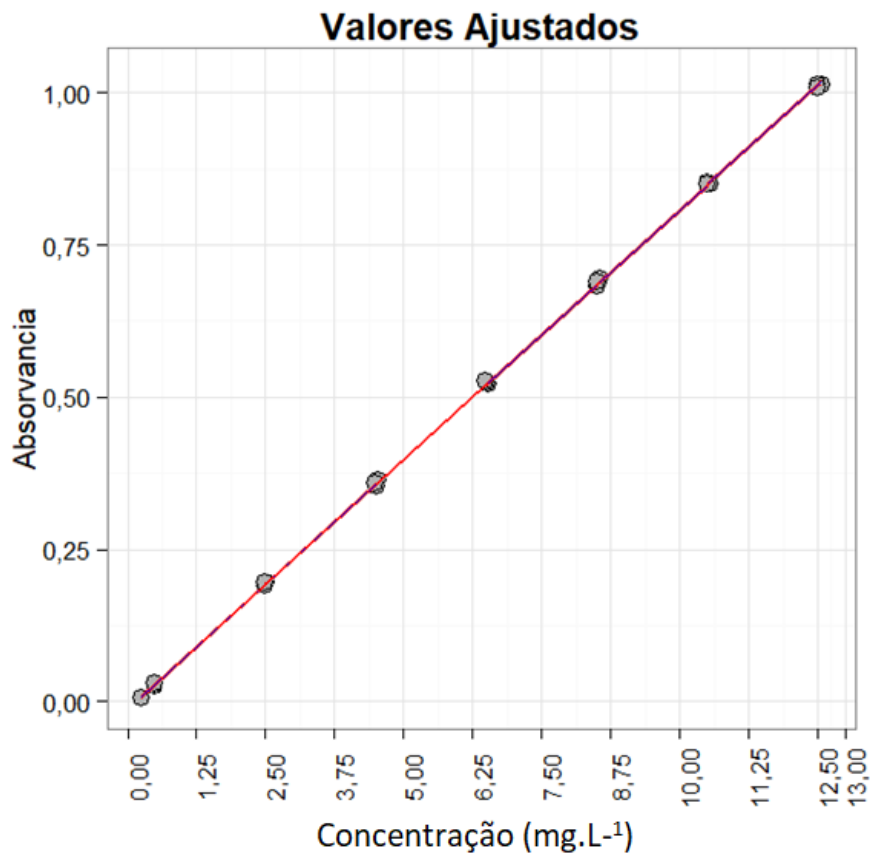


Figura 15 – Gráfico de correlação entre concentração e absorvância.

A partir dos dados apresentados acima foi realizada a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ordinários para estimação da equação de correlação entre a concentração e a absorvância. Após a regressão linear (Equação 3).

$$\text{Absorvância} = 0,0821 \times \text{Concentração} - 0,0125 \quad \text{Equação 3}$$

#### 4.4.1.1 – Teste do coeficiente angular

Para avaliar a significância do modelo linear foi utilizado o teste F da ANOVA (Tabela 7) com as seguintes hipóteses:

H<sub>0</sub>: coeficiente angular igual a zero;

H<sub>1</sub>: coeficiente angular diferente de zero.

Os resultados do teste do coeficiente angular são apresentados na tabela 7.



Tabela 7 – Resultado da ANOVA para avaliação da significância do coeficiente angular da curva de absorvância em função da concentração.

	<b>Graus de Liberdade</b>	<b>Estatística F</b>	<b>P-valor</b>
Rregressão	1	249908,8551	0
Resíduos	22		

Como P-valor (zero) do teste F da ANOVA é menor que 0,05 rejeita-se a hipótese nula ( $H_0$ ) com nível de significância de 5%. Logo, pode-se afirmar estatisticamente que existe correlação entre a concentração e a absorvância na faixa de concentração estudada.

#### **4.4.1.2 – Teste do intercepto (coeficiente linear)**

Quando o intercepto não é significativamente diferente de zero, a quantificação frente à curva de calibração é dispensável, podendo a quantificação ser feita frente a uma solução padrão. Nestes casos assume-se que a curva de calibração tem intercepto de valor zero. Geralmente o intercepto não passa pelo ponto zero, mas em alguns casos o intercepto não é significativamente diferente de zero, podendo ser negligenciado. Para avaliar o intercepto utilizou-se a estatística t de Student com as seguintes hipóteses:

$H_0$ : coeficiente linear (intercepto) igual a zero;

$H_1$ : coeficiente linear (intercepto) diferente de zero.

O teste t de Student leva a um P-valor igual a zero (menor que 0,05). Assim, rejeita-se a hipótese nula ao nível de significância de 5%. Logo, pode-se afirmar que o coeficiente linear é significativamente diferente de zero. Este resultado sugere que as quantificações de nitrofurazona devem ser realizadas frente a uma curva de calibração.

#### **4.4.1.3 – Avaliação do impacto do intercepto (coeficiente linear)**

Antes de descartar a possibilidade da quantificação por medição direta em comparação frente a uma solução padrão avaliou-se o impacto do coeficiente linear sobre os resultados em diferentes níveis de concentração de nitrofurazona. Para isso,

verificou-se o percentual que o intercepto vale para cada ponto da curva. Os resultados são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Avaliação do impacto do coeficiente linear sobre a quantificação de nitrofurazona ao longo do intervalo do método.

<b>Concentração (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Absorvância (UA)</b>	<b>Impacto do Coeficiente Linear (%)</b>
0,2515	0,007	178,703
0,2501	0,005	250,184
0,2498	0,006	208,487
0,5030	0,026	48,112
0,5002	0,028	44,676
0,4995	0,029	43,135
2,5150	0,196	6,382
2,5013	0,190	6,584
2,4975	0,195	6,415
4,5270	0,363	3,446
4,5022	0,354	3,534
4,4955	0,359	3,485
6,5390	0,521	2,401
6,5033	0,523	2,392
6,4935	0,527	2,374
8,5510	0,694	1,803
8,5043	0,681	1,837
8,4915	0,689	1,816
10,563	0,851	1,470
10,5052	0,852	1,468
10,4895	0,850	1,472
12,5750	1,014	1,234
12,5062	1,014	1,234
12,4875	1,008	1,241

Como pode ser observado, o impacto é baixo quando a concentração é alta. Mas quando a concentração é baixa a quantificação é muito prejudicada, em especial nas concentrações entre 0,25 e 0,50mg.L<sup>-1</sup>. Confirma-se então a importância e necessidade de utilizar-se uma curva de calibração para quantificação de nitrofurazona.

#### **4.4.1.4 – Coeficiente de correlação de Pearson (R<sup>2</sup>)**

Para um dado modelo (neste caso o modelo linear) o coeficiente de correlação de Pearson mede o grau de proporcionalidade entre a variável independente (concentração) e a variável resposta (absorvância). A partir do coeficiente de correlação pode-se avaliar se o modelo utilizado está bem ajustado ao conjunto de

dados (Tabela 9). Neste caso, o coeficiente serve para avaliar o quão linear é a correlação entre as variáveis.

Tabela 9 – Avaliação da qualidade do ajuste.

