

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM
QUÍMICA

Diego Caproni de Moraes

Fibras Poliméricas e suas Associações com Ciclodextrina para a
Liberação Controlada do Antimicrobiano Sulfadiazina de Sódio

Diego Caproni de Moraes

Fibras Poliméricas e suas Associações com Ciclodextrina para a Liberação Controlada do Antimicrobiano Sulfadiazina de Sódio

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais como requisito para obtenção do grau de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Barros de Sousa

Itajubá, 2023

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus pelo dom da vida e a capacidade de me guiar com humildade até aqui.

Agradeço a minha família: meu pai Vicente e minha mãe Elzy, por todo carinho, respeito e pela ajuda que me é dada, tanto psicológica, quanto materiais; ao meu irmão Robson, por todo apoio e carinho nos mais distintos momentos da minha vida; a minha cunhada Márcia que além de fornecer alguns produtos químicos, também me dá muito apoio.

Agradeço a minha esposa Cristiane, que no começo do meu doutorado era namorada e em meio ao caos que a pandemia nos trouxe, aceitou ser minha esposa para trilharmos um só caminho, cheio de amor, dedicação e companheirismo, ensinamentos e principalmente pela pessoa que é. Ela vem demonstrando ser uma pessoa muito paciente nesse meu período de doutorado. Não posso deixar de citar o nosso cãozinho Luppi, que nos ajuda a melhorar psicologicamente todos os dias. Aos meus sogros, Rovanei e Márcia, aos meus cunhados Monike e Gustavo pelo apoio nesse meu projeto.

Agradeço ao meu orientador Frederico (Fred) pelo apoio, por me motivar nos momentos difíceis, pelos ensinamentos, pela paciência, por entender o meu ritmo e minhas dificuldades e sempre me motivar a vencer. Você se tornou bem mais que um simples orientador, é um exemplo de profissionalismo e de pessoa!

Agradeço aos meus colegas de laboratório que se tornaram amigos: Flávio, Jorge, Bianca, Daniel, Samuel, Ricardo e Lucas, pela troca de experiências e vivências que nos ajudam a crescer. Aos amigos que a UNIFEI me deu, mas não estão mais presentes no cotidiano: Thiago, Ana Laura, Lucas e Gabriel.

Agradeço ao professor Hernane Barud, e aos colegas do grupo BioPolMat da Universidade de Araraquara, por terem me recebido em seu laboratório para realização de experimentos de citotoxicidade, liberação e wound healing, agradeço em especial a Marina, que me auxiliou na execução e discussão de todos os testes feitos lá.

Ao professor Luiz Fernando Cappa do Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora, pela atenção ao me receber e pelas análises de MEV.

Ao CNPq e BioSmart Nano pela bolsa e fomento à pesquisa recebidos durante o doutorado.

Aos órgãos de fomento CAPES, FAPEMIG e Finep.

Resumo

No presente trabalho é documentada a obtenção de matrizes poliméricas de poli- ϵ -caprolactona (PCL), polimetilmetacrilato (PMMA) e poli (ácido láctico-co- ácido glicólico) (PLGA), polímeros biocompatíveis que já são comumente utilizados em sistemas médicos. A esses polímeros foram adicionadas substâncias como o fármaco anti-inflamatório e antibacteriano sulfadiazina de sódio (SDS) e o composto supramolecular formado pelo fármaco e pela hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD), com a finalidade de montagem de um sistema de liberação de fármaco via transdérmica. A técnica utilizada para obtenção destas membranas poliméricas foi a eletrofiação, sendo a formação das fibras e suas características morfológicas observadas previamente por microscopia ótica. Em seguida a formação das fibras poliméricas e suas distribuições de diâmetro médio avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As características de hidrofobia e hidrofilia dos materiais foram caracterizadas pela técnica de medida de ângulo de contato da água com a superfície dos materiais, bem como pelas análises de permeabilidade ao vapor de água. Previamente ao teste de liberação, extrações foram feitas a fim de quantificar a presença do fármaco nas membranas poliméricas. Após feita a quantificação foram realizados testes de liberação para descobrir o perfil de liberação que é associado a esse material e se a quantidade liberada durante o período de teste será efetiva para o objetivo principal que é a obtenção de uma matriz polimérica para liberação transdérmica. Posteriormente a isso foram feitas avaliações de viabilidade celular, a fim de constatar a possível toxicidade do material. Também foi realizado o teste de ranhura (wound healing), que simula o processo de cicatrização através da proliferação dos fibroblastos. Outra análise biológica realizada foi o ensaio de atividade antibacteriana, para mensurar a capacidade do material em reduzir a carga microbiana das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. A caracterização por MEV, demonstrou que as fibras obtidas estão com diâmetros em escala nanométrica e micrométrica e as análises de ângulo de contato indicaram que as fibras de PCL e PMMA, mesmo com a presença de moléculas hidrofílicas, como o fármaco e a HP β CD, apresentaram caráter hidrofóbico, enquanto as fibras de PLGA apresentaram caráter hidrofílico, tanto para as fibras do polímero quanto quando adicionadas as moléculas supracitadas. As quantificações das extrações, apresentaram um erro que pode ser atribuído a questões experimentais ou a não uniformidade de distribuição do fármaco pela membrana. Os valores de liberação demonstraram que as fibras de PLGA E PMMA são

promissoras para ser utilizadas, pois apresentaram perfis que demonstram ser promissores. O teste de viabilidade celular demonstrou que todas as membranas poliméricas foram consideradas não tóxicas. No teste de ranhura, os resultados demonstram que os sistemas que contêm especialmente os sistemas supramoleculares SDS/HP β CD, aceleram o processo de proliferação celular, quando comparados ao polímero livre ou carregado somente com SDS. A membrana que apresentou melhores resultados foi a de PLGA SDS/HP β CD. Nos ensaios antimicrobianos novamente a membrana PLGA SDS/HP β CD foi a que apresentou menores valores de carga microbiana e maior valor de halo de inibição.

Palavras-chaves: polímeros; eletrofiação; liberação de fármacos; química supramolecular; bactericida; *in vitro*.

Abstract

The present work documents the production of polymeric matrices of poly- ϵ -caprolactone (PCL), polymethylmethacrylate (PMMA) and poly (lactic acid-co-glycolic acid) (PLGA), biocompatible polymers that are already commonly used in medical systems. Substances such as the anti-inflammatory and antibacterial drug sodium sulfadiazine (SDS) and the supramolecular compound formed by the drug and hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD) were added to these polymers, with the aim of assembling a delivery system. of drug transdermally. The technique used to obtain these polymeric membranes was electrospinning, with the formation of fibers and their morphological characteristics previously observed by optical microscopy. Then the formation of polymeric fibers and their average diameter distributions evaluated by scanning electron microscopy (SEM). The hydrophobic and hydrophilic characteristics of the materials were characterized by the technique of measuring the contact angle of the water with the surface of the materials, as well as by the analysis of permeability to water vapor. Prior to the release test, extractions were performed to quantify the presence of the drug in the polymeric membranes. After quantification, release tests were performed to discover the release profile that is associated with this material and whether the amount released during the test period will be effective for the main objective, which is to obtain a polymeric matrix for transdermal release. Subsequently, cell viability assessments were carried out to verify the possible toxicity of the material. The scratch test (wound healing) was also performed to simulate the healing process through fibroblast proliferation. Another biological analysis conducted was the antibacterial activity assay, to measure the material's ability to reduce the microbial load of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria. The characterization by SEM showed that the fibers obtained have diameters in nanometer and micrometer scale and the contact angle analysis indicate that the PCL and PMMA fibers, even with the presence of hydrophilic molecules, such as the drug and HP β CD, have a hydrophobic character, while the PLGA fibers have a hydrophilic character, both by the pure polymer and when the molecules are added. The quantification of the extractions showed an error that can be attributed to experimental issues or the non-uniformity of drug distribution across the membrane. The release values demonstrate that PLGA and PMMA fibers are promising to be used, as they have profiles demonstrate to be promise. The cell viability test showed that all

polymeric membranes were found to be non-toxic. In the scratch test, the results showed that systems containing the supramolecular systems SDS/HP β CD particularly accelerated the cell proliferation process compared to the free polymer or SDS-only loaded systems. The membrane that yielded the best results was the PLGA SDS/HP β CD membrane. In the antimicrobial assays, once again, the PLGA SDS/HP β CD membrane showed lower microbial load values and a larger inhibition zone.

Keywords: polymers; electrospinning; drug release; supramolecular chemistry; bactericidal; *in vitro*.

Lista de Abreviações

CD – ciclodextrina

CHCl₃ – Clorofórmio

CHX – Clorexidina

DCM – Diclorometano

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMF – Dimetilformamida

HPβCD – hidroxipropil-β-ciclodextrina

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

PBS – Tampão fosfato salino

PCL – Policaprolactona

PLGA – Poli (ácido lático-co-glicólico)

PMMA – Polimetilmetacrilato

PVA – Permeabilidade ao vapor de água

SBF – Soro fetal bovino

SDS – Sulfadiazina de sódio

THF – Tetrahidrofurano

UV-Vis – Ultravioleta-Visível

βCD – β-ciclodextrina

Lista de Figuras

Figura 1.1- Redução da infecção no local da ferida, após a liberação do agente bacteriano presente no curativo.	4
Figura 1.2 - Representação estrutural de alguns exemplos de sulfonamidas.....	5
Figura 1.3- Representação estrutural da sulfadiazina de sódio.....	6
Figura 1.4 Representação dos tipos de liberação de fármacos.....	9
Figura 1.5- a) Unidade glicosídica com identificação dos carbonos b) estrutura da β -ciclodextrina.....	10
Figura 1.6- Representação estrutural do monômero da policaprolactona.....	12
Figura 1.7- Representação estrutural do monômero do polimetilmetacrilato.....	13
Figura 1.8- Representação estrutural do ácido poli (lático-co-glicólico).....	15
Figura 1.9- Representação de um modelo de equipamento de eletrofiação.	17
Figura 2.1 – Esquema de célula de Franz modificada.	25
Figura 3.1 - Imagens obtidas por microscopia ótica para diferentes tentativas de obtenção de fibras de: (a) PMMA SDS/HP β CD, (b) PCL SDS e (c) e PLGA pela técnica de eletrofiação.....	38
Figura 3.2 - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura para as fibras obtidas por eletrofiação com ampliação: PCL (a) 500x (b) 1500x, PCL SDS (c) 500x (d) 1500x, PCL SDS/HP β CD (e) 500x (f) 1500x.....	40
Figura 3.3 – Distribuição dos diâmetros das fibras a) PCL, b) PCL SDS e c) PCL SDS/HP β CD.	42
Figura 3.4 - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura para as fibras obtidas por eletrofiação com ampliação: PMMA (a) 500x (b) 1500x, PMMA SDS (c) 500x (d) 1500x, PMMA SDS/HP β CD (e) 500x (f) 1500x.....	44
Figura 3.5 -Distribuição dos diâmetros das fibras a) PMMA, b) PMMA SDS e c) PMMA SDS/HP β CD.	45
Figura 3.6 - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura para as fibras obtidas por eletrofiação com ampliação: PLGA (a) 500x (b) 1500x, PLGA SDS (c) 500x (d) 1500x, PLGA SDS/HP β CD (e) 500x (f) 1500x.....	47

Figura 3.7 - Distribuição dos diâmetros das fibras a) PLGA, b) PLGA SDS e c) PLGA SDS/HP β CD.	48
Figura 3.8 Esquema geral de como é calculado o ângulo (θ) de contato da água com a superfície do material.	50
Figura 3.9 - Ângulo de contato entre água (10 μ L) e a superfície das membranas de a) PCL, b) PCL SDS, c) PCL SDS/HP β CD.	51
Figura 3.10 - Ângulo de contato entre água (10 μ L) e a superfície das membranas de a) PMMA, b) PMMA SDS e c) PMMA SDS/HP β CD.	51
Figura 3.11 - Ângulo de contato entre água (10 μ L) e a superfície das membranas de PLGA.	52
Figura 3.12 - Espectro de UV-Vis da sulfadiazina de sódio variando as concentrações entre 4,955x10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹ a 5,505x10 ⁻⁶ mol.L ⁻¹	57
Figura 3.13 - Representação da curva de calibração obtida para sulfadiazina de sódio em solução aquosa.	58
Figura 3.14 - Espectro de UV-Vis da sulfadiazina de sódio e HP variando as concentrações entre 4,955x10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹ a 5,505x10 ⁻⁶ mol.L ⁻¹	59
Figura 3.15 - Representação da curva de calibração obtida para sulfadiazina de sódio em presença de HP β CD.	59
Figura 3.16 Gráfico de quantificação para cada sistema polimérico contendo sulfadiazina de sódio.	60
Figura 3.17 - Curva de média da massa acumulada por tempo para as fibras PMMA SDS e PMMA SDS/HP β CD no ensaio de liberação <i>in vitro</i>	62
Figura 3.18 - Curva de média da massa acumulada por tempo para as fibras PLGA SDS e PLGA SDS/HP β CD no ensaio de liberação <i>in vitro</i>	63
Figura 3.19 - Curva de média da massa acumulada por tempo para as fibras PCL SDS e PCL SDS/HP β CD no ensaio de liberação <i>in vitro</i>	64
Figura 3.20 – Média das massas acumuladas para membranas poliméricas com presença de sulfadiazina e HP β CD.....	65
Figura 3.21 - Média das massas acumuladas para as membranas poliméricas com presença de sulfadiazina.	66

Figura 3.22 - Gráfico do percentual de viabilidade celular para as fibras de PCL, PMMA e PLGA com a presença de SDS ou SDS/HP β CD.	68
Figura 3.23 Micrografias de uma pseudo-ferida criada em uma monocamada de fibroblastos, às 0 horas (coluna da esquerda), às 10 horas (coluna do meio) e às 24 horas (coluna da direita). As pseudo-feridas foram tratadas com (a-c) PCL, (d-f) PCL SDS, (g-i) PCL SDS/HP β CD e (j-l) grupo controle.	70
Figura 3.24 Micrografias de uma pseudo-ferida criada em uma monocamada de fibroblastos, às 0 horas (coluna da esquerda), às 10 horas (coluna do meio) e às 24 horas (coluna da direita). As pseudo-feridas foram tratadas com (a-c) PMMA, (d-f) PMMA SDS, (g-i) PMMA SDS/HP β CD e (j-l) grupo controle.	71
Figura 3.25 Micrografias de uma pseudo-ferida criada em uma monocamada de fibroblastos, às 0 horas (coluna da esquerda), às 10 horas (coluna do meio) e às 24 horas (coluna da direita). As pseudo-feridas foram tratadas com (a-c) PLGA, (d-f) PLGA SDS, (g-i) PLGA SDS/HP β CD e (j-l) grupo controle.	72
Figura 3.26 Porcentagem de fechamento da pseudo-ferida para os sistemas de fibras PCL, PMMA e PLGA.	73
Figura 3.27 Análise visual do halo de inibição microbiano para o ensaio de difusão em ágar de dupla camada para: a) <i>Staphylococcus aureus</i> e b) <i>Escherichia coli</i>	74
Figura 3.28 Gráfico de mediana com valores mínimos/máximos ilustrando os resultados significativos do teste de múltiplas comparações de Dunn para biofilme de <i>S. aureus</i>	76
Figura 3.29 Gráfico de mediana com valores mínimos/máximos ilustrando os resultados significativos do teste de múltiplas comparações de Dunn para análise de peso seco de biofilme de <i>S. aureus</i>	77
Figura 3.30 Gráfico de mediana com valores mínimos/máximos ilustrando os resultados significativos do teste de múltiplas comparações de Dunn para biofilme de <i>E. coli</i>	78
Figura 3.31 Gráfico de mediana com valores mínimos/máximos ilustrando os resultados significativos do teste de múltiplas comparações de Dunn para análise de peso seco de biofilme de <i>E. coli</i>	79

Lista de Tabelas

Tabela 2.1- Parâmetros utilizados para obtenção das fibras pela técnica de eletrofição.	22
Tabela 2.2 Descrição do mecanismo em função do expoente difusional.	27
Tabela 3.1 – Valores médios das medidas ângulo de contato e desvio padrão.....	50
Tabela 3.2 - Valores de permeabilidade ao vapor de água (PVA) e desvio padrão (DP) para as fibras obtidas por eletrofição.....	54
Tabela 3.3 Valores da taxa de carga do fármaco nas membranas de nanofibras.....	61
Tabela 3.4 Modelos matemáticos e parâmetros de ajuste de curvas para os perfis de liberação SDS.	67
Tabela 3.5 Halo de Inibição (mm) dos materiais testados.	75

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	2
1.1	Lesões na pele e o processo de cicatrização	2
1.2	Sulfadiazina de Sódio	4
1.3	Materiais para sistemas de liberação de fármacos.....	7
1.3.1	Tipos de liberação de fármacos	8
1.3.2	Ciclodextrinas.....	10
1.3.3	Polímeros.....	11
1.3.3.1	Policaprolactona	12
1.3.3.2	Polimetilmetacrilato	13
1.3.3.3	Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)	14
1.4	Eletrofição	16
1.5	Objetivos	19
1.5.1	Objetivos Gerais	19
1.5.2	Objetivos Específicos	19
2	MATERIAIS E MÉTODOS	21
2.1	Obtenção das fibras poliméricas.....	21
2.2	Espectroscopia eletrônica de absorção na região do ultravioleta visível.....	22
2.3	Microscopia eletrônica de varredura	23
2.4	Ângulo de contato.....	23
2.5	Permeabilidade ao vapor de água	23
2.6	Estudo de extração e liberação	24
2.6.1	Modelo de Primeira Ordem.....	26
2.6.2	Modelo de Higuchi.....	26
2.6.3	Modelo de Peppas	27

2.6.4	Modelo de Weibull.....	29
2.6.5	Modelo de Ordem Zero	29
2.6.7	Modelo de Hixson e Crowell	30
2.7	Avaliação da citotoxicidade celular.....	30
2.8	Ensaio de arranhão (teste de cicatrização <i>in vitro</i>).....	32
2.9	Triagem primária para bioatividade do material (Halo de inibição)	33
2.10	Avaliação da atividade antibacteriana em biofilmes	33
2.11	Análise estatística.....	34
3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	37
3.1	Caracterização das fibras por microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura.....	37
3.2	Análise por ângulo de contato.....	49
3.3	Análise de permeabilidade em vapor de água.....	53
3.4	Ensaio de liberação <i>in vitro</i> do fármaco sulfadiazina de sódio.....	56
	Tabela 3.3 -	61
3.5	Avaliação da viabilidade celular (citotoxicidade)	67
3.6	Teste de ranhura (avaliação da cicatrização <i>in vitro</i>)	69
3.7	Halo de inibição.....	74
3.8	Teste de atividade antibacteriana.....	75
4	CONCLUSÕES.....	82
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Lesões na pele e o processo de cicatrização

O maior órgão que o corpo humano possui é a pele, que é revestido pelo tecido epitelial denominado epiderme. O conjunto que compõe o sistema epitelial tem como algumas de suas funções: regular a temperatura corporal, ser responsável pelos estímulos sensoriais e atuar como barreira protetora contra ataques de agentes internos e externos ao nosso corpo, como bactérias, vírus, fungos, reações alérgicas a fármacos, calor, radiação, entre outros. Este conjunto de funções, além da grande exposição, faz com que esse órgão se torne suscetível a diferentes tipos de lesões (SHAMS et al., 2021; YEH et al., 2017).

As lesões podem ter origens diversas, porém as duas maiores causas destas lesões cutâneas estão associadas à queimadura e ao diabetes. Esta última, o diabetes, pode ser responsável ainda por agravar a lesão e dificultar a cicatrização das feridas, pois a doença gera complicações cardiovasculares que diminuem o fluxo da circulação sanguínea. Além disso, o excesso de glicose no organismo pode dificultar o bom funcionamento do sistema imunológico (GOUTOS et al., 2015). Para as pessoas com diabetes recomenda-se a avaliação da gravidade da lesão e a aplicação de agentes antibióticos e cicatrizantes, concomitante com o controle das taxas de glicose, para as lesões que não se tornaram crônicas (HAN; CEILLEY, 2017). Já os casos que envolve feridas oriundas de queimaduras, há necessidade de um tratamento um pouco diferente. Para estes pacientes o diagnóstico de melhor tratamento depende do grau e da extensão da queimadura e de qual foi o agente responsável por aquela lesão (SHPICHKA et al., 2019).

As doenças de pele afetaram cerca de 4,1 bilhões de pessoas em todo o mundo no período de 1990 a 2017, com um aumento de 46,8 % em relação a 1990. Estas foram a quarta principal causa de incapacidade em todo o mundo, atrás apenas de doenças respiratórias, infecções intestinais e outras doenças não transmissíveis. As lesões de pele também são responsáveis por cerca de 50 mil mortes por ano, principalmente devido ao câncer de pele, destacando a importância da prevenção, tratamento adequado e conscientização sobre as causas (GIESEY et al., 2021).

Quando a pele sofre uma lesão, é comum que ocorra uma resposta imunológica para combater possíveis infecções, já que a barreira protetora da pele é prejudicada. Os peptídeos

antimicrobianos (AMPs) são um dos mecanismos dessa resposta imunológica, pois são moléculas capazes de eliminar microrganismos patogênicos. Os AMPs possuem uma estrutura anfipática, ou seja, possuem uma região hidrofóbica e outra hidrofílica, o que lhes permite se inserir na membrana de células bacterianas ou fúngicas e provocar a ruptura destas (LUO; SONG, 2021). Os AMPs estão sempre presentes na pele, sendo produzidos de forma constitutiva, mas também podem ser induzidos após a ativação celular em resposta a estímulos inflamatórios ou homeostáticos. No entanto, mesmo com essa resposta imunológica, o acesso de bactérias em uma região cutânea lesionada é inevitável. Em alguns casos, a ação imunológica pode ser ineficaz, o que pode levar a complicações e até mesmo óbitos em pessoas com lesões cutâneas crônicas graves (TOTTOLI et al., 2020).

É importante ressaltar que a presença de bactérias na pele saudável é essencial para o seu equilíbrio e proteção contra agentes patogênicos. As bactérias atuam como uma espécie de barreira natural, impedindo a colonização de microrganismos nocivos. Entretanto, quando há interrupção da continuidade da pele, as bactérias se deslocam para outras áreas do corpo, causando um desequilíbrio que pode resultar em infecções cutâneas. Em pessoas com lesões cutâneas crônicas, como úlceras e feridas de difícil cicatrização, o risco de complicações é ainda maior, podendo levar a quadros de infecção grave e até óbito. As bactérias presentes nas lesões cutâneas podem ter origem no ambiente externo, como o *Staphylococcus aureus*, uma bactéria comum na pele e no nariz de muitas pessoas. Outra fonte são as bactérias residentes em órgãos, como o trato gastrointestinal e urinário, que podem migrar pela corrente sanguínea e colonizar as feridas (WILLYARD, 2018).

Os fatos citados anteriormente impactam diretamente no tratamento proposto para as lesões de pele. Dentre diversos tratamentos, aqueles que fazem uso de membranas contendo substâncias auxiliares que atuam como agentes cicatrizantes, como por exemplo proteínas, vitaminas C, ácido hialurônico e agentes anti-inflamatórios, como o corticóide de uso tópico têm sido buscadas. Estes curativos têm a função de proteger as lesões de ações de agentes externos, sendo considerado essencial para a cicatrização e restauração da pele (RAHMATI et al., 2020). Agentes cicatrizantes potencializam a eficácia do curativo aplicado sobre a lesão devido, ao maior controle de microrganismos. Esse controle se deve a diminuição da proliferação das bactérias e/ou fungos na região das lesões uma vez que a presença destes (bactérias ou fungos) retardam o processo de cicatrização (Figura 1.1) (CHEN et al., 2021; FAROKHI et al., 2018; LIU et al., 2008).

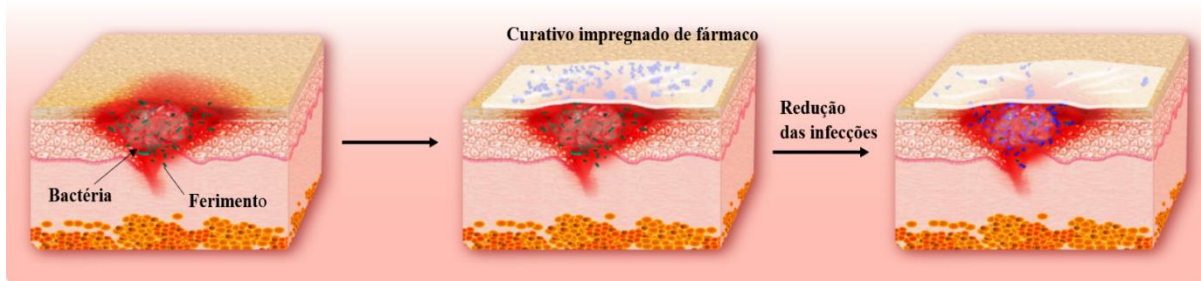


Figura 1.1- Redução da infecção no local da ferida, após a liberação do agente bacteriano presente no curativo. Adaptado de Trends in Biotechnology com permissão da editora Cell Press (FAROKHI et al., 2018).

Dentre as diferentes classes de compostos que são utilizados para a inibição do crescimento de microorganismos em lesões de pele, e atuam também como antibacterianos bactericidas e bacteriostáticos, podemos destacar as classes dos beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, macrolídeos, e as sulfonamidas (SKÖLD, 2000).

1.2 Sulfadiazina de Sódio

As sulfonamidas compreendem um dos principais grupos utilizados para o tratamento de infecções bacterianas (SOUZA et al., 2018). Em sua estrutura, o grupo SO_2NH é amplamente empregado em pesquisas voltadas para o desenvolvimento de novos medicamentos, isso ocorre devido à sua função toxofórica, que consiste na habilidade de conferir ao fármaco propriedades de toxicidade, determinando, assim, sua atividade antimicrobiana. (ALGANABI; RASOOL, 2018; PERLOVICH et al., 2014). Alguns exemplos de fármacos, que contêm o grupo funcional, estão apresentados na Figura 1.2, sendo essa classe de compostos muito utilizadas em tratamentos infecciosos oriundos de bactérias (SKÖLD, 2000). A sulfadiazina destaca-se por apresentar rápida absorção no organismo pelo trato gastrointestinal, quando administradas por via oral, podendo ser administrada mais de uma vez por dia dependendo da dosagem recomendada, já que a sua concentração plasmática pode variar entre 2 a 6 horas.

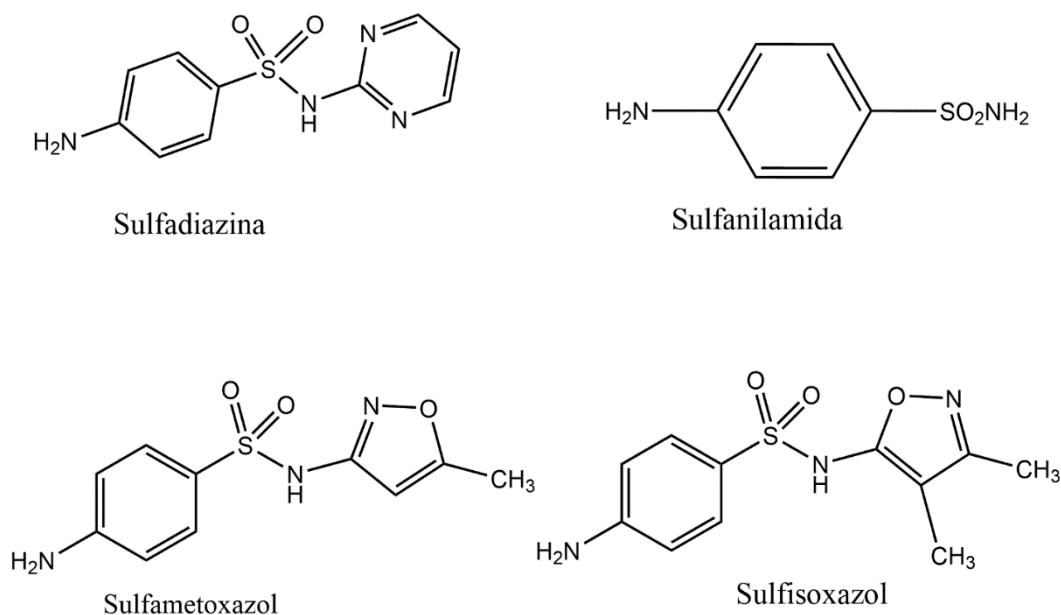


Figura 1.2 - Representação estrutural de alguns exemplos de sulfonamidas.

Além disso, quando as sulfonamidas são quimicamente modificadas, trocando o hidrogênio ligado ao nitrogênio do grupo (SO₂NH) por íons metálicos, a toxicidade destas moléculas diminui (MANSOUR; RADACKI, 2020). Esta troca, que transforma a base livre em um sal, aumentando a capacidade destas moléculas de penetrarem nos líquidos corporais, permitindo que as mesmas possam ser utilizadas, por exemplo, em curativos (MANSOUR; RADACKI, 2020). De forma geral a sulfadiazina possui uma rápida absorção e excreção, tendo um tempo de meia-vida de aproximadamente 10 horas (JORDAN et al., 2004).

Sobre sua toxicidade tem-se relatos que demonstram que a sulfadiazina na forma de base livre (sem a presença de um íon metálico) apresenta uma citotoxicidade elevada, porém quando acontece a formação de complexos com diferentes íons metálicos, sua toxicidade diminui, justificando então a obtenção dos sais com sulfadiazina. No trabalho de Rocha e colaboradores (2019) foi relatada a formação de complexos metálicos com cobalto, níquel e cobre, que comparados a sulfadiazina (Figura 1.2) apresentaram menores valores de toxicidade. Porém, a atividade antimicrobiana foi diminuída, devido ao fato da solubilidade desses complexos formados serem baixas. Tendo em vista esses fatos apresentados a formação de um sal mais solúvel de sulfadiazina pode reduzir o efeito tóxico e aumentar a atividade antimicrobiana, justificando assim a utilização da sulfadiazina de sódio.

O mecanismo de ação da sulfadiazina de sódio (SDS), cuja estrutura está apresentada na Figura 1.3, é baseado na inibição da produção de ácido fólico no interior das células das bactérias, incapacitando-as de agir no organismo. Além disso, a sulfadiazina de sódio também auxilia no processo de cicatrização de ferida atuando como um controlador de infecções, inibindo a proliferação de bactérias, diminuindo as infecções e consequentemente aumentando a replicação dos queratinócitos (DA SILVA et al., 2021; LEE et al., 2005; MUZZALUPO et al., 2014).

