



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

**CURATIVOS PRODUZIDOS A PARTIR DE NANOFIBRAS DE PVA
CONTENDO CLORANFENICOL**

GABRIEL NARDI FRAGA

Toledo – PR, 2022



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

CURATIVOS PRODUZIDOS A PARTIR DE NANOFIBRAS DE PVA
CONTENDO CLORANFENICOL

GABRIEL NARDI FRAGA

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

Orientador(a): DOUGLAS CARDOSO DRAGUNSKI

Toledo – PR
Ano 2022

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

Fraga, Gabriel Nardi
Curativos produzidos a partir de nanofibras de PVA
contendo cloranfenicol / Gabriel Nardi Fraga; orientador
Douglas Cardoso Dragunski. -- Toledo, 2022.
81 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Toledo) --
Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de
Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em
Química, 2022.

1. Eletrofiação. 2. Álcool poli(vinílico). 3. Reticulação.
4. Cloranfenicol. I. Dragunski, Douglas Cardoso, orient. II.
Título.

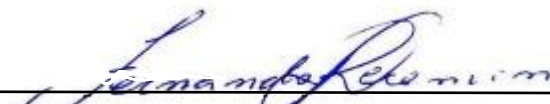
GABRIEL NARDI FRAGA

“Curativos produzidos a partir de nanofibras de PVA contendo cloranfenicol”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração em Química, APROVADO pela seguinte banca examinadora:



Orientador – Prof. Dr. Douglas Cardoso Dragunski (unioeste)



Prof. Dr. Fernando Reinaldo Scremim (unioeste)



Prof. Dr. Eduardo Radovanovic (UEM)

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus, por ter permitido tudo de bom que ocorreu durante esse período. Por ter me dado saúde e força para manter a cabeça erguida e seguir lutando pelos meus objetivos;

Agradeço ao meu pai por garantir que nada me falta-se. A minha mãe por ser peça fundamental sempre me incentivo e apoiando, por tantas vezes que teve que escutar horas de minhas reclamações e mesmo assim nunca desistiu de sonhar comigo;

Aos meus avôs Reni e Pierina, que sempre souberam que o estudo e o aprendizado é o caminho correto a se seguir. Lutaram para que todos seus filhos se formassem na universidade, e junto transmitiram aos seus filhos o valor do estudo e do aprendizado que depois seriam cobrados de mim pela minha mãe;

Dedico esse trabalho ao meio tio Marcos, que infelizmente não está mais aqui para comemorar essa conquista comigo. Um homem que me passou diversos ensinamentos e valores, que ajudaram a moldar quem eu sou hoje;

Aos meus amigos que fizeram parte dessa história me tirando do trabalho exaustivo e proporcionando momento de paz e alegria em tempos difíceis;

Agradeço também a Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQUI), ao Grupo Interdisciplinar de Pesquisa em Fotoquímica e Eletroquímica Ambiental (GIPeFEA). Também a Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) que foi minha casa nesses últimos anos.

Por fim agradeço ao meu orientado Douglas Dragunski, ele que foi mais que um orientador, mas também um amigo. Aceitou a árdua tarefa de me acompanhar nesta jornada, buscou sempre o melhor de mim. Foi e ainda é peça fundamental na minha formação.

“O homem comum é exigente com os outros; o homem superior é exigente consigo mesmo”.

(Marcus Aurelius)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA	6
2	OBJETIVOS	7
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
3.1	Eletrofição	7
3.1.1	Parâmetros do processo de eletrofição	9
3.1.2	Parâmetros da solução	9
3.2	Álcool poli(vinílico) PVA	10
3.2.1	Efeito do grau de hidrólise nas propriedades físico-química do PVA	11
3.2.2	Aplicações Biomédicas do PVA	12
3.3	Reticulação	13
3.3.1	Glutaraldeído	14
3.3.2	Ácido Cítrico	15
3.4	Curativos	16
3.5	Cloranfenicol	18
3.6	Considerações finais	19
4	ARTIGO	21
5	INTRODUÇÃO	22
6	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	24
6.1	Preparo da solução eletrofiável	24
6.2	Reticulação	24
6.3	Caracterização das fibras	25
6.4	Grau de intumescimento e perda de massa	26
6.5	Taxa de transmissão de vapor da água (WVT)	27

6.6	Teste de liberação do fármaco <i>in-vitro</i>	27
6.6.1	Curva de calibração	27
6.6.2	Liberação <i>in vitro</i> do Cloranfenicol.....	28
6.6.3	Modelos cinético de liberação	28
6.7	Coagulação sanguínea e hemólise	29
6.8	Permeação em pele de suíno.....	30
6.9	Atividade antibacteriana	30
7	RESULTADOS	31
7.1	Microscopia eletrônica de varredura.....	31
7.2	Caracterização por espectroscopia de FTIR	36
7.3	Análise Termogravimétrica (TGA).....	39
7.4	Difração de raios-X (DRX).....	40
7.5	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	42
7.6	Propriedades Mecânicas.....	44
7.7	Espectroscopia de RMN ¹³ C CP/MAS	47
7.8	Ângulo de contato	48
7.9	Grau de Intumescimento e perda de massa.....	49
7.10	Taxa de transmissão de vapor de água.....	51
7.11	Liberação <i>in vitro</i> do cloranfenicol.....	52
7.12	Hemocompatibilidade e Coagulação sanguínea	54
7.13	Estudo de permeação cutânea	56
7.14	Atividade antibacteriana	57
8	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Soluções preparadas para eletrofição.	24
Tabela 2 - Modelos cinéticos de liberação de fármaco aplicados.	29
Tabela 3 - Parâmetros obtidos da análise de DSC.	43
Tabela 4 - Parâmetros obtidos da análise mecânica.	47
Tabela 5 - Taxa de transmissão de vapor da água para as membranas eletrofiadas.	52
Tabela 6 - Modelos cinéticos aplicados para a liberação do CLF.	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sistema básico para eletrofição.	8
Figura 2: Fórmula Estrutural do PVA. (I) parcialmente hidrolisado; (II) totalmente hidrolisado.....	11
Figura 3: Fórmula estrutural do glutaraldeído.	14
Figura 4: Fórmula estrutural do Ácido Cítrico.	15
Figura 5: Fórmula estrutural do cloranfenicol.	19
Figura 6: Esquema para a reticulação com vapor de glutaraldeído.	25
Figura 7: Célula para WVT padrão ASTM E96/E96M-16.	27
Figura 8: Suporte esférico de aço inox para fixação da membrana.	28
Figura 9: Microscopia eletrônica de varredura e diâmetro médio das fibras: A1 – (PVA) membrana de álcool polivinílico; A2 – (PVA/GLA) membrana de PVA reticulada com glutaraldeído; A3 – (PVA/CA) membrana de PVA reticulada com ácido cítrico; A4 – (PVA)+CLF membrana de álcool polivinílico e 10% (m/m) de cloranfenicol; A5 – (PVA/GLA)+CLF membrana de PVA reticulado com glutaraldeído e 10% (m/m) de cloranfenicol; A6 – (PVA/CA)+CLF reticulado com ácido cítrico e 10% (m/m) de cloranfenicol.	33
Figura 10: Microscopia eletrônica de varredura e diâmetro médio das fibras após imersão em meio aquoso: B1 – (PVA) membrana de álcool polivinílico; B2 – (PVA/GLA) membrana de PVA reticulada com glutaraldeído; B3 – (PVA/CA) membrana de PVA reticulada com ácido cítrico; B4 – (PVA)+CLF membrana de álcool polivinílico e 10% (m/m) de cloranfenicol; B5 – (PVA/GLA)+CLF membrana de PVA reticulado com glutaraldeído e 10% (m/m) de cloranfenicol; B6 – (PVA/CA)+CLF reticulado com ácido cítrico e 10% (m/m) de cloranfenicol.	35

Figura 11: Caracterização por infravermelho das membranas eletrofiadas: **(PVA)** membrana de álcool polivinílico, **(PVA/GLA)** membrana de PVA reticulada com glutaraldeído, **(PVA/CA)** membrana de PVA reticulada com ácido cítrico. **I** - Espectros das membranas reticuladas e absorvância relativa da banda de (OH). **II** - **a)** Deslocamento do máximo da banda de (OH); **b)** cristalinidade das membranas obtida da relação ($A_{1142\text{cm}^{-1}}/ A_{1091\text{cm}^{-1}}$). **III** – Deconvolução das bandas entre 1500 e 1800 cm^{-1} ; **a)** bandas entre 1500 e 1800 cm^{-1} para PVA, PVA/GLA e PVA/CA; **b)** deconvolução PVA; **c)** deconvolução PVA/GLA; **d)** deconvolução PVA/CA. **IV** – imagens de MEV das membranas com e sem reticulação após imersão em água. 36

Figura 12: Espectros de FTIR das membranas eletrofiadas contendo o fármaco: **(PVA)+CLF** membrana de álcool polivinílico e 10% (m/m) de cloranfenicol; **(PVA/GLA)+CLF** membrana de PVA reticulado com glutaraldeído e 10% (m/m) de cloranfenicol; **(PVA/CA)+CLF** reticulado com ácido cítrico e 10% (m/m) de cloranfenicol; **(CLF)** cloranfenicol..... 38

Figura 13: **I** – Análise termogravimétrica (TGA) e primeira derivada (-dTGA) das membranas eletrofiadas. **II** – Deconvolução da primeira derivada do TGA; **(PVA)** membrana de álcool polivinílico; **(PVA/GLA)** membrana de PVA reticulada com glutaraldeído; **(PVA/CA)** membrana de PVA reticulada com ácido cítrico; **(PVA)+CLF** membrana de álcool polivinílico e 10% (m/m) de cloranfenicol; **(PVA/GLA)+CLF** membrana de PVA reticulado com glutaraldeído e 10% (m/m) de cloranfenicol; **(PVA/CA)+CLF** reticulado com ácido cítrico e 10% (m/m) de cloranfenicol; **(CLF)** cloranfenicol..... 39

Figura 14: Espectros de difração de raios-X das membranas eletrofiadas; **a)** (PVA) membrana de álcool polivinílico; **b)** (PVA/GLA) membrana de PVA reticulada com glutaraldeído; **c)** (PVA/CA) membrana de PVA reticulada com ácido cítrico; **d)** (PVA)+CLF membrana de álcool polivinílico e 10% (m/m) de cloranfenicol; **e)** (PVA/GLA)+CLF membrana de PVA reticulado e glutaraldeído com 10% (m/m) de cloranfenicol; **f)** (PVA/CA)+CLF reticulado com ácido cítrico e 10% (m/m) de cloranfenicol; **g)** (CLF) cloranfenicol. 41

Figura 15: **I** – Análise calorimetria exploratória diferencial das membranas eletrofiadas; **a)** (PVA) membrana de álcool polivinílico; **b)** (PVA/GLA) membrana de PVA reticulada com glutaraldeído; **c)** (PVA/CA) membrana de PVA reticulada com ácido cítrico; **d)** (PVA)+CLF membrana de álcool polivinílico e 10% (m/m) de cloranfenicol; **e)** (PVA/GLA)+CLF membrana de PVA reticulado com glutaraldeído e 10% (m/m) de cloranfenicol; **f)** (PVA/CA)+CLF reticulado com ácido cítrico e 10% (m/m) de cloranfenicol; **g)** (CLF) cloranfenicol. **II** – Correlação entre a cristalinidade obtida por DRX, DSC e FTIR com a entalpia de fusão..... 42

Figura 16: **A** – Análise mecânica das membranas; **(PVA)** membrana de álcool polivinílico; **(PVA/GLA)** membrana de PVA reticulada com glutaraldeído; **(PVA/CA)** membrana de PVA reticulada com ácido cítrico; **(PVA)+CLF** membrana de álcool polivinílico e 10% (m/m) de cloranfenicol; **(PVA/GLA)+CLF** membrana de PVA reticulado com glutaraldeído e 10% (m/m) de cloranfenicol; **(PVA/CA)+CLF** reticulado com ácido cítrico e 10% (m/m) de cloranfenicol. **B** – Camadas formada nas membranas contendo CA e esquema da possível reticulação gradual da membrana. **C** – Estrutura cristalina lamelar efeito do cloranfenicol no afastamento das lamelas. 45

Figura 17: **I** – Espectros de RMN ^{13}C , **a)** (PVA) membrana de álcool polivinílico; **b)** (PVA/GLA) membrana de PVA reticulada com glutaraldeído; **c)** (PVA/CA) membrana de PVA reticulada com ácido cítrico; **d)** (PVA)+CLF membrana de álcool polivinílico e 10% (m/m) de cloranfenicol; **e)** (PVA/GLA)+CLF membrana de PVA reticulado com glutaraldeído e 10% (m/m) de cloranfenicol; **f)**

(PVA/CA)+CLF reticulado com ácido cítrico e 10% (m/m) de cloranfenicol; **g**) (CLF) cloranfenicol; **II** – Deslocamentos químico de seus respectivos carbono para a molécula de cloranfenicol. 48

Figura 18: Análise da hidrofiliicidade das membranas eletrofiadas. **A)** ângulo de contato inicial para as membranas eletrofiadas em tempo 0 s; **B)** Imagens da gota em t = 0s e após 1s. As abreviações correspondem a **(PVA)** membrana de álcool polivinílico; **(PVA/GLA)** membrana de PVA reticulada com glutaraldeído; **(PVA/CA)** membrana de PVA reticulada com ácido cítrico; **(PVA)+CLF** membrana de álcool polivinílico e 10% (m/m) de cloranfenicol; **(PVA/GLA)+CLF** membrana de PVA reticulado com glutaraldeído e 10% (m/m) de cloranfenicol; **(PVA/CA)+CLF** reticulado com ácido cítrico e 10% (m/m) de cloranfenicol. 49

Figura 19: **I** – Grau de intumescimento e perda de massa. **II** – valores obtidos de intumescimento e perda de massa; **(PVA)** membrana de álcool polivinílico; **(PVA/GLA)** membrana de PVA reticulada com glutaraldeído; **(PVA/CA)** membrana de PVA reticulada com ácido cítrico; **(PVA)+CLF** membrana de álcool polivinílico e 10% (m/m) de cloranfenicol; **(PVA/GLA)+CLF** membrana de PVA reticulado com glutaraldeído e 10% (m/m) de cloranfenicol; **(PVA/CA)+CLF** reticulado com ácido cítrico e 10% (m/m) de cloranfenicol. 50

Figura 20: Cinética de liberação do cloranfenicol das membranas. **(PVA)+CLF** membrana de álcool polivinílico e 10% (m/m) de cloranfenicol; **(PVA/GLA)+CLF** membrana de PVA reticulado com glutaraldeído e 10% (m/m) de cloranfenicol; **(PVA/CA)+CLF** reticulado com ácido cítrico e 10% (m/m) de cloranfenicol. 53

Figura 21: **I** – Taxa de hemólise sanguínea obtida para membranas; **II** – Coagulação sanguínea promovida pelas membranas eletrofiadas. **(PVA)** membrana de álcool polivinílico; **(PVA/GLA)** membrana de PVA reticulada com glutaraldeído; **(PVA/CA)** membrana de PVA reticulada com ácido cítrico; **(PVA)+CLF** membrana de álcool polivinílico e 10% (m/m) de cloranfenicol; **(PVA/GLA)+CLF** membrana de PVA reticulado com glutaraldeído e 10% (m/m) de cloranfenicol; **(PVA/CA)+CLF** reticulado com ácido cítrico e 10% (m/m) de cloranfenicol. 55

Figura 22: **I** – Espectros de fotoacústica das membranas contendo o fármaco. **II** – Espectros de fotoacústica normalizados para derme, **A** – **(PVA/CA+CLF)**; **B** – **(PVA+CLF)**; **C** – **(PVA/GLA+CLF)**. **III** – Espectros de fotoacústica para a permeação na epiderme e derme, **a**) – **(PVA)+CLF** membrana de álcool polivinílico e 10% (m/m) de cloranfenicol; **b**) – **(PVA/GLA)+CLF** membrana de PVA reticulado com glutaraldeído e 10% (m/m) de cloranfenicol; **c**) – **(PVA/CA)+CLF** reticulado com ácido cítrico e 10% (m/m) de cloranfenicol. 57

Figura 23: **I** – Halo de inibição em (mm) e desvio padrão; **CLF** disco padrão de cloranfenicol 30 µg; para um mesmo microrganismo letras iguais em sobrescrito indicam que as medias não diferem estatisticamente com 95% de confiança pelo teste de Tukey. **II** – Ensaio de difusão de disco para os microrganismos utilizados, **(PVA)+CLF** membrana de álcool polivinílico e 10% (m/m) de cloranfenicol; **(PVA/GLA)+CLF** membrana de PVA reticulado com glutaraldeído e 10% (m/m) de cloranfenicol; **(PVA/CA)+CLF** reticulado com ácido cítrico e 10% (m/m) de cloranfenicol. 58

CURATIVOS PRODUZIDOS A PARTIR DE NANOFIBRAS DE PVA CONTENDO CLORANFENICOL

GABRIELNARDI FRAGA

Resumo

A eletrofiação de soluções poliméricas tem se tornado um método atrativo para aplicação nas áreas biomédicas, como a obtenção de curativos. Assim, polímeros biocompatíveis são amplamente eletrofiados para engenharia de tecidos, um exemplo é o álcool poli(vinílico) PVA. No entanto, este polímero possui uma solubilidade em água, a qual é amplificada quando está na forma de nanofibras. Portanto, nanofibras de PVA necessitam passar por um processo de reticulação, com a finalidade de melhorar a estabilidade em água, mantendo, desta maneira, sua estrutura morfológica. Neste estudo membranas eletrofiadas de PVA contendo o antibiótico cloranfenicol (CLF) para aplicação como curativos, foram submetidas a dois tipos de reticulação utilizando ácido cítrico (CA) ou glutaraldeído (GLA). As imagens de MEV mostraram que foi possível obter nanofibras de PVA contendo o antibiótico cloranfenicol com diâmetros variando entre 600 e 700 nm, sendo o menor diâmetro 593 nm observado para as membranas reticuladas com CA. A reticulação com ácido cítrico foi capaz de conferir melhor estabilidade das fibras frente a meios aquoso, mantendo as estruturas morfológicas com perda de 0,7% da massa após 24h. Entretanto, a reticulação com GLA não foi capaz de manter a estrutura fibrosa permitindo a coalescência das fibras. A melhora na estabilidade térmica promovida pela reticulação foi observada nas análises de TGA, bem como no aumento da cristalinidade confirmado pelas análises de DSC, DRX e FTIR. As análises de FTIR comprovaram a incorporação do fármaco nas fibras, enquanto as análises de TGA mostraram que o CLF retarda a degradação térmica do polímero. A ausência de picos referente ao CLF nos difratogramas de raios-X e nas curvas de DSC

indicam, que possivelmente o fármaco esteja em seu estado amorfo, o que melhora a solubilidade do fármaco tornando mais biodisponível. O mecanismo de liberação do CLF mostra que a cinética segue o modelo de Weibull para sistemas matriciais de liberação, apresentando uma liberação de instantânea nos primeiros 30 min. As membranas apresentaram hemotoxicidade abaixo do limite estabelecido (5%), sendo adequada para aplicação em dispositivos médicos, além disso, na presença do fármaco promovem atividade antimicrobiana observada pelos ensaios de difusão de disco. Assim, mediante aos resultados obtidos, constatou-se que estas membranas são promissoras para aplicação em curativos.

Palavras chave: Eletrofiação; Álcool poli(vinílico); Reticulação, Cloranfenicol.

DRESSINGS PRODUCED FROM PVA NANOFIBERS CONTAINING CHLORAMPHENICOL

GABRIEL NARDI FRAGA

Abstract

The electrospinning of polymeric solutions has become an attractive method for application in biomedical areas, such as obtaining dressings. Thus, biocompatible polymers are widely electrospun for tissue engineering, an example is a poly(vinyl alcohol) PVA. However, this polymer has a solubility in water, which is amplified when it is in the form of nanofibers. Therefore, PVA nanofibers need to undergo a crosslinking process in order to improve their stability in water, thus maintaining their morphological structure. In this study, electrospun PVA membranes containing the antibiotic chloramphenicol (CLF) for application as dressings were subjected to two types of crosslinking using citric acid (CA) or glutaraldehyde (GLA). The SEM images showed that it was possible to obtain PVA nanofibers containing the antibiotic chloramphenicol with diameters varying between 600 and 700 nm, with the smallest diameter 593 nm being observed for membranes crosslinked with CA. Crosslinking with citric acid was able to provide better stability of the fibers against aqueous media, maintaining the morphological structures with a loss of 0.7% of the mass after 24h. However, cross-linking with GLA was not able to maintain the fibrous structure, allowing the fibers to coalesce. The improvement in thermal stability promoted by crosslinking was observed in the TGA analysis, as well as in the increase in crystallinity confirmed by the DSC, XRD, and FTIR analyses. The FTIR analysis confirmed the incorporation of the drug in the fibers, while the TGA analysis showed that the CLF delays the thermal degradation of the polymer. The absence of peaks referring to CLF in the X-ray diffractograms and the DSC curves indicate that the drug is possibly in its amorphous state, which improves the drug's solubility making it more bioavailable. The CLF release mechanism shows that the kinetics follows the Weibull model for matrix release systems, presenting a burst release in the first 30 min. The membranes showed hemotoxicity below the established limit (5%), being suitable for application in

medical devices, in addition, in the presence of the drug, it promotes antimicrobial activity observed by the disk diffusion assays. Thus, through the results obtained, it was found that these membranes are promising for application in dressings.

Keywords: Electrospinning; Poly(vinyl alcohol); Crosslink; Chloramphenicol.

1 INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA

A pele humana trata-se do nosso maior órgão e o primeiro mecanismo de defesa contra infecções, estando sujeita a danificações na continuidade do tecido. Assim, uma forma de tratar estas lesões seria utilizando os curativos transdérmicos. Os curativos apresentam importantes funções, atuando como barreira antimicrobiana impedindo a proliferação de bactérias e o desenvolvimento de infecções. Além disso, podem reter a perda de fluido corpóreo e possibilitar as trocas gasosas. Porém, devido a necessidade de troca contínua o processo de crescimento celular é interrompido agravando as marcas de cicatrizes, promovendo deformidades na morfologia do tecido. Com isso, a utilização de membranas poliméricas para produção de curativos tem ganhado grande destaque por apresentarem boa absorvidade de fluidos, eficácia no controle de invasão bacteriana, além de melhores resultados cicatriciais em um menor tempo.

Entre as técnicas para obtenção de membranas poliméricas, a eletrofição apresenta uma metodologia atrativa, devido ao baixo custo e fácil operação, tendo como produto a obtenção de membranas compostas de nanofios. Estas membranas nanoestruturadas tem como características serem extremamente porosas e apresentarem uma alta relação superfície/volume. Portanto, a obtenção de nanofibras de álcool polivinílico (PVA) incorporadas com o antibiótico cloranfenicol para produção de curativos transdérmicos torna-se de grande interesse devido as características do PVA. O álcool polivinílico trata-se de um polímero solúvel em água, totalmente biodegradável, biocompatível e atóxico, além de ser um polímero com alta capacidade de intumescimento. O cloranfenicol é um dos antibióticos sintéticos mais antigos sendo eficaz contra um amplo espectro de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, podendo atuar como bactericida ou bacteriostático inibindo a formação de proteínas bacteriana.

As membranas compostas de nanofios desde que mantenham sua estrutura fibrosa podem atuar como scaffolds (andaimés) capazes de acelerar a cicatrização e a proliferação celular. A estrutura de nanofibras e a presença de poros fornecem um ambiente similar a matriz extracelular (MEC), em que a topografia do material é capaz de sustentar e direcionar o crescimento celular, atuando como um suporte para as células do tecido que se deseja reparar. Isto ocorre pois os nanofios se encontram na mesma escala de grandeza das células biológicas criando-se um ambiente ideal para o desenvolvimento das células. Assim membranas eletrofiadas de polímeros solúveis em água, como o PVA, devem ser submetidos ao processo de reticulação, processo em que há formação de ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas, diminuindo assim, sua solubilidade e melhorando as propriedades físico-químicas.

Desta forma a obtenção de biocurativos eletrofiados capazes de fornecer um microambiente adequado, como também promover a atividade antimicrobiana trata-se de uma alternativa promissora que poderá ser utilizado como uma nova proposta no tratamento de ferimentos graves.

2 OBJETIVOS

Obter nanofibras de Poli (Álcool Vinílico) (PVA) por meio da técnica de eletrofiação incorporadas com o antibiótico cloranfenicol, para utilização terapêutica no tratamento de ferimentos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Avaliar dois métodos químicos de reticulação empregando glutaraldeído e ácido cítrico, e eficiência de cada agente reticulante sobre as propriedades físico-químicas das membranas de PVA eletrofiadas;
- 2- Caracterizar as membranas obtidas utilizando as técnicas de Difração de Raios X (DRX), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Análise Termogravimétrica (TGA) e espectrofotometria no infravermelho (FTIR);
- 3- Avaliar o efeito do grau de reticulação sobre as alterações morfológicas das fibras, resistência a água e possíveis influências no perfil de liberação do fármaco in-vitro;
- 4- Analisar a atividade antimicrobiana frente aos seguintes microorganismos: Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis e Pseudomonas aeruginosa
- 5- Realizar análises de hematoxicidade, com o intuito de verificar a biocompatibilidade das membranas produzidas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Eletrofiação

A eletrofiação trata-se de uma técnica eletro-hidrodinâmica, de tecnologia simples e de fácil aplicação para obtenção de fibras poliméricas com diâmetros em escala de nano/micro. Neste processo a aplicação de um campo elétrico sobre uma solução viscoelástica proporciona a formação de um jato seguido de um estiramento promovendo a formação de nanofibras. Tradicionalmente a configuração mais simples de um sistema de eletrofiação FIG. 1 consiste em uma fonte de alta tensão, uma bomba infusora e um coletor aterrado [1,2].

Durante o processo de eletrofiação a bomba infusora empurra a solução polimérica contida em uma seringa até a ponta da agulha ligada a um dos terminais da fonte de alta tensão. A tensão aplicada em kV faz com que a gota da solução polimérica formado na ponta do capilar seja carregada, desta forma o acúmulo de cargas positivas induzidas na superfície da gota provoca uma deformação formando uma estrutura cônica denominado “cone de Taylor”. Assim, quando a tensão aplicada atinge seu valor crítico, superando a tensão superficial da gota, um jato polimérico carregado é ejetado da ponta do cone devido as forças elétricas repulsivas. Inicialmente o jato ejetado é linear e estável, entretanto logo em seguida tem-se uma zona de instabilidade caracterizada por vigorosos movimentos caóticos e de severos chicoteamento. É nesta zona de instabilidade causada pela presença do campo eletrostático em que ocorre a aceleração e miniaturização das fibras, permitindo uma rápida evaporação do solvente solidificando as fibras depositadas no coletor [3,4].

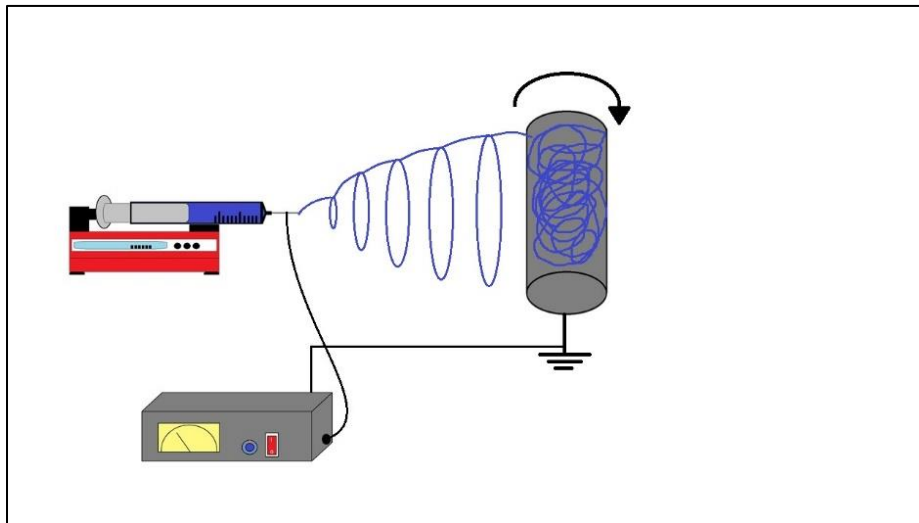


Figura 1: Sistema básico para eletrofiação.