<b>Desvio Padrão dos Resíduos</b>	<b>Graus de Liberdade</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Coefficiente de Correlação</b>
0,0034	22	0,9999	0,9999

O coeficiente de correlação (0,9999) demonstra que existe uma correlação linear adequada, visto que o valor é maior que 0,99, como preconizado pela ANVISA e maior que 0,995, como preconizado pelo MAPA. [65 – 67]

#### 4.4.1.5 – Avaliação dos resíduos: Teste de Anderson-Darling

O resíduo de cada ponto é a diferença entre a absorvância medida experimentalmente e a absorvância estimada pela modelo utilizado para o conjunto de dados (estimado pela equação da reta da regressão linear). A distribuição dos resíduos foi avaliada acerca da normalidade pelo teste de Anderson-Darling com as seguintes hipóteses:

H<sub>0</sub>: a distribuição dos resíduos é normal;

H<sub>1</sub>: a distribuição dos resíduos não é normal.

A seguir é apresentado o resultado do teste de normalidade na tabela 9.

Tabela 10 – Resultados do teste de normalidade de resíduos de Anderson Darling.

<b>Teste</b>	<b>Estatística</b>	<b>P-valor</b>
Anderson-Darling	0,5283	0,1596

Como P-valor (0,1596) do teste de Anderson-Darling é maior que 0,05, não rejeita-se a hipótese de normalidade dos resíduos ao nível de significância de 5%. Uma distribuição normal indica que os erros analíticos são majoritariamente aleatórios e sem indícios de tendência.

#### 4.4.1.6 – Avaliação da homocedasticidade: Teste de Breusch Pagan

O teste de homogeneidade das variâncias (homocedasticidade) mostra se ao longo de todos os níveis de concentração as variâncias são equivalentes. Por este é

avaliado se a confiabilidade dos resultados é equivalente em todos os níveis dentro da faixa de trabalho do método ou se existe predisposição a tendência nos resultados.

Para avaliação da homocedasticidade foram utilizadas as seguintes hipóteses:

H<sub>0</sub>: todos os níveis possuem variâncias iguais;

H<sub>1</sub>: pelo menos um nível possui variância diferente.

A seguir é apresentado o resultado do teste de homocedasticidade na tabela 11.

Tabela 11 – Resultados do teste de homocedasticidade de Breusch Pagan.

Teste	Estatística	P-valor
Breusch Pagan	1,5999	0,2059

Como P-valor (0,2059) do Teste de Breusch Pagan é maior que 0,05, não rejeita-se a hipótese de igualdade das variâncias (homocedasticidade) ao nível de 5% de significância.

#### 4.4.1.7 – Avaliação de valores extremos (outliers)

Valores extremos, ou *outliers*, são valores considerados discrepantes do conjunto de dados. A detecção de valores extremos foi baseada nos resíduos padronizados ajustados. Para isso, cada resíduo foi determinado em relação à curva de ajuste. Em seguida, cada valor de resíduo foi dividido pelo desvio padrão de todos os resíduos. Assim, os resíduos puderam ser explícitos em termos de desvio padrão. Um valor é considerado um *outlier* quando o seu resíduo padronizado é maior que  $\pm 3$  desvios padrão. Este teste baseia-se no quanto cada ponto se difere do conjunto de dados. Os resultados estão expressos na tabela 12.

Tabela 12 – Resumo dos resultados da análise de pontos extremos.

<b>Observação</b>	<b>Concentração (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Resíduos (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Resíduos Padronizados</b>
1	0,2515	-0,0011	-0,3468
2	0,2501	-0,003	-0,9277
3	0,2498	-0,002	-0,6104
4	0,503	-0,0028	-0,8475
5	0,5002	-0,0005	-0,1648
6	0,4995	0,0005	0,1609
7	2,515	0,0021	0,6456
8	2,5013	-0,0027	-0,8177
9	2,4975	0,0026	0,7766
10	4,527	0,0041	1,207
11	4,5022	-0,0029	-0,864
12	4,4955	0,0026	0,7865
13	6,539	-0,003	-0,8983
14	6,5033	0,0019	0,5663
15	6,4935	0,0067	1,9911
16	8,551	0,0049	1,4634
17	8,5043	-0,0043	-1,2807
18	8,4915	0,0048	1,4275
19	10,563	-0,0032	-0,9771
20	10,5052	0,0025	0,7739
21	10,4895	0,0018	0,5579
22	12,575	-0,0053	-1,6641
23	12,5062	0,0004	0,1106
24	12,4875	-0,0041	-1,291

Como nenhum dos valores apresenta resultado de resíduo padronizado acima de 3, não foram encontrados pontos extremos. Logo, todos os valores são representativos do conjunto de dados do modelo linear.

A seguir é apresentado o gráfico de distribuição de resíduos para avaliação de tendência nos resíduos.

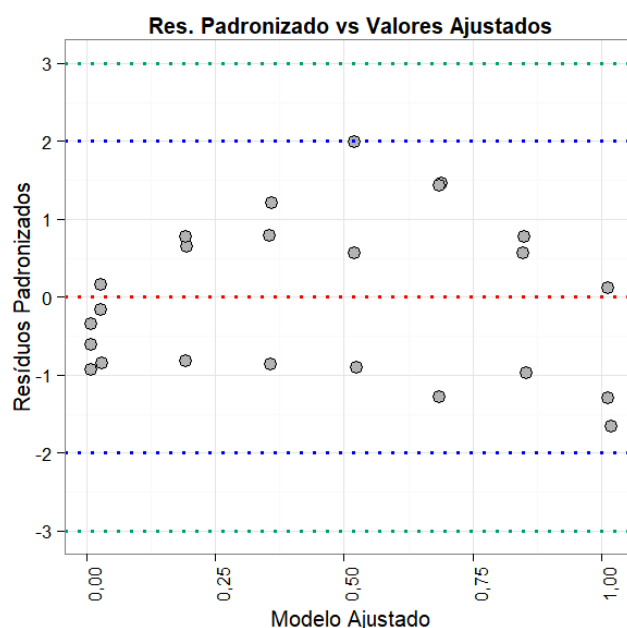


Figura 16 – Representação gráfica da distribuição de resíduos padronizados.

Como pôde-se perceber, os resíduos apresentam distribuição aleatória ao redor do eixo de concentrações, sendo livre de tendência nos resultados.

#### 4.4.1.8 – Avaliação de independência dos dados

O teste de independência entre os pontos mostra se existem valores dentro do conjunto de dados com tendência semelhante devido a algum tipo de dependência entre os pontos. A presença de pontos dependentes invalida a maioria dos testes utilizados na análise de linearidade, já que praticamente todos os testes estatísticos aplicados pressupõem independência entre os pontos. Para avaliação da independência entre os valores observados aplicou-se o Teste de Independência de Durbin-Watson utilizando as seguintes hipóteses:

$H_0$ : Observações são independentes;

$H_1$ : Observações não são independentes.

Os resultados são apresentados na tabela 13, a seguir.

Tabela 13 – Resultados do teste de independência de Durbin-Watson.

Teste	Estatística	P-valor
Durbin-Watson	2,2827	0,6855

Foi construído um gráfico (Figura 17) com a distribuição de resíduos apresentada na ordem das análises. A avaliação visual mostra se existe tendência a resíduos semelhantes em amostras preparadas ou analisadas em momentos próximos.

