



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA - FEQ

KARINE CAPPUCCIO DE CASTRO

OBTENÇÃO DE NANOFIBRAS ELETROFIADAS BASEADAS EM POLI(ÁLCOOL VINÍLICO) E ÁCIDO HIALURÔNICO PARA APLICAÇÕES NA ÁREA MÉDICA

OBTENTION OF NANOFIBERS BASED ON POLY(VINYL ALCOHOL) AND HYALURONIC ACID VIA ELECTROSPINNING FOR MEDICAL APPLICATIONS

CAMPINAS – SP

2021

KARINE CAPPUCCIO DE CASTRO

**OBTENÇÃO DE NANOFIBRAS ELETROFIADAS BASEADAS EM POLI(ÁLCOOL
VINÍLICO) E ÁCIDO HIALURÔNICO PARA APLICAÇÕES NA ÁREA MÉDICA**

**OBTENTION OF NANOFIBERS BASED ON POLY(VINYL ALCOHOL) AND
HYALURONIC ACID VIA ELECTROSPINNING FOR MEDICAL APPLICATIONS**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutora em Engenharia Química.

Orientadora: Dra. Lucia Helena Innocentini Mei.

Coorientadora: Dra. Maria Gabriela Nogueira Campos.

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA KARINE
CAPPUCCIO DE CASTRO E ORIENTADA PELA
PROFA. DRA. LUCIA HELENA INNOCENTINI MEI.

CAMPINAS – SP

2021

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

C279o Castro, Karine Cappuccio de, 1992-
Obtenção de nanofibras eletrofiadas baseadas em poli(álcool vinílico) e ácido hialurônico para aplicações na área médica / Karine Cappuccio de Castro. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Lucia Helena Innocentini Mei.
Coorientador: Maria Gabriela Nogueira Campos.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Eletrofiação. 2. Ácido hialurônico. 3. Poli (álcool vinílico). 4. Reticulação. 5. Medicamentos fitoterápicos. 6. Liberação controlada de fármacos. 7. Cicatrização de feridas. I. Mei, Lucia Helena Innocentini, 1953-. II. Campos, Maria Gabriela Nogueira, 1979-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Obtention of nanofibers based on poly(vinyl alcohol) and hyaluronic acid via electrospinning for medical application

Palavras-chave em inglês:

Electrospinning
Hyaluronic acid
Poly(vinyl alcohol)
Crosslinking
Herbal Medicines
Controlled drug release
Wound healing

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Doutora em Engenharia Química

Banca examinadora:

Lucia Helena Innocentini Mei [Orientador]

Liliane Maria Ferrareso Lona

Cristina Pontes Vicente

Lizandro Manzato

Rodrigo Lambert Oréfice

Data de defesa: 19-07-2021

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Identificação e Informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-9782-4767>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/0158432112710885>

FOLHA DE APROVAÇÃO

Tese de doutorado defendida por KARINE CAPPUCIO DE CASTRO, aprovado em 19 de julho de 2021, pela banca examinadora constituída pelos professores doutores:

Profa. Dra. Lucia Helena Innocentini Mei – Presidente e Orientadora
(FEQ/UNICAMP)
Videoconferência

Profa. Dra. Liliane Maria Ferrareso Lona
(FEQ/UNICAMP)
Videoconferência

Profa. Dra. Cristina Pontes Vicente
(IB/UNICAMP)
Videoconferência

Prof. Dr. Rodrigo Lambert Oréfice
(DEMET/UFMG)
Videoconferência

Prof. Dr. Lizandro Manzato
(IFAM)
Videoconferência

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

*Aos meus pais, Sibarita Florisbela Altina Cappuccio
e Sergio Henrique de Castro, por me apoiarem
nessa caminhada e pelo amor incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por me permitir chegar até aqui, e mesmo nas circunstâncias tão adversas me permitir concluir este ciclo.

Aos meus pais, Sibarita e Sergio, por nunca me deixarem só na caminhada da vida, vocês tornaram o caminho menos árduo e me deram força para nunca desistir. Ao meu irmão e melhor amigo, Diego, sua torcida e apoio foram e sempre será um estímulo para enfrentar minhas batalhas.

A minha orientadora, Professora Dra. Lucia Helena Innocentini Mei, por acreditar no meu trabalho e me ajudar a conquistar o meu sonho de carreira.

A minha coorientadora, Professora Dra. Maria Gabriela Nogueira Campos, pela amizade e pelos ensinamentos ao longo de toda minha vida acadêmica.

Aos meus amigos e parceiros de laboratório, Carol, Silvia, Anne e Tami, e em especial a Larissa Giorgetti Mendes, uma parceira de pesquisa e uma irmã de alma e coração, sem você o caminho teria sido penoso, só posso dizer obrigada por ter feito parte dessa loucura.

Ao Carlos, pelo companheirismo e apoio, e por sempre acreditar no meu esforço e dedicação.

Ao meu amigo e parceiro de vida, Josiel Martins Costa, pela amizade e por ser esse exemplo de garra e dedicação.

A Maria Nogueira Silva, que foi uma mãe que a Unicamp me presenteou, e tornou todos os dias de trabalho mais leves e prazerosos, obrigada pelo carinho e cuidado para comigo.

A Professora Dra. Cristina Pontes Vicente, do Instituto de Biologia da Unicamp, por todo apoio e suporte na elaboração e desenvolvimento dos ensaios biológicos.

A todos do Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) pelas análises experimentais e por sempre estarem disponíveis para sanar minhas dúvidas.

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

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho, a todos o meu muito OBRIGADA.

*A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre
aquilo que todo mundo vê.*

Arthur Schopenhauer

RESUMO

O uso de materiais nanofibrosos tornou-se interessante devido à sua alta relação superfície/volume, baixo peso, alta permeabilidade e pequeno diâmetro das fibras, que os capacita a atuarem como plataformas bem-sucedidas para a regeneração de tecidos e órgãos danificados. Atualmente, existem várias abordagens para se produzir nanofibras poliméricas reticuladas, sendo a eletrofiação uma delas. Neste trabalho, membranas de nanofibras eletrofiadas baseadas em misturas de Ácido Hialurônico (AH) e Poli(álcool vinílico) (PVA) reticuladas quimicamente, foram carregadas com extrato de Tanchagem (*Plantago major*) (Tan), e sua eficiência testada *in vitro*. A caracterização das membranas obtidas foi feita por um conjunto de técnicas, tais como: Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), para identificar grupos funcionais e confirmar ocorrência de reticulação das nanofibras; análise térmica, por Termogravimetria (TGA) para acompanhar o perfil das perdas de massa e por Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) para verificar eventos térmicos como Tg e Tm; análise morfológica, por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV); análises físico-químicas, para determinação das propriedades da solução de eletrofiação e estabilidade das formulações. Ensaios de estabilidade de armazenamento, de liberação controlada de Tan *in vitro* e de citotoxicidade das membranas também foram feitos, visando aplicação futura *in vivo*. Os resultados mostraram que a eletrofiação ocorreu de forma eficaz, sendo a proporção 75% PVA e 25% AH a que se destacou. A reticulação das nanofibras ocorreu apenas para concentrações de reticulador de 15 e 30%, conforme evidenciado por FTIR e ensaios de intumescimento, favorecendo a estabilidade do jato de eletrofiação e as propriedades térmicas no material final, especialmente para concentração de 30%. Os resultados de liberação *in vitro* foram compatíveis com a literatura, sendo o mecanismo de liberação governado pela difusão. As isotermas de sorção obtidas pelos dados experimentais do estudo da estabilidade de armazenamento foram melhor ajustados pelo modelo de GAB, e indicou que umidades relativas menores favorecem o armazenamento. O princípio ativo (Tanchagem) escolhido, além de favorecer a proliferação e a migração celular, diminuiu efeitos negativos do agente de reticulação não reagido. As membranas não apresentaram citotoxicidade mesmo após o processo de reticulação, indicando um material funcionalizado com grande potencial para futuras aplicações *in vivo*.

Palavras-chave: Eletrofiação, ácido hialurônico, poli(álcool vinílico), reticulação, medicamentos fitoterápicos, liberação controlada de fármaco, cicatrização de feridas.

ABSTRACT

The use of nanofiber materials has become interesting due to its high surface/volume ratio, low weight, high permeability, and small diameter of the fibers, which enables them to act as successful platforms for the regeneration of damaged tissues and organs. Currently, there are several approaches for producing cross-linked polymeric nanofibers, electrospinning being one of them. In this work, electrospun nanofiber membranes based on mixtures of hyaluronic acid (HA) and poly(vinyl alcohol) (PVA) chemically cross-linked, were loaded with plantain extract (*Plantago major*) (Tan), and their efficiency tested *in vitro*. The characterization of the obtained membranes was made by a set of techniques, such as Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (FTIR), to identify functional groups and confirm the occurrence of nanofiber crosslinking; thermal analysis, by Thermogravimetry (TGA), to monitor the profile of mass losses and by Differential Scanning Calorimetry (DSC) to check thermal events such as T_g and T_m; morphological analysis, by Scanning Electron Microscopy (SEM); physical-chemical analyzes, to determine the properties of the electrospinning solution and stability of the formulations. Storage stability tests, controlled release of Tan *in vitro*, and membrane cytotoxicity tests were also carried out, aiming for future application *in vivo*. The results showed that electrospinning occurred effectively, with the proportion 75% PVA and 25% AH being the one that stood out. The crosslinking of the nanofibers occurred only for crosslinker concentrations of 15 and 30%, as evidenced by FTIR and swelling tests, favoring the stability of the electrospinning jet, especially for 30% concentration, as well as the thermal properties. The results of *in vitro* release were compatible with the literature, with the release mechanism being governed by diffusion. The sorption isotherms obtained by experimental data from the storage stability study were better fitted by the GAB model and indicated that lower relative humidity favors storage. The active principle (*Plantago major*) chosen, in addition to favoring cell proliferation and migration, reduced the negative effects of the unreacted crosslinking agent. The membranes did not show cytotoxicity even after the crosslinking process, indicating a functionalized material with great potential for future *in vivo* applications.

Keywords: Electrospinning, hyaluronic acid, poly(vinyl alcohol), crosslinking, herbal medicines, controlled drug release, wound healing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação da abordagem de cada capítulo.	23
Figura 2 – Esquema experimental do processo de eletrofiação.	26
Figura 3 – Estrutura química do Ácido Hialurônico.....	29
Figura 4 – Estrutura química da unidade repetitiva do PVA.	31
Figura 5 – Resumo dos benefícios medicinais e constituintes químicos do <i>Plantago major</i>	32
Figura 6 – Principais método de reticulação utilizados em matrizes poliméricas.	33
Figura 7 – Estrutura química do Irgacure 2959.	35
Figura 8 – Ilustração do mecanismo de Hemostasia.....	36
Figura 9 – Imagens de MEV e distribuição de diâmetro das nanofibras de PVA (10% m/v) e AH (3% m/v) nas proporções: (A) 75PVA/25AH, (B) 50PVA/50AH, (C) 25PVA/75AH.	49
Figura 10 – Imagens de MEV e distribuição de diâmetro de nanofibras de PVA (6% m/v) e AH (2% m/v) nas proporções: (A) 75PVA/25AH, (B) 50PVA/50AH, (C) 25PVA/75AH.	50
Figura 11 – Representação esquemática de possíveis reações de esterificação entre (i) AH e MA, (ii) PVA e MA, (iii) PVA e AH.	56
Figura 12 – Imagens de MEV e distribuição dos diâmetros das nanofibras das membranas de PVA/AH com diferentes concentrações de MA (A) 5%, (B) 15% e (C) 30%.....	60
Figura 13 – Espectros de FTIR das membranas PVA/AH com diferentes concentrações de MA.	61
Figura 14 – Fotos ilustrativas das membranas antes (A) e depois (B) da imersão em solução de PBS 7,4 por 72 horas. Da esquerda para a direita: (I) 0% MA, (II) 5% MA, (III) 15% MA e (IV) 30% MA. (C) Comportamento de intumescimento de membranas 15% MA e 30% MA em 12, 24, 48 e 72 horas.	63
Figura 15 – Imagens de MEV das membranas PVA/AH: Após 48 horas de imersão (A) 15% MA, (B) 30% MA. Após 72 horas de imersão (C) 15% MA e (D) 30% MA.	64
Figura 16 – Imagens de MEV e distribuição de diâmetro das nanofibras de PVA (6% m/v) e AH (2% m/v): (A) 0% MA – 15% Tan, (B) 0% MA – 25% Tan, (C) 15% MA – 15% Tan, (D) 15% MA – 25% Tan, (E) 30% MA – 15% Tan e (F) 30% MA – 25% Tan.....	74
Figura 17 – Espectro de FTIR do extrato de tanchagem (Tan) e das membranas de PVA/AH com extrato de tanchagem: (1) 0%MA - 15%Tan, (2) 0%MA - 25%Tan, (3) 15%MA - 15%Tan, (4) 15%MA - 25%Tan, (5) 30%MA - 15%Tan e (6) 30%MA - 25%Tan.	76

Figura 18 – Comparação entre os resultados do modelo e os dados experimentais (Exp. 1) em termos de (A) tanchagem liberada e (B) concentração de tanchagem na solução.	78
Figura 19 – Comparação entre os resultados do modelo e os dados experimentais (Exp. 2) em termos de (A) tanchagem liberada e (B) concentração de tanchagem na solução.	78
Figura 20 – Alterações macroscópicas das membranas de PVA/AH reticuladas e carregada com 25% de tanchagem em diferentes condições de armazenamento.	84
Figura 21 – Imagens de Microscopia Óptica (MO) das membranas PVA/AH: (A) 0%MA – 25%Tan, (B) 15%MA – 25%Tan e (C) 30%MA – 25%Tan.	85
Figura 22 – Difratogramas das membranas de PVA/AH com diferentes graus de reticulação....	86
Figura 23 – Curvas de TGA e DTG das membranas de PVA/AH com diferentes graus de reticulação e com 25% de tanchagem.	87
Figure 24 – Termogramas DSC de membranas PVA/AH carregadas com 25% de tanchagem e com diferentes concentrações de reticulação. (A) Primeiro aquecimento e (B) Segundo aquecimento..	88
Figura 25 – Isotermas de sorção de água (% Umidade - g água/100g de membrana versus aw) das membranas de PVA/AH com diferentes concentrações de agente reticulante e de temperatura: (A) 10°C, (B) 30°C e (C) 50°C, ajustado através do modelo GAB.	90
Figura 26 – Avaliação da viabilidade celular de células HaCaT após serem cultivadas com as membranas eletrofiadas por um período de 24 h (NS: Diferença não significativa, * Diferença significativa, para $p < 0.05$, ANOVA – Tukey).	99
Figura 27 – Imagens de microscopia de fluorescência do ensaio live (verde)/dead (vermelha) com HaCaT cultivado na superfície das membranas de PVA/AH com e sem extrato de tanchagem (Tan) após 24 horas. (A) 0% MA, (B) 5% MA (C) 15% MA, (D) 30% MA, (E) 0% MA – 25% Tan, (F) 5% MA – 25% Tan, (G) 15% MA – 25% Tan e (H) 30% MA – 25% Tan.	101
Figura 28 – Imagens de migração celular das membranas de PVA/AH com diferentes concentrações de MA e de Tanchagem.	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros de eletrofiação e seus efeitos usuais na morfologia de nanofibras.....	27
Tabela 2 – Principais curativos comerciais utilizados nos hospitais públicos do Brasil, baseados em manuais vinculados ao Ministério da Saúde.....	38
Tabela 3 – Parâmetros das soluções poliméricas para o processo de eletrofiação.....	47
Tabela 4 – Diâmetros médios das nanofibras obtidas no sistema PVA/AH.....	49
Tabela 5 – Diâmetros médios das nanofibras obtidas no sistema PVA/AH.....	51
Tabela 6 – Parâmetros das soluções poliméricas para o processo de eletrofiação de PVA/AH com agente de reticulação MA.....	59
Tabela 7 – Diâmetro médio das nanofibras de PVA/AH após a adição de diferentes concentrações de MA.....	61
Tabela 8 – Parâmetros das soluções poliméricas para o processo de eletrofiação de PVA/AH com adição de tanchagem.....	72
Tabela 9 – Diâmetros médios das nanofibras de PVA/AH carregadas com extrato de tanchagem e reticuladas com diferentes concentrações de MA.....	75
Tabela 10 – Os valores numéricos das constantes de Langmuir e o coeficiente de difusão efetivo do fármaco na membrana para ambos Experimentos 1 e 2.....	77
Tabela 11 – Modelos matemáticos de isotermas de sorção.....	83
Tabela 12 – Estabilidade térmica das amostras obtidas por TGA.....	87
Tabela 13 – Parâmetros dos principais modelos de isotermas de sorção para as membranas de PVA/AH em diferentes condições de temperatura e concentração de agente reticulante.....	89
Tabela 14 – Porcentagem de células vivas e mortas no ensaio live/dead com HaCaT, em membranas de PVA/AH com diferentes concentrações de MA (com e sem extrato de tanchagem).....	101
Tabela 15 – Medidas em porcentagem (%) de fechamento das membranas de PVA/AH em diferentes e condições.....	104

LISTA DE SIGLAS

AG	Algoritmo Genérico
AgNPs	Nanopartícula de prata
AH	Ácido Hialurônico
CD44	Proteína
CO ₂	Dióxido de carbono
CC	Corrente contínua
DEMBio	Departamento de Engenharia de Materiais e de Bioprocessos
DMA	Análise dinâmico-mecânica
DMEM	Meio essencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DRX	Difração de Raios-X
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
ECM	Matriz Extracelular
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EDO	Equação Diferencial Ordinária
EDP	Equação Diferencial Parcial
EMR	Erro Médio Relativo
FDA	Food and Drug Administration
FEQ	Faculdade de Engenharia Química
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
GAB	Guggenheim-Anderson-de Boer
HaCat	Linha de células queratinócitos
HPβCD	2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin
Irgacure 2959	1-[4-(2-Hydroxyethoxy)-phenyl]-2-hydroxy-2-methyl-1-propane-1-one
K ₂ CO ₃	Carbonato de potássio
KCl	Cloreto de potássio
LRAC	Laboratório de Caracterização de Biomassa, Recursos Analíticos e de Calibração
MA	Anidrido Maleico

MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MM	Massa Molar
MO	Microscopia Óptica
MRS	Materials Research Society
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium brometo
NaBr	Brometo de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NHS	N-Hidroxisuccinimida
PBS	Tampão fosfato-salino
PED	Programa de Estágio Docente
PEO	Poli (óxido de etileno)
PGA	Poli(ácido glicólico)
PLA	Poli(Ácido Láctico)
PLGA	Poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico)
PVA	Poli(Álcool Vinílico)
Tan	Tanchagem
TGA	Análise Termogravimétrica
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL, JUSTIFICATIVA, OBJETIVOS E ESTRUTURA DO TEXTO	18
1.1. INTRODUÇÃO GERAL	19
1.2. JUSTIFICATIVA	21
1.3. OBJETIVOS	22
1.3.1. OBJETIVOS GERAIS	22
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
1.4. ESTRUTURA DO TEXTO.....	23
CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1. ELETROFIAÇÃO	26
2.2. ÁCIDO HIALURÔNICO.....	28
2.3. PVA	30
2.4. TANCHAGEM.....	31
2.5. RETICULAÇÃO ENTRE CADEIAS POLIMÉRICAS	33
2.5.1. RETICULAÇÃO QUÍMICA	34
2.5.2. FOTORETICULAÇÃO	34
2.6. CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS	35
CAPÍTULO 3: ESTUDO DOS PARÂMETROS DO PROCESSO DE ELETROFIAÇÃO	41
3.1. INTRODUÇÃO.....	42
3.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
3.2.1. PREPARO DAS SOLUÇÕES POLIMÉRICAS	45
3.2.2. CARACTERIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES POLIMÉRICAS	45
3.2.3. ETAPA DE ELETROFIAÇÃO.....	45
3.2.4. CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS ELETROFIADAS	46
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	46
3.4. CONCLUSÕES	53
CAPÍTULO 4: ESTUDO DA RETICULAÇÃO DAS MEMBRANAS	54
4.1. INTRODUÇÃO.....	55
4.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	57

4.2.1. PREPARO DAS SOLUÇÕES	57
4.2.2. CARACTERIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES POLIMÉRICAS	57
4.2.3. ETAPA DE ELETROFIAÇÃO.....	57
4.2.4. FOTORETICULAÇÃO	57
4.2.5. CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS ELETROFIADAS	58
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	58
4.4. CONCLUSÕES	64
CAPÍTULO 5: ADIÇÃO DE TANCHAGEM E ESTUDO DA CINÉTICA DE LIBERAÇÃO.....	65
5.1. INTRODUÇÃO.....	66
5.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	67
5.2.1. PREPARO DAS SOLUÇÕES POLIMÉRICAS	67
5.2.2. CARACTERIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES POLIMÉRICAS	67
5.2.3. CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS ELETROFIADAS	67
5.2.4. ENSAIO DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	67
5.2.5. MODELAGEM MATEMÁTICA DO PERFIL DE LIBERAÇÃO.....	68
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	71
5.4. CONCLUSÕES	79
CAPÍTULO 6: ESTUDO DA ESTABILIDADE DE ARMAZENAMENTO DAS MEMBRANAS ELETROFIADAS.....	80
6.1. INTRODUÇÃO.....	81
6.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	82
6.2.1. PREPARO DAS AMOSTRAS	82
6.2.2. CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS ELETROFIADAS	82
6.2.3. ISOTERMAS DE SORÇÃO DE ÁGUA	82
6.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	83
6.4. CONCLUSÕES	92
CAPÍTULO 7: ENSAIOS BIOLÓGICOS	93
7.1. INTRODUÇÃO.....	94
7.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	95
7.2.1. PREPARO DAS AMOSTRAS	95

7.2.2. ENSAIOS DE MTT	96
7.2.3. <i>LIVE/DEAD</i>	96
7.2.4. ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR (<i>SCRATCH ASSAY</i>).....	97
7.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	98
7.4. CONCLUSÕES	105
CAPÍTULO 8: CONCLUSÕES GERAIS, REFERÊNCIAS, MEMORIAL DO DOUTORADO E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	106
8.1. CONCLUSÕES GERAIS	107
8.2. REFERÊNCIAS	109
8.3. MEMÓRIA DO PERÍODO DE DOUTORADO	119
8.4. PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS	120
APÊNDICE A – CURVA PADRÃO DE ÁCIDO GÁLICO.....	121
APÊNDICE B – CONCENTRAÇÃO DO MEDICAMENTO DENTRO DA MEMBRANA EM VÁRIOS MOMENTOS DA LIBERAÇÃO DO MEDICAMENTO	122
APÊNDICE C – TRABALHOS PUBLICADOS	123
ANEXO A – LAUDO TÉCNICO DA TANCHAGEM	169
ANEXO B – CERTIFICADO DE ANÁLISE DO ÁCIDO HIALURÔNICO	171
ANEXO C – PERMISSÕES DE USO	173

CAPÍTULO 1
Introdução Geral, Justificativa, Objetivos e Estrutura do Texto

1.1. INTRODUÇÃO GERAL

A engenharia de tecidos é um campo científico-tecnológico interdisciplinar que aplica os conceitos de engenharia e ciências da vida com o objetivo de desenvolver dispositivos capazes de restaurar, preservar e restabelecer as funções de um órgão ou tecido lesado (LANGER; VACANTI, 1993; NASCIMENTO; LOMBELLO, 2016). Um dos grandes pilares das aplicações de biomateriais na área biomédica está voltado para cicatrização de feridas. As membranas produzidas por eletrofiação nessa área de pesquisa são majoritariamente empregadas como curativos de cicatrização e liberação de medicamentos. Para o desenvolvimento desses materiais, muitas técnicas são utilizadas e uma infinidade de matérias-primas está disponível, quer sejam naturais ou sintéticas.

A eletrofiação tornou-se uma das técnicas mais versáteis, por ser relativamente simples e econômica, além de possibilitar a projeção de materiais avançados usados em muitas aplicações, especialmente nas áreas farmacêutica e médica, incluindo curativos, sistemas de filtração e administração de medicamentos, bem como *scaffolds* para regeneração de tecidos (JESÚS et al., 2016). Os materiais resultantes, quando o processo é bem-sucedido, apresentam uma alta área superficial (CHOU et al., 2017; TOUNY; BHADURI, 2010), o que é importante para várias aplicações, como por exemplo, *scaffolds* para crescimento celular.

Elevada relação entre a área de superfície e o volume, alta porosidade e maleabilidade, possibilidade de carregamento de diversos princípios ativos, além das boas propriedades físico-químicas e mecânicas necessárias para mimetizar fisicamente a matriz extracelular (ECM), são algumas das propriedades alcançadas pelos materiais eletrofiados (FAHIMIRAD; AJALLOUEIAN, 2019). A técnica permite também o controle da porosidade desses *scaffolds*, o que facilita a infiltração e crescimento de diferentes tipos de células (SHANKHWAR et al., 2015). A utilização de agentes bioativos nessas membranas as torna funcionalizadas e com grande potencial como dispositivos antimicrobianos e biocompatíveis.

Diversos polímeros podem ser utilizados pela técnica de eletrofiação para se obter resultados satisfatórios nas aplicações mencionadas anteriormente, como exemplos temos os polímeros naturais como, quitosana, colágeno, gelatina, celulose e ácido hialurônico (UPPAL et al., 2011) e os polímeros sintéticos como, poli(ácido lático) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli (álcool vinílico) (PVA) e poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) (VILLARREAL-

GÓMEZ et al., 2016). Neste trabalho daremos enfoque ao Ácido Hialurônico (AH), normalmente presente no corpo humano e ao PVA, devido às suas propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade.

O AH é um polímero natural presente na matriz extracelular (ECM), cuja boa biocompatibilidade e biodegradabilidade conferem a este material um excelente potencial de aplicação na administração de fármacos, cicatrização de feridas, reparação de cartilagem e na engenharia de tecidos como um todo (DENG et al., 2017; KADERLI et al., 2015; LI et al., 2014; MOHAN et al., 2016; NASCIMENTO; LOMBELLO, 2016; SURI; SCHMIDT, 2010; TAN et al., 2009; YU et al., 2013). O grande número de grupos carboxila e hidroxila, disponíveis dentro da estrutura AH, são responsáveis por lhe conferir um caráter altamente hidrofílico. Tal característica permite que o AH realize a absorção do exsudato, bem como aprimore a adesão celular. Além disso, a biocompatibilidade, a biodegradabilidade (por meio da ação enzimática das hialuronidases (HYAL)) e a fácil modificação química do AH impulsionaram sua aplicação na cicatrização de feridas, com o intuito de promover a fase de hemostasia, regular a inflamação e estimular o processo de reepitelização (GRAÇA et al., 2020).

Outro polímero amplamente utilizado em aplicações biomédicas é o PVA devido às suas características bem conhecidas de biocompatibilidade, biodegradabilidade, solubilidade em água, não toxicidade, capacidade de intumescimento em meio aquoso e suas boas propriedades mecânicas (JALVANDI et al., 2017; SHANKHWAR et al., 2015).

Ambos os polímeros deste estudo são altamente hidrossolúveis e possuem baixa toxicidade, o que é extremamente desejado para a confecção de dispositivos biomédicos. No entanto, um sistema altamente solúvel se degradará muito rapidamente, perdendo a integridade e tornando impossível seu uso quando houver necessidade de contato com fluidos corporais por um determinado período de tempo. Portanto, o processo de reticulação pode ser uma alternativa interessante para melhorar a estabilidade do dispositivo final e as propriedades mecânicas em condições fisiológicas. Como nosso objetivo final é aplicar as membranas aqui preparadas como carreadores de drogas para liberação sustentada, a reticulação será imprescindível.

A escolha de um princípio ativo, com a função desejada para uma determinada aplicação, exige o conhecimento das características da matriz polimérica que será carreadora, do modo de encapsulamento e das propriedades físico-químicas deste princípio ativo. Aqui optamos por utilizar um fitoterápico, devido a sua composição natural, diminuição dos efeitos colaterais, baixo custo,

abundância na natureza e baixo índice de dependência. O *Plantago major* (*P. major*), é um fitoterápico comumente conhecido no Brasil como tanchagem, transagem, tansagem, plantagem, língua de vaca, trançagem ou, ainda, tançagem. É uma planta medicinal da família *Plantaginaceae*, amplamente utilizada no tratamento de várias doenças, como constipação, tosse, feridas, infecção, febre, sangramento e inflamação (NAJAFIAN et al., 2018).

O objetivo deste trabalho é obter uma nanomalha tridimensional carregada com o fármaco Tanchagem (Tan), obtida por eletrofiação dos biopolímeros AH e PVA seguida de fotoreticulação com radiação UV, na presença de anidrido maleico (MA), visando explorar efeitos sinérgico da viscoelasticidade do AH e das boas propriedades mecânicas do PVA nas propriedades físico-químicas do curativo final e na liberação do fármaco.

1.2. JUSTIFICATIVA

Embora muitos estudos e técnicas envolvendo a produção de curativos foram desenvolvidos ao longo dos anos, ainda há muito a se fazer para produzir um curativo que apresente alta performance e que reúna todas as propriedades desejadas para cada caso. A eletrofiação é uma técnica simples e versátil capaz de produzir estruturas poliméricas nanofibrosas com propriedades para promover a rápida recuperação da pele.

No Brasil ainda não existe uma estatística oficial a respeito das feridas crônicas ou agudas, porém estimativas mostram que no mundo 14% das pessoas apresentam algum tipo de lesão durante suas vidas. Embora os registros sejam escassos, as feridas constituem um sério problema de saúde pública, devido ao grande número de pacientes com alterações na integridade da pele e dos elevados gastos do poder público (BORGES; NASCIMENTO FILHO; PIRES JÚNIOR, 2018; MEMIC et al., 2019).

Embora a tanchagem seja um princípio ativo que tem atuação na cicatrização de feridas, seu comportamento ainda foi pouco explorado nos sistemas de liberação controlada. Este trabalho poderá contribuir para uma maior disseminação desse princípio ativos e de princípios ativos naturais que apresentam grandes potencialidades e efeitos colaterais reduzidos se utilizados de maneira adequada.

Outro ponto importante é o estudo do ácido hialurônico em sistemas de eletrofiação, pois esse polímero apresenta propriedades muito particulares e que serão discutidas nos próximos

capítulos, tais propriedades dificultam/impossibilitam sua eletrofiação em solução aquosa e em sistemas convencionais de eletrofiação. No entanto, suas propriedades de aplicação podem ser potencializadas com o uso da eletrofiação, o que torna importante estudos que viabilizem esse processo.

Neste contexto, reunir esforços para o desenvolvimento de dispositivos de alto desempenho e de fácil alcance social se faz necessário, pois além dos fatores econômicos envolvidos é possível proporcionar maior qualidade de vida às pessoas acometidas por estes traumas.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivos Gerais

Sintetizar e caracterizar membranas formadas por nanofibras poliméricas eletrofiadas e reticuladas quimicamente com boas propriedades físico-químicas para potenciais aplicações em engenharia de tecidos.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Buscar os melhores parâmetros das soluções poliméricas para obter membranas eletrofiadas, biocompatíveis com e sem princípio ativo.
- Escolher a reação de reticulação química mais adequada das membranas obtidas, que possa fornecer um material com boas propriedades químicas (não tóxicas e biodegradáveis), térmicas e mecânicas.
- Estudar o efeito da reticulação nas propriedades do material.
- Caracterizar as membranas por: Análise química (FTIR), Termoanálises (TGA e DSC) e Análises morfológicas (MEV e MO).
- Avaliar a aplicação em liberação controlada de extrato de Tanchagem e a sua cinética de liberação, além de propor um modelo matemático do perfil de liberação que se ajuste aos resultados obtidos.
- Avaliar a citotoxicidade das membranas *in vitro* (MTT, Live/Dead e Migração celular).
- Divulgar os resultados obtidos em revistas indexadas e Congressos da área.

1.4. ESTRUTURA DO TEXTO

As etapas do texto são apresentadas em 8 capítulos. Neste, **Capítulo 1 – Introdução Geral, Justificativas, Objetivos e Estrutura do Texto** foram apresentados em detalhes o tema do projeto, a justificativa e os objetivos propostos para a realização da pesquisa. Na Figura 1 são destacadas as principais abordagens de cada capítulo.

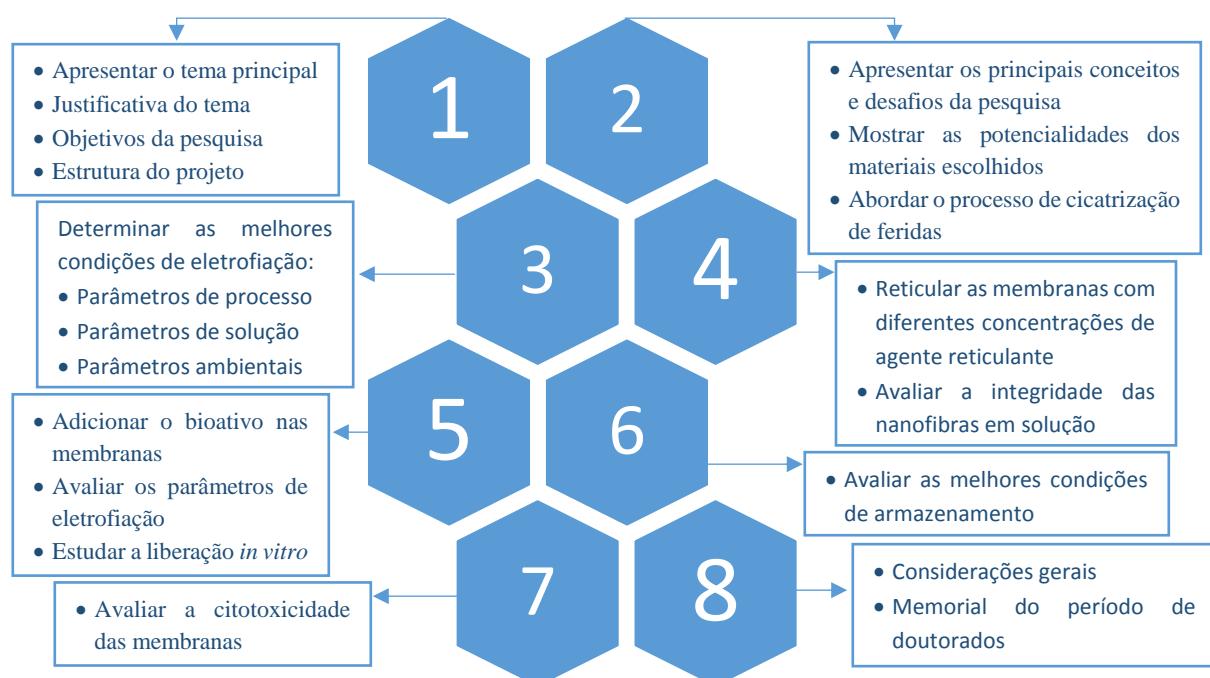


Figura 1 – Representação da abordagem de cada capítulo.

Fonte: Da autora

No **Capítulo 2 – Revisão bibliográfica**, foram apresentados o referencial teórico dos assuntos abordados nesse projeto, com referências atualizadas e com as lacunas ainda encontradas nas pesquisas mais recentes.

No **Capítulo 3 – Estudo dos parâmetros do processo de eletrofiação**, foram abordados os três principais parâmetros envolvendo a técnica de eletrofiação: (1) Parâmetros do processo (voltagem, vazão e distância entre a agulha e o coletor), (2) Parâmetros da solução (condutividade elétrica, viscosidade, tensão superficial, concentração da solução e massa molar do polímero) e (3)

Parâmetros ambientais (temperatura e umidade); bem como foi discutido a influência dos mesmos na morfologia das nanofibras formadas.

No **Capítulo 4 – Estudo da reticulação das membranas**, foram discutidos a influência da etapa de reticulação na integridade das nanofibras quando colocas em solução PBS 7,4. O estudo deste capítulo foi publicado na *RSC Advances*.

No **Capítulo 5 – Adição de tanchagem e estudo da cinética de liberação**, um biofármaco (Tan) foi adicionado nas membranas produzidas nas etapas anteriores para avaliação do material como carreador de medicamento. Neste capítulo foi abordado a influência dessa biomolécula nos parâmetros do processo de eletrofição, bem como a cinética de liberação *in vitro* e os mecanismos que comandam essa liberação.

No **Capítulo 6 – Estudo da estabilidade de armazenamento das membranas eletrofiadas**, foram discutidas as melhores condições de armazenamento dessas membranas, em termos de estabilidade térmica e umidade relativa e de suas respectivas isotermas de sorção.

No **Capítulo 7 – Ensaios biológicos**, foi avaliada a viabilidade celular de células HaCat quando cultivadas com as membranas deste estudo. Os ensaios analisaram células metabolicamente ativas, a fim de avaliar sua atividade qualitativa e quantitativamente. Também foram realizados ensaios de migração celular utilizando a linhagem de célula 3T3 (fibroblastos), com o objetivo de estudar o comportamento de migração celular na presença das membranas propostas. Esses, são ensaios importantes para futuras aplicações *in vivo*.