Esta técnica além de fácil e versátil permite a produção de fibras com diferentes morfologias por meio da alteração de parâmetros do processo. Entre os parâmetros tem-se: (I) relacionados a condição de eletrofiação como tensão aplicada, fluxo empregado e distância capilar coletor; (II) propriedades da solução como concentração, condutividade, tensão superficial e viscosidade; (III) parâmetros ambientais tais como umidade e temperatura. A alteração de tais parâmetros permite a produção de membranas compostas de nanofibras com elevada área superficial. A possibilidade de obtenção de membranas com tais características torna esta técnica de grande interesse para as mais diversas áreas como sistemas de carreamento de fármacos, engenharia de tecidos, filtração, adsorção, fotocatalise entre outras [5,6].

3.1.1 Parâmetros do processo de eletrofiação

Entre os parâmetros relacionados a condição do processo de eletrofiação e a sua influência sobre a morfologia das fibras, a tensão aplicada tem relação direta com o diâmetro médio. O aumento do campo elétrico aplicado provoca uma maior repulsão eletrostática ocasionando uma diminuição no diâmetro, favorecendo o estreitamento da fibra, além de uma rápida evaporação do solvente. A taxa de fluxo delimitada pela bomba infusora tem relação com a velocidade do jato e a taxa de transferência de material. Elevadas taxa de fluxo promovem o aumento no diâmetro e dos poros, além de fibras irregulares devido à falta de tempo para evaporação do solvente. Desta forma, taxas mais baixas de fluxo são desejadas para garantir uma evaporação adequada do solvente e a obtenção de fibras homogêneas [4,7].

A distância agulha coletor é outro parâmetro que afeta diretamente a morfologia, podendo resultar em fibras extremamente porosas ou planificadas devido a evaporação incompleta do solvente. Portanto, uma distância mínima adequada é necessária para garantir total evaporação do solvente impedindo que as fibras cheguem ainda úmidas ao coletor. Os parâmetros ambientais como temperatura, humidade relativa etc., também podem influenciar sobre a estrutura morfológica das fibras. Estudos mostraram que umidade relativa do ar acima de 60% provocam uma evaporação inadequada do solvente ocasionando pontos de coalescência devido a umidade das fibras. Por outro lado, uma baixa umidade provoca a rápida evaporação de solventes voláteis provocando a obstrução da agulha. Por meio de uma relação inversa, a temperatura ambiente pode alterar a viscosidade da solução polimérica, alterando o diâmetro médio das fibras [8,9].

3.1.2 Parâmetros da solução

A concentração polimérica é um dos fatores que delimitam parte das características da solução para a formação das fibras eletrofiadas, devido a relação entre a concentração e as propriedades da solução com tensão superficial e a viscosidade. Em soluções com baixas concentrações de polímero é observado apenas spray de pequenas gotas, e soluções com altas concentração resultam em uma incapacidade de formar fibras e manter o fluxo. A variação da concentração também tem relação direta com o diâmetro médio das fibras, em que o aumento da concentração de polímero resulta em fibras com diâmetros maiores. A massa molar do polímero é outro fator importante para a eletrofiação, influenciando diretamente sobre as propriedades reológicas da solução, afetando a morfologia das

fibras. Portanto, polímeros com baixa massa molar tendem a formar spray devido à baixa viscosidade, já soluções de polímero com alta massa molar fornecem uma viscosidade ideal para a eletrofiação [10].

Parâmetros reológicos como viscosidade e tensão superficial, resultantes da composição da solução, são de grande importância para que a eletrofiação ocorra de forma adequada. Valores muito elevados ou muito baixos para estes parâmetros acabam impedindo a eletrofiação dificultando a ejeção e estabilização dos jatos impedindo a obtenção de fibras. Assim estes parâmetros delimitam uma faixa ideal com limites inferiores e superiores em que os valores de tensão superficial e viscosidade devem se encontrar para uma boa eletrofiação, entretanto, estes limites variam em específico para cada polímero diferente. A condutividade elétrica da solução é outro fator que tem efeito sobre a morfologia, o aumento da condutividade exige a aplicação de tensão elétrica maior proporciona uma diminuição no diâmetro do filme. Por outro lado, a volatilidade do solvente é determinante no processo, relacionando-se diretamente com a taxa de evaporação e o tempo de secagem das fibras [8,11].

3.2 Álcool poli(vinílico) PVA

O álcool polivinílico (PVA) trata-se de um polímero sintético hidrossolúvel, utilizado para diversas aplicações nas indústrias têxteis, alimentícias e biomédicas. O grande interesse neste polímero ocorre devido suas características, um polímero semicristalino, atóxico, biocompatível e termoestável, além de ser biodegradável e não cancerígeno [12,13]. O PVA é sintetizado a partir da hidrólise alcalina do acetato de polivinila (reação de saponificação) para remoção dos grupos éster, substituindo-os por um grupo hidróxido. Assim devido ao processo de hidrólise o PVA pode ser classificado em dois grupos, os parcialmente hidrolisados (I) e os totalmente hidrolisados (II) FIG. 2. A variação do tamanho da cadeia inicial do acetato de vinila e o grau de hidrólise (%) obtido durante a substituição dos grupos éster, resultam em diferentes tipos de PVA com propriedades físico-químicas e mecânicas variadas. Desta forma, quanto maior o grau de hidroxilação e massa molar, mais difícil será a solubilização do PVA em água, devido ao maior número de ligações de hidrogênio formada entre as cadeias de PVA [14,15].

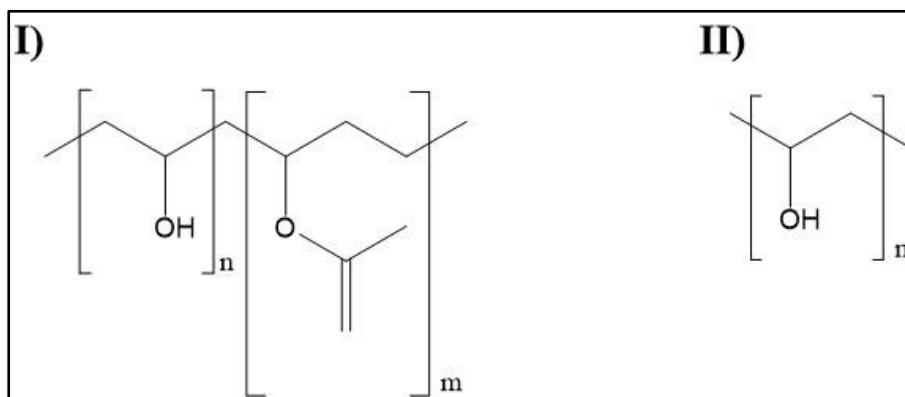


Figura 2: Fórmula Estrutural do PVA. (I) parcialmente hidrolisado; (II) totalmente hidrolisado.

3.2.1 Efeito do grau de hidrólise nas propriedades físico-química do PVA

Com a finalidade de estudar a influência do grau de hidrólise e da massa molar sobre as propriedades físico-químicas do PVA, Van Etten *et al.*, (2014) avaliou as propriedades térmicas de diferentes filmes de PVA. Assim para o estudo utilizaram PVA com diferentes massas molares (31-50k; 146-186k) (g/mol) e grau de hidrólise (87-89; 99) % a fim de monitorar o efeito dessas propriedades sobre o PVA. De acordo com as análises de degradação térmica (TGA) observaram que o PVA com maior grau de hidrólise possui a menor estabilidade térmica, degradando em temperaturas mais baixas. Isto ocorre devido a primeira etapa da decomposição térmica do PVA está associada a remoção dos grupos hidroxilas, portanto, um maior número desses grupos torna o polímero menos estável termicamente. Na calorimetria de varredura diferencial observaram que os filmes de PVA com maior grau de hidrólise possuíam uma maior cristalinidade, que pode ser confirmado pelo aumento da entalpia de fusão e com picos mais definidos [16].

No trabalho realizado por Limpan *et al.*, (2012) os autores também investigaram a influência do grau de hidrólise e da massa molar do PVA nas propriedades de filmes composto obtidos da mistura de PVA e proteína miofibrilar de peixe. Os autores relataram que para os filmes de PVA com a mesma massa molar e diferentes graus de hidrólise (GH), aqueles com maiores GH apresentaram maior resistência a tração e módulo elasticidade. E mantendo-se o GH constante e aumentando a massa molar também observaram uma melhora nas propriedades mecânicas, mostrando a influência direta do grau de hidrólise e da massa molar sobre as propriedades mecânicas do PVA. Ainda no trabalho avaliou-se a solubilidade dos diferentes tipos de PVA, os filmes contendo PVA com maior grau de hidrólise e massa molar apresentaram a menor solubilidade. Este efeito ocorre pois o aumento do GH permite que moléculas de PVA possam interagir mais entre elas via ligações de hidrogênio formando

estruturas cristalinas cada vez maiores. Assim, quanto maior o GH do PVA mais difícil será sua solubilização em água, necessitando de aquecimento para sua solubilização [17].

Park *et al.*, (2010) estudaram o efeito do grau de hidrólise sobre as propriedades reológicas da solução de PVA para obtenção de nanofibras eletrofiadas. Como no processo de eletrofiação as forças eletrostáticas geradas pela tensão elétrica aplicada devem superar a tensão superficial para que ocorra a fiação, uma baixa tensão superficial é desejada para a solução polimérica. Nos estudos realizados sobre as propriedades reológicas (viscosidade e tensão superficial) da solução de PVA, observaram que essas propriedades da solução aquosa têm relação direta e acentuada com o grau de hidrólise. O efeito do grau de hidrólise é resultante das interações inter e intramoleculares, via ligação de hidrogênio dos grupos hidroxila presentes no PVA. Entretanto, não é constatada variação na tensão superficial em função da concentração da solução polimérica, portanto a elevada tensão superficial para o PVA com grau de hidrólise (>99%) tem sua eletrofiação dificultada sendo necessário a adição de tensoativos para facilitar o processo [18].

3.2.2 Aplicações Biomédicas do PVA

O PVA por se tratar de um polímero biodegradável, biocompatibilidade, atóxico, solúvel em água e com boas propriedades mecânicas, tais características associado ao baixo custo desse polímero, tornou-se de grande interesse para a área biomédica. Além disso, a possibilidade de obtenção de diferentes morfologias do PVA (Bulk, Hidrogéis, Beads, Fibras, Filmes, Membranas, Scaffolds) torna favorável sua aplicação. Entre elas o PVA é comumente usado como carreador de fármacos, implantes médicos, curativos transdérmicos e engenharia de tecidos, por não apresentarem efeitos adversos, ou provocar lesões quando em contato com a pele [19,20].

O PVA faz parte do Handbook de excipientes farmacêuticos, sendo aprovado pela USA Food and Drug Administration (FDA) o seu uso em produtos de embalagem que estejam em contato com alimentos. O uso do PVA também é permitido para aplicações médicas em adesivos transdérmicos, comprimidos e microesferas reticuladas para liberação modificada de fármacos por administração oral e na preparação de soluções oftálmicas. A viabilidade da aplicação médica deste polímero decorre da sua segurança apresentando baixa toxicidade aguda para administração oral LD₅₀ 15 – 20 g/Kg, além de estudos realizados em ratos mostrarem que ele é muito pouco absorvido. Desta forma, o PVA não se acumula no organismo quando administrado oralmente, além de não apresentar efeito mutagênico em estudos conduzidos com agentes de união dentina constituídos de PVA, ácido cítrico e cloreto férrico [21–23].

Além de aplicações em implantes o PVA é utilizado como carreador de fármacos na forma de curativos transdérmicos, ou também em comprimidos, permitindo a obtenção de diferentes geometrias e com isso múltiplos perfis de liberação. Em um estudo conduzido por Xu *et al.*, (2019) comprimidos com três tipos de núcleos diferentes (cilindro, chifre e chifre invertido) foram produzidos utilizando modelagem por deposição fundida (impressão 3D). O PVA foi utilizado como suporte (casca) para o comprimido, na qual as cavidades foram preenchidas com um gel a base de PVA contendo paracetamol. As diferentes formas do comprimido permitiram diferentes perfis de liberação associados a mudanças na área superficial do comprimido. A taxa de liberação observada foi constante para a estrutura cilindro, crescente para chifre e decrescente para chifre invertido [24].

3.3 Reticulação

Em alguns casos certas propriedades como baixa resistência mecânica, facilidade de degradação e baixa instabilidade em água são indesejadas. Assim, a formação de ramificações inter e intracadeias poliméricas é capaz de atribuir uma melhora nas propriedades físico-químicas do polímero por meio da formação de uma rede polimérica interligada. Polímeros como o PVA que possui elevada solubilidade em água, possui uma série de restrições para aplicações biomédicas, devido ao contato direto com meios aquosos. Desta forma, o processo de reticulação torna-se de grande interesse na melhoria de tais propriedades. A reticulação trata-se de um método empregado para induzir a formação de um serie de ligações cruzada, ligando os grupos funcionais de uma cadeia polimérica a outra cadeia. Estas ligações formadas podem ser do tipo química com a formação de ligações covalente bem estabilizadas, ou por meio de interações físicas como Van der Waals e ligações de hidrogênio [25,26].

Os agentes físicos de reticulação mais aplicados são os tratamentos térmicos, irradiação de luz ultravioleta, feixes de elétrons. As vantagens da reticulação física ocorre por se tratar de um método mais barato e apresentar uma maior segurança biológica por não haver emprego de agentes reticuladores químico. Desta forma, não há o risco de que vestígios do agente reticulante químico que fiquem retido sobre o material, promovendo algum efeito de citotoxicidade as células. Entretanto, as desvantagens deste método é a demora para o processo de reticulação com formação de ligações fracas, proporcionando graus inferiores de reticulação em relação aos reticuladores químicos. Com o emprego de agentes reticuladores químico tem-se a formação de ligações fortes e permanentes entre cadeias poliméricas, apresentando significativa melhora nas propriedades do polímero. Porém a aplicação deste tipo de reticulação apresenta certas complicações para fins de aplicações biomédicas, em que a presença residual destes agentes reticuladores possam apresentar efeito tóxicos para as células. Sendo

necessário a lavagem dos materiais para remoção de resíduos que possam ter ficado retidos durante o processo de reticulação, assim dependendo a finalidade de aplicação do material deve ser feita a escolha adequada do agente reticulador químico [25,27,28].

3.3.1 Glutaraldeído

O glutaraldeído (GLA) é um dos agentes de reticulação químico mais conhecido e empregado para diversos polímeros promovendo melhoras significativas nas características físico-químicas. Estudos envolvendo diferentes materiais poliméricos já relataram que o uso deste agente reticulante causaram melhorias nas propriedades mecânica, diminuíram a solubilidade e aumentaram a estabilidade térmica. O glutaraldeído FIG. 3 trata-se de um dialdeído com baixa pressão de vapor capaz de reagir com os grupos funcionais amina ou hidroxila presente nos polímeros. Muitos trabalhos relatam o emprego deste agente químico na reticulação de biomateriais, entretanto os grupos funcionais aldeído possuem efeito citotóxico para as células podendo causar inflamações severas [29,30].

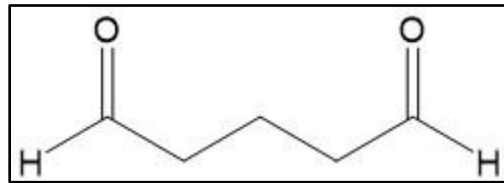


Figura 3: Fórmula estrutural do glutaraldeído.

Vashisth e Pruthi (2016) sintetizaram e caracterizaram nanofibras eletrofiadas para aplicação em engenharia de tecidos, composta de gellan/PVA reticuladas por diferentes técnicas. Entre as técnicas, a reticulação física por irradiação UV e calor, química e iônica por imersão em metanol e cloreto de cálcio e reticulação com vapor de glutaraldeído. Para a reticulação com vapor de glutaraldeído as fibras foram colocadas em uma câmara de vapor contendo 10 mL de GLA e mantidas por 24h. Esta técnica foi capaz de gerar fibras estáveis que manteve sua morfologia mesmo após o contato com a água e com resistência a tração melhorada. Entretanto, no estudo de biocompatibilidade em que foi monitorado a proliferação de células de fibroblastos dérmico humano sobre as membranas eletrofiadas, o método utilizando glutaraldeído apresentou a menor viabilidade celular. Possivelmente devido a presença de molécula de GLA na superfície que não reagiram promovendo uma diminuição na proliferação celular. Já as membranas fisicamente reticulada com calor não apresentaram influência significativa na proliferação das células [31].

Desta forma, embora o glutaraldeído seja o agente reticulante mais empregado, quando se trata de aplicações biomédicas, deve-se aplicar alguma estratégia de retirar o excesso de GLA do material de forma a aumentar a viabilidade celular. Como, por exemplo, técnicas de lavagem com soluções que apresente grupos amins livre ou soluções de aminoácidos capazes de eliminar os grupos aldeído que não tenha sido consumido no processo de reticulação. Devido à presença deste efeito tóxico a utilização de glutaraldeído para fins de biomateriais não se torna muito atrativo buscando-se assim outro agentes de reticulação [25,30,32].

3.3.2 Ácido Cítrico

Entre os agentes químico reticulante os ácidos carboxílicos têm se apresentado como uma proposta promissora na melhora das propriedades dos materiais poliméricos. O ácido cítrico (CA) FIG. 4 é um ácido policarboxílico fraco de ocorrência natural em frutas cítricas e de base biológica, é utilizado em uma série de produtos farmacêuticos, alimentício, cosméticos e suplementos. A crescente utilização do ácido cítrico em biomateriais está relacionada a sua biocompatibilidade permitindo a adesão e proliferação de células. O CA possui natureza não toxica visto que ele é produto metabólico do corpo humano produzido pelo ciclo de Krebs ou ciclo do ácido cítrico, desenvolvido por todas as células que fazem uso do oxigênio como parte da respiração celular [33,34].

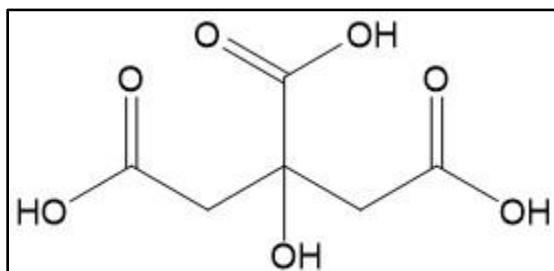


Figura 4: Fórmula estrutural do Ácido Cítrico.

O ácido cítrico durante o processo de reticulação pode reagir com grupos amina e hidroxila, a reticulação com o CA promove a formação de ligação éster ou amidas cruzadas entre as cadeias poliméricas. O uso do CA como agente reticulante agrega uma importante característica a biomateriais aumentando a hemocompatibilidade. Permitindo assim, contato direto do material com o sangue apresentando baixa adesão de plaquetas, adsorção de proteínas, não apresentando resposta inflamatória e com baixa atividade hemolítica. Tais características são de grande importância na engenharia de tecidos já que estes podem entrar em contato direto com o sangue [35,36].

Estudo *in-vitro* realizado por Scelza *et al.*, (2021) sobre os efeitos citotóxico do ácido cítrico a 10% e EDTA-T, usados como irrigantes do canal radicular, avaliaram a toxicidade em cultura

de fibroblastos realizando ensaios de curto e longo prazo para viabilidade e sobrevivência celular. Os ensaios mostraram que o ácido cítrico se apresentou mais biocompatível apresentando uma maior porcentagem de células viáveis no ensaio de curto prazo. Além disso, em ensaios de longo prazo as culturas tratadas com ácido cítrico foram capazes de atingir os valores de controle, indicando a biocompatibilidade do mesmo [37].

No estudo conduzido por Gyawali *et al.*, (2010) com polímeros biodegradáveis. O hidrogel produzido com citrato de maleato de poli(etilenoglicol) (PEGMC), um polímero derivado do ácido cítrico, obtido por uma reação de policondensação. Mostraram em ensaios *in-vitro* que as células de fibroblastos humano foram capazes de se aderir e espalhar sobre a superfície do hidrogel de PEGMC. A avaliação da citotoxicidade do polímero e de seus produtos de degradação mostraram que não houve mudança na viabilidade celular. Entretanto, nos estudos realizados em ratos obteve-se uma inflamação mínima. Os resultados indicam que polímeros derivados de ácido cítrico são excelentes candidatos para a aplicação biológica apresentando baixa toxicidade e biocompatibilidade [35].

3.4 Curativos

Feridas são interrupções na uniformidade da superfície da pele, estas lesões são formadas por meio de danos físico, químico, mecânico e térmico. A cicatrização de feridas trata-se de um processo fisiológico complexo composto por etapas biológicas, química e mecânica responsável por remover patógenos causadores de infecção para reestruturação do tecido lesionado. O processo de cicatrização ocorre em três fases extremamente ordenada, a primeira fase inflamatória está relacionada no estabelecimento da homeostase e da inflamação, a segunda fase proliferativa consiste na granulação, contração e epitelização. Por último a fase de remodelação em que os fibroblastos recobrem toda área do ferimento, entretanto alguns casos o processo de cicatrização fica estagnado em uma fase de inflamação crônica sendo necessário a presença de uma agente anti-inflamatório [38,39].

De acordo com o processo de cicatrização, as feridas podem ser classificadas em 2 grupos, as agudas decorrente de traumas causados principalmente por choques mecânicos, calor extremo ou produtos químicos corrosivos, as quais demoram de 8 a 12 semanas para cicatrizarem. As feridas crônicas resultantes de certas doenças como diabetes e tumores, estas feridas são capazes de atingir os tecidos que cicatrizam lentamente. Portanto, as feridas crônicas acabam não tendo limitação de tempo para cicatrizarem além de poderem ser recorrentes, sendo que a produção excessiva de exsudato é o principal problema para este tipo de ferimento [40].

Desta maneira, a escolha de um curativo adequado demanda conhecimento das etapas de cicatrização e os fatores que influenciam no processo. Os fatores locais são aqueles que afetam diretamente a cicatrização como a oxigenação. A presença do oxigênio é fundamental para que os leucócitos possam produzir superóxido responsáveis pela morte oxidativa de patógenos. A falta de oxigênio no ferimento leva a hipóxia, sendo que a hipóxia crônica retarda o processo prejudicando a cicatrização. Outro fator é a inflamação, a pele é uma barreira contra microrganismo, assim, quando há um ferimento eles entram e contaminam o local. A inflamação é uma etapa importante, em que a remoção inadequada de bactérias permite que estas formem um biofilme sobre o ferimento contendo uma série de bactérias como: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *estreptococos β-hemolíticos* [41,42].

Em virtude dos processos de cicatrização e dos fatores que influenciam, os materiais convencionais para o tratamento das duas classes de feridas nem sempre são adequados e eficazes para uma rápida cicatrização. O curativo deve fornecer um ambiente químico adequado para a fixação e proliferação celular. Portanto, o curativo moderno deve ser um material bioabsorvível, poroso, permitir a permeação de vapor da água e oxigênio, fornecer proteção mecânica e uma barreira contra bactérias. Ainda, deve ser capaz de absorver o excesso de exsudato, não aderir na superfície da ferida, possibilitando uma troca fácil sem promover traumas na região, ser atóxico e biocompatível. Desta forma, a eletrofição tem se destacado por fornecerem membranas com uma serie de propriedades desejáveis para um curativo, como: elevada área superficial, presença de poros. boa absorvidade e possibilidade de troca gasosas e líquida. Trata-se de um material maleável e flexível capaz de se conformar ao relevo da ferida, a capacidade de incorporar compostos terapêuticos como fármacos e extratos, além de ser um material promissor no tratamento de feridas a malha nanofibrosa é capaz de imitar a matriz extracelular [43,44].

Um estudo utilizando membranas eletrofiadas composta de PVA/amido/quitosana em diferentes proporções, destinadas para a aplicação em curativos foi realizado por ADELI *et al.*, (2019). A partir de testes de viabilidade celular e citocompatibilidade com fibroblastos de camundongo (L929), mostraram alta viabilidade celular das membranas entre 72% - 95% após 24 h, atingindo um máximo de 68% - 98% após 48 h revelando possuir boa biocompatibilidade. Os ensaios antimicrobiano mostraram eficiência antibacteriana frente bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* e Gram-negativas como *Escherichia coli*, responsáveis por causar infecções em tecidos moles interferindo no processo de cicatrização. A avaliação da cicatrização de feridas *in vitro*, obtido pelo ensaio de raspagem com base na migração e crescimento celular, mostraram a eficiência das

membranas no fechamento de feridas. A membrana composta de PVA/quitosana/amido na proporção (90/10/10) apresentou eficiência de 100% na cicatrização de feridas [45].

3.5 Cloranfenicol

O cloranfenicol (CLF) ou cloromicetina foi isolado pela primeira vez da bactéria *Streptomyces venezuelae* em 1947 tornando-se o primeiro antibiótico sintético a ser produzido. O CLF trata-se de uma molécula anfifílica com estrutura estável, o que permite o armazenamento do fármaco por longos períodos a temperatura ambiente. O CLF trata-se de um antibiótico capaz de permear membranas biológicas podendo alcançar bactérias intracelulares. As aplicações deste antibiótico incluem desde o tratamento de infecções oculares superficiais, como também para infecções graves (meningite, febre tifóide, cólera, ...). Pomadas contendo CLF também são utilizadas como profilaxia no período perioperatório para evitar infecções da ferida cirúrgica. Entretanto, a presença de alguns efeitos colaterais tóxicos tem limitado o uso do CLF a infecções que podem vir a ser fatais [46,47].

O cloranfenicol trata-se de um antibiótico de amplo espectro empregado no combate a uma série de infecções bacterianas. O mecanismo de ação do cloranfenicol é eventualmente do tipo bacteriostático podendo também em alguns casos atuar como bactericida em presença de altas concentrações. Seu mecanismo bacteriostático ocorre devido a formação de uma ligação reversível no centro da peptidiltransferase na região da subunidade ribossômica 50S inibindo a síntese de proteínas bacteriana, bloqueando as funções essenciais do ribossomo bacteriano. Portanto, em função do mecanismo de atuação do cloranfenicol, ele passa a ser eficiente tanto para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas [48–50].

O CLF FIG. 5 é composto por um anel p-nitrofenil e um substituinte N-dicloroacetil no carbono C-2*, ligado a 1,3-propanodiol apresentando dois centros quirais em C-1* e C-2*. Desta forma, o CLF consegue agregar-se a um terminal C da cadeia de peptídeo, em processo de crescimento, de tal forma a ocasionar uma liberação prematura do peptídeo incompleto ainda em fase de crescimento. A presença da hidroxila no carbono primário é um dos fatores essenciais para que ocorra a inibição da síntese proteica da bactéria devido a sua afinidade pela peptidiltransferase dos ribossomos 50S [51,52]. A solubilidade do CLF em água é relativamente baixa diminuindo assim sua biodisponibilidade, desta maneira, uma forma de aumentar sua solubilidade é por meio da amorfização do fármaco, não necessitando de alterações na estrutura química atribuindo melhores perfis de solubilização. A estabilização do estado amorfo do fármaco dispersando-o em um polímero é uma

estratégia para a amorfização, promovendo uma estabilidade cinética contra a recristalização, formando, assim, uma dispersão sólida amorfa [53].

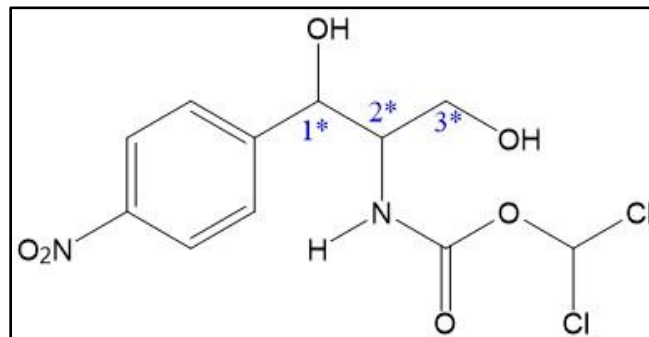


Figura 5: Fórmula estrutural do cloranfenicol.

Estudo realizado por Preem *et al.*, (2017) com nanofibras eletrofiadas de PCL e PEO contendo CLF para sistemas de carregamento de fármaco no tratamento de feridas, demonstraram viabilidade celular. Este ensaio foi realizado, com células murinas NIH 3T3 utilizando os extratos líquidos das membranas de PCL/CLF e PCL/PEO/CLF. Constatou-se que não houve diferença na viabilidade celular de fibroblastos para exposição de curto tempo, indicando que a toxicidade depende do tempo de administração e da via de administração. Outro indicativo da possibilidade de aplicação em ferimento das membranas foi o ensaio de difusão de disco, onde pode-se constatar atividade antimicrobiana frente a bactérias *E. coli* mais comumente encontrada em feridas, mostrando a eficiência do CLF para aplicação em curativos [54].