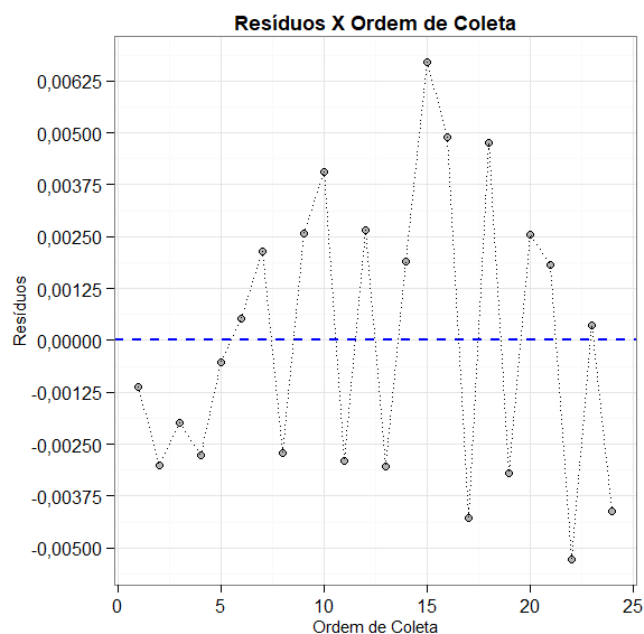


Figura 17 – Distribuição de resíduos na ordem de coleta das soluções analisadas.

Pode-se observar uma distribuição livre de tendência. Além disso, como o P-valor (0,6855) obtido no teste de Durbin-Watson é maior que 0,05, não rejeita-se a hipótese de independência das observações ao nível de significância de 5%.

Como todos os testes utilizados apresentaram resultados satisfatórios para a avaliação de linearidade do método para quantificação de nitrofurazona, pode-se dizer que o método apresenta linearidade satisfatória.

#### 4.4.2 – Limites de detecção e de quantificação (LoD e LoQ)

Para estimação dos limites de detecção e quantificação foram utilizadas as curvas de regressão linear preparadas para a avaliação da linearidade do método. O limite de detecção é a menor quantidade de analito que pode ser detectada em uma amostra. Já o limite de quantificação é a menor quantidade de analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão. Com base nas curvas de linearidade os resultados de LoD e LoQ foram estimados.

Tabela 14 – Estimação do limite de detecção e de quantificação baseados no coeficiente angular e no desvio padrão dos resíduos.

Dados	Valores
Desvio Padrão dos Resíduos	0,0034 AU
Coeficiente Angular	0,0821 AU.L.mg <sup>-1</sup>
Limite de Detecção	0,1385 mg.L <sup>-1</sup>
Limite de Quantificação	0,4197 mg.L <sup>-1</sup>

Apesar de ter sido utilizado o ponto com concentração 0,25 mg.L<sup>-1</sup> e esse valor estar dentro da faixa linear, a precisão neste ponto foi muito insatisfatória. Levando em consideração que as massas dos 3 pontos a 0,25 mg.L<sup>-1</sup> eram diferentes, considerou-se a razão entre a resposta analítica e a concentração dos 3 pontos da curva de linearidade. Com esses resultados determinou-se o desvio padrão relativo de 16,4%. Enquanto o segundo nível de concentração a 0,5 mg.L<sup>-1</sup> apresentou desvio padrão relativo de 5,9% e os demais pontos valores ainda menores. Desta forma, considerou-se que a partir de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> o método apresentou precisão satisfatória. Este nível foi então considerado o limite de quantificação, com precisão, linearidade e exatidão. Esta última confirmada no item abaixo.

#### 4.4.3 – Precisão e exatidão

A precisão foi avaliada em duas categorias (repetibilidade e reprodutibilidade), nos níveis equivalentes às liberações de 5, 65, 100 e 125% do fármaco presente no filme. Esses testes geram soluções nas concentrações nominais de 0,50: 6,5; 10,0 e 12,5 mg.L<sup>-1</sup>. A repetibilidade foi avaliada duas vezes, em dias diferentes. Cada nível de concentração foi avaliado individualmente em termos de desvio padrão relativo e de recuperação da nitrofurazona adicionada ao filme.

As especificações aceitáveis dos testes de exatidão foram definidas com base na AOAC *International*<sup>4</sup>, de 2016 que apresenta em seu apêndice F especificações de exatidão baseadas na concentração mássica do analito presente na amostra. Neste caso temos um analito na concentração de 2,5%, ou seja, fração mássica de 0,025; na ordem de 10<sup>-2</sup>. Logo, adotou-se uma especificação de exatidão é de 97 a 103%.

---

<sup>4</sup> AOAC *International*: Association of Official Analytical Chemists International; do ingles Associação Internacional dos Químicos Analíticos Oficiais.



Para repetibilidade a especificação foi calculada a partir da equação de Horwitz, também presente no mesmo documento [68].

$$PRSD_R = 2 C^{-0,15} \quad \text{Equação 4}$$

Onde,  $PRSD_R$  é a especificação de reprodutibilidade e  $C$  é a fração mássica do analito na amostra. Para uma fração mássica de 0,025, tem-se uma especificação máxima de 3,5% de desvio padrão relativo na reprodutibilidade. [68]

Seguindo ainda o conceito de Horwitz, tem-se que a especificação de repetibilidade é igual a 2/3 da especificação de reprodutibilidade. Desta forma, adotou-se a especificação máxima da repetibilidade como sendo 2,3%. [68]

A seguir encontram-se os resultados de precisão e exatidão nas tabelas 15 e 16.

Tabela 15 – Resultados da Precisão Primeiro dia e da exatidão.

massa polímero (g)	Massa NFZ (g)	massa de filme no dissolutor (g)	Dissolução		Quantificação	
			Concentração NFZ teórica (mg.L <sup>-1</sup> )	Concentração NFZ experimental (mg.L <sup>-1</sup> )	DPR (%)	Recuperação (%)
2,2617	0,0028	0,2054	0,50794	0,5112	1,4	100,64
		0,2049	0,50671	0,4979		98,26
		0,2061	0,50968	0,5012		98,34
2,2657	0,0371	0,2051	6,60866	6,6512	1,1	100,64
		0,2055	6,62155	6,5964		99,62
		0,2048	6,59899	6,5124		98,69
2,2513	0,0563	0,2055	10,0274	10,165	0,9	101,37
		0,2051	10,00791	10,0012		99,93
		0,2059	10,04695	10,0265		99,8
2,2586	0,0706	0,2053	12,44563	12,4021	0,5	99,65
		0,2061	12,49413	12,535		100,33
		0,205	12,42744	12,4521		100,2

Como pode-se perceber, todos os valores de recuperação estão dentro de 97 a 103% e todos os resultados de DPR estão  $\leq 2,3\%$ .

Tabela 16 – Resultados da Precisão Segundo dia e da exatidão.