No **Capítulo 8 - Considerações, cronograma e memória do período de doutorado** foram apresentados as principais considerações desse trabalho de Tese de doutorado. Na memória do período do doutorado foram listadas as atividades realizadas pela doutoranda, como disciplinas cursadas, estágio docente e produção bibliográfica, como, capítulo de livro e artigos científicos já publicados.

CAPÍTULO 2
Revisão Bibliográfica

2.1. ELETROFIAÇÃO

A eletrofiação é uma técnica versátil e amplamente utilizada em diversas áreas de pesquisa, especialmente na área biomédica e farmacêutica (BALUSAMY; SENTHAMIZHAN; UYAR, 2017; KALAF et al., 2017; SELDERS et al., 2017). De forma simplificada, o processo consiste em uma bomba ejetora capaz de empurrar o embolo de seringas contendo solução polimérica para a ponta de uma agulha (ou fieira), que ao ser submetida a altas voltagens cria uma tensão entre essa ponta e o coletor aterrado (Figura 2). A alta tensão aplicada cria um alto campo elétrico externo que faz com que a gota da solução polimérica na ponta da agulha (fieira) seja carregada positivamente e se alongue formando um cone, também denominado como cone de Taylor (MEMIC et al., 2019; SNETKOV et al., 2019). Quando a tensão aplicada é suficiente para que as forças eletrostáticas geradas na gota superem a tensão superficial, um jato carregado na forma de chicote é ejetado. Durante a trajetória deste jato, o solvente evapora e o polímero solidifica-se, formando uma manta nanofibrosa que se deposita em um coletor que atua como um contra-eletrodo (ABRIGO; MCARTHUR; KINGSHOTT, 2014; FAHIMIRAD; AJALLOUEIAN, 2019; KALAF et al., 2017).

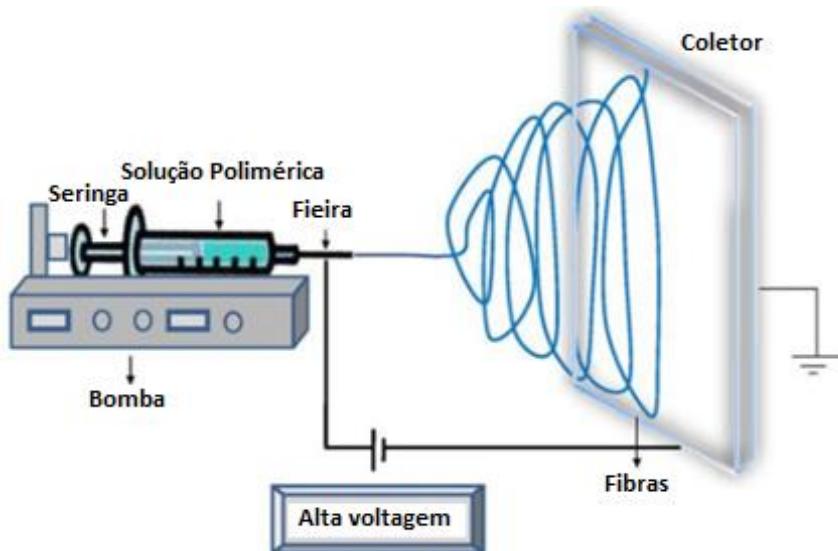


Figura 2 – Esquema experimental do processo de eletrofiação.

Fonte: Adaptado de Zhu et al. (2013).

A morfologia e a estrutura das nanofibras dependem de muitos parâmetros, que são divididos principalmente em três categorias: parâmetros de solução, parâmetros de processo e parâmetros ambientais (INOZEMTSEVA et al., 2015). Em resumo, a Tabela 1 apresenta o efeito individual desses parâmetros na morfologia, mas é importante lembrar que, para todos os parâmetros, existe um valor crítico que dependerá da natureza do polímero e do projeto de eletrofiação. Além disso, parâmetros com valores extremos geralmente têm o efeito oposto ao esperado na estrutura de nanofibras. Por fim, é relevante mencionar que há interação entre os parâmetros que devem ser levadas em consideração na definição dos valores ótimos do processo (CASTRO; COSTA; MEI, 2020).

Tabela 1: Parâmetros de eletrofiação e seus efeitos usuais na morfologia de nanofibras.

Parâmetro	Efeito na morfologia da fibra eletrofiada
Parâmetros de Solução	
Massa molar do polímero	O aumento da massa molar reduz o número de “contas” (<i>beads</i>)
Concentração da solução polimérica	Aumento no diâmetro da fibra com o aumento da concentração da solução de polímero
Condutividade	Aumento no diâmetro da fibra com a diminuição da condutividade
Viscosidade	Aumento do diâmetro da fibra e redução de defeitos, com aumento da viscosidade
Tensão superficial	Alta tensão superficial resulta em instabilidade do jato
Parâmetros do Processo	
Voltagen elétrica	Diminuição do diâmetro da fibra com o aumento da tensão aplicada
Vazão	Aumento no diâmetro da fibra e número de “contas”, com o aumento da vazão

Distância entre a agulha e o coletor Aumento na distância Agulha-Coletor, diminui o diâmetro da fibra

Parâmetros Ambientais

Temperatura	Aumento da temperatura diminui a viscosidade da solução e consequentemente reduz o diâmetro da fibra
Umidade relativa	Aumento da umidade causa o aparecimento de poros nas nanofibras

Dependendo da natureza dos polímeros a serem trabalhados e do controle adequado dos parâmetros, uma variedade morfologia e de diâmetro das fibras pode ser obtida. Este método de fabricação proporciona, em geral, excelente resistência à tração e elevada relação área de superfície/volume do dispositivo obtido, o que favorece sua aplicação para obtenção de *scaffolds* 3D (DHANDAYUTHAPANI; KRISHNAN; SETHURAMAN, 2010; JEONG; PARK; LEE, 2017; ZHOU; GONG, 2008)

2.2. ÁCIDO HIALURÔNICO

O ácido hialurônico é um polissacarídeo linear, constituinte da matriz extracelular (ECM) e amplamente utilizado na engenharia de tecidos (FAHIMIRAD; AJALLOUEIAN, 2019; ZHAO et al., 2015a; ZHONG; XING; MAIBACH, 2010). É um polímero natural constituído por unidades dissacarídicas alternadas de ácido β -1, 4-D-glucurônico e β -1, 3-N-acetil-D-glucosamina (Figura 3), com massas molares (MM) que variam de baixas (≤ 250 kDa) a elevadas (1000 a 6000 kDa) (FAHIMIRAD; AJALLOUEIAN, 2019; ZHAO et al., 2015a). Além disso, é um polianion hidrofílico com alta capacidade de intumescimento em presença de água, possui alta biodegradabilidade, biocompatibilidade, funções biológicas únicas, como mediação da adesão, migração e proliferação celular e promove a formação de tecido de granulação (CROISIER et al., 2014; FAHIMIRAD; AJALLOUEIAN, 2019; HADISI et al., 2020; ZHAO et al., 2015a).

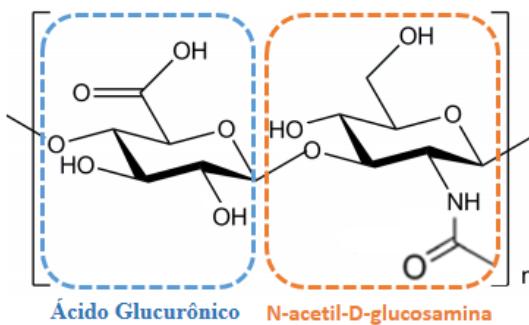


Figura 3 – Estrutura química do Ácido Hialurônico.

Fonte: Adaptado de Castro et al. (2021).

Durante os estágios iniciais da cicatrização de feridas, o ácido hialurônico atua como uma estrutura temporária principalmente por causa de seu grande tamanho molecular. Sua estrutura única facilita a difusão de nutrientes e produtos residuais do local da lesão. Mais importante, entretanto, é a interação do ácido hialurônico com os queratinócitos. Os queratinócitos são células da epiderme da pele cujo papel é produzir queratina e formar junções herméticas. O AH afeta diretamente a proliferação e migração desses tipos de células (DOVEDYTIS; LIU; BARTLETT, 2020; VOIGT; DRIVER, 2012).

Várias funções importantes associadas ao AH durante o processo de cicatrização de feridas derivam do receptor CD44 (DOVEDYTIS; LIU; BARTLETT, 2020; HUANG; HUANG, 2018). O CD44, um receptor proeminente do AH, está presente na membrana celular de quase todas as células humanas. No ambiente da ferida, o CD44 é responsável pela internalização dos produtos de degradação do AH e é um receptor essencial durante a resposta inflamatória (DOVEDYTIS; LIU; BARTLETT, 2020; KROLIKOSKI; MONSLOW; PURÉ, 2019). Além disso, o CD44 é responsável pelo recrutamento de fibroblastos para a área da ferida a partir do tecido circundante. No entanto, CD44 e AH não podem atuar de forma independente. O CD44 então dispara uma cascata de sinalização que auxilia no processo de crescimento e motilidade celular (DOVEDYTIS; LIU; BARTLETT, 2020; JOHNSON et al., 2018).

Por outro lado, o AH possui propriedades reológicas que dificultam a eletrofiação, como alta tensão superficial e alta viscosidade, além da elevada hidrofilicidade (FAHIMIRAD; AJALLOUEIAN, 2019; ZHAO et al., 2015a; ZHONG; XING; MAIBACH, 2010). A solução desse polímero apresenta alto nível de condutividade e baixa evaporabilidade, o que limita o desempenho do processo de eletrofiação devido as possíveis falhas de circuito entre a agulha e o coletor. Fibras

úmidas podem atuar como condutores elétricos entre os eletrodos, resultando em curto-circuito (SNETKOV et al., 2019).

A degradação progressiva do AH dá origem a fragmentos com tamanhos decrescentes, que possuem diferentes funções biológicas de acordo com a massa molar do polímero (D'AGOSTINO et al., 2017; STERN; ASARI; SUGAHARA, 2006). Um estudo proposto por D'Agostino et al. (2017) avaliou as propriedades bioativas do AH com diferentes MM (1800–6 kDa), cujos resultados mostraram que todas as amostras foram capazes de acelerar a cicatrização de feridas, promovendo a ativação celular e o reparo da derme, com exceção do AH de 6 kDa. Assim como mostrado por Zhao et al. (2015b) e Li et al. (2012), o trabalho de D'Agostino et al. (2017) evidenciou que a glicoproteína transmembrana do tipo 1, CD44, é a receptora para o AH, apenas na faixa de 1800 até 15 kDa deste polímero; abaixo dessa MM não houve estímulo dessa glicoproteína, além de poder prejudicar o processo de reparo e aumentar os níveis de citocinas inflamatórias (D'AGOSTINO et al., 2017; LI et al., 2012; ZHAO et al., 2015b).

Muitos estudos sobre o efeito da MM do AH no processo de cicatrização foram feitos, e podem ser facilmente encontrados na literatura. Todos os estudos apontam que uma alta MM aumenta a quiescência celular, previne a apoptose e mantêm a integridade do tecido, protegendo suas células; adicionalmente, AH de alta MM atua diretamente na fase inflamatória e estimula proliferação de fibroblastos *in vitro* (CHEN et al., 2018; DAY; DE LA MOTTE, 2005; LITWINIUK; KREJNER; GRZELA, 2016; STERN; ASARI; SUGAHARA, 2006; TOLG et al., 2006).

2.3. PVA

O polímero PVA apresenta estrutura química relativamente simples, derivada da hidrólise parcial ou total do poli(acetato de vinila) caracterizada por uma cadeia principal constituída por ligações C–C com hidroxilos e grupos acetato em suas laterais (Figura 4). O número desses grupos está relacionado ao seu processo de síntese e pode variar. No estado reticulado seu potencial de uso se amplia, podendo atuar no transporte de várias substâncias da área da saúde, incluindo-se fármacos, bem como atuar em outras aplicações na engenharia de tecidos (KENAWY; AL-DEYAB, 2010). Esse material recebe grande atenção devido ao seu baixo custo, alta hidrofilicidade e excelente resistência química que amplia suas áreas de aplicação (QUINN et al., 2018).

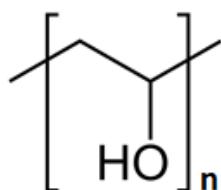


Figura 4 – Estrutura química da unidade repetitiva do PVA.

Fonte: Adaptado de Quinn et al. (2018).

Este polímero é caracterizado como parcialmente hidrolisável, quando apresenta cerca de 80,0% –98,5% dos grupamentos hidroxilas ($-\text{OH}$); altamente hidrolisável na presença de $-\text{OH}$ acima de 98,5% e, na ausência de qualquer grupo acetato, é denominado como totalmente hidrolisado. O grau de hidrólise, a MM (influenciada pelo grau de polimerização) e a taticidade afetam as propriedades químicas e físicas do polímero; como por exemplo, a solubilidade, a cristalinidade e a biodegradabilidade (KUMAR; HAN, 2017; TEIXEIRA; AMORIM; FELGUEIRAS, 2019).

As aplicações de PVA na engenharia de tecidos se devem às suas inúmeras características positivas, tais como, alta solubilidade em água, biodegradabilidade, excelente biocompatibilidade, baixa toxicidade, propriedades adesivas e facilidade de processamento (FAHMY et al., 2015; KENAWY; AL-DEYAB, 2010).

2.4. TANCHAGEM

Plantago major ou Tanchagem é uma planta de interesse medicinal, originária do norte da Europa e da Ásia Central, pertencente à família *Plantaginaceae*, sendo também conhecida popularmente no Brasil por vários outros nomes já citados anteriormente. A planta é caracterizada por ter caule curto, folhas largas, raízes, flores, frutos e sementes. Possui folhas geralmente nas faixas 15–30 cm de diâmetro e formato oval, 4–9 cm de largura e 5–20 cm de comprimento, e cerca de 5 a 9 nervuras proeminentes nas folhas. As flores são de cor castanho-esverdeada com estames roxos e são pequenas (Figura 5). A planta tem pequenas sementes ovais com um sabor amargo ligeiramente desagradável (ADOM et al., 2017).

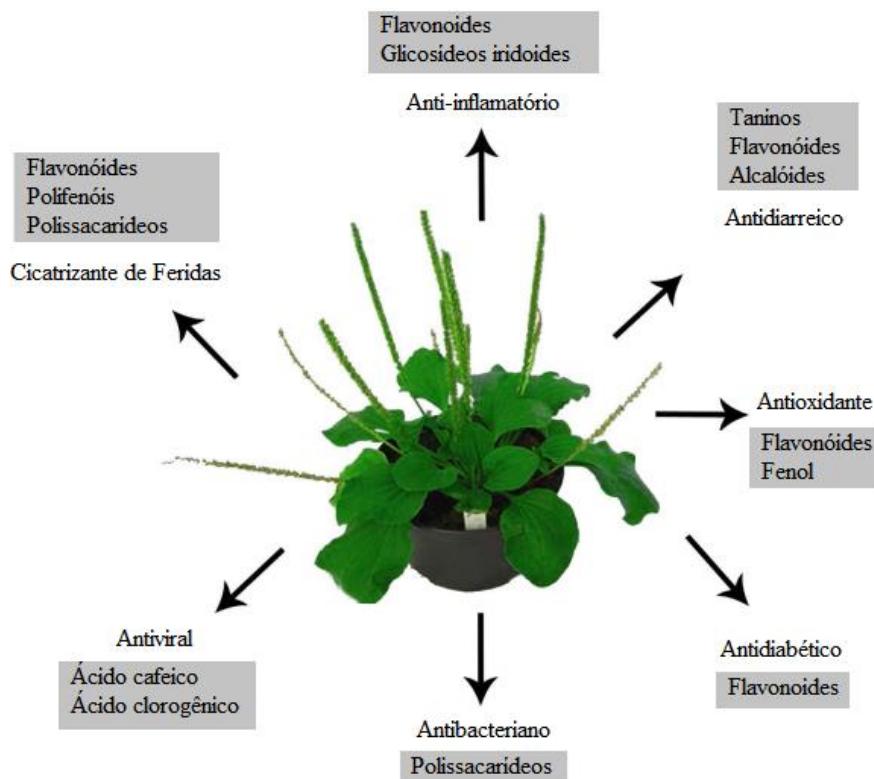


Figura 5 – Resumo dos benefícios medicinais e constituintes químicos do *Plantago major*.

Fonte: Adaptado de Adom et al. (2017).

A literatura mostra que a maioria dos constituintes químicos da planta pode ser encontrada em quase todas as suas estruturas (sementes, folhas, flores e raízes), em maior ou menor quantidade. Os principais compostos encontrados são os alcaloides, compostos fenólicos (derivados do ácido cafeico), flavonóides (principalmente luteolina e apigenina), alcalóides, terpenóides e iridóides glicosilados, ácidos graxos, polissacarídeos e vitaminas (MINISTÉRIO DA SAÚDE; ANVISA, 2014; NAJAFIAN et al., 2018; SANTOS; TONIN, 2019).

Por ser uma planta medicinal, a Tanchagem (Tan) é utilizada mundialmente para várias finalidades, tais como, diurética, antidiarreica, expectorante, hemostática, cicatrizante, bronquite crônica e como auxiliar no tratamento de úlceras pépticas, infecções bacterianas e virais, inflamação e câncer (Figura 5). Essas atividades biológicas e propriedades medicinais da planta dependem principalmente das atividades dos constituintes químicos ativos. A parte da planta utilizada e a forma de extração são de grande importância para determinar os compostos bioativos presentes (ADOM et al., 2017).

2.5. RETICULAÇÃO ENTRE CADEIAS POLIMÉRICAS

Durante o processo de eletrofiação, é possível a obtenção de membranas com propriedades mecânicas extremamente ajustáveis; isto é, por meio de processo simultâneo de reticulação por emaranhamentos físicos ou interação covalente entre cadeias (Figura 6) (MA et al., 2016; VARAPRASAD et al., 2017; ZHANG; KHADEMHSSEINI, 2017).

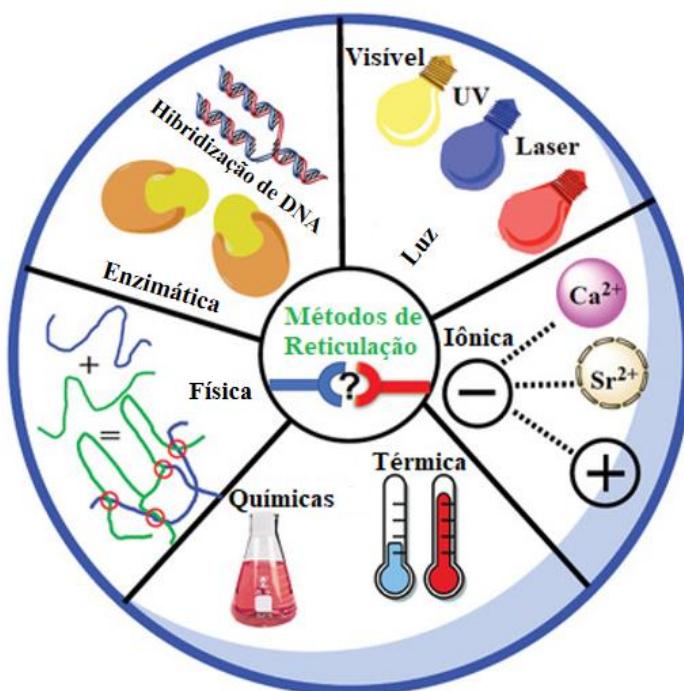


Figura 6 – Principais método de reticulação utilizados em matrizes poliméricas.

Fonte: Adaptado de GhavamiNejad et al. (2020).

Ressalta-se que sistemas eletrofiados e reticulados são amplamente empregados para transporte e liberação controlada de fármacos, sendo uma das alternativas mais procuradas por pesquisadores atualmente. Isso se deve às suas características bidimensionais, ou tridimensionais, como alta área superficial e as estruturas porosas das fibras, que proporcionam excelente eficácia terapêutica na liberação do fármaco. Esses biomateriais em escala nanométrica têm o potencial de oferecer maior área de contato para o crescimento celular e de promover a interação celular com o transportador de medicamentos, tornando-se candidatos ideais para diversas em aplicações *in vivo* (CHOU et al., 2017).

A reticulação de AH com PVA, ou de PVA na presença de AH, proporciona a formação de redes tridimensionais (3D) com maior resistência mecânica e com maior (maior grau de reticulação) ou menor (menor grau de reticulação) afinidade com a água ou meio fisiológico.

2.5.1. Reticulação química

As ligações covalentes são normalmente desejadas entre as cadeias de polímero reticulados por serem mais energéticas e permanentes quando comparadas com reticulações físicas reversíveis (ou pseudoreticulações). Várias reações de reticulação já foram relatadas, e elas normalmente envolvem polimerização de radicais livres, reticulação por enzimas, por reação "clique" de Diels-Alder, por formação de base de Schiff, por formação de Oxima e por adição do tipo Michael, entre outras. Em comparação com as reticulações físicas, as reticulações químicas geralmente exibem materiais com estabilidade superior sob condições fisiológicas e excelentes propriedades mecânicas, bem como degradabilidade ajustável (HU et al., 2019; OZBOLAT, 2017).

2.5.2. Fotoreticulação

A fotoreticulação é um método limpo e de baixo custo, que pode ser realizado em temperatura ambiente e consome menos energia em comparação com outras técnicas. O processo ocorre por radiação de luz na forma de ultravioleta (UV), laser ou luz visível. Entre as várias luzes, a luz UV (320–365 nm) é a mais comumente usada.

Uma fotoreticulação bem-sucedida depende da otimização de diversos parâmetros, tais como, tempo de exposição da amostra, intensidade da radiação, tipo de fotoiniciador e concentração. Vários fotoiniciadores, como acilfosfinato de lítio, Irgacure 2959, Irgacure 1173, Irgacure 819, VA086, canforquinona, fluoresceína, riboflavina, rutênio/persulfato de sódio, Rose Bengal, e eosina Y, têm sido utilizados.

Daremos enfoque ao 1-[4-(2-Hydroxyethoxy)-phenyl]-2-hydroxy-2-methyl-1-propane-1-one (Irgacure 2959), pois foi o fotoiniciador estudado neste trabalho (Figura 7). O Irgacure 2959 é um fotoiniciador radical anti-amarelamento, eficiente para a reticulação (ou cura) por UV de sistemas compostos de monômeros insaturados e pré-polímeros, sendo especialmente adequado onde é necessário baixo odor e em sistemas à base de água. O grupo hidroxi ativo pode reagir com

resinas insaturadas funcionalizadas adequadas (COIMBRA et al., 2008). A literatura aponta que este fotoiniciador apresenta baixa toxicidade (morte celular) em uma ampla gama de tipos e espécies de células de mamíferos. Pode ser empregado na fotopolimerização de polímeros e copolímeros, destinados para aplicações biomédicas e de engenharia de tecidos, em solventes líquidos convencionais farmaceuticamente aceitos (GHAVAMINEJAD et al., 2020; WILLIAMS et al., 2005; XU et al., 2020).

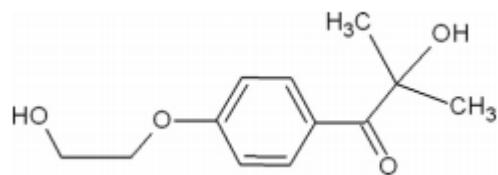


Figura 7 – Estrutura química do Irgacure 2959.

Fonte: (COIMBRA et al., 2008).

2.6. CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

Um dos grandes pilares das aplicações de biomateriais na área biomédica está voltada para cicatrização de feridas. As membranas produzidas por eletrofiação nessa área de pesquisa são majoritariamente empregadas como curativos de cicatrização e liberação de medicamento. Portanto, é fundamental que se compreenda o processo de cicatrização, que envolve quatro grandes fases que atuam de forma interconectadas, são elas: Hemostasia, inflamação, proliferação e remodelamento (EL-AASSAR et al., 2020; FAHIMIRAD; AJALLOUEIAN, 2019; MEMIC et al., 2019).

A hemostasia, ou primeira fase, ocorre imediatamente após a lesão, em que a cascata de coagulação é ativada. O sangramento traz consigo plaquetas, hemácias e fibrina, selando as bordas da ferida, ainda sem valor mecânico, mas facilitando as trocas. O coágulo de fibrina formado estabelece uma barreira impermeabilizante que protege a ferida da contaminação (EL-AASSAR et al., 2020; FAHIMIRAD; AJALLOUEIAN, 2019; MEMIC et al., 2019). Nessa etapa as plaquetas liberam grandes quantidades de AH de alto peso molecular, que levam à deposição de fibrinogênio e à formação de um coágulo inicial, sendo assim, membranas contendo AH em sua matriz potencializam este mecanismo (Figura 8). Além disso, o AH como um componente principal do

fluído de edema, também promove o recrutamento de células de neutrófilos, envolvidas na fagocitose dos detritos e remoção de tecido morto, e a liberação subsequente de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-1 β , IL-8 (GRAÇA et al., 2020; TAVIANATOU et al., 2019).

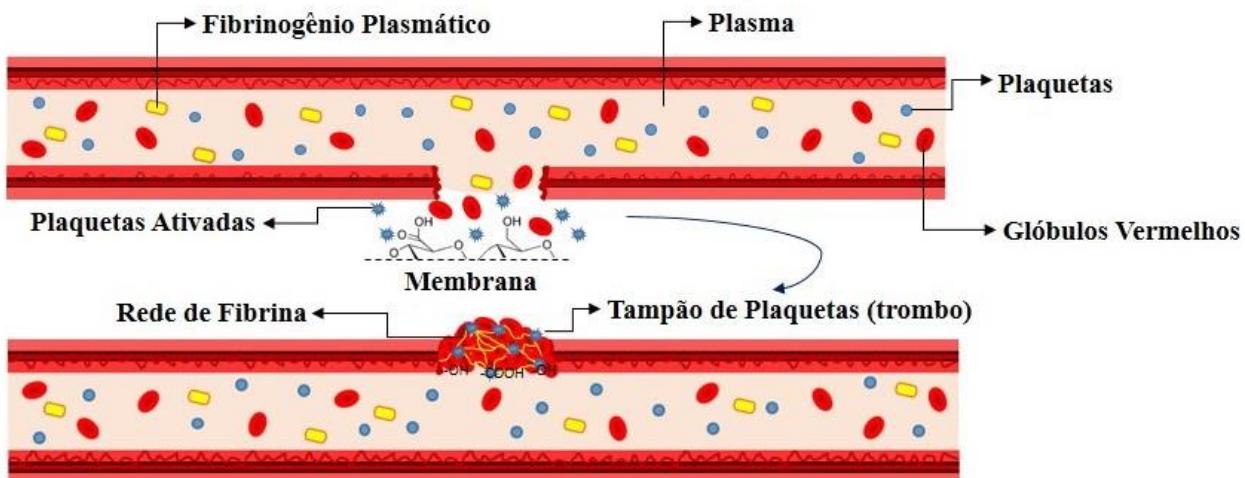


Figura 8 – Ilustração do mecanismo de Hemostasia.

Fonte: Da autora

A segunda fase, ou fase inflamatória ocorre simultaneamente com o processo de hemostasia, o que leva muitos autores a considerarem os dois processos como uma única fase. A resposta inflamatória se inicia com vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, promovendo a quimiotaxia (migração de neutrófilos para a ferida). Os primeiros elementos celulares a alcançar o local da ferida são os neutrófilos e os monócitos, que são atraídos por substâncias quimiotáticas liberadas pelas plaquetas, com a função de desbridar as superfícies da ferida e fagocitar as partículas antigênicas e corpos estranhos. Aos poucos os neutrófilos são substituídos por macrófagos, que possuem papel importante para as fases seguintes. Essas células são responsáveis pela secreção de fatores de crescimento e citocinas, causando a migração de queratinócitos e fibroblastos para o local da ferida (fibroplastia), e contribuem com a angiogênese e síntese da matriz extracelular, necessárias para iniciar a etapa de proliferação e posterior cicatrização (EL-AASSAR et al., 2020; FAHIMIRAD; AJALLOUEIAN, 2019; MEMIC et al., 2019).

Na fase de proliferação, ou terceira fase, os fibroblastos se proliferam sob a ação de citocinas, que dão origem a um processo denominado fibroplasia. Ao mesmo tempo, ocorre a

proliferação de células endoteliais, com formação de uma rica vascularização (angiogênese) e infiltração densa de macrófagos, formando o tecido de granulação. Este tecido, por sua vez, é constituído por um leito capilar, fibroblastos, macrófagos, um frouxo arranjo de colágeno, fibronectina e ácido hialurônico. Novos vasos sanguíneos são formados a partir de vasos pré-existentes durante o processo de angiogênese, o que auxilia na restauração da perfusão de oxigênio (EL-AASSAR et al., 2020; FAHIMIRAD; AJALLOUEIAN, 2019; MEMIC et al., 2019).

Por fim, temos a quarta fase, ou remodelamento, que tem como principal função a deposição de colágeno de forma organizada. Nessa fase o colágeno do tipo III é reabsorvido e um colágeno mais espesso (colágeno do tipo I) é produzido e organizado ao longo das linhas de tensão. A força tênsil jamais retornará a 100% e a cicatriz vai progressivamente alterando sua tonalidade passando do vermelho escuro ao rosa claro (EL-AASSAR et al., 2020; FAHIMIRAD; AJALLOUEIAN, 2019; MEMIC et al., 2019).

2.7. PRINCIPAIS COBERTURAS PARA TRATAMENTO DE FERIDAS DISPONÍVEIS NA REDE SUS

Antes de pontuar os principais curativos que vêm sendo utilizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (Tabela 2), é importante entender que essas coberturas podem ser classificadas como primária, secundária e mista. A cobertura primária é o produto que permanece em contato direto com o leito da ferida na pele adjacente com a finalidade de absorver seu exsudato, facilitando o fluxo livre das drenagens, preservando o ambiente úmido e a não-adherência. Esse tipo de curativo requer permeabilidade aos fluidos, não-adherência à ferida e impermeabilidade às bactérias. A cobertura secundária é o produto que recobre a cobertura primária, com a finalidade de absorver o excesso de drenagem, proporcionando proteção e compressão. Esse tipo de curativo necessita ter capacidade satisfatória de absorção e proteção. A cobertura mista é o produto que possui as duas camadas: uma em contato com o leito da ferida e outra em contato com o ambiente externo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Tabela 2 – Principais curativos comerciais utilizados nos hospitais públicos do Brasil, baseados em manuais vinculados ao Ministério da Saúde.

Curativo	Nome Comercial	Descrição	Tipo de Cobertura	Contraindicação/Desvantagem
Gaze umedecida em solução fisiológica	Cremer® Megatex® Nexcare®	Feito de algodão, seda, raiom ou fibras sintéticas	Primária	Lesões com excesso de exsudato e secreção purulenta, locais de inserção de cateter, adesão a ferida, etc.
Hidrocolóide	Duoderm Gel®, Hydrosorb®, Hypergel®, Nu-Gel®, Intrasite®, Sheets®, Act FoamCool®, Intrasite Conformable®, Saft Gel®, AliGel®	Os hidrocolóides são curativos sintéticos derivados da celulose natural que contêm partículas hidrofílicas, que se transformam em gel em contato com o exsudato da ferida	Primária e/ou secundária	Em casos de infecção, principalmente por anaeróbicos, porque estes produtos são impermeáveis ao oxigênio. Em casos com excessiva drenagem, por causa da limitada capacidade de absorção
Bota de Unna	Flexidress Viscopaste®	Óxido de zinco, glicerina, água destilada e gelatina	Primária ou secundária	Úlceras arteriais e mistas (artério-venosas), sinais de infecção e presença de miíase. Não deve ser utilizada em indivíduos com sensibilidade conhecida ao produto ou a seus componentes.
Gel com (PHMB)	-	Gel aquoso, incolor, não gorduroso, hidratante, composto de poli(hexametileno biguanida) (PHMB)	Primária	Não utilizar em conjunto com sabonetes, pomadas, óleos ou enzimas, não associar com tensoativos aniônicos, não utilizar em cartilagem hialina.

Ácidos graxos essenciais	Dersani® Ativo Derm AGE Derm	Óleos vegetais polissaturados, compostos fundamentalmente de ácidos graxos essenciais, ácido linoléico, ácido caprílico, ácido cáprico, vitamina A e E e a lecitina de soja	Primária	Tecidos desvitalizados, hipergranulação, lesões infectadas, feridas oncológicas,
Alginatos e Hidrofibras	Algoderm® Curasorb® Sorbalgon®, Aquacel®	Polissacarídeo composto de cálcio, derivado de algumas algas marinhas marrons, ácidos gulurônico e manurônico	Primária	Resseca se não houver curativo secundário adequado. Não deve ser utilizado em feridas secas ou com pouco exsudato, pois pode haver aderência e maceração da pele adjacente.
Hidrofibra com prata (Ag)	Aquacel Ag®	Composto por fibras de carboximetilcelulose sódica e prata (Ag)	Primária	Feridas com pouca exsudação e uso limitado em feridas superficiais, feridas com necrose seca ou tecido inviável, hipersensibilidade a prata.
Carvão ativado	Carboflex ® Actisorb® Silversel®	Curativo composto por carvão ativado, impregnado por íons de prata, envolto por uma camada de não tecido	Primária	Não deve ser utilizado em feridas secas, não utilizar em feridas limpas e queimaduras, requer observação constante do tecido de granulação.
Sulfadiazina de prata	Dermazine® e Pratazine ®	Sulfadiazina de prata a 1%, hidrofílico	Primária	Hipersensibilidade.

Além dos curativos sintéticos, ainda são utilizados os fitoterápicos, como: arnica 5%, calêndula 5%, hamamélis 10%, babosa (aloe vera) 25% e papaína 10% (JORGE et al., 2021; ZERBINATTI et al., 2018).

Como pode ser observado na Tabela 2 os curativos eletrofiados ainda não são uma realidade, e por isso a viabilização de novos materiais para cicatrização de feridas utilizando esta técnica e as matrizes poliméricas adequadas ao tratamento é inovador e merece ser explorado.

CAPÍTULO 3
Estudo dos parâmetros do processo de eletrofiação

3.1. INTRODUÇÃO

Abreviando a História, no início da década de 1990 vários grupos de pesquisa reportaram que muitos dos polímeros orgânicos poderiam ser eletrofiados para formar nanofibras, sendo cada vez maior o número de pesquisas desde então para diferentes aplicações destes materiais (DOSHI; RENEKER, 1995; LI; XIA, 2004). A eletrofiação pode ser definida como um processo de produção de micro- e nanofibras de comprimento infinito obtidas de soluções poliméricas submetidas a uma alta voltagem (MEGELSKI et al., 2002). A maneira mais simples do arranjo experimental desse processo consiste em uma fonte de alta tensão, seringa e um sistema de aterramento (coletor) (INOZEMTSEVA et al., 2015). Porém, existem diversas conformações do arranjo; por exemplo, o coletor pode ser estático ou rotativo, o sistema pode ser montado na vertical e com isso utilizar a força da gravidade ou ainda pode ser horizontal, fazendo uso de uma bomba para ejeção da solução. Além disso, podem ser utilizadas uma ou várias seringas ao mesmo tempo.

A escolha do arranjo experimental depende da finalidade da aplicação; assim, se a escolha é obter alinhamento das fibras para melhorar suas propriedades mecânicas e outras, um coletor rotativo pode ser utilizado. O sistema de fieira pode também ser modificado para produzir nanofibras feitas de misturas de polímeros ou estruturas de casca-núcleo usando um sistema de fieira múltipla ou um coaxial.

Muitos parâmetros precisam ser controlados para que o processo de eletrofiação seja bem-sucedido e para que a morfologia das fibras atinja as características esperadas. Três categorias de parâmetros são estudadas, tais como: (1) Parâmetros do processo (voltagem, vazão e distância entre a agulha e o coletor), (2) Parâmetros da solução (condutividade elétrica, viscosidade, tensão superficial, concentração da solução e massa molar do polímero) e (3) Parâmetros ambientais (temperatura e umidade) (CASTRO; COSTA; MEI, 2020; MIGUEL et al., 2018)

A tensão elétrica aplicada é um parâmetro fundamental para o processo, uma vez que influencia na formação do jato e consequentemente na formação das nanofibras. A tensão elétrica para que esse processo ocorra com sucesso é chamada de tensão crítica, e ela varia dependendo da configuração e da solução utilizadas (HAIDER; HAIDER; KANG, 2018; SANKARAN; DESHMUKH; AHAMED, 2019), sendo que alguns estudos mostraram que essa tensão crítica ocorre com valores tipicamente superiores a 4 kV (SALEHHUDIN et al., 2018; SUNDARAY et al., 2004). É importante ressaltar que o aumento da voltagem ocasiona uma diminuição no diâmetro

da fibra; porém, quando aumentada demasiadamente, pode favorecer a formação de “contas” (estruturas que podem ser formadas ao longo das fibras, que são encaradas como defeitos do processo) e ocasionar uma inversão quanto ao tamanho do diâmetro (LI et al., 2007; MOUTLOALI, 2013).