3.6 Considerações finais

A eletrofiação tem se apresentado como uma técnica atrativa e promissora no desenvolvimento de curativos modernos constituídos de nanofibras poliméricas, podendo atuar como um carreador de fármaco proporcionando atividade biológica. O PVA devido suas propriedades físico-químicas por ser um polímero de baixo custo, solúvel em água e biocompatível, tornando-se de grande interesse para aplicação médica. Entre os tipos de PVA o de alta massa molar e elevado grau de hidrólise é vantajoso devido a suas propriedades físico-química aprimoradas, além da sua menor solubilidade em água. Muitos trabalhos já relataram a eletrofiação do PVA, porém o PVA com alta massa molar e elevado grau de hidrólise é pouco empregado devido às dificuldades da sua eletrofiação e na obtenção de fibras perfeitas.

O agente reticulador químico glutaraldeído já estabelecido tem sido amplamente empregado para melhora das propriedades de polímeros, nas mais diferentes formas (hidrogel, filmes, membranas, ...). Entretanto, um dos métodos mais citados para reticulação com o glutaraldeído, é manter o material em contato com uma atmosfera saturada de seu vapor. Muitos trabalhos relatam a eficiência deste método dizendo serem capaz de reticular membranas eletrofiadas, atribuindo melhoras significativas em suas propriedades, bem como, a estabilidade em água mantendo sua estrutura morfológica.

Desta forma, analisando o estado da arte deste, este trabalho apresentará uma metodologia eficiente tanto na obtenção de nanofibras de PVA de alta massa molar, quanto alto grau de hidrólise pela técnica de eletrofiação. Além disso, diferentes métodos de reticulação, capazes de manter a estrutura morfológica das nanofibras de PVA em água, foram avaliados. Perante o que já foi exposto, e analisado na literatura estudada, este trabalho tem como novidade a utilização do PVA com alta massa molar e grau de hidrólise, com a reticulação com baixo teor de ácido cítrico contendo o fármaco CLF.

4 ARTIGO

CURATIVOS PRODUZIDOS A PARTIR DE NANOFIBRAS DE PVA CONTENDO CLORANFENICOL

Gabriel Nardi Fraga^a, Douglas Cardoso Dragunski^{a*}, Bruno Henrique Vilsinski^b, Camila Kauany da Silva Azevedo^b, Helton José Wiggers^c, Maria Graciela Iecher Faria^d, Marcella Ribeiro da Costa^d, Vitor Santaella Zanuto^e, Mariana Sversut Gibin^e

^aMaster Program in Chemistry, State University of West Paraná, 645, Rua da Faculdade, Paraná 85903-000, Toledo, Brazil

^bGroup of Biopolymeric Materials and Composites (GBMC), Federal University of Juiz de Fora. Campus Universitário, Rua José Lourenço Kelmer, s/n – São Pedro, Juiz de Fora – MG, 36036-900

^cLaboratory for Biomaterials and Bioengineering (LBB-BPK), Associação de Ensino, Pesquisa e Extensão BIOPARK, Toledo, Brazil

^dPostgraduate Program in Biotechnology Applied to Agriculture, Universidade Paranaense – UNIPAR, Praça Mascarenhas de Moraes, 4282, Umuarama, PR, Brazil

^eGraduate Program in Physics (PFI) at the State University of Maringá (UEM)

gabrielnardi1@hotmail.com

gracielaiecher@prof.unipar.br

marcella.costa@edu.unipar.br

bruno.vilsinski@ufjf.br

camilakauany@ice.ufjf.br

marigibin32@gmail.com

vszanuto@gmail.com

*e-mail: dcdragunski@gmail.com

RESUMO

Neste trabalho foram obtidas membranas eletrofiadas de PVA reticuladas com ácido cítrico ou glutaraldeído, contendo o antibiótico cloranfenicol (CLF), com a finalidade de produzir curativos. Estes materiais foram caracterizados por MEV, FTIR, DSC, TGA, RMN, grau de intumescimento e solubilidade. As imagens de MEV mostraram que foi possível obter nanofibras com diâmetros variando entre 600 e 700 nm. A reticulação com ácido cítrico (3% m/m) foi a única capaz de conferir estabilidade em água as fibras de PVA mantendo sua morfologia. A melhora na estabilidade térmica e o aumento da cristalinidade, promovida pela reticulação, foi observada, respectivamente, por meio das análises de TGA e DSC, DRX e FTIR. As análises de FTIR comprovaram a incorporação do fármaco nas fibras, enquanto as análises de TGA mostraram que o CLF retarda a degradação térmica do polímero. A ausência de picos referente ao CLF, nos difratogramas de raios-X e nas curvas de DSC, indicam que possivelmente, o fármaco encontra-se em um estado amorfo. O mecanismo de liberação

do CLF mostra que a cinética segue o modelo de Weibull, apresentando uma liberação instantânea nos primeiros 30 min. As membranas apresentaram hemotoxicidade abaixo do limite estabelecido, além disso, os ensaios de difusão de disco mostraram atividade antimicrobiana, indicando que estas membranas são promissoras para aplicação em curativos.

Palavras chave: Eletrofiação; Álcool poli(vinílico); Reticulação; Curativo; Cloranfenicol.

5 INTRODUÇÃO

A pele humana é o primeiro mecanismo de defesa contra a infecção por bactéria gram-positivas e gram-negativas. Trata-se de um dos órgãos mais vulneráveis sujeita a danificação da sua continuidade seja por choques mecânicos, calor, frio e agentes químicos, podendo provocar feridas [55]. A cicatrização destas feridas é processo complexo que envolve uma série de células e fatores de crescimento, assim, o objetivo de inserir biomateriais seria de recobrir o ferimento promovendo uma cicatrização efetiva como também um rápido alívio da dor [56].

O curativo moderno é preparado para proporcionar um microambiente ideal para a célula, fornecendo uma boa oxigenação local, e uma barreira física contra a contaminação bacteriana. Além de atuar na retenção de fluidos corpóreo que são liberados pelo ferimento, como também promovendo um crescimento celular ordenado capaz de reduzir as marcas cicatriciais [57]. A aplicação destes curativos podem representar uma significativa melhora no tratamento de feridas crônicas, que não cicatrizam, como as provocadas por diabetes e úlceras [58]. Estes materiais estão ganhando destaque no mercado global devido ao aumento notável de pacientes diabéticos, os quais são mais vulneráveis no desenvolvimento dessas feridas, desta forma, o não tratamento adequado pode vir a acarretar na amputação do membro [59].

Neste contexto, a produção de membranas pode ser realizada utilizando várias técnicas existentes como: fundição por solvente, inversão de fase térmica, casting entre outras. Dentre estas técnicas a eletrofiação possui um destaque na produção de membranas poliméricas porosas empregadas na engenharia de tecidos [60]. A eletrofiação trata-se de uma técnica de metodologia fácil e baixo custo empregada na produção de nanofibras em escala de nanômetros e micrômetros. Esta técnica utiliza da aplicação de um campo elétrico de alta tensão sobre uma solução polimérica, provocando então o estiramento e a formação de nanofibras [61]. Esta técnica de forma controlável, em que a alteração dos parâmetros da eletrofiação permitem a obtenção de membranas com diferentes morfologias. Portanto a alteração de parâmetros como: concentração da solução polimérica, tensão superficial, distância

agulha-coletor, tensão, fluxo, temperatura e umidade, permite a obtenção de fibras com uma alta porosidade além de uma elevada área superficial [62].

Dentre os polímeros utilizados para eletrofiação e na obtenção de biomateriais, pode-se destacar o Poli (Álcool Vinílico) PVA, o qual se trata de um polímero sintético solúvel em água, biocompatível, não toxicidade, totalmente biodegradável. Tais propriedades faz do PVA um polímero de grande interesse para aplicações biomédicas [45,63]. Este polímero possui uma elevada capacidade de sorção de água podendo absorver exsudato de feridas responsável pela proliferação bacteriana no ferimento. Outras propriedades como semipermeabilidade e estabilidade de pH ajudam na formação de um ambiente adequado para o crescimento celular [64].

Entretanto, nanofibras de PVA são instáveis em água solubilizando rapidamente em meio aquoso. Assim para aplicação em curativos em que a membrana entrará em contato com exudatos faz-se necessário a reticulação das fibras. A solubilidade do PVA está diretamente relacionada ao grau de hidroxilação, portanto, um menor grau de hidrólise proporciona uma melhor solubilidade, enquanto o PVA com graus de hidrólises maiores possuem menor solubilidade [17]. O PVA com menor grau de hidrólise possui menos OH em sua cadeia polimérica, desta forma, uma quantidade maior de agente reticulante é necessário para promover uma reticulação efetiva. Porém, o uso excessivo de agentes reticulantes como o ácido cítrico podem tornar a fibra frágil e quebradiça, ou promover um certo grau de toxicidade devido a resquícios do agente reticulante como no caso do glutaraldeído [31]. Assim, a utilização de um PVA 99% hidrolisado, por possuir uma certa estabilidade em água e resistência mecânica aprimorada, exigiram quantidades menores de agente químico para reticulação, diminuindo, portanto, a possibilidade de promover algum efeito toxico a membrana. Por fim, a utilização do PVA com elevada massa molar e 99% hidrolisado não é convencional devido as dificuldades de eletrofiação do mesmo, uma vez que a solução tende a apresentar elevada tensão superficial [18].

Além da obtenção do polímero na forma de fibra, a técnica de eletrofiação permite a produção de fibras funcionalizadas por meio do encapsulamento de nanopartículas, fármacos e compostos bioativos [65,66]. Um dos fármacos que podem ser incorporados é o cloranfenicol, que segundo a (OMS) Organização Mundial da Saúde é um fármaco genérico e essencial. Antibiótico de baixo custo, o cloranfenicol trata-se de um fármaco com amplo espectro contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, como também bactérias anaeróbicas. Utilizado no tratamento de um vasto número de patógenos, principalmente contra cólera, conjuntivite infecciosa e ferimentos provocados pela úlcera varicosa. A atividade antimicrobiana ocorre devido ao seu efeito primário inibindo a síntese de

proteínas procarióticas, assim a aplicação do cloranfenicol em curativos torna-se de grande interesse no combate a infecções graves [67,68].

Mediante ao relatado, este trabalho teve como objetivo estabelecer uma metodologia para obtenção de nanofibras de PVA de alta massa molar e 99% hidrolisado. No intuito de obter um curativo de nanofibras eletrofiadas com atividade antimicrobiana por meio da incorporação do antibiótico cloranfenicol. Bem como, investigar a eficiência dos agentes reticulantes sobre as propriedades físico-químicas das membranas eletrofiadas e sua influência sobre o perfil de liberação do fármaco.

6 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

6.1 Preparo da solução eletrofiável

Soluções álcool polivinílico (PVA) Sigma-Aldrich massa molar 85,000-124,000 grau de hidrólise 99%, com concentração de 8% m/v foram preparadas dissolvendo-se o polímero em água destilada a 80°C até a completa solubilização. Após a solução ser resfriada a temperatura ambiente, adicionou-se 10% (v/v) de etanol 99%. Juntamente com o etanol foi dissolvido 10% m/m de cloranfenicol (CLF) em relação a massa do polímero e 3% m/m de ácido cítrico (CA), todas a soluções preparadas são apresentadas na TAB. 1. Para o processo de eletrofição foram utilizados os seguintes parâmetros, sistema de coleta rotativo a 200 rpm (d), tensão de 10 kV, distância agulha coletor de 18 cm e fluxo de 1,00 mL h⁻¹.

Tabela 1 - Soluções preparadas para eletrofição.

Solução	PVA (m/m)	EtOH (m/v)	CLF (m/m)	CA (m/m)
(PVA)	8%	10%	-	-
(PVA/CA)	8%	10%	-	3%
(PVA)+CLF	8%	10%	10%	-
(PVA/CA)+CLF	8%	10%	10%	3%

6.2 Reticulação

As membranas eletrofiadas foram submetidas a dois processos de reticulação. O primeiro utilizando vapor de glutaraldeído 25% (v/v). Para isso os filmes sem CA foram suspensos sobre uma placa de petri contendo 5 mL de solução de glutaraldeído (GLA) em um recipiente hermeticamente fechado FIG. 6 e colocado na estufa a 40 °C por 3 h. Para os filmes contendo CA, após o término da eletrofição a membrana foi acondicionada na estufa a 190 °C por 10 min.

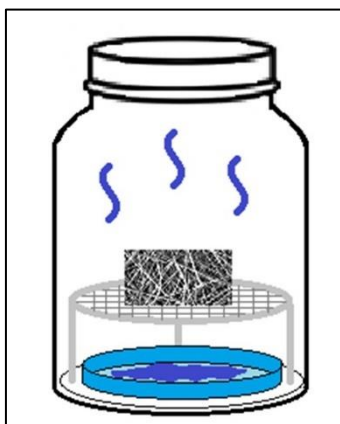


Figura 6: Esquema para a reticulação com vapor de glutaraldeído.

6.3 Caracterização das fibras

A estrutura morfológica das nanofibras foram obtidas usando microscopia eletrônica de varredura (MEV) equipamento QUANTA 250. As amostras da membrana foram fixadas ao stub com fita dupla face de carbono e metalizadas com uma fina camada de ouro, metalizador BAL-TEC – SCD 050. Com as imagens o diâmetro médio foi determinado utilizando o *software* de processamento de imagem *imagej*.

Os espectros de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) das membranas produzidas foram obtidas com o módulo de Refletância Total Atenuada (ATR) aparelho Perkin Elmer, modelo Frontier. Obtendo os espectros no intervalo de número de onda de $4000-600\text{ cm}^{-1}$, com uma resolução de 2 cm^{-1} e um total de 8 acumulações.

A análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) foi realizada em equipamento Shimadzu DSC 60. Aproximadamente 6 mg das amostras foram utilizadas, aquecendo-se de 30 °C a 300 °C com razão de aquecimento de 10 °C min^{-1} sob fluxo de nitrogênio (N_2) com vazão de $50\text{ cm}^3\text{ min}^{-1}$. A estabilidade térmica foi avaliada via análise termogravimétrica (TGA) utilizando o equipamento termogravimétrico Perkin Elmer, modelo STA 6000. Aproximadamente 5 mg das amostras foram aquecidas de 30 °C a 900 °C com razão de aquecimento de 10 °C min^{-1} , sob fluxo de nitrogênio (N_2) com vazão de $50\text{ cm}^3\text{ min}^{-1}$.

A difração de raios X (DRX) foram realizadas em equipamento Bruker®, modelo D2 Phaser com uma fonte de radiação $\text{CuK}\alpha$ de $\lambda=1,5418\text{ \AA}$, tensão 40 kV e corrente 30mA com monocromador de grafite. As membranas foram examinadas com um ângulo de varredura em um intervalo de 2θ entre 10° e 80° com incremento de $0,02^\circ$.

A resistência mecânica dos filmes foi determinada utilizando uma máquina universal de ensaios (Biopdi/ Brasil). Os filmes foram cortados em tamanho padrão com dimensões de 60 mm × 10 mm. A espessura das amostras foi mensurada com um medidor de espessura analógico (Mitutoyo, NO.7301). Uma célula de carga de 100 N foi usada para realizar o teste de tração com velocidade de deslocamento 5 mm min⁻¹, a 30 °C e umidade relativa de 30%. Para cada amostra o ensaio foi realizado em triplicata e a média dos parâmetros avaliados foram obtida.

As medições de ângulo de contato foram realizadas utilizando um microscópio USB com ampliação de 10 vezes ligado a um computador. Para a análise 5 µL de água destilada foram depositadas sobre a membrana. A gota formada foi monitorada por um período tempo de 2 min até que não fosse mais observado alteração no ângulo. Os valores do ângulo de contato foram determinados utilizando o software *imagej*.

Os espectros de RMN de ¹³C no estado sólido (RMNES) foram obtidos em um espectrofotômetro Bruker Avance III HD 300 (7,04 T), operado a uma frequência de Larmor de 75,00 MHz. As análises foram executadas em uma sonda MAS, em rotores de ZrO₂ (com tampas de Kel-F) de 4 mm. Os espectros foram obtidos numa frequência de giro de 9000 Hz, com tempo de relaxação de 1,0 s e pulso de 2,3 µs utilizando giro-ao-ângulo mágico e polarização cruzada. Os deslocamentos químicos foram padronizados de forma indireta através de uma amostra de glicina, com sinal referente a carboxila em 176,00 ppm em relação ao tetrametilsilano que é o padrão primário.

6.4 Grau de intumescimento e perda de massa

Um pedaço circular da membrana com diâmetro de 3 cm, foi colocado em imersão em solução tampão fosfato pH (5,75) a temperatura ambiente. Após 24 h a membrana foi retirada do meio tamponante, com papel filtro retirou-se o excesso da solução, e pesou-se novamente a membrana. O grau de intumescimento foi calculado pela seguinte equação (1).

$$\text{Intumescimento (\%)} = \left(\frac{M_m - M_s}{M_s} \right) \times 100 \quad (1)$$

Onde M_m e M_s são respectivamente a massa da fibra molhada e massa da fibra seca inicialmente pesada. Para a determinação da perda de massa da membrana, após o estudo de intumescimento as fibras foram completamente secas na dessecadora por 24h e pesadas. A perda de massa foi calculada pela seguinte equação (2).

$$\text{Perda de massa (\%)} = \left(\frac{M_i - M_f}{M_i} \right) \quad (2)$$

Em que M_i e M_f são a massa inicial e final respectivamente.

6.5 Taxa de transmissão de vapor da água (WVT)

A taxa de transmissão de vapor da água (WVT) foi determinada seguindo a ASTM E96/E96M-16 adaptada. No prato de teste padrão ASTM foram adicionados 5 mL de solução tampão fosfato (PBS) pH 5,7 e mantido em um pote hermeticamente fechado contendo sílica gel, o pote foi mantido em estufa a 32 °C. O conjunto contendo prato de teste solução tampão e membrana foram pesadas periodicamente por um período de 24 h obtendo-se um total de nove pontos. O WVT foi calculado pela equação (3), em que ΔW é a quantidade de água perdida em função do tempo A é a área da membrana em m^2 , e $(\Delta W/\Delta t)$ trata-se do coeficiente angular obtido pela regressão linear.

$$WVT = \frac{\Delta W}{\Delta t \cdot A} \quad (3)$$

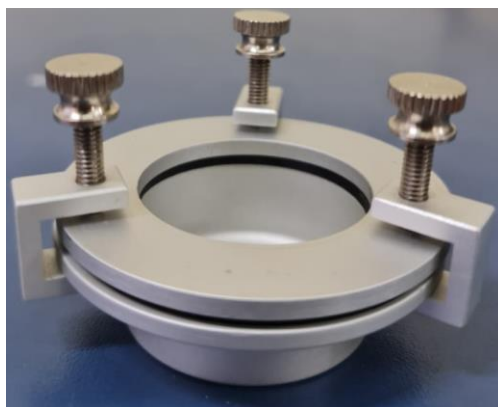


Figura 7: Célula para WVT padrão ASTM E96/E96M-16.

6.6 Teste de liberação do fármaco *in-vitro*

6.6.1 Curva de calibração

A curva de calibração para o cloranfenicol foi realizada utilizando-se uma solução padrão de 45 mg L⁻¹ de cloranfenicol preparada em solução tampão fosfato PBS pH 5,75. A partir da

solução padrão, foram realizadas as diluições necessárias para obter soluções nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 mg L⁻¹. Os espectros de absorção das amostras foram obtidos utilizando o espectrofotômetro UV-Vis SHIMAZU – UV-1800 no comprimento de onda de 278 nm, referente a absorção do fármaco CLF.

6.6.2 Liberação *in vitro* do Cloranfenicol

Para a liberação do fármaco CLF a membrana foi fixada a um suporte esférico FIG. 8 e submersa em 150 mL de solução tampão fosfato (pH 5,7). O sistema de liberação foi mantido sob agitação utilizando agitador orbital (incubadora shaker new lab) a uma temperatura de 35 ± 1 °C a 100 rpm. Nos intervalos de (1, 2.5, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos) foram retiradas alíquotas do meio de liberação e faze-se a leitura em espectrofotômetro SHIMAZU–UV-1800. A alíquota retirada para leitura foi devidamente retornada ao meio de liberação correspondente de modo a se obter um volume constante.



Figura 8: Suporte esférico de aço inox para fixação da membrana.

6.6.3 Modelos cinético de liberação

Para investigar o mecanismo cinético de liberação do CLF, os dados experimentais obtidos foram ajustados utilizando diferentes modelos matemáticos TAB. 2. Os parâmetros estatísticos como coeficiente de determinação ajustado ($R^2_{ajustado}$), Akaike Information Criterion (AIC) e Model Selection Criterion (MSC), foram usados como critério para escolha do melhor ajuste matemático. Assim, o modelo com melhor ajuste será aquele que apresentar maior valor de $R^2_{ajustado}$ e MSC e o menor valor para AIC [69].

Tabela 2 - Modelos cinéticos de liberação de fármaco aplicados.

Modelo	Equação	Referência
Primeira Ordem	$F = 100 \cdot (1 - e^{-k_1 \cdot t})$	[69,70]
Kormeyer-Peppas	$F = k_{KP} \cdot t^n$	[69]
Gompertz	$F = F_{max} \cdot e^{-\alpha \cdot e^{-\beta \cdot \log(t)}}$	[69,70]
Weibull	$F = F_{max} \cdot \left(1 - e^{-\frac{(t-T_i)^\beta}{\alpha}}\right)$	[69,70]

F: fração dissolvida em (%); k_1 : constante de primeira ordem em (min^{-1}); t: tempo em (min); k_{KP} : constante da taxa de liberação; n: expoente de liberação; F_{max} : dissolução máxima (%); α : parâmetro de escala; β : parâmetro de forma; T_i : tempo de atraso antes da liberação do fármaco.

6.7 Coagulação sanguínea e hemólise

Amostras com dimensões de 10mm x 10mm de cada membrana foram submetidas ao processo de esterilização em luz UV durante 30 min, em sequência as amostras foram viradas e mantidas por mais 30 min. O sangue foi coletado de doador saudável em tubo contendo citrato de sódio na proporção 1:9. Em seguida para o teste de coagulação sanguínea, as amostras foram colocadas em placa TPP de 24 poços. Sobre cada amostra foram depositados 100 μL do sangue citrado, em seguida adicionou-se 20 μL de solução de CaCl_2 para iniciar a coagulação. A coagulação foi monitorada nos tempos de 0, 15, 30 e 45 min, para o tempo 0 min após a adição de CaCl_2 foram adicionadas 2 mL de água deionizada de maneira cuidadosa para não perturbar o coágulo. Três alíquotas de 100 μL de cada amostra foram transferidas para uma placa TPP de 96 poços, e a as hemácias hemolizadas foram determinadas medindo-se a absorbância em 540 nm. O mesmo processo de adição de água e leitura da absorbância foi realizado para as demais amostras após incubação a 37 °C nos tempos de 15, 30 e 45 min. O controle foi realizado utilizando a placa de TPP onde o sangue foi depositado diretamente sobre a placa. A absorbância relativa de hemoglobina RHA no tempo t, foi calculada dividindo $\text{HA}(t)/\text{HA}(0)$ que são respectivamente a absorbância da hemoglobina no tempo t e no tempo 0 [71].

Para o teste de hemólise as amostras das membranas foram colocadas em tubo do tipo Falcon e adicionadas 10 mL de solução PBS, um tubo contendo apenas PBS foi utilizado como controle negativo e outro com NaOH 0,5 mol L^{-1} como controle positivo. Posteriormente os tubos foram incubados em banho maria a 37 °C por 30 min, em seguida a amostra de sangue citrato foi diluída em PBS na proporção 4:5 (4 partes de sangue para 5 de PBS). Após o término da incubação 200 μL do sangue diluído em PBS foram adicionados nos tubos, e agitados por inversão. As amostras foram então incubadas a 37 °C por 1h, após 30 min foram agitadas por inversão. Depois de incubadas foram centrifugadas a 800 g por 5 min e então 100 μL do sobrenadante foram retiradas e sua absorbância

medida em 540 nm. O aumento na absorbância da hemoglobina (HA) é decorrente da sua liberação dos glóbulos vermelhos devido a hemólise, a porcentagem de hemólise foi calculada pela equação (4) [72].

$$\text{taxa de hemólise} = \frac{(HA \text{ amostra} - HA \text{ CTRL Neg})}{(HA \text{ CTRL Posi} - HA \text{ CTRL Neg})} \cdot 100 \quad (4)$$

6.8 Permeação em pele de suíno

Para o estudo de permeação foram utilizadas amostras de orelhas de suínos, brancos, jovens e recém abatidos. As orelhas foram doadas pelo abatedouro Fazenda Experimental da Universidade Estadual de Maringá (autorizada pelo Ministério da Agricultura do Brasil para consumo humano) e seguindo todos os protocolos sanitários. As orelhas foram limpas com água bidestilada e dissecadas para a remoção de cartilagem e gordura subcutânea. Para o experimento foram utilizadas apenas peles integras, sem hematomas e/ou feridas.

Foram adquiridos os espectros das amostras de nanofibras e seus componentes, a fim de identificar as bandas de absorção. As amostras de nanofibras foram colocadas sobre a epiderme das orelhas e mantidas em contato pelo tempo de 1 hora e 6 horas para a avaliação da permeação. Decorrido o tempo, foi realizada a obtenção das regiões espectrais na derme e na epiderme, com variação de comprimento de onda de 250 – 550 nm utilizando técnica fotoacústica para as regiões espectrais do ultravioleta e do visível (PAS UV-Vis).

A potência da fonte utilizada foi de 800 W e a frequência de modulação da luz foi de 13 Hz. As leituras foram realizadas na superfície da epiderme e da derme. A espessura do tecido que contribuiu para o sinal fotoacústico é obtido pelo cálculo do comprimento de difusão térmica (m_s). Este parâmetro é definido matematicamente como $m_s = \left(\frac{d}{\pi f}\right)^{1/2}$, em que d é a difusividade térmica da amostra e f a frequência de modulação de luz. Utilizando $d = 4,1 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para a difusividade térmica do tecido (epiderme e derme) o $m_s = 32 \mu\text{m}$, o que garante que as leituras sejam realizadas próximas as superfícies nas quais a luz é incidente, sendo a espessura média das amostras de aproximadamente 1040 μm . Para cada amostra foram realizadas medidas em triplicata [73].