			Dissolução		Quantificação	
massa polímero (g)	Massa NFZ (g)	massa de filme no dissolutor (g)	Concentração NFZ teórica (mg.L <sup>-1</sup> )	Concentração NFZ experimental (mg.L <sup>-1</sup> )	DPR (%)	Recuperação (%)
2,2617	0,0028	0,2054	0,50794	0,5112	1,6	100,64
		0,2049	0,50671	0,5074		100,14
		0,2061	0,50968	0,4956		97,24
2,2657	0,0371	0,2051	6,60866	6,5834	1,1	99,62
		0,2055	6,62155	6,5744		99,29
		0,2048	6,59899	6,4512		97,76
2,2513	0,0563	0,2055	10,02743	10,0889	0,5	100,61
		0,2051	10,00791	9,9976		99,9
		0,2059	10,04695	10,0555		100,09
2,2586	0,0706	0,2053	12,44563	12,3487	0,5	99,22
		0,2061	12,49413	12,4643		99,76
		0,205	12,42744	12,4131		99,88

Assim como na primeira precisão, a segunda também apresentou resultados de desvio padrão relativo abaixo de 2,3%. Quando avalia-se a recuperação, pode-se perceber que todos os valores estão dentro da faixa de 97 a 103%.

Aprovados os resultados em termos de recuperação e em desvio padrão relativo, procedeu-se com o Teste F para comparação de variâncias entre dois grupos. Para cada uma das 4 de concentração (0,5; 6,5; 10,0 e 12,5 mg.L<sup>-1</sup>) foi avaliado se nos diferentes dias as variâncias são equivalentes com as seguintes hipóteses:

H<sub>0</sub>: As variâncias no primeiro e segundo dias são equivalentes;

H<sub>1</sub>: As variâncias no primeiro e segundo dias não são equivalentes.

Os resultados de comparação das variâncias nos diferentes dias para todos os níveis de concentração são apresentados a seguir na tabela 17.

Tabela 17 – Resultado do teste F de comparação entre as variâncias para os diferentes dias e níveis de concentração.

<b>Concentrações</b>	<b>0,5 mg.L<sup>-1</sup></b>		<b>6,5 mg.L<sup>-1</sup></b>		<b>10,0 mg.L<sup>-1</sup></b>		<b>12,5 mg.L<sup>-1</sup></b>	
	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 2</b>	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 2</b>	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 2</b>	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 2</b>
<i>Média</i>	0,503	0,505	6,587	6,536	10,064	10,047	12,463	12,409
<i>Variância</i>	0,000	0,000	0,005	0,005	0,008	0,002	0,005	0,003
<i>Observações</i>	3	3	3	3	3	3	3	3
<i>gl</i>	2	2	2	2	2	2	2	2
<i>P(F&lt;=f) uni-caudal</i>	0,420		0,473		0,215		0,427	

Como para todas as concentrações o P-valor foi maior que 0,05, não rejeita-se a hipótese de que em todas as concentrações as variâncias são iguais nos dois dias diferentes, a um nível de significância de 5%. Sabendo que as variâncias são equivalentes, utilizou-se o teste T de Student para duas amostras com variâncias equivalentes. Assim, comparou-se as médias do primeiro e segundo dias para avaliar se as mesmas são equivalentes. A comparação foi feita para todos os níveis de concentração analisados com as seguintes hipóteses:

H<sub>0</sub>: As médias do primeiro e segundo dias são equivalentes;

H<sub>1</sub>: As médias do primeiro e segundo dias não são equivalentes.

Os resultados são apresentados na tabela 18, na página a seguir.

Tabela 18 – Resultado do teste T de comparação entre as médias dos diferentes dias e níveis de concentração.

<b>Concentrações</b>	<b>0,5 mg.L<sup>-1</sup></b>		<b>6,5 mg.L<sup>-1</sup></b>		<b>10,0 mg.L<sup>-1</sup></b>		<b>12,5 mg.L<sup>-1</sup></b>	
	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 2</b>	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 2</b>	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 2</b>	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 2</b>
<i>Média</i>	0,503	0,505	6,587	6,536	10,064	10,047	12,463	12,409
<i>Variância</i>	0,000	0,000	0,005	0,005	0,008	0,002	0,005	0,003
<i>Observações</i>	3	3	3	3	3	3	3	3
<i>Variância agrupada</i>	5,7E-05		5,2E-03		5,0E-03		3,9E-03	
<i>Hipótese da diferença de média</i>	0		0		0		0	
<i>gl</i>	4		4		4		4	
<i>P(T&lt;=t) uni-caudal</i>	0,422		0,220		0,392		0,174	

Como em todos os níveis P-valor é maior que 0,05, não rejeita-se a hipótese de que as médias são equivalente em todos os níveis de concentração, a um nível de significância de 5%.

#### 4.4.4 – Seletividade

A seletividade foi avaliada pelo efeito da única substância com potencial de interferir na análise: o polímero. Após zerar a absorvância (375 nm) do equipamento com solução tampão acetato/ácido acético 15 mmol.L<sup>-1</sup> e pH 5,5 (dilúente do método e meio de dissolução), uma amostra do mesmo tampão foi lida após 500 mL serem mantidos por 300 minutos no dissolutor a 32±0,5 °C, sob agitação a 75 rpm juntamente com 3 gramas do polímero ecovio®.

Seis alíquotas da solução foram retiradas do dissolutor e lidas no mesmo comprimento de onda do método (375 nm). Os resultados de cada leitura, bem como a média dos resultados, estão expressos na tabela 19, a seguir.

Tabela 19 – Resultado das leituras de verificação de impacto do polímero sobre a quantificação.

Leitura	Absorvância (UA)	Média (UA)
1	0	
2	0,001	
3	0	
4	0	0,000166667
5	0	
6	0	

Levando em consideração que a absorvância foi desprezível e que foi utilizada uma quantidade muito mais alta de polímero do que a possível quantidade presente, pôde-se constatar que o impacto do polímero na quantificação a 375 nm é desprezível. Desta forma, a seletividade do método foi considerada adequada para a quantificação de nitrofurazona liberada dos filmes.

#### 4.4.5 – Faixa de trabalho

A faixa de trabalho do método foi determinada como o intervalo de 0,5 a 12,5 mg.L<sup>-1</sup>; intervalo no qual o método apresentou linearidade, precisão, exatidão e seletividade adequadas para quantificação de nitrofurazona.

#### 4.5 – PERFIL DE LIBERAÇÃO DO FÁRMACO [909192]

Seguindo os parâmetros descritos no capítulo 3, o teste de dissolução foi realizado com os dois filmes obtidos por eletrofição (com THF e com clorofórmio), e o filme obtido por *casting*. A quantidade de material adicionado no dissolutor foi uma massa de filme que contivesse teoricamente 10 mg de nitrofurazona. Os resultados das análises em triplicata encontram-se na figura 18.