A vazão da solução polimérica é outro parâmetro importante na morfologia das fibras formadas. O aumento da vazão não só aumenta a taxa de produção das fibras, mas também o seu diâmetro e a formação de contas, corroborando os resultados obtidos por Tang et al. (2015) e Ghelich et al. (2015). Isso ocorre porque quanto maior as taxas de fluxo, mais altas são as quantidades de material ejetado; porém, o tempo para o jato secar é reduzido devido à maior velocidade (HAIDER; HAIDER; KANG, 2018).

A distância adequada entre a agulha e o coletor, é fundamental para a formação adequada das fibras, uma vez que durante essa trajetória ocorre a evaporação do solvente, permitindo a formação de fibras uniformes, evitando defeitos como: fibras com contas, fundidas e achatadas (HAIDER; HAIDER; KANG, 2018; PHAM et al., 2006; SALEHHUDIN et al., 2018; SANKARAN; DESHMUKH; AHAMED, 2019). De maneira geral existe uma distância crítica para que o processo ocorra de forma satisfatória, essa distância varia de acordo com a solução polimérica, principalmente em detrimento do solvente.

A MM, a concentração e, consequentemente, a viscosidade da solução são os fatores que mais influenciam a morfologia das nanofibras. A alta MM de polímeros, em relação às pequenas moléculas, facilita o emaranhamento das suas cadeias e assim promove o aumento da viscosidade do sistema. Isso também ocorre quando a concentração da solução aumenta, já que esses três parâmetros estão interligados entre si (HAIDER; HAIDER; KANG, 2018; PILLAY et al., 2013; SANKARAN; DESHMUKH; AHAMED, 2019). É importante encontrar a concentração ideal para cada solução, uma vez que soluções com altas concentrações podem gerar fibras na forma de fitas e soluções com baixas concentrações podem levar à deposição de gotículas ou fibras defeituosas, incluindo as fibras descontínuas, fundidas e com contas. O valor mínimo de concentração para fabricar fibras lisas e livres de defeitos depende principalmente da natureza da solução (HAIDER; HAIDER; KANG, 2018; PHAM et al., 2006; SALEHHUDIN et al., 2018; SANKARAN; DESHMUKH; AHAMED, 2019).

A condutividade elétrica da solução é outro parâmetro que influencia a morfologia das nanofibras e ocupa um papel importante na formação do cone de Taylor. Se a solução tem

condutividade baixa, a superfície da gota não terá nenhuma carga para formar um cone de Taylor e, portanto, não ocorrerá eletrofiação. Por outro lado, o aumento da condutividade da solução para um valor crítico não só aumentará a carga na superfície da gotícula, para formar o cone de Taylor, mas também causará diminuição no diâmetro da fibra (HAIDER; HAIDER; KANG, 2018; SANKARAN; DESHMUKH; AHAMED, 2019; SUN et al., 2013). Para aumentar a condutividade da solução e dar origem a fibras de boa qualidade, podem ser adicionados sais, íons, surfactantes ou polímeros condutores à solução do polímero base (HAIDER; HAIDER; KANG, 2018; PILLAY et al., 2013; SALEHHUDIN et al., 2018; SANKARAN; DESHMUKH; AHAMED, 2019).

A escolha adequada do solvente é fundamental para formação de nanofibras homogêneas e sem contas. Para isso, duas coisas devem ser levadas em conta. A primeira é a solubilidade do polímero e a segunda é a volatilidade do solvente (HAIDER; HAIDER; KANG, 2018; PILLAY et al., 2013; SANKARAN; DESHMUKH; AHAMED, 2019). Solventes voláteis são os mais utilizados no processo de eletrofiação, devido a sua rápida evaporação. Porém, é importante lembrar que solventes altamente voláteis promovem a secagem da solução dentro da agulha, o que pode ocasionar seu entupimento (HAIDER; HAIDER; KANG, 2018; LANNUTTI et al., 2007; PILLAY et al., 2013; SANKARAN; DESHMUKH; AHAMED, 2019; SILL; RECUM, 2008). Já a baixa volatilidade dos solventes pode ocasionar a formação de fibras com contas, pois a evaporação ocorrerá de forma lenta e incompleta (LANNUTTI et al., 2007; PILLAY et al., 2013; SILL; RECUM, 2008).

A tensão superficial da solução também desempenha um papel importante na morfologia das nanofibras formadas e também no sucesso do processo de eletrofiação (PHAM et al., 2006; TARUS et al., 2016). Soluções com elevadas tensões superficiais impedem e/ou dificultam a formação do cone de Taylor e consequentemente a formação do jato, uma vez que seria necessária uma voltagem muito alta para que a tensão superficial se rompesse e um jato estável fosse estabelecido (ZHANG; YUAN, 2005; ZUO et al., 2005).

A umidade relativa do ar e a temperatura são parâmetros pouco estudados, mas também afetam diretamente a morfologia das nanofibras, já que estão diretamente ligados com a evaporação do solvente (HAIDER; HAIDER; KANG, 2018; PHAM et al., 2006). De acordo com Wang et al. (2007) a temperatura possui forte influência na viscosidade da solução para eletrofiação, pois, conforme constataram, ao aumentar a temperatura da solução trabalhada, o diâmetro das fibras diminuiu. Segundo esses pesquisadores, isso ocorreu devido à redução da viscosidade e da tensão

superficial, além da maior condutividade da solução. A umidade relativa do ar, por sua vez, afeta o diâmetro das nanofibras regulando o processo de solidificação do jato de polímero (HAIDER; HAIDER; KANG, 2018; SANKARAN; DESHMUKH; AHAMED, 2019).

Desta forma, o objetivo deste capítulo foi determinar os melhores parâmetros para eletrofiação de membranas de PVA/AH, sabendo que a eletrofiação do AH ainda é um desafio a ser superado.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Preparo das soluções poliméricas

Dois sistemas foram estudados: No primeiro sistema PVA ($M_w \approx 130 \text{ kg mol}^{-1}$, 86.5–89.5% hidrólise, Vetec) foi dissolvido em água destilada (10% m/v) e agitado magneticamente a 80°C durante 2h. Já a solução de AH (Grau cosmético, Symbios, $M_w > 1.6 \text{ MDa}$, D-ácido glucurônico ≥ 45%, bacteriano, mais informações vide [ANEXO B](#) (3% m/v) foi preparada em meio aquoso de NaCl (1% m/v) sob agitação magnética à temperatura ambiente. A metodologia do segundo sistema foi semelhante ao do primeiro, porém a concentração de PVA foi de 6% m/v e a de AH foi de 2% m/v. Em ambos os processos a solução de PVA e AH foram misturadas em uma proporção de 25PVA:75AH, 50PVA:50AH e 75PVA:25AH, sob agitação vigorosa à temperatura ambiente durante a noite.

3.2.2. Caracterização das soluções poliméricas

A condutividade elétrica das soluções foi determinada por um medidor de condutividade Analion K0392 à 25°C. A viscosidade foi medida em um reômetro Haake RheoStress 1 a 25°C. A tensão superficial foi medida pelo método do anel em um Tensiômetro K6 Kruss.

3.2.3. Etapa de eletrofiação

As soluções para eletrofiação foram preparadas e carregadas em uma seringa de vidro de 10 mL com uma agulha de inox de 0,80 mm de diâmetro interno. A distância entre a ponta da

agulha e o coletor plano, envolto em folha de alumínio (10x30 cm), foi ajustada para 15 cm. Uma corrente de alta voltagem de 25 kV (CC) foi aplicada entre a agulha e o coletor para iniciar o jato da solução de polímero, e a vazão foi controlada por uma bomba de seringa. A taxa de alimentação que melhor se ajustou ao processo foi a de 0,3 mL/h. Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente e a umidade relativa de 20 a 30% controlada com o uso de um desumidificador.

3.2.4. Caracterização das membranas eletrofiadas

A escolha do melhor sistema foi determinada pela análise morfológica das membranas, que foi realizada através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), pela determinação do diâmetro médio das fibras, realizado com o auxílio do software ImageJ® e pela facilidade de processabilidade observada experimentalmente.

As análises de MEV foram realizadas na central analítica (LRAC – Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração) da Faculdade de Engenharia Química (FEQ) da UNICAMP. As amostras foram inicialmente recobertas com 200Å de ouro (Sputter Coater EMITECH, modelo K450) e posteriormente analisadas em um microscópio eletrônico de varredura (Modelo Leo 440i - LEO Electron Microscopy/Oxford).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Eletrofiar o AH em solução aquosa por um método convencional não é possível, pois esse polímero apresenta propriedades reológicas únicas, como alta viscosidade e alta tensão superficial. Porém, algumas alternativas podem ser escolhidas para contornar esses desafios, tais como utilizar solventes orgânicos ou uma mistura de outros polímeros na matriz com boas características de processabilidade. A utilização de solventes orgânicos foi evitada, uma vez que esses compostos são tóxicos na maioria das vezes, e podem degradar fármacos ou até mesmo a matriz polimérica, além de encarecerem o processo. A melhor opção foi misturar outro polímero biocompatível, inerte e que apresentasse boas propriedades biológicas e de processabilidade. Os resultados discutidos a seguir são baseados na mistura de soluções poliméricas de AH e PVA.

A combinação de algumas concentrações de soluções de PVA (10 e 6 %m/v) e AH (3 e 2 %m/v) foram realizadas para o estudo de 3 proporções dessas soluções (75PVA/25AH, 50PVA/50AH e 25PVA/75AH), com foco nas que apresentaram melhores resultados.

Tabela 3 – Parâmetros das soluções poliméricas para o processo de eletrofiação.

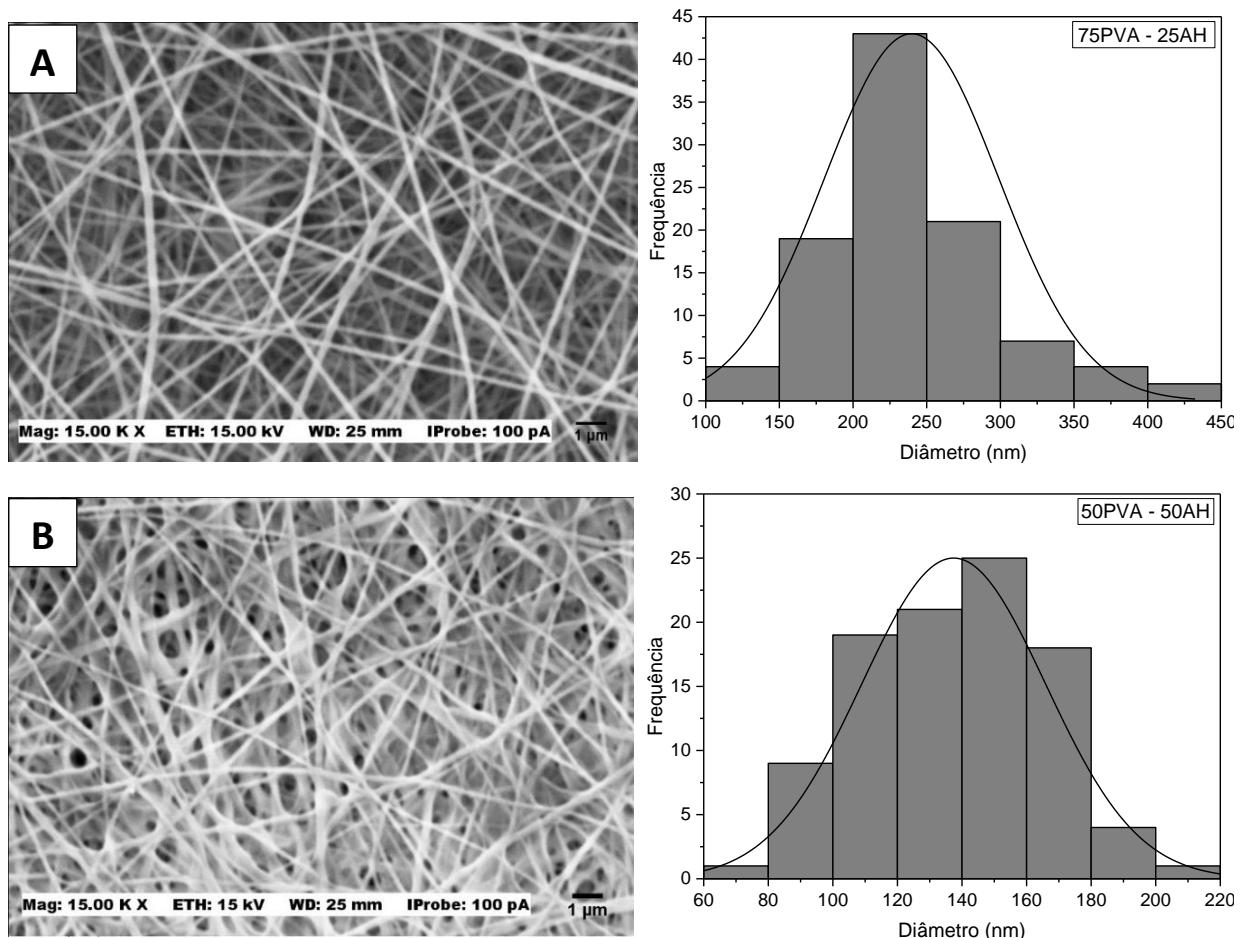
Concentração (m/v)	Proporção entre as soluções	Tensão Superficial (mN/m)	Condutividade Elétrica (mS/cm)	Viscosidade (cP)
PVA 10% AH 3%	75PVA/25AH	47±1	4,95±0,02	24200±174
	50PVA50AH	66±1	9,75±0,03	75750±500
	25PVA/75AH	80±1	14,73±0,03	110800±529
PVA 6% AH 2%	75PVA/25AH	45±1	5,43±0,01	2869±79
	50PVA/50AH	53±2	10,85±0,08	3510±61
	25PVA/75AH	59±1	15,56±0,02	4720±85

Inicialmente serão apresentados os resultados para as concentrações de 3% AH e 10% PVA. O estudo dos parâmetros reológicos mostrou que à medida que a proporção de AH aumentou, a viscosidade e a tensão superficial da solução aumentaram significativamente (Tabela 3). A escolha das concentrações das soluções foi planejada para serem as maiores possíveis, mas abaixo do ponto de gelificação. Porém, a solução de AH apresenta propriedades peculiares, por exemplo, o aumento de sua viscosidade não está associado ao maior emaranhamento de cadeias, como é necessário e normalmente ocorre com outras soluções poliméricas. Para que isso ocorra com AH, sua concentração crítica para promover o emaranhamento de cadeia (CEC) e a eletrofiação é muito alta, o que gera viscosidades extremamente altas e elevada tensão superficial, dificultando sua processabilidade (VIGANI et al., 2018a, 2018b, 2019). Por esse motivo, deve-se encontrar uma concentração que não ocasione instabilidade e que não resulte em nanofibras defeituosas.

A taxa de alimentação da solução durante a eletrofiação é um fator que afeta o processo de fabricação. Por isso, foram feitos alguns estudos para elucidar o efeito da taxa na processabilidade, escolhendo uma faixa de estudo entre 0,2 e 0,7 mL/h. Verificou-se experimentalmente que para estas condições de solução, uma vazão acima de 0,3 mL/h origina um jato instável. Assim, nesse estudo a taxa de alimentação foi fixada em 0,3 mL/h, a fim de aliar uma estabilidade do jato com um aumento da eficiência de produção. Em uma operação de eletrofiação típica, há uma janela

estreita de taxa de alimentação para o processamento ser bem-sucedido; isso porque o consumo da solução sendo eletrofiada deve ser limitado a uma certa faixa, a fim de manter o cone de Taylor na fieira.

A morfologia das fibras emaranhadas pode ser observada nas imagens de MEV (Figura 9). As fibras preparadas nas proporções de PVA/AH 75/25 e 50/50 apresentaram superfícies relativamente lisas e diâmetros uniformes, sem nenhuma estrutura de “conta”. Apesar de a proporção 50/50 apresentar um diâmetro de fibra menor, a instabilidade do processo com o aumento da proporção de AH aumentou significativamente. Então, avaliando a processabilidade e a morfologia de forma conjunta, à proporção que apresentou melhor desempenho foi a de PVA/AH 75/25.



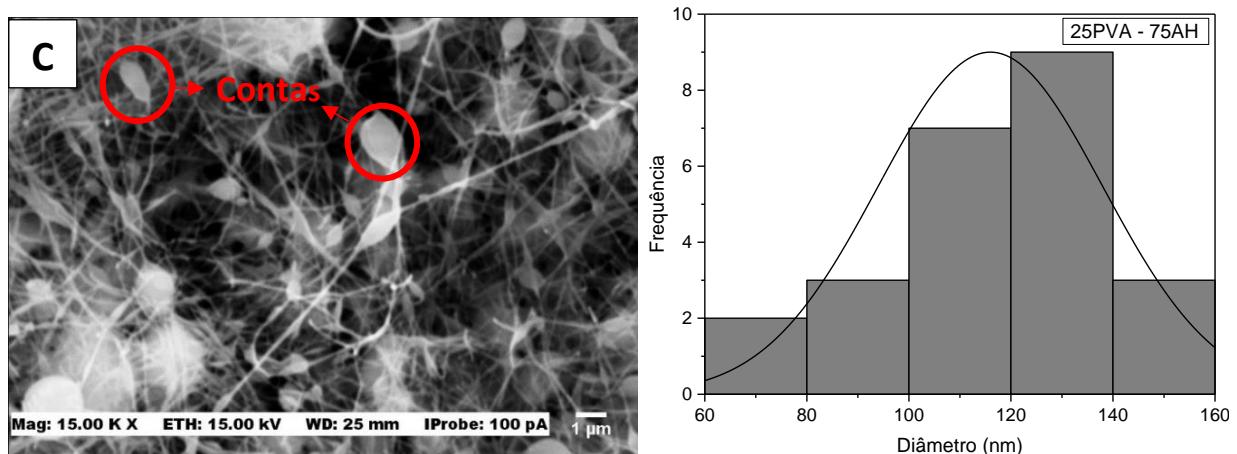


Figura 9 – Imagens de MEV e distribuição de diâmetro das nanofibras de PVA (10% m/v) e AH (3% m/v) nas proporções: (A) 75PVA/25AH, (B) 50PVA/50AH, (C) 25PVA/75AH.

Fonte: Da autora.

Com o auxílio do software *ImageJ®* uma estimativa do diâmetro médio das fibras foi também obtida (Tabela 4). A significância estatística foi calculada com uma ANOVA de fator único e com teste Tukey, onde um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Tabela 4 – Diâmetros médios das nanofibras obtidas no sistema PVA/AH.

	75PVA/25AH	50PVA/50AH	25PVA/75AH
Diâmetro Médio (nm)	240±60*	137±28*	116±22*

* Diâmetro médio estatisticamente diferentes.

O estudo envolvendo as concentrações 2% AH e 6% PVA apresentou comportamento diferente para as proporções, quando comparado com a combinação de concentração anterior. Para a proporção de 75PVA/25AH o processo se manteve estável; porém, para as demais proporções não houve estabilidade, o que refletiu na morfologia das nanofibras. Enquanto para a proporção 50/50 das concentrações anteriores (PVA 10% e AH 3%), foram obtidas fibras relativamente homogêneas, para as concentrações 2% AH e 6% PVA obteve-se fibras com muitos defeitos, possivelmente devido à alta viscosidade do AH que prevaleceu neste sistema. A proporção 75AH/25AH apresentou morfologia semelhante, porém para essa última combinação de

concentrações o processo foi ainda mais instável e, portanto, descontinuado. A morfologia das novas nanofibras pode ser observada na Figura 10.

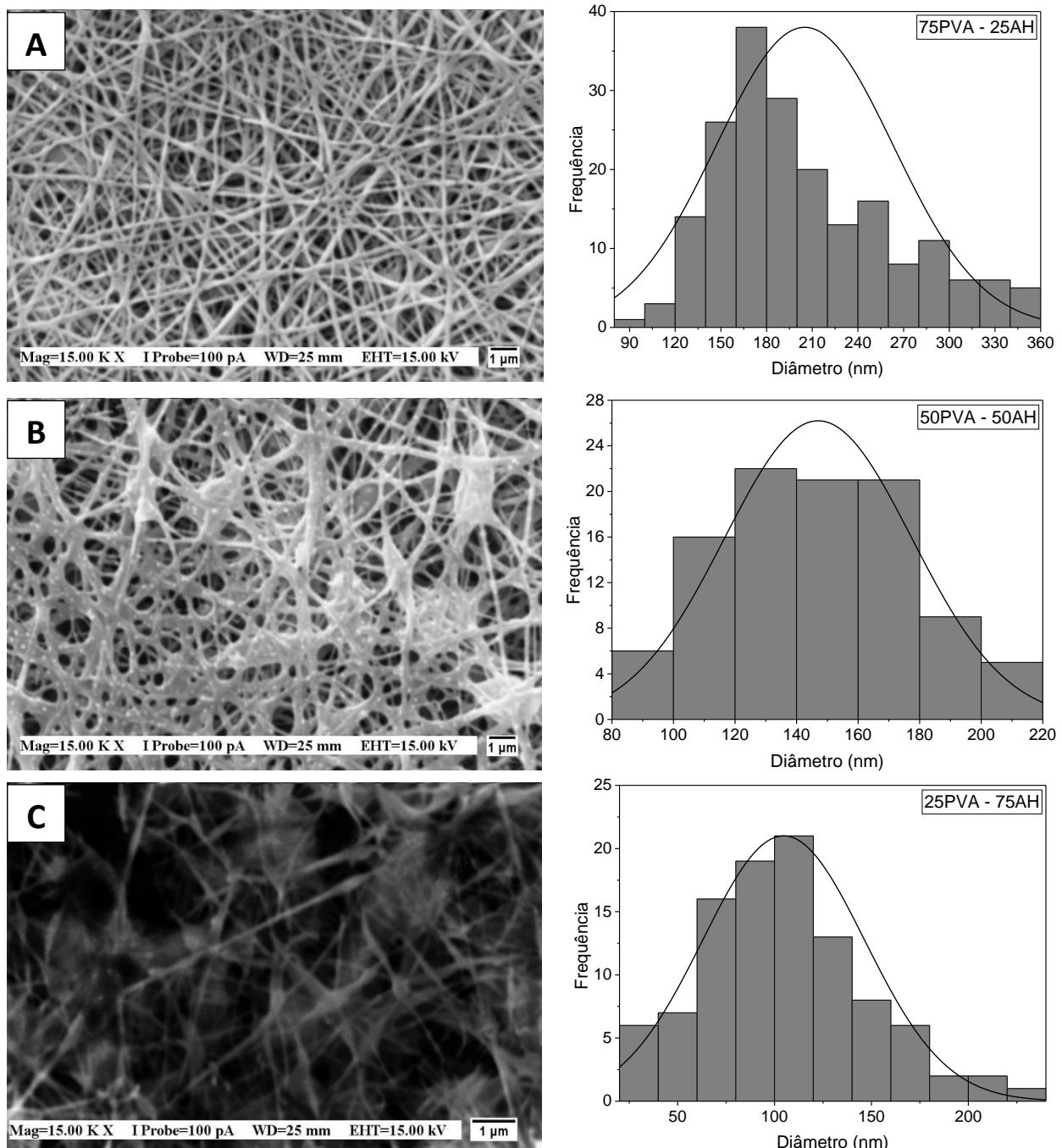


Figura 10 – Imagens de MEV e distribuição de diâmetro de nanofibras de PVA (6% m/v) e AH (2% m/v) nas proporções: (A) 75PVA/25AH, (B) 50PVA/50AH, (C) 25PVA/75AH.

Fonte: Da autora

Uma nova estimativa do diâmetro médio das fibras foi feita com base na morfologia das membranas (Tabela 5). A significância estatística foi calculada com uma ANOVA de fator único e com teste Tukey, onde um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Tabela 5 – Diâmetros médios das nanofibras obtidas no sistema PVA/AH.

	75PVA/25AH	50PVA/50AH	25PVA/75AH
Diâmetro Médio (nm)	205 ± 58	$147 \pm 30^*$	$104 \pm 41^*$

*Diâmetro médio estatisticamente diferente em relação ao diâmetro médio da amostra 75PVA/25AH.

De acordo com os resultados apresentados o diâmetro médio das amostras 50PVA/50AH e 25PVA/75AH são estatisticamente diferentes em relação a amostra 75PVA/25AH; no entanto, são iguais entre si. Do ponto de vista de processo, a formulação contendo 75PVA/25AH com concentrações de soluções de 2% AH e 6% PVA, apresentou maior estabilidade. Isso significa que o processo apresentou maior facilidade de reproduzibilidade, a solução não “espirrou” no coletor (fenômeno similar à eletropulverização), não houve a formação de curtos-circuitos, o que é bem comum na eletrofiação de ácido hialurônico em solução aquosa, tais fenômenos ocorreram nas formulações de 3% AH e 10% PVA.

De maneira geral, as nanofibras apresentaram um diâmetro coerente com os trabalhos encontrados na literatura. Shankhwar et al. (2015) encontraram um diâmetro de 107 nm para fibras de PVA (8% m/v), enquanto que o trabalho realizado por Quinn et al. (2018) obteve um diâmetro de fibra de aproximadamente 130 nm, para uma concentração de 9% m/v de solução de PVA. Nos experimentos envolvendo AH, autores como Young (2006) e Chen et al. (2016) obtiveram fibras de AH/PEO com um diâmetro variando entre 150 e 220 nm; os resultados mostraram que, para este sistema houve um aumento no diâmetro médio das fibras à medida que a quantidade de AH na solução diminuiu. Segundo Chen et al. (2016) isso pode ter ocorrido pelo fato do ácido hialurônico utilizado ser de baixa massa molar, o que provocou o aumento da densidade de carga das soluções. Com isso, forças de alongamento mais fortes foram impostas aos jatos, resultando em um menor diâmetro médio das fibras eletrofiadas, além disso, essas adições de AH ocasionaram a diminuição da viscosidade do sistema, o que pode ter melhorado a taxa de evaporação da solução de fiação, acelerando a etapa de formação das fibras no processo com concomitante diminuição de seu diâmetro médio. Já Young (2006), atribui esse comportamento à maior viscosidade da solução de

AH que sobrepuja à viscosidade relativamente baixa da solução de PEO; deste modo, a viscosidade total da solução aumentou com a concentração de AH, dificultando estabelecer um consenso.

No presente estudo, o AH de alta massa molar aumentou a viscosidade, a condutividade elétrica e a tensão superficial e consequentemente diminuiu o diâmetro médio das fibras, o que nos levou a concluir que a avaliação de um único parâmetro não é suficiente para se determinar as propriedades finais de um sistema, ainda mais quando se trata de um polímero com características tão peculiares, como é o caso do AH. Além disso, é importante ressaltar que a eletrofiação é um processo que pode abranger apenas uma faixa limitada de viscosidade da solução e tensão superficial, especialmente quando a intensidade do campo elétrico aplicado é limitada, ou seja, quando o sistema polimérico impõe um limite prático de operação, em que o uso de potenciais elétricos mais elevados costuma produzir faísca ou causar curto no equipamento. Isso significa, em outras palavras, que a eletrofiação de AH costuma não ultrapassar 20 kV. Neste experimento o campo elétrico aplicado foi de 25 kV, sendo que acima deste valor já foram observados os problemas acima relatados. Destaca-se que essa faixa estreita de parâmetros para tornar a eletrofiação convencional viável do AH ainda não foi encontrada.

Membranas obtidas por sistemas poliméricos baseados nos dois polímeros aqui estudados ainda não foram muito abordadas na literatura. Abdel-Mohsen et al. (2019) produziram membranas de PVA/hialuronano (AH) na presença de nanopartículas de prata (AgNPs), obtendo diâmetros médios de fibra entre 154 e 225 nm em diferentes proporções destes polímeros. À medida que a proporção de AH-AgNPs aumentou no sistema, houve estreitamento da distribuição de diâmetro e diminuição do diâmetro médio das fibras, ao mesmo tempo em que a processabilidade do sistema diminuiu. Os autores acreditam que esse efeito está ligado ao aumento de hialuronano na solução, o que levou ao aumento da carga na superfície do jato formado durante a eletrofiação, bem como o aumento expressivo da viscosidade do sistema.

Séon-lutz et al. (2019) obtiveram diâmetros médios de fibras variando de 120 a 348 nm para sistemas baseados em AH-PVA-HP β CD, em um estudo feito com base na variação da concentração de HP β CD. Ou seja, a inserção de outras moléculas pode alterar os resultados de um sistema, como no caso, devido a mudanças reológicas provocadas por esse novo componente.

3.4. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos experimentalmente, fica evidente que a eletrofiação do AH em solução aquosa ainda é um desafio, porém é viável e promissora quando os parâmetros se ajustam. Eletrofiar apenas AH em solução aquosa se mostrou inviável, mas existem alternativas que nos possibilitam inserir esse polímero no sistema preservando suas propriedades biológicas. De maneira geral houve a formação de nanofibras para todas as formulações; no entanto, as proporções com maiores quantidade de AH (25PVA/75AH) apresentaram nanofibras com defeitos e um processo completamente instável.

A proporção 75PVA/25AH garantiu uma maior estabilidade do processo de eletrofiação, quando comparada com as proporções testadas, assim como as concentrações de PVA a 6% e AH a 2%. Portanto, a formulação com PVA 6% e AH 2% com a proporção 75PVA/25AH foi escolhida para dar continuidade a este trabalho, por apresentar maior estabilidade de processo e um diâmetro médio de fibra adequado para as aplicações desejadas.

CAPÍTULO 4
Estudo da reticulação das membranas

4.1. INTRODUÇÃO

Uma preocupação da atualidade é a utilização de metodologias que tornem os processos capazes de reduzir ou eliminar o uso e a geração de substâncias nocivas ao ser humano e ao meio ambiente como um todo. A eletrofiação é um processo que majoritariamente utiliza de solventes orgânicos para reduzir a tensão superficial de muitas soluções poliméricas. Tais solventes apresentam volatilidade que favorecem a formação de nanofibras; por outro lado, apresentam a desvantagem de serem altamente tóxicos aos sistemas biológicos e encarecerem o processo. Assim, a procura por alternativas viáveis se faz necessária.

O AH e o PVA são polímeros altamente solúveis em água e permitem a eletrofiação das suas soluções poliméricas utilizando este meio como solvente. Deste modo, membranas altamente biocompatíveis e biodegradáveis são obtidas com toxicidade praticamente nula; no entanto, o processo de eletrofiação apresenta maior instabilidade neste caso, devido à alta viscosidade e à alta tensão superficial do AH. Adicionalmente, a solubilidade dos materiais resultantes em pH fisiológico é instantânea, o que inviabiliza sua utilização como nanocarreadores de princípios ativos, bem como reduz sua eficiência em processos de cicatrização.

Normalmente, para a aplicação *in vivo*, são necessários materiais com taxas de degradação controláveis. Por exemplo, materiais com um tempo de degradação de 25 dias são adequados para a cicatrização de feridas agudas (queimadura e excisão de pele) e com um tempo de degradação de 8 semanas são adequados para a cicatrização de feridas crônicas (úlcera diabética, úlcera de pressão) (XU et al., 2009). Portanto a reticulação é uma alternativa que soluciona esses problemas e tem se destacado nos processos envolvendo principalmente o AH.

A reticulação por reação de esterificação é um processo simples e amplamente utilizado, na área de materiais poliméricos, e assim para reticulação de PVA e de AH (COLLINS; BIRKINSHAW, 2013; LIOU; WANG, 1996; SNETKOV et al., 2019; TRUONG et al., 2017). Neste último, a esterificação pode ocorrer tanto pelos grupos carboxilas, quanto pelos grupos hidroxilas, isso dependerá do agente de reticulação escolhido e das condições de reação (SELYANIN et al., 2015; TROMBINO et al., 2019). No caso do PVA essa reação ocorrerá em sua maioria pelos grupos hidroxilas.

Nesse capítulo realizamos reticulação química via reação de esterificação utilizando Anidrido Maleico (MA), bem como uma etapa de fotoreticulação com Irgacure 2959. Na literatura

já foi relatado que apenas o campo elétrico e a temperatura, gerados pelo processo de eletrofiação, são suficientes para promover a reação de esterificação entre o PVA e o MA (YANG; QIN; WANG, 2008). Portanto a fotoreticulação após o processo de eletrofiação foi uma etapa para garantir a reação completa, evitando qualquer resíduo remanescente. Abaixo estão exemplificadas as reações que podem ocorrer neste processo (Figura 11).

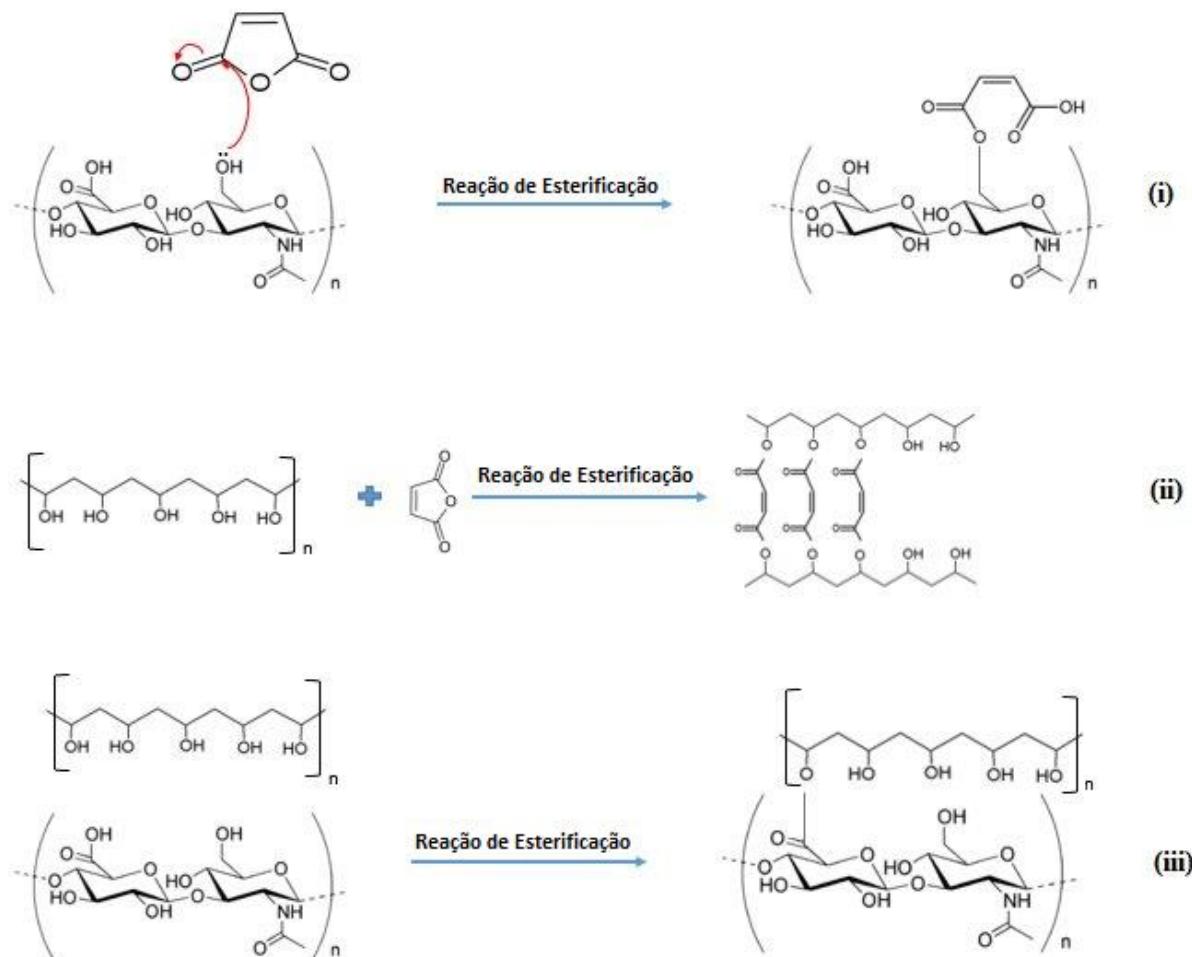


Figura 11 – Representação esquemática de possíveis reações de esterificação entre (i) AH e MA, (ii) PVA e MA, (iii) PVA e AH.