6.9 Atividade antibacteriana

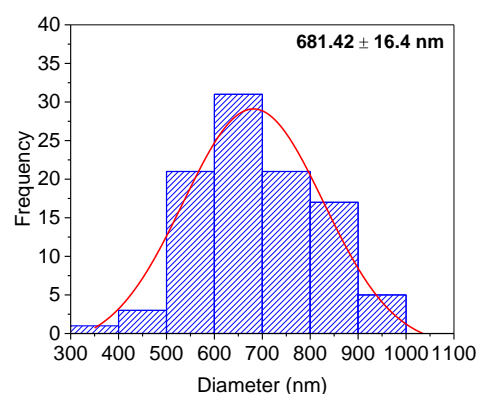
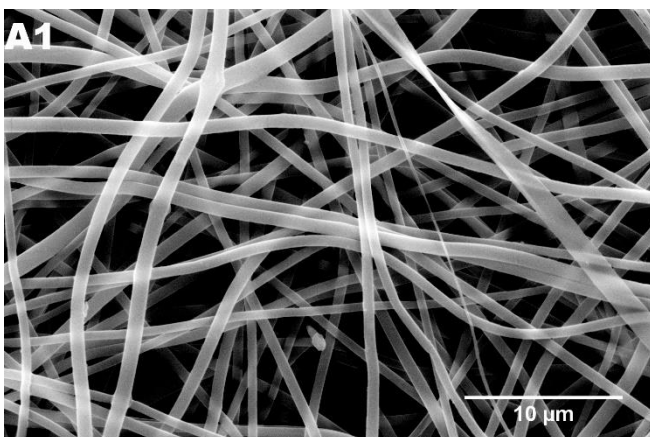
Para avaliar a atividade antimicrobiana dos filmes foi utilizado a metodologia de disco difusão, baseado nos normas do CLSI com modificações (CLSI, 2019). Foram utilizadas as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Pseudomonas*

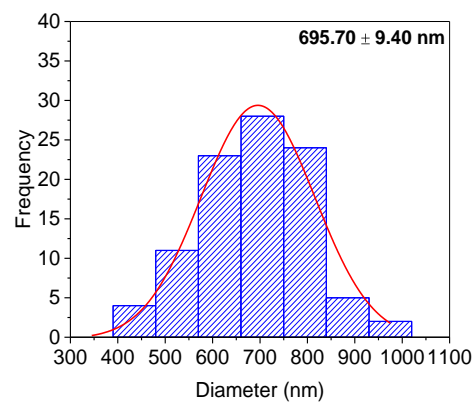
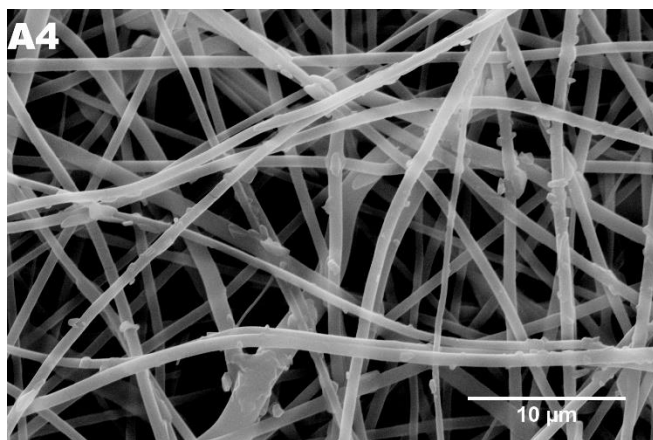
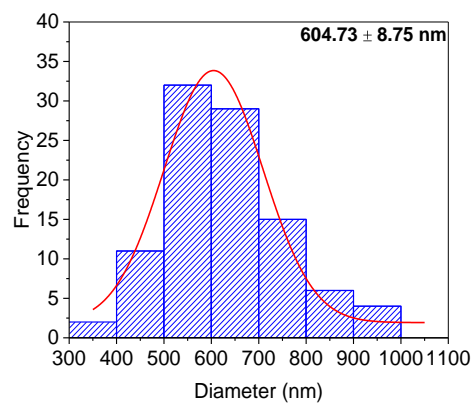
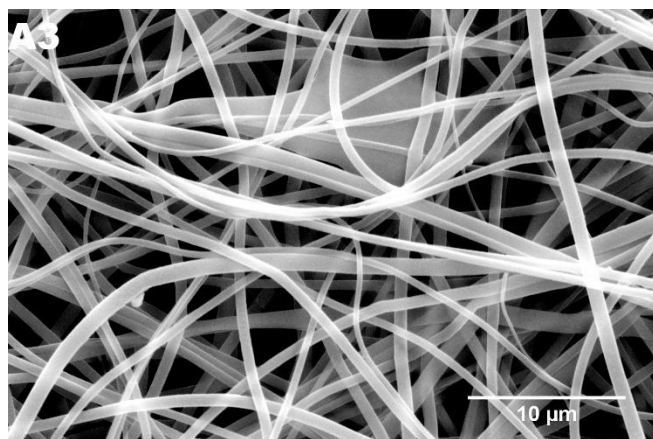
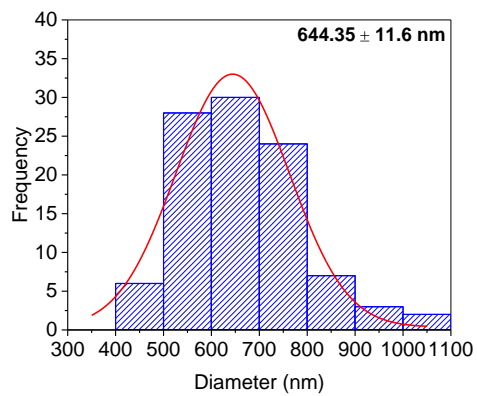
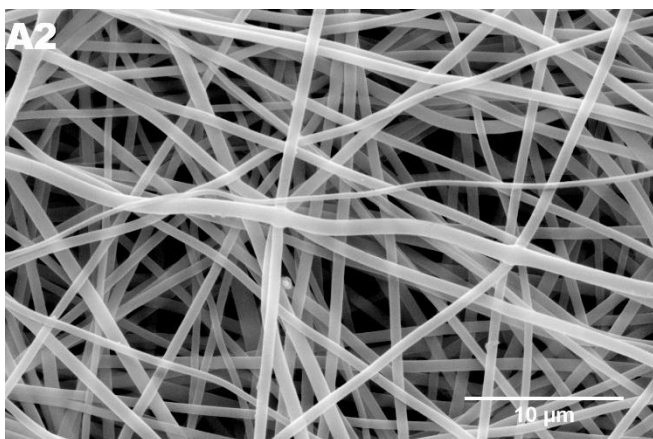
aeruginosa ATCC 27853. Colônias provenientes de culturas de 24 h a 35° C, foram adicionadas com alça bacteriológica em salina estéril (NaCl 0,85%) até se obter uma turvação compatível com a Escala 0,5 de Mac Farland (1×10^8 UFC/mL). Para confirmação da concentração de microrganismos no inóculo foi realizada leitura em espectrofotômetro a 625 nm com absorbância variando entre 0,08 - 1,0. Após o inóculo pronto embebeu-se swab estéril na suspensão bacteriana, comprimindo-o contra as paredes do tubo para tirar o excesso. Foi semeado de forma suave em pelo menos 5 direções em placa de Petri contendo Mueller Hinton Agar, abrangendo toda a superfície. Com auxílio de uma pinça flambada e resfriada, foi adicionado os discos da membrana com 4 mm de diâmetro sobre a superfície do meio inoculado. Após, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35° C por 24 h. Como controle positivo foram utilizados discos de Cloranfenicol (30 µg). Com o auxílio de uma régua mediu-se o diâmetro dos halos inibitórios de cada disco. O experimento foi realizado em triplicata.

7 RESULTADOS

7.1 Microscopia eletrônica de varredura

O estudo morfológico das membranas eletrofiadas utilizando as imagens MEV (FIG 9.) mostram que por meio da técnica de eletrofiação foi possível a obtenção das nanofibras. Para as soluções de PVA sem o fármaco CLF as nanofibras apresentaram-se homogêneas, lisas sem a presença de imperfeições e ou beads. Ainda por meio do MEV é possível observar um decréscimo no diâmetro médio das nanofibras de (PVA), (PVA/GLA) e (PVA/CA) variando de 681,42 a 604,73 nm.





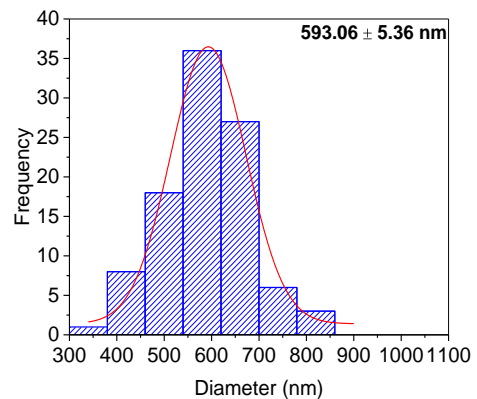
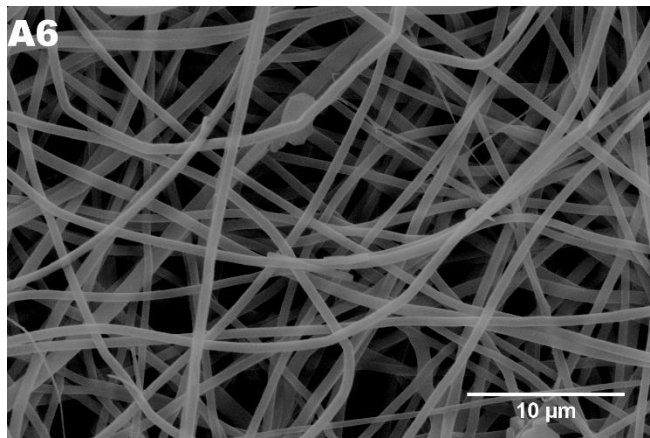
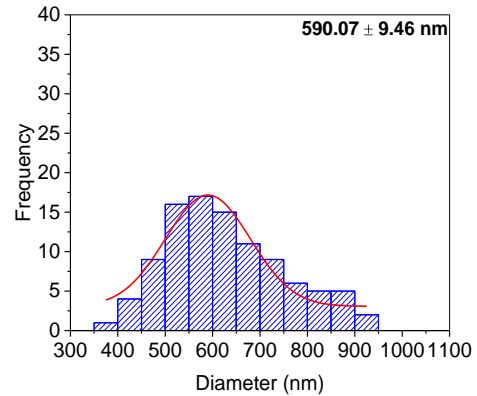
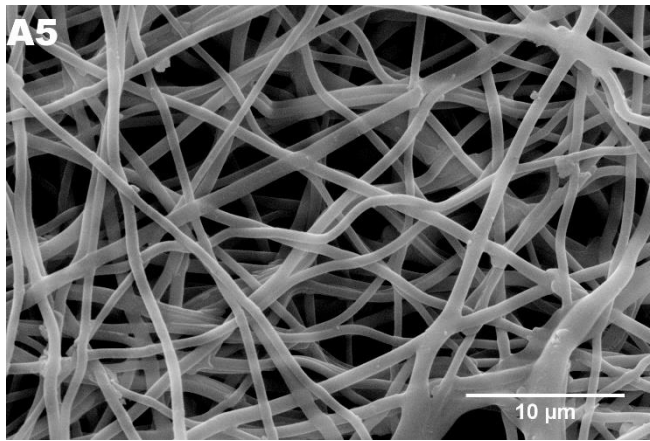


Figura 9: Microscopia eletrônica de varredura e diâmetro médio das fibras: **A1** – (PVA) membrana de álcool polivinílico; **A2** – (PVA/GLA) membrana de PVA reticulada com glutaraldeído; **A3** – (PVA/CA) membrana de PVA reticulada com ácido cítrico; **A4** – (PVA)+CLF membrana de álcool polivinílico e 10% (m/m) de cloranfenicol; **A5** – (PVA/GLA)+CLF membrana de PVA reticulado com glutaraldeído e 10% (m/m) de cloranfenicol; **A6** – (PVA/CA)+CLF reticulado com ácido cítrico e 10% (m/m) de cloranfenicol.

O diâmetro médio obtido para o PVA está associado à sua elevada massa molar e a seu alto grau de hidrólise 99%, o alto valor de massa molar acaba dificultando o relaxamento das cadeias poliméricas tornando a divisão e expansão dos jatos menos eficazes. Já o elevado grau de hidrólise resulta em uma maior tensão superficial da solução provocando um aumento na tensão crítica necessária para a ejeção do jato. Portanto, a adição de etanol para diminuição da tensão superficial pode ter ocasionado o aumento no diâmetro médio das nanofibras, como também auxiliado na evaporação do solvente [74–76].

Pelo teste de Tukey a 95% de confiança não há diferença significativa entre os diâmetros de PVA e PVA/GLA, indicando assim que a reticulação com GLA não provoca alterações morfológicas. Para a reticulação com CA embora o tratamento térmico não tenha mostrado alterações

morfológicas, a presença do reticulante provocou uma diminuição significativa no diâmetro médio ($P < 0,05$). A diminuição pode estar associada ao fato que o CA, possivelmente cause uma redução na tensão superficial, como também, a ionização do ácido poder provocar um aumento na condutividade da solução. O aumento da condutividade elétrica da solução exige uma densidade de carga maior para formação do jato, melhorando a capacidade de fiação reduzindo o diâmetro médio da fibra [77,78].

Nas membranas contendo cloranfenicol foi possível constatar a presença de grânulos possivelmente do fármaco CLF, o que pode estar associado à sua baixa solubilidade em água. Bayrakci *et al.*, (2021) obtiveram fibras lisas e homogêneas de PVA contendo CLF por eletrofiação sem a presença de grânulos utilizando DMF como solvente [79]. Ainda é possível observar que a presença do CLF causou uma diminuição no diâmetro das fibras de (PVA/GLA)+CLF e (PVA/CA)+CLF. Valenti *et al.*, (2021) relataram que na eletrofiação por fusão de PLA contendo CLF, foram obtidos menores diâmetro de fibras na presença do fármaco. Segundo o autor o fármaco causaria a alteração da polaridade do meio tornando mais suscetível a força do campo elétrico, podendo alterar o comportamento viscoelástico do polímero facilitando a eletrofiação [80].

Após a imersão das membranas em meio aquoso, tampão PBS, as membranas foram secas e as novas imagens de MEV foram obtidas. Como pode-se observar na FIG. 10 apenas as membranas reticuladas com CA apresentaram estabilidade em água, sendo capazes de manter sua morfologia e estrutura de nanofibras. No entanto, nas membranas não reticuladas as fibras coalesceram perdendo sua morfologia devido a hidrossolubilidade do PVA em água em virtude da abundância de grupos (OH) [81,82]. As membranas reticuladas com vapor de GLA apresentaram o mesmo comportamento perdendo as características morfológicas de fibras. Esta coalescência possivelmente é resultado do baixo grau de reticulação promovido pelo vapor de GLA permitindo a perda da estrutura fibrosa.

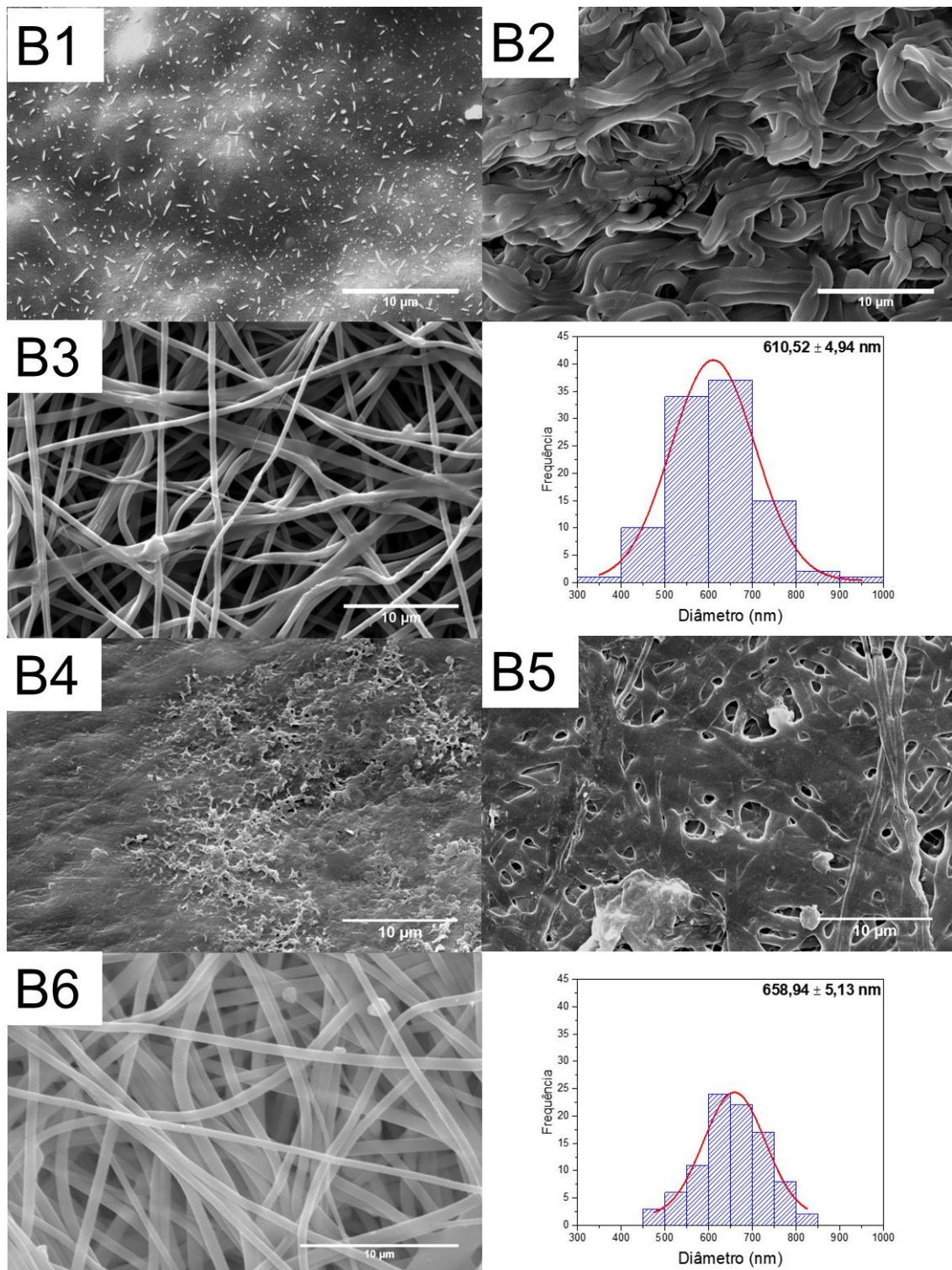


Figura 10: Microscopia eletrônica de varredura e diâmetro médio das fibras após imersão em meio aquoso: **B1** – (PVA) membrana de álcool polivinílico; **B2** – (PVA/GLA) membrana de PVA reticulada com glutaraldeído; **B3** – (PVA/CA) membrana de PVA reticulada com ácido cítrico; **B4** – (PVA)+CLF membrana de álcool polivinílico e 10% (m/m) de cloranfenicol; **B5** – (PVA/GLA)+CLF membrana de PVA reticulado com glutaraldeído e 10% (m/m) de cloranfenicol; **B6** – (PVA/CA)+CLF reticulado com ácido cítrico e 10% (m/m) de cloranfenicol.

7.2 Caracterização por espectroscopia de FTIR

Os espectros de FTIR das membranas eletrofiadas de PVA puro, e das membranas reticuladas PVA/GLA e PVA/AC, estão apresentados na (FIG. 11-I). Para o PVA é possível observar a banda larga em 3280 cm^{-1} associada a vibração de estiramento dos grupos (O – H), devido as ligações de hidrogênio inter e intramoleculares. As duas bandas com máximo em 2940 e 2910 cm^{-1} correspondem as vibrações assimétrica (ν_{as}) e simétrica (ν_s) de estiramento (C – H) dos grupos metileno ($-\text{CH}_2-$) da cadeia polimérica. Em 1426 cm^{-1} vibrações de flexão (C – H). A banda em 1142 cm^{-1} é decorrente da vibração simétrica de estiramento (C – C) nas regiões cristalinas do polímero, em 1091 cm^{-1} vibração assimétrica de estiramento (C – O) e a flexão (O – H). A vibração em 842 cm^{-1} é atribuída ao balanço de ($-\text{CH}_2-$). As vibrações observadas na região (I), FIG 11-I, são associadas ao estiramento (C – O) e (C = C) do resíduo de acetato presente no PVA [83–86].

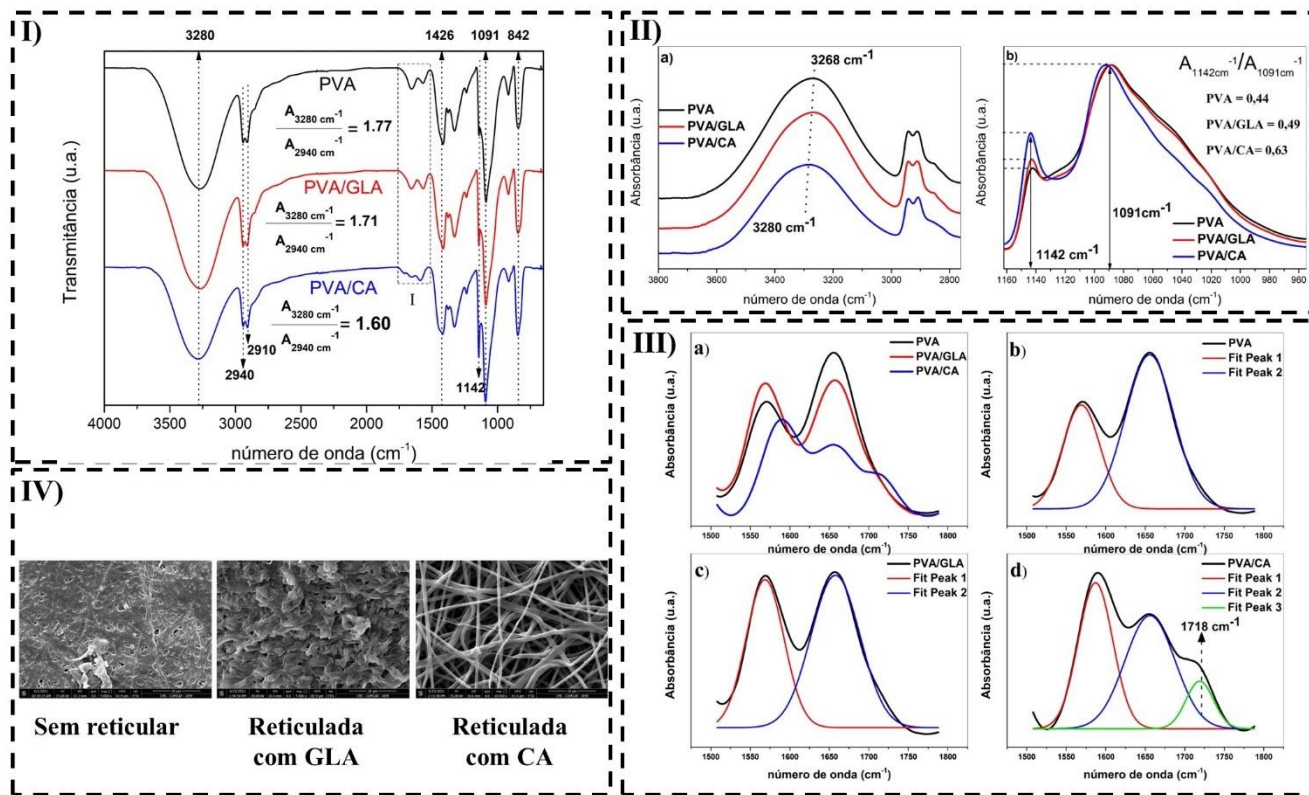


Figura 11: Caracterização por infravermelho das membranas eletrofiadas: (PVA) membrana de álcool polivinílico, (PVA/GLA) membrana de PVA reticulada com glutaraldeído, (PVA/CA) membrana de PVA reticulada com ácido cítrico. **I** - Espectros das membranas reticuladas e absorbância relativa da banda de (OH). **II** - **a)** Deslocamento do máximo da banda de (OH); **b)** cristalinidade das membranas obtida da relação ($A_{1142\text{cm}^{-1}}/A_{1091\text{cm}^{-1}}$). **III** - Deconvolução das bandas entre 1500 e 1800 cm^{-1} ; **a)** bandas entre 1500 e 1800 cm^{-1} para PVA, PVA/GLA e PVA/CA; **b)** deconvolução PVA; **c)**

deconvolução PVA/GLA; **d**) deconvolução PVA/CA. **IV** – imagens de MEV das membranas com e sem reticulação após imersão em água.

Um dos indicativos da reticulação é a diminuição da intensidade da banda de (O – H) observada pela intensidade relativa obtida entre a razão da absorvância da banda de (OH) 3280 cm^{-1} em relação a vibração em 2940 cm^{-1} ($A_{3280\text{cm}^{-1}}/ A_{2940\text{cm}^{-1}}$). A diminuição da intensidade é decorrente do consumo das hidroxilas do PVA para formação de pontes acetal com o GLA, e na reação de esterificação com o CA [87–89]. Como pode-se observar o agente reticulante CA resultou em uma diminuição mais significativa da intensidade relativa (PVA – 1,77; PVA/GLA – 1,71; PVA/CA – 1,60) indicando assim uma reticulação mais eficiente. A efetividade do CA como agente reticulante corrobora com as imagens obtidas por MEV, em que a membrana reticulada com CA foi a única capaz de manter estrutura fibrosa após imersão em água FIG. 11-IV.

Outro indicativo da reação de reticulação é o deslocamento do máximo da banda de (OH) nas membranas reticuladas FIG. 11-II(a). O deslocamento para um número de onda maior indica um possível fortalecimento das ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxilas presentes no PVA podendo estar associada a uma estrutura cristalina mais densa, alterando o ambiente químico [90]. A aumento da cristalinidade das membranas calculado pela razão entre as absorvâncias em 1142 cm^{-1} e 1091 cm^{-1} ($A_{1142\text{cm}^{-1}}/ A_{1091\text{cm}^{-1}}$) FIG. 11-II(b), trata-se de outro fator que evidencia a reticulação. Assim o aumento da intensidade relativa entre as absorvâncias indica um sistema mais cristalino, portanto a maior intensidade relativa observada para as membranas reticuladas (PVA – 0,44; PVA/GLA – 0,49; PVA/CA – 0,63) mostram que a reticulação promove um aumento na cristalinidade do sistema. A intensidade da banda em 1142 cm^{-1} está relacionada a vibração de estiramentos simétricos (O – C – C), o qual se referente a parte cristalina do PVA, ou seja, nesta região o oxigênio ligado ao carbono forma uma ligação de hidrogênio intramolecular entre dois (OH) vizinhos do mesmo lado do plano da cadeia polimérica. No entanto, a banda em 1091 cm^{-1} , refere-se ao estiramento antissimétrico (O – C – C), o qual se refere a parte amorfa do PVA. Desta forma, a razão das intensidades das bandas ($A_{1142\text{cm}^{-1}}/ A_{1091\text{cm}^{-1}}$) fornecem a cristalinidade do material [89,91,92].

Na reticulação com CA ainda é possível observar pela deconvolução utilizando a função gaussiana, das bandas entre 1500 e 1800 cm^{-1} FIG. 11-III(d) o surgimento da banda em 1718 cm^{-1} referente ao estiramento vibracional da carbonila (C = O). Esta banda sugere a formação de grupos éster alifático por meio da reação de esterificação entre as hidroxilas do PVA e carboxila do CA, favorecida pela elevação da temperatura a 190°C . [78,87,93]

A confirmação da incorporação do fármaco nas fibras eletrofiadas, e possíveis interações entre polímero e fármaco podem ser observadas a partir dos espectros de ATR-FTIR apresentados na FIG. 12. Nos espectros das membranas contendo o fármaco CLF é possível confirmação de sua presença devido ao surgimento de novas bandas. A banda em 1686 cm^{-1} refere-se à vibração de estiramento ($\text{C}=\text{O}$), a banda em 817 cm^{-1} correspondente a vibração de estiramento assimétrico ($\text{C}-\text{Cl}$). As bandas em 1520 e 1565 cm^{-1} estão relacionadas a vibração de estiramento assimétrico do grupo (NO_2), e a vibração de estiramento do anel aromático [94,95]. A presença destas bandas confirma a incorporação do fármaco cloranfenicol nas membranas eletrofiadas uma vez que não estavam presente nos demais espectros obtidos.

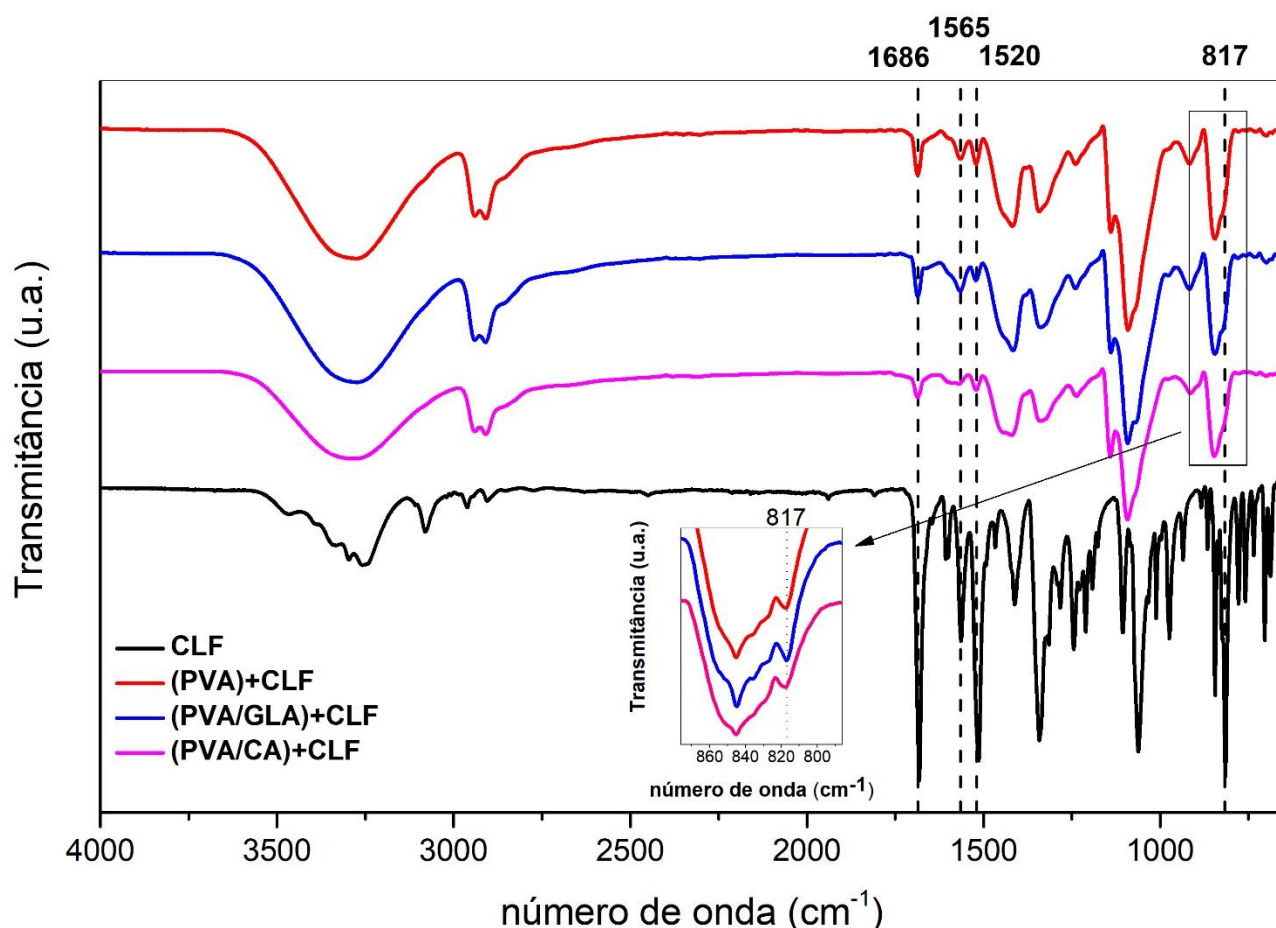


Figura 12: Espectros de FTIR das membranas eletrofiadas contendo o fármaco: **(PVA)+CLF** membrana de álcool polivinílico e 10% (m/m) de cloranfenicol; **(PVA/GLA)+CLF** membrana de PVA reticulado com glutaraldeído e 10% (m/m) de cloranfenicol; **(PVA/CA)+CLF** reticulado com ácido cítrico e 10% (m/m) de cloranfenicol; **(CLF)** cloranfenicol.