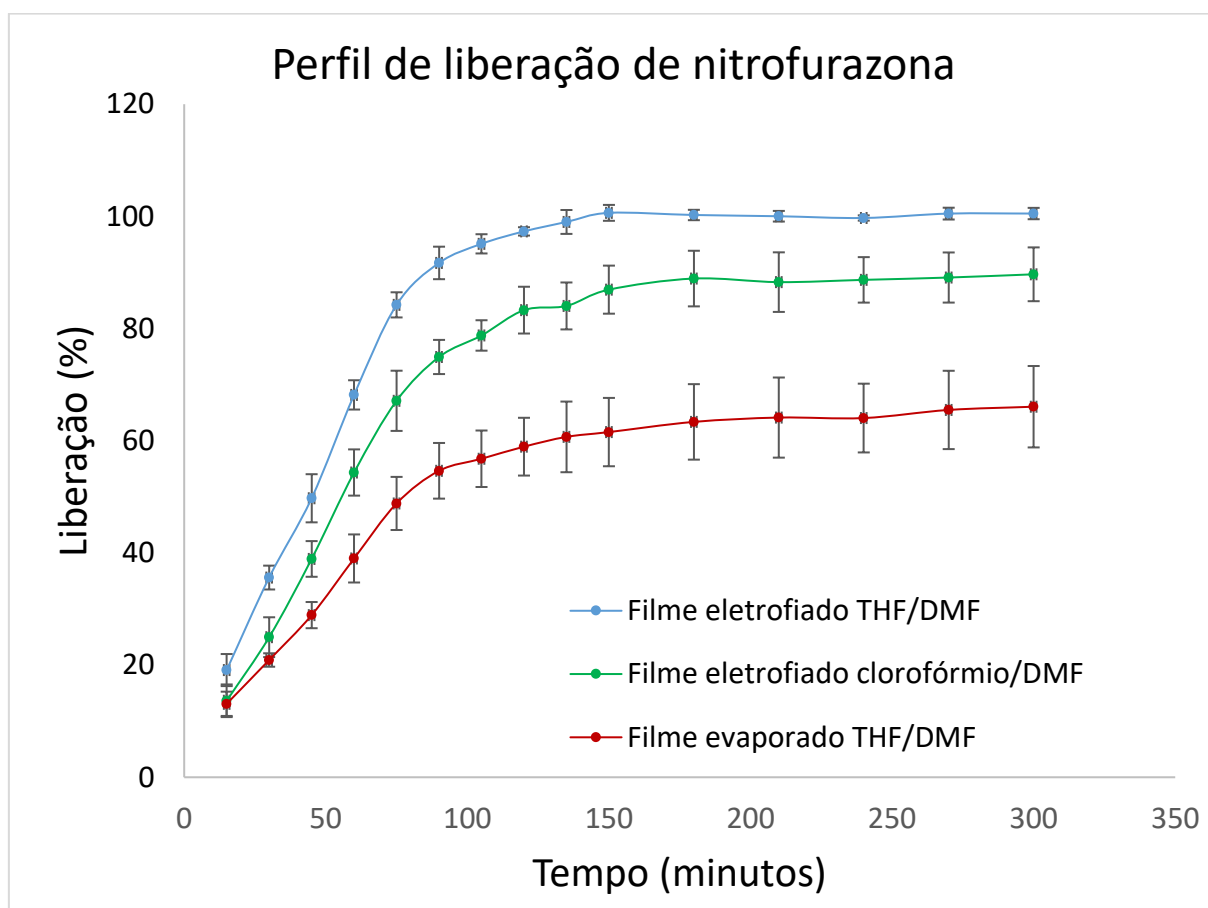


Figura 18 – Representação do teor de nitrofurazona liberado em função do tempo.

Pôde ser percebida uma maior variação entre as análises das triplicatas no filme preparado com clorofórmio/DMF, quando comparado com o filme de preparado

com THF/DMF filme preparado com clorofórmio/DMF. No caso do filme preparado por *casting* a variação foi ainda maior. Isso indica que os filmes produzidos por *casting* e por eletrofiação com clorofórmio/DMF apresentam menor homogeneidade na distribuição de nitrofurazona e, desta forma, podem apresentar maior diferença na quantidade de fármaco por filme a ser estudado. Já o filme produzido por eletrofiação com THF/DMF apresenta resultados bastante reprodutíveis, indicando homogeneidade da concentração de nitrofurazona ao longo filme. Deve ser considerada a baixa solubilidade do fármaco em clorofórmio. Em uma solução contendo clorofórmio, polímero e fármaco, este deverá interagir melhor com o polímero, favorecendo uma alta concentração do fármaco no interior das fibras poliméricas, levando a uma baixa disponibilidade para ser liberado no meio de dissolução.

Em relação ao filme produzido por *casting*, Ghosal *et al* (2018) compararam propriedades de membranas produzidas por *casting* e por eletrofiação, constatando pouca maleabilidade dos filmes por *casting*, assim como foi constatado aqui. Este já seria um motivo para inviabilizar a utilização do filme por *casting* em ferimentos. Mas, além disso, o filme produzido apresentou um perfil de liberação com alta variabilidade em função da heterogeneidade. [69].

Outro aspecto importante é que o filme eletrofiado com THF/DMF liberou 100% da nitrofurazona utilizada presente no filme. Enquanto os outros filmes geraram soluções com concentração menor que a prevista para a análise de dissolução. Isso pode ocorrer devido a mudança na interação entre o polímero e a NTZ, que pode ter sido ocasionada pela troca de solvente. Quanto ao filme obtido por *casting*, pode-se observar uma liberação de aproximadamente 60% e isso pode ser devido ao tamanho de partícula do NTZ, que com a eletrofiação tende a ser menor, aumentando a solubilidade do mesmo em solução. Além disso, todos filmes apresentaram um tempo de aproximadamente 90 min para liberação completa do fármaco disponível, mostrando características semelhantes na liberação.

Contudo, mesmo que parte da nitrofurazona não tenha sido liberada para o meio e tenha ficado retida nos filmes, isso não inviabiliza a utilização dos mesmos, já que bastaria corrigir a concentração para uma concentração maior de nitrofurazona, sabendo que nem todo o conteúdo é liberado para o meio.

A diferença realmente relevante nos perfis de dissolução está relacionada à reprodutibilidade do perfil. Enquanto o filme eletrofiado com THF/DMF reproduziu bem

os resultados, o filme produzido por evaporação e o filme eletrofiado com clorofórmio/DMF não reproduzem bem o perfil de dissolução.

Outro fator a ser considerado e chama a atenção é a possibilidade de solvente residual permanecer no filme após a secagem. Por isso, é recomendado realizar análises para verificação do teor de solventes residuais no filme. Felizmente a especificação máxima de THF é 720 ppm: 12 vezes maior que a especificação de clorofórmio (60 ppm). O que corrobora para o maior potencial da produção utilizando THF [70].

## CAPÍTULO 6 CONCLUSÕES

Os filmes produzidos por eletrofiação de PBTA/PLA (ecovio®) incorporados à nitrofurazona mostraram alto potencial na utilização como um curativo capaz de liberar o fármaco na área lesionada, visto que houve liberação do fármaco no teste de liberação.

Pôde-se constatar que os filmes gerados por ecovio®, nitrofurazona, THF e DMF mostraram-se viáveis para testes *in vivo*, uma vez que testes *in-vitro* apresentaram bons resultados.

O teste de liberação do fármaco apresentou um perfil de liberação completa em menos de 200 minutos para o filme produzido com THF/DMF, de forma reprodutível, enquanto o filme produzido com clorofórmio/DMF não liberou a quantidade prevista de nitrofurazona, além de ter apresentado resultados pouco reprodutíveis.