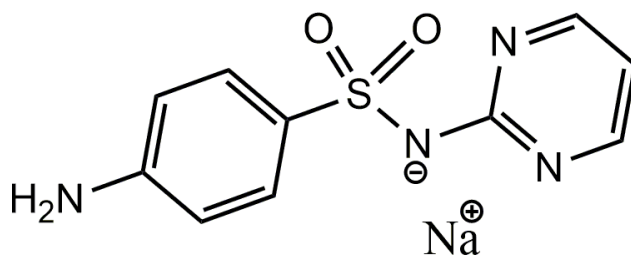


Figura 1. 3 - Representação estrutural da sulfadiazina de sódio.

A sulfadiazina de sódio é um pó cristalino de cor branca a levemente amarelada, possuindo peso molecular de 272,26 g/mol. Sua solubilidade em água, metanol e soluções diluídas de hidróxidos alcalinos é alta, entretanto é insolúvel em solventes orgânicos apolares. Enquanto a solubilidade da sulfadiazina e da sulfadiazina de prata é baixa em água (0,074 mg/mL e 0,034 mg/mL, respectivamente), a sulfadiazina de sódio apresenta uma solubilidade significativamente maior neste mesmo solvente, aproximadamente 50,0 mg/mL. (DELRIVO; ZOPPI; LONGHI, 2012; SZEGEDI et al., 2014).

A permeabilidade de um fármaco na pele é uma característica crucial que pode afetar sua eficácia. Devido à hidrofobicidade típica da camada externa da pele, chamada de estrato córneo, a penetração de fármacos é geralmente limitada. No entanto, se a pele apresentar alguma lesão, como um corte ou inflamação, as camadas mais hidrofóbicas podem estar comprometidas, permitindo que a água se acumule na região afetada. Esse acúmulo de água pode favorecer a ação do fármaco naquela região, aumentando sua penetração e, potencialmente, melhorando sua eficácia. Com base neste e em outros problemas relacionados ao SDS, a importância da montagem de um sistema que permita aumentar a permeabilidade do fármaco é fundamental (PRAUSNITZ; LANGER, 2008). Conforme estudo desenvolvido por Muzzalupo e colaboradores (2014), a permeabilidade da

sulfadiazina de sódio em solução aquosa é de 32 % v/v e aumenta para 68 % v/v quando dispersa em um biofilme a base de niossomas, demonstrando a importância de uma plataforma de liberação.

Devido a estas características citadas anteriormente e a vasta literatura relacionada ao tema (ALAVI; NOKHODCHI, 2022; BAI et al., 2020; DING et al., 2022; PUNJATAEWAKUPT; NAPAVICHAYANUN; ARAMWIT, 2019), a formação de sistemas de liberação controlada para essa classe de moléculas se torna promissora. Estes sistemas baseados em polímeros têm como princípio melhorar a biodisponibilidade do fármaco, favorecendo que este permaneça por mais tempo na concentração terapêutica, e conseqüentemente culminando em uma melhor eficiência do medicamento (DING et al., 2022).

1.3 Materiais para sistemas de liberação de fármacos

Atualmente o desenvolvimento de novos materiais, sejam estes orgânicos, inorgânicos ou híbridos, está atrelado ao surgimento de novas tecnologias tanto na descoberta de novas moléculas, quanto no desenvolvimento de equipamentos para montagens de estruturas complexas, como aquelas em duas ou três dimensões (2D e 3D). As aplicações destes novos materiais permeiam diversas áreas do conhecimento, como por exemplo: remediação ambiental (DOGAN; SATILMIS; UYAR, 2019), *switch* supramolecular (LIU et al., 2017), liberação de fármacos (CELEBIOGLU; UYAR, 2019; ZHOU et al., 2019), entre outras.

Estes sistemas poliméricos, quando associados à fármacos e aplicados aos sistemas de liberação controlada, têm como uma das funções melhorar a biodisponibilidade do fármaco, possibilitando assim a diminuição das flutuações da concentração do fármaco na corrente sanguínea e conseqüentemente levando a redução na frequência das doses administradas. Como consequência desses fatores, pode ser esperada a redução de alguns efeitos colaterais, garantindo assim uma maior segurança terapêutica do medicamento, quando comparado com sistemas convencionais de liberação de fármacos (FENTON et al., 2018; LANGER, 1998). Um sistema de liberação acarreta combinações físicas ou químicas dos fármacos de interesse com materiais biocompatíveis, o que pode ocasionar um aumento da solubilidade de fármacos pouco solúveis em água e fazendo a retenção daqueles muito solúveis na matriz polimérica, melhorando sua biodisponibilidade e controlando a taxa de liberação do fármaco (GÖKE et al., 2018).

1.3.1 Tipos de liberação de fármacos

As modificações nas formas de liberação são desenvolvidas para que o fármaco seja aproveitado pelo organismo de uma melhor maneira possível, quando se comparado aos sistemas convencionais. Essas modificações permitem a otimização do sistema de liberação, distribuindo de melhor forma o fármaco pelo organismo, evitando flutuações de concentração indesejáveis, melhorando sua biodisponibilidade.

A melhora da biodisponibilidade do fármaco no organismo acarreta algumas vantagens no sistema modificado de liberação, quando comparado aos sistemas convencionais de liberação. As principais vantagens são redução dos efeitos colaterais, manutenção de níveis plasmáticos do fármaco, acima da faixa ideal e abaixo da faixa toxicológica, e melhor adesão do paciente ao tratamento, pois possibilita uma menor frequência de administração das doses (MARTINS; SANTOS, 2020).

Conforme apresentado na Figura 1.4, existem 4 tipos de liberação de fármacos, são eles:

- Liberação imediata: é a forma de liberação convencional, na qual a liberação do fármaco ocorre logo após sua administração, passando pela faixa terapêutica, podendo atingir a faixa tóxica, quando atinge o ápice de sua liberação, e rapidamente volta a cair, passando novamente pela faixa terapêutica. Porém, rapidamente a concentração do fármaco se desloca para a faixa subterapêutica, necessitando na maioria das vezes de uma nova administração do medicamento para que o efeito esperado seja efetivo.
- Liberação controlada: inicialmente o fármaco é liberado mais rapidamente, até que se atinja a faixa terapêutica, e sua concentração plasmática é mantida por mais tempo dentro dessa faixa, quando se comparado a liberação convencional, reduzindo a frequência de sua administração.
- Liberação sustentada: o fármaco é liberado até que esteja na faixa terapêutica, e quando comparado a forma convencional, a concentração plasmática vai de forma mais lenta para a faixa subterapêutica.
- Liberação retardada: esse modelo de liberação consiste na liberação do fármaco após um período em que este foi administrado, porém permanecendo pouco tempo na faixa terapêutica, quando se comparado aos outros modelos de liberação modificada.

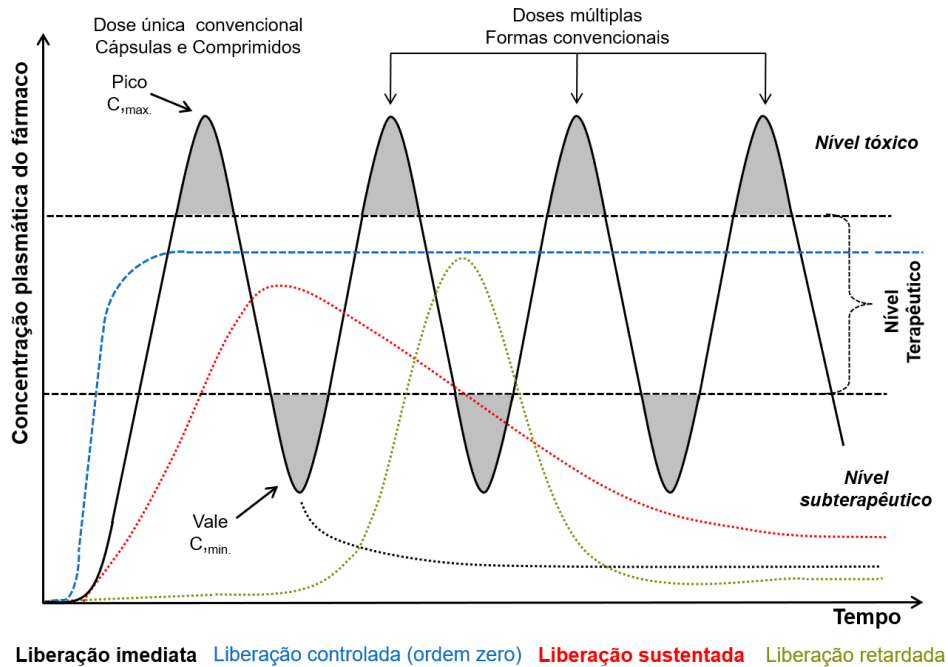


Figura 1. 4 Representação dos tipos de liberação de fármacos.

Exemplificando o que foi exposto, no trabalho de (LUONG-VAN et al., 2006), foi elaborada uma membrana polimérica utilizando a base de policaprolactona (PCL) para liberação de heparina, um anticoagulante utilizado na prevenção da formação de trombos ou coágulos na corrente sanguínea. Para a obtenção da membrana polimérica foi utilizada a técnica de eletrofiação e os autores relataram que a heparina permaneceu sendo liberada por um período de 14 dias, chegando a um total de 58 % na sua liberação acumulada. Esse sistema foi capaz de favorecer o tratamento com esse fármaco, que tem um tempo de meia vida curto e necessita de reposição de dose rapidamente.

Para que ocorra a formação de um sistema de liberação é necessário que haja um excipiente farmacêutico, que é uma molécula diferente do fármaco, capaz de realizar interações físicas, químicas ou biofarmacêuticas com o fármaco, a fim de melhorar sua estabilidade terapêutica e/ou biodisponibilidade (PANAKANTI; NARANG, 2012). Dentre os excipientes existentes, destaca-se um que vem sendo muito estudado ao longo dos anos que é a ciclodextrina (CD). Essa classe de macromoléculas possuem a capacidade de formar compostos do tipo hóspede/hospedeiro ou também comumente denominados de compostos de inclusão. Esses sistemas possuem uma gama de vantagens em relação a administração do fármaco não incluído na cavidade das ciclodextrinas,

como por exemplo, melhorar seu sabor desagradável, melhorar a taxa de dissolução de substâncias pouco solúveis e a biodisponibilidade das substâncias ativas (LOFTSSON; BREWSTER, 2012).

1.3.2 Ciclodextrinas

Para que consigam agir de forma eficiente, fármacos que precisam estar associados a excipientes farmacêuticos, que são substâncias responsáveis por melhorar sua biodisponibilidade e nessa classe se destacam as ciclodextrinas. As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos formados por unidades glicosídicas que possuem ligações do tipo α 1-4, podendo ser encontradas nas suas formas naturais α CD, β CD e γ CD, que possuem respectivamente 6, 7 e 8 unidades glicosídicas (Figura 1.5a). Dentre essas formas naturais de CDs a mais utilizada é a β CD (Figura 1.5b) devido ao seu baixo custo e tamanho adequado da cavidade para várias classes de moléculas e/ou grupos funcionais (DAVIS; BREWSTER, 2004). As CDs possuem hidroxilas secundárias nos carbonos C2 e C3 e hidroxilas primárias no carbono C6. As ciclodextrinas também se destacam por possuir uma forma de cone que tem a parte exterior hidrofílica ou polar e a parte inferior hidrofóbica, tendo assim a capacidade de incluir moléculas de caráter hidrofóbico e aumentar sua solubilidade (LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007).

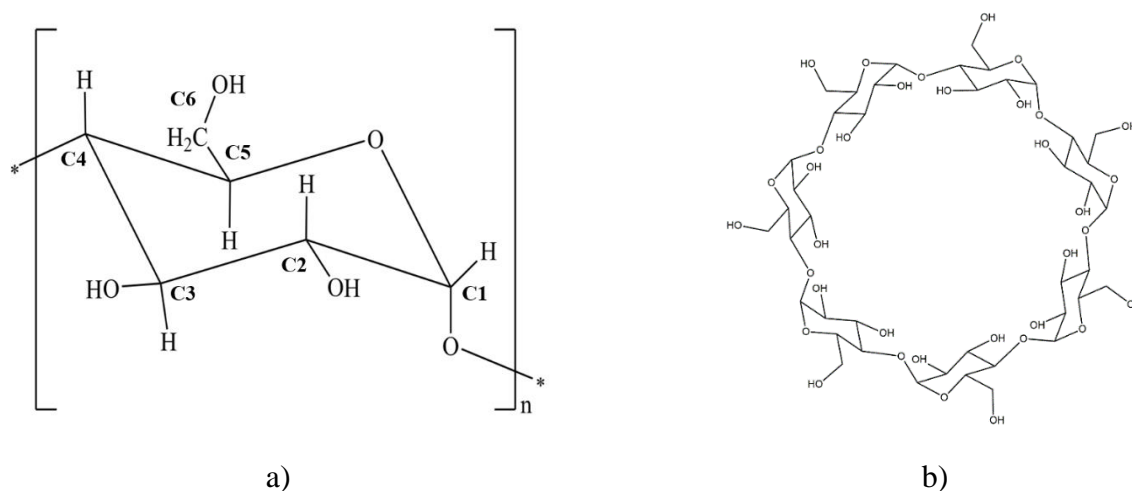


Figura 1.5- a) Unidade glicosídica com identificação dos carbonos b) estrutura da β -ciclodextrina.

Além das ciclodextrinas naturais, CDs quimicamente modificadas podem ser obtidas, utilizando-se rotas sintéticas, com a finalidade de alterar algumas de suas propriedades físico-químicas, que atendam a necessidade da aplicação para a qual será destinada. As CDs naturais são modificadas geralmente pela substituição dos hidrogênios das hidroxilas ligadas ao carbono C6, podendo ser substituídos por grupamentos metila, etila, hidroxipropila e sulfobutila (DODZUIK, 2002; KHAN et al., 1998). Uma das CDs modificadas que apresenta maior destaque na indústria farmacêutica, sendo já aprovada como excipiente farmacêutico em formulações comercializadas, é a hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD), por apresentar menor toxicidade e ser ainda mais solúvel em água que a β CD, sua precursora (IRIE; UEKAMA, 1997; LOFTSSON; BREWSTER, 2012; SZEJTLI, 2004).

Estudos na literatura têm explorado a utilização de ciclodextrinas em combinação com fármacos e suas possíveis interações. De acordo com da Silva e colaboradores (2021), a formação espontânea do composto supramolecular na razão molar de 1:2 CD:SDS aumentou a eficácia antibacteriana do fármaco, com resultados satisfatórios no combate a bactérias gram positivas, como *Staphylococcus aureus*, e gram negativas, como *Escherichia coli*, em comparação com a forma não incluída do fármaco

1.3.3 Polímeros

A formação de sistemas de liberação controlada com agentes que são biocompatíveis também se torna importante, para que forneçam ainda mais uma melhor eficácia e segurança na administração dos fármacos. Dentre alguns materiais que fazem esse suporte para o fármaco se destacam os polímeros, que são macromoléculas unidas por ligações covalentes, mas também possuem interações inter- ou intramoleculares que geram características que são importantes para esse sistema (ODIAN, 2004). Os polímeros são escolhidos de acordo com o local que irão atuar, a sua biocompatibilidade e o seu grau de associação com o fármaco escolhido para compor esse sistema (PRAJAPATI et al., 2019).

Dentre as diferentes classes de polímeros, sendo estes naturais ou sintéticos, biodegradáveis ou não, podemos destacar os poliésteres, como o ácido polilático, ácido poliglicólico e o copolímero destes o poli (ácido lático-co-ácido glicólico) e a policaprolactona. Adicionalmente, com relação aos não biodegradáveis, as celuloses e acrilatos como o

polimetilmetacrilato também são amplamente empregados em sistemas de liberação de moléculas de interesse biológico.

1.3.3.1 Policaprolactona

A policaprolactona (PCL), Figura 1.6, apresenta alguns diferentes modos de síntese, mas a maneira mais comum de se obter é pela abertura do anel de seu monômero a ϵ -caprolactona. Esse polímero é solúvel em clorofórmio, diclorometano, dimetilformamida e acetato de etila. A PCL é um polímero semicristalino, hidrofóbico e biocompatível, sendo utilizado em diversas aplicações como em próteses (DOMÍNGUEZ-ROBLES et al., 2021), regeneração tecidual (BIANCHI et al., 2021) e liberação de fármacos (SCHLESINGER; CIACCIO; DESAI, 2015).

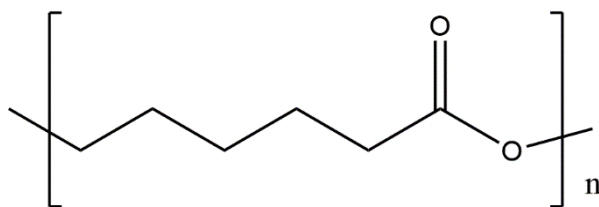


Figura 1.6- Representação estrutural do monômero da policaprolactona.

As propriedades mecânicas e térmicas do polímero poli(ϵ -caprolactona) (PCL) estão intimamente relacionadas à sua massa molecular e grau de cristalinidade, que geralmente é em torno de 69 %. A natureza miscível do PCL com outros polímeros, formação de blendas poliméricas, também é uma característica importante, o que o torna frequentemente utilizado em matrizes poliméricas que já contenham outros tipos de polímeros (LABET; THIELEMANS, 2009).

Outra característica relevante do PCL é a sua temperatura de transição vítrea (T_g), que normalmente está na faixa de -60 a -65 °C, e a sua temperatura de fusão, que se variando na faixa de 56 a 65 °C (LABET; THIELEMANS, 2009). Em relação às suas propriedades mecânicas, vale ressaltar que o PCL demonstra uma alta ductilidade, o que significa que ele é maleável e pode ser esticado consideravelmente antes de se romper (NAIR; LAURENCIN, 2007). Além disso, sua degradação é um processo lento que pode levar de 2 a 4 anos, dependendo de sua massa molecular e morfologia do material. A fase amorfa do polímero é a primeira a sofrer degradação, resultando

em um aumento na cristalinidade. Esse processo de degradação é principalmente causado pela hidrólise das cadeias do polímero que é auto-catalisado por ácidos carboxílicos liberados durante o processo. Adicionalmente, a degradação do PCL também pode ser acelerada por enzimas (BAPTISTA et al., 2020; LABET; THIELEMANS, 2009).

1.3.3.2 Polimetilmetacrilato

O polimetilmetacrilato (PMMA) é um polímero biocompatível obtido sinteticamente pela reação de poliadição do monômero metacrilato de metila (Figura 1.7). Ele é semelhante ao PCL em termos de hidrofobicidade e solubilidade em solventes como tricloroetileno, dimetilformamida, acetato de etila e tetrahidrofurano. O PMMA é amorfo, com um grau de cristalinidade abaixo de 25 % e sua solubilidade está diretamente relacionada ao grau de intumescimento, o qual é alto para este polímero. Além disso, o PMMA é conhecido por sua biocompatibilidade, baixa toxicidade e alta resistência mecânica, o que o torna uma escolha popular em várias aplicações médicas.

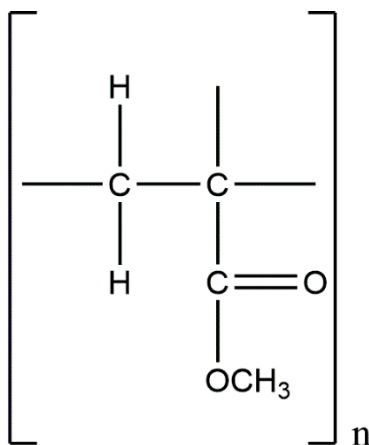


Figura 1.7- Representação estrutural do monômero do polimetilmetacrilato.

Na área médica, o PMMA tem sido amplamente utilizado em reconstituições teciduais, como em procedimentos de reconstrução de tecidos (ATILA; HASIRCI; TEZCANER, 2022). Além disso, o PMMA também é utilizado em sistemas de liberação de fármacos, permitindo a entrega controlada de medicamentos em locais específicos do corpo (SIMÕES et al., 2019). Outra aplicação importante do PMMA é na produção de próteses de substituição dentária, devido à sua

capacidade de ser moldado em formatos complexos e sua alta resistência mecânica (KARATEPE; OZDEMIR, 2020). Essas aplicações são possíveis graças às propriedades únicas do PMMA, que combinam biocompatibilidade, baixa toxicidade e elevada resistência mecânica, tornando-o um material versátil e confiável para aplicações biológicas.

O PMMA é um polímero termoplástico, o que significa que ele funde sob aquecimento e solidifica por resfriamento. Ele é conhecido por sua resistência a elevadas temperaturas, com uma temperatura de fusão geralmente na faixa de 200-240 °C. A decomposição do PMMA ocorre em três etapas distintas, com temperaturas de decomposição variando de 220 a 400 °C, dependendo de sua massa molecular (ALI; KARIM; BUANG, 2015). A primeira etapa da decomposição é a despolimerização da cadeia polimérica, seguida pela decomposição do monômero metacrilato de metila em produtos gasosos, como metano e metanol, na segunda etapa. Por fim, ocorre a combustão desses produtos gasosos na terceira etapa. A faixa de temperatura para essas etapas de decomposição também depende da massa molecular do PMMA. Uma característica interessante do PMMA é sua temperatura de Tg, que geralmente está na faixa de 100 a 130 °C. A justificativa para o PMMA apresentar uma Tg relativamente alta é a presença do grupo metila (O-CH₃) em sua estrutura. A presença desse grupo cria uma barreira de energia rotacional, restringindo a rotação das cadeias poliméricas, o que resulta em uma maior Tg (MANO; MENDES, 1999).

1.3.3.3 Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)

O poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), Figura 1.8, é um polímero sintético obtido por copolimerização do ácido láctico e ácido glicólico. Esse polímero que apresenta alta biocompatibilidade e sofre fácil degradação no ambiente, tendo como produtos de sua degradação dois sais, o lactato e o glicolato, sais inócuos ao organismo humano. É importante destacar que o PLGA é um polímero que é aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) e altamente utilizado em técnicas mais sensíveis da área da saúde, como a marcação de células tumorais e liberação de fármacos (SHEN et al., 2020).

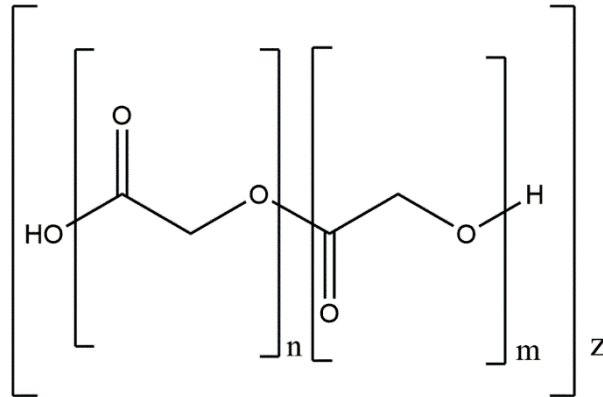


Figura 1.8- Representação estrutural do ácido poli (lático-co-glicólico).

O grau de cristalinidade é outra propriedade crucial do PLGA, que depende da razão molar dos seus monômeros. Enquanto o PGA é cristalino, a copolimerização do PLGA com o PLA reduz o seu grau de cristalinidade, aumentando assim a taxa de hidratação e hidrólise. Devido a esses fatores o PLGA 50:50, que foi utilizado neste trabalho é classificado como um polímero semicristalino (RAHMANI et al., 2023).

Segundo a literatura, a temperatura de Tg do PLGA 50:50 é superior à temperatura fisiológica de 37°C, ocorrendo em torno de 45-50°C. Durante esse processo, há uma mudança na mobilidade molecular do polímero que pode afetar suas propriedades mecânicas e sua taxa de degradação. Abaixo da transição vítrea, o PLGA 50:50 é relativamente rígido e pode se quebrar ou rachar quando submetido a tensões mecânicas. Acima da transição vítrea, o PLGA 50:50 se torna mais deformável e elástico, o que pode ser vantajoso para algumas aplicações médicas. (RAHMANI et al., 2023).

A degradação do PLGA 50:50 é influenciada por vários fatores, como massa molecular do polímero, proporção de ácido lático para glicólico na estrutura, forma do dispositivo médico ou sistema de liberação de medicamentos e condições ambientais de armazenamento e uso. Em comparação com outros polímeros biodegradáveis, o PLGA 50:50 apresenta um tempo de degradação relativamente curto, geralmente variando de algumas semanas a alguns meses. No entanto, a taxa de degradação pode ser ajustada para atender às necessidades específicas do dispositivo ou sistema. Por exemplo, em sistemas de liberação de medicamentos de longa duração, é possível modificar o PLGA 50:50 para ter uma taxa de degradação mais lenta, prolongando a liberação do medicamento por um período mais longo (LU et al., 2023).

Logo, com o intuito de aprimorar a utilização de polímeros em sistemas de liberação controlada de fármacos, a associação de ciclodextrinas pode ser uma estratégia interessante. Isso porque fármacos altamente solúveis em água podem interagir melhor com a matriz polimérica (hidrofóbica) permitindo uma liberação mais lenta e evitando os fenômenos de liberação rápida (*burst effect*) nos primeiros minutos (OLIVEIRA et al., 2015). Um exemplo da associação de ciclodextrina a matriz polimérica foi relatada para o anti-hipertensivo cloridrato de propranolol, altamente solúvel em solução aquosa (OLIVEIRA et al., 2015). Neste sistema, fibras obtidas por eletrofiação utilizando a estratégia de sistemas coaxiais reduziram em aproximadamente 20 % o efeito de liberação rápida nas primeiras horas.

Adicionalmente, Dagher e colaboradores testaram a formação de um composto de inclusão entre as moléculas de dexametasona e β CD para melhorar a capacidade de mineralização da polpa dentar. Após a obtenção desse composto, este foi adicionado a uma solução de PLGA e eletrofiado, demonstrando a liberação controlada por um período de 28 dias. Os autores constataram ainda uma liberação mais controlada do fármaco neste material, quando se comparado as fibras de PLGA/fármaco, sem a presença da β CD (DAGHERY et al., 2020).

1.4 Eletrofiação

A formação de novos materiais utilizando matrizes poliméricas está cada vez mais evidenciada no mercado e os polímeros utilizados passam por processos podendo originar materiais de diferentes formas, como filmes, membranas, partículas ou fibras. Essa variedade de processos está atrelada a possibilidade de elaborar sistemas com maior área de contato superficial, auxiliando na aplicação. Sendo assim as fibras são uma das possibilidades de obtenção de materiais com essas características (STUART et al., 2010).

Uma das possibilidades de obtenção de fibras está na técnica de eletrofiação, método que foi profundamente mais estudado por Reneker e outros colaboradores em meados dos anos 90 (FANG; RENEKER, 1997; RENEKER; CHUN, 1996; SRINIVASAN; RENEKER, 1995). A técnica tem sido constantemente aprimorada, e hoje existe uma gama de áreas em que é aplicada como por exemplo, engenharia de regeneração óssea e tecidual, eletrodos, remediação ambiental e liberação de fármacos, entre outras (XUE et al., 2019).

Sobre o funcionamento da técnica, esta consiste na aplicação de um determinado campo elétrico na solução polimérica, que pode variar entre 1 e 30 kV. Na ponta da agulha está presente uma gota que passará a ser eletrificada por cargas positivas que são espalhadas pela superfície. Com a formação do campo eletrostático a gota sofre uma deformação cônica que é denominada cone de Taylor (Figura 1.9), que é muito importante para a formação de fibras uniformes e que tenham o diâmetro compatível para a aplicação em sistemas controlados de fármacos (XUE et al., 2019). A tensão aplicada na gota pode atingir um valor muito elevado e quando esse valor é ultrapassado jatos são enviados em direção ao coletor, que pode ser uma placa aterrada ou um contra eletrodo, o solvente dessa solução polimérica é evaporado e as fibras começam a serem formadas, na ordem de nanômetros ou micrômetros (LIU et al., 2020). O equipamento de eletrofiação é composto principalmente por: fonte de alta tensão, bomba de infusão, seringa injetora da solução polimérica, agulha e coletor (que pode ou não estar aterrado).

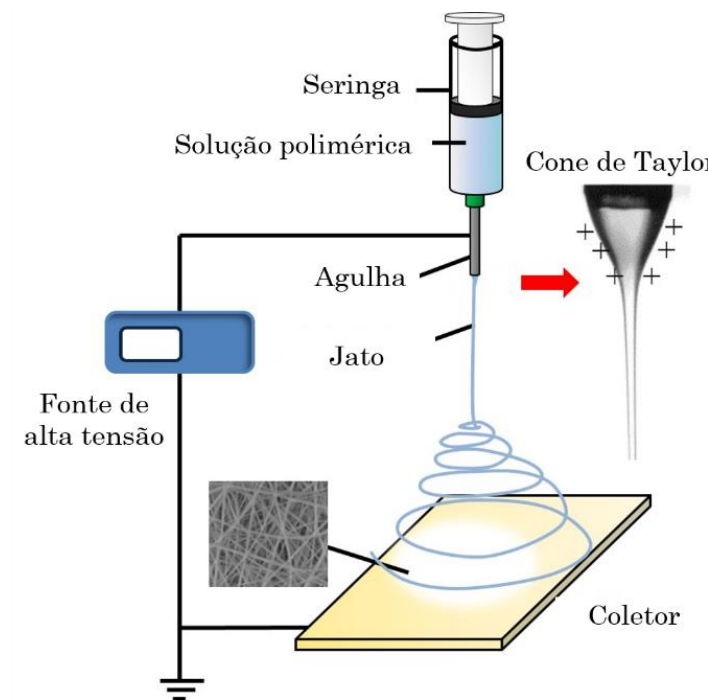


Figura 1.9- Representação de um modelo de equipamento de eletrofiação.

Alguns parâmetros têm que ser levados em consideração quando se utiliza essa técnica, são eles: taxa de fluxo da solução, a distância entre a agulha e o coletor, a tensão ideal a ser aplicada, a viscosidade da solução, a temperatura ambiente, a umidade relativa do ar. Todos esses

parâmetros interferem diretamente na obtenção das fibras, podendo acarretar a formação de partículas ou fusos.