7.3 Análise Termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica das membranas de PVA eletrofiadas, e o efeito da reticulação e do fármaco sobre a estabilidade dos filmes foram analisadas por TGA. Na FIG. 13-I são apresentados o perfil térmico e a primeira derivada (-dTGA). O primeiro evento observado entre (30 – 96 °C) está associado a perda de massa ocasionado pela evaporação de moléculas de água adsorvidas na superfície devido as características hidrofílicas do polímero. O segundo evento (195 – 311 °C) está relacionado ao primeiro estágio de degradação térmica ocorrendo a desidratação perda dos grupos (OH), resultando em polímeros conjugados e não conjugados como também na cisão da cadeia. No terceiro evento ocorre o segundo estágio de degradação, referente as reações de cisão em cadeia promovendo a degradação de subprodutos, bem como, a de composto cíclicos conjugados formando resíduos carbonizados (388 – 515 °C) [16,96,97].

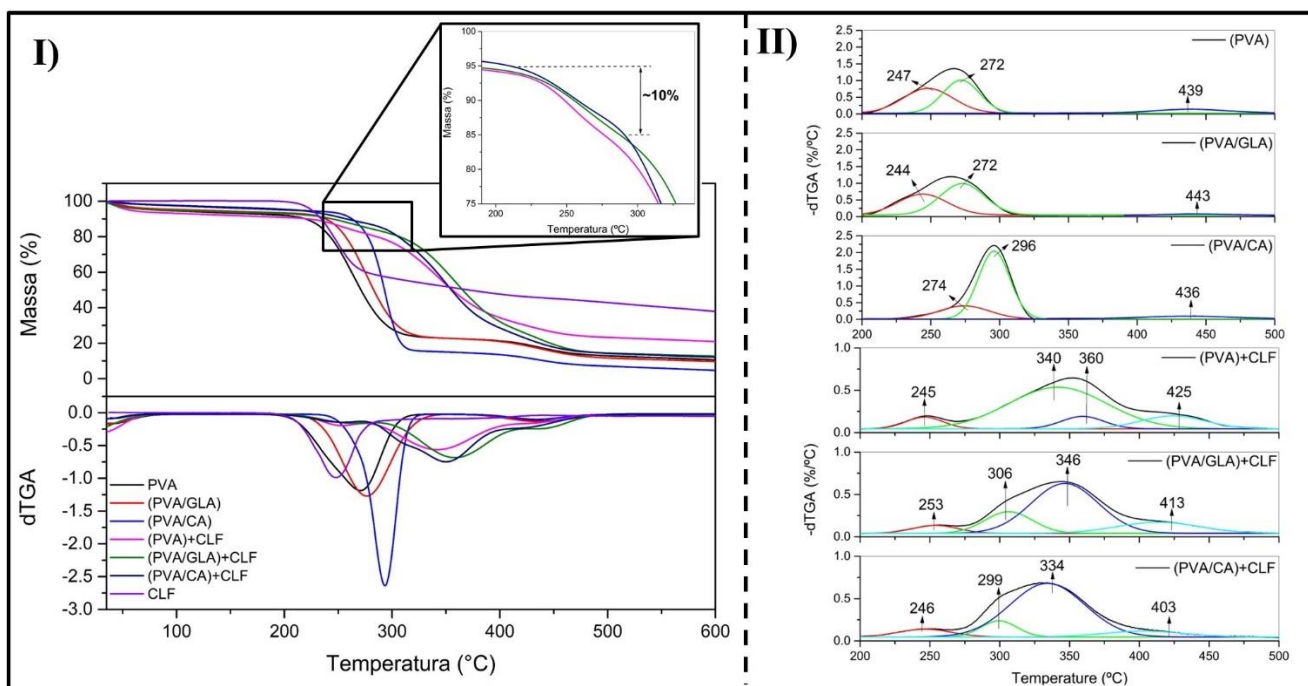


Figura 13: I – Análise termogravimétrica (TGA) e primeira derivada (-dTGA) das membranas eletrofiadas. II – Deconvolução da primeira derivada do TGA; (PVA) membrana de álcool polivinílico; (PVA/GLA) membrana de PVA reticulada com glutaraldeído; (PVA/CA) membrana de PVA reticulada com ácido cítrico; (PVA)+CLF membrana de álcool polivinílico e 10% (m/m) de cloranfenicol; (PVA/GLA)+CLF membrana de PVA reticulado com glutaraldeído e 10% (m/m) de cloranfenicol; (PVA/CA)+CLF reticulado com ácido cítrico e 10% (m/m) de cloranfenicol; (CLF) cloranfenicol.

As nanofibras reticuladas tiveram sua degradação térmica em três estágios assim como o PVA puro. Nos filmes reticulados com GLA e CA houve um aumento na estabilidade térmica observado pelo deslocamento dos picos da derivada para maiores temperaturas, como também o

aumento de T_{onset} . A maior estabilidade ocorre devido a formação de ligações covalentes entre o agente reticulante e o polímero. Entretanto, as hidroxilas que ainda se encontram presentes permitem a cisão e a degradação da cadeia principal do PVA. Para a membrana reticulada com CA como observado pela dTGA o primeiro evento ocorre de forma mais rápida e intensa, possivelmente a presença do ácido cítrico atua como catalisador protonando os grupos hidroxila para $(-\text{OH}_2^+)$ gerando um grupo de saída mais favorável (H_2O) [97]. A temperatura de degradação do terceiro estágio não tem alterações significativas para os filmes reticulados com GLA e CA, uma vez que a reticulação não altera a estrutura da cadeia carbônica do polímero, promovendo alterações apenas nos grupos laterais do polímero [98].

Por meio da deconvolução da dTGA utilizando a função gaussiana FIG. 13-II, para as membranas contendo CLF é possível observar um estágio de degradação associado a uma perda de massa de ~10%. Este estágio é referente a decomposição do fármaco presente na fibra, em que sua taxa máxima de degradação ocorre em ~250 °C. Este mesmo valor de taxa máxima foi registrado para o fármaco puro ocorrendo em apenas um estágio de degradação. Ainda é possível observar que a presença do CLF resulta em uma melhora na estabilidade térmica das membranas retardando o processo de degradação [80]. Durante a degradação térmica do PVA, a desidratação do polímero é favorecida na presença de prótons H^+ formando o grupo de saída $(-\text{OH}_2^+)$. Estes prótons podem ser fornecidos pelos compostos ácidos formados da degradação do PVA derivados dos grupos acetato presente no polímero catalisando o primeiro estágio de composição. Acredita-se que a presença de grupos com característica básica na molécula de CLF estejam atuando como receptores desses prótons durante a degradação térmica, favorecendo inicialmente a degradação do fármaco retardando o primeiro estágio de degradação térmica do polímero referente a desidratação do PVA.

7.4 Difração de raios-X (DRX)

Nos espectros de difração de raios-X, apresentados na FIG. 14, pode-se observar que o CLF se trata de um sólido cristalino, com picos de difração característicos em $2\theta = 10,80^\circ$, $12,80^\circ$, $18,85^\circ$, $25,79^\circ$ e $31,58^\circ$ referentes ao fármaco puro [99]. Por outro lado, as membranas eletrofiadas apresentaram características de sólido amorfo com o padrão de difração do PVA. O pico característico do PVA em $2\theta = 19^\circ$ referente ao plano cristalino (101) é resultado das ligações de hidrogênio, podendo ser atribuído ao cristalito do PVA [81,100–102]. Ainda é possível observar um aumento da cristalinidade causada pelos agentes de reticulação devido a maior intensidade do pico em 22° FIG. 14 (c; f) podendo estar associada a formação de cristalitos maiores, corroborando com o FTIR.

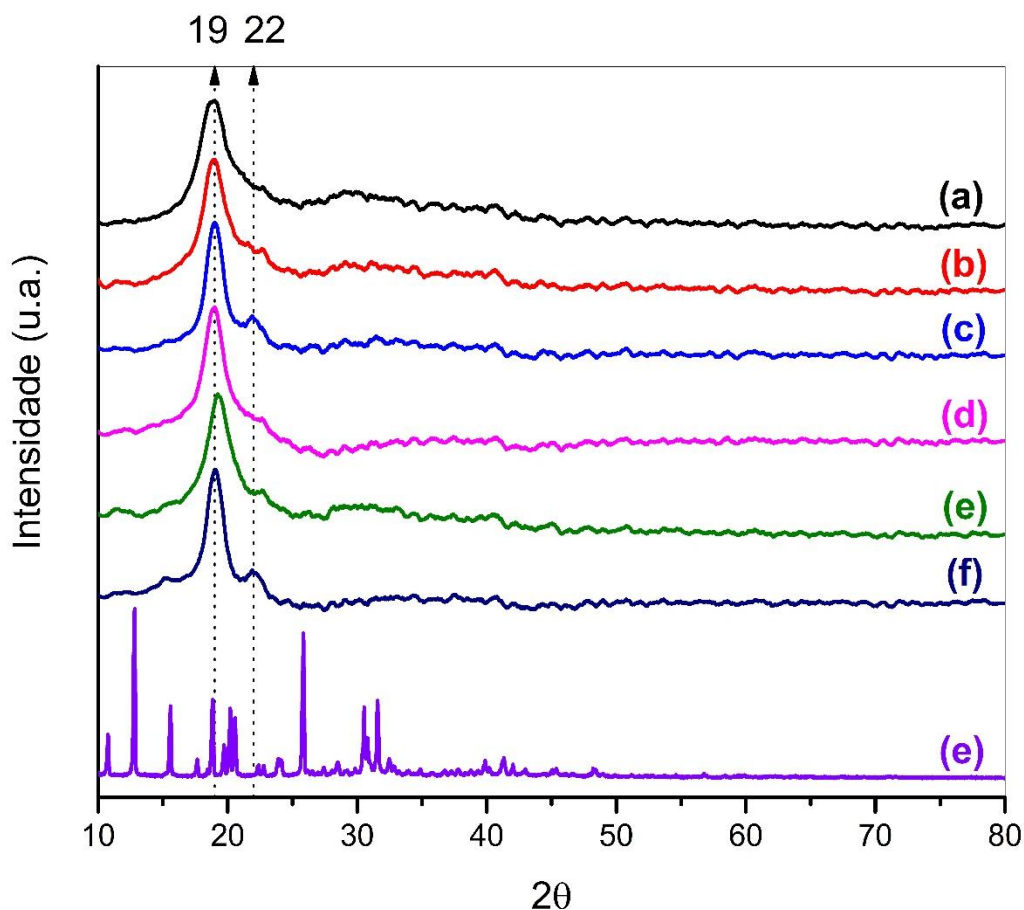


Figura 14: Espectros de difração de raios-X das membranas eletrofiadas; **a)** (PVA) membrana de álcool polivinílico; **b)** (PVA/GLA) membrana de PVA reticulada com glutaraldeído; **c)** (PVA/CA) membrana de PVA reticulada com ácido cítrico; **d)** (PVA)+CLF membrana de álcool polivinílico e 10% (m/m) de cloranfenicol; **e)** (PVA/GLA)+CLF membrana de PVA reticulado e glutaraldeído com 10% (m/m) de cloranfenicol; **f)** (PVA/CA)+CLF reticulado com ácido cítrico e 10% (m/m) de cloranfenicol; **g)** (CLF) cloranfenicol.

Nas membranas eletrofiadas contendo CLF não foi observado a presença dos picos do fármaco cristalizado. Esta observação indica que possivelmente o CLF pode estar presente em uma fase amorfa. A não recristalização do fármaco pode ocorrer devido a rápida taxa de solidificação das fibras durante o alongamento e a flambagem. A elevada área superficial das fibras favorece uma rápida evaporação do solvente no processo de eletrofição. Este fenômeno diminui a mobilidade das moléculas de fármaco sendo capaz de inibir a cinética de recristalização predominando a fase amorfa. Esta observação está de acordo com Li *et al.*, (2013) que relataram a amorfização de cafeína e riboflavina em nanofibras de PVA obtidas por eletrofição. Haroosh *et al.*, (2014) também observaram o mesmo efeito em nanofibras de PLA:PCL contendo tetraciclina. A amorfização do CLF também foi relatada por Michailidou *et al.*, (2019) em espumas de quitosana contendo até 20% (m/m) de CLF, sendo que as espumas contendo 30% (m/m) apresentou a recristalização do fármaco. A fase amorfa do

fármaco está relacionada com o aumento da solubilidade do fármaco favorecendo assim uma maior biodisponibilidade do CLF [103–107].

7.5 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Os resultados de DSC das fibras eletrofiadas são mostrados na FIG. 15-I, em que podemos observar a presença de dois picos endotérmicos para as membranas. O primeiro pico (I) entre 30 °C a 105 °C está associada perda de água, devido a umidade presente nas amostras decorrente da natureza hidrofílica do PVA. O segundo pico (II) endotérmico observado em torno de 230 °C é a fusão do PVA [103]. Para o CLF puro é possível observar a natureza cristalina do fármaco com pico de fusão em 155,5 °C. Nas membranas contendo CLF o pico de fusão característico do fármaco não é mais observado, podendo estar associado a um estado amorfo do fármaco. Este fato pode estar de acordo com os resultados apresentado no DRX, indicando que possivelmente o fármaco se encontra predominantemente em sua forma amorfa [108].

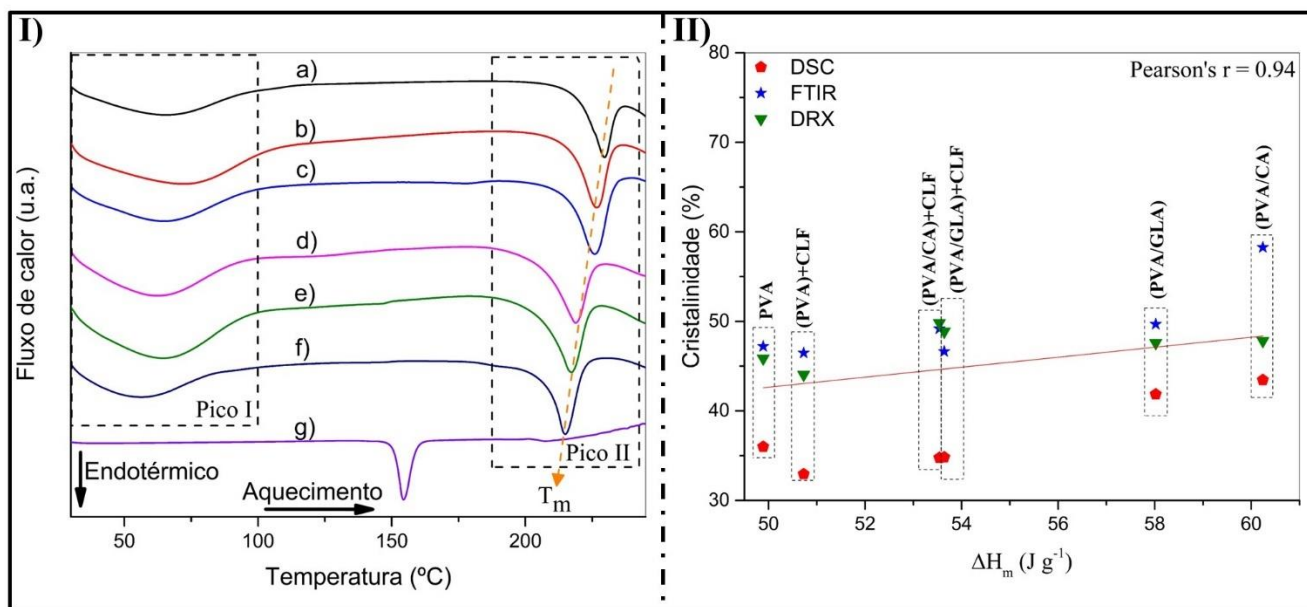


Figura 15: I – Análise calorimetria exploratória diferencial das membranas eletrofiadas; **a)** (PVA) membrana de álcool polivinílico; **b)** (PVA/GLA) membrana de PVA reticulada com glutaraldeído; **c)** (PVA/CA) membrana de PVA reticulada com ácido cítrico; **d)** (PVA)+CLF membrana de álcool polivinílico e 10% (m/m) de cloranfenicol; **e)** (PVA/GLA)+CLF membrana de PVA reticulado com glutaraldeído e 10% (m/m) de cloranfenicol; **f)** (PVA/CA)+CLF reticulado com ácido cítrico e 10% (m/m) de cloranfenicol; **g)** (CLF) cloranfenicol. II – Correlação entre a cristalinidade obtida por DRX, DSC e FTIR com a entalpia de fusão.

Pelas análises de DSC é possível observar na TAB. 3 que a presença do agente reticulante está causando uma diminuição da T_m . A queda da temperatura de fusão pode ser resultado da

diminuição das interações intermoleculares entre grupos hidroxila durante a reticulação, devido um menor número de ligações de hidrogênio entre as cadeias poliméricas.

As membranas contendo o CLF também é observado uma diminuição da T_m , podendo estar associada a uma redução nas interações intermoleculares entre as estruturas cristalinas lamelares do PVA. A presença de grupos hidroxilas do CLF permite interações de hidrogênio com o PVA, podendo ocasionar o afastamento das estruturas lamelares do polímero. Este afastamento pode favorecer uma menor interação entre as lamelas FIG. 16-C, promovendo uma diminuição no ponto de fusão.

Embora tenha diminuído o ponto de fusão, observou-se um aumento na entalpia de fusão (ΔH) para as membranas reticuladas. Levando em consideração o fato que polímeros são sistemas complexos e que o PVA utilizado neste trabalho apresenta alto grau de hidrólise (99%) e massa molar. O aumento da entalpia de fusão pode estar associado ao fato do agente reticulante proporcionar a formação de uma nova conformação da cadeia polimérica. Dando origem a estrutura cristalina diferente aumentando, portanto, a cristalização ou a perfeição dos cristais. O aumento da cristalinidade corroborando assim com os espectros de DRX e FTIR [102,109,110].

Tabela 3 - Parâmetros obtidos da análise de DSC.

Amostra	T_m (°C)	$\Delta H_{\text{melting}}$ (J/g)
(PVA)	229,64	49,89
(PVA/GLA)	226,57	58,02
(PVA/CA)	226	60,24
(PVA)+CLF	218,89	50,73
(PVA/GLA)+CLF	217,17	53,64
(PVA/CA)+CLF	214,95	53,54
CLF	155,55	102,26

T_m – temperatura de fusão em °C; $\Delta H_{\text{melting}}$ – entalpia de fusão em J/g. (PVA) membrana de álcool polivinílico; (PVA/GLA) membrana de PVA reticulada com glutaraldeído; (PVA/CA) membrana de PVA reticulada com ácido cítrico; (PVA)+CLF membrana de álcool polivinílico e 10% (m/m) de cloranfenicol; (PVA/GLA)+CLF membrana de PVA reticulado com glutaraldeído e 10% (m/m) de cloranfenicol; (PVA/CA)+CLF reticulado com ácido cítrico e 10% (m/m) de cloranfenicol.

O gráfico apresentado na FIG. 15-II representa a relação entre a entalpia de fusão e a média das cristalinidades dos filmes obtidas por FTIR, DRX e DSC. É possível observar pelo r da correlação de Pearson's que existe uma relação linear entre ΔH_m e a cristalinidade dos filmes. O aumento da cristalinidade e da entalpia de fusão também foi observado por Quin e Wang (2008) em que relataram este efeito em nanofibras de PVA reticuladas com ácido maleico [82].

7.6 Propriedades Mecânicas

Além da biocompatibilidade e não toxicidade materiais projetados para engenharia de tecidos devem apresentar também boas propriedades mecânicas, sendo ao mínimo capaz de resistir a manipulação do material. O ensaio de resistência a tração para as membranas é apresentado na FIG. 16-A. Na TAB. 4 estão os valores de resistência a tração, alongamento na ruptura e módulo de elasticidade. A reticulação com GLA resultou em um aumento da tensão máxima de ruptura e no módulo de elasticidade, como também na diminuição do alongamento. Este fato está diretamente relacionado as ligações covalentes cruzadas inter e intracadeias dos grupos acetais formados com o agente reticulante. O aumento do módulo de elasticidade e a diminuição do alongamento indicam que a reticulação com GLA tornou a fibra mais rígida e densamente empacotada [81,90,103,111].

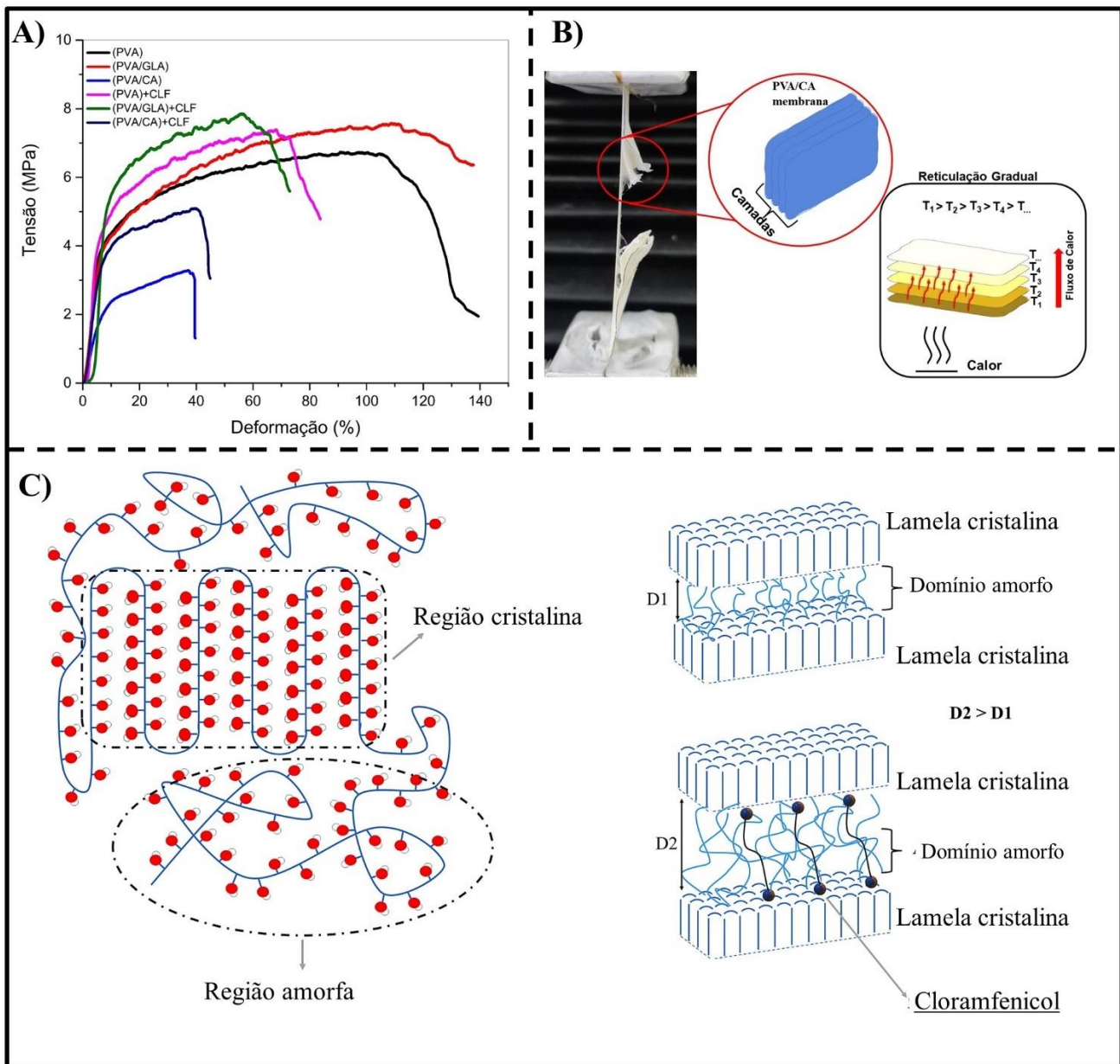


Figura 16: **A** – Análise mecânica das membras; **(PVA)** membrana de álcool polivinílico; **(PVA/GLA)** membrana de PVA reticulada com glutaraldeído; **(PVA/CA)** membrana de PVA reticulada com ácido cítrico; **(PVA)+CLF** membrana de álcool polivinílico e 10% (m/m) de cloranfenicol; **(PVA/GLA)+CLF** membrana de PVA reticulado com glutaraldeído e 10% (m/m) de cloranfenicol; **(PVA/CA)+CLF** reticulado com ácido cítrico e 10% (m/m) de cloranfenicol. **B** – Camadas formada nas membranas contendo CA e esquema da possível reticulação gradual da membrana. **C** – Estrutura cristalina lamelar efeito do cloranfenicol no afastamento das lamelas.

Normalmente o processo de reticulação de membranas polimérica tem como efeito o aumento da rigidez (módulo de elasticidade), e diminuição na ductibilidade (alongamento) [90]. As membranas reticuladas com CA apresentaram diminuição significativa no alongamento, efeito esperado no processo de reticulação, mesmo efeito observado por Sonker *et al.*, (2017) em membras de

PVA reticuladas com CA [98]. Entretanto, para as membranas reticuladas com CA ocorreu uma diminuição da tensão máxima de ruptura e do módulo de elasticidade, efeito antagônico de uma reticulação. Este fato está relacionado com a forma que estas membranas rompiam durante os ensaios. Observou-se que as membranas rompiam em camadas como se ela fosse constituída pela união de várias membranas empilhadas lembrando as camadas de uma cebola (comportamento lamelar) (FIG. 16-B). Este efeito influencia diretamente sobre os parâmetros obtidos na análise mecânica uma vez que a espessura do material medida não condiz com a espessura real, influenciando diretamente sobre os valores obtidos na análise, uma vez que o módulo de elasticidade é normalizado pela espessura.

Essa estrutura reticulada em camadas de forma graduada também foi observada por Gulino *et al.*, (2022) em que o estabelecimento de um gradiente térmico durante a reticulação diminuindo gradualmente entre as camadas induza esse tipo de estrutura [112]. Sabe-se que diferentes temperaturas promovem graus diferente de reticulação FIG. 16-B, assim pode-se dizer que a camada mais externa é a primeira a atingir a temperatura necessária para iniciar a reticulação. Desta forma, as camadas mais internas só iniciarão a reticulação a mediada que forem atingindo a temperatura necessária, reticulando gradualmente em camadas. A separação entre as camadas pode estar relacionada a estrutura lamelar dos cristalitos de PVA como se fossem placas do polímero dobradas sobre sua própria cadeia polimérica [89]. Como foi observado o aumento na cristalinidade o CA pode atuar como pontos de nucleação favorecendo a cristalização do PVA. O aumento da cristalinidade pode resultar em estruturas com cristais lamelares mais definidos FIG. 16-C e uma maior densidade de cristais (lamelas mais espessas), assim como relatado por Zhou *et al.*, (2021) [113].

A presença do fármaco CLF proporcionou melhora significativa nas propriedades mecânicas de todas as membranas, tornando-as mais resistentes, aumentando os valores de tensão de ruptura e do módulo de elasticidade. Este fato está relacionado, possivelmente, a uma forte interação via ligação de hidrogênio entre os grupos (OH) do CLF e do PVA, atuando como uma ponte de ligação na região amorfa entre as cadeias poliméricas FIG. 16-C. Essas interações melhoram a capacidade da membrana em absorver energia durante a aplicação de carga no ensaio uniaxial, promovendo um aumento na resistência à tração [64].