O método utilizado para a quantificação do fármaco foi validado, desta forma há confiança nos resultados obtidos a partir do método em questão, que apresentou linearidade, precisão, exatidão, seletividade e limite de quantificação satisfatórios no intervalo de trabalho do método.

Diversas análises foram realizadas com os filmes produzidos e deram indícios de que o fármaco interage com as fibras de PBAT/PLA, tanto os filmes produzidos com solvente THF/DMF quanto os produzidos com solvente clorofórmio/DMF. Este último apresentou maior heterogeneidade na liberação do fármaco, quando comparado ao filme produzido com THF/DMF. Além disso, o filme produzido com os solventes THF/DMF liberou praticamente 100% da nitrofurazona em aproximadamente 150 minutos, sendo que o filme produzido com clorofórmio/DMF liberou cerca de 90% de toda a nitrofurazona prevista em 300 minutos.

Há indícios de que a interação entre nitrofurazona com o PBAT e o PLA ocorra principalmente entre os grupamentos hidroxila e carbonila do polímero e os grupamentos polares da nitrofurazona.

Considerando-se que houve alterações em propriedades físico-químicas, pode-se afirmar que houve produção de nanofibras.



## REFERÊNCIAS

1. MONCRIEF, J. A.; LINDBERG R. B.; SWITZER, W. E.; PRUITT JR, B. A. *Use of topical antibacterial therapy in the treatment of the burn wound*. Arch Surg. 1966; 92(4):558-65.
2. MONAFO W.; FREEDMAN, B. *Topical therapy for burns*. Surg Clin North Am. 1987; 67(1):133-45.
3. *The Foundation Of Polymer Science By Hermann Staudinger (1881-1965)* - Freiburg, Baden-Württemberg. 1999.
4. ISHIHARA, M.; NAKANISHI, K.; ONO, K.; SATO, M.; KIKUCHI, M.; SAITO, Y.; YURA, H.; MATSUI, T.; HATTORI, H.; UENOYAMA, M. and KURITA, A.; *Biomaterials*, 2002, 23, 833.
5. OVINGTON, L. G.; Clin. Dermatol., 2007, 25, 33.
6. FURACIN: nitrofurazone. Fernando Costa Oliveira. Anápolis: Cosmed Indústria de Cosméticos e Medicamentos S.A - Mantecorp Farmasa. 2015. Bula de remédio.
7. SENSIDERME: nitrofurazone. Marco Aurélio Limirio G. Filho. Anápolis: Brainfarma Indústria Química e Farmacêutica S.A. 2015. Bula de remédio.
8. KIM, J. O.; PARK, J. K.; KIM, J. H.; JIN, S. G.; YONG, C. S.; LI, D. X.; CHOI, J. Y.; WOO, J. S.; YOO, B. K.; LYOO, W. S.; KIMA, J.; CHOI, H. *Development of polyvinyl alcohol–sodium alginate gel-matrix-based wound dressing system containing nitrofurazone*. International Journal of Pharmaceutics 359: 79–86, 2008.
9. COELHO, S. L. *Desenvolvimento e caracterização de hidrogel para liberação de nitrofurazone*, Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba. Sorocaba, Brasil, 2012
10. WEBBER, C.E.; GLANGES, E.; CRENSHAW, C.A. *Treatment of second degree burns: nitrofurazone, povidone-iodine, and sulfadiazine*. Journal of the American College of Emergency Physicians, 6. 1977. p. 486-490.
11. VALLEJO, R. B. B.; IGLESIAS, M. E. L.; CERVERA, L. A. *et al. Efficacy of intraoperative surgical irrigation with polyhexanide and nitrofurazone in reducing bacterial load after nail removal surgery*. American Academy of Dermatology, Inc. Madri. 2010.

12. KILONZO, M.; VALE, L.; PICKARD, R. *et al.* *Cost Effectiveness of Antimicrobial Catheters for Adults Requiring Short-term Catheterisation in Hospital.* *European Urology* 66. 2014. 615-618.
13. IRANI, P. S.; VARAJE, S. *Comparison of the Effect of Aloe Vera Gel and Nitrofurazone 2% on Epithelialization and Granulation Tissue Formation Regarding Superficial Second-Degree Burns.* *Iranian Journal of Medical Sciences.* Iran. 2016;41(3 Suppl):S3.
14. Chemical Database-Molbase – [http://www.molbase.com/en/search.html?search\\_keyword=59-87-0&utm\\_source=google&utm\\_medium=cpc&utm\\_term=cas%2059%2087%200&gclid=CjwKCAjw9-HZBRAwEiwAGw0QcaYMxYsj46FZ199mxcptsXTKZRB9ncvizpc746kMdneAsWqH6vo\\_IRoCnD8QAvD\\_BwE](http://www.molbase.com/en/search.html?search_keyword=59-87-0&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_term=cas%2059%2087%200&gclid=CjwKCAjw9-HZBRAwEiwAGw0QcaYMxYsj46FZ199mxcptsXTKZRB9ncvizpc746kMdneAsWqH6vo_IRoCnD8QAvD_BwE). Acessado em 12/03/2018.
15. ChemicalBook – [http://www.chemicalbook.com/CASEN\\_59-87-0.htm](http://www.chemicalbook.com/CASEN_59-87-0.htm). Acessado em 12/03/2018.
16. National Institute of Standards and Technology (NIST). U.S. Department of Commerce. <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=59-87-0&Units=SI>. Acessado em 12/03/2018.
17. Manual de Equivalência e Correção. Conselho Federal de Farmácia. Brasília, 2017. 72p.
18. CAMEO Chemicals – <https://cameochemicals.noaa.gov/chemical/20774>. Acessado em 12/03/2018.
19. OSOL, A. *Remington's Pharmaceutical Sciences. 16th ed. Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Co., 1980., p. 1105*
20. *IARC. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Geneva: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, 1972-PRESENT. (Multivolume work). p. V7 172. 1974. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>. Acessado 12/03/2018.*
21. *Sunshine, I. CRC Handbook of Analytical Toxicology. Cleveland: The Chemical Rubber Co., 1969., p. 80*
22. ÖZKAYA, E.; KILIÇ, S. *Polyethylene glycol as marker for nitrofurazone allergy: 20 years of experience from Turkey.* Department of Dermatology and Venereology. Istanbul. 2017.