Como por exemplo, no trabalho de (PENG et al., 2021) foi elaborada uma membrana polimérica a partir de uma blenda entre PLGA e fibroína de seda para liberação de artemisinina, um anti-inflamatório que auxilia na redução da proliferação das bactérias presentes nas lesões ou feridas na pele. Para a obtenção dessa membrana polimérica foi utilizada a técnica de eletrofiação e os autores concluíram que a utilização desse suporte polimérico retarda a liberação do fármaco, fazendo que sua liberação acumulada possa chegar a 69 % após três semanas. Também foram realizados testes de ação anti-inflamatória e de citotoxicidade celular e ambos os testes geraram resultados promissores.

Tendo em vista os tópicos citados anteriormente, este trabalho une as estratégias de liberação da molécula bioativa, sulfadiazina de sódio, baseadas na utilização de polímeros biocompatíveis e sistemas supramoleculares. A utilização de ciclodextrina para modular a liberação da sulfadiazina de sódio das fibras obtidas por eletrofiação, baseados em diferentes estudos da interação intermolecular deste fármaco com derivados da macromolécula (DA SILVA et al., 2021). Outros trabalhos, como por exemplo o descrito por Oliveira e colaboradores (2015) demonstrou que blendas de polímeros de ciclodextrina e o poli(ácido metacrílico) são capazes de modular a liberação do cloridrato de propranolol *in vitro*. Estas evidências reforçam o interesse em estudar sistemas de liberação utilizando diferentes matrizes poliméricas e ainda testar a capacidade da ciclodextrina de modular a liberação de moléculas de interesse biológico.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivos Gerais

Objetiva-se neste trabalho a obtenção de matrizes poliméricas, contendo sulfadiazina de sódio e ciclodextrinas como potencial sistema de liberação controlada, aplicado ao tratamento de feridas.

1.5.2 Objetivos Específicos

- Obter fibras poliméricas pela técnica de eletrospinning utilizando os polímeros PCL, PMMA e PLGA com a capacidade de serem utilizadas em sistemas de liberação da sulfadiazina de sódio.
- Combinar estes sistemas poliméricos com a macromolécula HP β CD.
- Confirmar a formação de fibras poliméricas dos sistemas propostos.
- Realizar testes de permeabilidade ao vapor de água.
- Determinar as propriedades de superfície pela análise do ângulo de contato da gota de água e os materiais poliméricos.
- Quantificar a concentração do fármaco em cada sistema polimérico.
- Realizar testes para determinar o perfil de liberação do fármaco utilizando o modelo Célula de Franz.
- Realizar experimentos que envolvam a proliferação celular, utilizando os testes de arranhão (wound healing) e ensaio de adesão celular.
- Testar a sua citotoxicidade e resposta antimicrobiana de cada sistema polimérico.

CAPÍTULO 2

METODOLOGIA

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os reagentes e solventes citados nesse capítulo foram obtidos comercialmente e utilizados sem purificação prévia.

2.1 Obtenção das fibras poliméricas

As fibras poliméricas foram obtidas no Laboratório de Sistemas Poliméricos e Supramoleculares (LSPS) da UNIFEI pela técnica de eletrofiação. Para a formação das fibras foi utilizado um equipamento que é composto por uma bomba de infusão (Harvard Apparatus PHD 2000 Infusion) e de um gerador de tensão (Gamma High Voltage).

Para a formação das fibras, padronizadas em 30 % m/v utilizou-se 1,8 g de polímero e 6 mL dos respectivos solventes. Para as fibras de polimetilmetacrilato (PMMA) (100.000 g.mol⁻¹, Polysciences) utilizou-se como solvente uma mistura de dimetilformamida (DMF) com tetrahidrofurano (THF) na proporção 7:3 respectivamente, já as de policaprolactona (PCL) (50.000 g.mol⁻¹, Polysciences) foram utilizados os solventes diclorometano (DCM) e DMF nas proporções 8,5:1,5 e por fim, para o ácido poli (lático-co-glicólico) (PLGA) (50:50) (60.000 g.mol⁻¹ Lactel) utilizou-se a mistura de DMF e clorofórmio (CHCl₃) nas proporções 1:1.

Para os sistemas, utilizando os polímeros descritos anteriormente (PMMA, PCL ou PLGA), contendo o fármaco SDS e/ou o sistema supramolecular SDS/HPβCD, foram utilizadas as massas de 10,0 mg de SDS e 52,0 mg de HPβCD, respectivamente. A Tabela 2.1, detalha os parâmetros utilizados para cada um dos sistemas que permitiram a obtenção dos sistemas poliméricos. Cabe ressaltar, que o ajuste destes parâmetros foi otimizado para cada um dos sistemas.

Tabela 2.1- Parâmetros utilizados para obtenção das fibras pela técnica de eletrospinação.

SOLUÇÃO	FLUXO (mL/h)	TENSÃO (kV)	DISTÂNCIA (cm)
PCL	2,5	13	19
PCL SDS	1,0	12	18
PCL SDS/HPβCD	1,5	12	18
PMMA	2,0	15	24
PMMA SDS	1,5	14	16
PMMA SDS/HPβCD	1,4	14	16
PLGA	1,2	19	14
PLGA SDS	1,0	15	18
PLGA SDS/HPβCD	1,0	19	12

2.2 Espectroscopia eletrônica de absorção na região do ultravioleta visível

Os espectros de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) para determinação da banda característica do fármaco foram obtidos empregando um espectrofotômetro da marca Varian, modelo Cary 50 Scan, com varredura entre 200 e 800 nm e resolução de 1,5 nm. Todas as medidas foram realizadas em solução aquosa, na UNIFEI, utilizando uma cubeta de quartzo de 1 mL e caminho ótico de 10 mm. A presente ferramenta de caracterização, foi utilizada para verificar a banda de absorção do fármaco (caracterização eletrônica), fazer a quantificação de fármaco nas fibras a partir de uma curva de calibração feita com a variação de sua concentração seguindo a lei de Lambert-Beer.

Além disso, a técnica permitiu quantificar o fármaco que foi liberado em cada sistema polimérico, possibilitando identificar o perfil de liberação da sulfadiazina de sódio, sendo esta quantificação realizada num espectrofotômetro da marca Perkin Elmer, modelo Lambda 365, com comprimento de onda fixado em 260 nm e resolução de 1,0 nm. As medidas foram realizadas em solução de tampão fosfato salino (PBS), na Universidade de Araraquara (UNIARA), em cubeta de quartzo de 1 mL e caminho ótico de 10 mm.

2.3 Microscopia eletrônica de varredura

Para se realizar as análises morfológicas das fibras, uma das técnicas mais utilizadas é a microscopia eletrônica de varredura. Para o presente trabalho os resultados foram obtidos utilizando um microscópio Tabletop Microscope Hitachi modelo TM3000, operando a 15 kV, localizado no Departamento de química da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). As amostras foram fixadas ao suporte para análise utilizando fita dupla face. As medidas de diâmetro das fibras, foram obtidas utilizando ao menos 60 medições para cada sistema polimérico de diferentes imagens, usando o software ImageJ®, em magnitudes de 1500 X.

2.4 Ângulo de contato

A análise do ângulo de contato do líquido com a superfície das fibras considera a medida do ângulo tangente formado entre a gota e a superfície do material, variando de acordo com essa interação entre a água e o material, gerando informações a respeito da hidrofobicidade e da hidrofiliabilidade do mesmo. Foram realizadas 10 medidas do ângulo de contato entre a gota de água (utilizando um volume de 10 μ L) e as superfícies das fibras poliméricas. As análises foram realizadas em aparelho Krüss GmbH Germany, modelo DO4010 localizado na Central Analítica da UNIFEI, a partir dos ângulos obtidos, a média e o desvio padrão foram calculados.

2.5 Permeabilidade ao vapor de água

As medidas de permeabilidade ao vapor de água para todas as fibras foram realizadas no laboratório LSPS segundo a metodologia proposta por AKHGARI et al., 2006. As fibras foram cortadas em formato circular com aproximadamente 1,0 cm de diâmetro e presas a tampas de tubos de vidro que foram preenchidos com 10 mL de água. Para medir-se as espessuras das fibras, utilizou-se micrômetro digital ZAAS PRECISION ($\pm 0,001$ nm) em triplicata e obteve-se uma média e desvio padrão desses valores. Cada tubo contendo água e a fibra foram pesados e colocados em uma estufa com temperatura de 25 °C, a perda de massa de cada sistema foi acompanhada pela pesagem de cada um respectivamente. Esse teste foi realizado em duplicata e

os valores médios foram obtidos. O valor de permeabilidade ao vapor de água (PVA) pode ser obtido conforme Equação (2.1) a seguir:

$$PVA = \frac{TTVA \times L}{\Delta P} \quad \text{Equação 2.1}$$

Onde

- TTVA é a taxa de transmissão de vapor de água;
- L é a espessura da fibra;
- ΔP é a diferença de pressão de vapor de água, da atmosfera em que estão expostas a fibras.

O valor de TTVA é obtido a partir de um gráfico de perda de massa x tempo nos intervalos de 0, 24, 48, 72, 96, 120 e 168 horas. Com esse gráfico pode-se encontrar a equação da reta através da regressão linear, sendo então utilizado o valor da inclinação de cada reta. Este valor obtido é correspondente a taxa de permeação de vapor de água para cada uma das fibras.

2.6 Estudo de extração e liberação

Previamente ao estudo de liberação, realizou-se extrações a fim de quantificar a sulfadiazina de sódio nas fibras, esse experimento foi realizado utilizando-se 5 mL de clorofórmio para dissolver 12 mg de fibra e 5 mL de água, agitando essa solução, para que o fármaco se dissolva e migre para a fase aquosa, essa solução foi mantida em repouso por um período de 24 horas. A fase aquosa foi coletada e analisada em espectroscopia na região do ultravioleta visível. Os espectros foram obtidos de 200 a 800 nm e o valor de absorbância em 260 nm utilizado para a quantificação.

O estudo de liberação foi realizado no Laboratório de Biopolímeros e Biomateriais (BIOPOLMAT) da Universidade de Araraquara – UNIARA. Para realização desse estudo, utilizou-se a montagem da Célula de Franz modificada, Figura 2.1, um sistema de difusão com temperatura controlada através um fluxo de água por banho termostático. O sistema é composto por células de vidro que tem um compartimento doador, onde é colocada a amostra, um compartimento receptor, o qual é preenchido por uma solução de tampão fosfato salino e entre

esses compartimentos é inserida uma membrana de diálise (membrana de acetato de 3 cm de diâmetro, que permite o fluxo entre a amostra e a solução receptora). O sistema células de Franz foi incubado e mantido sob agitação e temperatura constante de 37 °C.

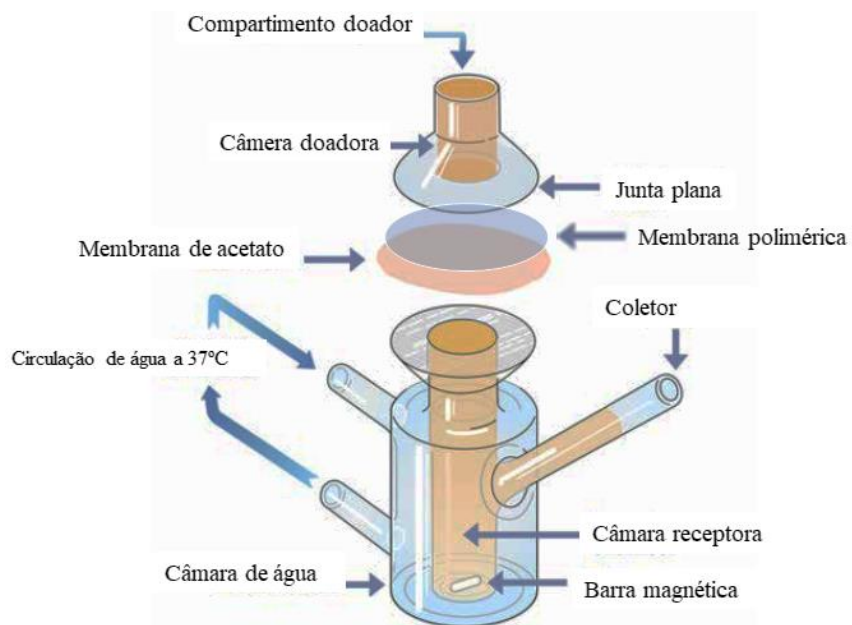


Figura 2 1 – Esquema de célula de Franz modificada. Adaptado de An Overview on Advance Vesicles Formulation as a Drug Carrier for N.D.D.S, com autorização da revista EJBPS (MAURYA; KUMAR, 2018)

A amostra permaneceu em contato com a solução por um período de 24 horas e em tempos pré-determinados (0, 7, 15, 30, 60, 120, 240, 480, e 1440 minutos), foram coletadas alíquotas de 800 µL e feita a reposição com o mesmo volume de solução receptora pura em cada uma das células. As alíquotas foram analisadas pela técnica de UV-Vis no comprimento de onda 260 nm para obter a quantificação da sulfadiazina de sódio no material. Para indicar a quantificação correta da sulfadiazina foram feitos cálculos matemáticos de diluição. Todos os experimentos foram realizados em seis repetições e foram obtidos gráficos que demonstram o perfil de liberação.

A partir dos resultados obtidos pode-se fazer a aplicação de modelos matemáticos com o intuito de determinar alguns aspectos físicos, como o coeficiente de difusão do fármaco, e descrever os modelos de liberação. Além disso, por meio desses modelos, é possível fazer previsões teóricas para alcançar o perfil de liberação desejado. Pode-se citar como modelos

matemáticos utilizados: Primeira Ordem, Higuchi, Peppas, Weibull, Ordem Zero e Hixson e Crowell. A seguir serão detalhados estes modelos matemáticos.

2.6.2 Modelo de Primeira Ordem

A liberação de um fármaco, seguindo o modelo cinético de primeira ordem, pode ser expressa através da seguinte Equação (2.4):

$$\log C = \log C_0 - \frac{K_1 t}{2,303} \quad \text{Equação (2.4)}$$

Na equação fornecida, K_1 representa a constante de velocidade de primeira ordem, expressa em termos de frequência, na qual C_0 representa a concentração inicial do fármaco, enquanto C representa a porcentagem de fármaco restante no tempo t . A equação é linear e descreve a relação entre essas variáveis. Ao plotar um gráfico com o logaritmo da porcentagem de concentração resultante do fármaco em função do tempo, o coeficiente angular do gráfico corresponde a $K_1/2,303$, e o coeficiente linear é igual ao logaritmo de C_0 . Esse gráfico permite correlacionar o coeficiente angular com a constante de velocidade de segunda ordem. Além disso, o coeficiente de correlação (R^2) pode ser utilizado para determinar se a liberação está de acordo com o modelo proposto ou não (RAMETEKE, 2014).

2.6.3 Modelo de Higuchi

O processo de liberação de fármacos engloba a difusão e a dissolução como principais fenômenos envolvidos. A equação de Higuchi (Equação 2.5) aborda ambos esses processos e é amplamente reconhecida e utilizada na área de liberação controlada de fármacos.

$$Q = K_H \sqrt{t} \quad \text{Equação (2.5)}$$

Onde, Q é a quantidade acumulada de fármaco liberado no período t, K_H é a constante de dissolução de Higuchi. Para estudar esse modelo, é necessário criar um gráfico da porcentagem acumulada de fármaco liberado em relação à raiz quadrada do tempo. Esse gráfico terá uma forma linear, com um coeficiente angular representado por K_H . Caso o coeficiente de correlação (R^2) seja maior em comparação com outros modelos cinéticos, podemos concluir que o mecanismo predominante de liberação é controlado por difusão (BRUSCHI, 2015).

2.6.4 Modelo de Peppas

Este modelo é utilizado para fármacos que são entregues por difusão, geralmente em sistemas poliméricos, demonstrando qual modelo que deve ser o ideal, esta Equação (2.6) determina o entendimento de mecanismo de dissolução a partir da matriz.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_{kp} t^n \quad \text{Equação (2.6)}$$

Onde $\frac{M_t}{M_\infty}$ é a fração liberada no intervalo de tempo da quantidade de fármaco liberada no tempo t, sendo M_∞ a quantidade de fármaco liberada após o tempo t, k é a constante da velocidade de liberação e n é o expoente difusional. A fim de analisar o modelo de liberação proposto, é necessário construir um gráfico que relacione o logaritmo da porcentagem de liberação acumulada de um fármaco ($\log \frac{M_t}{M_\infty}$) com o logaritmo do tempo ($\log(t)$) (KORSMEYER; LUSTIG; PEPPAS, 1986; RITGER; PEPPAS, 1987). Com os valores de n consegue-se caracterizar os diferentes modelos de liberação, conforme Tabela 2.2.

Tabela 2 2 Descrição do mecanismo em função do expoente difusional.

Expoente Difusional (n)	Mecanismo de transporte
n= 0,5	Modelo de Fick (ou Fickiano) (Caso I)
n=1,0	Modelo não-Fickiano (Caso II)
0,5 < n < 1,0	Modelo não-Fickiano (Caso Anômalo)
n < 0,5	Comportamento pseudo Fickiano
n > 1,0	Modelo não-Fickiano (Super Caso II)

É relevante notar que a difusão do solvente é influenciada pelas características físicas da rede polimérica e pela interação entre o solvente e o polímero. Essa interação pode levar a diferentes comportamentos, que foram classificados com base nas velocidades relativas de difusão do solvente e relaxamento do polímero. Essas classificações incluem a difusão Fickiana (Caso-I) e a difusão não-Fickiana (Caso-II e Transporte Anômalo).

A difusão Fickiana, ou Caso I ($n=0,5$), a liberação é governada principalmente pela difusão e descreve o processo em que as moléculas do fármaco se dissolvem antes de atravessar a matriz polimérica. Esse fenômeno não requer energia adicional, é de primeira ordem e atinge o equilíbrio quando as concentrações se igualam em ambos os lados da matriz. A velocidade de liberação é proporcional à quantidade que ainda precisa ser absorvida. Em outras palavras, a liberação ocorre devido à diferença de concentração entre a matriz e o meio de dissolução.

No entanto, em polímeros vítreos, a difusão da água muitas vezes não segue as previsões da lei de Fick, levando a um comportamento anômalo ou difusão não-Fickiana. Esse desvio do comportamento Fickiano está relacionado à velocidade com que o polímero reorganiza sua estrutura para acomodar as moléculas de água. Esse fenômeno tem sido observado em muitos sistemas poliméricos hidrofílicos. A natureza da difusão (Fickiana ou não-Fickiana) depende da dinâmica de intumescimento do polímero e da mobilidade relativa do fármaco e da água no sistema.

Na categoria de transporte não-Fickiano ($n = 1$), também conhecido como Caso II, as cadeias poliméricas apresentam uma mobilidade limitada, o que impede a rápida penetração do solvente no interior da matriz polimérica. Esse tipo de difusão não-Fickiana pode ser subdividido em três classes distintas: transporte anômalo, transporte Caso II e transporte supercaso II. A diferenciação entre essas categorias se baseia nas proporções relativas entre a velocidade de difusão do solvente e o relaxamento do polímero.

No transporte anômalo, quando os valores de n estão na faixa de 0,5 a 1,0, as velocidades de difusão do solvente e do relaxamento do polímero são aproximadamente equivalentes, o que significa que ambas as velocidades estão na mesma ordem de magnitude. Já no transporte Caso II, a velocidade de difusão do solvente supera a taxa de relaxamento do polímero, enquanto no transporte supercaso II, em que os valores de n são maiores que 1,0, a velocidade de difusão do solvente é significativamente maior, resultando em uma rápida penetração do solvente na matriz

polimérica. Nesse último caso, a velocidade de difusão do solvente é o fator determinante da difusão (RITGER; PEPPAS, 1987; XIE; BUSCHLE-DILLER, 2010).

2.6.5 Modelo de Weibull

A aplicação da equação de Weibull (Equação 2.7) é possível em praticamente todos os tipos de curvas de dissolução de princípios ativos. Esse modelo específico se destaca pela sua utilidade na comparação da liberação de princípios ativos em sistemas de matriz.

$$F = 1 - \exp(-at^b) \quad \text{Equação (2.7)}$$

Onde, F é a quantidade do fármaco liberada, o parâmetro de escala “ a ” é o parâmetro de tempo e “ b ” é o parâmetro de forma, obtido a partir da inclinação da linha. Os valores de b inferiores a 0,75 indicam difusão Fickiana, valores entre 0,75 e 1,0 indicam difusão não Fickiana, enquanto valores superiores a 1,0 indicam um mecanismo complexo de liberação de fármacos. Quando aplicado a sistemas farmacêuticos que seguem esse modelo, o gráfico do logaritmo decimal da quantidade liberada do princípio ativo em relação ao logaritmo decimal do tempo exibirá uma relação linear (BRUSCHI, 2015).

2.6.6 Modelo de Ordem Zero

Outro modelo utilizado para sistemas de liberação é o modelo de Ordem Zero, que pode ser descrito pela equação a seguir:

$$C_t = C_0 - k_0 t \quad \text{Equação (2.8)}$$

Onde, C_t é a quantidade de fármaco liberado em determinado tempo t , C_0 é a concentração inicial no tempo zero e k_0 é a constante de velocidade de dissolução. A cinética de ordem zero é um termo usado para descrever o processo de liberação constante de um fármaco a partir de um sistema de drug delivery. Nesse caso, o nível de droga no sangue permanece constante ao longo da liberação. Para estudar esse modelo, é necessário construir um gráfico de concentração,

representado pela porcentagem acumulada de droga liberada em função do tempo de liberação. O gráfico resultante é uma linha reta e o valor do coeficiente angular corresponde à constante K_0 . O coeficiente de correlação (R^2) indica se a liberação segue ou não a cinética de ordem zero (RAMETEKE, 2014).

2.6.7 Modelo de Hixson e Crowell

De acordo com o modelo proposto por Hixson e Crowell, a área regular de um grupo de partículas é proporcional à raiz cúbica de seu volume, conforme Equação (2.9).

$$\sqrt[3]{W_0} = \sqrt[3]{W_i} + k_{HCT} \quad \text{Equação (2.7)}$$

Na qual, a quantidade inicial do fármaco no sistema é representada por W_0 , enquanto W_i refere-se ao valor restante no sistema no tempo t . A constante de incorporação k_{HC} é utilizada para relacionar superfície e volume. Essa equação é aplicável a formas farmacêuticas como comprimidos, onde a dissolução ocorre em planos paralelos à superfície da forma farmacêutica. Com o passar do tempo, essa superfície diminui proporcionalmente, enquanto a forma geométrica se mantém constante. A fim de analisar o modelo de liberação proposto, é necessário construir um gráfico que relacione a raiz cúbica da liberação não acumulada pelo tempo t (BRUSCHI, 2015).

2.7 Avaliação da citotoxicidade celular

O ensaio de viabilidade celular foi realizado para todas as fibras preparadas no presente estudo, em colaboração com o Laboratório de Ensaio Celulares e Medicina Regenerativa – LECER da Universidade de Araraquara (UNIARA). Para o ensaio, utilizou-se fibroblastos murino derivados de tecido conjuntivo (L929) adquiridos da ATCC (*American Type Culture Collection*), que foram gentilmente cedidas pelo laboratório da Prof^a. Gisele Faria da Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP.

Inicialmente, as células foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Embriolife) suplementado com 10 % de Soro Fetal Bovino (SFB) e antibióticos (penicilina 100 U/mL; estreptomicina 0,1 mg/mL), com posterior incubação em estufa a 37 °C e 5 % de CO₂. Após 2 repiques consecutivos, iniciou-se o ensaio de citotoxicidade, empregando uma

concentração de $1,5 \times 10^4$ células/poço, que foram incubadas em placa de 96 poços. A placa foi mantida por 24 horas em incubadora, respeitando os mesmos parâmetros de temperatura e porcentagem de CO₂ descritos anteriormente.

Paralelamente ao plaqueio das células, os meios de extração (tratamentos) empregando as fibras poliméricas de PCL, PLGA E PMMA contendo ou não SDS e HPβCD, respectivamente, foram preparados de acordo com a (ISO 10993-12, 2012). Para tal, 6 cm² de cada material foi disposto em microtubo de 1,5 mL com a adição de 1 mL de meio de cultura (DMEM + 10 % de soro fetal bovino). Os materiais foram deixados sob agitação orbital por 24 horas a 37 °C. Finalizado o período de agitação, os meios que ficaram em contato com os materiais foram filtrados em filtro de seringa 0.22 μm. Após a filtragem dos meios de extração, estes foram colocados em contato com a monocamada celular. Empregou-se 100 uL/poço de cada meio de extração, seguido da incubação da placa em estufa de CO₂ por mais 24 horas. Decorrido as 24 horas de tratamento, os meios de extração foram removidos dos poços, seguido da lavagem com tampão fosfato (PBS) por duas vezes consecutivas. Finalizada essa etapa, 50 μL de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) previamente diluído na concentração de 1 mg/mL foram adicionados em cada poço. As placas foram novamente incubadas a 37 °C, ao abrigo da luz, até a observação da formação dos cristais violeta de formazana (3 horas). Finalizado o período de incubação, o MTT foi retirado dos poços e os cristais de formazana formados foram dissolvidos adicionando-se 100 μL de álcool isopropílico absoluto.

Os valores de absorvância (Abs) foram obtidos em espectrofotômetro de microplacas (SoftMax® Pro 5), com leitura em comprimento de onda a 570 nm. Como controle de morte celular (controle positivo), as células foram tratadas com DMSO (Dimetilsulfóxido) a 10 % e como controle de sobrevivência (controle negativo), as células foram tratadas com DMEM + 10 % SFB. Os experimentos foram conduzidos em triplicata para cada amostra, em três ensaios independentes, incluindo os controles (MOSMANN, 1983). Com os valores de Abs, calculou-se a média da porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle de sobrevivência (100 %), conforme apresentado pela Equação (2.10) abaixo (ISO 10993-5, 2009).

$$\frac{(Abs \text{ da amostra} - Abs \text{ branco})}{(Abs \text{ do controle de sobrevivência} - Abs \text{ branco})} \times 100$$

Equação 2.10

2.8 Ensaio de arranhão (teste de cicatrização *in vitro*)

O ensaio de viabilidade celular foi realizado para todas as fibras preparadas no presente estudo, em colaboração com o Laboratório de Ensaio Celulares e Medicina Regenerativa – LECER da Universidade de Araraquara (UNIARA). Inicialmente, as células de fibroblastos foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Embriolife), suplementado com 10 % de Soro Fetal Bovino (SFB) e antibióticos (100 U/mL de penicilina e 0,1 mg/mL de estreptomicina). Após dois repiques consecutivos, as células foram incubadas a 37 °C e 5 % de CO₂. Em seguida, foi iniciado o ensaio de wound healing utilizando uma concentração de 1,5x10⁴ células/poço, as quais foram incubadas em uma placa de 96 poços por 24 horas, mantendo-se os parâmetros de temperatura e porcentagem de CO₂ mencionados anteriormente.

Enquanto as células eram plaqueadas, foram preparados meios de extração (tratamentos) utilizando as fibras poliméricas de PCL, PLGA e PMMA, contendo ou não SDS e HPβCD, respectivamente, seguindo a norma (ISO, 2012). Para isso, 6 cm² de cada material foram colocados em um microtubo de 1,5 mL e 1 mL de meio de cultura (10 % de soro fetal bovino) foi adicionado. Os materiais foram agitados por 24 horas a 37 °C e, em seguida, os meios que entraram em contato com os materiais foram filtrados em filtro de seringa de 0,22 μm.

Após o plaqueamento, a monocamada celular tem-se a sua região central destruída por um arranhão, que pode ser feita por uma ponteira de 10 ou 200 μL. Posteriormente ao arranhão o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados 2x com PBS e então os meios de extração filtrados foram colocados em contato com a monocamada e imagens foram registradas. As células foram mantidas sob incubação e as micrografias foram registradas em períodos pré-determinados de 2,4,6,8,10 e 24 horas (CAPPIELLO; CASCIARO; MANGONI, 2018). As imagens obtidas foram analisadas e a área da arranhadura inicial, assim como nos demais tempos determinados foi determinada, usando o software ImageJ[®]. O fechamento (%) da arranhadura é calculado de acordo com a Equação (2.11):

$$\% \text{ fechamento} = \frac{[\text{Área } t(0) - \text{Área } t(x)]}{\text{Área } t(0)} \times 100 \quad \text{Equação (2.11)}$$

Onde x são os tempos de 2,4,6,8,10 e 24 horas.

2.9 Triagem primária para atividade antimicrobiana do material (Halo de inibição)

O ensaio de viabilidade celular foi realizado para todas as fibras preparadas no presente estudo, em colaboração com o Departamento de Morfologia e Odontopediatria, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Araraquara. A triagem inicial dos materiais foi realizada utilizando a técnica de difusão em ágar, seguindo as diretrizes do CLSI M2-A8 (2003), com exceção de que os discos de antibiótico foram substituídos pelos próprios materiais ou por discos de papel de filtro qualitativo GR1 (Whatman). Os seguintes grupos foram avaliados: controle negativo: disco de papel de filtro embebido em meio de cultura (C); clorexidina: disco de papel de filtro embebido em solução de digluconato de clorexidina a 0,12% (CHX); grupo 1: PMMA; grupo 2: PLGA; grupo 3: PCL SDS; grupo 4: PCL SDS/HP β CD; grupo 5: PMMA SDS/HP β CD; grupo 6: PLGA SDS; grupo 7: PLGA SDS/HP β CD. Um cortador circular (\varnothing 16 mm) foi utilizado para preparar as amostras, garantindo diâmetro e espessura consistentes entre os diferentes grupos de estudo.

As seguintes cepas de referência foram utilizadas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922. As cepas foram obtidas da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e mantidas em caldo de soja triptona (TSB) a -80 °C. A reativação das cepas foi realizada utilizando ágar TSB em condições aeróbicas a 37 °C. Um inóculo de cada microrganismo estudado foi preparado ajustando a leitura da densidade óptica em 630 nm para 0,08-0,10 (aproximadamente 1×10^8 células/mL).

O inóculo preparado foi uniformemente espalhado na superfície do ágar TSB e permitido descansar à temperatura ambiente por 3 minutos. Posteriormente, as amostras previamente etiquetadas foram colocadas equidistantemente no ágar e, após um intervalo de 15 minutos, as placas foram incubadas em uma incubadora bacteriológica a 37 °C por 18 horas. Os experimentos foram realizados em duas ocasiões separadas (n = 4/grupo).