Fonte: Da autora

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1. Preparo das soluções

Baseado nos resultados do Capítulo 3, a solução com maior desempenho no processo de eletrofiação foi a de PVA (6% m/v) e AH (2% m/v) na proporção de 75% de solução de PVA para 25% de solução de AH, então as etapas de reticulação foram feitas somente para esta formulação. As soluções poliméricas foram preparadas de acordo com a metodologia do item [3.2.1. \(Cap. 3\)](#), com a adição de anidrido maleico (MA, $M_w \approx 98 \text{ g mol}^{-1}$, 98%, Dinâmica) (5%, 15%, 30% relativos a massa de PVA e AH) e de 1-[4-(2-Hydroxyethoxy)-phenyl]-2-hydroxy-2-methyl-1-propane-1-one (Irgacure 2959, 98%, $M_w = 224.25 \text{ g mol}^{-1}$, Sigma Aldrich) (5% relativos a massa de PVA e AH) à solução final, sob agitação vigorosa e à temperatura ambiente por 24 horas.

4.2.2. Caracterização das soluções poliméricas

As soluções poliméricas foram caracterizadas de acordo com o item [3.2.2. \(Cap. 3\)](#), mudando apenas o *spindle* na medida de viscosidade.

4.2.3. Etapa de eletrofiação

A etapa de eletrofiação ocorreu de forma similar ao item [3.2.3. \(Cap. 3\)](#). Como a adição do agente reticulante diminuiu a viscosidade e a tensão superficial das soluções poliméricas, a vazão utilizada variou de 0,3 mL/h até 0,7 mL/h, indo da menor concentração de agente reticulante para maiores concentrações, respectivamente. Similar comportamento foi observado para voltagem, que variou de 20 kV a 25kV.

4.2.4. Fotoreticulação

Para ativar a reação de fotoreticulação nas nanofibras, todas as membranas foram colocadas em um reator de luz ultravioleta (BLACK LIGHT 8W F8T5BL - 300mm a 365nm - PHILIPS) por

40 min em atmosfera de nitrogênio, e a seguir armazenadas em um dessecador em temperatura ambiente para posterior análise.

4.2.5. Caracterização das membranas eletrofiadas

As membranas foram caracterizadas por MEV, FTIR (Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier) e grau de intumescimento. A análise de MEV seguiu a metodologia do item [3.2.4. \(Cap. 3\)](#).

Os espectros de infravermelho foram coletados em um espectrômetro (Thermo Scientific - Nicolet 6700 - Madison/EUA) e registrados de 500 a 4000 cm⁻¹. A ocorrência da reação de esterificação (*crosslinking*) e interações inter- e intramoleculares entre os polímeros foram caracterizadas pela presença de grupos funcionais característicos de AH e PVA nas membranas.

Para o ensaio de intumescimento, as membranas secas foram inicialmente pesadas e imersas em PBS 7,4 por 72 horas, à temperatura ambiente, para atingir o grau de intumescimento de equilíbrio. Antes de medir o peso das amostras intumescidas, o excesso de água na superfície foi cuidadosamente removido por meio de papel de filtro. A razão de intumescimento foi calculada seguindo a norma ASTM 471, da seguinte forma:

$$\%Intumescimento = \frac{w_t - w_0}{w_0} \times 100 \quad (4.1)$$

Onde w_t e w_0 são os pesos das amostras intumescidas e secas, respectivamente.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Tabela 6 mostra os parâmetros das soluções poliméricas para o processo de eletrofiação após a adição do agente de reticulação (MA), que desempenha um papel importante nas propriedades das nanofibras formadas. Portanto, discutimos cuidadosamente seus efeitos na morfologia das nanofibras obtidas neste trabalho.

Tabela 6 – Parâmetros das soluções poliméricas para o processo de eletrofiação de PVA/AH com agente de reticulação MA.

Amostras	Tensão Superficial (mN/m)	Condutividade elétrica (mS/cm)	Viscosidade (cP)
5% MA	41,8±0,8	6,0±0,1	212±1
15% MA	39,3±0,6	10,8±0,2	167±2
30% MA	32,3±0,6	15,3±0,2	124,5±0,3

A adição de MA à solução polimérica melhorou os parâmetros de eletrofiação; ou seja, diminuiu a voltagem aplicada, que era inicialmente de 25 kV e mudou para 20 kV, e melhorou o fluxo de ejeção da solução, que passou de 0,3 mL/h para 0,7 mL/h, devido à redução da viscosidade e da tensão superficial das soluções, facilitando seu escoamento e dando origem a um sistema mais homogêneo e sem defeitos. A adição deste reticulante também aumentou a condutividade elétrica da solução, gerando cargas superficiais suficientes para a geração do cone de Taylor e, consequentemente, a formação de um jato estável. Destaca-se que acima de 30% do agente reticulador não é mais possível eletrofiar a solução, resultando em um fenômeno semelhante ao da eletropulverização, ou seja, a deposição de pequenas gotículas no coletor.

As fotomicrografias de MEV mostraram que o aumento da concentração de MA diminuiu o diâmetro das nanofibras (Tabela 7) e tornou a distribuição do diâmetro mais homogênea (Figura 12). Embora os diâmetros médios não sejam estatisticamente diferentes entre si, é possível observar uma tendência de redução do diâmetro da fibra para alta concentração de reticulador (Tabela 7). Além disso, foi possível observar uma maior interconexão das nanofibras com o aumento da concentração do reticulador, sugerindo que a porosidade da membrana também diminuiu. No entanto, estudos adicionais sobre a distribuição do tamanho dos poros precisam ser investigados.

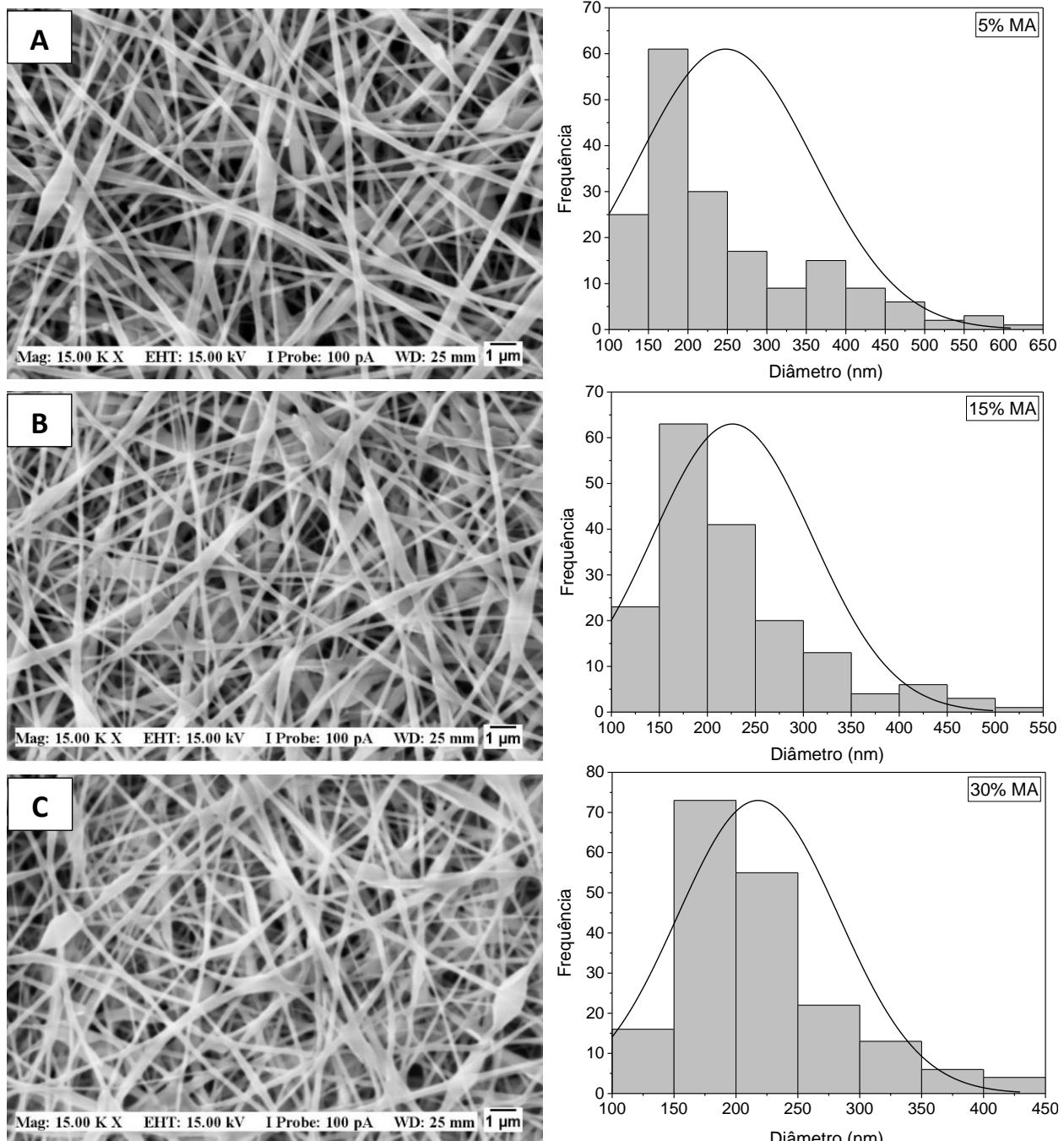


Figura 12 – Imagens de MEV e distribuição dos diâmetros das nanofibras das membranas de PVA/AH com diferentes concentrações de MA (A) 5%, (B) 15% e (C) 30%.

Fonte: Da autora

A significância estatística entre os diâmetros médios foi calculada com uma ANOVA de fator único e o teste Tukey, onde um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Tabela 7 – Diâmetro médio das nanofibras de PVA/AH após a adição de diferentes concentrações de MA.

	5% MA	15% MA	30% MA
Diâmetro (nm)	247±101*	226±83*	217±65*

*Diâmetro médio estatisticamente diferente comparados com o diâmetro médio da amostra sem agente de reticulação

Séon-Lutz et al. (2019) encontraram semelhante diâmetro médio de fibra (348 ± 51 nm) em seu estudo com a adição de EDC e NHS como reticulante da membrana PVA-AH-HP β CD, porém com um sistema de eletrofiação modificado. Já no trabalho desenvolvido por Abdel-Mohsen et al. (2019) o diâmetro médio das fibras foi relativamente menor para um sistema PVA/AH-AgNPs (225 nm). Nesse caso, dois pontos devem ser levados em consideração; primeiro, o sistema de eletrofiação foi modificado e a tensão utilizada foi de 58 kV; segundo, o hialuronano (AH) serviu apenas como agente redutor e estabilizador para a formação de nanopartículas de prata, o que explica sua baixa concentração na composição.

A análise de FTIR (Figura 13) foi importante para confirmar que a reação de reticulação ocorreu entre as cadeias de PVA e AH e também os efeitos da concentração do reticulante seguindo os grupos funcionais e as ligações presentes nas amostras.

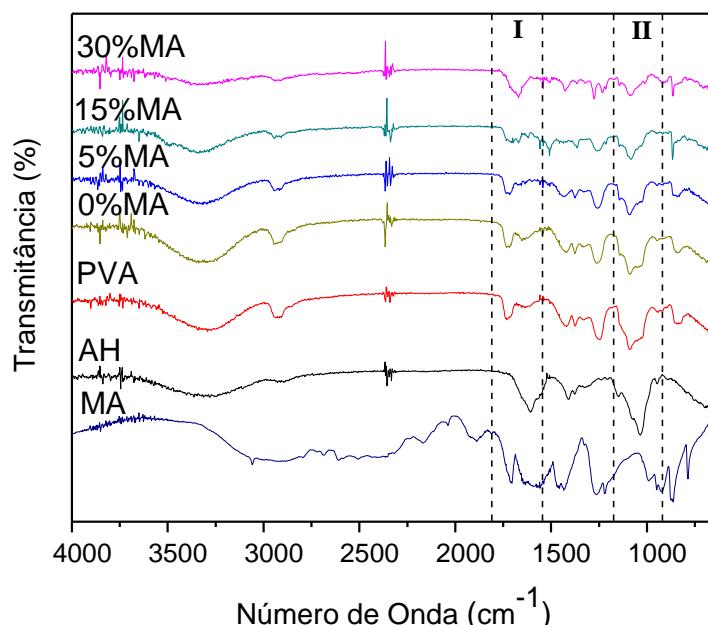


Figura 13 – Espectros de FTIR das membranas PVA/AH com diferentes concentrações de MA.

Fonte: Da autora

O espectro revelou as principais bandas relacionadas ao PVA e AH, como esperado, por se tratar dos polímeros que compõem a membrana. A banda larga em torno de 3200-3500 cm⁻¹ está relacionada aos estiramentos da ligação -OH e também da ligação -NH, pois à medida que o processo de reticulação aumenta com a adição de maiores concentrações de MA, a intensidade desta banda diminui (SÉON-LUTZ et al., 2019; ZEYTUNCU et al., 2015). A banda fraca próxima a 2900 cm⁻¹ atribuída ao alongamento da vibração -CH, também muda durante o processo de reticulação. Bandas características entre 1600 e 1700 cm⁻¹ estão relacionadas ao alongamento da ligação dos grupos carbonil amida (-R₁R₂N-C=O) e ácido carboxílico (-COOH) do AH (LARRAÑETA et al., 2018; ZHAO et al., 2015b). Algumas bandas características próximas a 1434 e 1089 cm⁻¹ para AH são devidas a vibrações de flexão de amida do tipo -N-H e de curvatura -C-O-C-, respectivamente, enquanto a banda próxima a 1420 cm⁻¹ corresponde ao alongamento das ligações carboxila (DE OLIVEIRA et al., 2017; GILLI et al., 1994; SÉON-LUTZ et al., 2019). Todos os espectros mostram picos característicos de PVA próximos a 2945 cm⁻¹, 1734 cm⁻¹ e 1250 cm⁻¹, em relação aos grupos alquil, acetil e -C-O, respectivamente (GOHIL; BHATTACHARYA; RAY, 2006; RAI; BASAK, 2010). A reticulação foi evidenciada pelo pico em 1700 cm⁻¹ que é uma indicação clara da existência do alongamento -C-O-O- (Figura 13 – Região I) que é mais evidente em ambas as amostras de PVA/AH com concentrações de MA de 15 e 30% (MAJIDI; NEZAFATI; PAZOUKI, 2017; TRUONG et al., 2017; ZEYTUNCU et al., 2015). Outra evidência da reticulação foi a mudança de intensidade no pico de 1091 cm⁻¹, que também é relativa à reticulação entre o grupamento -OH da estrutura do PVA e o grupamento -C=O da molécula MA, dando origem a banda -COC- (Figura 13 – Região II) (MAJIDI; NEZAFATI; PAZOUKI, 2017; PINGRUI et al., 2000). Ainda, uma outra observação interessante foi o desaparecimento do pico em 1640 cm⁻¹, relacionado à ligação -C=C- da molécula MA, sugerindo sua presença na reação de fotoreticulação (LIOU; WANG, 1996).

As membranas foram submersas em solução de PBS 7,4 para verificar sua integridade (Figura 14a) e, conforme observado, aquelas com MA 0 e 5% se dissolveram instantaneamente, enquanto as de 15 e 30% permaneceram íntegras após 72 horas (Figura 14b). A Figura 14c mostra o comportamento de intumescimento das membranas MA de 15 e 30%. Curiosamente, nas primeiras 12 horas, a membrana de 15% MA aumentou 501%, enquanto 30% MA aumentou 296%. Porém, após 24 horas, a membrana de 30% MA atingiu cerca de 550% de porcentagem de intumescimento, sendo maior que a da membrana 15% MA, e se a manteve até 72 horas. Por outro

lado, a membrana de 15% MA passou a apresentar diminuição da taxa de inchaço, e aumentou 381% às 72 horas, sugerindo perda de peso. Sugere-se que neste caso a distância entre os pontos de reticulação foi maior e permitiu maior interação intermolecular entre os grupamentos –OH das cadeias do polímero em relação à interação com os grupamentos –OH da água. Portanto, o grau de reticulação desempenha um papel importante na cinética e estabilidade de absorção de água das membranas.

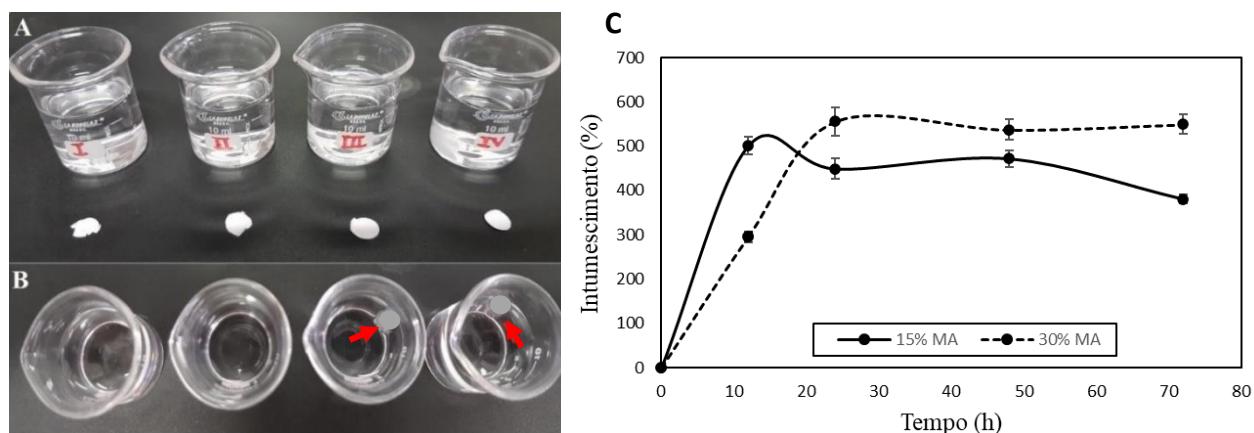


Figura 14 – Fotos ilustrativas das membranas antes (A) e depois (B) da imersão em solução de PBS 7,4 por 72 horas. Da esquerda para a direita: (I) 0% MA, (II) 5% MA, (III) 15% MA e (IV) 30% MA. (C) Comportamento de intumescimento de membranas 15% MA e 30% MA em 12, 24, 48 e 72 horas.

Fonte: Da autora

Este é um resultado importante para a aplicação de membranas em feridas com cicatrização prolongada. Conforme observado nas micrografias de MEV da Figura 15, as fibras mantiveram sua integridade; entretanto, ocorreram alguns pontos de coalescência e inchaço destas (círculos vermelhos indicados na Figura 15), principalmente após 72 horas. Séon-Lutz et al. (2019) encontraram resultados semelhantes após 48h, porém neste caso a reticulação foi ativada por temperatura na presença de EDC e NHS.

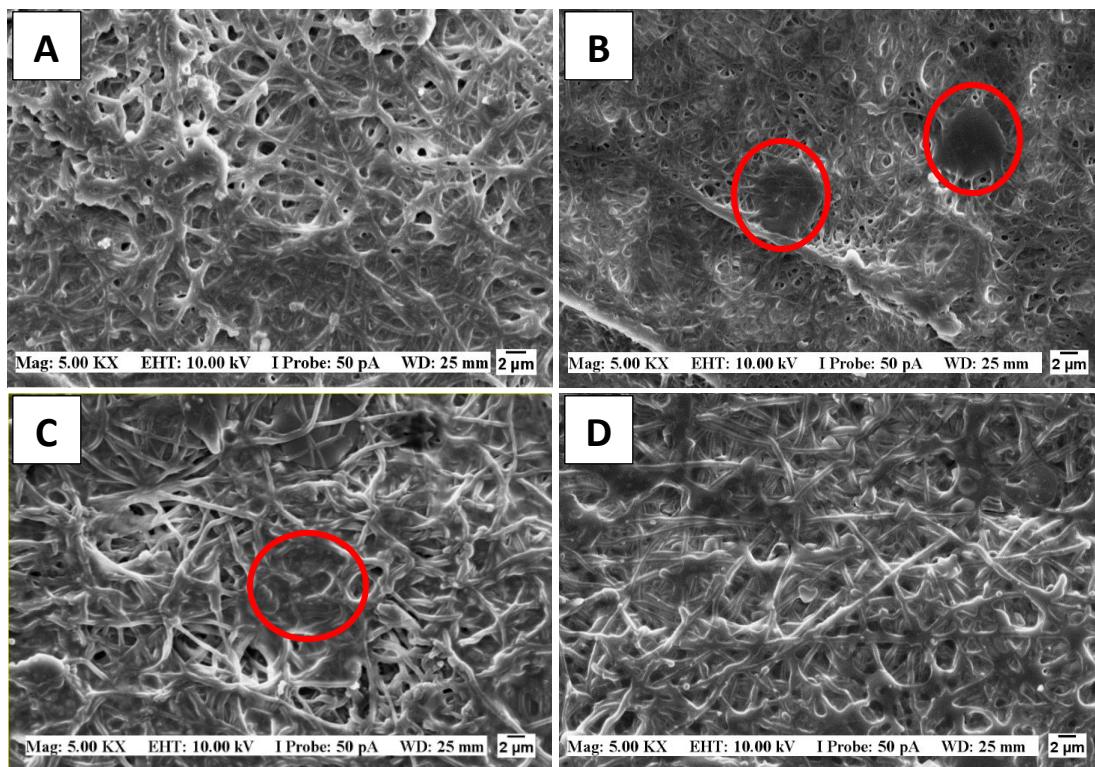


Figura 15 – Imagens de MEV das membranas PVA/AH: Após 48 horas de imersão (A) 15% MA, (B) 30% MA. Após 72 horas de imersão (C) 15% MA e (D) 30% MA.

Fonte: Da autora

4.4. CONCLUSÕES

A eletrofiação de membranas de PVA/AH foi bem-sucedida e a adição de um agente de reticulação (MA e Irgacure 2959) causou uma melhora efetiva nas propriedades da solução e nas condições do processo. Isso foi extremamente importante, especialmente para aumentar a taxa de ejeção da solução de polímero e diminuição na voltagem, o que está relacionado à economia de energia e ao tempo de produção da membrana. Foi possível obter nanofibras homogêneas sem a presença de “contas”, utilizando apenas água como solvente. A reação de reticulação completa ocorreu com a adição de 15 e 30% de reticulante, o que significa que a faixa de concentração deste entre 15 e 30% é interessante de se investigar, focando a aplicação em dispositivos modulados de liberação controlada com diferentes tempos de vida útil antes da degradação.

Visto que o sistema com 5% de agente reticulante não foi eficiente para o objetivo proposto, essa concentração foi descartada dos nossos propósitos de pesquisas futuras.

CAPÍTULO 5
Adição de Tanchagem e estudo da cinética de liberação

5.1. INTRODUÇÃO

A adição de um princípio ativo (fármaco) em uma matriz de transporte é uma etapa muito importante e exige alguns cuidados, tais como compatibilidade entre o fármaco e a matriz, de forma que ocorram interações secundárias entre as moléculas do fármaco e do material carreador, para garantir o tempo de residência do princípio ativo desejado na matriz. Entretanto, deve haver um balanço para que essas interações não inativem ou impeçam que o princípio ativo seja liberado. Além disso, a forma de encapsulamento também deve respeitar as propriedades do princípio ativo, não permitindo que ele seja degradado ou inativado.

Plantago major ou tanchagem, como é popularmente conhecida a planta que forneceu o princípio ativo escolhido para estudo, possui muitas propriedades medicinais conhecidas; dentre elas, destacaremos seu potencial antinflamatório, antibacteriano, coagulante e cicatrizante (ADOM et al., 2017).

Estudos mostraram que o extrato da planta apresenta compostos fenólicos em geral, flavonoides, taninos, alcaloides, esteróis insaturados, triterpenos, carboidratos, lactonas/ésteres, proteínas/aminoácidos, antraquinonas reduzidas, cumarinas e esteroides livres. Os polifenóis são os principais responsáveis pela cicatrização de feridas e por isso os ensaios de liberação foram baseados nesses compostos (ADOM et al., 2017; NAJAFIAN et al., 2018).

O estudo dos mecanismos e a cinética de liberação de um fármaco são de extrema importância. Assim, a aplicação de modelos matemáticos nos sistemas de liberação controlada *in vitro* é importante porque nos permite compreender o processo de liberação como um todo, bem como determinar o período de eficiência dos dispositivos projetados. Modelos como os propostos por Korsmeyer (1983), Peppas e Sahlin (1989) e Reis et al. (2007) são alguns dos principais para filmes/membranas nanocarreadoras.

O objetivo deste capítulo foi incorporar e estudar o mecanismo de liberação de extrato de tanchagem em membranas eletrofiada de PVA/AH.

5.2. MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1. Preparo das soluções poliméricas

O preparo das soluções poliméricas seguiu a metodologia do item [4.2.1. \(Cap. 4\)](#). Porém nessa etapa foi incorporado extrato de tanchagem (Tan, Padrão comercial, MagisPharma, Brasil) nas soluções poliméricas (15% e 25% relativos a massa total da solução polimérica) com diferentes concentrações de MA (0%, 15%, 30% relativos a massa de PVA e AH). A etapa de eletrofiação ocorreu seguindo a metodologia do item [4.2.3. \(Cap. 4\)](#), assim como a etapa de fotoreticulação (item [4.2.4.](#)). Informações sobre a tanchagem utilizada podem ser encontrada no [ANEXO A](#).

5.2.2. Caracterização das soluções poliméricas

As soluções poliméricas foram caracterizadas de acordo com o item [3.2.2. \(Cap. 3\)](#), mudando apenas o *spindle* na medida de viscosidade.

5.2.3. Caracterização das membranas eletrofiadas

As membranas foram caracterizadas por MEV e FTIR.

5.2.4. Ensaio de liberação *in vitro*

A liberação *in vitro* foi baseada na medida de polifenóis e quantificada pela curva padrão de ácido gálico utilizando um comprimento de onda a 760 nm. Membranas contendo 25% de tanchagem foram cortadas nas dimensões de 2 × 1 cm e submersas em 2,0 mL de solução PBS (pH 7,4) à 37°C, sob agitação de 40 rpm. Em períodos de tempos pré-determinados (0,25, 0,75, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 12 e 24 horas), alíquotas de 1,0 mL da solução foram retiradas para determinação da concentração de ácido gálico. A cada alíquota retirada foi adicionado meio fresco para manter o volume do meio sempre constante.

Para as análises de fenóis totais utilizamos uma curva padrão de ácido gálico (padrão de fenol) em diferentes concentrações ($y=0,0092x-0,02$ $R^2=0,997$) (vide [APÊNDICE A](#)). O conteúdo

fenólico foi determinado em microgramas equivalentes de ácido gálico ($\mu\text{gGAE/mL}$). Esta determinação do teor de fenóis totais foi feita utilizando o método já validado de Folin Ciocalteau (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999). Os fenóis totais presentes nas plantas são desprotonados em meio básico, gerando ânions que sofrem uma reação de oxirredução com o reagente de Folin (que contém molibdênio) que se reduz, mudando a cor do meio reacional de amarela para azul, alterando assim a absorção de radiação do composto. O procedimento experimental consistiu na mistura de 300 μL da alíquota de liberação, com 300 μL do reagente Folin Ciocalteau e 2,4 mL de bicarbonato de cálcio, a mistura foi agitada e colocada em local escuro durante 20 minutos, antes da leitura no UV-visível (760 nm).

5.2.5. Modelagem matemática do perfil de liberação

A aplicação de modelos matemáticos nos sistemas de liberação controlada *in vitro* foi bastante útil para complementar e entender as informações relativas aos mecanismos de liberação de tanchagem pela matriz polimérica utilizada (PVA/AH). A modelagem para este estudo foi bem descrita e detalhada nos parágrafos a seguir, para que a compreensão do estudo não seja comprometida.

Partindo desse ponto, temos que no tempo zero, 2 mL de solvente puro foram injetados dentro de um leito vazio contendo uma membrana carregada de fármaco com uma concentração denominada q_0 . Após um tempo pré-determinado, 1 mL da solução foi retirado do leito para análise (amostragem) e 1 mL de solvente puro foi imediatamente injetado no leito para manter constante o volume da solução. O processo de retirar 1 mL de amostra e injetar 1 mL de solvente puro foi repetido também nas próximas vezes predeterminadas durante 24 h. Sabe-se que todo o processo é um sistema com possibilidade de abertura devido à necessidade periódica de coleta de amostra e injeção de solvente puro. No entanto, o processo no intervalo de tempo entre o tempo de injeção e o tempo de amostragem subsequente é um sistema fechado. Assim, em vez de desenvolver um único modelo para todo o processo como um sistema aberto, foi desenvolvido um único modelo para cada sistema fechado. Desta forma, temos que desenvolver modelos de N_{inj} , onde N_{inj} é o número de injeções.

As principais premissas para cada modelo são (SIEPMANN; SIEPMANN, 2012): o fármaco é um único componente cujo tamanho é muito menor do que a espessura da membrana; a

distribuição inicial do medicamento dentro da membrana é homogênea; a transferência de massa dentro da membrana é unidimensional e seu mecanismo é a difusão; a resistência de transferência de massa externa na solução é desprezada; o coeficiente de difusão efetivo dentro da membrana é constante; a membrana não incha nem se dissolve e sua geometria permanece inalterada; o volume da solução é constante; os tempos necessários para amostragem e injeção são ignoráveis; e há um equilíbrio termodinâmico na interface membrana-solução baseado na isoterma de Langmuir (RODRIGUES et al., 2020).

De acordo com as suposições acima, cada sistema fechado foi modelado pelas equações que seguem abaixo. Para minimizar o custo computacional, apenas metade da membrana foi modelada e a concentração do fármaco na outra metade foi calculada pela simetria.

Considere-se a lei da conservação da massa dentro da membrana:

$$\frac{\partial q}{\partial t} = D_e \frac{\partial^2 q}{\partial z^2} \quad (5.1)$$

Onde q é a concentração do fármaco na membrana ($\mu\text{g/ml}$), D_e é o coeficiente de difusão efetivo do fármaco na membrana (cm^2/h), t é o tempo (h), e z é a coordenada espacial ao longo da espessura da membrana, cuja origem está localizada no centro da membrana (cm). As condições iniciais e de contorno para a equação diferencial parcial (EDP) acima são representados como segue:

$$z = 0 \text{ (centro da membrana)} \Rightarrow \frac{\partial q}{\partial z} = 0 \quad (5.2)$$

$$z = \frac{L}{2} \Rightarrow q = \frac{Kq_{max}C}{1 + KC} \quad (5.3)$$

$$t = t_i \Rightarrow q = q_i \quad (5.4)$$

Onde K e q_{max} são as constantes de Langmuir, t_i é o tempo de injeção do solvente (h), L é a espessura da membrana (cm) e q_i é o perfil de concentração do fármaco na membrana logo após a injeção do solvente ($\mu\text{g/ml}$). Para o primeiro sistema fechado, q_i é independente de z e é igual a q_0 , enquanto q_i para cada outro sistema fechado é dependente de z e é igual ao valor final de q do sistema fechado anterior.

Na sequência, a Lei da Conservação de Massa para a solução é dada por:

$$V \frac{dC}{dt} = -2D_e A \frac{\partial q}{\partial z} \Big|_{z=\frac{L}{2}} \quad (5.5)$$

$$\frac{\partial q}{\partial z} \Big|_{z=\frac{L}{2}} = \frac{\frac{Kq_{max}C}{1+KC} - q \Big|_{z=\frac{L}{2}-\Delta z}}{2\Delta z}$$

Onde, C é a concentração do fármaco na solução ($\mu\text{g/ml}$), V é o volume da solução (cm^3) e A é a área da superfície de transferência de massa da membrana (cm^2).

A condição inicial para a Eq. (5.5) é a seguinte:

$$t = t_i \Rightarrow C = C_i \quad (5.6)$$

Onde C_i é a concentração do fármaco na solução logo após a injeção do solvente ($\mu\text{g/ml}$). Para o primeiro sistema fechado, C_i é igual a zero, enquanto C_i para cada sistema fechado é igual à metade do valor final de C do sistema fechado anterior, porque a cada processo de injeção de amostragem, metade do volume da solução concentrada é substituída por solvente puro.

O fármaco liberado é calculado da seguinte forma:

$$\begin{aligned} \text{Fármaco liberado} &= \left(\frac{q_0 LA - \int_{-\frac{L}{2}}^{\frac{L}{2}} qAdz}{q_0 LA} \right) \times 100 \\ \text{Fármaco liberado} &= \left(\frac{q_0 LA - 2 \int_0^{\frac{L}{2}} qAdz}{q_0 LA} \right) \times 100 \\ \text{Fármaco liberado} &= \left(1 - \frac{2}{q_0 L} \int_0^{L/2} qdz \right) \times 100 \end{aligned} \quad (5.7)$$

Onde q_0 é a concentração inicial do medicamento dentro da membrana ($\mu\text{g/ml}$).

Estratégia de Solução:

O método das diferenças finitas é usado para expandir a segunda e a primeira derivadas parciais de “ q ” em relação a “ z ” nas Eqs. (5.1) e (5.5), respectivamente. Consequentemente, as duas equações acima são convertidas em $n_z + 1$ equações diferenciais ordinárias (EDOs), n_z EDO para q e uma EDO para C , ambos em relação a t . Aqui, n_z é o número de nós no domínio espacial da membrana. Esse conjunto de EDOs foi resolvido usando a caixa de ferramentas EDO do software MATLAB. O valor numérico de n_z (1000) deve ser alto o suficiente para que o aumento adicional de seu valor não tenha nenhum impacto nos resultados do modelo.

Os valores numéricos de K , q_{max} e D_e foram determinados de forma que os resultados do modelo de tanchagem liberada se aproximasse dos dados experimentais correspondentes. Na linguagem da matemática, essas três constantes foram obtidas de forma a minimizar o erro médio relativo (EMR) com base na seguinte equação:

$$EMR = \frac{100}{N} \sum_{i=1}^N \left| \frac{Tanchagem\ liberada|_{Exp} - Tanchagem\ liberada|_{Model}}{Tanchagem\ liberada|_{Exp}} \right| \quad (5.8)$$

Onde N é o número total de dados experimentais. A minimização foi feita usando uma combinação do Algoritmo Genético (AG) e as técnicas de otimização Fmincon (EBRAHIMI; HATAMI; VERA, 2013) no software MATLAB®.