Tabela 4 - Parâmetros obtidos da análise mecânica.

Amostra	σ (MPa)	ϵ (%)	Modulo de elasticidade (MPa)
(PVA)	6,55 \pm 0,26	139,37 \pm 0,099	96,55 \pm 0,007
(PVA/GLA)	7,21 \pm 0,92	138,44 \pm 35,14	98,12 \pm 4,278
(PVA/CA)	3,59 \pm 0,44	37,69 \pm 2,79	53,47 \pm 4,702
(PVA)+CLF	7,07 \pm 0,45	81,91 \pm 2,60	152,66 \pm 17,430
(PVA/GLA)+CLF	7,51 \pm 0,48	77,15 \pm 1,62	138,51 \pm 19,530
(PVA/CA)+CLF	4,98 \pm 0,15	40,82 \pm 5,81	73,72 \pm 5,812
Pele humana	2 – 16 ^a	70 – 77 ^a	6000 – 40000 ^a

σ – Tensão de ruptura em MPa; ϵ - Alongamento em %; Módulo de elasticidade em MPa. ^a referência [60]. (PVA) membrana de álcool polivinílico; (PVA/GLA) membrana de PVA reticulada com glutaraldeído; (PVA/CA) membrana de PVA reticulada com ácido cítrico; (PVA)+CLF membrana de álcool polivinílico e 10% (m/m) de cloranfenicol; (PVA/GLA)+CLF membrana de PVA reticulado com glutaraldeído e 10% (m/m) de cloranfenicol; (PVA/CA)+CLF reticulado com ácido cítrico e 10% (m/m) de cloranfenicol.

7.7 Espectroscopia de RMN ¹³C CP/MAS

As análises de RMN ¹³C em estado sólido das membranas de PVA são apresentados na FIG. 17-I. Para os espectros de RMN o pico agudo em 44 ppm está relacionado aos grupos CH₂, e os picos (I, II e III) localizados em (74,71; 69,45 e 64,47 ppm) são característicos dos grupos CH da cadeia polimérica. Os três picos de CH observados são referentes a taticidade do polímero sendo assim o pico associadas as porções isotática (I), atática (II) e sindiotática (III) do PVA [86,114]. O aparecimento desses picos está relacionado as ligações de hidrogênio inter e intramolecular, sendo assim o pico (I) é atribuído ao CH com duas ligações de hidrogênio, (II) com uma ligação de hidrogênio e (III) com nenhuma ligação de hidrogênio entre os grupos hidroxila. O aumento da intensidade do pico em 74,71 ppm nas membranas reticuladas é um indicativo que a reticulação pode estar favorecendo a porção isotática, promovendo um maior número de interação de hidrogênio inter e intramolecular entre grupos OH vizinhos. Possivelmente em função do dobramento das cadeias polimérica na formação de cristalitos maiores [115]. Corroborando com o aumento da banda em 1141cm⁻¹ no FTIR FIG. 11-II(b) relacionada a vibração de estiramento C – O da cadeia polimérica onde há a formação de ligação de hidrogênio entre dois grupos OH vizinhos [92], bem como, com a análise de DRX e mecânica. Os picos característicos do fármaco CLF FIG. 17-II observados entre 110 e 180 ppm também podem ser observados nas membranas como sinais de baixa intensidade nesta mesma região. Portanto, a presença destes picos confirma a presença do fármaco na matriz de PVA eletrofiada, assim como observado no FTIR FIG. 12 [116].

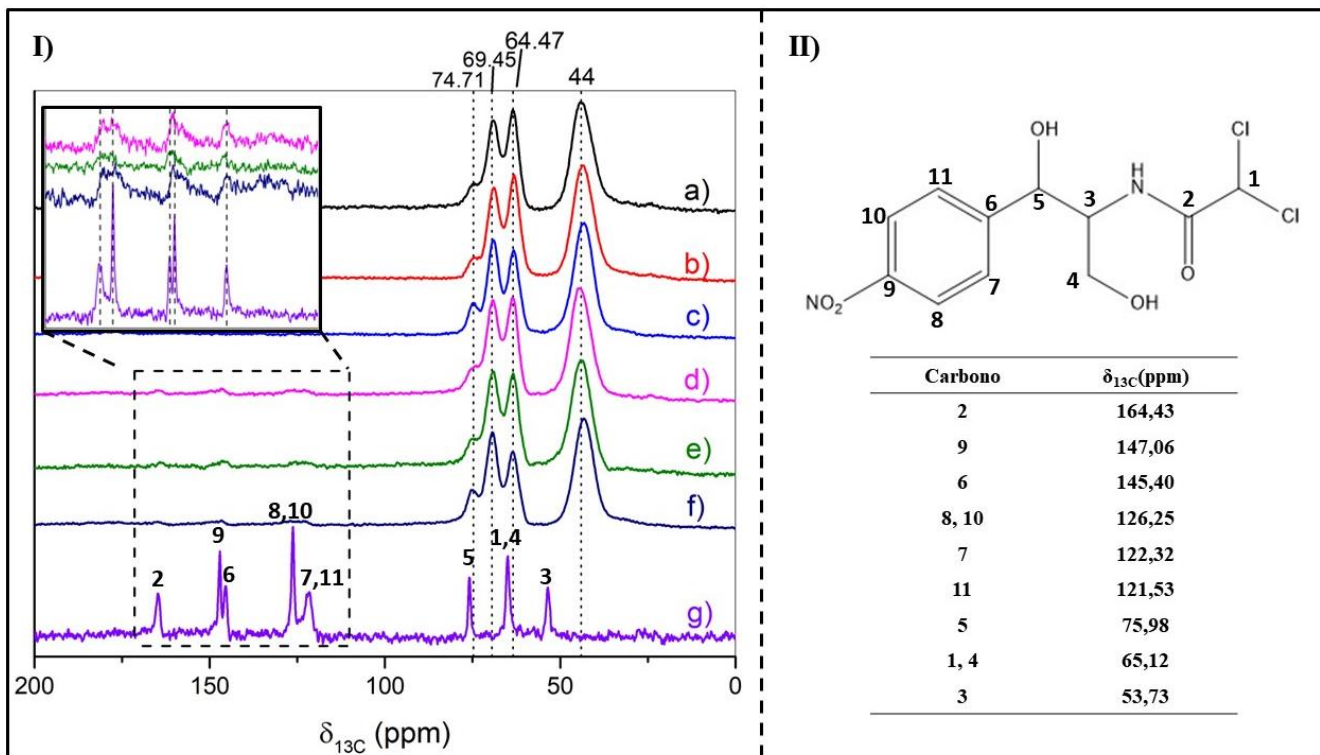


Figura 17: I – Espectros de RMN ^{13}C , **a)** (PVA) membrana de álcool polivinílico; **b)** (PVA/GLA) membrana de PVA reticulada com glutaraldeído; **c)** (PVA/CA) membrana de PVA reticulada com ácido cítrico; **d)** (PVA)+CLF membrana de álcool polivinílico e 10% (m/m) de cloranfenicol; **e)** (PVA/GLA)+CLF membrana de PVA reticulado com glutaraldeído e 10% (m/m) de cloranfenicol; **f)** (PVA/CA)+CLF reticulado com ácido cítrico e 10% (m/m) de cloranfenicol; **g)** (CLF) cloranfenicol; **II** – Deslocamentos químico de seus respectivos carbono para a molécula de cloranfenicol.

7.8 Ângulo de contato

A hidrofiliçidade da membrana é de grande importância para as aplicações biomédicas podendo influenciar na liberação de fármacos, e na fixação e crescimento celular [64,117]. O ângulo de contato com a água é utilizado como indicador do comportamento característico de uma superfície, empregado para determinar sua natureza hidrofílica ou hidrofóbica. Assim a molhabilidade de uma superfície pode ser determinada pelo valor do ângulo de contato. Ângulos menores que 90° indicam que a molhagem da superfície é favorável, e valores maiores à 90° a molhagem é desfavorável [60,98]. Com os resultados apresentados na FIG. 18-A pode-se observar que todas as membranas eletrofiadas em $t = 1$ segundo apresentaram ângulos iguais a 0° devido à natureza hidrofílica do PVA. As membranas reticuladas apresentaram um aumento no ângulo de contato, isto ocorre devido a diminuição de grupos hidroxila livres na superfície (OH) pela reação com GLA e CA formando ligações covalente durante a reticulação. Embora reticulação tenha diminuído a hidrofiliçidade o

ângulo de contato dinâmico para todas as membranas foi igual a 0° após 1 segundo FIG. 18-B Sendo possível observar uma absorção instantânea após o contato da gota com a superfície não sacrificando a hidrofiliicidade dos filmes [78,79,111].

Na presença do fármaco CLF a hidrofiliicidade da membrana aumentou com a diminuição do ângulo de contato que pode estar relacionada a presença dos grupos hidrofílicos (OH) presentes na molécula do fármaco, permitindo interações de hidrogênio com a água. Portanto a elevada hidrofiliicidade observada nas membranas são extremamente favoráveis para a adesão e crescimento celular e cicatrização [64].

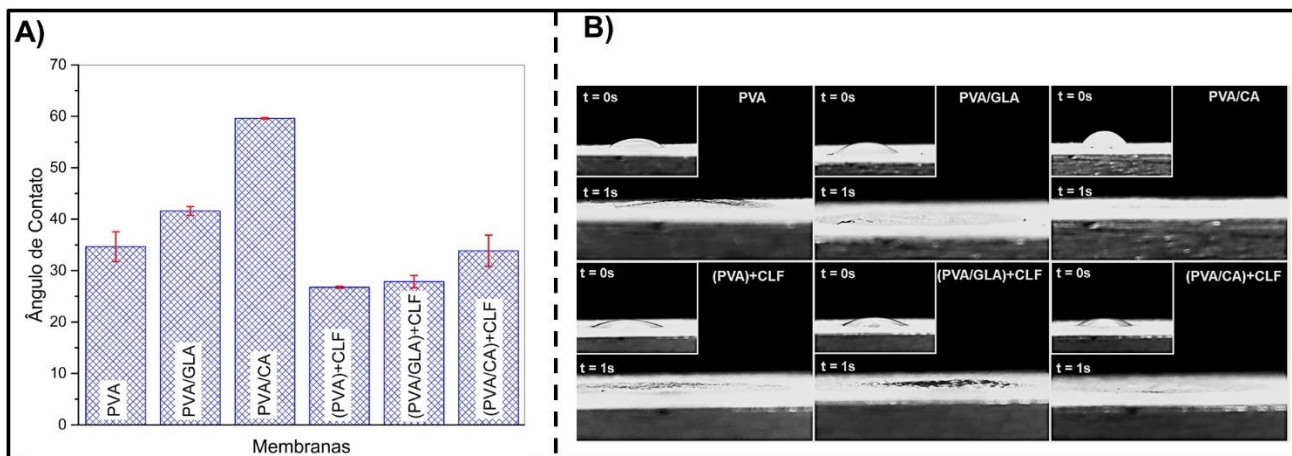


Figura 18: Análise da hidrofiliicidade das membranas eletrofiadas. **A)** ângulo de contato inicial para as membranas eletrofiadas em tempo 0 s; **B)** Imagens da gota em t = 0s e após 1s. As abreviações correspondem a **(PVA)** membrana de álcool polivinílico; **(PVA/GLA)** membrana de PVA reticulada com glutaraldeído; **(PVA/CA)** membrana de PVA reticulada com ácido cítrico; **(PVA)+CLF** membrana de álcool polivinílico e 10% (m/m) de cloranfenicol; **(PVA/GLA)+CLF** membrana de PVA reticulado com glutaraldeído e 10% (m/m) de cloranfenicol; **(PVA/CA)+CLF** reticulado com ácido cítrico e 10% (m/m) de cloranfenicol.

7.9 Grau de Intumescimento e perda de massa

Com os resultados apresentados na FIG. 19-I para grau de intumescimento e solubilidade em água, é possível observar que todas as membranas tiveram capacidade de inchar e reter água em decorrência da sua alta área superficial e porosidade. A elevada área superficial e porosidade são resultado da estrutura de nanofibras, estas características da membrana altera a solubilidade do PVA tornando-o mais solúvel a temperatura ambiente. Desta forma, as membranas de PVA não reticuladas tiveram a maior perda de massa, por volta de 60% da sua massa inicial [77,118,119].

As membranas de PVA reticuladas tiveram uma diminuição na capacidade de intumescer em água, propriedade que depende das interações entre o polímero e solvente. A reação entre os grupos funcionais dos agentes reticulantes GLA e CA com a hidroxila do PVA diminui o

número de hidroxila disponíveis. Com a redução dos grupos OH nas membranas tem-se uma diminuição do número de interações de hidrogênio com a água, reduzindo assim a capacidade de inchar da membrana. A diminuição na capacidade de intumescer também está relacionado ao fato que reticulação com as moléculas de baixa massa molar, favorece a formação de uma estrutura de rede mais compacta tornando o filme mais rígido e com menores espaços intermoleculares [120–122]. A formação de pontos de reticulação também resultam na redução do tamanho dos poros da membrana, diminuindo assim a capacidade de inchar.

O aumento no intumescimento das membranas de PVA e PVA/CA contendo CLF, pode estar associada a liberação do fármaco contido no interior da matriz polimérica. A saída do fármaco promove a formação de poros ou interstícios, permitindo que mais solvente penetre na membrana aumentando sua capacidade de inchar [78,79,93].

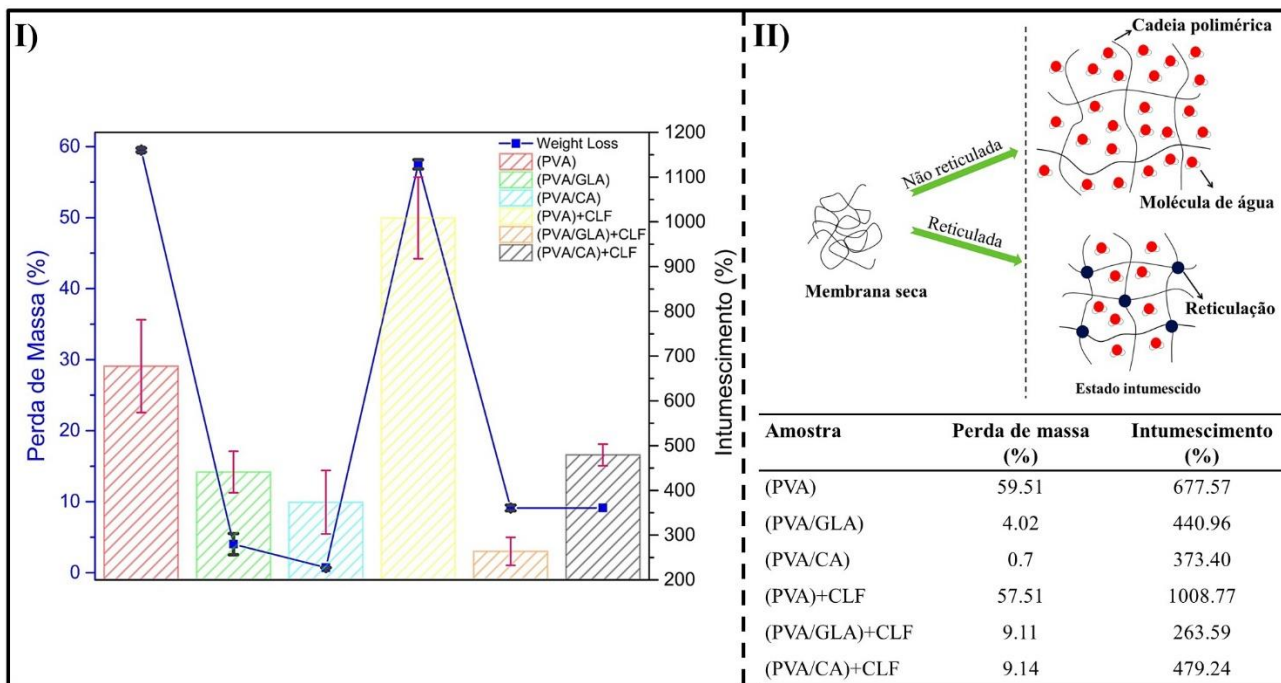


Figura 19: I – Grau de intumescimento e perda de massa. **II** – valores obtidos de intumescimento e perda de massa; **(PVA)** membrana de álcool polivinílico; **(PVA/GLA)** membrana de PVA reticulada com glutaraldeído; **(PVA/CA)** membrana de PVA reticulada com ácido cítrico; **(PVA)+CLF** membrana de álcool polivinílico e 10% (m/m) de cloranfenicol; **(PVA/GLA)+CLF** membrana de PVA reticulado com glutaraldeído e 10% (m/m) de cloranfenicol; **(PVA/CA)+CLF** reticulado com ácido cítrico e 10% (m/m) de cloranfenicol.

Outro fator importante para evidenciar a reticulação é a perda de massa em meio aquoso. Como apresentado na FIG. 19-II, as membranas não reticuladas tiveram perda de aproximadamente

60% de sua massa, já para as membranas reticuladas esta perda foi de 4,02% para a membrana (PVA/GLA) e 0,7% para (PVA/CA). As membranas reticuladas contendo o fármaco CLF tiveram perdas de 9,11% e 9,14% referente aos 10% do fármaco. Embora o GLA tenha sido capaz de promover um certo grau de reticulação, este método não se mostrou eficaz devido a perda da estrutura morfológica após contato com água como apresentado na imagem obtidas por MEV FIG. 10 (B2 e B5). Portanto o CA trata-se de um agente reticulante promissor para produção de PVA eletrofiados estáveis em meio aquoso [103].

7.10 Taxa de transmissão de vapor de água

Controlar a umidade de uma ferida é um fator importante na cicatrização. Uma ferida extremamente seca pode retardar a cicatrização, bem como o acúmulo excessivo de exsudato pode favorecer uma infecção ou maceração. Portanto, o curativo ideal deve ser capaz de controlar a taxa de transmissão de vapor, mantendo um valor ideal de permeação proporcionando um ambiente adequado para o ferimento [123]. A taxa de permeação de vapor para uma pele saudável é de $204 \text{ g/m}^2 / \text{dia}$, já uma pele lesada a perda de água pode variar de $279 \text{ g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ a $5138 \text{ g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$. A permeabilidade ideal de um curativo sem fornecer riscos com relação a desidratação de ferida é de $2500 \text{ g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ garantindo assim um nível adequado de umidade [123,124]. Como pode-se observar na TAB. 5, as membranas sem o fármaco CLF tiveram valores de (WVP) mais próximos ao ideal, o que pode estar relacionada com as alterações causadas pelo CLF nas propriedades como hidrofiliabilidade e diâmetro das fibras. A permeabilidade de vapor é uma propriedade influenciada pela porosidade da membrana, desta forma redução no diâmetro das fibras causado pelo CLF resulta em membranas mais porosas. Outro fator é a hidrofiliabilidade do material em que a permeação do vapor de água ocorre após a hidratação da membrana, como observado na análise de ângulo de contato a presença do CLF melhorou a hidrofiliabilidade da membrana [60,125]. Ainda para as membranas de PVA e PVA/GLA a absorção de água pode ocasionar o inchamento da fibra, promovendo uma diminuição dos poros entre as fibras reduzindo a capacidade de permeação de vapor da água. Estando de acordo como as imagens de MEV em que essas membranas perdem facilmente sua estrutura fibrosa em contato com a água.

Tabela 5 - Taxa de transmissão de vapor da água para as membranas eletrofiadas.

Membrana	WVP ($\text{g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$)	R ²
PVA	2571.36	0.99
PVA/GLA	2543.05	0.99
PVA/CA	3401.74	0.99
(PVA)+CLF	3279.07	0.99
(PVA/GLA)+CLF	3583.39	0.99
(PVA/CA)+CLF	3623.49	0.99

WVP - taxa de permeação de vapor em $\text{g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$, R² - coeficiente de determinação. (PVA) membrana de álcool polivinílico; (PVA/GLA) membrana de PVA reticulada com glutaraldeído; (PVA/CA) membrana de PVA reticulada com ácido cítrico; (PVA)+CLF membrana de álcool polivinílico e 10% (m/m) de cloranfenicol; (PVA/GLA)+CLF membrana de PVA reticulado com glutaraldeído e 10% (m/m) de cloranfenicol; (PVA/CA)+CLF reticulado com ácido cítrico e 10% (m/m) de cloranfenicol.

7.11 Liberação in vitro do cloranfenicol

Investigar o perfil de liberação do fármaco é de grande importância para a aplicação médica do material. A fim de simular o microambiente da pele a liberação do CLF foi realizada em tampão PBS (pH = $5,7 \pm 0,1$). A FIG. 20 mostra os perfis de liberação do CLF das membranas eletrofiadas, como pode-se observar todas as membranas apresentaram uma liberação instantânea nos primeiros 30 min. Característica desejável para curativos em que se pretende uma ação antimicrobiana inicial aprimorada [107].

A liberação de instantânea do fármaco está relacionada a elevada hidrofiliabilidade da membrana que facilita a difusão da água promovendo o inchaço e a dissolução do fármaco, como também a presença do fármaco que se encontra possivelmente em grande parte na superfície da fibra. Outro fator é a possível presença de uma quantidade do fármaco na superfície da membrana, esta será liberada instantaneamente, em comparação com o fármaco que está alojado internamente nas fibra [79,105,126].

Para as membranas reticuladas é constatado uma diminuição na liberação máxima, chegando a 84,4% para GLA e 75,4% para CA. A redução na % liberada pode estar associada a diminuição na hidrofiliabilidade e capacidade de inchaço das membranas devido a reticulação. Ainda para as membranas reticuladas a cristalinidade do sistema tem influência sobre a liberação, pois com o aumento da cristalinidade restringe-se a mobilidade das moléculas do fármaco, na matriz polimérica, dificultando a liberação, e uma cristalinidade menor facilita a desintegração do filme acelerando a liberação do fármaco [106,127].

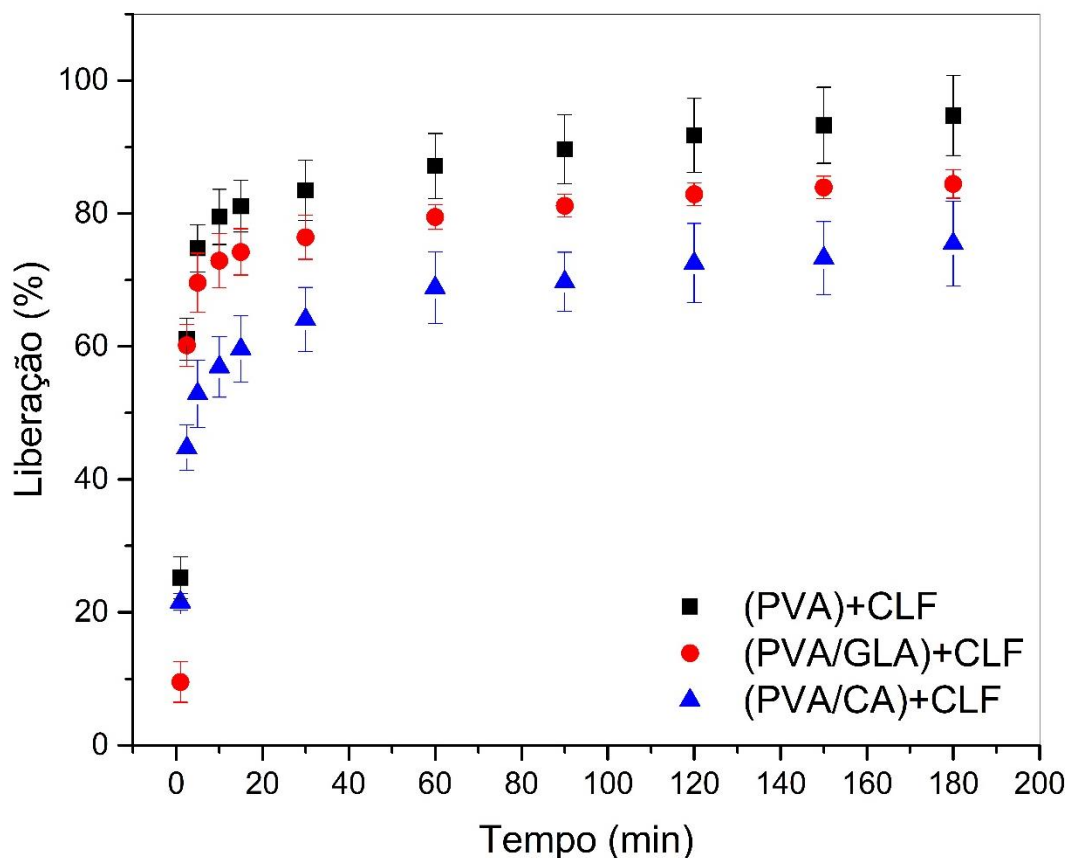


Figura 20: Cinética de liberação do cloranfenicol das membranas. **(PVA)+CLF** membrana de álcool polivinílico e 10% (m/m) de cloranfenicol; **(PVA/GLA)+CLF** membrana de PVA reticulado com glutaraldeído e 10% (m/m) de cloranfenicol; **(PVA/CA)+CLF** reticulado com ácido cítrico e 10% (m/m) de cloranfenicol.

O mecanismo cinético de liberação do CLF foi investigado aplicando-se quatro modelos matemáticos. Os parâmetros dos modelos cinéticos e dos ajustes matemáticos são apresentados na TAB. 6. Segundo os parâmetros matemáticos $R^2_{ajustado}$, AIC e MSC avaliados, o modelo de Weibull foi o que apresentou o melhor ajuste para todas as liberações. O modelo de Weibull é típico para liberação de fármaco a partir de um sistema de entrega do tipo matriz, neste caso o sistema matricial tridimensional composto de nanofibras de PVA [128,129]. Assim, fica evidente que a alteração da matriz causada pela reticulação teve influência direta sobre o perfil de liberação. Para este modelo o parâmetro F_{max} indica a quantidade de fármaco que está sendo liberado, a é o parâmetro de escala que descreve a dependência do tempo. T_i define o tempo de atraso antes do processo de dissolução, sendo que na maioria dos casos será zero, e b descreve a forma da curva de liberação. Quando b é maior que 1 a curva segue uma forma sigmoide com um ponto de viragem, enquanto para b menor que 1 a forma teria um aumento mais acentuado do que a com b igual a 1 [130,131].

Tabela 6 - Modelos cinéticos aplicados para a liberação do CLF.

(PVA)+CLF					
Modelo	Parâmetros	Valores	R ² _{ajustado}	AIC	MSC
Weibull	α (min)	1.02	0.99	45.67	4.15
	β	0.23			
	T_i (min)	0.99			
	F_{max} (%)	96.46			
Kormeyer-Peppas	k_{KP} (min ⁻¹)	51.97	0.73	80.87	0.95
	n	0.12			
Gompertz	α	1.19	0.97	55.91	3.22
	β	2.42			
	F_{max}	90.84			
Primeira Ordem	k_I (min ⁻¹)	0.28	0.67	80.98	0.94
(PVA/GLA)+CLF					
Weibull	α (min)	0.89	0.99	34.35	5.31
	β	0.19			
	T_i (min)	1.00			
	F_{max} (%)	87.96			
Kormeyer-Peppas	k_{KP} (min ⁻¹)	45.60	0.59	86.74	0.54
	n	0.13			
Gompertz	α	1.95	0.97	59.75	3.00
	β	4.31			
	F_{max}	79.84			
Primeira Ordem	k_I (min ⁻¹)	0.19	0.28	91.05	0.15
(PVA/CA)+CLF					
Weibull	α (min)	1.49	0.99	24.53	5.60
	β	0.19			
	T_i (min)	0.98			
	F_{max} (%)	88.28			
Kormeyer-Peppas	k_{KP} (min ⁻¹)	39.17	0.83	72.34	1.42
	n	0.14			
Gompertz	α	1.17	0.97	55.12	2.98
	β	1.61			
	F_{max} (%)	78.65			
Primeira Ordem	k_I (min ⁻¹)	0.082	-	97.74	-1.04

k_I : constante de primeira ordem; k_{KP} : constante da taxa de liberação; n : expoente de liberação; F_{max} : dissolução máxima (%); α : parâmetro de escala; β : parâmetro de forma; T_i : tempo de atraso antes da liberação do fármaco; ($R^2_{ajustado}$): coeficiente de determinação ajustado; (AIC) Akaike Information Criterion; (MSC) Model Selection Criterion. **(PVA)+CLF** membrana de álcool polivinílico e 10% (m/m) de cloranfenicol; **(PVA/GLA)+CLF** membrana de PVA reticulado com glutaraldeído e 10% (m/m) de cloranfenicol; **(PVA/CA)+CLF** reticulado com ácido cítrico e 10% (m/m) de cloranfenicol.