2.10 Avaliação da atividade antibacteriana em biofilmes

Após a triagem inicial, biofilmes de espécies únicas de *E. coli* e *S. aureus* foram desenvolvidos no fundo de placas de 24 poços pré-preparadas, utilizando as condições de crescimento previamente descritas (FONTANA et al., 2009). Um volume de 150 μ L de suspensões

bacterianas, preparadas conforme descrito na seção 2.9, foi adicionado a cada poço das placas. Simultaneamente, espécimes de cada grupo experimental ($n = 4/\text{grupo}$) foram individualmente colocados nos poços da placa de 24 poços durante a formação do biofilme. As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C com agitação orbital (75 rpm). Após 24 horas de incubação, amostras de cada grupo experimental foram removidas dos poços contendo os biofilmes e analisadas utilizando métodos padrão de análise bioquímica e microbiológica. Esses métodos foram utilizados para determinar o peso seco do biofilme (biomassa) e a unidade formadora de colônia (UFC).

Os biofilmes aderidos às amostras foram dispersos em 2 mL de NaCl 0,89 %. Um banho ultrassônico (42 kHz) foi utilizado por 10 minutos em tubos de vidro. Em seguida, os biofilmes dispersos foram transferidos para novos tubos. Para garantir a transferência completa dos microrganismos dispersos, os tubos de vidro foram enxaguados com 3 mL de NaCl 0,89 %, que também foram adicionados aos biofilmes dispersos, resultando em um volume total de 5 mL da suspensão de biofilme. A suspensão foi homogeneizada por 30 segundos a 7 watts (modelo Q125 Sonicator, QSonica) e processada. Do volume de 5 mL, 0,1 mL foi utilizado para diluição seriada e semeadura em ágar TSA, seguido de incubação por 24 horas a 37 °C para contagem de UFC.

Para determinação do peso seco, o volume restante (4,9 mL) foi centrifugado a 4000 rpm por 20 minutos (4 °C). O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado duas vezes com 2 mL de água MilliQ®, nas mesmas condições descritas (4000 rpm / 20 min / 4 °C). Após as lavagens, o pellet foi ressuspensionado em 1 mL de água, transferido para recipientes de papel alumínio pré-pesados e seco a 100 °C por pelo menos 4 horas. Após a secagem, os recipientes foram pesados novamente. O peso seco insolúvel foi calculado pela diferença de massa antes e após a pesagem, multiplicada pelo volume da amostra dividido pelo volume total.

2.11 Análise estatística

Foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via para determinar a significância estatística, e os dados e imagens foram processados utilizando o software GraphPad Prism 8 com nível de significância $\alpha = 0,01$ e $\alpha = 0,001$. Para as análises microbiológicas, foi realizada uma análise descritiva dos dados. Como o tamanho amostral é igual a 4, foi utilizado o teste de Kruskal-

Wallis seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn. As análises estatísticas de caráter microbiológico foram realizadas com nível de significância $\alpha = 0,05$.

CAPÍTULO 3
RESULTADOS E DISCUSSÕES

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Caracterização das fibras por microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura

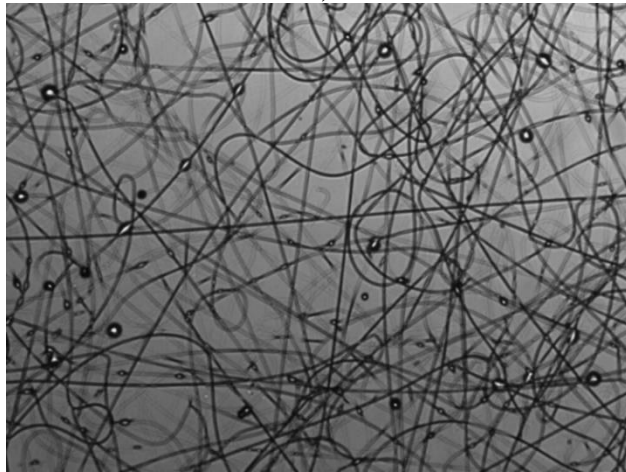
As fibras poliméricas obtidas por eletrofiação, utilizando os polímeros PCL, PMMA ou PLGA com ou sem a presença de SDS e/ou o sistema supramolecular SDS/HP β CD, foram primeiramente analisadas utilizando microscópio óptico. A utilização desta técnica (ferramenta de análise) de caracterização de baixo custo e de rápida aplicação foi fundamental para identificar os parâmetros ideais para a obtenção de fibras poliméricas uniformes.

Na Figura 3.1, estão apresentadas imagens obtidas utilizando o microscópio ótico, que evidenciam a importância de uma análise rápida de imagem e prévia à técnica de microscopia eletrônica de varredura. A Figura 3.1a evidencia que o parâmetro testado não permitiu a formação de fibras poliméricas majoritariamente, mas sim a formação de partículas esféricas. Já para os parâmetros testados para os sistemas PCLSDS e PLGA, Figuras 3.1b e 3.1c respectivamente, percebe-se a presença de gotas na estrutura das fibras poliméricas.

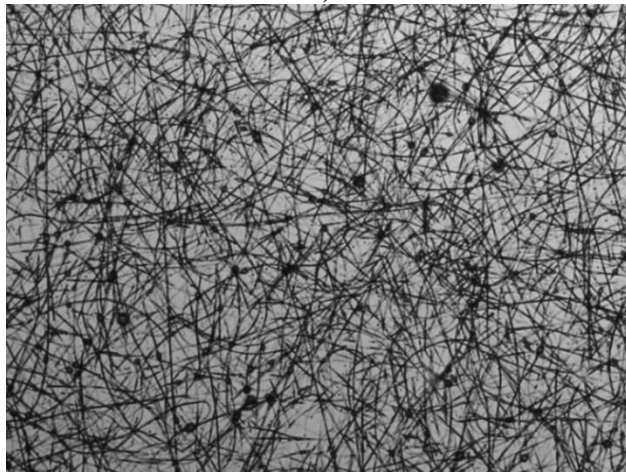
Estas alterações nas morfologias dos materiais com base nos parâmetros de eletrofiação empregados demonstram a importância da prévia caracterização, pois apesar de uma técnica considerada de fácil utilização, muitos parâmetros podem afetar a formação de fibras com características cilíndricas e uniformes (GREINER; WENDORFF, 2007). Dentre estas interferências externas, podemos destacar por exemplo a umidade e temperatura do ambiente, além da condutividade e da viscosidade da solução polimérica, que podem afetar significativamente a característica final do material (SILL; VON RECUM, 2008). Outro fato atrelado a capacidade de obter fibras uniformes, pode estar relacionado com a capacidade das moléculas de ciclodextrina em incluir outras moléculas hóspedes em sua cavidade, até mesmo polímeros. Desta forma, as moléculas que formam a rede polimérica podem ficar inseridas nestas cavidades e isso consequentemente altera a viscosidade da solução, importante parâmetro para obtenção de fibras (KOBAYASHI, 2021).



a)



b)



c)

Figura 3 1 - Imagens obtidas por microscopia ótica para diferentes tentativas de obtenção de fibras de: (a) PMMA SDS/HP β CD, (b) PCL SDS e (c) e PLGA pela técnica de eletrofiação.

Nas Figuras 3.2, a 3.7 estão apresentadas as micrografias, obtidas pela técnica de microscopia eletrônica de varredura, e os histogramas de variação de diâmetro para as fibras poliméricas utilizando o PCL, o PMMA e o PLGA, assim como seus sistemas contendo o fármaco SDS e o sistema supramolecular SDS/HP β CD, respectivamente. É importante enfatizar que para determinar o diâmetro médio de cada sistema polimérico, diferentes micrografias foram analisadas e a medida de diâmetro de 60 (sessenta) fibras avaliadas para cada sistema. A utilização de uma grande amostragem tem por objetivo dar mais confiabilidade aos dados obtidos, uma vez que um grande número de fibras é obtido em cada processo de eletrospinação.

Do ponto de vista de aspectos morfológicos, pode-se observar que as fibras, em cada série apresentam aspectos cilíndricos e uniforme. Este fato, pode ser atribuído ao ajuste dos parâmetros de eletrospinação: como o fluxo da solução, distância entre a placa coletora e o bico injetor e a tensão utilizada (SILL; VON RECUM, 2008). Outro fator que influencia diretamente na morfologia das fibras é a escolha do solvente. Na hipótese de ser utilizada uma maior razão de solventes voláteis, como por exemplo, o tetrahidrofurano ou clorofórmio, a rápida evaporação pode levar a formação de poros nas fibras pela instabilidade da solução que está sendo injetada. Entretanto, quando se utiliza uma maior proporção de solventes pouco voláteis, como no caso da dimetilformamida a solução polimérica fica mais estável, o que auxilia na escolha mais assertiva dos parâmetros da eletrospinação e consegue-se obter fibras em que não há presença de gotas (COSTA et al., 2012).

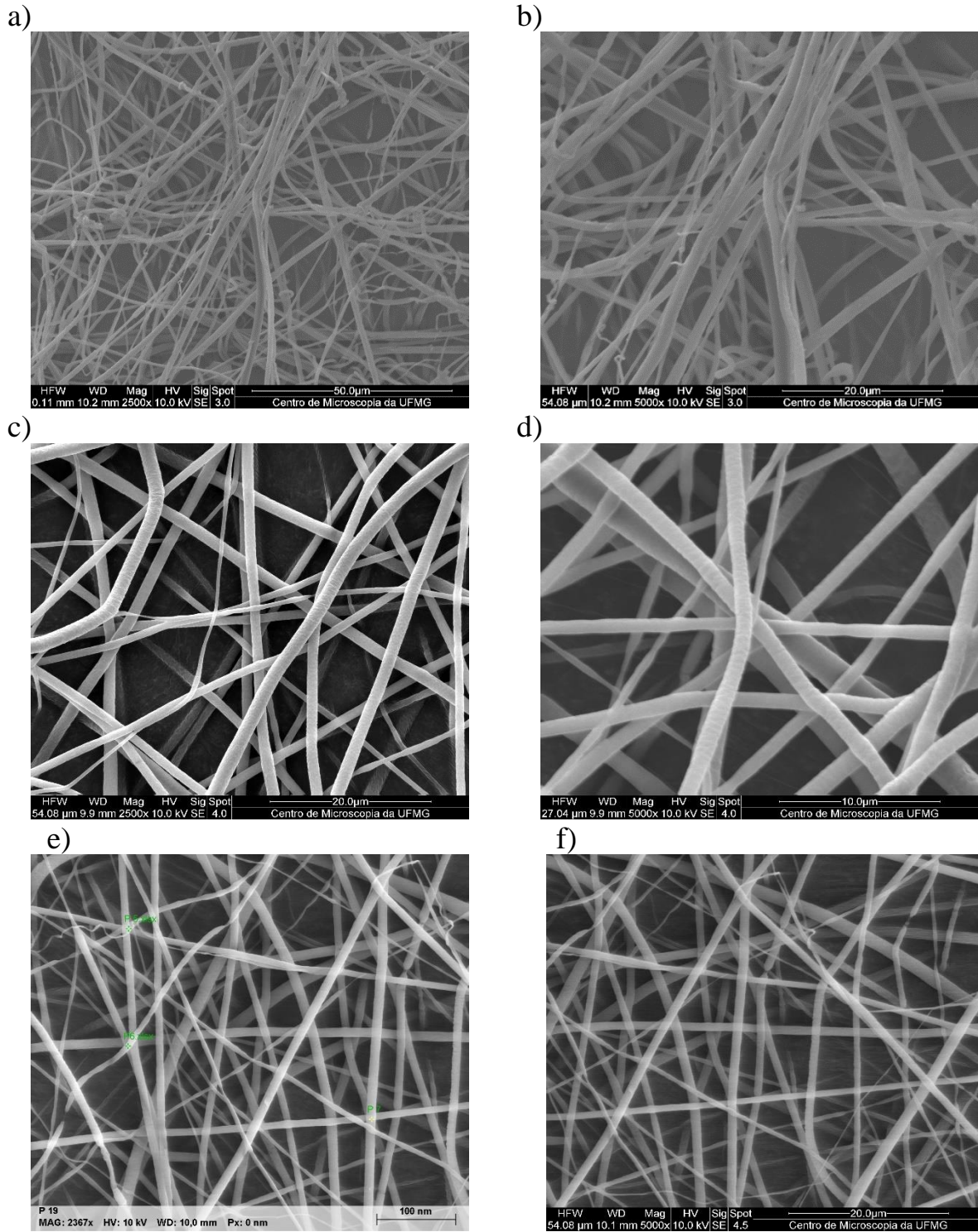
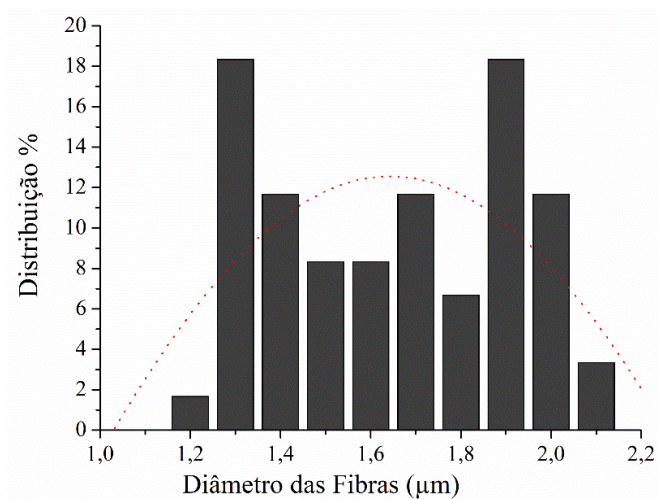
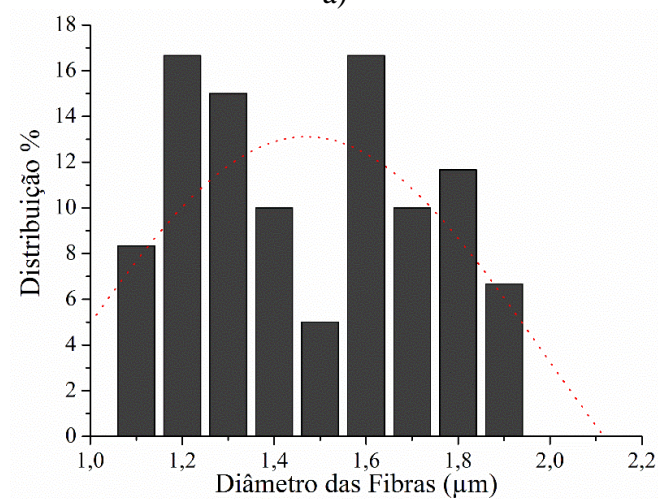


Figura 3. 2 - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura para as fibras obtidas por eletrofiação com ampliação: PCL (a) 2500x (b) 5000x, PCL SDS (c) 2500x (d) 5000x, PCL SDS/HPβCD (e) 2367x (f) 5000x.

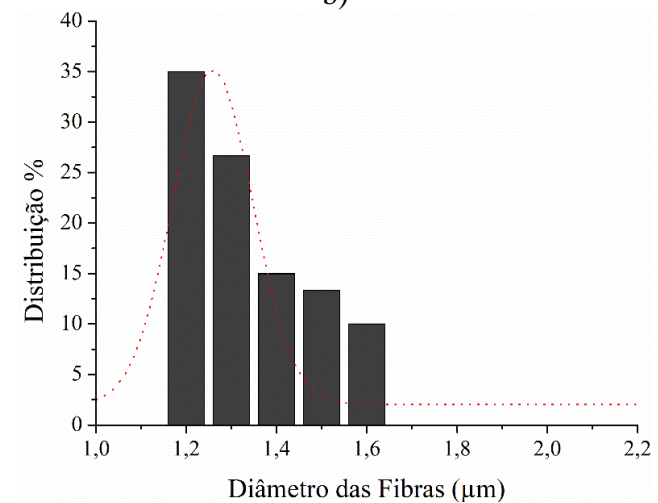
De forma específica, pode-se observar nas fibras dos sistemas utilizando PCL (Figura 3.2), que estas apresentam um formato cilíndrico, ausência de poros, furos e fusos, gotas ou partículas, apresentando também baixa uniformidade de distribuição de diâmetros. O diâmetro médio para o PCL foi de $1,73 \pm 0,27 \mu\text{m}$ que está de acordo com o diâmetro médio observado por Simões e colaboradores (2019). Para as fibras de PCL SDS o valor do diâmetro médio foi de $1,45 \pm 0,25 \mu\text{m}$ e para a combinação com o sistema supramolecular (PCL SDS/HP β CD) foi de $1,36 \pm 0,13 \mu\text{m}$. Embora, uma pequena variação no diâmetro médio para o sistema PCL possa ser observado, não é verificada uma diferença significativa entre as fibras obtidas do polímero contendo somente PCL e aqueles contendo fármaco e na presença da HP β CD.



a)



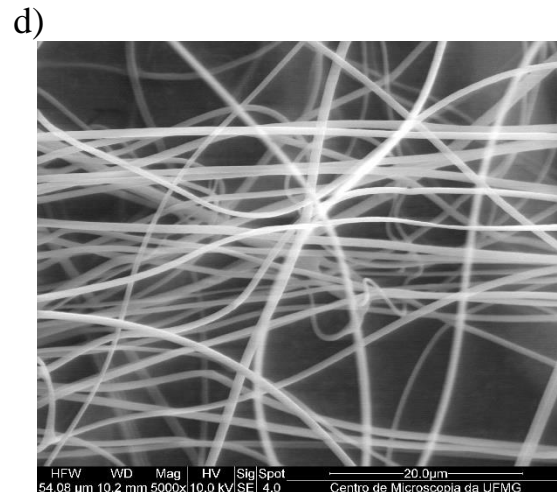
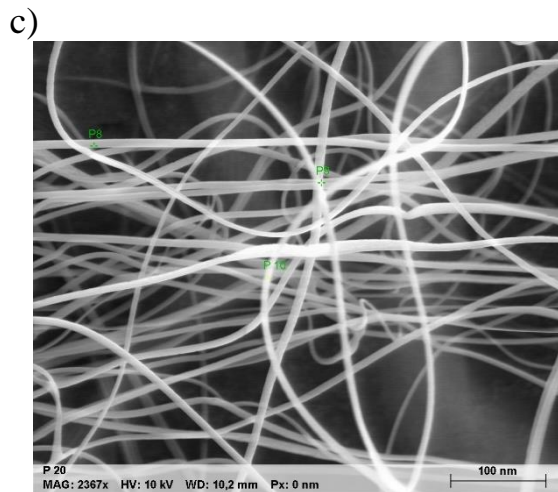
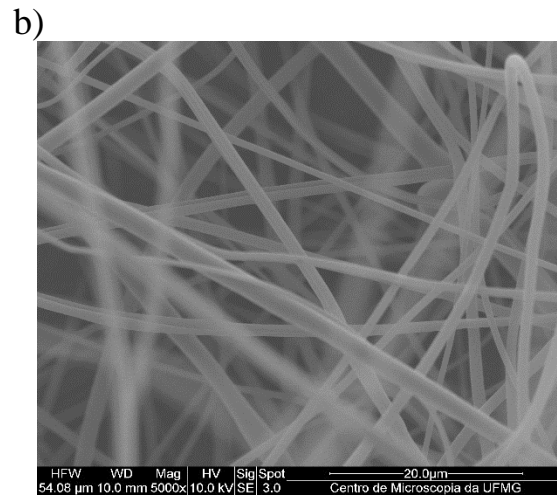
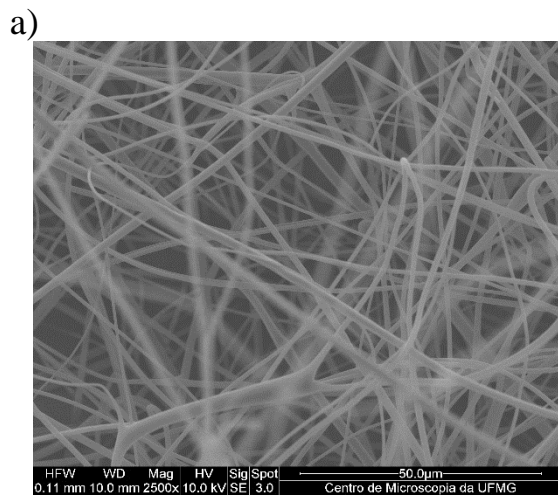
b)



c)

Figura 3 3 – Distribuição dos diâmetros das fibras a) PCL, b) PCL SDS e c) PCL SDS/HPβCD.

Na Figura 3.3 são apresentados os histogramas para o sistema polimérico utilizando o PCL. Os histogramas de porcentagem de distribuição por diâmetro apresentados na Figura 3.3a e 3.3b demonstram que para ambos os sistemas poliméricos (PCL e PCL SDS) apresentam um máximo de distribuição em aproximadamente 1,6 e 1,5 μm . Entretanto, para o sistema contendo o composto supramolecular SDS/HP β CD o valor máximo de distribuição encontra-se em 1,3 μm , aproximadamente. Essa diferença de porcentagem de distribuição entre os sistemas observada pelos histogramas podem ser fundamentais para explicar os comportamentos de perfil de liberação, permeabilidade ao vapor de água, entre outros fenômenos relacionados à área superficial das fibras poliméricas.



e)

f)

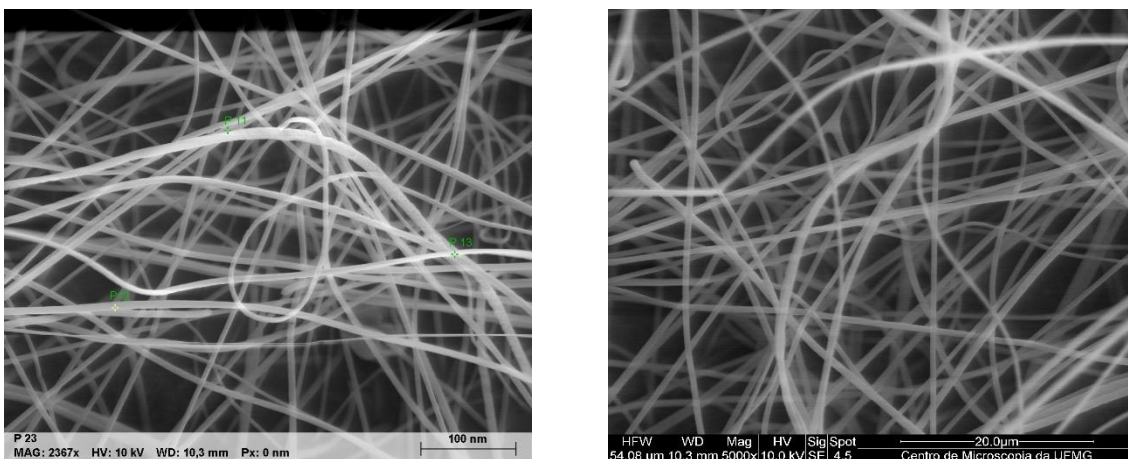
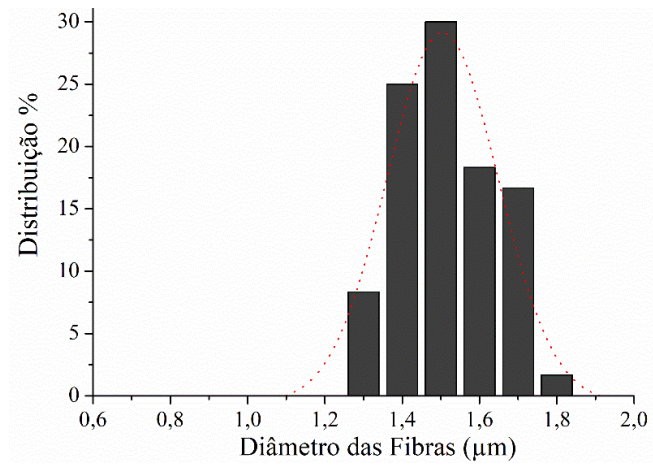
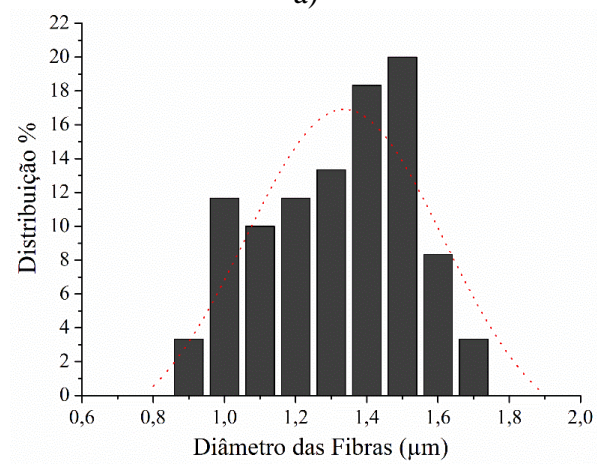


Figura 3. 4 - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura para as fibras obtidas por eletrofiação com ampliação: PMMA (a) 2500x (b) 5000x, PMMA SDS (c) 2367x (d) 5000x, PMMA SDS/HP β CD (e) 2367x (f) 5000x.

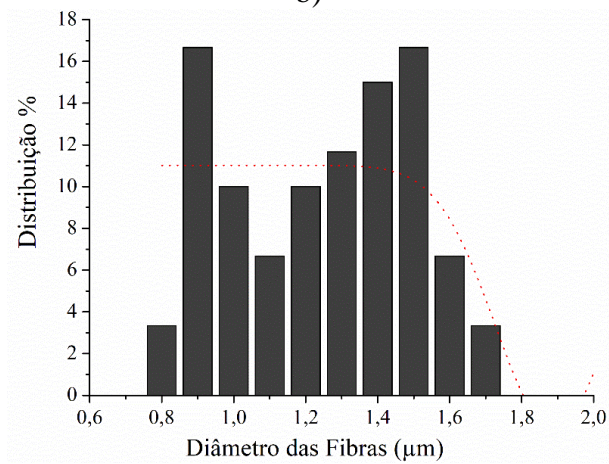
Assim como para o sistema referente as fibras de PCL, as micrografias obtidas para o sistema PMMA (Figura 3.4) demonstraram que estas não apresentam poros, furos e fusos, nota-se também a ausência de gotas ou partículas e apresentando baixa uniformidade de distribuição de diâmetros. Para as fibras de PMMA sem a presença do fármaco ou do sistema supramolecular, a média dos diâmetros apresentou um valor de $1,55 \pm 0,13 \mu\text{m}$, corroborando com os valores apresentados por Simões e colaboradores (2019). Os valores de diâmetro médio para as fibras de PMMA SDS foi de $1,40 \mu\text{m} \pm 0,22$ e de $1,35 \mu\text{m} \pm 0,26$ para as fibras de PMMA SDS/HP β CD. Apesar de se observar uma pequena variação no diâmetro médio para o sistema PMMA, não se constata nenhuma diferença significativa entre as fibras que contém o fármaco e na presença de HP β CD, em relação as fibras obtidas utilizando somente o polímero.



a)



b)

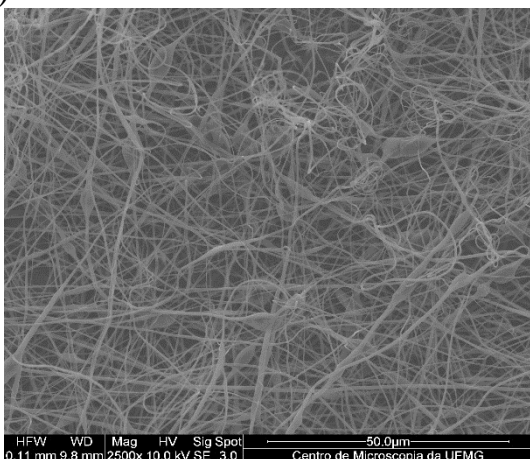


c)

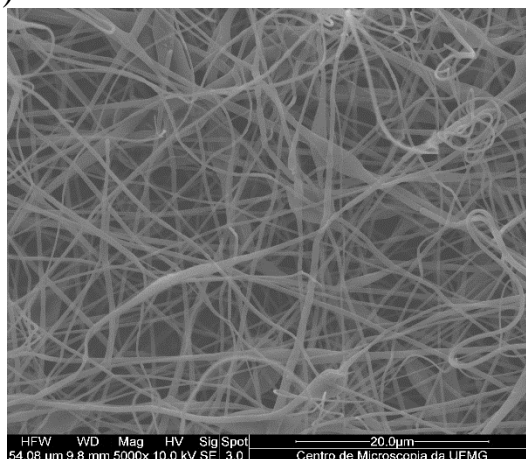
Figura 3.5 - Distribuição dos diâmetros das fibras a) PMMA, b) PMMA SDS e c) PMMA SDS/HPβCD.

Entretanto, analisando os histogramas apresentados na Figura 3.5 para o sistema polimérico utilizando o PMMA, percebe-se uma variação na porcentagem de distribuição dos diâmetros médios comparando os sistemas poliméricos. O histograma para o sistema PMMA apresenta um valor máximo de distribuição em aproximadamente 1,5 μm , com diâmetros que variam de 1,3 a 1,8 μm . Porém, para as duas fibras poliméricas de PMMA com SDS e com SDS/HP β CD (Figuras 3.5b e 3.5c) a porcentagem de distribuição dos diâmetros variam de 0,8 a 1,8 μm , indicando que o fármaco na presença e na ausência de HP β CD afeta a característica das soluções poliméricas para a obtenção das fibras, influenciando diretamente nos diâmetros obtidos.