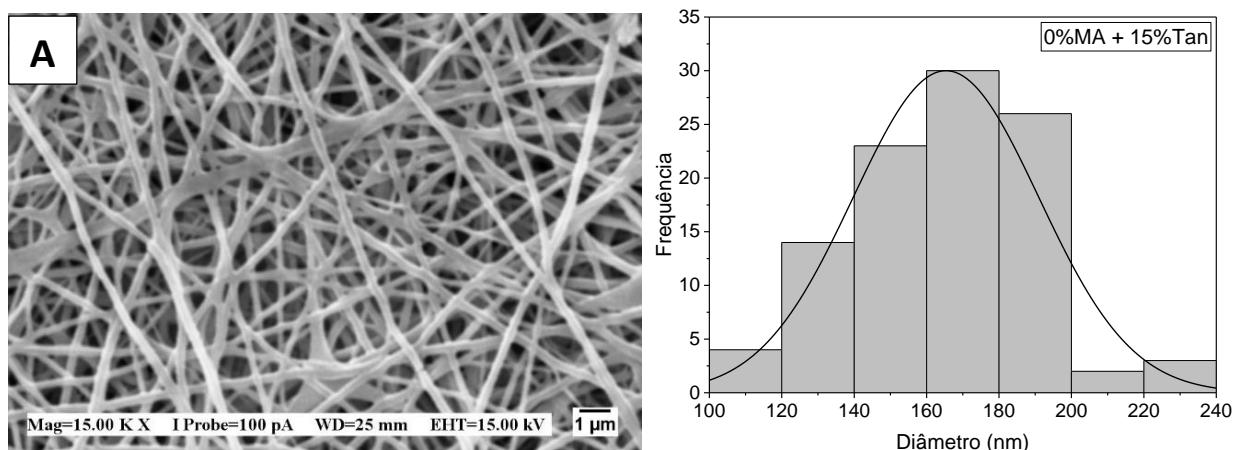
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

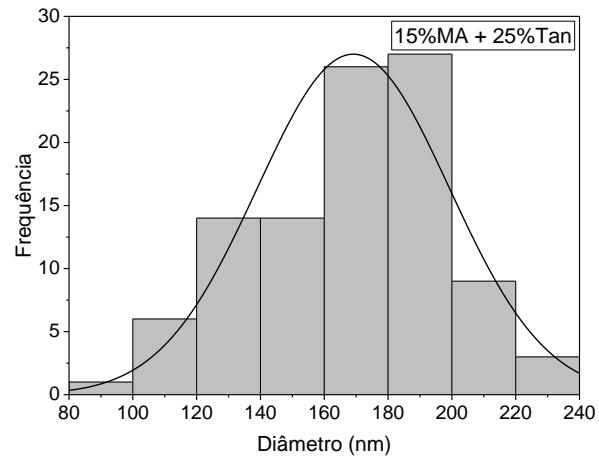
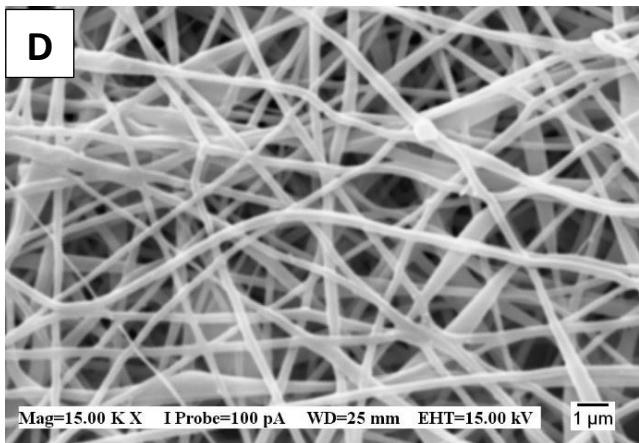
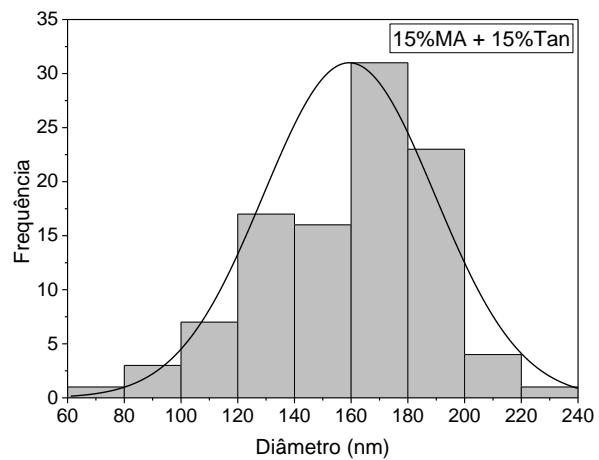
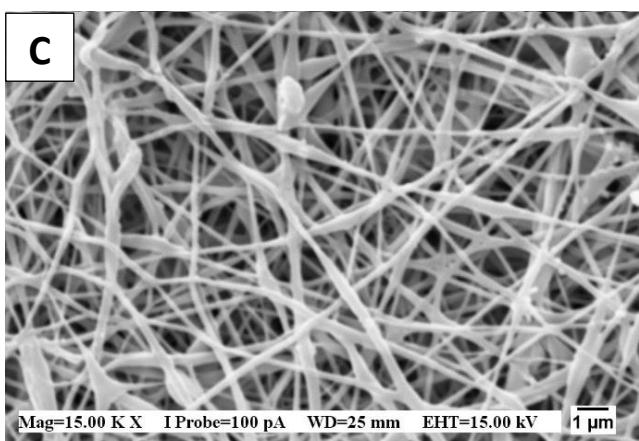
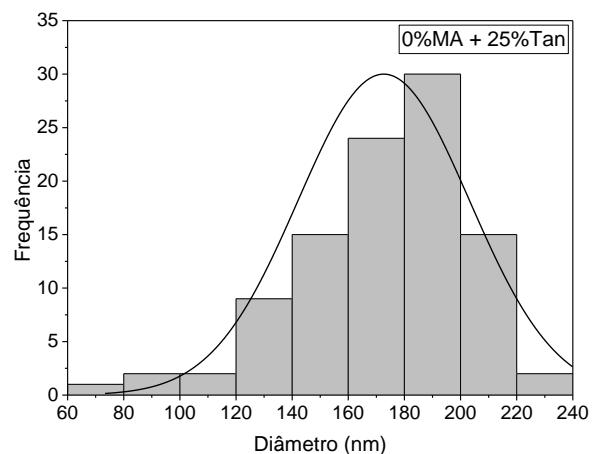
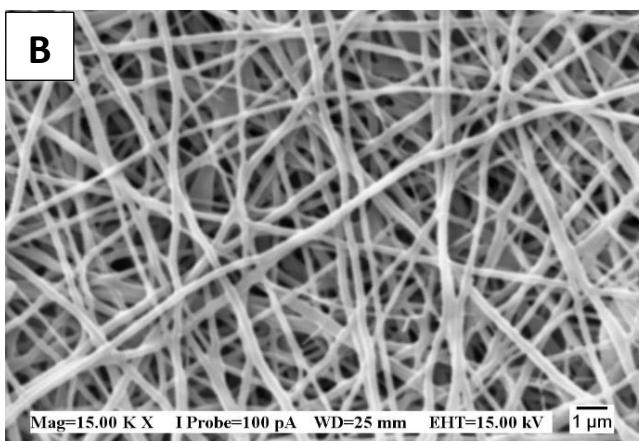
O estudo das propriedades das soluções (Tabela 8) mostrou que a adição de tanchagem afeta principalmente a viscosidade e a condutividade elétrica, mas mantém a tensão superficial praticamente inalterada quando comparada com as medidas da Tabela 6.

Tabela 8 – Parâmetros das soluções poliméricas para o processo de eletrofiação de PVA/AH com adição de tanchagem.

Concentração (m/v)	Amostras	Tensão Superficial (mN/m)	Condutividade Elétrica (mS/cm)	Viscosidade (cP)
PVA/AH 15% Tan	0% MA	41±1	3,4±0,1	704±6
	15% MA	39±1	8,9±0,1	143±2
	30% MA	40±1	10,7±0,1	96±1
PVA/AH 25% Tan	0% MA	41±1	3,8±0,1	606±9
	15% MA	42±1	8,0±0,1	115±1
	30% MA	41±2	9,9±0,2	68±1

Os valores encontrados para as propriedades corroboram com as análises morfológicas apresentadas na Figura 16. As nanofibras com adição da menor concentração de tanchagem (15% Tan) apresentam maior tendência para formação de defeitos, o que pode estar relacionado com a menor condutividade e maior viscosidade. De maneira geral a distribuição de diâmetros não apresentou grandes diferenças, quando comparada com as mesmas condições de reticulação, o que significa que todos os sistemas são promissores. Como a tanchagem é um princípio ativo natural, e que ainda não foi encapsulado em muitos sistemas para liberação, a determinação da sua concentração foi baseada em abordagens diferentes da apresentada neste trabalho. Assim, escolheu-se avaliar a melhor concentração por meio dos ensaios biológicos realizados.





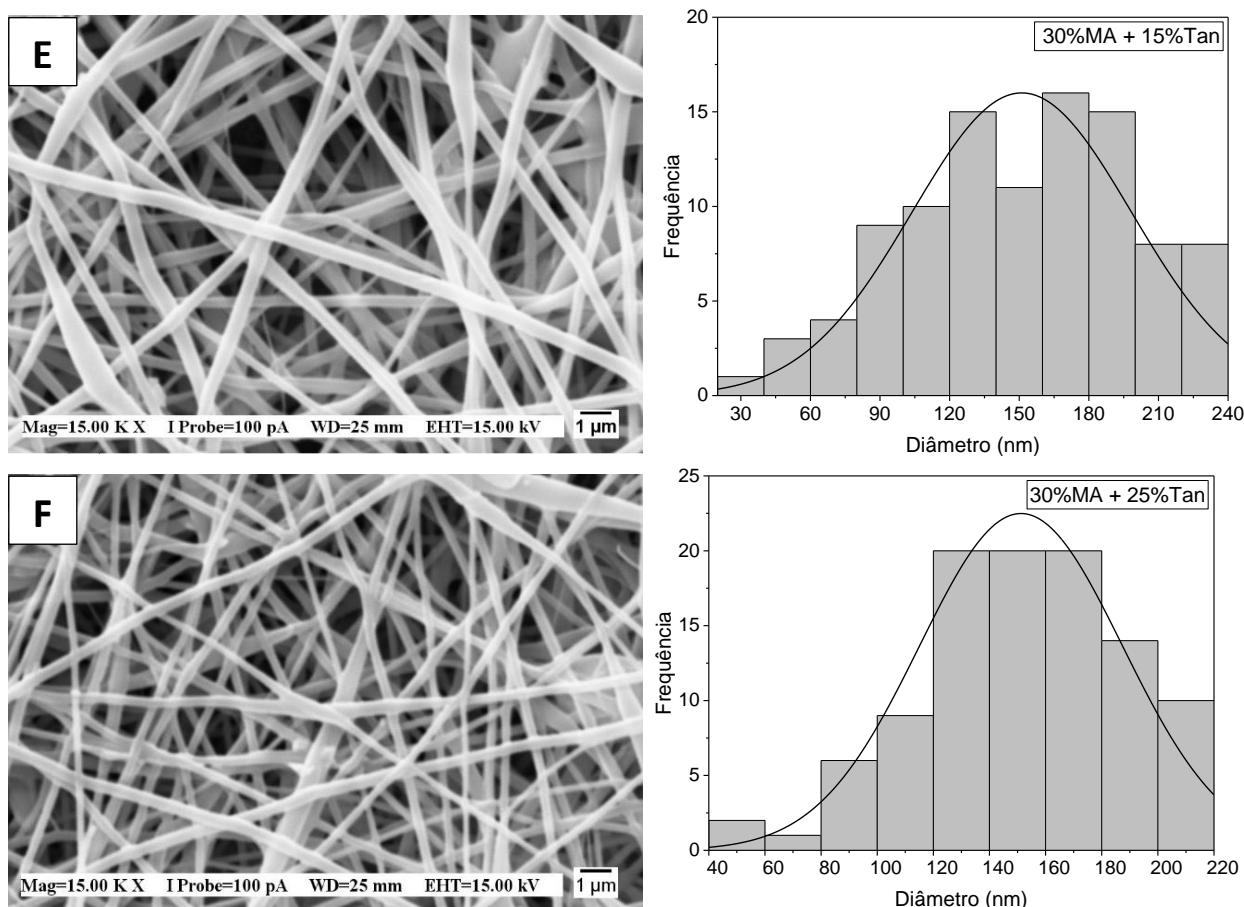


Figura 16 – Imagens de MEV e distribuição de diâmetro das nanofibras de PVA (6% m/v) e AH (2% m/v): (A) 0% MA – 15% Tan, (B) 0% MA – 25% Tan, (C) 15% MA – 15% Tan, (D) 15% MA – 25% Tan, (E) 30% MA – 15% Tan e (F) 30% MA – 25% Tan.

Fonte: Da autora

A significância estatística entre os diâmetros foi calculada com uma ANOVA de fator duplo e com o teste Tukey, onde um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. A ANOVA mostrou que tanto a concentração do agente de reticulação como a concentração de tanchagem influenciam no diâmetro das nanofibras, mas que a interação dos dois só influenciou no diâmetro final da amostra 15%MA (Tabela 9). Os diâmetros foram compatíveis com a aplicação desejada e com a literatura.

Séon-Lutz (2019) também encontrou diâmetro médio semelhante para o mesmo sistema polimérico, bem como Hussein (2020) que eletrofiou membranas de PVA/AH reticuladas com ácido cítrico e obteve um diâmetro médio de 120 ± 30 nm.

Tabela 9 – Diâmetros médios das nanofibras de PVA/AH carregadas com extrato de tanchagem e reticuladas com diferentes concentrações de MA.

[Tan] (v/v)	Diâmetro (nm)		
	0% MA	15% MA	30% MA
15%	165±25 [#]	159±30 [*]	151±47 [#]
25%	170±30 [#]	169±30 ^{*, a}	151±36 ^{#, a}

[#]Diferença estatística entre o diâmetro médio do mesmo grupo (mesma concentração de Tan); ^aDiferença estatística entre o diâmetro médio do mesmo grupo (mesma concentração de Tan); ^{*}Diferença estatística entre o diâmetro de grupos diferentes (diferentes concentrações de Tan)

O espectro FTIR da tanchagem está ilustrado na Figura 17. Pode-se observar que o espectro apresentou todas as bandas e picos típicos dos polissacarídeos. A área entre 800 e 1200 cm⁻¹ é conhecida como a área de “impressão digital” dos carboidratos (ALIZADEH BEHBAHANI et al., 2017). As absorções na faixa de número de onda de 950-1150 cm⁻¹ são atribuídas às vibrações das ligações C-O, C-O-C glicosídicas e C-O-H. O pico em 1648 cm⁻¹ é atribuído ao ν-COO assimétrico, enquanto o pico em 1423 cm⁻¹ é atribuído ao ν-COO simétrico. A faixa de número de onda de 3000 a 2800 cm⁻¹ está associada aos modos de estiramento das ligações C-H dos grupos metil (CH₃). As bandas em torno de 2900-2950 cm⁻¹ estão relacionadas à absorção de C-H, que podem ser alongamento e vibrações de flexão, simétricas, assimétricas de grupos CH, CH₂ e CH₃ e, ocasionalmente, duplica sobrepondo-se com O-H (KACURÁKOVÁ, 2000). O espectro é governado por uma banda larga em aproximadamente 3431 e 2977 cm⁻¹, que se refere aos modos de vibração do alongamento de grupos -OH e -OH de álcoois, respectivamente. Além disso, a absorção em 2977 cm⁻¹ é atribuída ao alongamento C-H, simétrico e assimétrico e, ocasionalmente, duplica sobrepondo-se com O-H (CUI et al., 2007). As vibrações de estiramento O-H ocorrem dentro de uma ampla faixa de números de onda entre 3500 e 3000 cm⁻¹ e demonstram várias características, como as ligações de alongamento de grupos hidroxila livres existentes nas amostras na fase de vapor e bandas de O-H de ácido carboxílico (CUI et al., 2007). Como resultado, pode-se perceber que a tanchagem é um hidrocolóide com um pequeno conteúdo de peptídeo. Espectros semelhantes foram observados para goma de semente de *Salvia* (RAZAVI et al., 2014), goma de semente de *Alyssum homolocarpum* (HESARINEJAD; RAZAVI; KOCHEKI, 2015) e mucilagem extraída da semente de *Plantago major* (ALIZADEH BEHBAHANI et al., 2017).

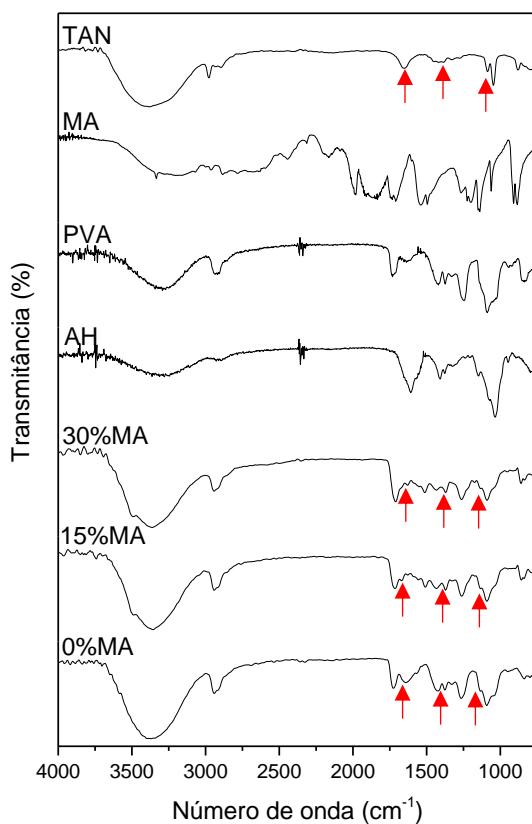


Figura 17 – Espectro de FTIR das membranas de PVA/AH carregadas com 25% de extrato de tanchagem e dos respectivos componentes da matriz.

Fonte: Da autora

Relativo as membranas contendo extrato de tanchagem é difícil apontar com exatidão quais são as bandas relativas ao extrato, pois em muitas situações elas podem estar sobrepostas as bandas do polímero. No entanto, os picos em 1089 cm⁻¹, 1370 cm⁻¹ e 1648 cm⁻¹ são características do extrato de tanchagem (indicados pela seta vermelha na Figura 17) e só aparecem nos espectros das membranas contendo tanchagem, o que pode ser comparado com a Figura 13 na qual foram apresentadas as membranas sem o extrato.

Os estudos da cinética de liberação de tanchagem foram realizados apenas para uma das concentrações, isso porque uma vez determinado o mecanismo e o perfil de liberação, mesmo que a concentração seja variada o mecanismo permanecerá o mesmo. Entender o processo de como foi realizado o ensaio de liberação é fundamental para realizar a modelagem dos dados experimentais, e por esse motivo ele está bem detalhado na metodologia, bem como as estratégias adotadas para traçar o modelo. Outro ponto importante é que a amostra sem agente de reticulação não foi

modelada, pois essa membrana dissolve e, portanto, não existem modelos para este tipo de abordagem, já que o medicamento é liberado quase imediatamente.

Os parâmetros dos modelos para o Experimento 1 (Exp. 1) (15% MA) e Experimento 2 (Exp. 2) (30% MA) são relatados na Tabela 10. Verificou-se que K e D_e são dependência fraca dos conjuntos de dados, então foram considerados os mesmos valores de K (0,3828) e D_e ($8,2223 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{h}$) para ambos Exp. 1 e Exp. 2. No entanto, as precisões do modelo foram alteradas consideravelmente com q_{max} . Concluiu-se que o desvio mínimo entre o modelo e os dados experimentais é obtido se q_{max} for exatamente igual a q_0 para cada corrida experimental.

Tabela 10 – Os valores numéricos das constantes de Langmuir e o coeficiente de difusão efetivo do fármaco na membrana para ambos os Experimentos 1 e 2.

Parâmetros do Modelo			
	K	q_{max} (μg/ml)	D_e (cm²/h)
Experimento 1	0.3828	7.3905×10^3	8.2223×10^{-4}
Experimento 2	0.3828	8.6971×10^3	8.2223×10^{-4}

A Figura 18 e a Figura 19 representam a tanchagem liberada e a concentração de tanchagem na solução para Exp. 1 e Exp. 2 usando modelagem e resultados experimentais. A droga liberada aumenta drasticamente nas horas iniciais e, em seguida, sua inclinação diminui gradualmente à medida que a liberação progride. A concentração de tanchagem na solução aumenta rapidamente e atinge um pico no início da liberação de tanchagem. Então, diminui com o tempo devido à coleta de amostras e injeção de solvente puro em tempos predeterminados. Para mostrar claramente a região de concentração máxima, os perfis de concentração em ambas as figuras são representados apenas para as 5 horas iniciais do processo. Ambas as figuras indicam excelente concordância entre os resultados do modelo e os dados experimentais.

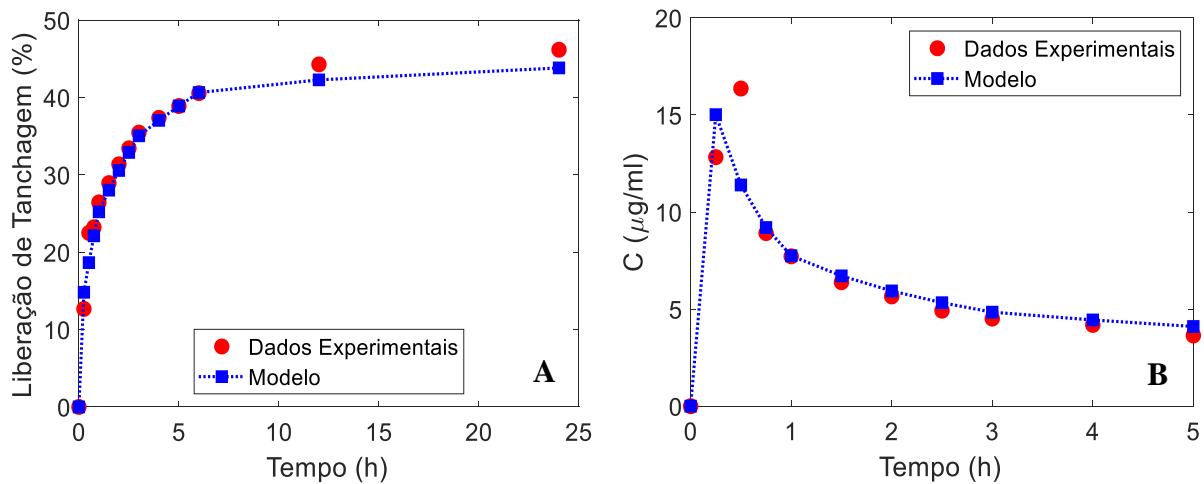


Figura 18 – Comparação entre os resultados do modelo e os dados experimentais (Exp. 1) em termos de (A) tanchagem liberada e (B) concentração de tanchagem na solução.

Fonte: Da autora

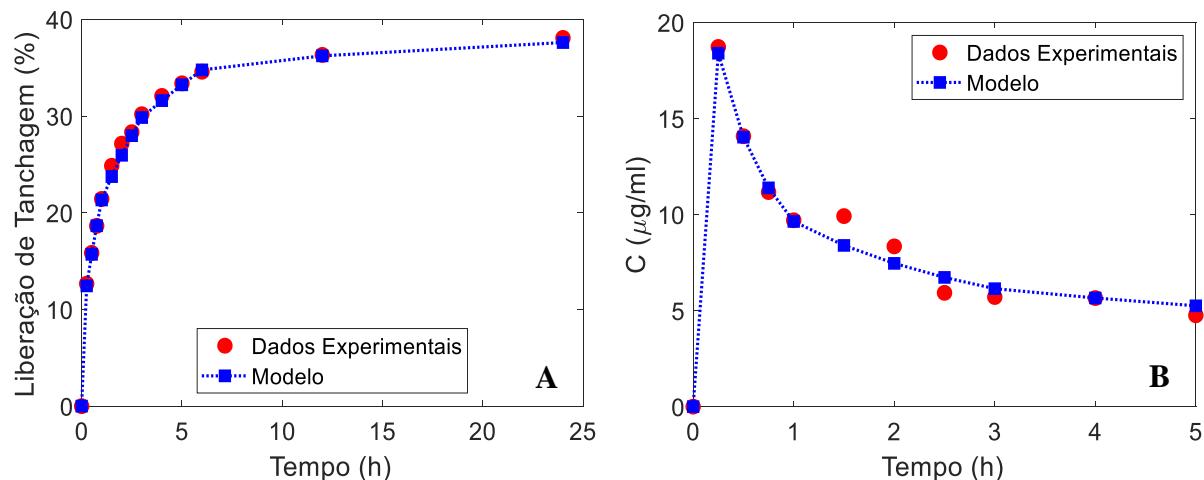


Figura 19 – Comparação entre os resultados do modelo e os dados experimentais (Exp. 2) em termos de (A) tanchagem liberada e (B) concentração de tanchagem na solução.

Fonte: Da autora

Pela análise dos gráficos também é importante destacar que após 24 horas foi liberado cerca de 40% do extrato tanchagem para membrana contendo 15% MA e cerca de 35% para membrana com 30% MA, indicando que taxas menores do princípio ativo podem continuar sendo liberadas por um longo período, o que contribui para produção de curativos de longa duração.

5.4. CONCLUSÕES

A adição de extrato de tanchagem na solução não afeta a formação de nanofibras, por outro lado a adição de uma concentração menor tendeu para uma maior formação de defeitos. As bandas características da tanchagem estão presentes nos espectros das membranas, o que garante a presença do princípio ativo nas nanofibras. Os resultados da liberação *in vitro* indicam que a reação de reticulação atendeu o objetivo desejado, prolongando a liberação e a modelagem matemática mostrou que o principal mecanismo de liberação foi a difusão, o que é condizente com a literatura.

CAPÍTULO 6

Estudo da estabilidade de armazenamento das membranas eletrofiadas

6.1. INTRODUÇÃO

Uma análise importante é a da estabilidade de estocagem de materiais, pois a partir daí pode se estabelecer as melhores condições para que o produto seja armazenado e/ou transportado sem sofrer degradação. A estabilidade física, química e microbiológica de membranas eletrofiadas originadas de polímeros altamente solúveis depende do teor de água. A isoterma de adsorção de água modela a atividade de água e o conteúdo de umidade correspondente a uma temperatura constante (LARA et al., 2020; SILVA et al., 2014).

Ainda em relação ao teor de água, as propriedades mecânicas e de barreira de materiais hidrofílicos, como o PVA e o AH podem ser significativamente alteradas. Quando o vapor d'água interage fortemente com a matriz polimérica, pode afetar fortemente sua estrutura; assim, os dados determinados a partir das isotermas de sorção auxiliam na avaliação da estabilidade do armazenamento de amostras poliméricas, principalmente hidrofílicas, e também são utilizados nos projetos e controle de processo (AZEVEDO et al., 2015).

A avaliação da sensibilidade à umidade das membranas transportadoras de fármacos, bem como sua higroscopidade, pode ser determinada por meio da cinética de adsorção que mostra a relação entre o aumento do teor de água e o tempo de armazenamento. As formas das curvas das isotermas de sorção dependem da composição do produto e de propriedades como temperatura e umidade relativa do ambiente circundante (SILVA et al., 2014, 2020).

A quantidade de água adsorvida é uma função da afinidade entre a superfície do material e as moléculas de água, da temperatura, da concentração do vapor de água (pressão, seja expressa como pressão parcial, pressão relativa, umidade relativa ou atividade de água) e, evidentemente, da área de superfície exposta (AYROSA et al., 2007). Esse estudo também é importante para que o princípio ativo mantenha sua atividade inalterada que garantirá seus efeitos farmacológicos (SILVA et al., 2020).

O objetivo desse capítulo foi determinar as melhores condições de armazenamento das membranas de PVA/AH carreadoras de tanchagem, por meio do estudo das isotermas de sorção de água.

6.2. MATERIAIS E MÉTODOS

6.2.1. Preparo das amostras

As amostras foram preparadas de acordo com o item [5.2. \(Cap. 5\)](#), e posteriormente foram recortadas em formato quadrangular ($2,2\text{ cm}^2$) e colocadas em um dessecador com pentóxido de fósforo, por pelo menos 5 dias, de forma a retirar toda humidade da amostra antes de iniciar o ensaio de estabilidade.

6.2.2. Caracterização das membranas eletrofiadas

A morfologia das membranas foi avaliada por microscopia óptica (MO) utilizando um DMLM (Leica – Cambridge, Inglaterra) e por análise macroscópica.

A estabilidade térmica das membranas foi avaliada por análise termogravimétrica (TGA) em um TGA/DSC1 (METTLER TOLEDO, Schwerzenbach – Suíça). As análises foram realizadas sob uma atmosfera de nitrogênio a uma vazão de $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ com aquecimento de 25°C a 600°C , a uma taxa de $10^\circ\text{C min}^{-1}$.

As temperaturas de transição vítreia foram avaliadas por Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) em um DSC1 (METTLER TOLEDO, Schwerzenbach – Suíça). Foi realizado um ciclo aquecimento (I)-resfriamento (II)-aquecimento (III), o método utilizado consistiu em: (I) Primeiro aquecimento de 0 a 250°C , (II) Resfriamento de 250 a 0°C e (III) Segundo aquecimento de 0 a 250°C . Todas as etapas utilizaram uma taxa de $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ (aquecimento e resfriamento), atmosfera de nitrogênio a uma taxa de fluxo de $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e cadinho de alumínio.

O estudo da estrutura das membranas foi realizado por difração de raio-X (DRX) com um X'Pert-MPD (Philips Analytical X Ray – Almelo, Netherlands) usando radiação CuK α ($\lambda=1,54056\text{ \AA}$), operando com 40kV , 40mA e 2θ variando de 5 a 60° com passo igual a $0,02^\circ$.

6.2.3. Isotermas de sorção de água

As isotermas de sorção foram determinadas pelo método gravimétrico estático, com amostras de filmes de $2,2\text{ cm}^2$, acondicionadas em pequenos recipientes plásticos revestidos com

papel alumínio. Três amostras para cada filme foram balanceadas em seis potes herméticos, cada um com uma solução salina saturada diferente (NaOH , K_2CO_3 , NaBr , NaCl e KCl), com atividade de água medida e de acordo com Greenspan (1977), variando de 0,049 a 0,867 e também variando a temperatura. As amostras foram mantidas nos recipientes até atingir o equilíbrio. As isotermas foram realizadas a 10, 30 e 50°C e os dados experimentais foram ajustados pelos modelos apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Modelos matemáticos de isotermas de sorção.

Modelo Matemático	Equação	a_w	Referência
GAB	$X_{eq} = \frac{X_m CK a_w}{(1 - Ka_w)(1 - Ka_w + CK a_w)}$	0,05-0,95	(VAN DEN BERG, 1984)
Halsey	$X_{eq} = \left(\frac{a}{ln a_w} \right)^{\frac{1}{r}}$	0,05-0,80	(HALSEY, 1948)
Oswin	$X_{eq} = a \left[\frac{a_w}{(1 - a_w)} \right]^b$	0,05-0,90	(OSWIN, 1946)
Smith	$X_{eq} = a + b \cdot \log(1 - a_w)$	0,30-0,90	(SMITH, 1947)

X_{eq} : teor de umidade de equilíbrio; X_m : teor de umidade na monocamada; a_w : atividade de água; C e K são constantes de adsorção; r : constantes; a : quantidade de água na primeira fração sorvida; b : quantidade de água na fração de umidade multicamadas.

6.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O ensaio de estabilidade foi realizado pensando nas diferentes condições de temperatura e umidade que o produto poderia ser submetido, caso fosse comercializado. A análise macroscópica dos filmes em diferentes condições ambientais (Figura 20) mostrou que a membrana com 30% de agente reticulante apresenta uma alteração física insignificante em todas as condições; enquanto a membrana sem agente reticulante enovelou-se (enrolou-se) e apresentou uma coloração mais amarelada à medida que a umidade relativa aumentou. As membranas com 15% de agente reticulante apresentou comportamento intermediário. Visualmente a alteração da temperatura intensificou a mudança de coloração (branco para amarelo), mas as mudanças são mais imperceptíveis macroscopicamente.

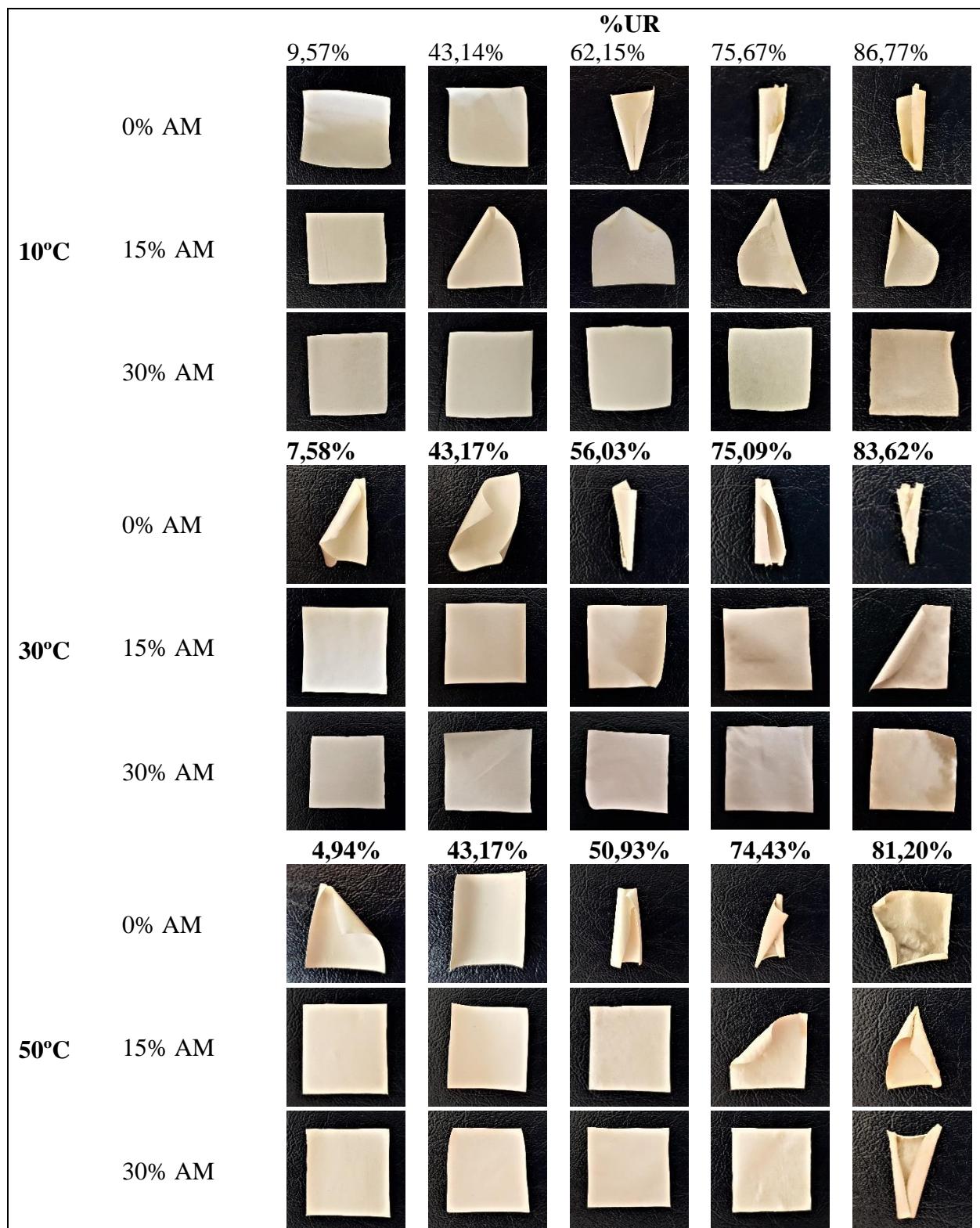


Figura 20 – Alterações macroscópicas das membranas de PVA/AH reticuladas e carregada com 25% de tanchagem em diferentes condições de armazenamento.

Fonte: Da autora

As imagens de MO foram semelhantes de maneira geral (Figura 21), porém a intensidade de pontos brancos luminosos aumentou à medida que o agente reticulante aumentou. Acredita-se que esse resultado indica um maior adensamento das cadeias do polímero à medida que o grau de reticulação aumenta (vide Figura 12), provocando maior reflexão da luz como observado.

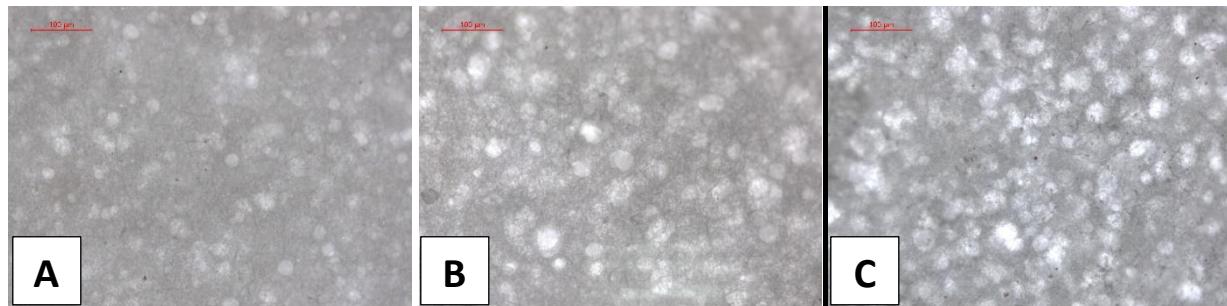


Figura 21 – Imagens de Microscopia Óptica (MO) das membranas PVA/AH: (A) 0%MA – 25%Tan, (B) 15%MA – 25%Tan e (C) 30%MA – 25%Tan.

Fonte: Da autora

As amostras de PVA/AH, apesar de reticuladas, apresentaram uma estrutura bastante cristalina (Figura 22), o pico em 20° e 45° é característico do AH, correspondendo a cristais hidratados e anidros, bem como são responsáveis pela estrutura semicristalina do AH. Esses picos sugerem uma estrutura ordenada formada como consequência das ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxil, acetil e carboxilato e que é responsável por dificultar o movimento das cadeias, esses resultados foram semelhantes a outros relatados na literatura (ABU ELELLA; MOHAMED; SABAA, 2018; BARROSO et al., 2019).

O pico em 38,5° é atribuído à natureza semicristalina do PVA, assim como o pico em ~19° pode também estar relacionado ao plano cristalino (101) desse polímero. Tal cristalinidade surge da forte ligação de hidrogênio intermolecular e intramolecular entre as cadeias de PVA (AZIZ et al., 2017a, 2017b; MARKA et al., 2015).

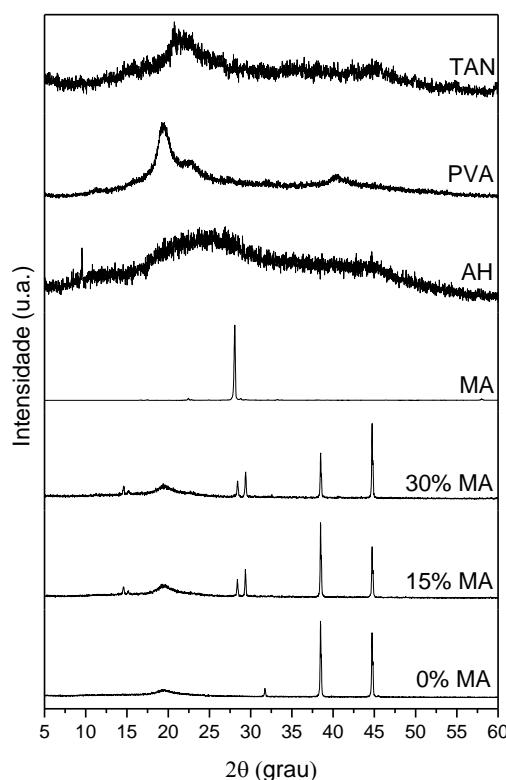


Figura 22 – Difratogramas das membranas de PVA/AH com diferentes graus de reticulação e carregadas com 25% de tanchagem.