7.12 Hemocompatibilidade e Coagulação sanguínea

Avaliar a hemocompatibilidade de biomateriais é de extrema importância uma vez que estes materiais entrarão em contato com o sangue *in vivo*. Segundo a ASTM F756-08 dispositivos médicos que entrarão em contato com sangue devem apresentar porcentagem de hemólise inferior a 5%

[132]. A taxa de hemólise para as membranas é mostrada na FIG. 21-I, como pode-se observar todas as membranas apresentaram valores inferiores a 2% mostrando uma boa hemocompatibilidade. As taxas de hemólises ficaram próximas ao valor da membrana de PVA puro, visto que o PVA já é estabelecido como hemocompatível [64,98].

O potencial hemostático das membranas foi determinado pelo ensaio de coagulação sanguínea. Após o início da coagulação com CaCl_2 as hemácias que não ficaram aderidas ao coágulo foram hemolisadas com água e a absorbância medida em 540 nm [58,133]. Os resultados obtidos para a coagulação são apresentados na FIG. 21-II, o gráfico apresenta a absorbância relativa da hemoglobina RHA. Quedas mais abruptas para valores mais baixos de intensidade relativa mostram uma maior rapidez e eficácia na coagulação sanguínea. Todas as membranas promoveram a coagulação sanguínea, chegando basicamente à coagulação quase que total após 30 min. Entretanto as membranas reticuladas com GLA e CA contendo o fármaco CLF apresentaram melhor desempenho na coagulação. A capacidade coagulante das membranas torna este material promissor para aplicação em distúrbios hemorrágicos [71].

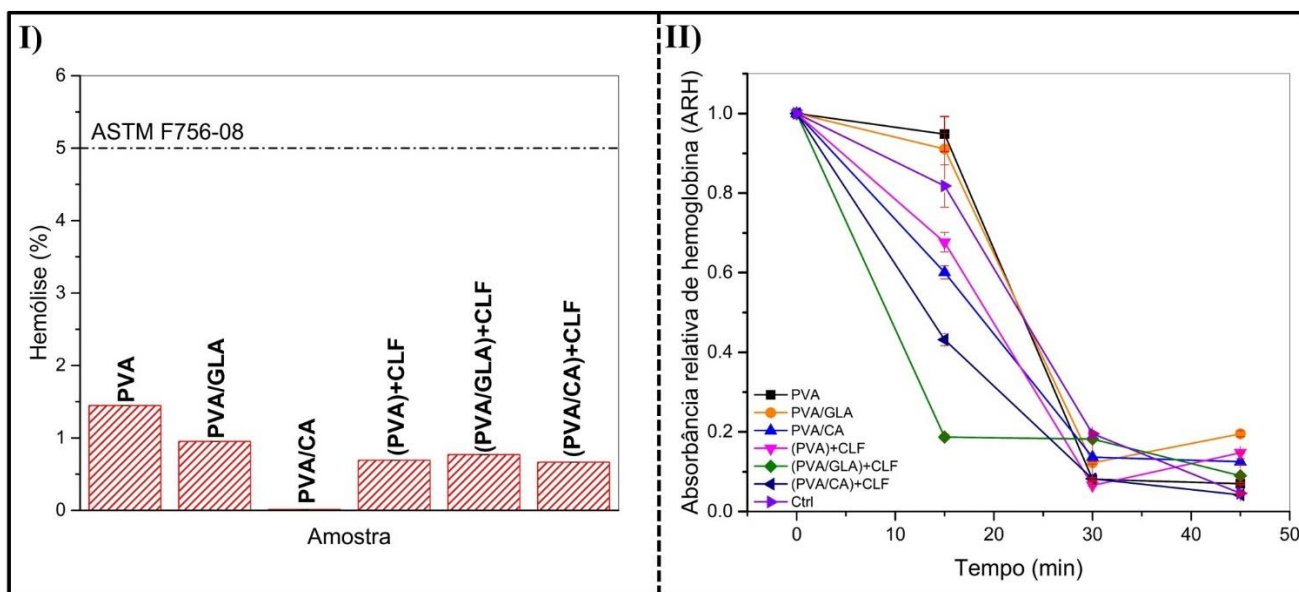


Figura 21: I – Taxa de hemólise sanguínea obtida para membranas; II – Coagulação sanguínea promovida pelas membranas eletrofiadas. (PVA) membrana de álcool polivinílico; (PVA/GLA) membrana de PVA reticulada com glutaraldeído; (PVA/CA) membrana de PVA reticulada com ácido cítrico; (PVA)+CLF membrana de álcool polivinílico e 10% (m/m) de cloranfenicol; (PVA/GLA)+CLF membrana de PVA reticulado com glutaraldeído e 10% (m/m) de cloranfenicol; (PVA/CA)+CLF reticulado com ácido cítrico e 10% (m/m) de cloranfenicol.

7.13 Estudo de permeação cutânea

Com o intuito de avaliar a capacidade do CLF presente nas membranas de permear a epiderme e derme, assim foi utilizado a pele de porco como modelo para simular a pele humana durante o ensaio. A FIG. 22-I apresenta os espectros de absorção óptica obtidos por espectroscopia fotoacústica das membranas contendo CLF. O pico em $\lambda_{\max} = 285 \text{ nm}$ é referente ao fármaco CLF indicando que ele se encontra presente nas membranas. Os espectros de absorção óptica obtida para a pele em contato com as membranas contendo CLF são apresentados na FIG 22-III. Como pode-se observar a o aumento do sinal fotoacústico foi mais significativo para epiderme do que para a derme mostrando uma baixa capacidade de permeação do fármaco, encontrando-se preferencialmente na parte mais superficial da pele.

Ainda com relação a epiderme para as membranas não reticulada e reticulada com GLA, o sinal obtido em 1h e 6h na região do fármaco não apresentou diferença mostrando uma maior capacidade de difusão do CLF para estas membranas. Na membrana reticulada com CA os sinais obtidos em 6h são significativamente mais intensos que os de 1h, indicando uma demora na capacidade de difusão do CLF. Esta difusão mais lenta pode estar associada a reticulação com o CA tornar a fibra mais rígida mantendo o fármaco mais fortemente aprisionado na cadeia polimérica. A FIG. 22-II apresenta os espectros normalizados para a derme, embora o aumento do sinal não seja significativo o deslocamento dos espectros indicam que possivelmente uma quantidade do CLF tenham atingido a derme. Entretanto a baixa capacidade de permeação do fármaco CLF na pele não é uma característica significativa para a membrana, uma vez que se deseja a atividade antimicrobiana local aplicada sobre o ferimento.

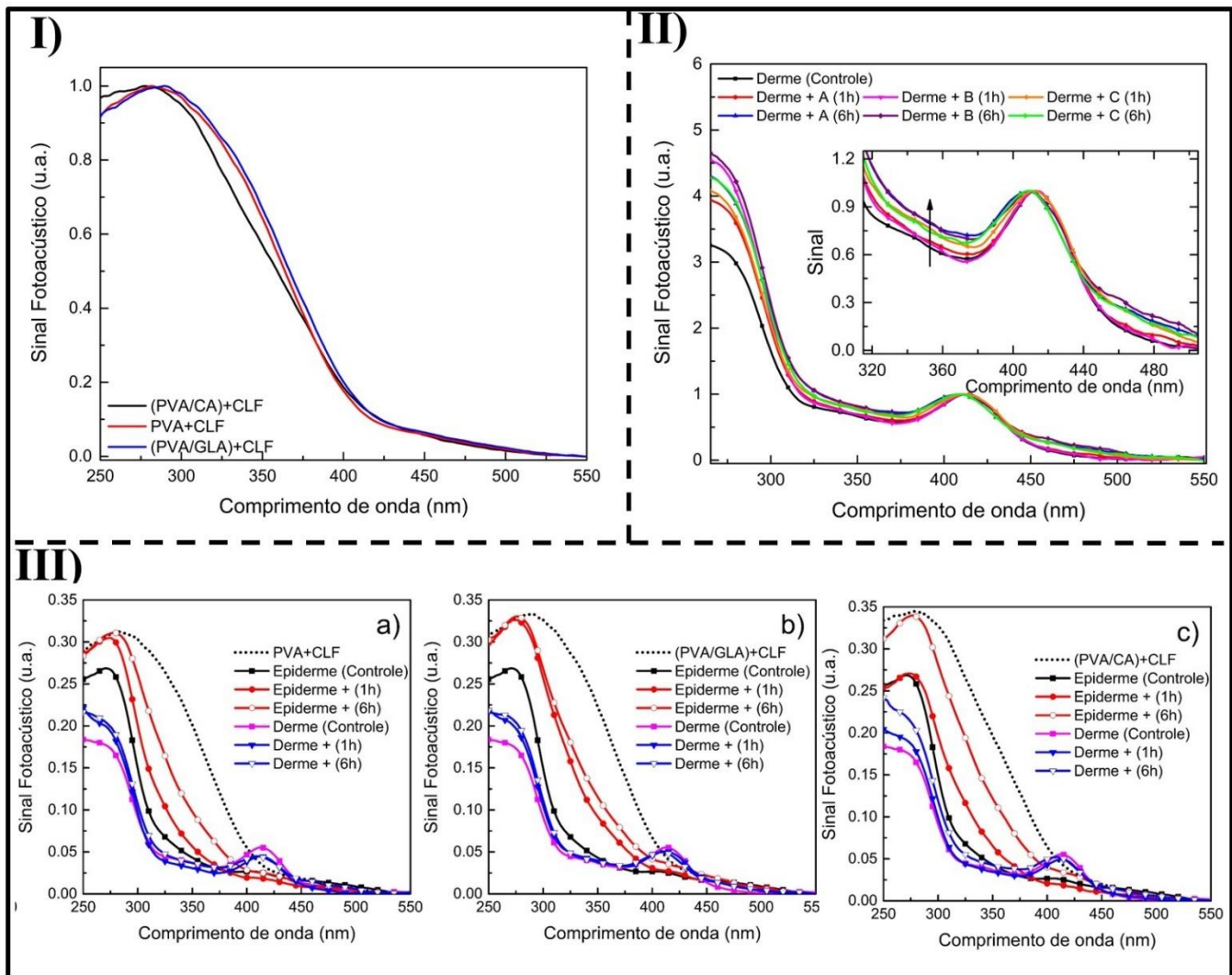


Figura 22: I – Espectros de fotoacústica das membranas contendo o fármaco. II – Espectros de fotoacústica normalizados para derme, A – (PVA/CA)+CLF; B – (PVA+CLF); C – (PVA/GLA)+CLF. III – Espectros de fotoacústica para a permeação na epiderme e derme, a) – (PVA)+CLF membrana de álcool polivinílico e 10% (m/m) de cloranfenicol; b) – (PVA/GLA)+CLF membrana de PVA reticulado com glutaraldeído e 10% (m/m) de cloranfenicol; c) – (PVA/CA)+CLF reticulado com ácido cítrico e 10% (m/m) de cloranfenicol.

7.14 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana das fibras eletrofiadas foram estudadas contra as cepas *S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*. Conforme os resultados apresentados para os ensaios de difusão de disco FIG. 23-II, observa-se que as membranas contendo CLF apresentaram zonas claras ao redor do disco indicando eficiência na inibição das bactérias. Este fato confirma que a atividade ocorre exclusivamente pela presença do fármaco uma vez que as membranas sem CLF não apresentaram

atividade inibitória [107]. O tamanho do halo de inibição depende da capacidade de difusão do fármaco podendo ser influenciada pelo mecanismo de liberação [94]. Assim para as membranas contendo CLF o halo de inibição em uma mesma bactéria não apresentou diferença significativa segundo teste de Tukey.

Esta observação corrobora com o perfil de liberação in-vitro, em que não foi observado diferença no mecanismo de liberação do fármaco entre as membranas. Os halos de inibição das membranas foram superiores aos obtidos para disco padrão de CLF 30 µg FIG. 23-I, possivelmente devido a imobilização e amorfização do fármaco na superfície da matriz polimérica hidrofílica que facilita a difusão do CLF. A atividade antibacteriana do CLF está associada à sua capacidade de difusão pela parede celular bacteriana, resultando atividades diferentes para bactérias Gram positivas e Gram negativas devido a composição da parede celular. O CLF se liga reversivelmente a subunidade ribossômica bacteriana 50S parando a síntese proteica inibindo a atividade peptidil transferase do ribossomo bacteriano promovendo sua morte [67,79].

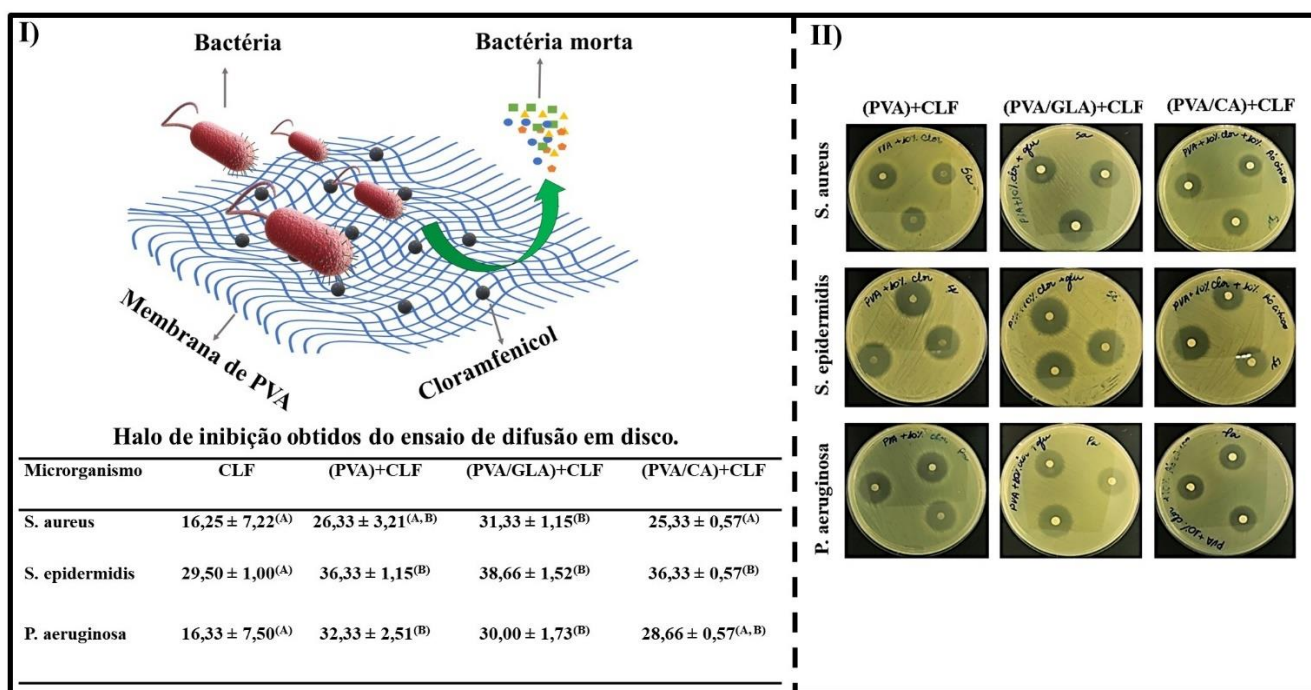


Figura 23: I – Halo de inibição em (mm) e desvio padrão; CLF disco padrão de cloranfenicol 30 µg; para um mesmo microrganismo letras iguais em sobrescrito indicam que as medias não diferem estatisticamente com 95% de confiança pelo teste de Tukey. **II** – Ensaio de difusão de disco para os microrganismos utilizados, (PVA)+CLF membrana de álcool polivinílico e 10% (m/m) de cloranfenicol; (PVA/GLA)+CLF membrana de PVA reticulado com glutaraldeído e 10% (m/m) de cloranfenicol; (PVA/CA)+CLF reticulado com ácido cítrico e 10% (m/m) de cloranfenicol.

8 CONCLUSÃO

A técnica de eletrofição mostrou-se eficaz na obtenção de nanofibras de álcool poli(vinílico) (PVA) contendo o antibiótico cloranfenicol obtendo fibra lisas e uniformes. As análises de caracterização mostraram a eficácia do ácido cítrico como agente reticulante, melhorando a estabilidade em água das membranas como também proporcionando melhor estabilidade térmica e diminuição do diâmetro médio das fibras devido a uma melhora na eletrofiabilidade da solução. A reticulação como vapor de glutaraldeído mostrou-se um método ineficaz para a membranas de PVA eletrofiadas, não sendo capaz de manter as características de fibra após o contato com meio aquoso.

Todas as membranas obtidas apresentaram hemocompatibilidade adequada para a aplicação em dispositivos médicos, além de serem capazes de coagular o sangue possibilitando o estancamento de sangramentos.

As membranas apresentaram o mesmo perfil de liberação de fármaco seguindo o modelo de Weibull para sistemas matriciais 3 dimensionais com liberação de estouro nos primeiros 30 min. Ainda na liberação a reticulação promoveu uma diminuição na capacidade máxima liberada, indicando que grau de reticulação influencia diretamente na liberação mantendo as moléculas de fármaco mais aprisionadas na matriz polimérica.

As propriedades antimicrobianas apresentadas pelas membranas são exclusivamente devido a presença do antibiótico cloranfenicol, visto que as fibras sem fármaco não apresentaram halo de inibição no ensaio de difusão de disco, sendo esses halos superiores ao disco padrão de cloranfenicol indicando que a membrana eletrofiada auxilia na difusão do fármaco.

Portanto os resultados deste trabalho demonstram que as membranas de PVA reticuladas com CA contendo o antibiótico CLF, trata-se de um material promissor para aplicações biomédicas. Apresentando estabilidade em água capaz de manter sua estrutura fibrosa com capacidade de inchaço importante para absorção de exsudato, hemocompatibilidade e atividade antimicrobiana.

REFERÊNCIAS

- [1] J. Xue, T. Wu, Y. Dai, Y. Xia, Electrospinning and electrospun nanofibers: Methods, materials, and applications, *Chem. Rev.* 119 (2019) 5298–5415.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00593>.
- [2] A. Frenot, I.S. Chronakis, Polymer nanofibers assembled by electrospinning, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 8 (2003) 64–75. [https://doi.org/10.1016/S1359-0294\(03\)00004-9](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(03)00004-9).
- [3] S. Jiang, Y. Chen, G. Duan, C. Mei, A. Greiner, S. Agarwal, Electrospun nanofiber reinforced composites: A review, *Polym. Chem.* 9 (2018) 2685–2720. <https://doi.org/10.1039/c8py00378e>.
- [4] N. Bhardwaj, S.C. Kundu, Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique, *Biotechnol. Adv.* 28 (2010) 325–347. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.01.004>.
- [5] A.P. Kishan, E.M. Cosgriff-Hernandez, Recent advancements in electrospinning design for tissue engineering applications: A review, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 105 (2017) 2892–2905. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36124>.
- [6] J. Lasprilla-Botero, M. Álvarez-Láinez, J.M. Lagaron, The influence of electrospinning parameters and solvent selection on the morphology and diameter of polyimide nanofibers, *Mater. Today Commun.* 14 (2018) 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2017.12.003>.
- [7] V. Beachley, X. Wen, Effect of electrospinning parameters on the nano fiber diameter and length, *Mater. Sci. Eng. C.* 29 (2009) 663–668. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.10.037>.
- [8] A. Sadat, M. Hamid, F. Hajiesmaeilbaigi, Effect of electrospinning parameters on morphological properties of PVDF nanofibrous scaffolds, *Prog. Biomater.* 6 (2017) 113–123.
<https://doi.org/10.1007/s40204-017-0071-0>.
- [9] T. Subbiah, G.S. Bhat, R.W. Tock, S. Parameswaran, S.S. Ramkumar, Electrospinning of Nanofibers, *J. Appl. Polym. Sci.* 96 (2004) 557–569. <https://doi.org/10.1002/app.21481>.
- [10] V. Jacobs, R.D. Anandjiwala, M. Maaza, The Influence of Electrospinning Parameters on the Structural Morphology and Diameter of Electrospun Nanofibers, *J. Appl. Polym. Sci.* 115 (2010) 3130–3136. <https://doi.org/10.1002/app>.
- [11] A. Haider, S. Haider, I. Kang, A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology, *Arab. J. Chem.* 11 (2018) 1165–1188.
<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.11.015>.

- [12] N.T.B. Linh, B.T. Lee, Electrospinning of polyvinyl alcohol/gelatin nanofiber composites and cross-linking for bone tissue engineering application, *J. Biomater. Appl.* 27 (2012) 255–266. <https://doi.org/10.1177/0885328211401932>.
- [13] A.S. Asran, K. Razghandi, N. Aggarwal, G.H. Michler, T. Groth, Nanofibers from blends of polyvinyl alcohol and polyhydroxy butyrate as potential scaffold material for tissue engineering of skin, *Biomacromolecules*. 11 (2010) 3413–3421. <https://doi.org/10.1021/bm100912v>.
- [14] N. Ben Halima, Poly(vinyl alcohol): Review of its promising applications and insights into biodegradation, *RSC Adv.* 6 (2016) 39823–39832. <https://doi.org/10.1039/c6ra05742j>.
- [15] M.I. Baker, S.P. Walsh, Z. Schwartz, B.D. Boyan, A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 100 B (2012) 1451–1457. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.32694>.
- [16] E.A. Van Etten, E.S. Ximenes, L.T. Tarasconi, I.T.S. Garcia, M.M.C. Forte, H. Boudinov, Insulating characteristics of polyvinyl alcohol for integrated electronics, *Thin Solid Films*. 568 (2014) 111–116. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2014.07.051>.
- [17] N. Limpan, T. Prodpran, S. Benjakul, S. Prasarpran, Influences of degree of hydrolysis and molecular weight of poly(vinyl alcohol) (PVA) on properties of fish myofibrillar protein/PVA blend films, *Food Hydrocoll.* 29 (2012) 226–233. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.03.007>.
- [18] J.C. Park, T. Ito, K.O. Kim, K.W. Kim, B.S. Kim, M.S. Khil, H.Y. Kim, I.S. Kim, Electrospun poly(vinyl alcohol) nanofibers: Effects of degree of hydrolysis and enhanced water stability, *Polym. J.* 42 (2010) 273–276. <https://doi.org/10.1038/pj.2009.340>.
- [19] T.S. Gaaz, A.B. Sulong, M.N. Akhtar, A.A.H. Kadhum, A.B. Mohamad, A.A. Al-Amiery, Properties and applications of polyvinyl alcohol, halloysite nanotubes and their nanocomposites, *Molecules*. 20 (2015) 22833–22847. <https://doi.org/10.3390/molecules201219884>.
- [20] M. Aslam, M.A. Kalyar, Z.A. Raza, Polyvinyl alcohol: A review of research status and use of polyvinyl alcohol based nanocomposites, *Polym. Eng. Sci.* 58 (2018) 2119–2132. <https://doi.org/10.1002/pen.24855>.
- [21] J.M. Sanders, H.B. Matthews, Vaginal Absorption of Polyvinyl Alcohol in Fischer 344 Rats, *Hum. Exp. Toxicol.* 9 (1990) 71–77. <https://doi.org/10.1177/096032719000900202>.
- [22] C.C. Demerlis, D.R. Schoneker, Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA), *Food Chem. Toxicol.* 41 (2003) 319–326. <https://kundoc.com/pdf-review-of-the-oral-toxicity-of-polyvinyl-alcohol-pva-.html>.
- [23] H. Schweikl, G. Schmalz, C. Göttke, Mutagenic activity of various dentine bonding agents,

- Biomaterials. 17 (1996) 1451–1456. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)87289-9](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)87289-9).
- [24] X. Xu, J. Zhao, M. Wang, L. Wang, J. Yang, 3D Printed Polyvinyl Alcohol Tablets with Multiple Release Profiles, *Sci. Rep.* 9 (2019) 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48921-8>.
- [25] A. Oryan, A. Kamali, A. Moshiri, H. Baharvand, H. Daemi, Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: Current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds, *Int. J. Biol. Macromol.* 107 (2018) 678–688. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.184>.
- [26] D. Nataraj, R. Reddy, N. Reddy, Crosslinking electrospun poly (vinyl) alcohol fibers with citric acid to impart aqueous stability for medical applications, *Eur. Polym. J.* 124 (2020) 109484. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109484>.
- [27] F. Garavand, M. Rouhi, S.H. Razavi, I. Cacciotti, R. Mohammadi, Improving the integrity of natural biopolymer films used in food packaging by crosslinking approach: A review, *Int. J. Biol. Macromol.* 104 (2017) 687–707. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.093>.
- [28] S. Torres-Giner, J. V. Gimeno-Alcañiz, M.J. Ocio, J.M. Lagaron, Comparative performance of electrospun collagen nanofibers cross-linked by means of different methods, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 1 (2009) 218–223. <https://doi.org/10.1021/am800063x>.
- [29] N. Reddy, R. Reddy, Q. Jiang, Crosslinking biopolymers for biomedical applications, *Trends Biotechnol.* 33 (2015) 362–369. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.03.008>.
- [30] S.S. Kim, S.H. Lim, W.C. Seung, S.J. Gwak, Y.S. Hong, C.C. Byung, H.P. Moon, W.S. Kang, Y.C. Cha, B.-S. Kim, Tissue engineering of heart valves by recellularization of glutaraldehyde-fixed porcine valves using bone marrow-derived cells, *Exp. Mol. Med.* 38 (2006) 273–283. <https://doi.org/10.1038/emm.2006.33>.
- [31] P. Vashisth, V. Pruthi, Synthesis and characterization of crosslinked gellan/PVA nanofibers for tissue engineering application, *Mater. Sci. Eng. C.* 67 (2016) 304–312. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.049>.
- [32] N.W. Guldner, I. Jasmund, H. Zimmermann, M. Heinlein, B. Girndt, V. Meier, F. Fließ, D. Rohde, A. Gebert, H.H. Sievers, Detoxification and endothelialization of glutaraldehyde-fixed bovine pericardium with titanium coating a new technology for cardiovascular tissue engineering, *Circulation.* 119 (2009) 1653–1660. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.823948>.
- [33] D. Rocha-García, A. Guerra-Contreras, J. Reyes-Hernández, G. Palestino, Thermal and kinetic evaluation of biodegradable thermo-sensitive gelatin/poly(ethylene glycol) diamine crosslinked

- citric acid hydrogels for controlled release of tramadol, *Eur. Polym. J.* 89 (2017) 42–56.
<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.02.007>.
- [34] J. Uranga, A.I. Puertas, A. Etxabide, M.T. Dueñas, P. Guerrero, K. de la Caba, Citric acid-incorporated fish gelatin/chitosan composite films, *Food Hydrocoll.* 86 (2019) 95–103.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.02.018>.
- [35] D. Gyawali, P. Nair, Y. Zhang, R.T. Tran, C. Zhang, M. Samchukov, M. Makarov, H.K.W. Kim, J. Yang, Citric acid-derived in situ crosslinkable biodegradable polymers for cell delivery, *Biomaterials.* 31 (2010) 9092–9105. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.08.022>.
- [36] D. Motlagh, J. Allen, R. Hoshi, J. Yang, K. Lui, G. Ameer, Hemocompatibility evaluation of poly(diols citrate) in vitro for vascular tissue engineering, *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 79 (2007) 907–916. <https://doi.org/10.1002/jbm.a>.
- [37] M.F.Z. Scelza, R.L.D.P. Daniel, E.M. Santos, M.M. Jaeger, Cytotoxic effects of 10% citric acid and EDTA-T used as root canal irrigants: An in vitro analysis, *J. Endod.* 27 (2001) 741–743.
<https://doi.org/10.1097/00004770-200112000-00007>.
- [38] R.A.F. Clark, Cutaneous tissue repair: Basic biologic considerations. I, *J. Am. Acad. Dermatol.* 13 (1985) 701–725. [https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(85\)70213-7](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(85)70213-7).
- [39] C. Mohanty, M. Das, S.K. Sahoo, Sustained wound healing activity of curcumin loaded oleic acid based polymeric bandage in a rat model, *Mol. Pharm.* 9 (2012) 2801–2811.
<https://doi.org/10.1021/mp300075u>.
- [40] P. Agrawal, S. Soni, G. Mittal, A. Bhatnagar, Role of polymeric biomaterials as wound healing agents, *Int. J. Low. Extrem. Wounds.* 13 (2014) 180–190.
<https://doi.org/10.1177/1534734614544523>.
- [41] M. Mir, M.N. Ali, A. Barakullah, A. Gulzar, M. Arshad, S. Fatima, M. Asad, Synthetic polymeric biomaterials for wound healing: a review, *Prog. Biomater.* 7 (2018) 1–21.
<https://doi.org/10.1007/s40204-018-0083-4>.
- [42] S. Guo, L.A. DiPietro, Critical review in oral biology & medicine: Factors affecting wound healing, *J. Dent. Res.* 89 (2010) 219–229. <https://doi.org/10.1177/0022034509359125>.
- [43] P. Zahedi, I. Rezaeian, S.O. Ranaei-Siadat, S.H. Jafari, P. Supaphol, A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages, *Polym. Adv. Technol.* 21 (2010) 77–95. <https://doi.org/10.1002/pat.1625>.
- [44] A.D. Juncos Bombin, N.J. Dunne, H.O. McCarthy, Electrospinning of natural polymers for the production of nanofibres for wound healing applications, *Mater. Sci. Eng. C.* 114 (2020)

110994. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110994>.
- [45] H. Adeli, M.T. Khorasani, M. Parvazinia, Wound dressing based on electrospun PVA / chitosan / starch nano fibrous mats : Fabrication , antibacterial and cytocompatibility evaluation and in vitro healing assay, *Int. J. Biol. Macromol.* 122 (2019) 238–254. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.115>.
- [46] S. Schwarz, C. Kehrenberg, A. Cloeckaert, Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol, *FEMS Microbiol. Rev.* 28 (2004) 519–542. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.04.001>.
- [47] A.Y. Shen, E.J. Haddad, D.J. Hunter-smith, W.M. Rozen, Efficacy and adverse effects of topical chloramphenicol ointment use for surgical wounds a systematic review, *ANZ J. Surg.* 88 (2018) 1243–1246. <https://doi.org/10.1111/ans.14465>.
- [48] J. Harms, A. Bashan, A. Tocilj, R. Albrecht, A. Yonath, R. Zarivach, F. Franceschi, F. Schlünzen, Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria, *Nature.* 413 (2001) 814–821.
- [49] N. Eliakim-raz, A. Lador, Y. Leibovici-weissman, M. Elbaz, Efficacy and safety of chloramphenicol : joining the revival of old antibiotics ? Systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials, *J. Antimicrob. Chemother.* 70 (2015) 979–996. <https://doi.org/10.1093/jac/dku530>.
- [50] O.N. Kostopoulou, E.C. Kouvela, G.E. Magoulas, T. Garnelis, I. Panagoulas, M. Rodi, G. Papadopoulos, A. Mouzaki, P. Dinos, D. Papaioannou, D.L. Kalpaxis, Conjugation with polyamines enhances the antibacterial and anticancer activity of chloramphenicol, *Nucleic Acids Res.* 42 (2014) 8621–8634. <https://doi.org/10.1093/nar/gku539>.
- [51] M. Rivas, P. Turon, L. J. del Valle, A. M. Rodríguez-Rivero, J. Puiggalí, C. Alemán, Loading of Antibiotic into Biocoated Hydroxyapatite Nanoparticles: Smart Antitumor Platforms with Regulated Release, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 4 (2018) 3234–3245. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.8b00353>.
- [52] W. V Shaw, Chloramphenicol acetyltransferase: enzymology and molecular biology, *CRC Crit. Rev. Biochem.* 14 (1950) 1–45.
- [53] A. Diaz, M. Romanini, L. Javier, J. Puiggalí, S. Valenti, J. Lluís, R. Macovez, Amorphous binary dispersions of chloramphenicol in enantiomeric pure and racemic poly-lactic acid : Morphology , molecular relaxations , and controlled drug release, *Int. J. Pharm.* 568 (2019) 118565. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118565>.