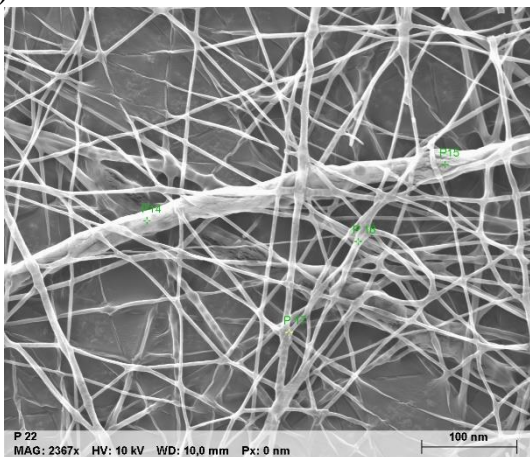
a)



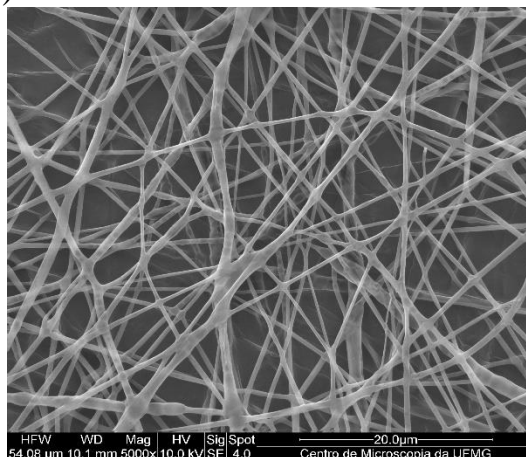
b)



c)



d)



e)

f)

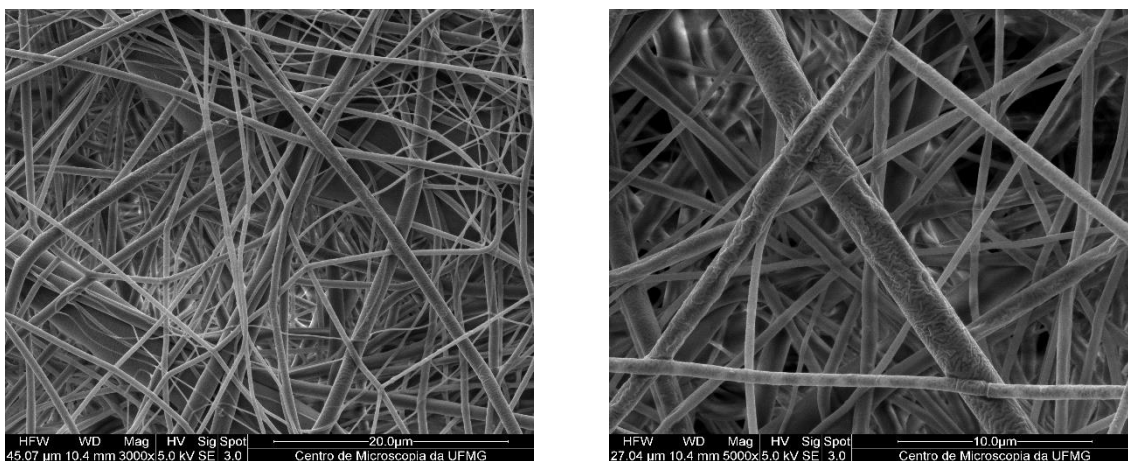
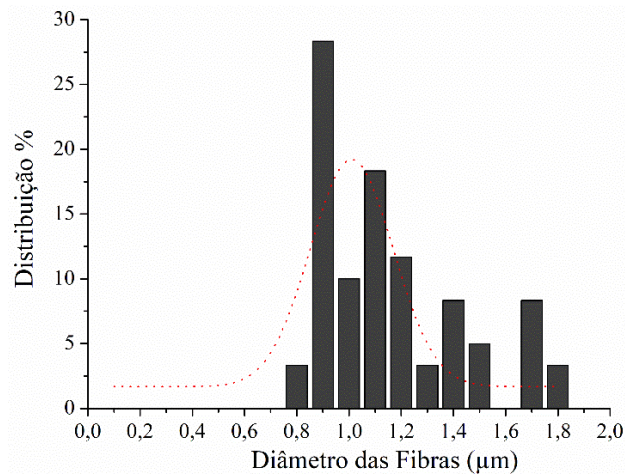
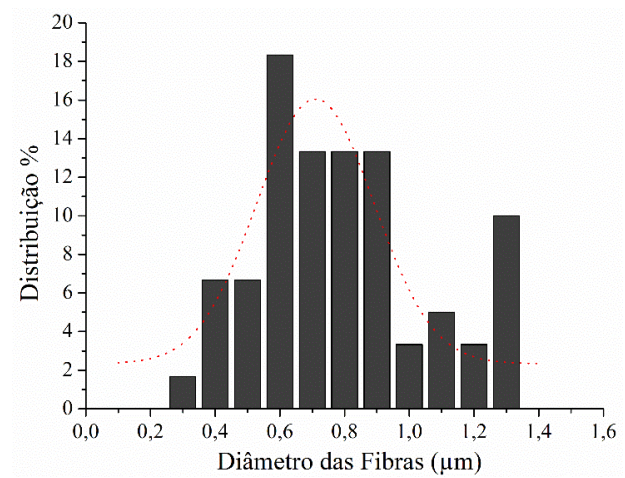


Figura 3. 6 - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura para as fibras obtidas por eletrofiação com ampliação: PLGA (a) 2500x (b) 5000x, PLGA SDS (c) 2367x (d) 5000x, PLGA SDS/HP β CD (e) 3000x (f) 5000x.

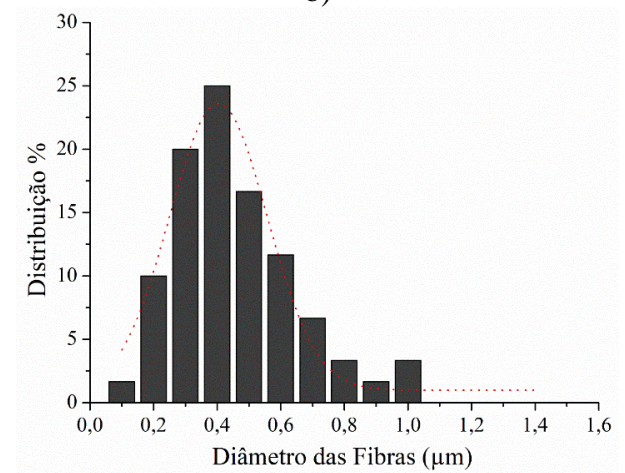
As micrografias obtidas para o sistema PLGA, apresentadas na Figura 3.6, não apresentam poros e furos, mas encontra-se em alguns locais gotas ou fusos. As fibras de PLGA apresentaram uma média de distribuição de diâmetros de $1,15 \mu\text{m} \pm 0,28$, enquanto, para as fibras de PLGA SDS o diâmetro é $0,81 \mu\text{m} \pm 0,31$ e $0,48 \mu\text{m} \pm 0,20$ para aquelas obtidas para o sistema PLGA SDS/HP β CD. Observa-se uma variação nos valores médios de distribuição dos diâmetros, demonstrando diferenças significativas quando se comparam as fibras contendo somente PLGA com as contendo SDS e HP β CD. De acordo com o que é relatado por Schoeller e colaboradores (2021), a inserção de sais nas membranas de PLGA aumenta a condutividade da solução polimérica e as fibras que eram obtidas em escala micrométrica para o polímero, passaram a ser obtidas em escala nanométrica.



a)



b)



c)

Figura 3 7 - Distribuição dos diâmetros das fibras a) PLGA, b) PLGA SDS e c) PLGA SDS/HPβCD.

Analisando os histogramas apresentados na Figura 3.7, consegue-se observar uma variação na porcentagem de distribuição dos diâmetros para o sistema polimérico utilizando o PLGA. O histograma para o sistema PLGA apresenta um valor máximo de distribuição em aproximadamente 1,0 μm , com diâmetros que variam de 0,8 a 1,8 μm . Já para as fibras de PLGA com SDS (Figura 3.7b) os diâmetros variam de 0,3 a 1,3 μm apresentando uma máxima em 0,7 μm e para as fibras com SDS/HP β CD (Figura 3.7c) os diâmetros variam de 0,1 a 1,0 μm , apresentando uma máxima distribuição em 0,4 μm . Essa variação de diâmetro apresentada mostra que a presença das moléculas de SDS e HP β CD interferem diretamente no processo de eletrofição e nas características de distribuição do diâmetro do material.

Pode-se observar em todas as séries poliméricas PCL, PMMA e PLGA uma diminuição do diâmetro das fibras quando adicionado o fármaco sulfadiazina de sódio. Esse fato já foi relatado em literatura e está atrelado a adição de um sal, que promove o aumento da condutividade da solução, interferindo nos parâmetros da eletrofição e ao mesmo tempo promovendo um alongamento da fibra, o que acarreta uma diminuição do seu diâmetro e menor formação de gotas (AHMADIAN; GHORBANI; MAHMOODZADEH, 2020; COSTA et al., 2012).

3.2 Análise por ângulo de contato

Com o intuito de verificar as propriedades de superfície das fibras de PCL, PMMA e PLGA foi utilizada a técnica de análise de ângulo de contato da água com as matrizes poliméricas (JENKINS; DONALD, 1999). A técnica permite inferir sobre as características de hidrofília e/ou hidrofobia destes materiais, por exemplo. Além disso, para verificar a influência das moléculas de SDS e SDS/HP β CD as fibras contendo estes materiais também foram analisadas.

As medidas do ângulo de contato da água, conforme ilustrado na Figura 3.8, fornecem informações que permitem a caracterização das fibras como hidrofílicas, quando se obtêm valores entre $0^\circ \leq \theta < 90^\circ$, resultando em uma maior interação do material com a gota. As fibras também podem ser caracterizadas como hidrofóbicas, apresentando valores de θ superiores a 90° , diminuindo a interação entre a gota e o material (VALENTE et al., 2019). Dentre a classe dos materiais com características hidrofóbicas, podemos destacar aqueles denominados de superhidrofóbicos, pois apresentam valores de ângulo de contato que são superiores a 150° (YAMASHITA; YASUKAWA; SAWADA, 2020).

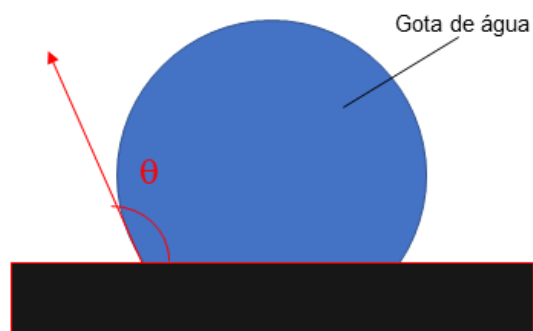


Figura 3.8 Esquema geral de como é calculado o ângulo (θ) de contato da água com a superfície do material.

As imagens de ângulo de contato da gota de água com a superfície dos materiais para os polímeros de PCL, PMMA e PLGA e ainda para estes contendo SDS ou SDS/HP β CD, estão apresentadas nas Figuras 3.9, 3.10 e 3.11, respectivamente. Os valores medidos para o ângulo θ , para todos os sistemas descritos anteriormente encontram-se na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Valores médios das medidas ângulo de contato e desvio padrão.

Fibras	$\theta / ^\circ$	Desvios Padrão
PCL	138,1	0,8
PCL SDS	131,1	2,4
PCL SDS/HPβCD	133,3	2,5
PMMA	136,2	2,1
PMMA SDS	140,1	1,3
PMMA SDS/HPβCD	139,6	2,3

As medidas de ângulo de contato para o sistema PLGA não são apresentadas uma vez que o material apresentou alto grau de molhabilidade.

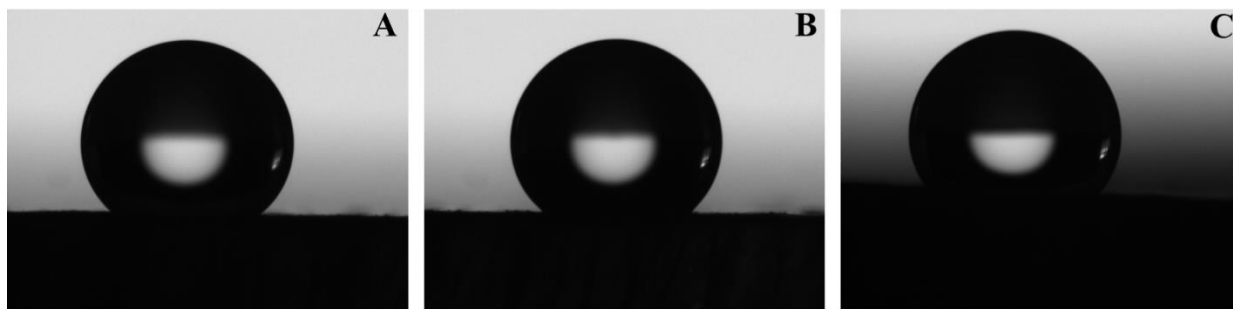


Figura 3.9 - Ângulo de contato entre água (10 μ L) e a superfície das membranas de a) PCL, b) PCL SDS, c) PCL SDS/HP β CD.

Para as fibras da série PCL (Figura 3.9), observa-se um decréscimo nos valores do θ , quando se compara as fibras contendo SDS ou SDS/HP β CD com aquela utilizando somente o polímero (PCL). O valor médio para o PCL foi de 138,1 $^{\circ}$ enquanto com a presença de SDS e SDS/HP β CD foram obtidos valores médios de 131,1 e 133,3 $^{\circ}$ respectivamente. Um ponto de destaque que pode justificar esse resultado é a adição das moléculas de CD e SDS ao sistema, que acarreta a diminuição do diâmetro das fibras. Estas variações de diâmetro apresentadas permitem que características da superfície das fibras sejam modificadas, possibilitando uma maior interação da gota de água depositada com o a membrana polimérica. Outra justificativa é a incorporação de moléculas que são solúveis em água (SDS e HP β CD), que podem alterar a hidrofobicidade do material. Resultados semelhantes foram reportados por Sharma e colaboradores, que demonstraram que a molécula de β CD inserida na membrana polimérica, diminui os valores de ângulo medidos.(SHARMA; SATAPATHY, 2021).

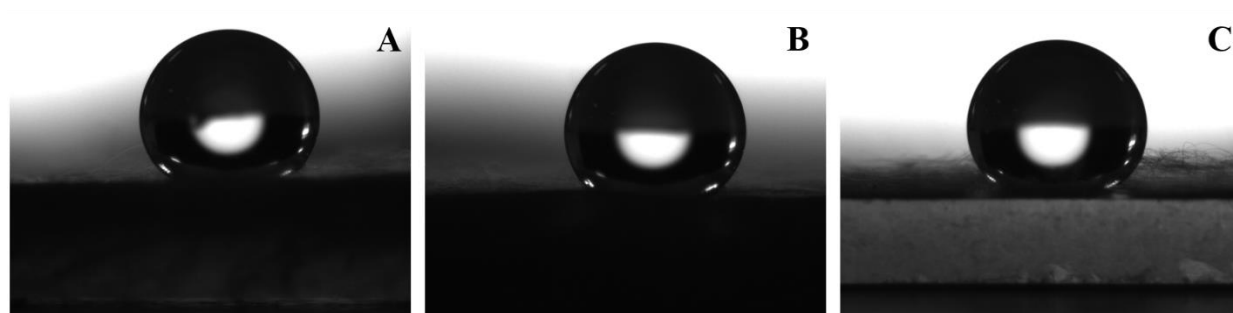


Figura 3.10 - Ângulo de contato entre água (10 μ L) e a superfície das membranas de a) PMMA, b) PMMA SDS e c) PMMA SDS/HP β CD.

O de valor θ obtido para as fibras de PMMA foi de $136,2^\circ$ e para as fibras contendo SDS e SDS/HP β CD com o mesmo polímero os valores de θ foram $140,1^\circ$ e $139,6^\circ$, respectivamente (Figura 3.10). Esses resultados indicam que não há uma variação entre as diferentes matrizes poliméricas para o sistema utilizando o PMMA. Dentre algumas razões duas podem justificar a variação de valores de ângulo de contato, sendo a primeira a adição de moléculas à matriz polimérica e a segunda a diferença de diâmetro das fibras. Especificamente para os sistemas de PMMA, não foram observadas variações significativas para a distribuição de tamanho, sendo somente a primeira razão para variação nas medidas de ângulo de contato, a justificativa para os valores observados.

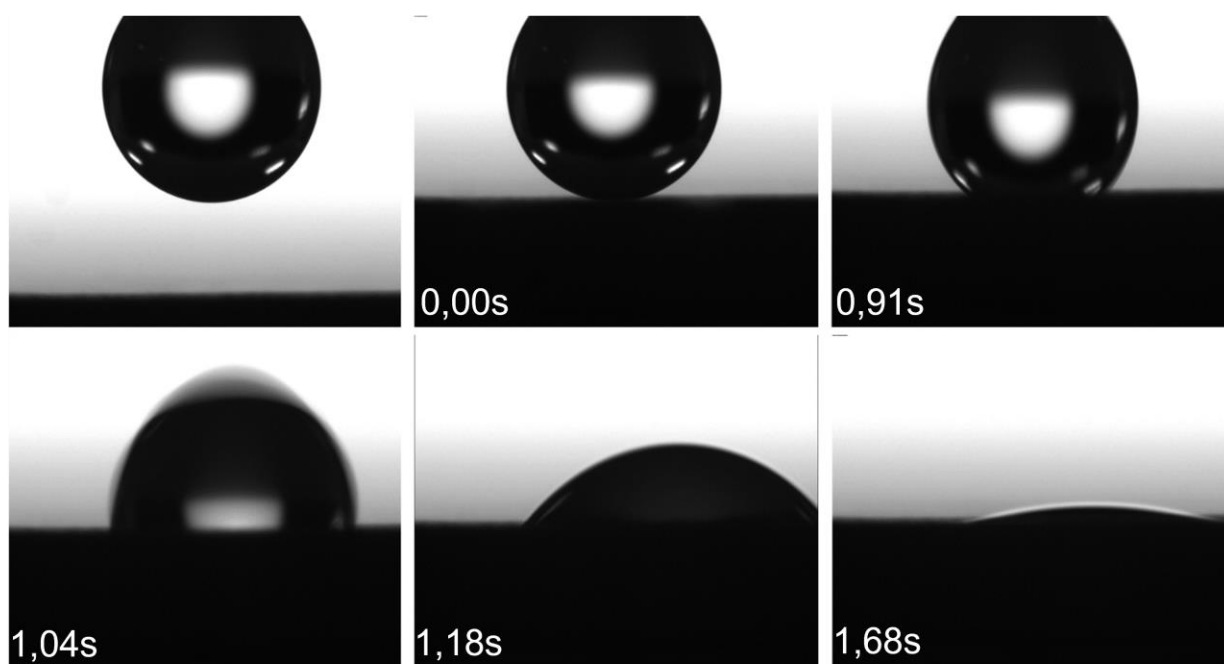


Figura 3.11 - Ângulo de contato entre água ($10 \mu\text{L}$) e a superfície das membranas de PLGA.

Para o sistema de fibras formadas pelo PLGA, as medidas de ângulo de contato da água com a superfície do material não puderam ser realizadas, pois a gotícula de água adicionada não se manteve na superfície, podendo se observar que após 1,7 segundos a maior parte da gota de água já havia sido absorvida pelo material, mostrando que a água tem interação com o material, caracterizando-o como hidrofílico, como pode ser observado na Figura 3.11. Uma das justificativas

para essa característica hidrofílica é o diâmetro determinado para as fibras de PLGA, dentro os sistemas estudados o único em uma escala nanométrica. Devido a essa característica hidrofílica apresentada pela fibra de PLGA, comportamento semelhante foi verificado para as fibras de PLGA SDS e PLGA SDS/HP β CD. Além dos sistemas apresentarem a adição de moléculas hidrofílicas, para os dois casos medidas de diâmetro médio na ordem de nanômetros também foram determinados pela análise de MEV.

Conforme relatado no trabalho de Qian e colaboradores (2016), que produziram uma blenda de PLGA/PCL, para incorporação de moléculas bioativas para melhorar a proliferação celular. A análise de ângulo de contato demonstra a hidrofílicidade do PLGA, uma vez que, mesmo estando em uma blenda polimérica com 30 % de PCL na composição, esta membrana apresentou um valor de ângulo de contato de aproximadamente 65 °. Esses resultados indicam que as fibras de PLGA podem apresentar características hidrofílicas, principalmente quando o diâmetro destas está na ordem de nanômetros.

3.3 Análise de permeabilidade em vapor de água

A análise de permeabilidade de vapor de água (PVA), é definida pela taxa de transmissão de vapor de água através de uma membrana. Analisando esses valores obtidos consegue-se averiguar os modelos de difusão de fármacos em matrizes poliméricas, as interações que podem ocorrer entre os componentes do sistema, caracterizando uma barreira de proteção ou até mesmo presumir o comportamento do fármaco dessa matriz (BERTUZZI et al., 2007). Ainda segundo Bertuzzi, (2007), o que caracteriza uma permeabilidade é se ela é um produto da difusividade e solubilidade de um sistema e para ter esse tipo de característica o sistema precisa estar obedecendo as leis de Fick ou Henry. Sendo assim a interação do vapor de água com a matriz polimérica pode levar a solubilidade ou difusão da molécula (de água) pela matriz. Alguns fatores podem ser determinantes para caracterizar a permeabilidade, destacando-se a natureza hidrofóbica ou hidrofílica do material, a modificação estrutural do material e a presença de poros ou fendas ao longo da membrana, além da espessura que foi medida para cada sistema polimérico (TAN; THOMAS, 2016). Os valores de PVA para os três polímeros e suas associações com o fármaco e com o sistema supramolecular estão apresentados na Tabela 3.2, assim como os valores da espessura média das membranas e seus respectivos desvios padrões.

Tabela 3.2 - Valores de permeabilidade ao vapor de água (PVA) e desvio padrão (DP) para as fibras obtidas por eletrofição.

Fibra	Espessura média (mm)	PVA (g.mm/h.m².Pa).10⁻⁰⁷
PCL	0,3205	4,53± 2,45 ^{a*}
PCL SDS	0,2505	6,47± 2,18 ^{a*}
PCL SDS/HPβCD	0,1730	9,55±0,14 ^{a**}
PMMA	0,2623	4,29 ± 0,35 ^{b*}
PMMA SDS	0,2275	4,74 ± 0,48 ^{b*}
PMMA SDS/HPβCD	0,1254	6,44 ± 0,16 ^{b**}
PLGA	0,1544	3,23 ± 0,25 ^{c*}
PLGA SDS	0,1665	4,90 ± 0,22 ^{c**}
PLGA SDS/HPβCD	0,1391	8,21 ± 0,72 ^{c***}

A análise estatística foi avaliada por meio de ANOVA unidirecional, seguida pelo Teste de Comparação Múltipla de Tukey. O símbolo ^a foi usado para o grupo PCL, o símbolo ^b foi usado para o grupo PMMA e o símbolo ^c foi usado para o grupo PLGA. O asterisco (*) indica que os dados foram divididos em grupos usando o pós-teste de Tukey, e foram observadas diferenças estatisticamente significativas com $p < 0,0001$.

Para as fibras da série PCL, observa-se um aumento nos valores de PVA para as fibras PCL SDS e PCL SDS/HPβCD, quando comparados as fibras contendo somente o polímero (PCL). Essas variações, são significativas para o sistema PCL SDS/HPβCD e podem ser atribuídas à presença do sistema supramolecular, na composição do material, visto que essas moléculas têm característica hidrofílicas. Essa diferença de valores corrobora com as variações de diâmetros para esse sistema polimérico, uma vez que houve a diminuição dos valores de diâmetros, com a presença do sistema supramolecular, o que acarreta a diminuição da espessura da membrana polimérica. Na análise de ângulo de contato, pode-se observar um ligeira diminuição nos valores de θ , indicando um aumento na hidrofília para as fibras com a presença dessas moléculas.

As observações mencionadas anteriormente também se aplicam às fibras de PMMA. Essas fibras demonstraram variações de valores menores em comparação com as membranas da série

PCL. No entanto, assim como ocorreu nas membranas de PCL, o sistema PMMA SDS/HP β CD apresentou uma variação estatisticamente significativa em relação ao polímero, especialmente na presença do fármaco SDS. Essa variação pode estar relacionada à redução do diâmetro das fibras e consequente diminuição de sua espessura. No entanto, ao analisar a permeabilidade ao vapor de água, é importante notar que esse sistema apresentou uma variação menor em comparação com o sistema mencionado anteriormente. Isso pode ser comprovado pelos valores de ângulo de contato, nos quais as variações nas medidas de θ para as fibras de PMMA não foram consideráveis.

As fibras para os sistemas PLGA caracterizadas como hidrofílicas pela análise de ângulo de contato da água com a superfície do material, aumenta a interação do vapor de água com a membrana. Conforme pode ser observado a variação dos valores das membranas contendo o fármaco SDS e o sistema supramolecular, apresentando valores estatisticamente significativos quando comparados àquele referente ao polímero. Essas duas membranas citadas também apresentam diferença significativa entre si, o que corrobora com a diminuição dos valores de diâmetro quando esses dois sistemas são comparados.

Analisando separadamente a fibras contendo somente os polímeros, tem-se o PCL e o PMMA com maior valor de PVA em relação ao PLGA, mesmo o PLGA apresentando características hidrofílicas, essa diferença pode ser corroborada pela variação do diâmetro médio apresentada para essas membranas, PCL $1,45 \pm 0,25 \mu\text{m}$ e PMMA $1,55 \pm 0,13 \mu\text{m}$. Isso porque, fibras com maior diâmetro médio tendem a formar mais poros do que aquelas com menor diâmetro médio, sendo esse o caso dos sistemas contendo o PLGA (POORMOHAMMADIAN; DARVISHI; DEZFULI, 2019).

Assim como acontece para os polímeros, as fibras com a presença da SDS alteram de forma significativa os valores de PVA, e essa variação também corrobora com os resultados da variação de diâmetro médio, enquanto as fibras de PCL SDS apresentam diâmetro de $1,45 \pm 0,25$, as de PMMA SDS $1,40 \mu\text{m} \pm 0,22$ e as de PLGA SDS $0,81 \mu\text{m} \pm 0,31$, justificando os valores próximos de PVA para as fibras, e o aumento dos valores é justificado pela presença do fármaco que é altamente solúvel em água.

Para as fibras de PCL SDS/HP β CD, PMMA SDS/HP β CD e PLGA SDS/HP β CD também foram observados aumentos dos valores de PVA quando comparados as outras fibras, que não tem presença da ciclodextrina, essa variação de PVA é atribuída a presença do fármaco e da HP β CD que são moléculas que possuem alta solubilidade em água. A presença dessas moléculas na

composição das membranas poliméricas é mais significativa para a permeabilidade do que a distribuição dos diâmetros, visto que os valores de PVA foram maiores, quando comparados as outras fibras com diâmetros maiores. Resultados semelhantes foram apresentados por Souza e colaboradores (2018), que obtiveram uma fibra de PCL com a presença do composto de inclusão formado pela sulfadiazina de prata e β CD e relataram também um aumento no valor de permeabilidade ao vapor de água, quando se comparado as fibras de polímero PCL. É importante ressaltar que para se calcular a permeabilidade leva-se em consideração a espessura média das fibras. Pode-se observar que em todos os sistemas poliméricos acontece a diminuição dos valores de espessura, na medida em que são inseridas as moléculas de SDS e do sistema SDS/HP β CD.

Outra justificativa importante para a variação dos valores de permeabilidade é que com a inserção dessas moléculas no sistema polimérico, tem-se a diminuição das interações polímero-polímero e das interações hidrofóbicas, que podem aparecer por toda extensão das cadeias poliméricas, e também pelo surgimento de interações (do tipo dipolo-dipolo, por exemplo) entre a SDS e os polímeros, e pela presença do seu grupo polar sulfonamida (SO_2NHR) favorecendo a diminuição das propriedades de barreira e o consequente aumento da vulnerabilidade do material.

3.4 Ensaio de liberação *in vitro* do fármaco sulfadiazina de sódio

O ensaio de liberação *in vitro* para as fibras contendo o fármaco sulfadiazina de sódio, foi realizado com o intuito de verificar a possibilidade desses materiais obtidos atuarem como sistemas de liberação controlada, a caracterização morfológica já demonstra que o sistema não possui poros e deformações e apresentam uniformidade. Anexo a essas características, o teste de permeabilidade ao vapor de água, já demonstrou que, quando se adiciona o fármaco e a HP β CD ao sistema, ele se torna mais permeável, diminuindo, portanto, sua propriedade de barreira, que mesmo apesar da diminuição ainda se mantem em valores favoráveis a utilização desse sistema para liberação via transdérmica.

Primeiramente, para a quantificação do SDS em cada sistema polimérico foi obtida uma curva de calibração. Espectros obtidos UV-VIS da sulfadiazina de sódio em solução aquosa, Figura 3.12, são apresentados. Os experimentos foram realizados em triplicata e o valor máximo de absorvância em 260 nm utilizado para construir a curva de calibração (Figura 3.13). Os dados

descritos na Figura 3.14, são a média de diferentes soluções e o desvio padrão calculado a partir destes dados.

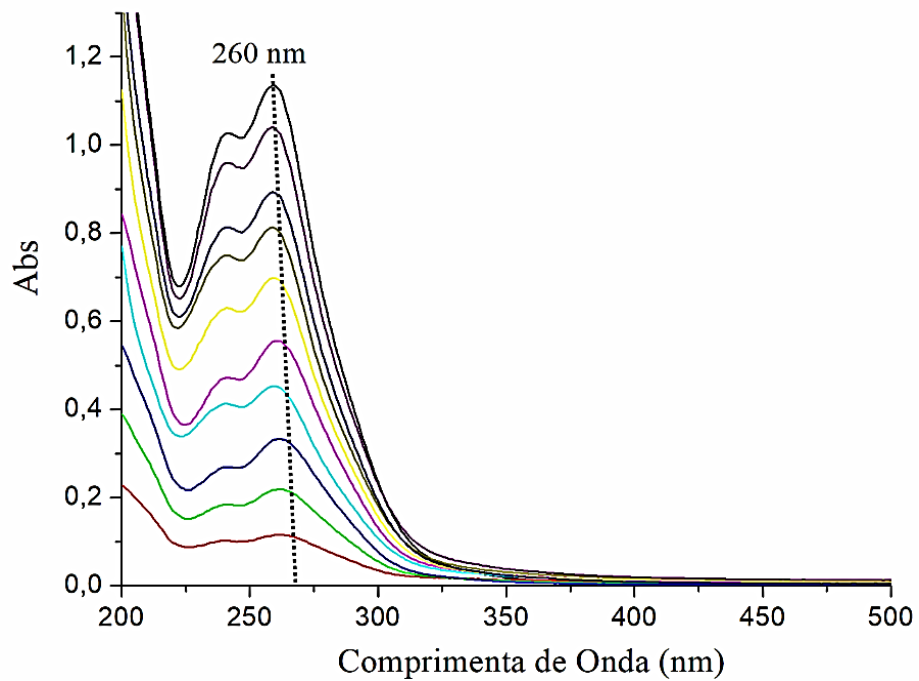


Figura 3.12 - Espectro de UV-Vis da sulfadiazina de sódio variando as concentrações entre $4,955 \times 10^{-5}$ a $5,505 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹.