Fonte: Da autora

A reação de reticulação ocasionou o aparecimento de quatro novos picos ($14,5^\circ$, $15,5^\circ$, $28,5^\circ$ e $29,5^\circ$) bem como provocou desaparecimento do pico de $31,5^\circ$, o que tornou a estrutura ainda mais cristalina.

Os termogramas das três amostras (Figura 23) apresentaram 5 eventos de perda de massa. A perda de água ocorre até 100°C (estágio I), essa perda de massa está relacionada à evaporação da umidade das membranas nanofibrosas e da água fisicamente adsorvida no material. O principal evento de perda de massa pode ser observado entre 200 e 400°C (estágio III) e está relacionado a decomposição térmica dos polímeros. Uma perda de massa entre 400 e 500°C (estágio IV) também foi observada e está relacionada a degradação de oligômeros de AH. De aproximadamente 500°C (estágio V) até o final do experimento, uma perda de massa contínua é observada para todas as amostras. Resultados semelhantes podem ser observados na literatura (ABDEL-MOHSEN et al., 2019; AZEVEDO et al., 2015; DE OLIVEIRA et al., 2017; HUSSEIN et al., 2020; SRIKAMUT et al., 2020; ZHANG et al., 2013)

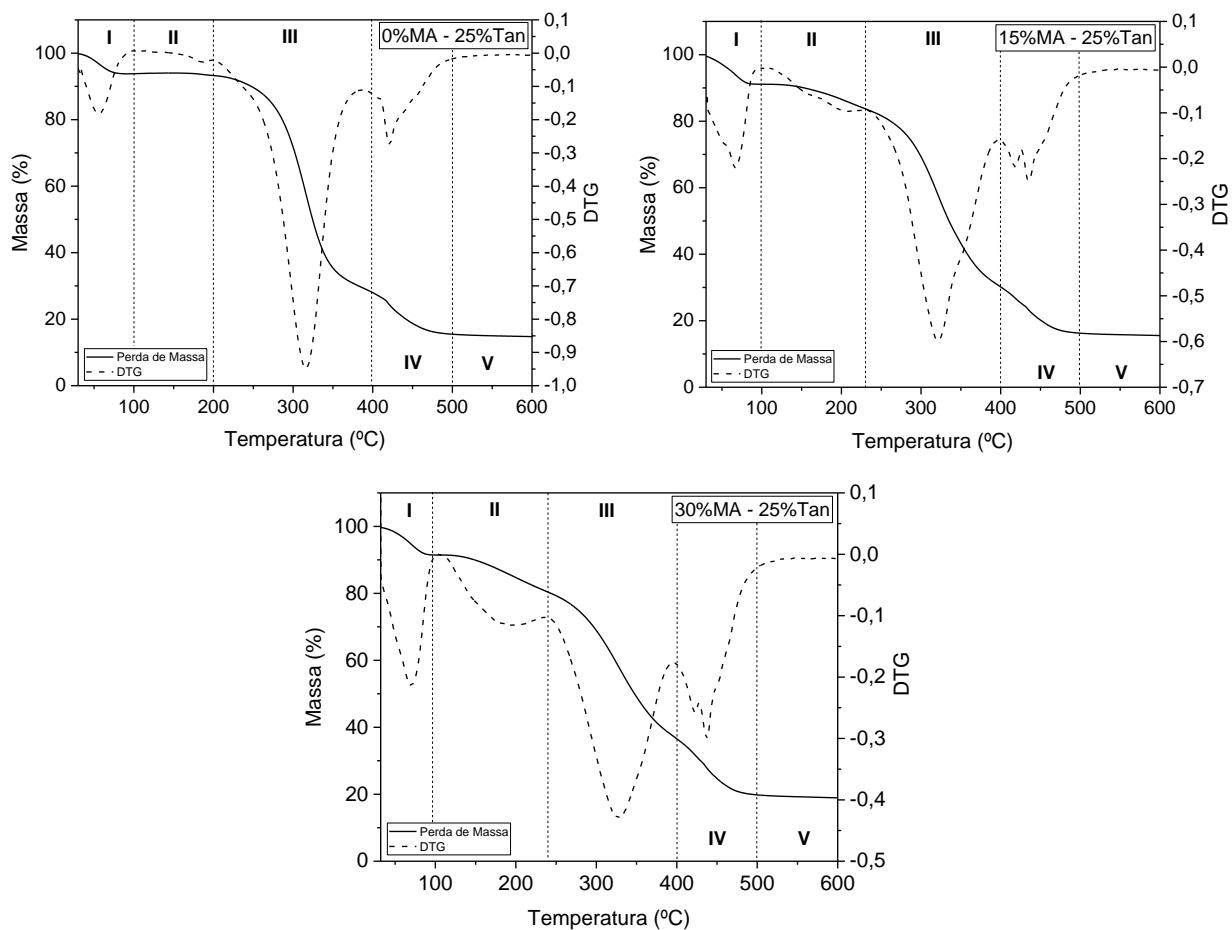


Figura 23 – Curvas de TGA e DTG das membranas de PVA/AH com diferentes graus de reticulação e carregadas com 25% de tanchagem.

Fonte: Da autora

Os resultados apresentados na Tabela 12 mostram que à medida que a concentração de reticulante aumenta T_i diminui e T_f aumenta e que a % de perda de massa diminui, indicando maior estabilidade do material reticulado.

Tabela 12 – Estabilidade térmica das amostras obtidas por TGA.

Amostras	T_i (°C)	DTG_{max} (°C)	T_f (°C)	M_{perda} (%)	$Res_{600°C}$ (%)
0% MA	206	315	482	78,97	15,28
15% MA	150	321	480	76,58	16,07
30% MA	122	327	492	73,58	19,65

T_i (temperatura inicial de decomposição); DTG_{max} (temperatura máxima de decomposição); T_f (temperatura final de decomposição); M_{perda} (porcentagem de perda de massa na faixa de decomposição); $Res_{600°C}$ (porcentagem de resíduo a 600°C).

Os termogramas de DSC podem ser observados na Figure 24A, em todos os casos foram observados pontos de fusão no primeiro aquecimento, mas no segundo aquecimento esse pico não se manifestou e somente as transições vítreas foram observadas (Figure 24B) , indicando que as amostras apresentaram alguns pontos de cristalinidade *in natura*, referente aos seus componentes, o que explica o comportamento apresentado na análise de DRX (Figura 22). A amostra 0%MA apresentou duas temperaturas de transições vítreas (T_g), uma em 75,80°C ($\Delta C_p=0,49 \text{ Jg}^{-1}\text{K}^{-1}$) e a outra em 117,94°C ($\Delta C_p=0,14 \text{ Jg}^{-1}\text{K}^{-1}$), já as amostras reticuladas apresentaram apenas uma temperatura de transição vítreia. A T_g da amostra 15%MA foi de 125,20°C ($\Delta C_p=0,19 \text{ Jg}^{-1}\text{K}^{-1}$) e da amostra de 30%MA de 114,78°C ($\Delta C_p=0,22 \text{ Jg}^{-1}\text{K}^{-1}$). O rápido processo de solidificação de cadeias esticadas sob alta taxa de alongamento durante os estágios posteriores de eletrofiação pode ter dificultado o desenvolvimento do cristal, pois as cadeias não têm tempo para formar o registro cristalino (YANG; QIN; WANG, 2008).

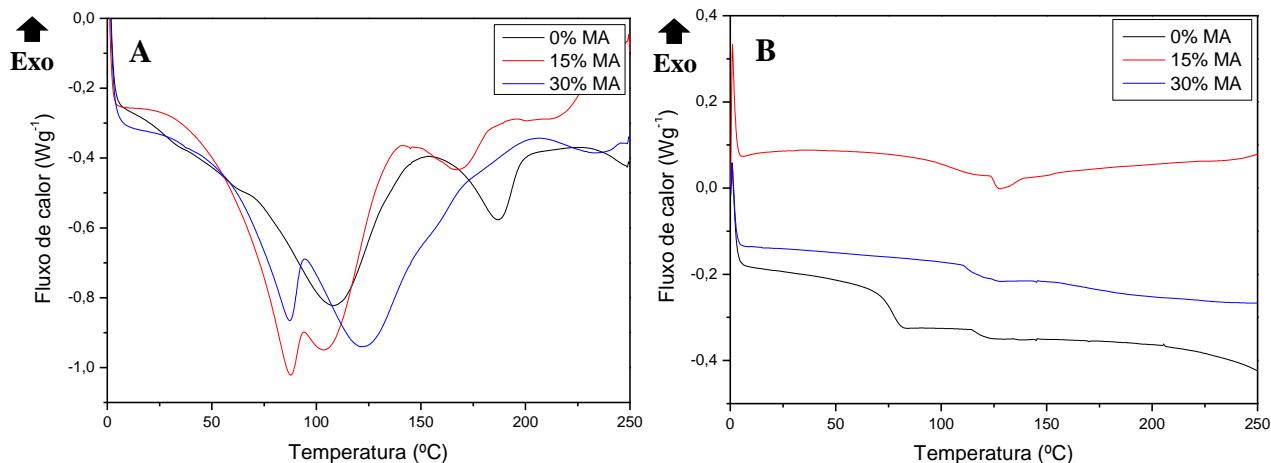


Figure 24 – Termogramas DSC de membranas PVA/AH carregadas com 25% de tanchagem e com diferentes concentrações de reticulação. (A) Primeiro aquecimento e (B) Segundo aquecimento.

Fonte: Da autora

De acordo com a literatura o AH não apresenta picos endotérmicos característicos, normalmente apresentam alguma depressões largas em seu termograma, que podem estar relacionado a higroscopicidade do AH ou a mudança para uma faixa de temperatura mais elevada (CHEN et al., 2016; JI et al., 2006). Já o PVA apresenta T_g em torno de 90°C e a reticulação

normalmente aumenta essa temperatura, o que justifica o aumento de Tg para as amostras reticuladas neste estudo (GOHIL; BHATTACHARYA; RAY, 2006; QUINN et al., 2018).

Para qualquer polímero puro, a Tg depende da rigidez de sua cadeia, mas para um polímero reticulado depende da densidade da reticulação, bem como da estrutura química do agente de reticulação. Assim que um material estranho é introduzido no polímero como um reticulador, ele interfere na formação da ligação de hidrogênio ao reagir com os grupos hidroxila. Isso pode resultar em uma diminuição na interação da ligação de hidrogênio, o que pode reduzir a rigidez das cadeias. Mas, ao mesmo tempo, novas pontes estão sendo geradas entre as cadeias por meio do reticulador; o que afeta a Tg desta matriz (GOHIL; BHATTACHARYA; RAY, 2006).

A Tabela 13 apresenta os resultados dos parâmetros de ajuste dos modelos aos dados experimentais da isoterma de sorção de água, para as membranas com diferentes concentrações de agente reticulante (MA) e carregadas com 25% de tanchagem, testadas em diferentes temperaturas (10°C, 30°C e 50°C).

Tabela 13 – Parâmetros dos principais modelos de isotermas de sorção para as membranas de PVA/AH em diferentes condições de temperatura e concentração de agente reticulante.

Modelos Matemáticos	0% MA			15% MA			30% MA		
	10 °C	30 °C	50 °C	10 °C	30 °C	50 °C	10 °C	30 °C	50 °C
GAB	<i>X_m</i>	208	632	2,69	1,68	2,32	3,29	407	1231
	<i>C</i>	0,0244	0,0075	751473	584877	740061	13,4	0,0145	0,0123
	<i>K</i>	0,774	0,0789	1,13	1,02	0,969	1,06	0,706	0,547
	<i>R</i> ²	0,985	0,941	0,961	0,963	0,993	0,992	0,991	0,896
Halsey	<i>a</i>	-0,141	-0,173	-0,180	-0,122	-0,103	-0,184	-0,087	-0,164
	<i>b</i>	0,0325	0,0371	0,0304	0,0567	0,0446	0,0385	0,0249	0,0363
	<i>R</i> ²	0,977	0,911	0,912	0,943	0,943	0,989	0,970	0,852
Oswin	<i>a</i>	5,92	5,18	6,68	3,26	4,52	6,47	5,55	7,93
	<i>b</i>	0,874	1,02	1,01	0,806	0,599	0,869	0,777	0,681
	<i>R</i> ²	0,980	0,928	0,910	0,949	0,985	0,990	0,980	0,877
Smith	<i>a</i>	-7,90	-11,0	-4,53	-2,02	0,253	-4,09	-5,33	-3,68
	<i>b</i>	-18,4	-20,9	-18,9	-7,84	-6,31	-15,7	-14,2	-15,4
	<i>R</i> ²	0,975	0,956	0,865	0,914	0,973	0,978	0,991	0,902

O ajuste de dados pelo modelo de GAB foi o que melhor descreveu os dados experimentais de equilíbrio de umidade para as três diferentes temperaturas e grau de reticulação,

o que foi confirmado pelos altos valores de R^2 , exceto para as amostras com 0 e 30% de MA a 30°C cujo valor de R^2 foi ligeiramente melhor para o modelo de Smith. Sendo assim, foram apresentadas apenas as isotermas de sorção de água nas três diferentes temperaturas testadas e ajustadas pelo modelo de GAB (Figura 25).

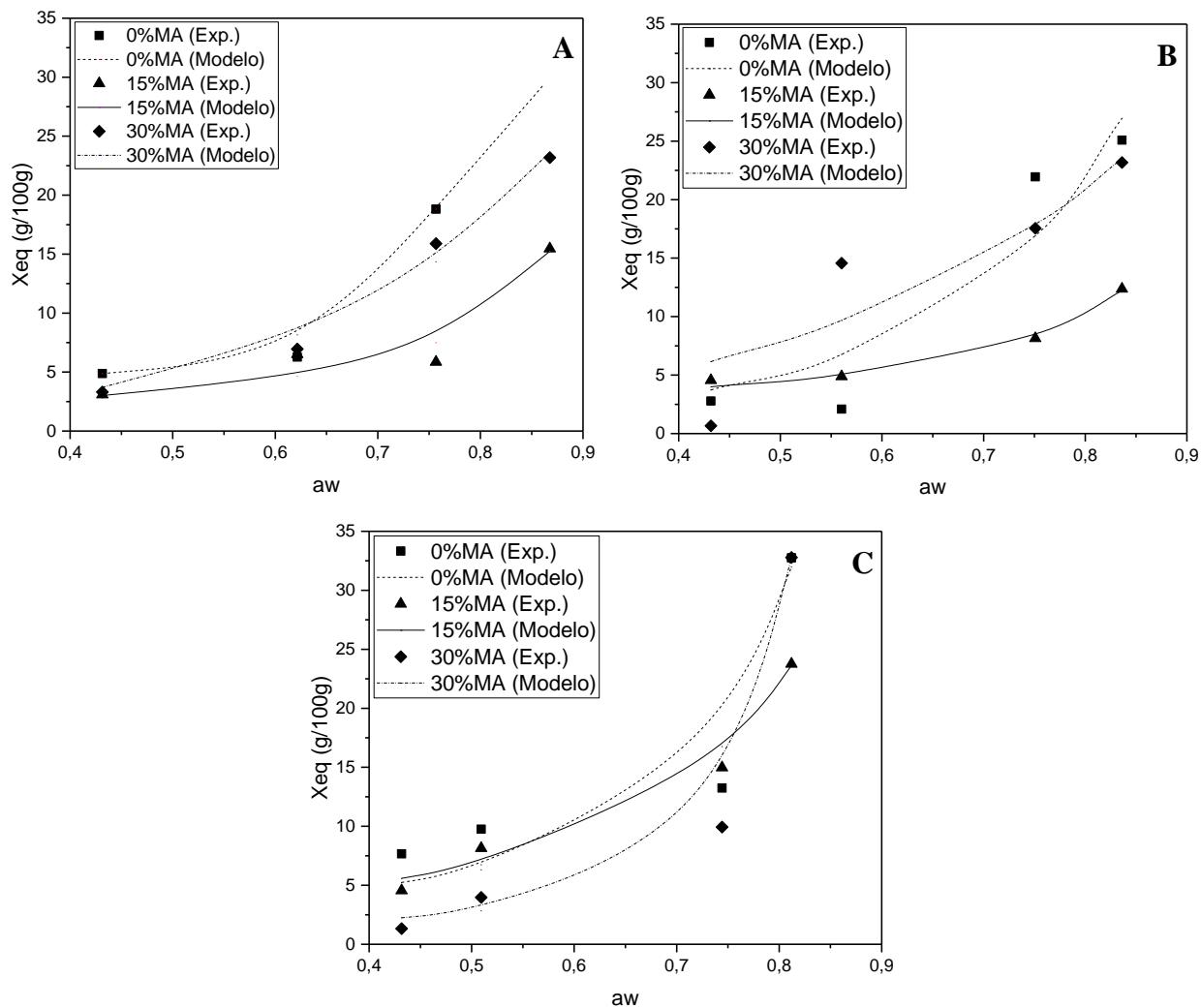


Figura 25 – Isotermas de sorção de água (% Umidade - g água/100g de membrana versus aw) das membranas de PVA/AH com diferentes concentrações de agente reticulante e de temperatura:
 (A) 10°C, (B) 30°C e (C) 50°C, ajustado através do modelo GAB.

Fonte: Da autora

O modelo de GAB já foi utilizado para descrever o comportamento de sorção de filmes baseados em PVA por outros autores (LARA et al., 2020; MONJAZEB MARVDASHTI;

KOCHEKI; YAVARMANESH, 2017; SRINIVASA et al., 2003). E assim como na literatura, o estudo mostrou que todas as isotermas de sorção apresentaram formato sigmoide, o que caracteriza a natureza hidrofílica dos filmes. Além disso, essas isotermas apresentam regiões características: Região (I) - se refere à adsorção de filme monomolecular de água ($aw < 0,2$); região (II) - correspondente à adsorção de camadas adicionais sobre esta monocamada ($0,2 < aw < 0,7$); e região (III) - ocorre a condensação de água nos poros do material seguida de uma dissolução do material ($aw > 0,7$) (BAJPAI; DEHARIYA; S SAGGU, 2014; GHAYAL et al., 2013; LARA et al., 2020). Com o aumento do teor de água em maiores valores de aw , as moléculas de água podem causar alterações estruturais como efeito de plastificação e intumescimento, aumentando o volume livre entre cadeias, facilitando maiores quantidades de água sorvida (LARA et al., 2020; SCHMID et al., 2015).

De maneira geral, a quantidade de água absorvida pelas membranas aumentou lentamente conforme aw aumentou até 0,70. Acima deste nível de aw , um aumento acentuado no teor de umidade foi observado, o que é semelhante aos resultados de filmes que possuem polissacarídeos em sua composição (ACEVEDO et al., 2017; ALVES et al., 2011; SRINIVASA et al., 2003).

A presença do agente de reticulação diminuiu a quantidade de água absorvida, porém ao contrário do que se esperava, a amostra com 30% de MA (maior grau reticulação) absorveu mais água do que a amostra com 15% de MA (menor grau de reticulação). Esse comportamento não era esperado pois um aumento no grau de reticulação torna a amostra mais hidrofóbica. Por outro lado, o estudo de absorção de água apresentado na Figura 14 mostrou que a amostra reticulada com 30% de MA absorve maior quantidade de água e se mantém estável quando comparada com a amostra 15% de MA.

A temperatura tem um efeito significativo no comportamento das amostras, porém não é possível dizer como esse fenômeno ocorre, isso porque as amostras não apresentaram um comportamento padronizado. É possível que o aumento da temperatura altere a estrutura das membranas, pois a temperatura é um parâmetro importante em reações de reticulação como a que ocorre nas amostras estudadas. As membranas são mais estáveis em temperatura ambiente e com umidade relativa abaixo de 50%.

6.4. CONCLUSÕES

As análises macroscópicas mostram que a umidade interfere bastante no aspecto das membranas e que o armazenamento destas em umidade relativas menor preserva sua integridade. As isotermas de sorção mostraram que o modelo de GAB foi o que melhor ajustou os dados experimentais, e que os resultados foram semelhantes aos estudos já apresentados na literatura. A reticulação também favoreceu o armazenamento em ambiente com maior umidade, assim como aumentou a estabilidade térmica do material, corroborando com os resultados anteriores de que a etapa de reticulação foi essencial para o desempenho do material.

7.1. INTRODUÇÃO

A aplicação biológica de qualquer novo material passa por uma série de etapas de pesquisas e comprovações de propriedades. De forma simplificada, um biomaterial adequado para aplicação na cicatrização de feridas deve ser elastomérico com propriedades capazes de imitar o ambiente natural da célula e fornecer pistas de sinalização mecânica. O material deve ser moldado na forma adequada ao local de aplicação, e deve ter uma morfologia que permita o transporte de nutrientes, para a regeneração do tecido. Além disso, o material selecionado deve ser não citotóxico, não imunogênico e minimamente pró-inflamatório, além de ser aprovado na avaliação de materiais para esse fim de acordo com as diretrizes da ISO 10993. Por fim, como o biomaterial adequado deve ser biodegradável, o mecanismo e a cinética de degradação precisam ser caracterizados e compreendidos (CHEN; LIANG; THOUAS, 2013; HARRIS; LU; GABRIELE, 2018; WILLIAMS, 2014).

Outro termo que sempre está associado a produção de um novo biomaterial é a biocompatibilidade, que pode ser definida como a “Habilidade relativa de um material de interagir favoravelmente com um sistema biológico” (“Medical Dictionary for the Dental Professions”, 2012).

Ainda, segundo a IUPAC, outras definições de Biocompatibilidade (terapia biomédica) é a capacidade de um material de funcionar com uma resposta apropriada do hospedeiro em uma aplicação específica ou a capacidade de entrar em contato com um sistema vivo sem produzir um efeito adverso (VERT et al., 2012).

Deste modo, um material que possa induzir uma causa de morte celular ou de tecido (citotoxicidade), induzir a formação de câncer (carcinogenicidade), danificar genes (mutagenicidade), induzir respostas imunes (pirogenicidade e alergenicidade) ou induzir a coagulação do sangue (trombogenicidade), não pode ser classificado como biocompatível (CHEN; LIANG; THOUAS, 2013).

O ensaio MTT (brometo de 3-4,5 dimetiltiazol-2,5 difenil tetrazólio) é um método conhecido mundialmente para avaliar a viabilidade e toxicidade celular. Baseia-se na conversão do sal tetrazólio solúvel e amarelo, em sua forma reduzida insolúvel, denominada formazan, de coloração roxa, pela ação da enzima succinato desidrogenase de células viáveis. Este ensaio vem

substituindo as metodologias tradicionais devido à facilidade, versatilidade e os bons resultados apresentados.

O ensaio de *Live/Dead*, é baseado em diferentes cores para determinar células metabolicamente ativas em uma população, com base na integridade da membrana plasmática e na atividade da esterase que são diferentes em células mortas. O ensaio discrimina células vivas (atividade normal de esterase) pela coloração-AM verde-fluorescente da calceína, de células mortas (esterase inativa) pela coloração fluorescente-vermelha do homodímero de etídio (Eth-D1) que só penetra em células danificadas e se liga ao seu DNA. Assim, o ensaio *Live/Dead* é muito útil pois é rápido, seguro e economicamente viável, utilizado como auxiliar dos ensaios de MTT.

Outro ensaio é o ensaio de raspagem *in vitro* é um método direto, simples e econômico para estudar a migração celular *in vitro*. Este método é baseado na observação de que, após a criação de uma nova lacuna artificial, chamada de "arranhão", em uma monocamada de células confluentes, as células na borda da lacuna recém-criada se moverão em direção à abertura para fechar o "arranhão" até que o contato célula-célula sejam estabelecidos novamente. As etapas básicas envolvem a criação de um "arranhão" nas células de monocamada, captura de imagens no início e intervalos regulares durante a migração celular para fechar o arranhão e comparação das imagens para determinar a taxa de migração celular (BOBADILLA et al., 2019; LIANG; PARK; GUAN, 2007). Esta técnica experimental é comumente usada para entender os mecanismos moleculares que afetam a migração celular e para identificar compostos farmacêuticos que podem modular a migração celular e, consequentemente, conduzir as terapias de tratamento (BOBADILLA et al., 2019).

O objetivo deste capítulo foi avaliar a citotoxicidade das membranas eletrofiadas de PVA/AH e identificar os possíveis mecanismos que afetam a migração celular, por meio dos ensaios acima descritos.

7.2. MATERIAIS E MÉTODOS

7.2.1. Preparo das amostras

As amostras foram previamente preparadas de acordo com o item [5.2.1 \(Cap. 5\)](#). Posteriormente as amostras foram esterilizadas com óxido de etileno na empresa Acecil (Campinas,

São Paulo) e deixadas em repouso por 15 dias antes do início dos testes. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os ensaios de MTT e *live/dead* foram realizados na Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp e o ensaio de migração celular no Laboratório de Trombose, Aterosclerose e Terapia Celular do Instituto de Biologia da Unicamp.

7.2.2. Ensaios de MTT

A cultura foi cultivada de acordo com a metodologia descrita por Li et al. (2010). Uma vez na confluência, queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT) foram transferidos para placas de cultura de células de 24 poços, a uma concentração de 5×10^4 células/mL e incubados a 37°C em 5% CO₂ por 24 h. Após o período de incubação, as membranas PVA/AH, com diferentes concentrações do agente reticulante, com e sem tanchagem, foram suspensas dentro dos poços e permaneceram no meio de cultura em contato com as células por 24 h. Posteriormente os poços foram lavados com PBS (pH 7,4) e, em seguida, 500 µL de DMEM com 0,5 mg/ml de sal de sódio MTT foram adicionados. As placas foram incubadas por 3 h em redução de MTT. O meio foi removido, as células foram lavadas com PBS novamente e 200 µL de etanol absoluto foram adicionados a cada poço para dissolver os cristais de formazan. A densidade óptica foi medida usando um comprimento de onda de leitor de microplaca de 570 nm.

7.2.3. *Live/Dead*

As células vivas e mortas foram coradas com calceína AM (2 uM) e Eth-D1 (4 uM), respectivamente. De forma simplificada, as células foram semeadas em poços (5×10^4 células/membrana) e cultivadas por 24 horas. Após o período de incubação as membranas foram colocadas suspensas no meio de cultura em contato com as células e incubadas por 24 horas. Posteriormente os poços foram lavados com PBS (pH 7,4) e incubadas em solução *live/dead* por 30 minutos em incubadora na temperatura ambiente e protegidas da luz. O excesso de corante foi removido por lavagem usando PBS e as células foram observadas em microscópio fluorescente invertido Zeiss Axiovert 40 CFL acoplado a uma câmera AxioCam MEC (Carl Zeiss, Alemanha).

7.2.4. Ensaio de migração celular (*Scratch Assay*)

Para este ensaio, utilizaram-se fibroblastos, por serem mais representativos do processo, da linhagem 3T3 de tecido de pele de camundongo. Garrafas de cultivo estéreis contendo meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF) foram acrescidas com fibroblastos e colocadas em estufa a 5% de CO₂, a 37°C por 24 horas, para alcançarem alta confluência. Após esse período, as subculturas foram realizadas utilizando-se a solução de tripsina-EDTA para desprender as células aderidas. Posteriormente, os fibroblastos foram semeados em placas de 24 poços, numa densidade de 5 x 10⁴ células/poço, e mantidos em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C, até atingirem confluência máxima.

Constatada a confluência, o ensaio foi iniciado, mas antes é importante destacar alguns pontos importantes. As membranas de PVA/AH reticuladas são opacas quando em solução, o que foi um problema, já que a observação da migração por microscopia confocal se tornou inviável, já que a luz não era capaz de atravessar essas membranas. Desta forma, na tentativa de visualizar a migração, o seguinte procedimento foi realizado: as membranas foram colocadas nos poços da placa, que foram mantidas em estufa a 5% de CO₂, a 37°C por 24 horas; após esse período, as membranas reticuladas foram removidas, e as membranas não reticuladas se dissolveram no meio. Posterior a esse procedimento foi confeccionando as “feridas” com a ponta de uma pipeta de 200 µL, produzindo um risco em linha reta na região média de cada poço. Este procedimento proporciona uma ruptura entre as células, causando a “lesão”.

A migração dos fibroblastos foi avaliada por meio de fotografias, utilizando-se uma objetiva de longa distância acoplada ao microscópio invertido (time-lapse, Zeiss Observer Z.1 - Zeiss, Alemanha), sempre com imagem da mesma área dos poços. As placas foram fotografadas a cada 30 min, durante 24 horas e com um aumento de 10 vezes.

O fechamento foi mensurado em todas as imagens por meio do software *ImageJ*®, sempre mantendo o mesmo ponto de medida, e a taxa de fechamento da ferida foi calculado de acordo com a equação 7.1 (PATHALAMUTHU et al., 2019).

$$SCR = \frac{d_0 - d_2}{d_0} \quad (7.1)$$

Onde, SCR é o grau de fechamento da ferida (*Scratch Closure Rate*), d_0 é a distância entre as bordas da “ferida” no tempo inicial e d_2 é a distância entre as bordas da “ferida” no tempo analisado (6 e 24 horas).

Os dados foram expressos em porcentagem de migração em 6 e 24 horas após a aplicação do tratamento, fazendo a medida da aproximação das bordas do ferimento, sendo o resultado a média da migração entre os grupos.

7.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

As membranas PVA/AH não mostraram citotoxicidade direta contra células HaCaT (Figura 26). Na verdade, elas estimularam o crescimento celular em comparação ao controle negativo da citotoxicidade (sem tratamento). Comparando as membranas preparadas, aquela sem o agente de reticulação (MA 0%) apresentou o melhor resultado de viabilidade celular (290%), enquanto membranas com concentrações de MA de 15 e 30% apresentaram valores semelhantes para viabilidade celular (~225%). A membrana com 5% de reticulador apresentou a menor viabilidade celular (120%), o que já era esperado, visto que a reação de reticulação estava incompleta nesta formulação (Figura 14), conforme já discutido no teste de solubilidade e análise de FTIR. Sabe-se que produtos químicos não ligados, como alguns agentes de reticulação, podem ser tóxicos para as células ou impedir o crescimento celular.

As membranas com extrato de tanchagem também não mostraram citotoxicidade, além disso, o princípio ativo camuflou o efeito negativo do agente reticulante que não foi completamente ligado (5% MA). Já para as amostras com 15% MA e 30% MA não houve diferença significativa entre os valores de viabilidade.

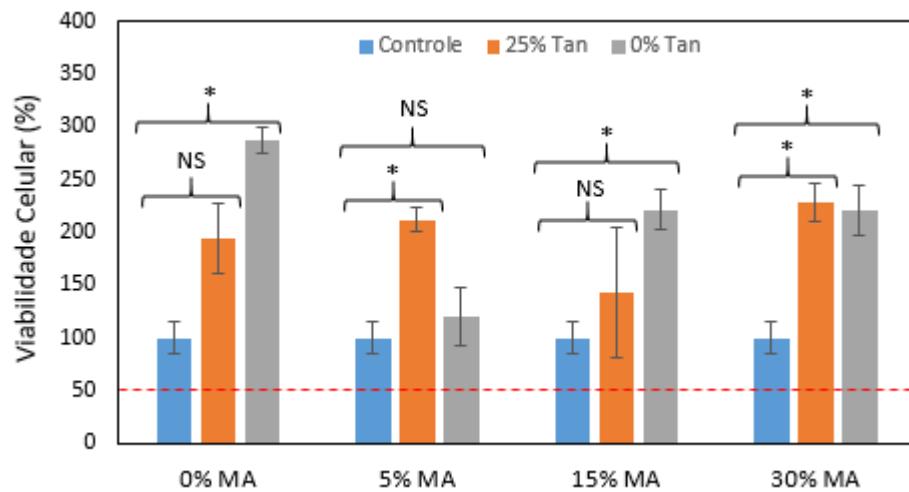
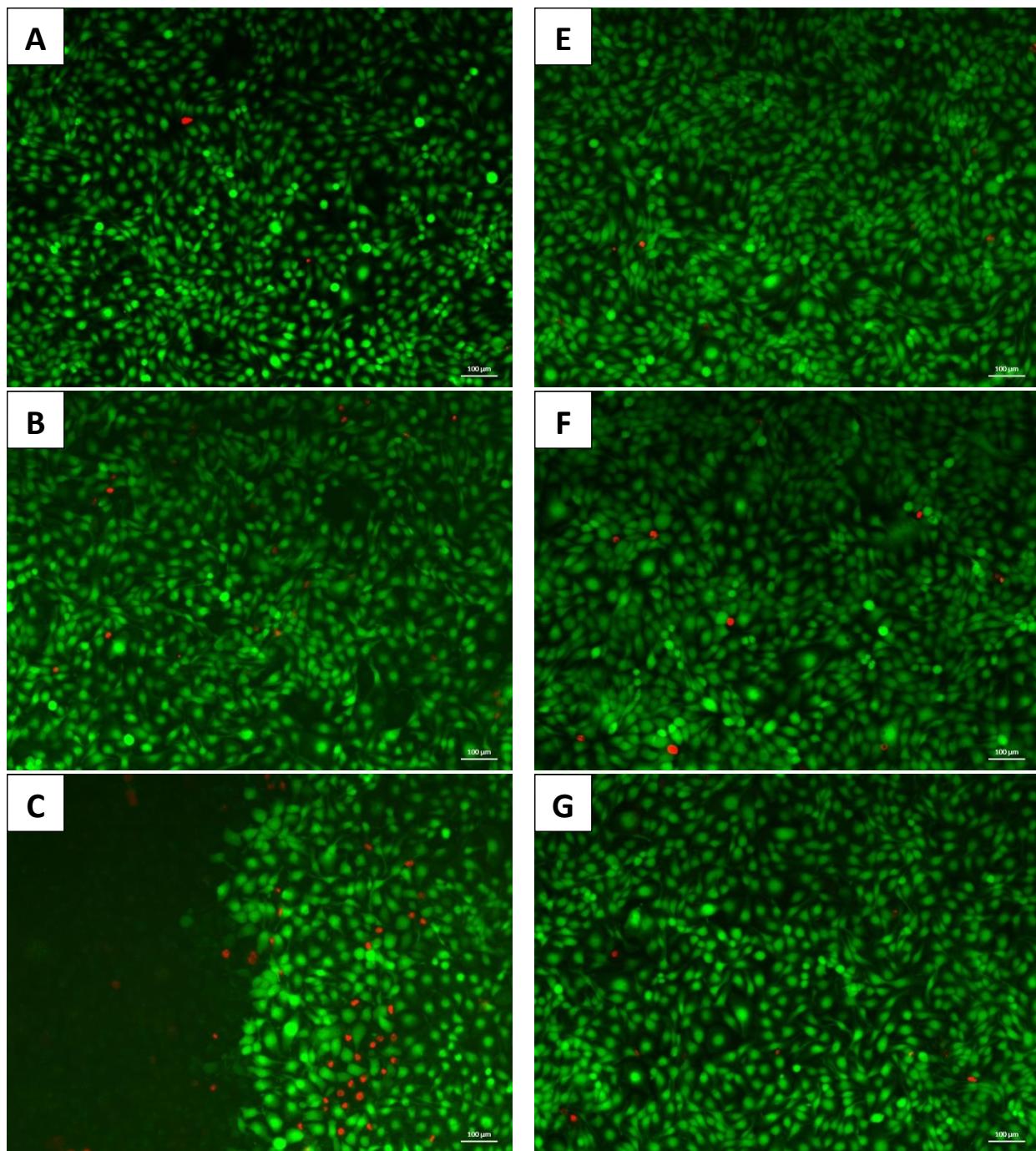


Figura 26 – Avaliação da viabilidade celular de células HaCaT após serem cultivadas com as membranas eletrofiadas por um período de 24 h (NS: Diferença não significativa, * Diferença significativa, para $p < 0.05$, ANOVA – Tukey).

Fonte: Da autora

O ensaio de *live/dead* foi realizado para analisar a sobrevivência das células na superfície das membranas, pela coloração simultânea de células vivas (marcadas em verde) e mortas (marcadas em vermelho). As imagens (Figura 27) mostram que as células permaneceram viáveis quando em contato com as membranas. Usando o suplemento Fiji do software *ImageJ®*, foi possível calcular a porcentagem de células vivas e mortas de cada amostra (Tabela 14). Esses resultados corroboram os dados obtidos no ensaio de MTT, confirmando a biocompatibilidade dessas membranas. Conforme o grau de reticulação aumenta, o número de células viáveis diminui, isso pode estar relacionado ao fato de que a membrana reticulada diminui a disponibilidade de AH livre capaz de promover a adesão celular, tendo em vista que o AH é um constituinte da ECM da pele e com excelentes propriedades biológicas (MIGUEL et al., 2019).