- [54] L. Preem, M. Mahmoudzadeh, M. Putrins, A. Meos, I. Laidma, A. Koivuniemi, A. Bunker, T. Tenson, K. Kogermann, Interactions between Chloramphenicol , Carrier Polymers , and Bacteria – Implications for Designing Electrospun Drug Delivery Systems Countering Wound Infection, *Mol. Pharm.* 14 (2017) 4417–4430. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00524>.
- [55] F. Zeighampour, F. Alihosseini, M. Morshed, A.A. Rahimi, Comparison of prolonged antibacterial activity and release profile of propolis-incorporated PVA nanofibrous mat, microfibrinous mat, and film, *J. Appl. Polym. Sci.* 135 (2018) 1–13. <https://doi.org/10.1002/app.45794>.
- [56] T. Mirmajidi, F. Chogan, A.H. Rezayan, A.M. Sharifi, In vitro and in vivo evaluation of a nanofiber wound dressing loaded with melatonin, *Int. J. Pharm.* 596 (2021) 120213. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2021.120213>.
- [57] T.B. Alberti, D.S. Coelho, M. de Prá, M. Maraschin, B. Veleirinho, Electrospun PVA nanoscaffolds associated with propolis nanoparticles with wound healing activity, *J. Mater. Sci.* 55 (2020) 9712–9727. <https://doi.org/10.1007/s10853-020-04502-z>.
- [58] R. Fatahian, M. Mirjalili, R. Khajavi, M.K. Rahimi, N. Nasirizadeh, Fabrication of antibacterial and hemostatic electrospun PVA nanofibers for wound healing, *SN Appl. Sci.* 2 (2020) 1–7. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-3084-6>.
- [59] S. Homaeigohar, A.R. Boccaccini, Antibacterial biohybrid nanofibers for wound dressings, *Acta Biomater.* 107 (2020) 25–49. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.02.022>.
- [60] R.B. Trinca, C.B. Westin, J.A.F. da Silva, Â.M. Moraes, Electrospun multilayer chitosan scaffolds as potential wound dressings for skin lesions, *Eur. Polym. J.* 88 (2017) 161–170. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.01.021>.
- [61] M. Liu, X.P. Duan, Y.M. Li, D.P. Yang, Y.Z. Long, Electrospun nanofibers for wound healing, *Mater. Sci. Eng. C.* 76 (2017) 1413–1423. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.034>.
- [62] D. Kai, S.S. Liow, X.J. Loh, Biodegradable polymers for electrospinning: Towards biomedical applications, *Mater. Sci. Eng. C.* 45 (2014) 659–670. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.04.051>.
- [63] A.W. Jatoi, H. Ogasawara, I.S. Kim, Q.Q. Ni, Polyvinyl alcohol nanofiber based three phase wound dressings for sustained wound healing applications, *Mater. Lett.* 241 (2019) 168–171. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2019.01.084>.
- [64] Q. Zhang, Q. Du, Y. Zhao, F. Chen, Z. Wang, Y. Zhang, H. Ni, H. Deng, Y. Li, Y. Chen, Graphene oxide-modified electrospun polyvinyl alcohol nanofibrous scaffolds with potential as

- skin wound dressings, *RSC Adv.* 7 (2017) 28826–28836. <https://doi.org/10.1039/c7ra03997b>.
- [65] I.J. Hall Barrientos, E. Paladino, S. Brozio, M.K. Passarelli, S. Moug, R.A. Black, C.G. Wilson, D.A. Lamprou, Fabrication and characterisation of drug-loaded electrospun polymeric nanofibers for controlled release in hernia repair, *Int. J. Pharm.* 517 (2017) 329–337. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.12.022>.
- [66] M. Adeli-Sardou, M.M. Yaghoobi, M. Torkzadeh-Mahani, M. Dodel, Controlled release of lawsone from polycaprolactone/gelatin electrospun nano fibers for skin tissue regeneration, *Int. J. Biol. Macromol.* 124 (2019) 478–491. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.237>.
- [67] G.K. Arbade, V. Dongardive, S.K. Rath, V. Tripathi, T.U. Patro, Effect of poly(ethylene glycol) on drug delivery, antibacterial, biocompatible, physico-chemical and thermo-mechanical properties of PCL-chloramphenicol electrospun nanofiber scaffolds, *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* 0 (2020) 1–12. <https://doi.org/10.1080/00914037.2020.1817020>.
- [68] A. Karava, M. Lazaridou, S. Nanaki, G. Michailidou, E. Christodoulou, M. Kostoglou, H. Iatrou, D.N. Bikiaris, Chitosan derivatives with mucoadhesive and antimicrobial properties for simultaneous nanoencapsulation and extended ocular release formulations of dexamethasone and chloramphenicol drugs, *Pharmaceutics.* 12 (2020) 594. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12060594>.
- [69] Y. Zhang, M. Huo, J. Zhou, A. Zou, W. Li, C. Yao, S. Xie, DDSolver: An add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles, *AAPS J.* 12 (2010) 263–271. <https://doi.org/10.1208/S12248-010-9185-1/TABLES/5>.
- [70] M.R. Berry, M.D. Likar, Statistical assessment of dissolution and drug release profile similarity using a model-dependent approach, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 45 (2007) 194–200. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2007.05.021>.
- [71] Z. Li, A. Millionis, Y. Zheng, M. Yee, L. Codispoti, F. Tan, D. Poulidakos, C.H. Yap, Superhydrophobic hemostatic nanofiber composites for fast clotting and minimal adhesion, *Nat. Commun.* 2019 101. 10 (2019) 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13512-8>.
- [72] C. Verhaegen, S. Lepropre, M. Octave, D. Brusa, L. Bertrand, C. Beauloye, P.J. Jacques, J. Kefer, S. Horman, C. Verhaegen, S. Lepropre, M. Octave, D. Brusa, L. Bertrand, C. Beauloye, P.J. Jacques, J. Kefer, S. Horman, Bioreactivity of Stent Material: In Vitro Impact of New Twinning-Induced Plasticity Steel on Platelet Activation, *J. Biomater. Nanobiotechnol.* 10 (2019) 175–189. <https://doi.org/10.4236/JBNT.2019.104010>.
- [73] S.M. Brown, M.L. Baesso, J. Shen, R.D. Snook, Thermal diffusivity of skin measured by two

- photothermal techniques, *Anal. Chim. Acta.* 282 (1993) 711–719. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(93\)80136-9](https://doi.org/10.1016/0003-2670(93)80136-9).
- [74] A. Koski, K. Yim, S. Shivkumar, Effect of molecular weight on fibrous PVA produced by electrospinning, *Mater. Lett.* 58 (2004) 493–497. [https://doi.org/10.1016/S0167-577X\(03\)00532-9](https://doi.org/10.1016/S0167-577X(03)00532-9).
- [75] J. Tao, S. Shivkumar, Molecular weight dependent structural regimes during the electrospinning of PVA, *Mater. Lett.* 61 (2007) 2325–2328. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2006.09.004>.
- [76] S. Estevez-Areco, L. Guz, R. Candal, S. Goyanes, Release kinetics of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) polyphenols from polyvinyl alcohol (PVA) electrospun nanofibers in several food simulants, *Food Packag. Shelf Life.* 18 (2018) 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.08.006>.
- [77] D. Nataraj, R. Reddy, N. Reddy, Crosslinking electrospun poly (vinyl) alcohol fibers with citric acid to impart aqueous stability for medical applications, *Eur. Polym. J.* 124 (2020) 109484. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109484>.
- [78] D. Yu, Y.Y. Feng, J.X. Xu, B.H. Kong, Q. Liu, H. Wang, Fabrication, characterization, and antibacterial properties of citric acid crosslinked PVA electrospun microfibre mats for active food packaging, *Packag. Technol. Sci.* 34 (2021) 361–370. <https://doi.org/10.1002/pts.2566>.
- [79] M. Bayrakci, M. Keskinates, B. Yilmaz, Antibacterial, thermal decomposition and in vitro time release studies of chloramphenicol from novel PLA and PVA nanofiber mats, *Mater. Sci. Eng. C.* 122 (2021) 111895. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.111895>.
- [80] S. Valenti, L. del Valle, O. Yousefzade, R. Macovez, L. Franco, J. Puiggali, Chloramphenicol loaded polylactide melt electrospun scaffolds for biomedical applications, *Int. J. Pharm.* 606 (2021) 120897. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120897>.
- [81] S. Ullah, M. Hashmi, N. Hussain, A. Ullah, M.N. Sarwar, Y. Saito, S.H. Kim, I.S. Kim, Stabilized nanofibers of polyvinyl alcohol (PVA) crosslinked by unique method for efficient removal of heavy metal ions, *J. Water Process Eng.* 33 (2020) 101111. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2019.101111>.
- [82] X.H. Qin, S.Y. Wang, Electrospun nanofibers from crosslinked poly(vinyl alcohol) and its filtration efficiency, *J. Appl. Polym. Sci.* 109 (2008) 951–956. <https://doi.org/10.1002/APP.28003>.
- [83] A. Aktürk, M. Erol Taygun, F. Karbancıoğlu Güler, G. Goller, S. Küçükbayrak, Fabrication of antibacterial polyvinylalcohol nanocomposite mats with soluble starch coated silver nanoparticles, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 562 (2019) 255–262.

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.11.034>.

- [84] E. Olewnik-Kruszkowska, M. Gierszewska, E. Jakubowska, I. Tarach, V. Sedlarik, M. Pummerova, Antibacterial films based on PVA and PVA-chitosan modified with poly(hexamethylene guanidine), *Polymers (Basel)*. 11 (2019) 2093.
<https://doi.org/10.3390/polym11122093>.
- [85] A.A. Menazea, A.M. Ismail, N.S. Awwad, H.A. Ibrahim, Physical characterization and antibacterial activity of PVA/Chitosan matrix doped by selenium nanoparticles prepared via one-pot laser ablation route, *J. Mater. Res. Technol.* 9 (2020) 9598–9606.
<https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2020.06.077>.
- [86] M.S. Peresin, A.H. Vesterinen, Y. Habibi, L.S. Johansson, J.J. Pawlak, A.A. Nevzorov, O.J. Rojas, Crosslinked PVA nanofibers reinforced with cellulose nanocrystals: Water interactions and thermomechanical properties, *J. Appl. Polym. Sci.* 131 (2014) 1–12.
<https://doi.org/10.1002/app.40334>.
- [87] F.C. do Nascimento, L.C.V. de Aguiar, L.A.T. Costa, M.T. Fernandes, R.J. Marassi, A. de S. Gomes, J.A. de Castro, Formulation and characterization of crosslinked polyvinyl alcohol (PVA) membranes: effects of the crosslinking agents, *Polym. Bull.* 78 (2021) 917–929.
<https://doi.org/10.1007/s00289-020-03142-2>.
- [88] K.C.S. Figueiredo, T.L.M. Alves, C.P. Borges, Poly(vinyl alcohol) Films Crosslinked by Glutaraldehyde Under Mild Conditions, *J Appl Polym Sci.* 111 (2008) 3074–3080.
<https://doi.org/10.1002/app.29263>.
- [89] H.S. Mansur, C.M. Sadahira, A.N. Souza, A.A.P. Mansur, FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde, *Mater. Sci. Eng. C.* 28 (2008) 539–548.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2007.10.088>.
- [90] Z. Zhang, Y. Liu, S. Lin, Q. Wang, Preparation and properties of glutaraldehyde crosslinked poly(vinyl alcohol) membrane with gradient structure, *J. Polym. Res.* 27 (2020) 228.
<https://doi.org/10.1007/s10965-020-02223-0>.
- [91] K. Sugiura, M. Hashimoto, S. Matsuzawa, K. Yamaura, Influence of degree of crystallinity and syndiotacticity on infrared spectra of solid PVA, *J. Appl. Polym. Sci.* 82 (2001) 1291–1298.
<https://doi.org/10.1002/APP.1963>.
- [92] M.S. Enayati, T. Behzad, P. Sajkiewicz, R. Bagheri, L. Ghasemi-Mobarakeh, W. Łojkowski, Z. Pahlevanneshan, M. Ahmadi, Crystallinity study of electrospun poly (vinyl alcohol) nanofibers:

- effect of electrospinning, filler incorporation, and heat treatment, *Iran Polym J.* 25 (2016) 647–659. <https://doi.org/10.1007/S13726-016-0455-3/FIGURES/17>.
- [93] M. Sabzi, M.J. Afshari, M. Babaahmadi, N. Shafagh, pH-dependent swelling and antibiotic release from citric acid crosslinked poly(vinyl alcohol) (PVA)/nano silver hydrogels, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 188 (2020) 110757. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110757>.
- [94] L. Preem, M. Mahmoudzadeh, M. Putrinš, A. Meos, I. Laidmäe, T. Romann, J. Aruväli, R. Härmas, A. Koivuniemi, A. Bunker, T. Tenson, K. Kogermann, Interactions between Chloramphenicol, Carrier Polymers, and Bacteria-Implications for Designing Electrospun Drug Delivery Systems Countering Wound Infection, *Mol. Pharm.* 14 (2017) 4417–4430. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00524>.
- [95] Zlatko Meić Mladen Žinić Snežžana Miljanić, Leo Frkanec, Tomislav Biljan, Recent Advances in linear and nonlinear Raman spectroscopy I, *J. Raman Spectrosc.* 38 (2007) 1538–1553. <https://doi.org/10.1002/jrs>.
- [96] A.K. Sonker, K. Rathore, R.K. Nagarale, V. Verma, Crosslinking of Polyvinyl Alcohol (PVA) and Effect of Crosslinker Shape (Aliphatic and Aromatic) Thereof, *J. Polym. Environ.* 26 (2018) 1782–1794. <https://doi.org/10.1007/s10924-017-1077-3>.
- [97] Z. Peng, L.X. Kong, A thermal degradation mechanism of polyvinyl alcohol/silica nanocomposites, *Polym. Degrad. Stab.* 92 (2007) 1061–1071. <https://doi.org/10.1016/J.POLYMDEGRADSTAB.2007.02.012>.
- [98] A.K. Sonker, A.K. Teotia, A. Kumar, R.K. Nagarale, V. Verma, Development of Polyvinyl Alcohol Based High Strength Biocompatible Composite Films, *Macromol. Chem. Phys.* 218 (2017) 1700130. <https://doi.org/10.1002/macp.201700130>.
- [99] S. Kalita, B. Devi, R. Kandimalla, K.K. Sharma, A. Sharma, K. Kalita, A.C. Katak, J. Kotoky, Chloramphenicol encapsulated in poly- ϵ -caprolactone-pluronic composite: Nanoparticles for treatment of MRSA-infected burn wounds, *Int. J. Nanomedicine.* 10 (2015) 2971–2984. <https://doi.org/10.2147/IJN.S75023>.
- [100] K.K. Mahato, S. Sabbarwal, N. Misra, M. Kumar, Fabrication of polyvinyl alcohol/chitosan oligosaccharide hydrogel: physicochemical characterizations and in vitro drug release study, *J. Polym. Anal. Charact.* 25 (2020) 353–361. <https://doi.org/10.1080/1023666X.2020.1789382>.
- [101] A.M. Pandele, M. Ionita, L. Crica, S. Dinescu, M. Costache, H. Iovu, Synthesis, characterization, and in vitro studies of graphene oxide/chitosan–polyvinyl alcohol films, *Carbohydr. Polym.* 102 (2014) 813–820. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2013.10.085>.

- [102] L. Wen, Y. Liang, Z. Lin, D. Xie, Z. Zheng, C. Xu, B. Lin, Design of multifunctional food packaging films based on carboxymethyl chitosan/polyvinyl alcohol crosslinked network by using citric acid as crosslinker, *Polymer (Guildf)*. 230 (2021) 124048.
<https://doi.org/10.1016/j.polymer.2021.124048>.
- [103] X. Qin, G. Dou, G. Jiang, S. Zhang, Characterization of poly (vinyl alcohol) nanofiber mats cross-linked with glutaraldehyde, *J. Ind. Text.* 43 (2012) 34–44.
<https://doi.org/10.1177/1528083712446385>.
- [104] X. Li, M.A. Kanjwal, L. Lin, I.S. Chronakis, Electrospun polyvinyl-alcohol nanofibers as oral fast-dissolving delivery system of caffeine and riboflavin, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 103 (2013) 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.10.016>.
- [105] M. Dinari, F. Bina, T. Khayamian, Poly(vinyl alcohol)-based electrospun nanofibers for the sustained release of celecoxib: Characterization and evaluation of drug release mechanism, *Polym. Compos.* 39 (2018) E221–E227. <https://doi.org/10.1002/pc.24671>.
- [106] H.J. Haroosh, Y. Dong, K.T. Lau, Tetracycline hydrochloride (TCH)-loaded drug carrier based on PLA:PCL nanofibre mats: Experimental characterisation and release kinetics modelling, *J. Mater. Sci.* 49 (2014) 6270–6281. <https://doi.org/10.1007/s10853-014-8352-7>.
- [107] G. Michailidou, E. Christodoulou, S. Nanaki, P. Barmpalexis, E. Karavas, S. Vergkizi-Nikolakaki, D.N. Bikiaris, Super-hydrophilic and high strength polymeric foam dressings of modified chitosan blends for topical wound delivery of chloramphenicol, *Carbohydr. Polym.* 208 (2019) 1–13. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2018.12.050>.
- [108] J.S. Boateng, A.M. Popescu, Composite bi-layered erodible films for potential ocular drug delivery, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 145 (2016) 353–361.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.05.014>.
- [109] R. Shi, J. Bi, Z. Zhang, A. Zhu, D. Chen, X. Zhou, L. Zhang, W. Tian, The effect of citric acid on the structural properties and cytotoxicity of the polyvinyl alcohol/starch films when molding at high temperature, *Carbohydr. Polym.* 74 (2008) 763–770.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.04.045>.
- [110] Y. Wang, Y.-L. Hsieh, Crosslinking of polyvinyl alcohol (PVA) fibrous membranes with glutaraldehyde and PEG diacylchloride, *J. Appl. Polym. Sci.* 116 (2010) 3249–3255.
<https://doi.org/10.1002/app>.
- [111] J.M.C. Puguán, H.S. Kim, K.J. Lee, H. Kim, Low internal concentration polarization in forward osmosis membranes with hydrophilic crosslinked PVA nanofibers as porous support layer,

- Desalination. 336 (2014) 24–31. <https://doi.org/10.1016/J.DESAL.2013.12.031>.
- [112] E.F. Gulino, M.C. Citarrella, A. Maio, R. Scaffaro, An innovative route to prepare in situ graded crosslinked PVA graphene electrospun mats for drug release, *Compos. Part A Appl. Sci. Manuf.* 155 (2022) 106827. <https://doi.org/10.1016/J.COMPOSITESA.2022.106827>.
- [113] Q. Zhou, J. Lyu, G. Wang, M. Robertson, Z. Qiang, B. Sun, C. Ye, M. Zhu, Mechanically Strong and Multifunctional Hybrid Hydrogels with Ultrahigh Electrical Conductivity, *Adv. Funct. Mater.* 31 (2021) 2104536. <https://doi.org/10.1002/ADFM.202104536>.
- [114] T. Terao, S. Maeda, A. Saika, High-Resolution Solid-State ¹³C NMR of Poly (vinyl alcohol): Enhancement of Tacticity Splitting by Intramolecular Hydrogen Bonds, *Macromolecules.* 16 (1983) 1535–1538. https://doi.org/10.1021/MA00243A022/ASSET/MA00243A022.FP.PNG_V03.
- [115] M. Kobayashi, I. Ando, T. Ishii, S. Amiya, Structural and dynamical studies of poly(vinyl alcohol) gels by high-resolution solid-state ¹³C NMR spectroscopy, *J. Mol. Struct.* 440 (1998) 155–164. [https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(97\)00238-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2860(97)00238-X).
- [116] V.B. Sterren, V. Aiassa, C. Garnerio, Y.G. Linck, A.K. Chattah, G.A. Monti, M.R. Longhi, A. Zoppi, Preparation of Chloramphenicol/Amino Acid Combinations Exhibiting Enhanced Dissolution Rates and Reduced Drug-Induced Oxidative Stress, *AAPS PharmSciTech.* 18 (2017) 2910–2918. <https://doi.org/10.1208/S12249-017-0775-4/FIGURES/9>.
- [117] L.F. Zhu, Y. Zheng, J. Fan, Y. Yao, Z. Ahmad, M.W. Chang, A novel core-shell nanofiber drug delivery system intended for the synergistic treatment of melanoma, *Eur. J. Pharm. Sci.* 137 (2019) 105002. <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2019.105002>.
- [118] A. López-Córdoba, G.R. Castro, S. Goyanes, A simple green route to obtain poly(vinyl alcohol) electrospun mats with improved water stability for use as potential carriers of drugs, *Mater. Sci. Eng. C.* 69 (2016) 726–732. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.07.058>.
- [119] A.G. Destaye, C.K. Lin, C.K. Lee, Glutaraldehyde vapor cross-linked nanofibrous PVA mat with in situ formed silver nanoparticles, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 5 (2013) 4745–4752. <https://doi.org/10.1021/am401730x>.
- [120] V.S. Praptowidodo, Influence of swelling on water transport through PVA-based membrane, *J. Mol. Struct.* 739 (2005) 207–212. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2004.04.035>.
- [121] A. de A. Morandim-Giannetti, S.R. Rubio, R.F. Nogueira, F. dos S. Ortega, O. Magalhães Junior, P. Schor, P.A. Bersanetti, Characterization of PVA/glutaraldehyde hydrogels obtained using Central Composite Rotatable Design (CCRD), *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl.*

- Biomater. 106 (2018) 1558–1566. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33958>.
- [122] C.K. Yeom, K.H. Lee, Pervaporation separation of water-acetic acid mixtures through poly(vinyl alcohol) membranes crosslinked with glutaraldehyde, *J. Memb. Sci.* 109 (1996) 257–265. [https://doi.org/10.1016/0376-7388\(95\)00196-4](https://doi.org/10.1016/0376-7388(95)00196-4).
- [123] J.R. Dias, S. Baptista-Silva, C.M.T. d. Oliveira, A. Sousa, A.L. Oliveira, P.J. Bártolo, P.L. Granja, In situ crosslinked electrospun gelatin nanofibers for skin regeneration, *Eur. Polym. J.* 95 (2017) 161–173. <https://doi.org/10.1016/J.EURPOLYMJ.2017.08.015>.
- [124] S. Gustaite, J. Kazlauske, J. Bobokalonov, S. Perni, V. Dutschk, J. Liesiene, P. Prokopovich, Characterization of cellulose based sponges for wound dressings, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 480 (2015) 336–342. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFA.2014.08.022>.
- [125] Y. Liu, L. Deng, C. Zhang, F. Feng, H. Zhang, Tunable Physical Properties of Ethylcellulose/Gelatin Composite Nanofibers by Electrospinning, *J. Agric. Food Chem.* 66 (2018) 1907–1915. https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.7B06038/ASSET/IMAGES/LARGE/JF-2017-06038T_0007.JPEG.
- [126] J. Jalvandi, M. White, Y. Gao, Y.B. Truong, R. Padhye, I.L. Kyrtzis, Polyvinyl alcohol composite nanofibres containing conjugated levofloxacin-chitosan for controlled drug release, *Mater. Sci. Eng. C.* 73 (2017) 440–446. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2016.12.112>.
- [127] Z. Cui, Z. Zheng, L. Lin, J. Si, Q. Wang, X. Peng, W. Chen, Electrospinning and crosslinking of polyvinyl alcohol/chitosan composite nanofiber for transdermal drug delivery, *Adva Polym Technol.* 37 (2018) 1917–1928. <https://doi.org/10.1002/ADV.21850>.
- [128] J. Meng, V. Agrahari, M.J. Ezoulin, C. Zhang, S.S. Purohit, A. Molteni, D. Dim, N.A. Oyler, B.B.C. Youan, Tenofovir Containing Thiolated Chitosan Core/Shell Nanofibers: In Vitro and in Vivo Evaluations, *Mol. Pharm.* 13 (2016) 4129–4140. https://doi.org/10.1021/ACS.MOLPHARMACEUT.6B00739/ASSET/IMAGES/MP-2016-00739N_M011.GIF.
- [129] S. Kajdič, O. Planinšek, M. Gašperlin, P. Kocbek, Electrospun nanofibers for customized drug-delivery systems, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 51 (2019) 672–681. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2019.03.038>.
- [130] J. Lamarra, M.N. Calienni, S. Rivero, A. Pinotti, Electrospun nanofibers of poly(vinyl alcohol) and chitosan-based emulsions functionalized with cabreuva essential oil, *Int. J. Biol. Macromol.* 160 (2020) 307–318. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.05.096>.

- [131] F. Kurd, M. Fathi, H. Shekarchizadeh, Nanoencapsulation of hesperetin using basil seed mucilage nanofibers: Characterization and release modeling, *Food Biosci.* 32 (2019) 100475. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2019.100475>.
- [132] T. Huang, Y. Cheng, Y. Zheng, In vitro studies on silver implanted pure iron by metal vapor vacuum arc technique, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 142 (2016) 20–29. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2016.01.065>.
- [133] N. Liao, A.R. Unnithan, M.K. Joshi, A.P. Tiwari, S.T. Hong, C.H. Park, C.S. Kim, Electrospun bioactive poly (ϵ -caprolactone)–cellulose acetate–dextran antibacterial composite mats for wound dressing applications, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 469 (2015) 194–201. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFA.2015.01.022>.