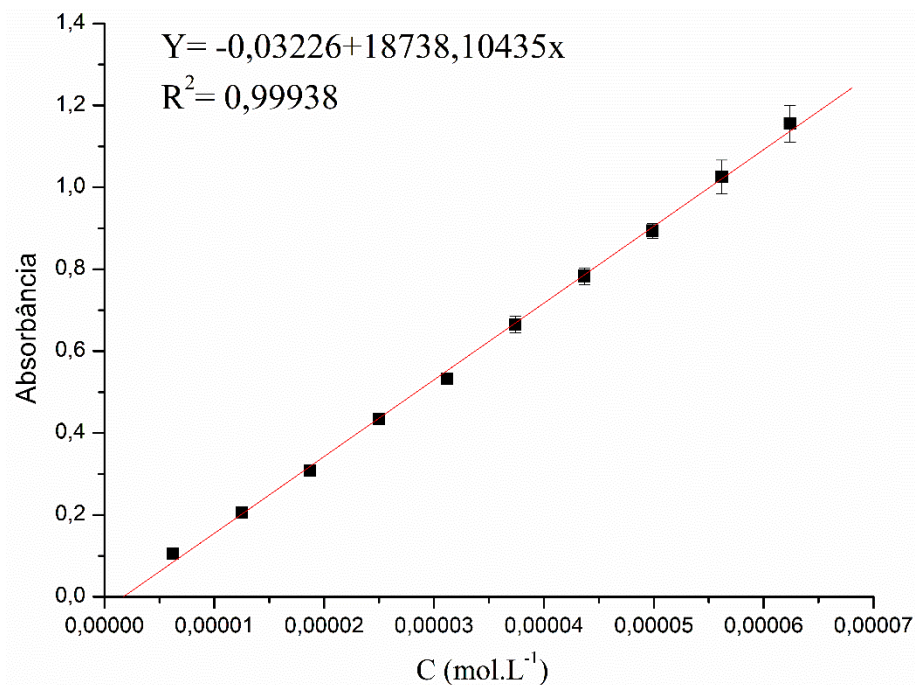


Figura 3.13 - Representação da curva de calibração obtida para sulfadiazina de sódio em solução aquosa.

Com o intuito de verificar se a presença de HP β CD poderia promover uma variação no espectro de absorção da molécula de SDS, espectros UV-VIS de sulfadiazina de sódio em solução aquosa em presença de HP β CD (na razão molar de 1:1) foram obtidos, conforme apresentados na Figura 3.14, sendo realizados em triplicata. A curva de calibração utilizando a absorbância máxima em 260 nm é apresentada na Figura 3.15, como média de concentração em cada ponto.

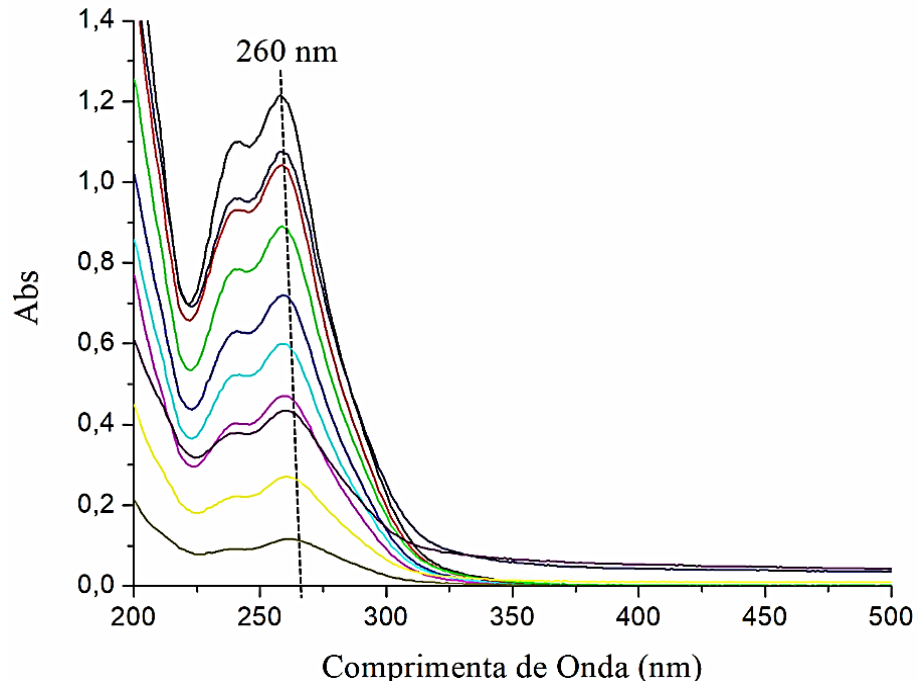


Figura 3.14 - Espectro de UV-Vis da sulfadiazina de sódio e HP β CD variando as concentrações entre $4,955 \times 10^{-5}$ a $5,505 \times 10^{-6}$ mol.L $^{-1}$.

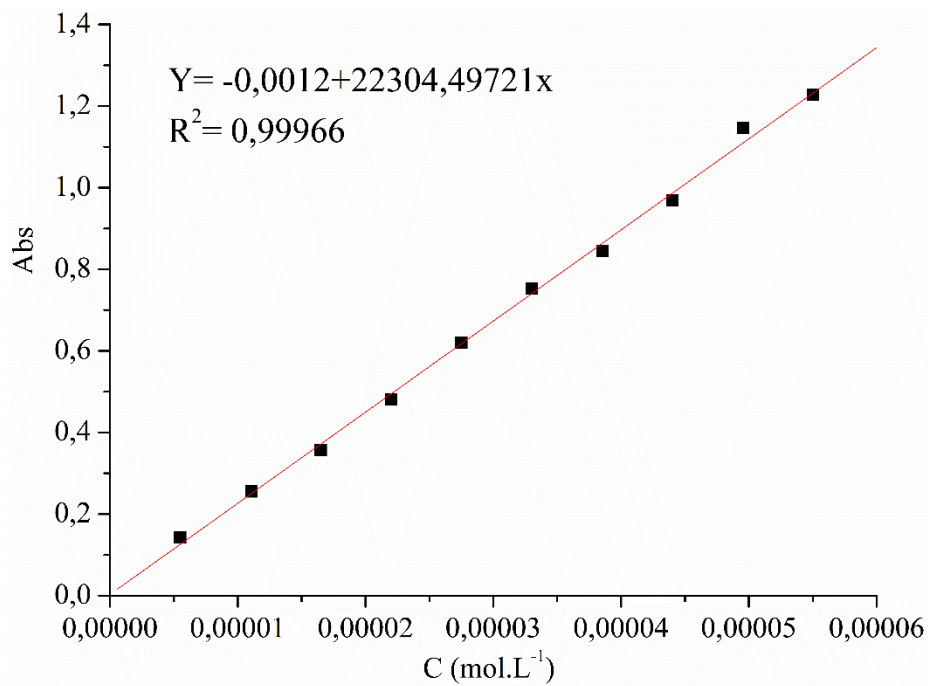


Figura 3.15 - Representação da curva de calibração obtida para sulfadiazina de sódio em presença de HP β CD.

Após a análise das curvas de calibração, é importante destacar que não foi identificada qualquer influência da HP β CD no processo de construção da curva de calibração. Esse resultado sugere que a presença da HP β CD não afeta as medições, garantindo assim a confiabilidade dos dados obtidos durante o experimento.

Após serem obtidas as curvas de calibração, a quantificação da sulfadiazina de sódio contida nas fibras foi realizada. Essa análise na qual se cortou seis alíquotas de 50 mg de cada fibra aproximadamente, foi realizada com o intuito de verificar a homogeneidade da distribuição do fármaco nas fibras. Os resultados obtidos para os sistemas poliméricos estão apresentados na Figura 3.16.

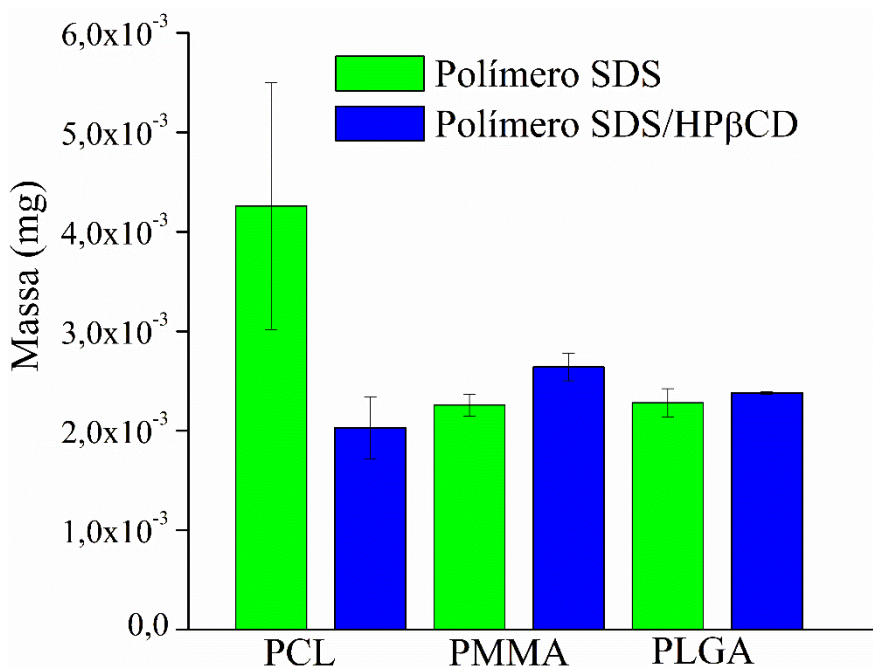


Figura 3.16 Gráfico de quantificação para cada sistema polimérico contendo sulfadiazina de sódio.

Os valores obtidos foram calculados com base nas alíquotas de 50,0 mg de fibra que foram utilizadas, apresentando resultados que são inferiores ao valor teórico calculado para a sulfadiazina na fibra, que é de 5,55x10⁻⁰³ mg por miligrama de fibra, se o fármaco estiver distribuído de forma uniforme por toda extensão das fibras. Esse valor não foi obtido em nenhuma extração, o que pode

atrelado a não uniformidade de distribuição do fármaco na membrana polimérica. A taxa de carga do fármaco nas fibras está apresentada na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 - *Valores da taxa de carga do fármaco nas membranas de nanofibras.*

Fibras	Taxa de carga de SDS (%)
PCL SDS	77,5 ± 29,1
PCL SDS/HPβCD	36,9 ± 11,2
PMMA SDS	40,6 ± 2,0
PMMA SDS/HPβCD	47,5 ± 2,5
PLGA SDS	41,2 ± 2,6
PLGA SDS/HPβCD	43,0 ± 0,3

Após serem feitas as quantificações, o ensaio de liberação de fármaco pelo sistema de liberação do tipo Franz Cell foi realizado a fim de se demonstrar o perfil de liberação característico do sistema e se este é viável para utilização como sistema de liberação transdérmico. As curvas de calibração utilizadas para quantificação do fármaco liberado são as supracitadas que estão nas Figuras 3.13, sistemas sem HPβCD e na Figura 3.15, sistemas com HPβCD. O perfil de liberação de cada sistema PMMA, PLGA e PCL está apresentado nas Figuras 3.17, 3.18 e 3.19, respectivamente.

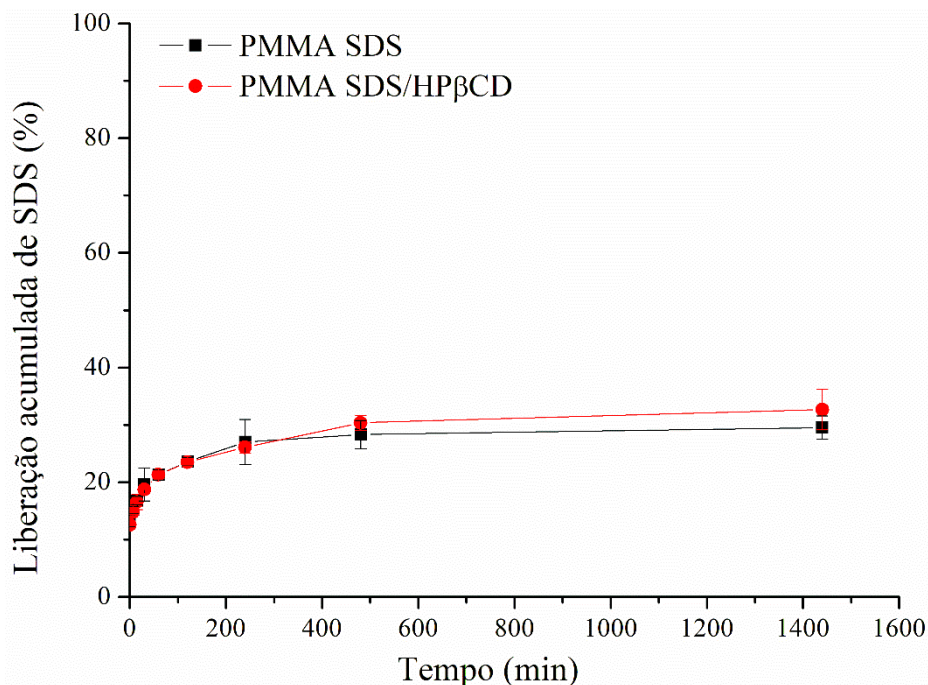


Figura 3 17 - Curva de média da massa acumulada por tempo para as fibras PMMA SDS e PMMA SDS/HPβCD no ensaio de liberação *in vitro*.

Fazendo a comparação entre os sistemas poliméricos, tem-se que as fibras de PMMA SDS apresenta uma máxima liberação de aproximadamente 28 % do fármaco em 8 horas de liberação e esse valor se mantem até atingir 24 horas de análise. Já as fibras de PMMA SDS/HPβCD apresentam baixo valor de erro na liberação do fármaco, sendo liberados para a solução uma máxima de 32 % de sulfadiazina em 480 minutos e esse valor se mantendo até 1440 minutos, porém a extração não está conforme o esperado, apresentando um erro grande. Além deste fato a maior liberação do fármaco para esse sistema corrobora com a diminuição dos valores de diâmetros das fibras com a adição do fármaco e do sistema supramolecular, aumentando a superfície de contato da membrana polimérica. Outra justificativa está nos valores observados na permeabilidade ao vapor de água, tendo em vista que com o aumento dos valores de permeabilidade a propriedade de barreira para esse sistema se torna menor.

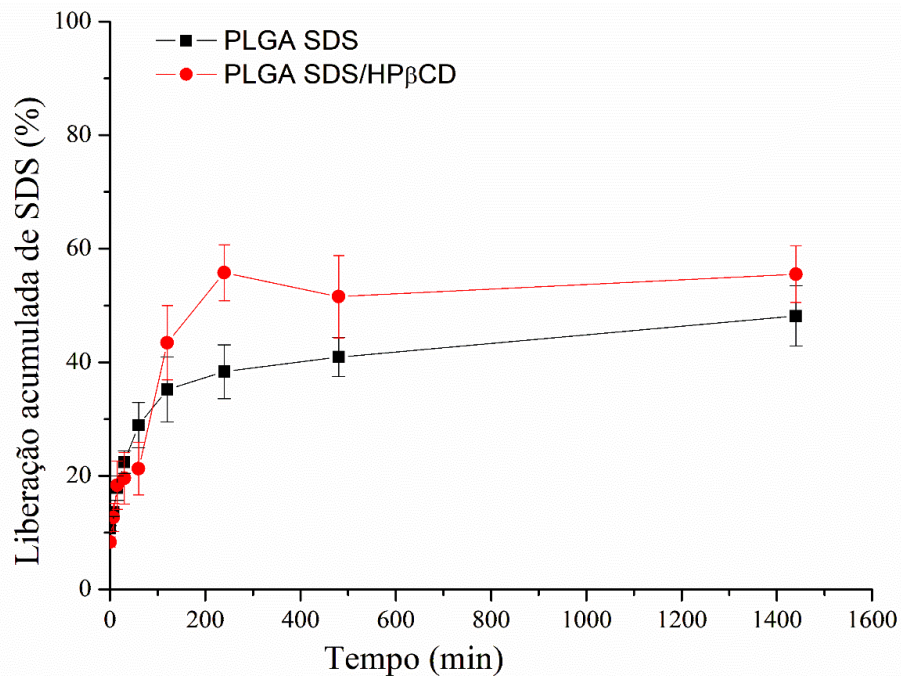


Figura 3 18 - Curva de média da massa acumulada por tempo para as fibras PLGA SDS e PLGA SDS/HPβCD no ensaio de liberação *in vitro*.

As membranas de PLGA apresentam maior liberação acumulada, com valores máximos de liberação do fármaco, apresentando 56 %, que se inicia com 240 minutos de análise e se mantém até 1440 minutos, para as fibras PLGA/SDSHPβCD e aproximadamente 48 %, nos mesmos minutos de análise para as fibras PLGA SDS. Esse fato corrobora com a média das extrações de sulfadiazina para essas fibras, pois em ambos os resultados se observa um erro de baixo valor e em comparação com as de PMMA libera mais sulfadiazina de sódio para o meio. Além deste fato a maior liberação do fármaco para esse sistema corrobora com a hidrofiliabilidade observada na análise de ângulo de contato e com os valores observados na permeabilidade ao vapor de água, tendo em vista que com o aumento dos valores de permeabilidade a propriedade de barreira para esse sistema se torna menor.

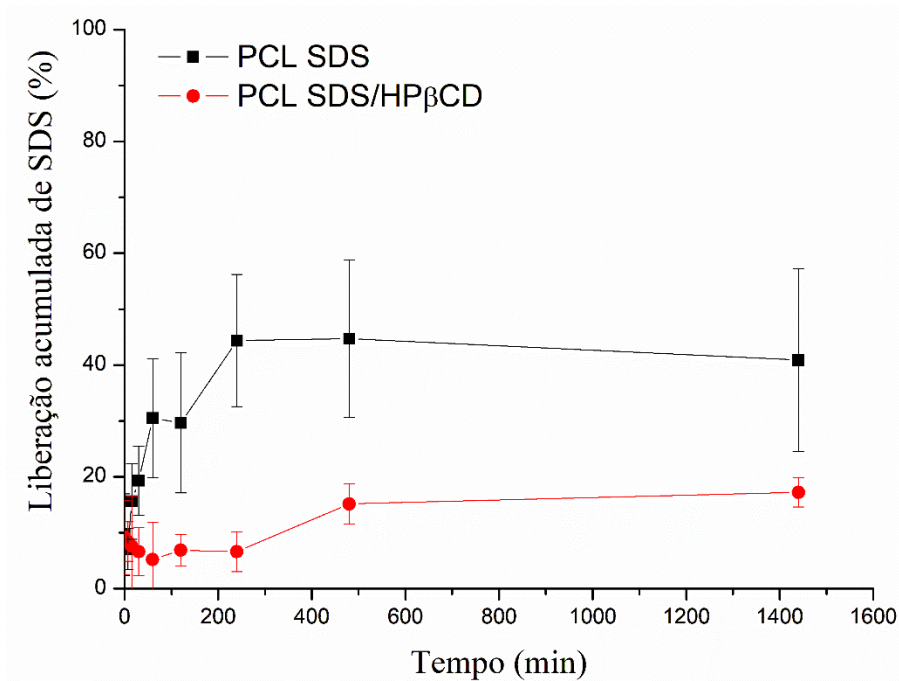


Figura 3 19 - Curva de média da massa acumulada por tempo para as fibras PCL SDS e PCL SDS/HPβCD no ensaio de liberação *in vitro*.

As fibras de PCL apresentam resultados inferiores quando comparadas as outras, pois as extrações apresentam erros maiores e a liberação da PCL SDS também apresenta um valor de erro que pode inviabilizar a aplicação desse sistema. A fibra PCL SDS/HPβCD apresenta um perfil de liberação acumulada diferente das demais e como a extração não condiz com o esperado, esse sistema se torna inviável para aplicação. Esses fatos podem ser justificados pelo efeito matriz apresentado pelo sistema polimérico que pode ser observado nas extrações e também pela menor variação dos diâmetros das fibras e de PVA, quando comparados aos outros sistemas poliméricos apresentados.

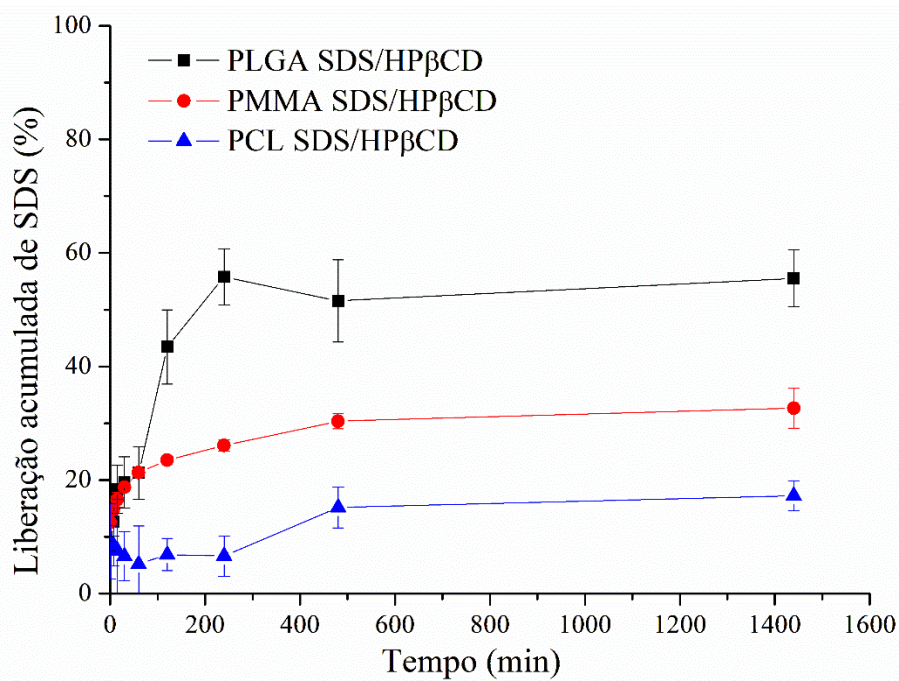


Figura 3 20 – Média das massas acumuladas para membranas poliméricas com presença de sulfadiazina e HPβCD.

Analisando separadamente os grupos com a presença de HPβCD, observa-se que todas as fibras desse sistema liberam mais do que quando se compara as fibras sem a presença dessa molécula. Esse fato se deve a possibilidade de formação do composto de inclusão entre a HPβCD e a sulfadiazina de sódio. Já é relatado em literatura que a formação do composto de inclusão interfere diretamente na liberação, pois o fármaco pode ficar melhor disponível para o sistema e normalmente a inserção das ciclodextrinas em sistemas diminui o efeito de liberação rápida nos minutos iniciais da liberação (PACZKOWSKA-WALENDOWSKA; MIKLASZEWSKI; CIELECKA-PIONTEK, 2022).

Fazendo um comparativo entre todas as fibras obtidas, nota-se que a amostra PLGA SDS/HPβCD é a que apresenta maior liberação, quando se compara com as demais, o que corrobora com os valores obtidos para a permeabilidade ao vapor de água, visto que quanto maior esse valor de permeabilidade, menor é sua propriedade de barreira, se tornando um material promissor para a utilização em curativos transdérmicos.

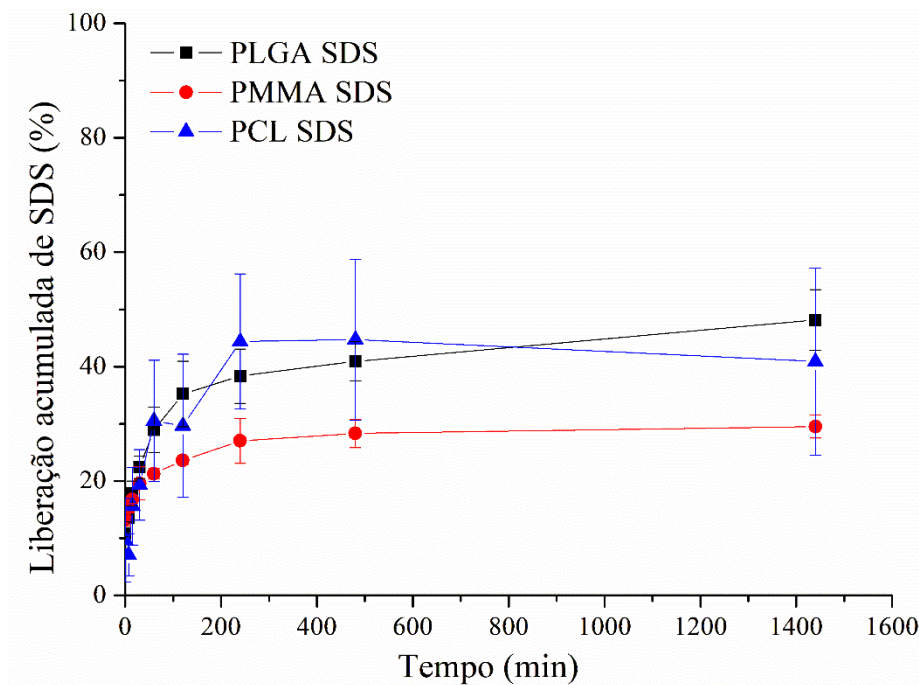


Figura 3 21 - Média das massas acumuladas para as membranas poliméricas com presença de sulfadiazina.

Para avaliar o mecanismo de liberação da SDS para todas as fibras carregadas com o fármaco investigadas, os dados experimentais foram ajustados a vários modelos cinéticos, como Primeira Ordem, Higuchi, Peppas, Weibull, Ordem Zero, Hixon e Crowell (Tabela 3.4). Os resultados foram melhor ajustados ao modelo Peppas, com exceção da fibra PCL SDS/ HP β CD, uma vez que essa apresentou um valor mais elevado para r^2 para o modelo de primeira ordem. Entretanto como a série polimérica do PCL apresentou um comportamento diferente para o sistema de extração e para o sistema de liberação, portanto não se pode afirmar que esses modelos observados para essas duas membranas poliméricas que compõe a série são realmente os mais adequados. Os valores de n , que são utilizados para caracterizar diferentes mecanismos de liberação, foram calculados e para todos os materiais testados os valores foram menores que 0,5. Esse resultado indica um mecanismo de difusão Pseudo-Fickniano. Nesse modelo, as curvas de sorção assemelham-se às curvas do modelo Fickiano, mas a aproximação ao equilíbrio final é muito lenta e pelo fluxo disperso da concentração ao longo da matriz polimérica. Verificou-se que a presença de HPBCD resultou em um aumento nos valores de k das fibras, o que sustenta a redução do diâmetro e sua maior permeabilidade, isso ocorre porque uma área superficial maior

pode aprimorar a liberação do fármaco, o que conseqüentemente aumenta o coeficiente de difusão. O modelo de Peppas apresentou um sistema de liberação dividido em duas fases, a primeira mais lenta e depois constante.

Tabela 3 4 - Modelos matemáticos e parâmetros de ajuste de curvas para os perfis de liberação SDS.

Modelo	PCL SDS	PCL	PMMA SDS	PMMA	PLGA SDS	PLGA
Matemático	SDS/HPβCD		SDS/HPβCD		SDS/HPβCD	
Primeira	$r^2= 0,6096$	$r^2= 0,8552$	$r^2= 0,73538$	$r^2= 0,81552$	$r^2= 0,8017$	$r^2= 0,69909$
Ordem	$k= 2,65 \times 10^{-4}$	$k= 8,59 \times 10^{-5}$	$k= 1,19 \times 10^{-4}$	$k= 1,57 \times 10^{-4}$	$k= 3,21 \times 10^{-4}$	$k= 4,54 \times 10^{-4}$
Higuchi	$r^2= 0,79729$	$r^2= 0,7954$	$r^2= 0,90869$	$r^2= 0,84889$	$r^2= 0,8900$	$r^2= 0,93762$
	$k= 0,97635$	$k= 0,27639$	$k= 0,9949$	$k= 1,38004$	$k= 0,4404$	$k= 0,54395$
Peppas	$r^2= 0,9041$	$r^2= 0,4202$	$r^2= 0,98431$	$r^2= 0,99152$	$r^2= 0,9809$	$r^2= 0,96003$
	$k= 2,8178$	$k= 2,2612$	$k= 2,0659$	$k= 2,13879$	$k= 2,2780$	$k= 2,53661$
	$n= 0,30937$	$n= 0,38573$	$n= 0,12519$	$n= 0,1434$	$n= 0,2284$	$n= 0,29938$
Weibull	$r^2= 0,89769$	$r^2= 0,51831$	$r^2= 0,97514$	$r^2= 0,98698$	$r^2= 0,9647$	$r^2= 0,94162$
	$k= 1,408$	$k= 1,0328$	$k= 1,14401$	$k= 1,21074$	$k= 1,2318$	$k= 1,25716$
	$b= 0,38799$	$b= 0,10828$	$b= 0,14666$	$b= 0,16879$	$b= 0,2656$	$b= 0,34723$
Ordem Zero	$r^2= 0,59441$	$r^2= 0,84864$	$r^2= 0,62801$	$r^2= 0,75976$	$r^2= 0,7506$	$r^2= 0,75075$
	$k= 0,0251$	$k= 0,00963$	$k= 0,01152$	$k= 0,02805$	$k= 0,0365$	$k= 0,0391$
Hixson	$r^2= 0,5137$	$r^2= 0,84438$	$r^2= 0,68232$	$r^2= 0,77983$	$r^2= 0,7598$	$r^2= 0,61984$
Crowell	$k= 0,01475$	$k= 0,0078$	$k= 0,00828$	$k= 0,01141$	$k= 0,0212$	$k= 0,02826$

3.5 Avaliação da viabilidade celular (citotoxicidade)

O ensaio de viabilidade celular para as fibras teve como objetivo, avaliar se as membranas poliméricas com e sem a presença de SDS ou SDS/HPβCD, apresentavam toxicidade celular. Já é relatado em que os polímeros PCL, PMMA e PLGA não apresentam toxicidade celular, sendo considerados polímeros biocompatíveis (ELMOWAFY; TIBONI; SOLIMAN, 2019; SIMÕES et al., 2019). Para determinação da viabilidade celular, utilizou-se o ensaio de MTT, que consiste em avaliar a atividade metabólica das células. Essa atividade é medida verificando-se a ação das

enzimas mitocondriais desidrogenases que podem reduzir o sal MTT a sua forma insolúvel, denominada sal de formazan, que possui coloração púrpura, se tornando um marcador da presença de células vivas nos poços das placas. Como o sal não é solúvel, as células necessitam sofrer uma quebra para que a quantificação do sal seja realizada, indicando indiretamente a presença das células vivas no meio.