As membranas com extrato de tanchagem apresentaram maior desempenho em todos os sistemas, isso significa que o princípio ativo em questão compensou os possíveis problemas causados pela reticulação. Ensaios *in vivo* e de migração celular apontarão de forma efetiva a eficiência desse princípio ativo para aplicação desejada.



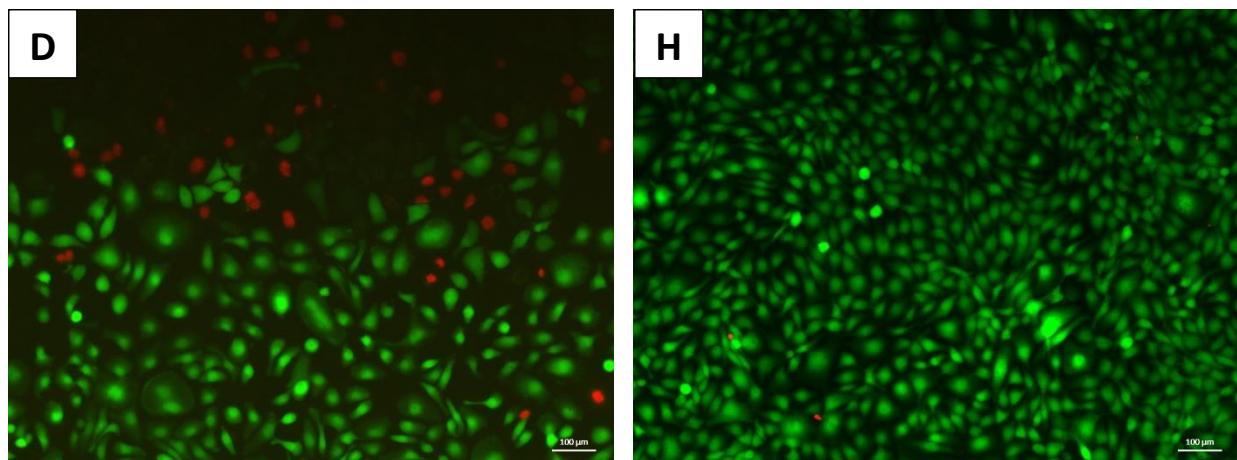


Figura 27 – Imagens de microscopia de fluorescência do ensaio *live* (verde)/*dead* (vermelha) com HaCaT cultivado na superfície das membranas de PVA/AH com e sem extrato de tanchagem (Tan) após 24 horas. (A) 0% MA, (B) 5% MA (C) 15% MA, (D) 30% MA, (E) 0% MA – 25% Tan, (F) 5% MA – 25% Tan, (G) 15% MA – 25% Tan e (H) 30% MA – 25% Tan.

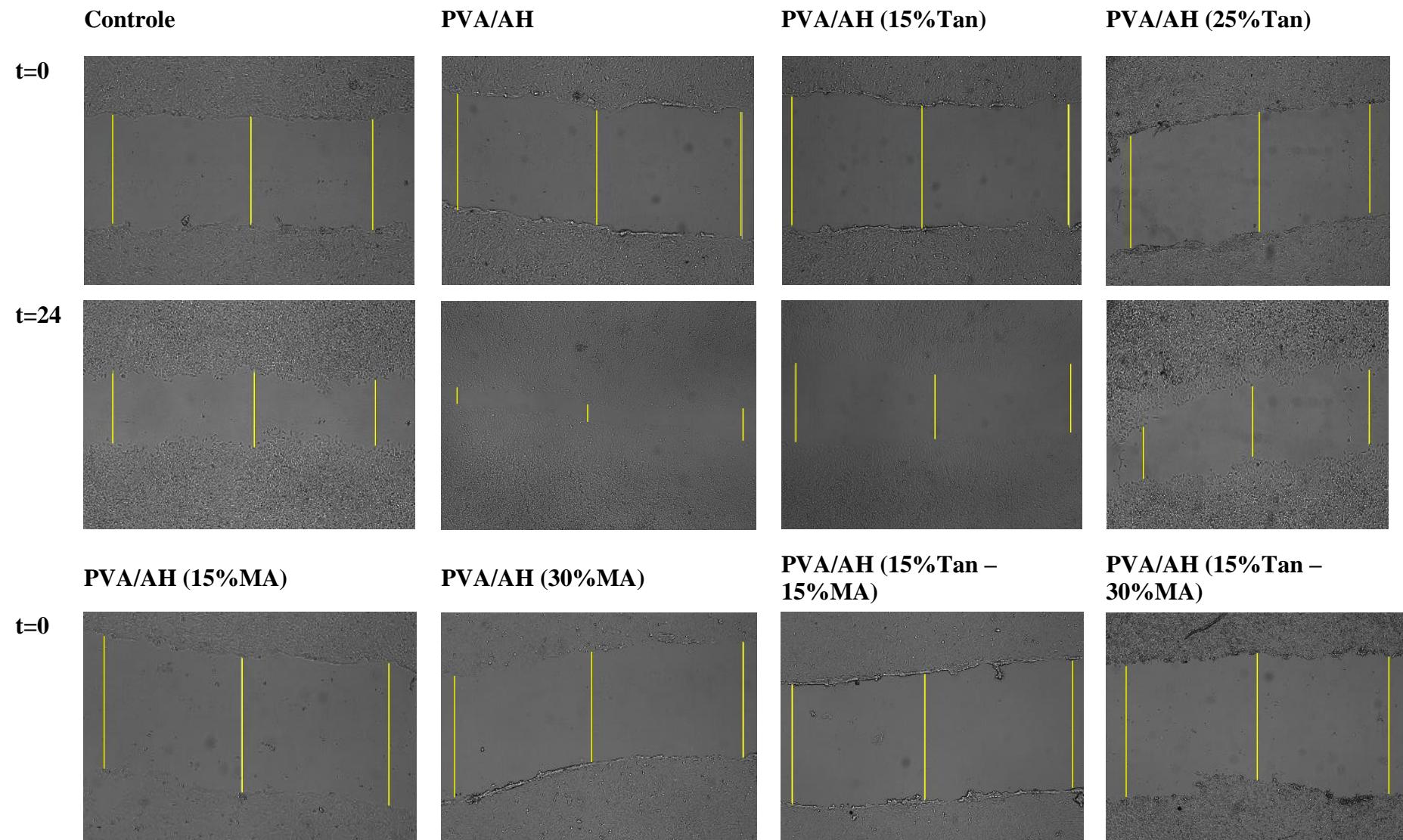
Fonte: Da autora

Tabela 14 – Porcentagem de células vivas e mortas no ensaio *live/dead* com HaCaT, em membranas de PVA/AH com diferentes concentrações de MA (com e sem extrato de tanchagem).

	0% MA	5% MA	15% MA	30% MA
Células vivas (%)	99,5	97,1	92,4	83,9
Células mortas (%)	0,5	2,9	7,6	16,1
	0% MA - Tan	5% MA - Tan	15% MA – Tan	30% MA - Tan
Células vivas (%)	99,6	99,0	98,6	99,5
Células mortas (%)	0,4	1,0	1,4	0,5

O fato de as membranas terem sido reticuladas com sucesso e não terem demonstrado citotoxicidade contra queratinócitos humanos é uma excelente indicação para este material ser usado como um potencial transportador para liberação sustentada de fármacos aplicados em cicatrização de feridas.

Os ensaios de migração celular não ocorreram completamente como o esperado, o que pode estar relacionado ao fato da metodologia utilizada ser uma medida de migração indireta, não avaliando o efeito estrutural da matriz no processo. A Figura 28 mostra as imagens do ensaio no tempo inicial e final.



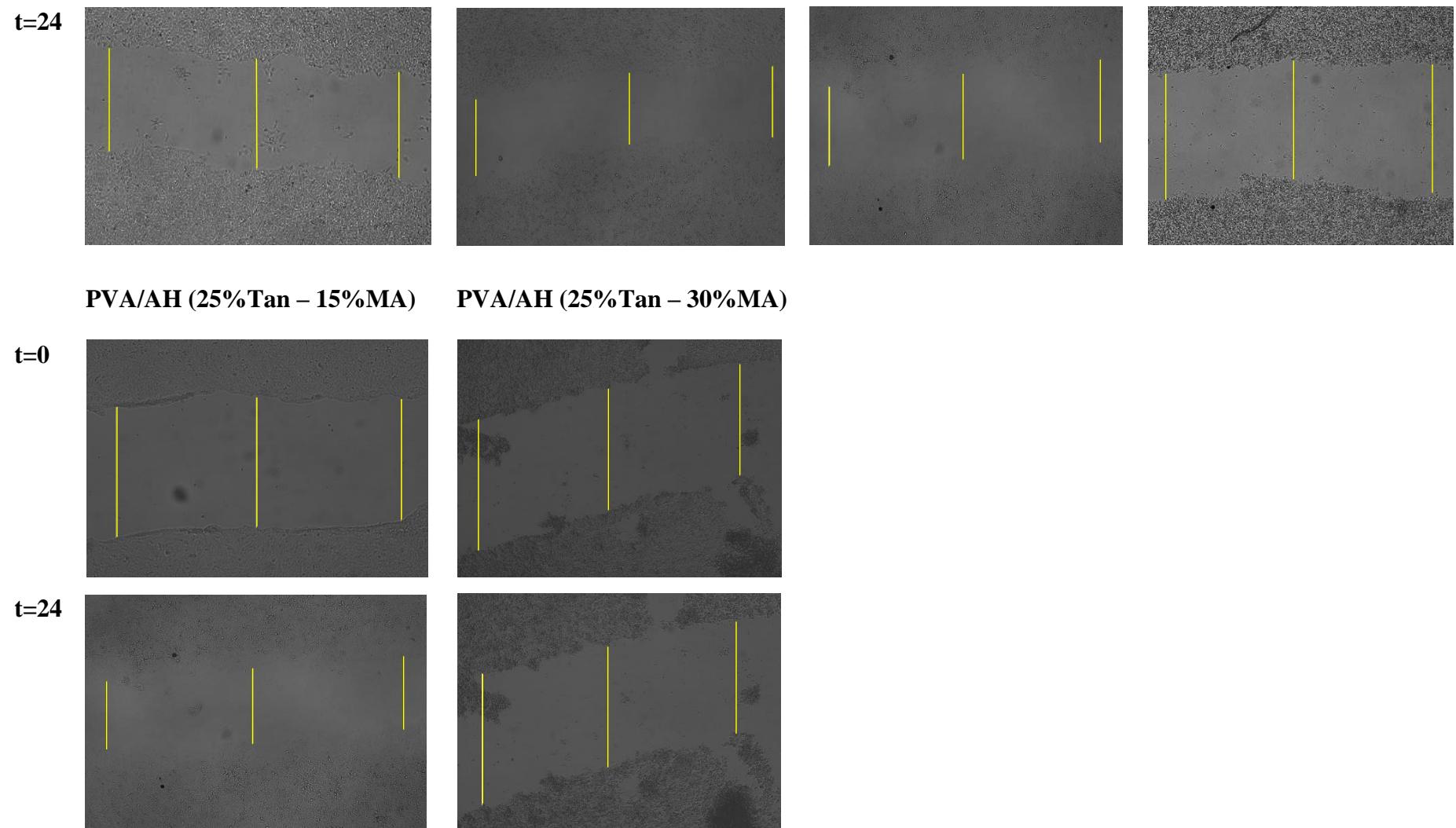


Figura 28 – Imagens de migração celular das membranas de PVA/AH com diferentes concentrações de MA e de Tanchagem.

Fonte: Da autora

Os resultados apresentados na Tabela 15 mostram que as membranas reticuladas apresentaram uma baixa migração celular quando comparadas com o controle, provavelmente devido à presença de agente reticulante não reagido, já que as membranas não passaram por um processo de purificação antes dos ensaios. Apesar dos resultados da migração não poderem ser comparados com os ensaios de MTT em decorrência das metodologias utilizadas serem diferentes, um ponto importante a ser destacado é que o ensaio de MTT já havia mostrado que a reticulação incompleta (5% MA) diminuiu significativamente a proliferação celular e que a presença do princípio ativo foi favorável para manter a não citotoxicidade do material. Corroborando com esses resultados, os ensaios de migração de forma indireta evidencia que a matriz polimérica, das membranas reticuladas, devem ser consideradas e não apenas o que é liberado delas, já que os compostos não reagidos são os primeiros a serem eliminados quando a matriz entre em contato com o meio de cultura, colocando em evidência os possíveis efeitos negativos desses compostos. De qualquer maneira é válido observar que apesar da migração não ocorrer nas primeiras 24 horas, as células apresentaram um aspecto morfológico positivo, não havendo morte celular aparente.

A significância estatística foi calculada com uma ANOVA de fator único e com teste t para comparação entre os grupos, onde um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Pela ANOVA existe diferença significativa entre todas as amostras do grupo de 24 horas ($p < 0,05$), o que não ocorreu para o grupo de 6 horas.

Tabela 15 – Medidas em porcentagem (%) de fechamento das membranas de PVA/AH em diferentes e condições.

Tempo	Controle	PVA/AH	PVA/AH 15%Tan	PVA/AH 25%Tan	PVA/AH 15%MA
6h	7±2	12±8	12±2*	9±4	4±2
24h	46±10	63±18	55±4	50±1	29±12 [#]
Tempo	PVA/AH 30%MA	PVA/AH 15%MA	PVA/AH 30%MA	PVA/AH 15%MA	PVA/AH 25%Tan
6h	5±1	5±3 ^b	0,4±0,6*, a, b	7±7	2±4 ^c
24h	34±8	36±10 ^b	5±4*, a, b	17±10*	3±3*, a, c

* Diferença estatística em relação ao controle (considerando o mesmo tempo); [#] Diferença estatística em relação a amostra sem agente de reticulação (PVA/AH); ^a Diferença estatística em relação a mesma concentração de agente de reticulação (PVA/AH-30%MA); ^b Diferença estatística em relação a mesma concentração de Tanchagem (PVA/AH-15%Tan); ^c Diferença estatística em relação a mesma concentração de Tanchagem (PVA/AH-25%Tan).

Uma observação importante foi a migração maior das membranas não reticuladas quando comparada com o controle, indicando que a estrutura composta pela matriz polimérica influencia positivamente na migração celular. Este resultado nos revela a importância de um novo ensaio, porém com a utilização de marcadores fluorescentes para que a migração possa ser acompanhada sem a retirada das membranas.

7.4. CONCLUSÕES

Os ensaios de citotoxicidade foram bem-sucedidos, e mostraram que as membranas apresentam grande potencial para aplicação em recobrimento de feridas e como nanocarreadoras de (bio)fármaco. A reticulação não interferiu de forma negativa na proliferação celular, além de garantir melhores propriedades para o material final. Os ensaios de migração celular *in vitro* revelaram alguns problemas relacionados a metodologia utilizada, deixando em aberto o estudo de uma nova metodologia.

CAPÍTULO 8

Conclusões Gerais, Referências, Memorial do Doutorado e Perspectivas Futuras

8.1. CONCLUSÕES GERAIS

Apesar dos grandes desafios ocasionados em decorrência da presença de ácido hialurônico foi possível obter membranas com características singulares, bem como obter um sistema estável em grande parte das condições estudadas. Alguns pontos são importantes de se destacar em cada um dos capítulos experimentais.

No **capítulo 3** concluiu-se que a vazão ótima para todos os sistemas é de 0,3 mL/h, enquanto a voltagem deve estar acima de 25 kV, nas proporções de 75% de AH e 25% de PVA o sistema é instável e a formação de nanofibras é praticamente inexistente, por outro lado obteve-se nanofibras com diâmetros menores. Dentre as combinações de concentrações propostas a concentração de AH 2% (m/v) e PVA 6% (m/v) se mostrou mais atrativa em termos de processabilidade.

A adição de agente reticulante proposta no **capítulo 4** solucionou o grande problema da alta solubilidade de ambas as matrizes poliméricas estudadas e permitiu que membranas fossem promissoras como plataformas de liberação controlada de medicamento. As membranas reticuladas com 15 e 30% garantiram a integridade das fibras em solução PBS 7,4 (pH fisiológico).

No **capítulo 5**, concluiu-se que a adição de tanchagem não prejudicou a processabilidade da solução polimérica e os ensaios de liberação baseados nas medidas de polifenóis foram satisfatórios, bem como, os dados se ajustaram ao modelo matemático, e mostraram que o mecanismo de liberação é primordialmente por difusão.

A estabilidade de armazenamento abordada no **capítulo 6**, mostrou que as membranas são estáveis termicamente e que o aumento da umidade relativa afeta principalmente a morfologia das amostras sem adição de agente de reticulação. Os dados experimentais foram melhor ajustados ao modelo de GAB, e os ensaios revelaram que a temperatura tem um efeito marcante nas membranas, e a forma como ocorre esse efeito precisa ser avaliada com cautela e minúcias, pois uma hipótese é que o efeito seja microestrutural, principalmente devido a reação de reticulação.

Por fim, o **capítulo 7**, mostrou que os sistemas propostos são não citotóxicos e estão aptos para prosseguirem para os ensaios *in vivo*. Os ensaios de migração necessitam de alguns ajustes para confirmar o efeito do agente reticulante, mas de qualquer maneira foram resultados positivos do ponto de vista das matrizes poliméricas e do princípio ativo proposto.

Diante das conclusões apresentadas o material proposto neste trabalho apresentou excelente estabilidade térmica e física, o que o torna também uma excelente matriz de liberação, que pode

ser explorada para outras aplicações terapêuticas. Como curativos, essa estabilidade e os bons resultados de liberação evidenciaram que o seu uso pode ser de tempo prolongado, evitando trocas excessivas e minimizando a contaminação da lesão. O princípio ativo superou as expectativas, auxiliando no processo de proliferação celular e minimizando possíveis efeitos negativos ocasionados pelo agente de reticulação.

8.2. REFERÊNCIAS

- ABDEL-MOHSEN, A. M. et al. Electrospinning of hyaluronan/polyvinyl alcohol in presence of in-situ silver nanoparticles: Preparation and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 139, p. 730–739, out. 2019.
- ABRIGO, M.; MCARTHUR, S. L.; KINGSHOTT, P. Electrospun nanofibers as dressings for chronic wound care: Advances, challenges, and future prospects. **Macromolecular Bioscience**, v. 14, n. 6, p. 772–792, 2014.
- ABU ELELLA, M. H.; MOHAMED, R. R.; SABAA, M. W. Synthesis of novel grafted hyaluronic acid with antitumor activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 189, p. 107–114, 2018.
- ACEVEDO, C. A. et al. Synergistic effects of crosslinking and chitosan molecular weight on the microstructure, molecular mobility, thermal and sorption properties of porous chitosan/gelatin/hyaluronic acid scaffolds. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 134, n. 18, 2017.
- ADOM, M. B. et al. Chemical constituents and medical benefits of *Plantago major*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 348–360, 2017.
- ALIZADEH BEHBAHANI, B. et al. *Plantago major* seed mucilage: Optimization of extraction and some physicochemical and rheological aspects. **Carbohydrate Polymers**, v. 155, p. 68–77, 2017.
- ALVES, V. D. et al. Characterization of biodegradable films from the extracellular polysaccharide produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on glycerol byproduct. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 4, p. 1582–1590, 2011.
- AYROSA, A. M. I. B. et al. Hygroscopic behavior of lyophilized bovine pericardium. **Materíia**, v. 12, n. 2, p. 313–321, 2007.
- AZEVEDO, V. M. et al. Whey protein isolate biodegradable films: Influence of the citric acid and montmorillonite clay nanoparticles on the physical properties. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 252–258, 2015.
- AZIZ, S. et al. Polymer blending as a novel approach for tuning the SPR peaks of silver nanoparticles. **Polymers**, v. 9, n. 12, p. 486, 2017a.
- AZIZ, S. B. et al. Fabrication of polymer blend composites based on [PVA-PVP] (1-x) : (Ag 2 S) x ($0.01 \leq x \leq 0.03$) with small optical band gaps: Structural and optical properties. **Materials Science in Semiconductor Processing**, v. 71, p. 197–203, 2017b.
- BAJPAI, S. K.; DEHARIYA, P.; S SAGGU, S. P. Investigation of moisture sorption, permeability and drug release behavior of carrageenan/poly vinyl alcohol films. v. 4, n. 3, p. 142–152, 2014.
- BALUSAMY, B.; SENTHAMIZHAN, A.; UYAR, T. Electrospun nanofibrous materials for wound healing applications. In: **Electrospun Materials for Tissue Engineering and Biomedical Applications: Research, Design and Commercialization**. [s.l.] Elsevier Ltd., 2017. p. 147–177.
- BARROSO, N. et al. Self-healable hyaluronic acid/chitosan polyelectrolyte complex hydrogels

and multilayers. **European Polymer Journal**, v. 120, n. July, p. 109268, 2019.

BOBADILLA, A. V. P. et al. In vitro cell migration quantification method for scratch assays. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 16, n. 2019.

BORGES, E. L.; NASCIMENTO FILHO, H. M. DO; PIRES JÚNIOR, J. F. Prevalence of chronic wounds in a city of Minas Gerais (Brazil). **REME: Revista Mineira de Enfermagem**, v. 22, p. 1–7, 2018.

CASTRO, K. C.; CAMPOS, M. G. N.; MEI, L. H. I. Hyaluronic acid electrospinning: Challenges, applications in wound dressings and new perspectives. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 173, p. 251–266, 2021.

CASTRO, K. C.; COSTA, J. M.; MEI, L. H. I. Advances in electrospinning technique in the manufacturing process of nanofibrous materials. In: **Electrospun Materials and Their Allied Applications**. [s.l.] Wiley, 2020. p. 379–399.

CHEN, G. et al. Preparation, characterization, and application of PEO/HA core shell nanofibers based on electric field induced phase separation during electrospinning. **Polymer**, v. 83, p. 12–19, 2016.

CHEN, L. H. et al. Hyaluronic acid, an efficient biomacromolecule for treatment of inflammatory skin and joint diseases: A review of recent developments and critical appraisal of preclinical and clinical investigations. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 116, p. 572–584, 2018.

CHEN, Q.; LIANG, S.; THOUAS, G. A. Elastomeric biomaterials for tissue engineering. **Progress in Polymer Science**, v. 38, n. 3–4, p. 584–671, 2013.

CHOU, S. F. et al. A review of injectable and implantable biomaterials for treatment and repair of soft tissues in wound healing. **Journal of Nanotechnology**, 2017.

COIMBRA, P. et al. Solubility of Irgacure® 2959 photoinitiator in supercritical carbon dioxide: Experimental determination and correlation. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 45, n. 3, p. 272–281, jul. 2008.

COLLINS, M. N.; BIRKINSHAW, C. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering — A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1262–1279, 2013.

CROISIER, F. et al. Polysaccharide-Coated PCL Nanofibers for Wound Dressing Applications. **Advanced Healthcare Materials**, v. 3, n. 12, p. 2032–2039, 2014.

CUI, S. W. et al. Characterisation and properties of Acacia senegal (L.) Willd. var. senegal with enhanced properties (Acacia (sen) SUPERGUM™): Part 4. Spectroscopic characterisation of Acacia senegal var. senegal and Acacia (sen) SUPERGUM™ arabic. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 3, p. 347–352, 2007.

D'AGOSTINO, A. et al. Is molecular size a discriminating factor in hyaluronan interaction with human cells? **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 21–30, 2017.

DAY, A. J.; DE LA MOTTE, C. A. Hyaluronan cross-linking: a protective mechanism in inflammation? **Trends in Immunology**, v. 26, n. 12, p. 637–643, 2005.

- DE OLIVEIRA, S. A. et al. Production and characterization of bacterial cellulose membranes with hyaluronic acid from chicken comb. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, p. 642–653, 2017.
- DENG, Y. et al. Injectable in situ cross-linking chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for abdominal tissue regeneration. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 2699, 2017.
- DHANDAYUTHAPANI, B.; KRISHNAN, U. M.; SETHURAMAN, S. Fabrication and characterization of chitosan-gelatin blend nanofibers for skin tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 94, n. 1, p. 264–272, 2010.
- DOSHI, J.; RENEKER, D. H. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. **Journal of Electrostatics**, v. 35, n. 2–3, p. 151–160, 1995.
- EBRAHIMI, B.; HATAMI, T.; VERA, J. H. Use of a hybrid optimization method to reduce vapor-liquid equilibrium data of maverick systems: The case of carbon dioxide with 2-methoxyethanol and 2-ethoxyethanol using cubic equations of state. **Fluid Phase Equilibria**, v. 338, p. 46–53, 2013.
- EL-AASSAR, M. R. et al. Wound healing of nanofiber comprising Polygalacturonic/Hyaluronic acid embedded silver nanoparticles: In-vitro and in-vivo studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 238, p. 116175, 2020.
- FAHIMIRAD, S.; AJALLOUEIAN, F. Naturally-derived electrospun wound dressings for target delivery of bio-active agents. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 566, p. 307–328, 2019.
- FAHMY, A. et al. Poly(vinyl alcohol)-hyaluronic acid membranes for wound dressing applications: Synthesis and in vitro bio-evaluations. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 26, n. 7, p. 1466–1474, 2015.
- GHAVAMINEJAD, A. et al. Crosslinking strategies for 3D bioprinting of polymeric hydrogels. **Small**, v. 16, n. 35, p. 2002931, 2020.
- GHAYAL, G. et al. Moisture sorption isotherms of dietetic Rabri at different storage temperatures. **International Journal of Dairy Technology**, v. 66, n. 4, 2013.
- GHELICH, R.; RAD, M. K.; YOUZBASHI, A. A. Study on morphology and size distribution of electrospun NiO-GDC composite nanofibers effect of polymer concentration solution. **Journal of Engineered Fibers and Fabrics**, v. 10, n. 1, p. 12–19, 2015.
- GILLI, R. et al. FTIR studies of sodium hyaluronate and its oligomers in the amorphous solid phase and in aqueous solution. **Carbohydrate Research**, v. 263, n. 2, p. 315–326, 1994.
- GOHIL, J. M.; BHATTACHARYA, A.; RAY, P. Studies on the cross-linking of poly(vinyl alcohol). **Journal of Polymer Research**, v. 13, n. 2, p. 161–169, 2006.
- GREENSPAN, L. Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. **Journal of Research of the National Bureau of Standards. A. Physics and Chemistry**, v. 81, n. 1, p. 89–112, 1977.
- HADISI, Z. et al. Hyaluronic acid (HA)-based silk fibroin/zinc oxide core–shell electrospun dressing for burn wound management. **Macromolecular Bioscience**, v. 20, n. 4, p. 1900328, 2020.

- HAIDER, A.; HAIDER, S.; KANG, I. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 11, n. 8, p. 1165–1188, 2018.
- HALSEY, G. Physical adsorption on non-uniform surfaces. **The Journal of Chemical Physics**, v. 16, n. 10, p. 931–937, 1948.
- HARRIS, J. J.; LU, S.; GABRIELE, P. Commercial challenges in developing biomaterials for medical device development. **Polymer International**, v. 67, n. 8, p. 969–974, 2018.
- HESARINEJAD, M. A.; RAZAVI, S. M. A.; KOCHEKI, A. Alyssum homocarpum seed gum: Dilute solution and some physicochemical properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 418–426, 2015.
- HU, W. et al. Advances in crosslinking strategies of biomedical hydrogels. **Biomaterials Science**, v. 7, n. 3, p. 843–855, 2019.
- HUSSEIN, Y. et al. Electrospun PVA/hyaluronic acid/L-arginine nanofibers for wound healing applications: Nanofibers optimization and in vitro bioevaluation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 667–676, 2020.
- INOZEMTSEVA, O. A. et al. Electrospinning of functional materials for biomedicine and tissue engineering. **Russian Chemical Reviews**, v. 3, p. 251–274, 2015.
- JALVANDI, J. et al. Polyvinyl alcohol composite nano fibres containing conjugated levo floxacincitosan for controlled drug release. **Materials Science & Engineering C**, v. 73, p. 440–446, 2017.
- JEONG, K.-H.; PARK, D.; LEE, Y.-C. Polymer-based hydrogel scaffolds for skin tissue engineering applications: a mini-review. **Journal of Polymer Research**, v. 24, n. 7, p. 112, 2017.
- JESÚS, V. L. et al. Electrospinning as a powerful technique for biomedical applications: A critically selected survey. **Journal of Biomaterials Science**, v. 27, n. 2, p. 157–76, 2016.
- JI, Y. et al. Electrospun three-dimensional hyaluronic acid nanofibrous scaffolds. **Biomaterials**, v. 27, p. 3782–3792, 2006.
- JORGE, D. et al. **Manual de Curativos**, 2021.
- KACURÁKOVÁ, M. FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 43, n. 2, p. 195–203, 2000.
- KADERLI, S. et al. A novel biocompatible hyaluronic acid-chitosan hybrid hydrogel for osteoarthritis therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, n. 1–2, p. 158–168, 2015.
- KALAF, E. A. G. et al. Electrospun biomaterials for dermal regeneration. In: **Electrospun Materials for Tissue Engineering and Biomedical Applications: Research, Design and Commercialization**. [s.l.] Elsevier Ltd., 2017. p. 179–232.
- KENAWY, E.; AL-DEYAB, S. S. Controlled release of atenolol from freeze/thawed poly(vinyl alcohol) hydrogel. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 237–240, 2010.
- KORSMEYER, R. W. et al. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers.

- International Journal of Pharmaceutics**, v. 15, n. 1, p. 25–35, 1983.
- KUMAR, A.; HAN, S. S. PVA-based hydrogels for tissue engineering: A review. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 66, n. 4, p. 159–182, 2017.
- LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue Engineering. **Science**, v. 260, p. 920–926, 1993.
- LANNUTTI, J. et al. Electrospinning for tissue engineering scaffolds. **Materials Science and Engineering C**, v. 27, p. 504–509, 2007.
- LARA, B. R. B. et al. Water sorption thermodynamic behavior of whey protein isolate/ polyvinyl alcohol blends for food packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 103, n. September 2019, p. 105710, 2020.
- LARRAÑETA, E. et al. Synthesis and characterization of hyaluronic acid hydrogels crosslinked using a solvent-free process for potential biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 181, p. 1194–1205, 2018.
- LI, D.; XIA, Y. **Electrospinning of nanofibers: Reinventing the wheel?Advanced Materials** John Wiley & Sons, Ltd, , 19 jul. 2004. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/adma.200400719>>. Acesso em: 21 maio. 2021
- LI, F.; ZHAO, Y.; SONG, Y. Core-shell nanofibers: Nano channel and capsule by coaxial electrospinning. In: **Nanofibers**. [s.l.] InTech, 2010. p. 438.
- LI, L. et al. The use of hyaluronan to regulate protein adsorption and cell infiltration in nanofibrous scaffolds. **Biomaterials**, v. 33, n. 12, p. 3428–3445, 2012.
- LI, L. et al. Biodegradable and injectable in situ cross-linking chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for postoperative adhesion prevention. **Biomaterials**, v. 35, n. 12, p. 3903–3917, 2014.
- LI, Q. et al. **Preparation and Properties of Poly (vinyl alcohol) Nanofibers by Electrospinning**. International Conference on Solid Dielectrics. **Anais**. Winchester: 2007
- LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329–333, 2007.
- LIOU, F. J.; WANG, Y. J. Preparation and characterization of crosslinked and heat-treated PVA-MA films. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 59, n. 9, p. 1395–1403, 1996.
- LITWINIUK, M.; KREJNER, A.; GRZELA, T. Hyaluronic acid in inflammation and tissue regeneration. **Wounds**, v. 28, n. 3, p. 78–88, 2016.
- MAJIDI, R. F.; NEZAFATI, N.; PAZOUKI, M. **Synthesis and characterization of a novel in-situ maleic acid cross-linked electrospun poly(vinyl alcohol)/ hydroxyapatite nanofibers**. 6th International Conference on Nanotechnology (ICN2017). **Anais**. Dubai: 2017
- MARKA, S. K. et al. Flexible few-layered graphene/poly vinyl alcohol composite sheets: Synthesis, characterization and EMI shielding in X-band through the absorption mechanism. **RSC Advances**, v. 5, n. 46, p. 36498–36506, 2015.
- Medical Dictionary for the Dental Professions**. Elsevier, , 2012. (Nota técnica).
- MEGELSKI, S. et al. Micro- and nanostructured surface morphology on electrospun polymer

fibers. **Macromolecules**, v. 35, p. 8456–8466, 2002.

MEMIC, A. et al. Latest progress in electrospun nanofibers for wound healing applications. **ACS Applied Bio Materials**, v. 2, n. 3, p. 952–969, 2019.

MIGUEL, S. P. et al. Electrospun polymeric nanofibres as wound dressings: A review. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 169, p. 60–71, 2018.

MIGUEL, S. P. et al. Production and characterization of electrospun silk fibroin based asymmetric membranes for wound dressing applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 524–535, 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de condutas para tratamento de úlceras em hanseníase e diabetes**, 2008. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_condutas_ulcera_hansenise.pdf>. Acesso em: 29 mar. 2021

MINISTÉRIO DA SAÚDE; ANVISA. **Monografia da espécie Plantago Major L. (Tanchagem)**.

MOHAN, N. et al. Chitosan-hyaluronic acid hydrogel for cartilage repair. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 1936–1945, 2016.

MONJAZEB MARVDASHTI, L.; KOCHEKI, A.; YAVARMANESH, M. Alyssum homolocarpum seed gum-polyvinyl alcohol biodegradable composite film: Physicochemical, mechanical, thermal and barrier properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 155, p. 280–293, 2017.

MOUTLOALI, K. P. M. R. M. The influence of electrospinning parameters on the morphology and diameter of poly (vinyledene fluoride) nanofibers- effect of sodium chloride. **J Mater Sci**, v. 48, p. 5475–5482, 2013.

NAJAFIAN, Y. et al. Plantago major in Traditional Persian Medicine and modern phytotherapy: a narrative review. **Electronic Physician**, v. 10, n. 2, p. 6390–6399, 2018.

NASCIMENTO, M. H. M. DO; LOMBELLO, C. B. Hidrogéis a base de ácido hialurônico e quitosana para engenharia de tecido cartilaginoso. **Polímeros**, v. 26, n. 4, p. 360–370, 2016.

OSWIN, C. R. The kinetics of package life. III. The isotherm. **Journal of the Society of Chemical Industry**, v. 65, n. 12, p. 419–421, 1946.

OZBOLAT, I. T. The Bioink. With contributions by Monika Hospodiuk and Madhuri Dey, The Pennsylvania State University. In: **3D Bioprinting**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 41–92.

PATHALAMUTHU, P. et al. Enhanced performance of Aloe vera incorporated chitosan-polyethylene oxide electrospun wound scaffold produced using novel Spirograph based collector assembly. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 140, p. 808–824, 2019.

PEPPAS, N. A.; SAHLIN, J. J. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 57, n. 2, p. 169–172, 1989.

PHAM, Q. P. et al. Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: A review. **Tissue Engineering**, v. 12, n. 5, p. 1197–1211, 2006.

- PILLAY, V. et al. A review of the effect of processing variables on the fabrication of electrospun nanofibers for drug delivery applications. **Journal of Nanomaterials**, p. 1–22, 2013.
- PINGRUI, M. et al. Crosslinking of PVA pervaporation membrane by maleic acid. **Tsinghua Science and Technology**, v. 5, n. 2, p. 172–175, 2000.
- QUINN, J. A. et al. Preparation and characterization of crosslinked electrospun poly(vinyl alcohol) nanofibrous membranes. **Polymer**, v. 134, p. 275–281, 2018.
- RAI, S. K.; BASAK, P. Synthesis and characterization of polyvinyl alcohol hydrogel. **International Conference on Systems in Medicine and Biology, ICSMB 2010 - Proceedings**, n. December, p. 360–364, 2010.
- RAZAVI, S. M. A. et al. Some physicochemical properties of sage (*Salvia macrosiphon*) seed gum. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 453–462, mar. 2014.
- REIS, A. V. et al. Mathematical model for the prediction of the overall profile of in vitro solute release from polymer networks. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 310, n. 1, p. 128–135, 2007.
- RODRIGUES, J. et al. Photocatalytic degradation using ZnO for the treatment of RB 19 and RB 21 dyes in industrial effluents and mathematical modeling of the process. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 153, p. 294–305, 2020.
- SALEHHUDIN, H. S. et al. Multiple-jet electrospinning methods for nanofiber processing: A review. **Materials and Manufacturing Processes**, v. 33, n. 5, p. 479–498, 2018.
- SANKARAN, S.; DESHMUKH, K.; AHAMED, M. B. Electrospinning Process. In: **Electrospun Polymeric Nanofibers: Fundamental Aspects of Electrospinning Processes, Optimization of Electrospinning Parameters, Properties, and Applications**. Cham: Springer, 2019. p. 380–388.
- SANTOS, K.; TONIN, L. T. Estudo da influência da temperatura de secagem e solvente extrator na capacidade antioxidante de folhas *Plantago major*. **Revista Fitos**, v. 13, n. 3, p. 200–211, 2019.
- SCHMID, M. et al. Storage time-dependent alteration of molecular interaction–property relationships of whey protein isolate-based films and coatings. **Journal of Materials Science**, v. 50, n. 12, p. 4396–4404, 2015.
- SELDERS, G. S. et al. Electrospun systems for drug delivery. In: **Electrospun Materials for Tissue Engineering and Biomedical Applications: Research, Design and Commercialization**. [s.l.] Elsevier Ltd., 2017. p. 115–146.
- SELYANIN, M. A. et al. **Hyaluronic Acid: Preparation, Properties, Application in Biology and Medicine**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2015. v. 57.
- SÉON-LUTZ, M. et al. Electrospinning in water and in situ crosslinking of hyaluronic acid / cyclodextrin nanofibers: Towards wound dressing with controlled drug release. **Carbohydrate Polymers**, v. 207, p. 276–287, 2019.
- SHANKHWAR, N. et al. Electrospun polyvinyl alcohol-polyvinyl pyrrolidone nanofibrous membranes for interactive wound dressing application. **Journal of Biomaterials Science**, v. 27, n. 3, p. 247–262, 2015.