23. STAUDINGER, H. (1920). *Über Polymerisation*. Ber. Deut. Chem. Ges. 53 (6): 1073. 1920.
24. LOPESA, M.; JARDINIB, A. L., MACIEL FILHO, R. *Poly (lactic acid) production for tissue engineering applications*. Procedia Engineering 42 ( 2012 ) 1402 – 1413.
25. Norma ABNT NBR 15448-1. *Embalagens plásticas degradáveis e/ou de fontes renováveis*. 2008.
26. GUPTA, B.; REVAGADE, N.; HILBORN, J. *Poly(lactic acid) fiber: an overview*. Prog Polym Sci 2007;34:455–482
27. LIAN, H.; MENG, Z. *Melt electrospinning of daunorubicin hydrochloride-loaded poly ( $\epsilon$ -caprolactone) fibrous membrane for tumor therapy*. Bioactive Materials. 2017; 1-5.
28. YUN-XUAN, W.; YU-JUAN, J.; QING-YANG, M.; LEI, W.; MIN, Z.; YU-ZHONG, W. *Biodegradation behavior of poly(butylene adipate-coterephthalate) (PBAT), poly(lactic acid) (PLA), and their blend under soil conditions*. Polymer Testing 32 2013; 918–926.
29. KUMAR, M.; MOTHANTY, S.; NAYAK, S.K.; RAHAIL PARVAIZ, .M. *Effect of glycidyl methacrylate (GMA) on the thermal, mechanical and morphological property of biodegradable PLA/PBAT blend and its nanocomposites*. Bioresour Technol. 2010; 101(21):840615.
30. BARRAZA, R.; SUAREZ,A., GÓMEZ, L.; GONZÁLEZ, J.; IGLESIAS, A.; GRAZIANO, R. *Designing a Low Cost Electrospinning Device for Practical Learning in a Bioengineering Biomaterials Course*. Nova Técnica. Vol. 37, No. 1, 2016, pp. 27-36.
31. DERSCH, R.; STEINHART, M.; BOUDRIOT, U.; GREINER, A.; WENDORFF, J. H. *Nanoprocessing of polymers: applications in medicine, sensors, catalysis, photonics*. Polym. Adv. Technol. 2005; 16: 276–282.
32. ARUAN, N. M.; SRIYANTI, I.; EDIKRESHA, D.; SUCIATI, T.; MUNIR, M. M.; KHAIRURRIJAL. *Polyvinyl Alcohol/Soursop Leaves Extract Composite Nanofibers Synthesized Using Electrospinning Technique and Their Potential as Antibacterial Wound Dressing*. Procedia Engineering 170 ( 2017 ) 31 – 35.
33. PATERSON, W. F. - Arch. Dis. Child., 79, p.323, 1988.)
34. REKSAMUNANDARA, R. P.; EDIKRESNHAA, D.; MUNIRA, M. M.; DAMAYANTIC, S.; KHAIRURRIJAL. *Encapsulation of  $\beta$ -carotene in*

- poly(vinylpyrrolidone) (PVP) by electrospinning technique. Procedia Engineering 170 ( 2017 ) 19 – 23.*
35. SAALLAH, M.; NAZLI, I.; WULED, L., MOKHTAR, M. N.; ABU BAKAR, N; GENA, M. *Immobilisation of cyclodextrin glucanotransferase into polyvinyl alcohol (PVA) nanofibres via electrospinning. Biotechnology Reports 10 (2016) 44–48.*
  36. WONGKANYA, R.; CHUYSINUAN, P.; PENGSIK, C.; NOOEAI, P. *Electrospinning of Alginate/Soy Protein Isolated Nanofibers and Their Release Characteristics for Biomedical Applications. Journal of Science: Advanced Materials and Devices. 2017.*
  37. BAE, H.-S.; HAIDER, A.; SELIM, K. M. K.; KANG, D.-Y.; KIM, E.-J.; KANG, I.-K. *Fabrication of highly porous PMMA electrospun fibers and their application in the removal of phenol and iodine. J. Polym. Res. (2013). 20 (7), 1–7.*
  38. HAIDER, S., HAIDER, A., AHMED, A., UD-DIN KHAN, S., ALMASRY, W.A., SARFARZ, M. *Electrospun Nanofibers Affinity Membranes for Water Hazards remediation. vol. 44. Nova Science Publishers, (2015) pp. 81–111.*
  39. PILLAY, V., DOTT, C., CHOONARA, Y.E., TYAGI, C., TOMAR, L., KUMAR, P., DU TOIT, L.C., NDESENDO, V.M.K. *A review of the effect of processing variables on the fabrication of electrospun nanofibers for drug delivery applications. J. Nanomater. 2013, 22.*
  40. DUQUE SÁNCHEZ, L.; RODRIGUEZ, L.; LÓPEZ, M. *Electrospinning: la era de las nanofibras. Revista Iberoamericana de Polímeros. Vol 14 (1). 2013.*
  41. KENAWY, E. R.; BOWLIN, G. L.; MANSFIELD, K.; LAYMAN, J.; SIMPSON, D. G.; SANDERS, E. H.; WNEK, G. E. *Release of tetracycline hydrochloride from electrospun poly(ethylene-co-vinylacetate), poly(lactic acid), and a blend. Journal of Controlled Release 81 (2002) 57–64.*
  42. DEITZEL, J. M.; KLEINMEYER, J.; HARRIS, D.; BECK TAN, N. C. *The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. Polymer 42 (2001) 261–272.*
  43. HAIDER, A.; HAIDER, S.; KANG, I. K. *A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. Arabian Journal of Chemistry; 2015.*

44. KULKARNI, A.; BAMBOLE, V. A.; MAHANWAR, P. A. *Electrospinning of polymers, their modeling and applications*. *polymer-plastics technology and engineering*, 49: 427–441, 2010.
45. SILL, T. J.; VON RECUM, H. A. *Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering*. *Biomaterials* 29 (13); 2008. 1989– 2006.
46. LANNUTTI, J.; RENEKER, D.; MA, T., TOMASKO, D.; FARSON, D. *Electrospinning for tissue engineering scaffolds*. *Mater. Sci. Eng., C* 27 (3). 2007 504–509.
47. MEGELSKI, S.; STEPHENS, J. S.; BRUCE CHASE, D.; RABOLT, J.F. *Micro- and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers*. *Macromolecules*. 2002. 35 (22), 8456–8466
48. MATABOLA, K.P.; MOUTLOALI, R.M. *The influence of electrospinning parameters on the morphology and diameter of poly (vinylidene fluoride) nanofibers-effect of sodium chloride*. *J. Mater. Sci.* 48 (16), 5475.
49. HOFFMAN, A. S. *The origins and evolution of “controlled” drug delivery systems*. *Journal of Controlled Release* 132 (2008) 153–163.
50. SCHMITT, E.; POLISTINA, R. *Surgical sutures*, US Patent 3,297,033, Jan. 10, 1967.
51. CUI, W.; LI, X.; XIE C.; ZHUANG, H.; ZHOU, S.; WENG, J. *Hydroxyapatite nucleation and growth mechanism on electrospun fibers functionalized with different chemical groups and their combinations*. *Biomaterials* 2010; 31: 4620–4629.
52. YOO, H.S.; KIM, T.G.; PARK, T.G. *Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery*. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61 (2009) 1033–1042.
53. CHEN, J.L.; CHU, B.; HSIAO, B.S. *Mineralization of hydroxyapatite in electrospun nanofibrous poly(L-lactic acid) scaffolds*, *J. Biomed. Mater. Res. A* 79A (2006) 307–317.
54. KOH, H.S.; YONG, T.; CHAN, C.K.; RAMAKRISHNA, S. *Enhancement of neurite outgrowth using nano-structured scaffolds coupled with laminin*, *Biomaterials* 29 (2008) 3574–3582.
55. MA, Z.W.; HE, W.; YONG, T.; RAMAKRISHNA, S. *Grafting of gelatin on electrospun poly (caprolactone) nanofibers to improve endothelial cell*