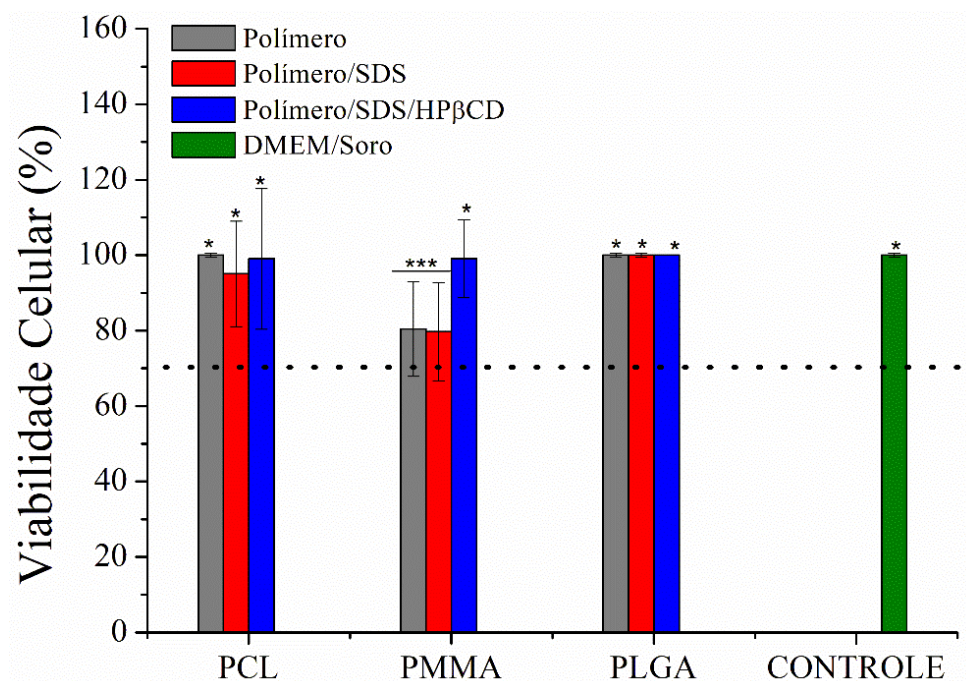


Figura 3.22 - Gráfico do percentual de viabilidade celular para as fibras de PCL, PMMA e PLGA com a presença de SDS ou SDS/HPβCD. A análise estatística foi avaliada por meio de ANOVA unidirecional, seguida pelo Teste de Comparação Múltipla de Tukey. O asterisco (*) indica que os dados foram divididos em grupos usando o pós-teste de Tukey, e foram observadas diferenças estatisticamente significativas com $p < 0,0001$.

Conforme apresentado na Figura 3.22, pode-se constatar que os materiais não apresentaram citotoxicidade. Pode-se notar que a disponibilidade de células é comparável entre PMMA SDS/HPβCD e o grupo de controle. Além disso, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas em relação a todos os sistemas PLGA e PCL quando comparados entre si e com o controle. Para o sistema PMMA, observa-se diferença significativa quando se compara às fibras do polímero e do sistema PMMA SDS com o controle. Já para a membrana PMMA SDS/HPβCD,

não se observou diferença significativa quando feita a comparação com o controle. De acordo com a ISO 10993-5, a viabilidade celular deve ser superior a 70 % para que os materiais/dispositivos médicos testados sejam considerados atóxicos. É importante ressaltar que outros estudos, incluindo estudos *in vivo* devem ser realizados para a comprovação que determinado composto químico/material é biocompatível com o tecido para o qual foi delineado. Estudos já demonstraram a viabilidade de se incorporar o fármaco sulfadiazina em membranas poliméricas, conforme foi observado por Nejaddehbashi e colaboradores (2020), que desenvolveram uma membrana de PCL eletrofiada, com sulfadiazina de prata incorporada e essa membrana apresentou melhor viabilidade celular quando comparada a membrana de polímero. O aumento da viabilidade foi atribuído a presença das moléculas de sulfadiazina nas membranas.

Ainda de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a dosagem de sulfadiazina permitida para adultos e administrada via oral é de 1 a 2 gramas por dia. Como para este trabalho foram utilizadas quantidades menores de que esse valor, espera-se que a viabilidade celular apresentada seja com valores que viabilizam a utilização do material, corroborando com os valores obtidos apresentados acima (ANVISA, 2007).

Conforme relatado em literatura o PLGA já é utilizado em formulações que mostram melhoria na viabilidade celular, sendo considerado como um polímero padrão ouro para liberação de fármacos (ALBERT et al., 2018; CHENG et al., 2008; CHIU et al., 2021; STROMBERG et al., 2021). Pode-se observar que o PLGA é o melhor sistema entre os três disponíveis, pois além de apresentar sempre valores próximos a 100 % e o desvio padrão atribuído a ele é menor que os sistemas com os polímeros PMMA e PCL.

3.6 Teste de ranhura (avaliação da cicatrização *in vitro*)

A percentagem de migração celular foi investigada a fim de quantificar o fechamento da arranhadura. Visualmente pode-se observar que os 3 sistemas poliméricos não interferem na migração celular, entretanto com a adição do fármaco SDS e do sistema SDS/HP β CD a migração celular é ainda maior. As micrografias dos sistemas poliméricos de PCL, PMMA e PLGA, bem como as do controle, são apresentadas nas Figuras 3.23, 3.24 e 3.25, respectivamente.

Já é relatado em literatura que a montagem de sistemas de liberação a partir de membranas poliméricas obtidas por eletrofição, podem favorecer a migração celular e a consequente

cicatrização das feridas, visto que esses sistemas podem deixar o fármaco mais disponível para o meio (BI et al., 2020; SALEHI et al., 2020).

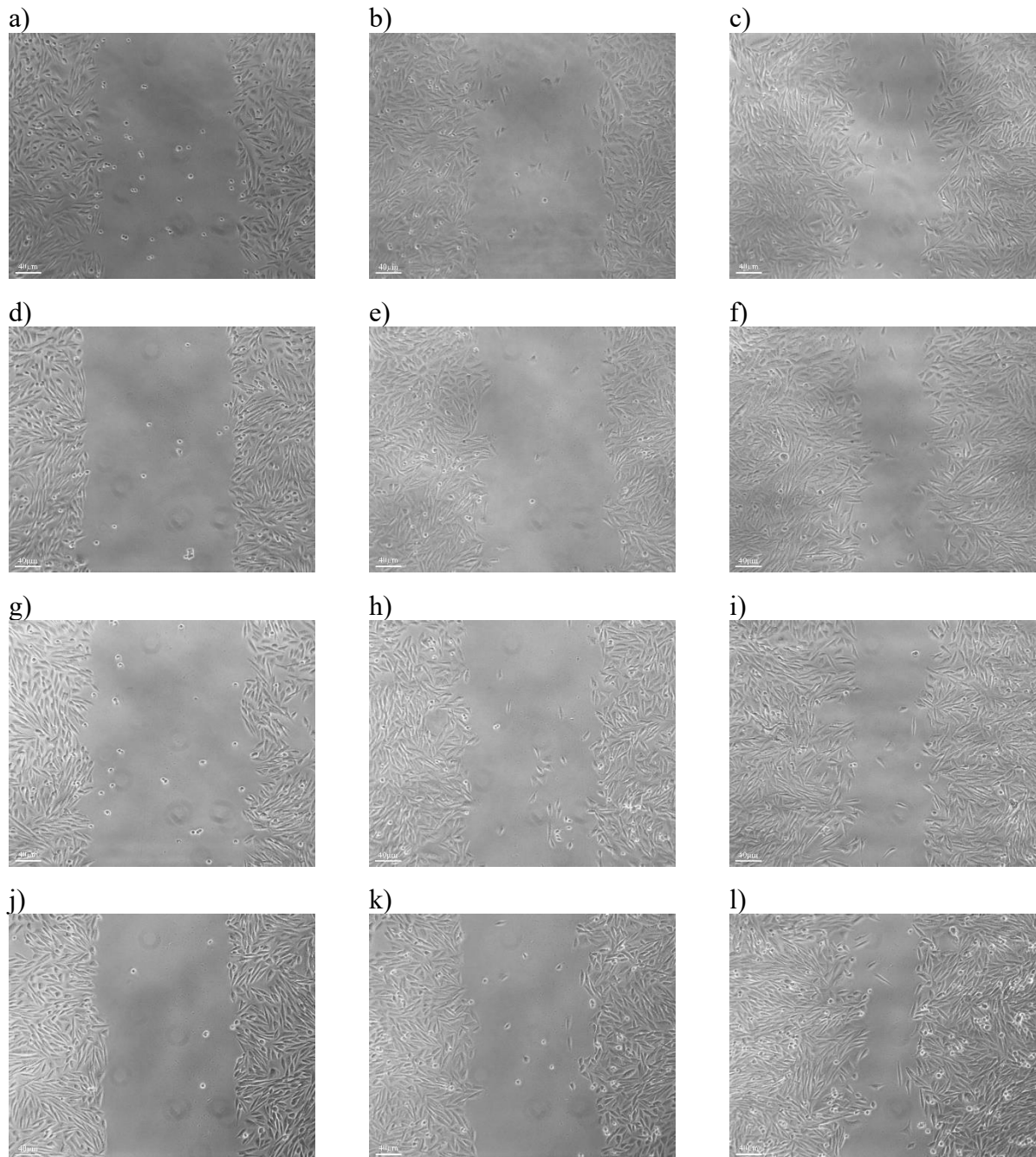


Figura 3.23 - Micrografias de uma pseudo-ferida criada em uma monocamada de fibroblastos, às 0 hora (coluna da esquerda), às 10 horas (coluna do meio) e às 24 horas (coluna da direita). As

pseudo-feridas foram tratadas com (a-c) PCL, (d-f) PCL SDS, (g-i) PCL SDS/HP β CD e (j-l) grupo controle.

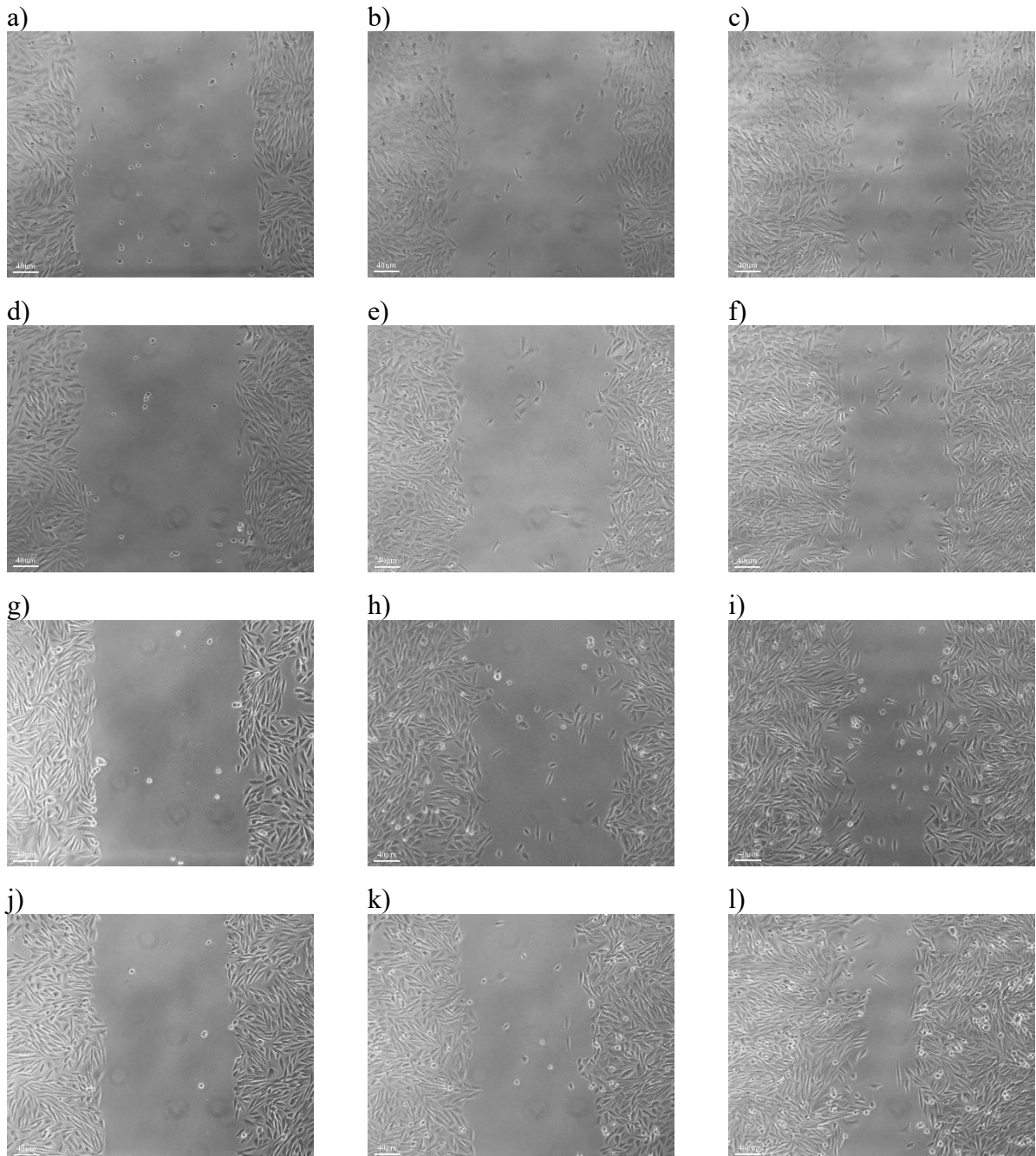


Figura 3.24 - Micrografias de uma pseudo-ferida criada em uma monocamada de fibroblastos, às 0 hora (coluna da esquerda), às 10 horas (coluna do meio) e às 24 horas (coluna da direita). As

pseudo-feridas foram tratadas com (a-c) PMMA, (d-f) PMMA SDS, (g-i) PMMA SDS/HP β CD e (j-l) grupo controle.

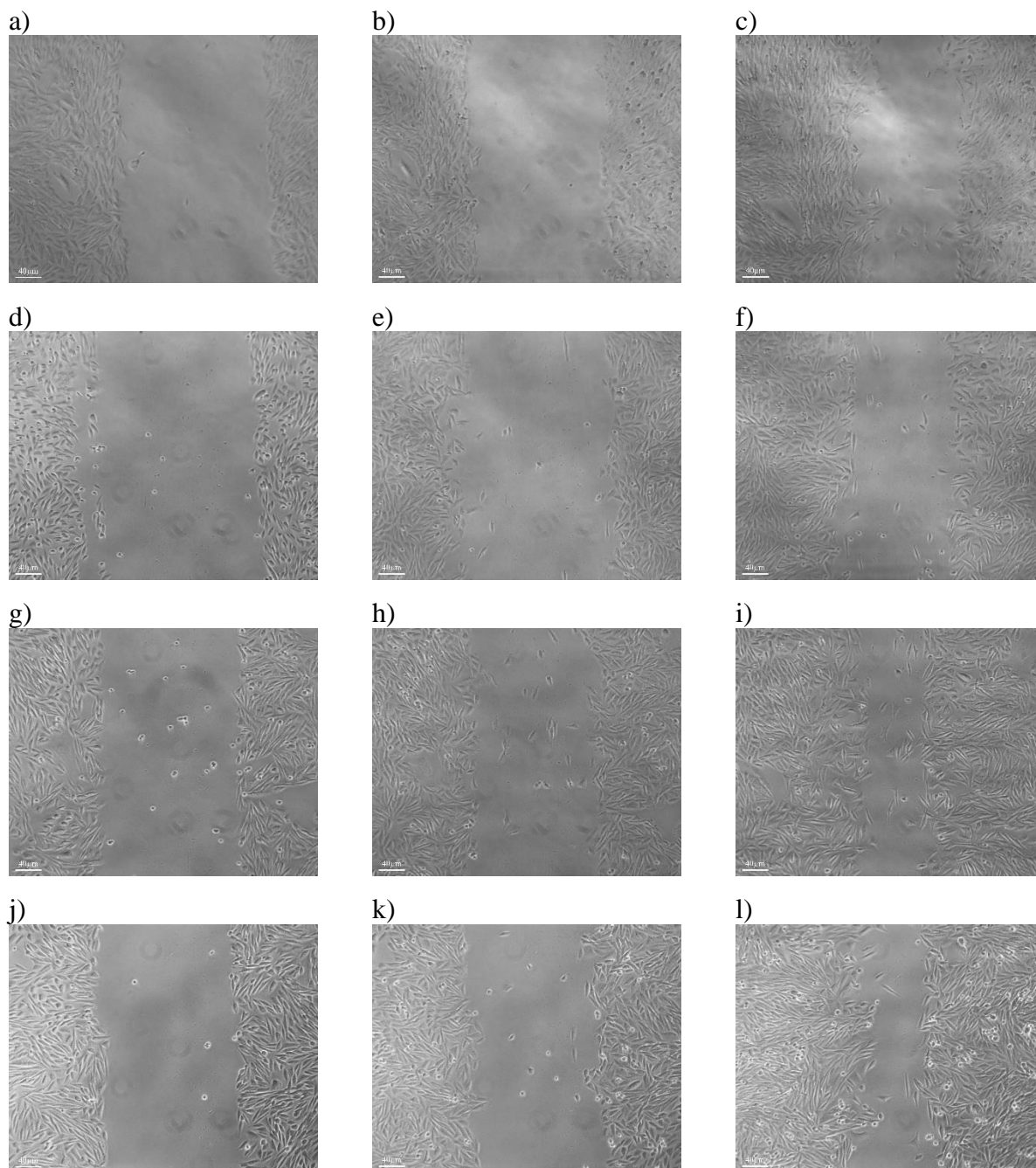


Figura 3.25 - Micrografias de uma pseudo-ferida criada em uma monocamada de fibroblastos, às 0 hora (coluna da esquerda), às 10 horas (coluna do meio) e às 24 horas (coluna da direita). As

pseudo-feridas foram tratadas com (a-c) PLGA, (d-f) PLGA SDS, (g-i) PLGA SDS/HP β CD e (j-l) grupo controle.

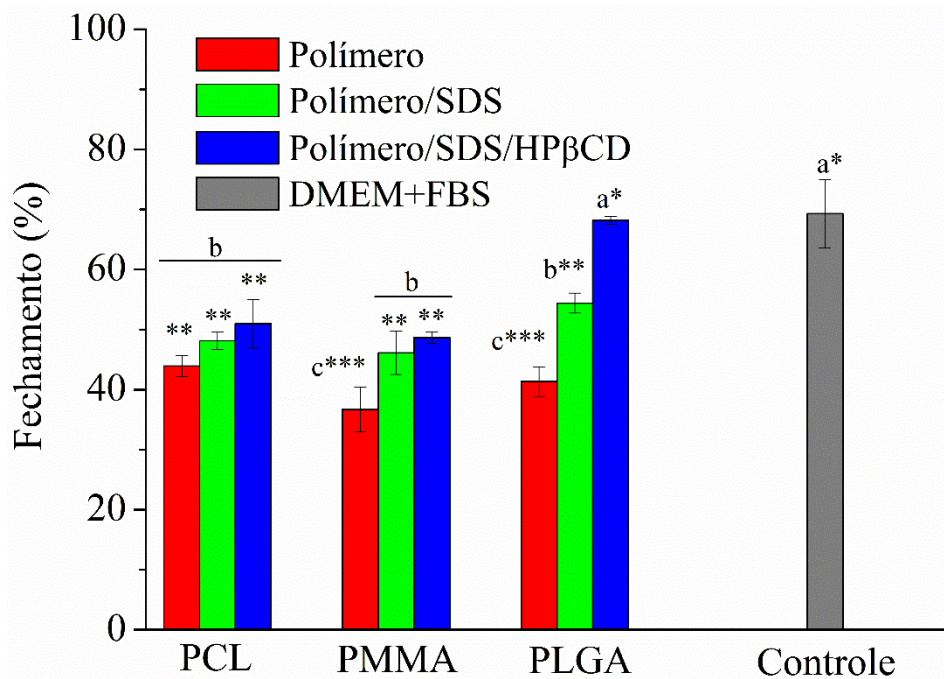


Figura 3.26 - Porcentagem de fechamento da pseudo-ferida para os sistemas de fibras PCL, PMMA e PLGA. A análise estatística foi avaliada por meio de ANOVA unidirecional, seguida pelo Teste de Comparação Múltipla de Tukey. O asterisco (*) indica que os dados foram divididos em grupos usando o pós-teste de Tukey, e foram observadas diferenças estatisticamente significativas com * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

A Figura 3.26 apresenta a taxa de fechamento da ferida após 24 horas usando todos os materiais eletrofiados. Foi observado que a presença do fármaco SDS acelerou a migração celular nos sistemas poliméricos PCL, PMMA e PLGA em comparação com as fibras contendo somente os polímeros. Além disso, a migração celular foi maior nos sistemas que continham o sistema supramolecular, especialmente no PLGA SDS/HP β CD, em comparação com o grupo controle (cerca de 68 %). Esse resultado é apoiado pelos maiores valores de permeabilidade desses sistemas e pelos maiores valores de liberação do fármaco quando comparado aos outros sistemas. A

membrana PLGA SDS/HP β CD, foi a única a não apresentar diferença significativa com o grupo controle, demonstrando ser o melhor sistema polimérico dentre os estudados.

3.7 Halo de inibição

A fim de verificar a sensibilidade das bactérias aos materiais em estudo, realizou-se o teste de antibiograma em disco de ágar, por meio de difusão. Entre os materiais examinados, não se observou a formação do halo em nenhuma fibra, identificando a formação de um halo menor que do CHX para a membrana PLGA SDS, para as bactérias *E. coli* e *S. aureus*. Já a membrana PLGA SDS/HP β CD apresentou um halo de inibição igual ou maior do que o controle positivo (CHX) tanto para *E. coli* quanto para *S. aureus*, conforme apresentado na Figura 3.27.

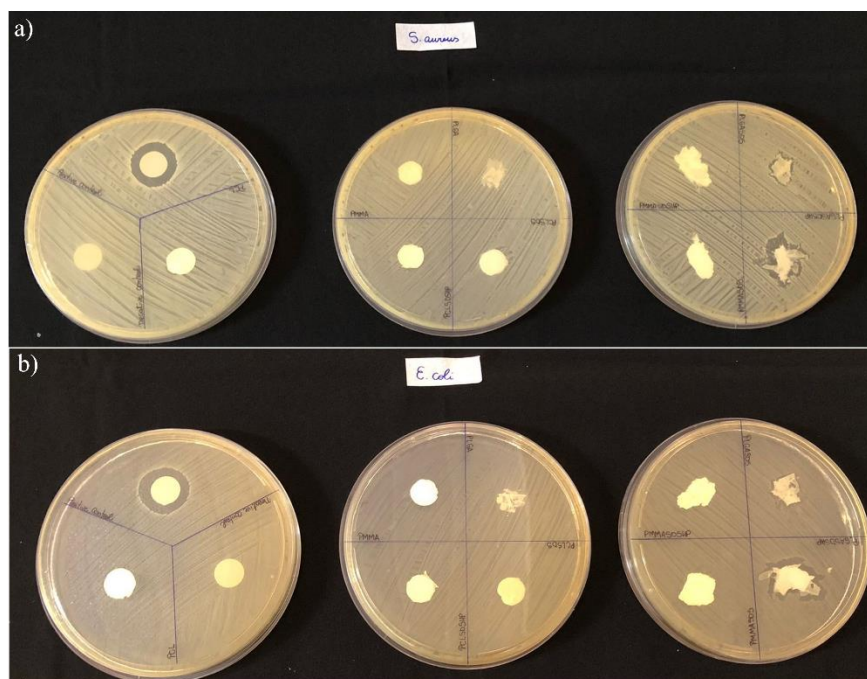


Figura 3.27 - Análise visual do halo de inibição microbiano para o ensaio de difusão em ágar de dupla camada para: a) *Staphylococcus aureus* e b) *Escherichia coli*.

Vale ressaltar que o método do halo de inibição é considerado semiquantitativo, e o tamanho do halo não está diretamente relacionado à atividade antimicrobiana (GIRONDI et al., 2017). Os valores obtidos para os halos de inibição estão apresentados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 - Halo de Inibição (mm) dos materiais testados.

Grupos	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Controle Negativo	0	0
CHX	0,5	0,5
PMMA	0	0
PLGA	0	0
PCL	0	0
PMMA SDS	0	0
PMMA SDS/HPβCD	0	0
PCL SDS	0	0
PLGA SDS	0,2	0,3
PLGA SDS/HPβCD	0,7	0,5
PCL SDS/HPβCD	0	0

Levando em consideração as características únicas dos materiais em avaliação, torna-se necessário avaliar todos os grupos com base em sua capacidade de inibir a formação de biofilme.

3.8 Teste de atividade antibacteriana (Biofilme)

A fim de demonstrar se os materiais diminuem a carga microbiana, impedindo a proliferação das unidades formadoras de colônia, foram realizados testes de atividade antibacteriana nas membranas poliméricas estudadas.

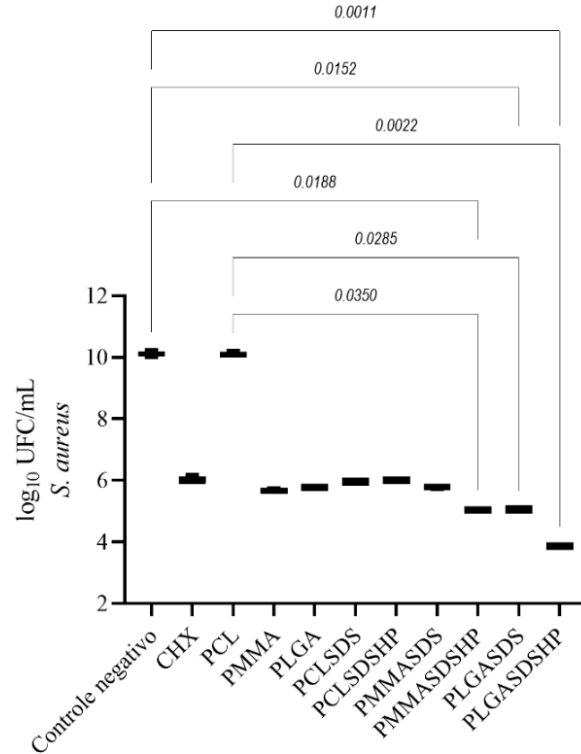


Figura 3.28 - Gráfico de mediana com valores mínimos/máximos ilustrando os resultados significativos do teste de múltiplas comparações de Dunn para biofilme de *S. aureus*.

Para biofilmes de *S. aureus*, Figura 3.28, todas as membranas poliméricas apresentaram atividade antimicrobiana, com exceção as fibras contendo somente PCL, porém o menor valor de carga microbiana foi observado no grupo PLGA SDS/HP β CD. Além do grupo citado anteriormente, os grupos PLGA SDS e PMMA SDS/HP β CD também mostraram diferenças estatisticamente significativas em comparação com o grupo controle negativo, porém apresentando valores superiores de carga microbiana, quando comparado ao PLGA SDS/HP β CD.

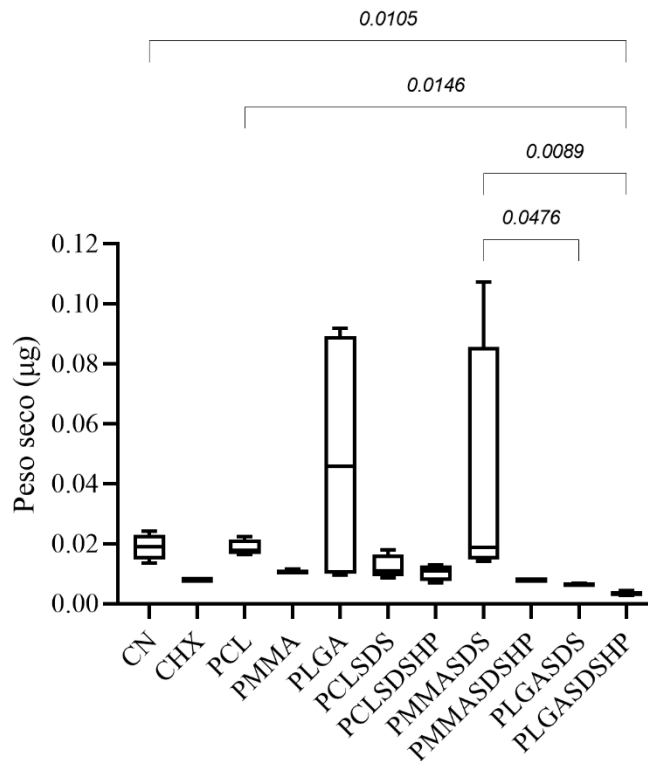


Figura 3.29 - Gráfico de mediana com valores mínimos/máximos ilustrando os resultados significativos do teste de múltiplas comparações de Dunn para análise de peso seco de biofilme de *S. aureus*.

Para o peso seco, apresentado na Figura 3.29, o grupo PLGA SDS/HP β CD apresentou diferença estatisticamente significativa em comparação com o controle negativo. Não houve diferenças significativas entre esse grupo e o controle positivo (CHX), demonstrando que esse material pode ser promissor na utilização desse material na mortalidade das bactérias *S. Aureus*. O PCL foi o único a apresentar resultados semelhantes ao controle negativo, enquanto os polímeros carregados com SDS e o sistema supramolecular SDS/HP β CD, apresentam valores que são inferiores ao controle negativo, porém são maiores que o controle positivo. Já o PMMA SDS, apresentou diferenças significativas em relação aos grupos PLGA SDS e PLGA SDS/HP β CD, o que pode estar atrelado a maior liberação do fármaco apresentada pelo sistema PLGA.

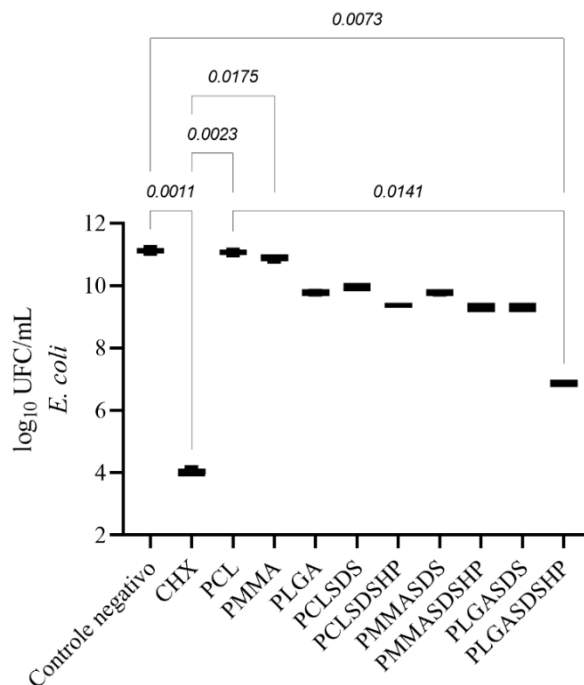


Figura 3.30 - Gráfico de mediana com valores mínimos/máximos ilustrando os resultados significativos do teste de múltiplas comparações de Dunn para biofilme de *E. coli*.

Para biofilmes de *E. coli*, Figura 3.30, as membranas poliméricas testadas apresentaram atividade antimicrobiana, com exceção as fibras contendo somente PCL e PMMA. Comparando as membranas que apresentaram atividade, a que obteve os menores valores de carga microbiana, foi a PLGA SDS/HP β CD, que não apresentou diferença estatisticamente significativa em comparação com o controle positivo (CHX), apesar de ter valores superiores aos desse controle. Ambos os grupos demonstraram diferença estatisticamente significativa quando comparados ao grupo controle negativo.

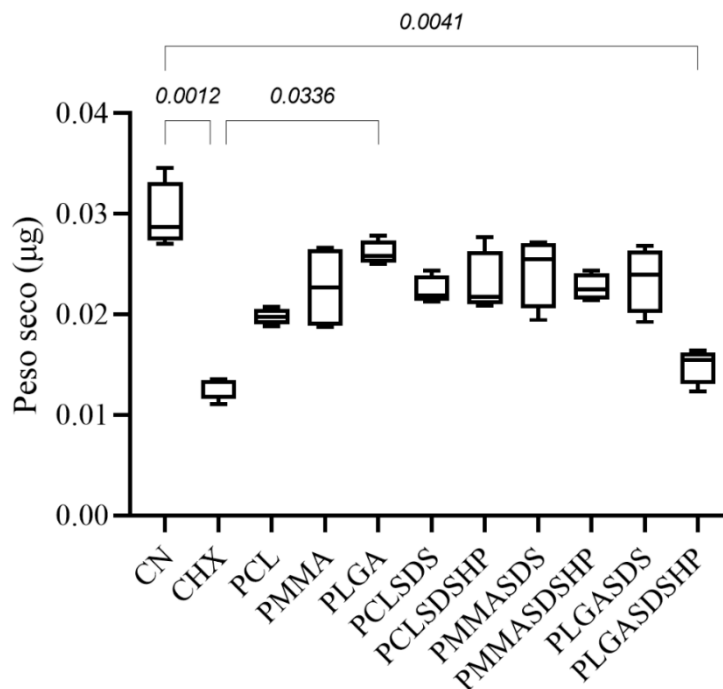


Figura 3.31 - Gráfico de mediana com valores mínimos/máximos ilustrando os resultados significativos do teste de múltiplas comparações de Dunn para análise de peso seco de biofilme de *E. coli*.

Para a análise de peso seco, Figura 3.31, novamente o material que apresentou melhores resultados, foi o PLGA SDS/HP β CD, obtendo-se resultados semelhantes e não apresentando diferença significativa quando comparado ao controle positivo (CHX). Assim como ocorreu para grupo controle positivo, a membrana PLGA SDS/HP β CD apresentou diferença estatisticamente significativa ao grupo controle negativo.

Conforme evidenciado nas figuras mencionadas anteriormente, os polímeros em si já apresentavam atividade antibiofilme, que é a capacidade de inibir a formação do biofilme, formado pelo aglomerado das bactérias supracitadas, no entanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as fibras de polímero e o grupo de controle. É possível que esses resultados apresentados pelos sistemas contendo somente os polímeros estejam mais relacionados à inibição da adesão bacteriana do que à própria atividade antimicrobiana, enquanto as reduções nos grupos de SDS podem ser atribuídas à atividade antimicrobiana do SDS e à inibição da adesão. A maior atividade antibiofilme observada no grupo PLGA SDS/HP β CD pode ser atribuída à maior liberação cumulativa de SDS em comparação com os outros grupos, assim

como à maior permeabilidade ao vapor de água observado para esse grupo, o que pode indicar a presença de complexos solúveis na superfície da fibra. O desempenho inferior dos grupos que não contêm o sistema supramolecular SDS/HP β CD em comparação aos outros grupos que contêm o fármaco pode ser explicado pela menor liberação de SDS para o meio.

A importância do desempenho comparável dos sistemas em relação à CHX é destacada, pois se está comparando um medicamento solúvel e amplamente disponível, com um sistema de liberação controlada que alcançou um máximo de 56 % de liberação de SDS. Isso ressalta a eficácia da metodologia utilizada para preparar as fibras eletrofiadas. Em geral, os resultados indicam que os materiais desenvolvidos, especialmente o PLGA SDS/HP β CD, têm potencial para serem utilizados no tratamento de infecções cutâneas.

CAPÍTULO 4
CONCLUSÕES

4 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que a metodologia proposta para obtenção das fibras por eletrofiação foi realizada com êxito, comprovada pela técnica de microscopia eletrônica de varredura. Com a inserção do fármaco e da HP β CD observa-se uma variação nos valores de diâmetro, o que demonstra a influência dessas moléculas na morfologia das fibras. De maneira mais específica também pode-se provar a diminuição dos valores de ângulo de contato, indicando que essa alteração deixa o material mais hidrofílico, quando se comparado ao sistema polimérico e esse fato é atribuído a inserção das moléculas solúveis em água, HP β CD e do fármaco sulfadiazina de sódio no sistema.

Nos testes de permeabilidade ao vapor de água foi observado um aumento da vulnerabilidade da membrana polimérica, com a adição do fármaco e da HP β CD. A inserção dessas moléculas hidrofílicas, acarretou a diminuição das propriedades de barreira das membranas poliméricas, quando comparadas com as membranas de polímeros somente. Foram realizados testes de extração, a fim de verificar a uniformidade da distribuição do fármaco nas membranas poliméricas e a taxa de carregamento do material, os resultados sugeriram que a distribuição do fármaco na membrana polimérica pode não estar uniforme, podendo estar mais concentrado em determinadas regiões da membrana.

Também foram realizados testes de liberação utilizando a metodologia de célula de Franz, técnica promissora na demonstração da efetividade do fármaco ser liberado da membrana em que está inserido. Esses testes demonstram a existência de uma liberação controlada dentro das 24 h de contato das membranas de PMMA e PLGA com a presença de SDS e do sistema SDS/HP β CD com a solução. Já as membranas de PCL quando na presença de SDS e do sistema SDS/HP β CD está em contato com a solução, os resultados obtidos estão inferiores ao esperado, apresentando um perfil inadequado de liberação, evidenciando que o sistema pode ser inviável para utilizações futuras a níveis biológicos.

Para todos os materiais também foi feito o ensaio de viabilidade celular e os testes apresentaram resultados que mostram que todas as fibras não foram consideradas tóxicas, e assim, sendo promissoras em outros testes biológicos. Após feito o ensaio de viabilidade celular, foi feito o teste de ranhura, técnica promissora para a substituição de testes em animais, que demonstra a

possibilidade do material em contribuir para a proliferação dos fibroblastos, simulando uma possível cicatrização. Os resultados demonstram que os sistemas que contêm especialmente os sistemas supramoleculares SDS/HP β CD, aceleram o processo de proliferação celular, quando comparados ao polímero livre ou carregado somente com SDS. Dentre todos os materiais, o que teve maiores valores foi a membrana PLGA SDS/HP β CD, que apresentou resultado semelhante ao controle.

A fim de demonstrar se os materiais apresentavam atividades antimicrobianas, foram realizados testes de halo de inibição e de atividade antibacteriana. Para o halo de inibição, tanto para a bactéria *S. Aureus*, quanto para as *E. Colli* somente duas membranas poliméricas apresentaram atividade, que foram a PLGA SDS e PLGA SDS/HP β CD, o que pode estar diretamente atrelado a maiores porcentagens de liberação. Sequencialmente foi realizado o teste de atividade antibacteriana e foi observado que as membranas poliméricas carregadas com fármaco SDS e com o sistema supramolecular SDS/HP β CD foram efetivos para ambas as bactérias supracitadas, destacando-se a membrana PLGA SDS/HP β CD, que novamente apresentou resultados equiparáveis ao controle positivo, demonstrando que a sua utilização pode ser eficaz para o objetivo proposto.

Em suma, os resultados promissores alcançados neste estudo destacam o potencial desses materiais na possibilidade de serem inseridos no tratamento de lesões e infecções cutâneas, destacando-se a fibra PLGA SDS/HP β CD, que apresentou os melhores resultados em todas as análises realizadas. Ao oferecer uma abordagem não invasiva, essas tecnologias podem representar uma alternativa segura e eficiente aos métodos tradicionais de tratamento. Além disso, os dispositivos mostraram-se eficazes no combate a infecções cutâneas, em decorrência da sua capacidade de inibir o crescimento bacteriano e promover a cicatrização acelerada. De maneira geral este estudo fornece informações que são valiosas para o desenvolvimento, aprimoramento e aplicações para estes tipos de dispositivos biomédicos.

CAPÍTULO 5
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMADIAN, S.; GHORBANI, M.; MAHMOODZADEH, F. Silver sulfadiazine-loaded electrospun ethyl cellulose/polylactic acid/collagen nanofibrous mats with antibacterial properties for wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 162, p. 1555–1565, 2020.

AKHGARI, A. et al. Permeability and swelling studies on free films containing inulin in combination with different polymethacrylates aimed for colonic drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 28, n. 4, p. 307–314, 2006.

ALAVI, M.; NOKHODCHI, A. Antimicrobial and wound healing activities of electrospun nanofibers based on functionalized carbohydrates and proteins. **Cellulose**, v. 29, n. 3, p. 1331–1347, 2022.

ALBERT, C. et al. Bare and Sterically Stabilized PLGA Nanoparticles for the Stabilization of Pickering Emulsions. **Langmuir**, v. 34, n. 46, p. 13935–13945, 2018.

ALGANABI, N. J.; RASOOL, S. R. Synthesis and characterization of some new sulfadiazine derivatives. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 10, n. 11, p. 2796–2799, 2018.

ALI, U.; KARIM, K. J. B. A.; BUANG, N. A. A Review of the Properties and Applications of Poly (Methyl Methacrylate) (PMMA). **Polymer Reviews**, v. 55, n. 4, p. 678–705, 2015.

ANVISA. **Antimicrobianos - Bases Teóricas e Uso Clínico. Accessed Aug. 27, 2020.**, 2007. Disponível em: <https://www.anvisa.gov.br/servicosade/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo1/bibliografia.htm#%0Ahttps://www.anvisa.gov.br/servicosade/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo1/macrolideos.htm%0Ahttps://www.anvisa.gov.br/servico>

ATILA, D.; HASIRCI, V.; TEZCANER, A. Coaxial electrospinning of composite mats comprised of core/shell poly(methyl methacrylate)/silk fibroin fibers for tissue engineering applications. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 128, n. 1, 2022.

BAI, Y. et al. Exploration of synthesizing fluorescent silicon nanoparticles and label-free detection of sulfadiazine sodium. **Talanta**, v. 220, n. April, p. 121410, 2020.

BAPTISTA, C. et al. The effect of temperature and pressure on polycaprolactone morphology. **Polymer**, v. 191, p. 122227, 2020.

BERTUZZI, M. A. et al. Water vapor permeability of edible starch based films. **Journal of Food Engineering**, v. 80, n. 3, p. 972–978, 2007.

BI, H. et al. In vitro and in vivo comparison study of electrospun PLA and PLA/PVA/SA fiber membranes for wound healing. **Polymers**, v. 12, n. 4, 1 abr. 2020.

BIANCHI, E. et al. Innovative strategies in tendon tissue engineering. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 1, p. 1–24, 2021.

BRUSCHI, M. L. Mathematical models of drug release. Em: **Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 63–86.

CAPPIELLO, F.; CASCIARO, B.; MANGONI, M. L. A novel in vitro wound healing assay to evaluate cell migration. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2018, n. 133, p. 10–15, 2018.

CELEBIOGLU, A.; UYAR, T. Fast Dissolving Oral Drug Delivery System Based on Electrospun Nanofibrous Webs of Cyclodextrin/Ibuprofen Inclusion Complex Nanofibers. **Molecular Pharmaceutics**, v. 16, n. 10, p. 4387–4398, 2019.

CHEN, L. et al. Conditioned medium-electrospun fiber biomaterials for skin regeneration. **Bioactive Materials**, v. 6, n. 2, p. 361–374, 2021.

CHENG, F. Y. et al. Stabilizer-free poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles for multimodal biomedical probes. **Biomaterials**, v. 29, n. 13, p. 2104–2112, 2008.

CHIU, H. I. et al. Cytotoxicity of targeted PLGA nanoparticles: a systematic review. **RSC Advances**, v. 11, n. 16, p. 9433–9449, 2021.

COSTA, R. G. F. et al. Eletrofiação de polímeros em solução. Parte I: Fundamentação teórica. **Polimeros**, v. 22, n. 2, p. 170–177, 2012.

DA SILVA, P. V. et al. Physical–chemical and antimicrobial activity of sulfadiazine sodium salt with β -cyclodextrin supramolecular systems. **Chemical Papers**, v. 75, n. 8, p. 3881–3890, 2021.

DAGHRERY, A. et al. Electrospinning of dexamethasone/cyclodextrin inclusion complex polymer fibers for dental pulp therapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 191, n. March, p. 111011, 2020.

DAVIS, M. E.; BREWSTER, M. E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: Past, present and future. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 12, p. 1023–1035, 2004.

DELRIVO, A.; ZOPPI, A.; LONGHI, M. R. Interaction of sulfadiazine with cyclodextrins in aqueous solution and solid state. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 3, p. 1980–1988, 14 fev. 2012.

DING, C. et al. Electrospun polylactic acid/sulfadiazine sodium/proteinase nanofibers and their applications in treating frostbite. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 139, n. 9, p. 1–11, 2022a.

DING, C. et al. Electrospun polylactic acid/sulfadiazine sodium/proteinase nanofibers and their applications in treating frostbite. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 139, n. 9, p. 1–11, 2022b.

DODZUIK, H. **Introduction to Supramolecular Chemistry**. New York: [s.n.].

DOGAN, Y. E.; SATILMIS, B.; UYAR, T. Crosslinked PolyCyclodextrin/PolyBenzoxazine electrospun microfibers for selective removal of methylene blue from an aqueous system. **European Polymer Journal**, v. 119, n. August, p. 311–321, 2019.

DOMÍNGUEZ-ROBLES, J. et al. Development of drug loaded cardiovascular prosthesis for thrombosis prevention using 3D printing. **Materials Science and Engineering C**, v. 129, n. July, 2021.

ELMOWAFY, E. M.; TIBONI, M.; SOLIMAN, M. E. **Biocompatibility, biodegradation and biomedical applications of poly(lactic acid)/poly(lactic-co-glycolic acid) micro and nanoparticles**. [s.l.] Springer Singapore, 2019. v. 49

FANG, X.; RENEKER, D. H. DNA fibers by electrospinning. **Journal of Macromolecular Science - Physics**, v. 36, n. 2, p. 169–173, 1997.

FAROKHI, M. et al. Overview of Silk Fibroin Use in Wound Dressings. **Trends in Biotechnology**, v. 36, n. 9, p. 907–922, 2018.

FENTON, O. S. et al. Advances in Biomaterials for Drug Delivery. **Advanced Materials**, v. 30, n. 29, p. 1–29, 2018.

FONTANA, C. R. et al. The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. **Journal of Periodontal Research**, v. 44, n. 6, p. 751–759, dez. 2009.

GIESEY, R. L. et al. **RESIDENT COMPETITION RESEARCH ARTICLE The Global Burden of Skin and Subcutaneous Disease: A Longitudinal Analysis from the Global Burden of Disease Study From 1990-2017**SKIN March. [s.l: s.n.].

GIRONDI, C. M. et al. **Screening of plants with antimicrobial activity against enterobacteria, Pseudomonas spp. and Staphylococcus spp.** **Future Microbiology**Future Medicine Ltd., , 1 jun. 2017.

GÖKE, K. et al. Novel strategies for the formulation and processing of poorly water-soluble drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 126, p. 40–56, 2018.

GOUTOS, I. et al. Diabetes mellitus and burns . Part I-basic science and implications for management. **International Journal of Burns and Trauma**, v. 5, n. 1, p. 1–12, 2015.

GREINER, A.; WENDORFF, J. H. Electrospinning: A fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 46, n. 30, p. 5670–5703, 2007.

HAN, G.; CEILLEY, R. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. **Advances in Therapy**, v. 34, n. 3, p. 599–610, 2017.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Biological evaluation of medical devices**Biological evaluation of medical devices. [s.l: s.n.].

IRIE, T.; UEKAMA, K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 86, n. 2, p. 147–162, 1997.

ISO 10993-5. **Tests for in vitro cytotoxicity Biological evaluation of medical devices Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods.** [s.l: s.n.].

JENKINS, L. M.; DONALD, A. M. Contact angle measurements on fibers in the environmental scanning electron microscope. **Langmuir**, v. 15, n. 22, p. 7829–7835, 1999.

JORDAN, M. K. et al. Plasma Pharmacokinetics of Sulfadiazine Administered Twice Daily versus Four Times Daily Are Similar in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 2, p. 635–637, 2004.

KARATEPE, U. Y.; OZDEMIR, T. Improving mechanical and antibacterial properties of PMMA via polyblend electrospinning with silk fibroin and polyethyleneimine towards dental applications. **Bioactive Materials**, v. 5, n. 3, p. 510–515, 2020.

KHAN, A. R. et al. Methods for selective modifications of cyclodextrins. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 5, p. 1977–1996, 1998.

KOBAYASHI, Y. Precise synthesis of polyrotaxane and preparation of supramolecular materials based on its mobility. **Polymer Journal**, v. 53, n. 4, p. 505–513, 2021.

KORSMEYER, R. W.; LUSTIG, S. R.; PEPPAS, N. A. Solute and Penetrant Diffusion in Swellable Polymers. I. Mathematical Modeling. **Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition**, v. 24, p. 395–408, 1986.

LABET, M.; THIELEMANS, W. Synthesis of polycaprolactone: A review. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 12, p. 3484–3504, 2009.

LANGER, R. **Drug delivery and targeting.** **Nature**, 1998.

LEE, A. R. C. et al. Reversal of silver sulfadiazine-impaired wound healing by epidermal growth factor. **Biomaterials**, v. 26, n. 22, p. 4670–4676, 2005.

LIU, L. et al. A review of smart electrospun fibers toward textiles. **Composites Communications**, v. 22, n. August, p. 100506, 2020.

LIU, P. et al. Tissue-engineered skin containing mesenchymal stem cells improves burn wounds. **Artificial Organs**, v. 32, n. 12, p. 925–931, 2008.

LIU, Y. et al. Construction of smart glutathione s-transferase via remote optically controlled supramolecular switches. **ACS Catalysis**, v. 7, n. 10, p. 6979–6983, 2017.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Cyclodextrins as functional excipients: Methods to enhance complexation efficiency. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 9, p. 3019–3032, 2012.

LOFTSSON, T.; DUCHÊNE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, n. 1–2, p. 1–11, 2007.

LU, Y. et al. Properties of Poly (Lactic-co-Glycolic Acid) and Progress of Poly (Lactic-co-Glycolic Acid)-Based Biodegradable Materials in Biomedical Research. **Pharmaceutics**, v. 16, n. 3, p. 454, 17 mar. 2023.

LUO, Y.; SONG, Y. **Mechanism of antimicrobial peptides: Antimicrobial, anti-inflammatory and antibiofilm activities.** **International Journal of Molecular Sciences** MDPI, , 1 nov. 2021.

LUONG-VAN, E. et al. Controlled release of heparin from poly(ϵ -caprolactone) electrospun fibers. **Biomaterials**, v. 27, n. 9, p. 2042–2050, 2006.

MANO, E.; MENDES, L. C. **Introdução a Polímeros.** [s.l: s.n.].

MANSOUR, A. M.; RADACKI, K. Experimental and DFT studies of sulfadiazine “piano-stool” Ru(ii) and Rh(iii) complexes. **RSC Advances**, v. 10, n. 18, p. 10673–10680, 2020.

MARTINS, J. P.; SANTOS, H. A. Oral drug delivery: Overview. Em: **Nanotechnology for Oral Drug Delivery.** [s.l.] Elsevier, 2020. v. 1999p. 517.

MAURYA, H.; KUMAR, S. AN OVERVIEW ON ADVANCE VESICLES FORMULATION AS A DRUG CARRIER FOR N Neuroprotective Potential of Swietenia macrophylla Seed Extract in Lead-induced Neurodegeneration in Albino Rats View project AN OVERVIEW ON ADVANCE VESICLES FORMULATION AS A DRUG CARRIER. n. August, 2018.

MOSMANN, T. Benzimidazole based Pt(II) complexes with better normal cell viability than cisplatin: Synthesis, substitution behavior, cytotoxicity, DNA binding and DFT study. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 80, p. 55–63, 1983.

MUZZALUPO, R. et al. Niosomes containing hydroxyl additives as percutaneous penetration enhancers: Effect on the transdermal delivery of sulfadiazine sodium salt. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 123, p. 207–212, 2014a.

MUZZALUPO, R. et al. Niosomes containing hydroxyl additives as percutaneous penetration enhancers: Effect on the transdermal delivery of sulfadiazine sodium salt. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 123, p. 207–212, 1 nov. 2014b.

NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. **Biodegradable polymers as biomaterials. Progress in Polymer Science (Oxford)**, ago. 2007.

NCCLS.

Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition. **NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]**, 2003.

NEJADDEHBASHI, F. et al. Incorporation of silver sulfadiazine into an electrospun composite of polycaprolactone as an antibacterial scaffold for wound healing in rats. **Cell Journal**, v. 21, n. 4, p. 379–390, 2020.

ODIAN, G. **PRINCIPLES OF POLYMERIZATION**. Fourt Edit ed. Hoboken: [s.n.].

OLIVEIRA, M. F. et al. Electrospun nanofibers of polyCD/PMAA polymers and their potential application as drug delivery system. **Materials Science and Engineering C**, v. 54, p. 252–261, 2015a.

OLIVEIRA, M. F. et al. Electrospun nanofibers of polyCD/PMAA polymers and their potential application as drug delivery system. **Materials Science and Engineering C**, v. 54, p. 252–261, 2015b.

PACZKOWSKA-WALENDOWSKA, M.; MIKLASZEWSKI, A.; CIELECKA-PIONTEK, J. Is It Possible to Improve the Bioavailability of Resveratrol and Polydatin Derived from *Polygoni cuspidati Radix* as a Result of Preparing Electrospun Nanofibers Based on Polyvinylpyrrolidone/Cyclodextrin? **Nutrients**, v. 14, n. 19, 1 out. 2022.

PANAKANTI, R.; NARANG, A. S. Impact of excipient interactions on drug bioavailability from solid dosage forms. **Pharmaceutical Research**, v. 29, n. 10, p. 2639–2659, 2012.

PENG, Y. et al. Electrospun PLGA/SF/artemisinin composite nanofibrous membranes for wound dressing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 183, n. April, p. 68–78, 2021.

PERLOVICH, G. L. et al. Impact of sulfonamide structure on solubility and transfer processes in biologically relevant solvents. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 59, n. 12, p. 4217–4226, 2014.

POORMOHAMMADIAN, S. J.; DARVISHI, P.; DEZFULI, A. M. G. Investigating the structural effect of electrospun nano-fibrous polymeric films on water vapor transmission. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 27, n. 1, p. 100–109, 2019.

PRAJAPATI, S. K. et al. Biodegradable polymers and constructs: A novel approach in drug delivery. **European Polymer Journal**, v. 120, n. August, p. 109191, 2019.

PRAUSNITZ, M. R.; LANGER, R. **Transdermal drug delivery**. **Nature Biotechnology**, nov. 2008.

PUNJATAEWAKUPT, A.; NAPAVIDICHAYANUN, S.; ARAMWIT, P. The downside of antimicrobial agents for wound healing. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 38, n. 1, p. 39–54, 2019.

QIAN, Y. et al. The preosteoblast response of electrospinning PLGA/PCL nanofibers: Effects of biomimetic architecture and collagen I. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 4157–4171, 2016.

RAHMANI, F. et al. **The recent advancement in the PLGA-based thermo-sensitive hydrogel for smart drug delivery**. **International Journal of Pharmaceutics** Elsevier B.V., , 25 jan. 2023.

RAHMATI, M. et al. Designing multigradient biomaterials for skin regeneration. **Materials Today Advances**, v. 5, p. 100051, 2020.

RAMETEKE, K. A. Mathematical Models of Drug Dissolution: A Review. **Scholars Academic Journal of Pharmacy (SAJP)**, v. 3, n. 5, p. 388–396, 2014.

RENEKER, D. H.; CHUN, I. Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. **Nanotechnology**, v. 7, n. 3, p. 216–223, 1996.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. **A SIMPLE EQUATION FOR DESCRIPTION OF SOLUTE RELEASE II. FICKIAN AND ANOMALOUS RELEASE FROM SWELLABLE DEVICES** **Journal of Controlled Release**. [s.l.] Elsevier Science Publishers B.V, 1987.

ROCHA, M. et al. Co(II), Ni(II) and Cu(II) ternary complexes with sulfadiazine and dimethylformamide: Synthesis, spectroscopic characterization, crystallographic study and antibacterial activity. **Journal of Molecular Structure**, v. 1176, p. 605–613, 15 jan. 2019.

SALEHI, M. et al. Porous electrospun poly(ϵ -caprolactone)/gelatin nanofibrous mat containing cinnamon for wound healing application: in vitro and in vivo study. **Biomedical Engineering Letters**, v. 10, n. 1, p. 149–161, 1 fev. 2020.

SCHLESINGER, E.; CIACCIO, N.; DESAI, T. A. Polycaprolactone thin-film drug delivery systems: Empirical and predictive models for device design. **Materials Science and Engineering C**, v. 57, p. 232–239, 2015.

SCHOELLER, J. et al. pH-responsive chitosan/alginate polyelectrolyte complexes on electrospun PLGA nanofibers for controlled drug release. **Nanomaterials**, v. 11, n. 7, 1 jul. 2021.

SHAMS, F. et al. The utility of dermal fibroblasts in treatment of skin disorders: A paradigm of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. **Dermatologic Therapy**, v. 34, n. 4, p. 1–11, 2021.

SHARMA, D.; SATAPATHY, B. K. Physicomechanical performance and encapsulation efficiency of β -cyclodextrin loaded functional electrospun mats based on aliphatic polyesters and their blends. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 32, n. 11, p. 1489–1513, 2021.

SHEN, X. et al. PLGA-Based Drug Delivery Systems for Remotely Triggered Cancer Therapeutic and Diagnostic Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. May, p. 1–19, 2020.

SHPICHKA, A. et al. Skin tissue regeneration for burn injury. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 10, n. 1, p. 1–16, 2019.

SILL, T. J.; VON RECUM, H. A. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. **Biomaterials**, v. 29, n. 13, p. 1989–2006, 2008.

SIMÕES, M. C. R. et al. The potential of electrospun poly(methyl methacrylate)/polycaprolactone core–sheath fibers for drug delivery applications. **Journal of Materials Science**, v. 54, n. 7, p. 5712–5725, 2019.

SKÖLD, O. Sulfonamide resistance: Mechanisms and trends. **Drug Resistance Updates**, v. 3, n. 3, p. 155–160, 2000.

SOUZA, S. O. L. et al. Electrospun poly(ϵ -caprolactone) matrices containing silver sulfadiazine complexed with β -cyclodextrin as a new pharmaceutical dosage form to wound healing: preliminary physicochemical and biological evaluation. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 29, n. 5, 2018.

SOUZA1, S. O. L. et al. Electrospun poly(ϵ -caprolactone) matrices containing silver sulfadiazine complexed with β -cyclodextrin as a new pharmaceutical dosage form to wound healing: preliminary physicochemical and biological evaluation. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, p. 29–67, 2018.

SRINIVASAN, G.; RENEKER, D. H. Structure and morphology of small diameter electrospun aramid fibers. **Polymer International**, v. 36, n. 2, p. 195–201, 1995.

STROMBERG, Z. R. et al. Formulation of stabilizer-free, nontoxic PLGA and elastin-PLGA nanoparticle delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 597, p. 120340, 2021.

STUART, M. A. C. et al. Emerging applications of stimuli-responsive polymer materials. **Nature Materials**, v. 9, n. 2, p. 101–113, 2010.

SZEGEDI, Á. et al. Silver- and sulfadiazine-loaded nanostructured silica materials as potential replacement of silver sulfadiazine. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 37, p. 6283–6292, 7 out. 2014.

SZEJTLI, J. Past, present, and future of cyclodextrin research. **Pure and Applied Chemistry**, v. 76, n. 10, p. 1825–1845, 2004.

TAN, B.; THOMAS, N. L. A review of the water barrier properties of polymer/clay and polymer/graphene nanocomposites. **Journal of Membrane Science**, v. 514, p. 595–612, 2016.

TOTTOLI, E. M. et al. **Skin wound healing process and new emerging technologies for skin wound care and regeneration. Pharmaceutics**MDPI AG, , 1 ago. 2020.

VALENTE, T. et al. Polymer blending or fiber blending: A comparative study using chitosan and poly(ϵ -caprolactone) electrospun fibers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 136, n. 11, p. 1–11, 2019.

WILLYARD, C. The secrets of healing without scars. **Nature**, v. 536, p. S86–S88, 2018.

XIE, Z.; BUSCHLE-DILLER, G. Electrospun Poly(D,L-lactide) fibers for drug delivery: The influence of cosolvent and the mechanism of drug release. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 115, n. 1, p. 1–8, 5 jan. 2010.

XUE, J. et al. Electrospinning and electrospun nanofibers: Methods, materials, and applications. **Chemical Reviews**, v. 119, n. 8, p. 5298–5415, 2019.

YAMASHITA, K.; YASUKAWA, A.; SAWADA, H. Fabrication of cotton fabric with superoleophilic/superhydrophobic characteristic on the modified surface by using fluoroalkylated oligomeric silica/triazine derivative nanocomposites. **Coatings**, v. 10, n. 2, 2020.

YEH, C. J. et al. The effects of artocarpin on wound healing: In vitro and in vivo studies. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.

ZHOU, P. et al. Glutamine- β -cyclodextrin for targeted doxorubicin delivery to triple-negative breast cancer tumors: Via the transporter ASCT2. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 7, n. 35, p. 5363–5375, 2019.