- spreading and proliferation and to control cell orientation, Tissue Eng.* 11 (2005) 1149–1158.
56. MA, Z. W.; KOTAKI, M.; YONG, T.; HE, W.; RAMAKRISHNA, S. *Surface engineering of electrospun polyethylene terephthalate (PET) nanofibers towards development of a new material for blood vessel engineering, Biomaterials* 26 (2005) 2527–2536.
  57. PRABHAKARAN, M. P.; VENUGOPAL, J.; CHAN, C. K. RAMAKRISHNA, S. *Surface modified electrospun nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. Nanotechnology* 19 (2008) 455102
  58. SPERLING, L. E.; REIS, K. P.; POZZOBON, L. G.; GIRARDI, C. S. PRANKE, P. *Influence of random and oriented electrospun fibrous poly(lactic-co-glycolic acid) scaffolds on neural differentiation of mouse embryonic stem cells. Journal of Biomedical Materials Research: Part A.* 2017.
  59. TANSAZ, S.; LIVERANI, L.; VESTER, L.; BOCCACCINI, A. R. *Soy protein meets bioactive glass: electrospun composite fibers for tissue engineering applications. Materials Letters* (2017).
  60. ZHU, Y. W.; LEONG, M. F. ONG, W. F.; CHAN-PARK, M. B.; CHIAN, K. S. *Esophageal epithelium regeneration on fibronectin grafted poly(l-lactide-co-caprolactone) (PLLCL) nanofiber scaffold. Biomaterials* 28 (2007) 861–868.
  61. FURNISS, B. S.; HANNAFORD, A. J.; SMITH, P. W. G. *et al. Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, 5th ed., Longman Scientific & Technical: Singapura, 1989
  62. Guia de referência de dissolução. Agilent Technologies, Inc. 2010
  63. United States Pharmacopeia. Capítulo geral 724. 2017.
  64. Portal Action. Estatcamp. Disponível em: <http://www.portalaction.com.br/analise-de-regressao/analise-dos-residuos>. Acessado em: 05/07/2018.
  65. BRASIL ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, 24/07/2017.
  66. BRASIL ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Guia para validação de métodos analíticos* - Julho, 2017.
  67. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Manual de Garantia da Qualidade Analítica, Brasília, 2011.

68. Guidelines for Standard Method Performance Requirements. AOAC International. Appendix F. 2016.
69. GHOSAL, K. Et al. *Electrospinning over Solvent Casting: Tuning of Mechanical Properties of Membranes*. Scientific Reports. 2018.
70. ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Impurities: Guideline for Residual Solvents – ICH Q3C(R6). Versão 4. 2016.
71. TIWARI, S.; TZEZANAB, R.; ZUSSMANB, E.; VENKATRAMANA, S. S. *Optimizing partition-controlled drug release from electrospun core–shell fibers*. International Journal of Pharmaceutics 392 (2010) 209–217.
72. SIETWED, M. et al. *Guidelines for Dissolution/In Vitro Release Testing of Novel/Special Dosage Forms*. P. 6-10. 2003
73. OLIVEIRA, B. C.; *Estudo da degradação in vitro de polímeros a base de poli(butileno adipato co tereftalato) processados por impressão 3d e moldagem por injeção*. Escola de Engenharia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2017.
74. HARWOOD, L. M.; CLARIDGE, T. D. W.; *Introduction to Organic Spectroscopy*, 1<sup>st</sup> ed., Oxford Science Publication: Great Britain, 2000.
75. SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. 3 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Dois S.A., pp. 1-10, 65-73, 1979.
76. PAVIA, D. L., LAMPMAN, G. M., KRIZ, G. S., VYVYAN, J. R., *Introdução à Espectroscopia*, Cengage Learning, 2010.
77. TABELA DE VALORES DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO PARA COMPOSTOS ORGÂNICOS. E-disciplinas. Universidade de São Paulo. Disponível em: [https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4218701/mod\\_resource/content/1/TABELA%20DE%20VALORES%20DE%20ABSOR%C3%87%C3%83O%20NO%20INFRAVERMELHO.pdf](https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4218701/mod_resource/content/1/TABELA%20DE%20VALORES%20DE%20ABSOR%C3%87%C3%83O%20NO%20INFRAVERMELHO.pdf) Acessado em: 10/07/2018.
78. CHOURASIA, M. K. & JAIN, S. K. - J. Pharm. Pharm. Sci., 6, p.33 (2003).
79. DZENIS, Y. A. *Spinning Continuous Fibers for Nanotechnology*. Faculty Publications from the Department of Engineering Mechanics. University of Nebraska 2004.

80. SHI, X.; ZHOU, W.; MA, D., MA, Q., BRIDGES, D.; MA, Y.; HU, A. *Electrospinning of Nanofibers and Their Applications for Energy Devices*. Journal of Nanomaterials. Volume 2015, Article ID 140716, 20 p.
81. M. ISHIHARA, M.; K. NAKANISHI, K. ONO, M. SATO, M. KIKUCHI, Y. SAITO, H. YURA, T. MATSUI, H. HATTORI, M. Uenoyama and A. Kurita, Biomaterials, 2002, 23, 833.
82. L. G. OVERTON, Clin. Dermatol., 2007, 25, 33.
83. SINGH, A. V.; GADE, W. N.; VATS, T.; LENARDI, C.; MILANI, P. Curr. Nanosci., 2010, 6, 577.
84. ABRIGO, M.; McARTHUR, S. L.; KINGSHOTT, P. Macromol. Biosci., 2014, 14, 772.
85. MOFOKENG, J. P.; LUYT, A. S.; TÁBI, T.; KOVÁCS, J. *Comparison of injection moulded, natural fibre-reinforced composites with PP and PLA as matrices*. Journal of Thermoplastic Composite Materials. 2011.
86. OLIVEIRA, B. C. *Estudo da degradação in vitro de polímeros a base de poli(butileno adipato co tereftalato) processados por impressão 3d e moldagem por injeção*. 2017.
87. SILVA, R. S. *Termo-estabilização da blenda PLA/PBAT*. Universidade Presbiteriana Mackenzie. São Paulo. 2016.
88. AL-ITRY, R.; LAMNAWAR, K; MAAZOUZ, A. *Improvement of thermal stability, rheological and mechanical properties of PLA, PBAT and their blends by reactive extrusion with functionalized epoxy*. Polymer Degradation and Stability. 2012.
89. KUMAR, M.; MOHANTY, S.; NAYAK, S. K.; RAHAIL PARVAIZ, M. *Effect of glycidyl methacrylate (GMA) on the thermal mechanical and morphological property of biodegradable PLA/PBAT blend and its nanocomposites*. Bioresour Technology. V. 101. 2010.
90. USP. United States Pharmacopeial Convention. USP39-NF34. *General Chapters: The dissolution procedure: development and validation*. Rockville, MD: USP; p. 1202- 1222, 2016.
91. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira, vol. 1, 5ª Ed. 5.1.5 Teste de dissolução, Brasília, DF, 2010.



92. SCHEUBEL, E. *Predictive in vitro dissolution tools: application during formulation development*. 201 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Farmácia, Universidade de Clermont-Ferrand, França, 2010.