- SIEPMANN, J.; SIEPMANN, F. Modeling of diffusion controlled drug delivery. **Journal of Controlled Release**. 2012.
- SILL, T. J.; RECUM, H. A. VON. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. **Biomaterials**, v. 29, p. 1989–2006, 2008.
- SILVA, E. K. et al. Water adsorption in rosemary essential oil microparticles: Kinetics, thermodynamics and storage conditions. **Journal of Food Engineering**, v. 140, p. 39–45, 2014.
- SILVA, N. H. C. S. et al. Topical drug delivery systems based on bacterial nanocellulose: Accelerated stability testing. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 4, p. 1262, 2020.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152–178, 1999.
- SMITH, S. E. The sorption of water vapor by high polymers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 69, n. 3, p. 646–651, 1947.
- SNETKOV, P. et al. Hyaluronan-based nanofibers: Fabrication, characterization and application. **Polymers**, v. 11, n. 12, p. 2036, 2019.
- SRIKAMUT, C. et al. Encapsulation of emulsion droplets and nanoparticles in nanofibers as sustainable approach for their transport and storage. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 577, p. 199–206, 2020.
- SRINIVASA, P. C. et al. Properties and sorption studies of chitosan-polyvinyl alcohol blend films. **Carbohydrate Polymers**, v. 53, n. 4, p. 431–438, 2003.
- STERN, R.; ASARI, A. A.; SUGAHARA, K. N. Hyaluronan fragments: An information-rich system. **European Journal of Cell Biology**, v. 85, n. 8, p. 699–715, 2006.
- SUN, B. et al. Advances in three-dimensional nanofibrous macrostructures via electrospinning. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 5, p. 862–890, 2013.
- SUNDARAY, B. et al. Electrospinning of continuous aligned polymer fibers. **Applied Physics Letters**, v. 84, n. 7, p. 1222–1224, 2004.
- SURI, S.; SCHMIDT, C. E. Cell-laden hydrogel constructs of hyaluronic acid, collagen, and laminin for neural tissue engineering. **Tissue Engineering Part A**, v. 16, n. 5, p. 1703–1716, 2010.
- TAN, H. et al. Injectable in situ forming biodegradable chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for cartilage tissue engineering. **Biomaterials**, v. 30, n. 13, p. 2499–2506, 2009.
- TANG, X.-P. et al. Effect of flow rate on diameter of electrospun nanoporous fibers. **Thermal Science**, v. 18, n. 5, p. 1447–1449, 2015.
- TARUS, B. et al. Effect of polymer concentration on the morphology and mechanical characteristics of electrospun cellulose acetate and poly (vinyl chloride) nanofiber mats. **Alexandria Engineering Journal**, v. 55, n. 3, p. 2975–2984, 2016.
- TEIXEIRA, M. A.; AMORIM, M. T. P.; FELGUEIRAS, H. P. Poly(vinyl alcohol)-based

- nanofibrous electrospun scaffolds for tissue engineering applications. **Polymers**, v. 12, n. 1, p. 7, 2019.
- TOLG, C. et al. Rhamm^{-/-} fibroblasts are defective in CD44-mediated ERK1,2 motogenic signaling, leading to defective skin wound repair. **Journal of Cell Biology**, v. 175, n. 6, p. 1017–1028, 2006.
- TOUNY, A. H.; BHADURI, S. B. A reactive electrospinning approach for nanoporous PLA/monetite nanocomposite fibers. **Materials Science and Engineering C**, v. 30, n. 8, p. 1304–1312, 2010.
- TROMBINO, S. et al. Strategies for hyaluronic acid-based hydrogel design in drug delivery. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 8, p. 407, 2019.
- TRUONG, Y. B. et al. Functional cross-linked electrospun polyvinyl alcohol membranes and their potential applications. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 302, n. 8, p. 1–9, 2017.
- UPPAL, R. et al. Hyaluronic acid nanofiber wound dressing-production, characterization, and in vivo behavior. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 97B, n. 1, p. 20–29, 2011.
- VAN DEN BERG, C. Description of water activity of foods for engineering purposes by means of the GAB model of sorption. In: B.M. MCKENNA (Ed.). **Engineering and Foods**. London: Elsevier, 1984. p. 311–321.
- VERT, M. et al. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). **Pure and Applied Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 377–410, 2012.
- VIGANI, B. et al. Coated electrospun alginate-containing fibers as novel delivery systems for regenerative purposes. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 6531–6550, 2018a.
- VIGANI, B. et al. Electrospun alginate fibers: Mixing of two different poly(ethylene oxide) grades to improve fiber functional properties. **Nanomaterials**, v. 8, n. 12, p. 971, 2018b.
- VIGANI, B. et al. Hyaluronic acid and chitosan-based nanosystems: a new dressing generation for wound care. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 16, n. 7, p. 715–740, 2019.
- VILLARREAL-GÓMEZ, L. J. et al. Electrospinning as a powerful technique for biomedical applications: A critically selected survey. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 27, n. 2, p. 157–176, 2016.
- WANG, C. et al. Electrospinning of polyacrylonitrile solutions at elevated temperatures. **Macromolecules**, v. 40, p. 7973–7983, 2007.
- WILLIAMS, C. G. et al. Variable cytocompatibility of six cell lines with photoinitiators used for polymerizing hydrogels and cell encapsulation. **Biomaterials**, v. 26, n. 11, p. 1211–1218, 2005.
- WILLIAMS, D. F. The biomaterials conundrum in tissue engineering. **Tissue Engineering - Part A**, v. 20, n. 7–8, p. 1129–1131, 2014.
- XU, H. et al. Effects of Irgacure 2959 and lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate on cell viability, physical properties, and microstructure in 3D bioprinting of vascular-like constructs. **Biomedical Materials**, v. 15, n. 5, p. 055021 2020.

- XU, S. et al. Chemical crosslinking and biophysical properties of electrospun hyaluronic acid based ultra-thin fibrous membranes. **Polymer**, v. 50, n. 15, p. 3762–3769, jul. 2009.
- YANG, E.; QIN, X.; WANG, S. Electrospun crosslinked polyvinyl alcohol membrane. **Materials Letters**, v. 62, n. 20, p. 3555–3557, 2008.
- YOUNG, D. S. **Hyaluronic Acid-based Nanofibers via Electrospinning**. [s.l.] North Carolina State University in, 2006.
- YU, F. et al. An interpenetrating HA/G/CS biomimic hydrogel via Diels-Alder click chemistry for cartilage tissue engineering. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, n. 1, p. 188–195, 2013.
- ZERBINATTI, G. et al. **Manual de Tratamento de Feridas**, 2018.
- ZEYTUNCU, B. et al. Influence of polyvinyl alcohol amount on producing in situ photo-crosslinked thioamide functionalized nanofiber membranes. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 80, n. 1, p. 97–106, 2015.
- ZHANG, C.; YUAN, X. Study on morphology of electrospun poly (vinyl alcohol) mats. **European Polymer Journal**, v. 41, p. 423–432, 2005.
- ZHANG, F. et al. Development of a complex hydrogel of hyaluronan and PVA embedded with silver nanoparticles and its facile studies on Escherichia coli. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 24, n. 12, p. 1410–1425, 2013.
- ZHAO, W. et al. Preparation of animal polysaccharides nanofibers by electrospinning and their potential biomedical applications. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 103, n. 2, p. 807–818, fev. 2015a.
- ZHAO, Y. et al. Hyaluronic acid-functionalized electrospun polyvinyl alcohol/polyethyleneimine nanofibers for cancer cell capture applications. **Advanced Materials Interfaces**, v. 2, n. 15, p. 1500256, 2015b.
- ZHONG, W.; XING, M. M. Q.; MAIBACH, H. I. Nanofibrous materials for wound care. **Cutaneous and Ocular Toxicology**, v. 29, n. 3, p. 143–152, 2010.
- ZHOU, F.-L.; GONG, R.-H. Manufacturing technologies of polymeric nanofibres and nanofibre yarns. **Polymer international**, v. 57, n. April, p. 171–180, 2008.
- ZHU, N.; CHE, X. Biofabrication of tissue scaffolds. In: **Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications**. [s.l.] InTech, 2013.
- ZUO, W. et al. Experimental study on relationship between jet instability and formation of beaded fibers during electrospinning. **Polymer Engineering & Science**, v. 45, p. 704–709, 2005.

8.3. MEMÓRIA DO PERÍODO DE DOUTORADO

A Engenheira Química Karine Cappuccio de Castro ingressou como doutoranda na UNICAMP em 2017 sob a orientação do Profa. Dra. Lucia Helena Innocentini Mei por meio do processo seletivo do Departamento de Engenharia de Materiais e Bioprocessos (DEMBio). Com auxílio financeiro inicialmente da Capes com posterior troca para o CNPq (nº 140567/2019-4), cursou uma disciplina obrigatória: IQ120 Termodinâmica - I, duas disciplinas eletivas: IQ040 Escrita Acadêmica em Inglês e IQ226 Caracterização dos Polímeros; Uma disciplina de verão: TP333 Planejamento Experimental e Otimização de Processos, realizada na FEA (Faculdade de Engenharia de Alimentos); e validou por aproveitamentos de estudos, outra disciplina obrigatória: IQ130 Fenômenos de Transporte I.

Participou do Programa de Estágio Docente como bolsista no grupo C (PED C) com atividades de apoio parcial à docência da disciplina EQ701 - Laboratório de Engenharia Química II, entre agosto/2018 e dezembro/2018 e como bolsista na modalidade PED B entre fevereiro/2019 e dezembro/2019 na mesma disciplina.

A pesquisa referente ao doutorado resultou até o momento em 2 artigo científico publicado na *RSC Advances* e na *International Journal of Biological Macromolecules*. Houve também a produção de 2 capítulos de livro, sendo um pela editora Wiley e outro pela editora da *UNICAMP*. A doutoranda participou do XVIII Encontro da SBPMat/B-MRS Meeting (2019), recebendo a premiação *Bernard Gross Award*, de melhor trabalho da área na modalidade pôster, bem como a publicação de 2 resumos expandidos.

Artigos publicados

CASTRO, K. C.; BURGA-SANCHEZ, J.; CAMPOS, M. G. N.; MEI, L. H. I. Water-based synthesis of photocrosslinked hyaluronic acid/polyvinyl alcohol membranes via electrospinning. *RSC Advances*, v. 10, p. 31271-31279, 2020.

CASTRO, K. C.; CAMPOS, M. G. N.; MEI, L. H. I. Hyaluronic acid electrospinning: Challenges, applications in wound dressings and new perspectives. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 173, p. 251-266, 2021.

Capítulos de Livros

HATAMI, T.; **CASTRO, K. C.**; MENDES, L. G. Liberação Controlada de Fármaco: Perspectivas e Desafios Futuros. In: Lucia Helena Innocentini Mei. (Org.). Polímeros de fontes renováveis: síntese e aplicações na saúde e no meio ambiente. 1ed. Campinas: BCCL/UNICAMP, 2020, v. 1, p. 87-115.

CASTRO, K. C.; COSTA, J. M.; MEI, L. H. I. Advances in Electrospinning Technique in the Manufacturing Process of Nanofibrous Materials. In: Inamuddin; Rajender Boddula; Mohd Imran Ahamed; Abdullah M. Asiri. (Org.). Electrospun Materials and Their Allied Applications. 1ed. Wiley, 2020, p. 379-399.

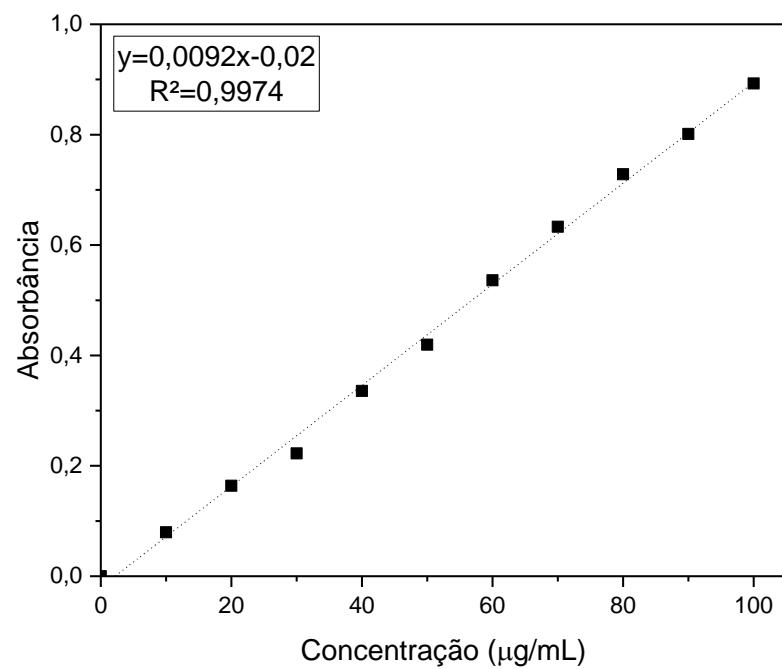
Resumos Expandidos

CASTRO, K. C.; MENDES, L. G.; CAMPOS, M. G. N.; INNOCENTINI-MEI, L. H. Effects of solution rheology in electrospinning of Hyaluronic acid/ Poly(vinyl alcohol) membranes. In: XVIII Brazilian MRS Meeting, 2019, Balneário Camboriú. XVIII Brazil MRS Meeting - Proceedings, 2019. p. 2932-2934.

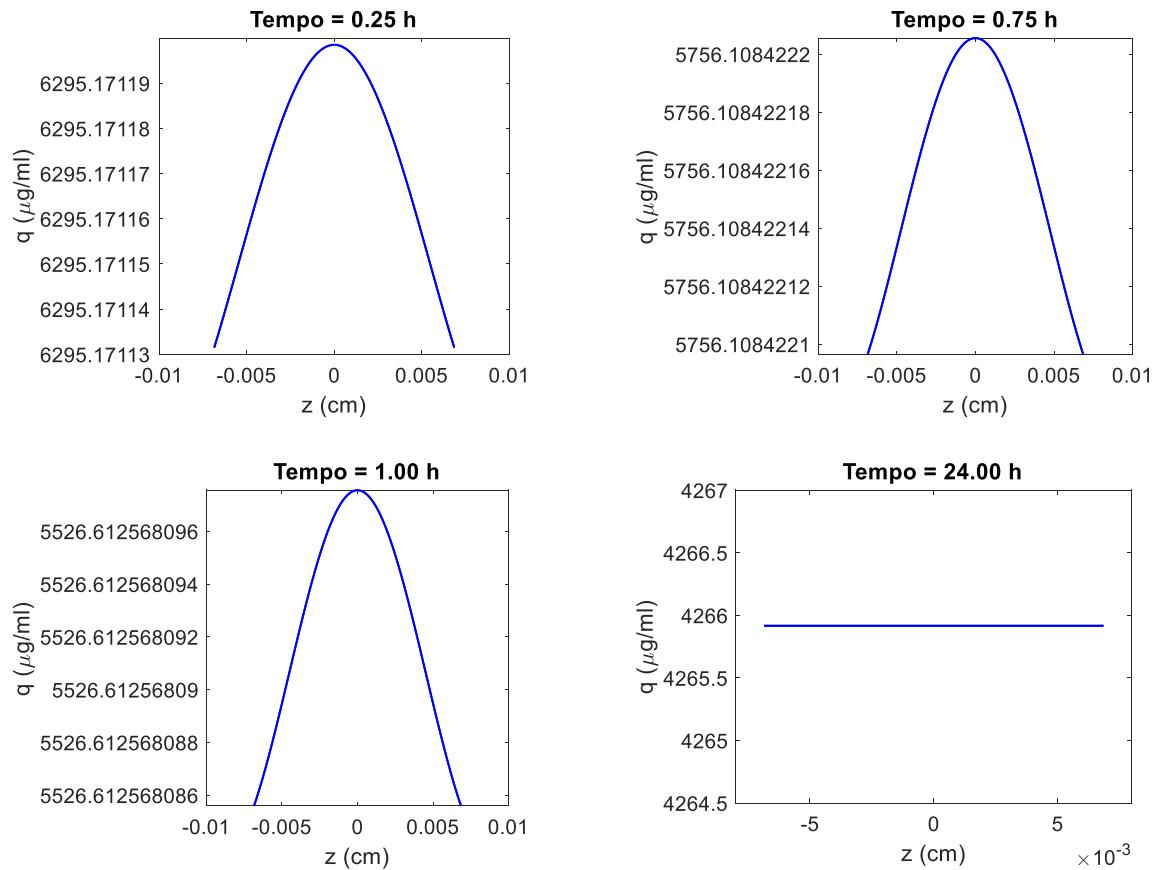
MENDES, L. G.; **CASTRO, K. C.**; FERREIRA, F. V.; SANCHEZ, J. B.; INNOCENTINI-MEI, L. H. Nanostructured poly(ethylene oxide) (PEO) membrane loaded with human thrombin as biomaterial application. In: XVIII Brazil MRS Meeting, 2019, Balneário Camboriú. XVIII Brazil MRS Meeting - Proceedings, 2019. p. 2935-2937.

8.4. PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS

Para trabalhos futuros é sugerido testar outros agentes e métodos de reticulação. Fazer a caracterização mecânica e realizar os ensaios *in vivo* das membranas aqui estudadas.

APÊNDICE A – CURVA PADRÃO DE ÁCIDO GÁLICO

**APÊNDICE B – CONCENTRAÇÃO DO MEDICAMENTO DENTRO DA MEMBRANA
EM VÁRIOS MOMENTOS DA LIBERAÇÃO DO MEDICAMENTO**



APÊNDICE C – TRABALHOS PUBLICADOS

13

**Advances in Electrospinning
Technique in the Manufacturing
Process of Nanofibrous Materials**

Karine Cappuccio de Castro*, Josiel Martins Costa
and Lucia Helena Innocentini Mei

*School of Chemical Engineering University of Campinas (UNICAMP) Avenida
Albert Einstein, Campinas, SP, Brazil*

Abstract

Nanofibrous materials have been manufactured by the electrospinning technique due to their ease of production, potential application in various sectors and versatility, capable of producing continuous membranes at low cost and with relatively uniform fiber diameter. Electrospinnable nanofibers excel in a variety of fields, such as drug delivery, filtration, biosensors, arrangements may be modified concerning the number and positions of syringes, and static or dynamic collector, die systems. The variation of electrospinning parameters can modify the morphology and tissue engineering depending on the application and properties of interest, the experimental and composition of nanofibers, affecting the diameter, conductivity, molecular weight, and number of beads. In this sense, this chapter brings the new trends in the fabrication process of nanofibers materials by the technique of electrospinning, addressing how the effects of the parameters influence the structure and morphological characteristics of nanofibers.

Keywords: Nanomaterials, electrospinning parameters, fiber morphology, nanofibers application

*Corresponding author: cappuccio.karine@gmail.com

13.1 Introduction

The electrospinning technique is a membrane making tool that has been highlighting in the last years. The first reports of the technique appeared in the '30s, being first reported by Formhals, through a patent [1, 2].

Initially the production of nanofibrous materials by electrospinning developed slowly, the research was mainly focused on the technique (equipment). The first studies of the parameters and their influence on the final material took place only in the 1960s, from then on the process parameters (viscosity, solution concentration, conductivity, etc.) have gained greater prominence and are being studied to this day [2–4].

The electrospinning process consists of four components: a syringe pump containing polymer solutions, a metal needle spinneret, a high voltage power supply, and a grounded manifold. These components are interconnected in different designs to obtain the best properties for the desired application [5].

In general, the electrospinning produces one-dimensional (1D) nanofiber membranes that are employed in a multitude of applications [1, 6]: biomedical, pharmacological, catalytic, electronic, separation, energetic, etc. This versatility is due to the unique properties achieved by the process, the ease of operation of the equipment and the large contact surface area obtained [7].

Therefore, this chapter aims to consolidate the main concepts involved in the electrospinning technique and present the main advances related to the process and the applications that have been highlighted in recent years.

13.2 Process

Electrospinning is a micro- and nanofiber production process of infinite length by polymer solutions subjected to a high voltage [8]. The process consists of using a metal needle as a die and a high voltage power supply. Applying a certain voltage to the needle, the solution inside the needle is electrically charged, causing repulsion between molecules with equal charges. When the repulsive electrical force exceeds the surface tension of the solution drop formed at the tip of the needle, a Taylor cone is formed and ejected this drop [8–11]. Entanglements between polymer chains inside the drop can maintain jet continuity. Once ejected in a straight line, the fiber enters the Taylor Cone region and undergoes random whipping. The jet extends due to Coulomb forces with simultaneous solvent evaporation to the grounded collector (Figure 13.1) [9, 12, 13].

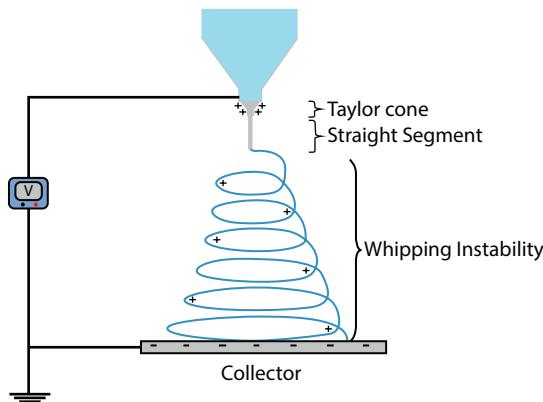


Figure 13.1 Schematic diagram of the polymeric jet path from the needle to the collector.

The simplest way of the experimental arrangement consists of a high voltage source, polymer solution (syringe) and a grounding system (collector) [14]. However, there are several conformations of the experimental arrangement; for example, the collector may be static or rotary. Beyond, the system can be mounted vertically, and use the force of gravity, or can be horizontal, using a pump to eject the solution. Moreover, one or several syringes may be used at the same time (Figure 13.2).

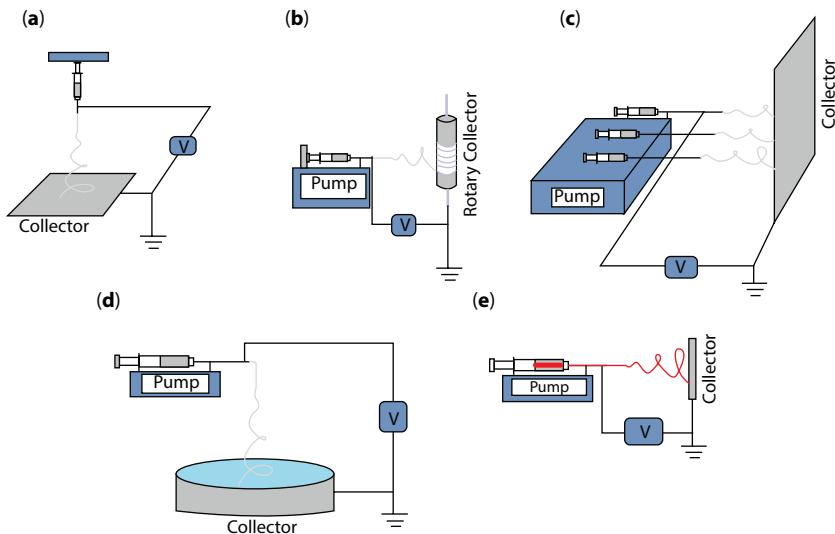


Figure 13.2 Experimental arrangement models: (a) horizontal electrospinning, (b) rotary collector, (c) multiple syringes, (d) hydrospinning, and (e) coaxial electrospinning.

The choice of experimental arrangement depends on the purpose of the application. If a rotary collector is used, the fibers will be aligned and thus exhibit better mechanical properties. The spinneret system can also be adapted to produce nanofibers with polymer blends or core–shell structures using multiple spinnerets or coaxial system (Figure 13.2e).

13.3 Important Parameters

The morphology and structure of nanofibers depend on many parameters, which are mainly divided into three categories: solution parameters, process parameters and environmental parameters [14]. In summary, Table 13.1 presents the individual effect of these parameters on morphology, but it is important to remember that, for all parameters, there is a critical value that will depend on the nature of the polymer and the electrospinning designer. Furthermore, parameters with extreme values generally have the opposite effect as expected on nanofiber structure. Finally, it is relevant to mention that there is interaction between the parameters that must be taken into consideration when defining the optimal values of the process.

13.3.1 Effects of the Applied Tension

The formation of nanofibers occurs due to the stretching of the polymeric drop by electrostatic forces. Applying a specific voltage will make electrostatic forces greater than surface tension, causing the droplet to stretch [15, 17]. Therefore, the applied electrical voltage is a fundamental parameter for the process, since it influences the formation of the jet and the consequent formation of nanofibers. The electrical voltage for this process to succeed is called critical voltage, and it varies depending on the configuration and solution used [17, 18]. Some studies have shown that this critical voltage occurs at values greater than 4 kV [19, 20]. Importantly, the increase in voltage causes a decrease in fiber diameter, but when increased too much it can favor bead formation and cause inversion in diameter size [21, 22].

13.3.2 Effects of Solution Eject Rate

The ejection rate of the polymeric solution is another important parameter in the morphology of the formed membranes. Increasing both the flow rate and the rate of production during electrospinning process will increase the

Table 13.1 Electrospinning parameters and their usual effects on the morphological characteristics of nanofibers [14–16].

Parameters	Effect on fiber morphology
Solution parameters	
Polymer molecular weight	Increasing molecular weight reduce the number of beads
Polymer solution concentration	Decrease in nanofiber diameter with the decrease of polymer solution concentration
Conductivity	Increase in fiber diameter with the decrease of conductivity
Viscosity	Increase in fiber diameter and defects reduction, with increase viscosity
Surface tension	High surface tension results in jet instability
Processing parameters	
Electric voltage	Increase in nanofiber diameter with the decrease of applied voltage
Flow rate	Increase in fiber diameter and number of beads, with the increase of eject rate
Needle–collector distance	Increase in needle–collector distance, decreases fiber diameter
Environmental parameters	
Temperature	The increase in temperature decreases the viscosity of the solution and consequently reduces the fiber diameter
Relative humidity	Increase in moisture causes the appearance of pores in the nanofibers

fiber diameter and bead formation [15, 17, 20]. This effect was studied by Tang *et al.* [23] and Ghelich *et al.* [24], i.e., due to the higher flow rate, the greater the amount of material ejected; however, the period for the jet to dry is reduced due to the higher speed [17].

13.3.3 Effects of Needle-to-Collector Distance and Needle Diameter

The proper distance between the needle and the collector is fundamental for the formation of good quality fibers, since it is during this interval that solvent evaporation occurs, allowing the formation of uniform fibers, avoiding defects such as crimped, collapsed or flattened fibers [15, 17, 18, 20].

In general, there is a critical distance for the process to occur satisfactorily, which varies according to the polymer solution, mainly to the detriment of the solvent. Studies presented in the literature showed that at closer distances the fibers appear flatter, with defects and with larger diameters, while at longer distances the fibers are rounder and have smaller diameters [15, 17, 18, 20, 25–27].

In recent years a multitude of needle designs and configurations have been developed, either to increase productivity or to produce nanofibers with different characteristics and properties [15, 28–30]. Straight-tipped stainless steel needles are the most commonly used electrospinning nozzles, and needle diameter often interferes with fiber diameter. Larger diameter fibers may be formed by larger diameter needles, which may also cause needle plugging due to solution solidification caused by increased exposure to air [11, 20, 31, 32].

13.3.4 Effects of Solution Concentration and Viscosity

Molecular weight, concentration and, consequently, solution viscosity are the factors that most influence the nanofiber morphology, this is because increasing the molecular weight of the polymers facilitates the entanglement of the polymer chains, which causes the viscosity to increase. The same is true with increasing concentration, since these three earlier cited parameters are interconnected [17, 18, 33]. It is important to find the optimal concentration for each solution since high concentration solutions can generate ribbon-shaped fibers and low concentration solutions can lead to droplet deposition, defective fibers, including stapled, fused, and beaded fibers. The ideal concentration value for uniform and defect-free fibers depends especially on the characteristics of the solution [15, 17, 18, 20].

With regard to very low concentrations, a phenomenon similar to electrospray may occur, which is the deposition of small droplets on the collector; In this case, there is no fiber formation due to the lack of sufficient entanglement between the polymer chains and the formation of a stable and continuous jet [15, 17, 33, 34].

On the other hand, at very high concentrations, the viscosity and surface tension become very high, which makes it difficult to eject the solution through the needle and the resulting jet formation [17, 18, 20].

13.3.5 Effects of Solution Conductivity

The electrical conductivity of the solution is another parameter that influences the nanofibers morphology, besides being an important factor in the Taylor cone formation. For solutions with low conductivity, the droplet surface will have no sufficient charge to form a Taylor cone; As a consequence, there will be no formation of nanofibers. Increasing the conductivity of the solution to an optimal value will enable Taylor cone formation and cause a decrease in fiber diameter [12, 17, 18]. To increase the conductivity of the solution and obtain uniform and defect-free fibers, salts, ions, surfactants or conductive polymers may be added to the polymeric solutions [12, 15, 17, 18, 20, 33].

It is noteworthy that the excessive increase in conductivity prevents the formation of the Taylor cone and consequently the process of electrospinning [18].

13.3.6 Solvent Effects

The proper choice of solvent is critical to the formation of homogeneous and beadles' nanofibers. In choosing the solvent, two things must be taken into account. The first is the solubility of the polymer and the second is the volatility of the solvent indirectly related to its boiling point [17, 18, 33]. Volatile solvents are the most commonly used in the electrospinning process, due to their rapid evaporation. However, it is important to remember that highly volatile solvents promote jet drying inside the needle, which can cause it to clog [17, 18, 33, 35, 36]. On the other hand, the low volatility of solvents can cause the formation of beaded fibers, as the evaporation will occur slowly and incompletely [33, 35, 36].

An interesting aspect of solvents is that, when mixed, they can produce porous fibers, so that mixing occurs between solvents with different volatilities, so that different evaporation rates give rise to porous nanofibers [8, 17, 33, 36].

13.3.7 Effects of Surface Tension

The surface tension of the solution is an essential factor in the morphological characteristics of the formed nanofibers and also in the success of

the electrospinning process [15, 37]. Solutions with high surface voltages prevent and/or hinder Taylor cone formation and consequently jet formation, this occurs because a very high voltage would be required for the surface tension to break and a stable jet to be established. Some studies have already demonstrated the effect of surface tension on the morphology of nanofibers based on PEO, PVA, and PHBV. In all cases, it was possible to observe the increase or decrease of beads in nanofibers [38–40].

The choice of solvents directly interferes with the surface tension of a solution. Research has shown that by fixing the polymer concentration and reducing the surface tension of a solution, with a suitable solvent, the beaded fibers can be converted to smooth fibers [1, 41].

13.3.8 Humidity and Temperature Effects

Relative air humidity and temperature are poorly studied parameters, but they also directly affect nanofiber morphology, since these parameters are directly linked with solvent evaporation [15, 17]. The temperature has a strong influence on solution viscosity, as reported by Wang *et al.* [43]. They have shown in their studies that decreasing viscosity and of the surface tension by increasing temperature of the polymeric solution causes a reduction in nanofibers diameter [1, 18, 20, 42, 43]. Relative humidity is a fundamental factor in the production of porous nanofibers when the solvent-mixed system is used, as evaporation rates are different and relative humidity hinders evaporation; moreover, it affects the diameter of the nanofibers by regulating the polymer jet solidification process [7, 15, 17, 18, 44].

13.4 Recent Advances in the Technique

For the best applicability of these nanofibers, several innovations in electrospinning have been developed. These innovations include coaxial electrospinning, triaxial electrospinning, multi-needle electrospinning, electroblowing, magnetic field-assisted electrospinning, centrifugal electrospinning, and many others [20, 45–47]. Besides, needleless electrospinning techniques are gaining prominence, because they allow the production of industrial-scale nanofibers, solving one of the main limitations of traditional electrospinning [46, 48].

13.4.1 Electrospinning Coaxial

Coaxial electrospinning has become one of the most outstanding wiring procedures of recent years, due to the great flexibility of the process.

The technique makes it possible to combine the specific characteristics of various polymers, fabricate nanofibers with polymers with low electrospinning capacity, and produce devices capable of overcoming several limitations [9, 49, 50]. In this process, two different types of polymer solutions are ejected through a two-chambered syringe with a double capillary needle, forming core–shell nanofibers [10]. These systems can also be multiaxial and have been of particular interest in biomedical applications as they allow different release profiles of two different drugs from the same membrane [51].

13.4.2 Electrospinning Triaxial

The triaxial electrospinning assembly is similar to the conventional electrospinning system; however, three polymer solutions are used to form a Taylor cone composed of a spinneret [46, 52]. Triaxial fibers are may be used to release two different drugs or to prolong the diffusion of drug encapsulated in the core. This process is also used to modify the hydrophobicity and mechanical strength of nanofibers materials [46, 51, 52].

13.4.3 Multiple Needle Electrospinning

This is the simplest and most straightforward approach to increasing nano-fiber productivity. In this system, the polymer solution is ejected by multiple needles simultaneously connected to a high tension source. The main problems with using a multiple needle configuration are the interaction forces between the jets, the non-uniformity of the electric fields at the needle tips and the variation in fiber size distribution [20, 46].

13.4.4 Electroblowing

Electroblowing consists of the interaction of two forces (electric force and air blowing shear force) to process the nanofibers of the polymeric fluid. In this process, the polymeric solution is subjected to high tension and the compressed air is injected around the spinneret, the air contributes to the formation of the Taylor cone, to the evaporation of the solvent and consequently to the formation of nanofibers [46, 53]. This is an interesting system for forming nanofibers from thermoplastic resins, thermosetting resins and many non-electrospinnable polymers by conventional process, such as hyaluronic acid without the use of surfactants or a combination of toxic solvents [53–55].

13.4.5 Magnetic Electrospinning

The process of magnetic electrospinning consists of the use of magnetic fields *in situ*. In general, two magnets are positioned parallel between the needle and the collector, giving rise to a magnetic field [20, 46, 47, 56]. For the effectiveness of this system, magnetic polymer solutions and/or the addition of magnetic nanoparticles are used in the usual polymer solutions [56, 57]. This system is capable of increasing the stability of spinning jets and decreasing their branches, as well as controlling fiber orientation, alignment, and size [20, 47, 58–60].

13.4.6 Centrifugal Electrospinning

Electrospinning and centrifugation are the most traditional methods for producing nanofibers; however, electrospinning can produce high-performance fibers and structures, but the difficulty of large-scale production is a limitation of the process; on the other hand, centrifugal spinning may guarantee large-scale production but cannot produce high-performance fibers [61–63]. Thus, the combination of both methods has recently emerged so that large-scale, high-performance fibers can be produced.

The system consists in the association between centrifugal force and electrostatic force. The electric field contributes to stretching the jets to very small dimensions under simultaneous evaporation of the solvent, and the introduction of centrifugal force makes the tension needed to overcome the surface tension of the solution to be smaller [46, 61]. To increase the production scale, several nozzles can be placed around the spin axis of the centrifuge. This combination is of nanofibers aligned to effective production and with good properties [46, 64, 65].

13.4.7 Needleless Electrospinning

Even with the numerous modifications in the conventional electrospinning process for large-scale nanofibers production, the most effective way has been needless electrospinning, because production can be considerably improved due to the many polymeric jets formed from free liquid surfaces [53].

Simply put, the formation of multiple jets from a needless system occurs because the waves of an electrically conductive liquid self-organize and form jets when the intensity of the applied electric field is above a critical value [53, 66]. The great difficulty of the process is to achieve a narrow diameter distribution and the formation of the spinning jets, but

it is already known that these parameters are related to the intensity of the electric field around the spinneret and the profile of electric field intensity in the electrospinning zone [67].

The narrow diameter distribution of nanofibers is attributed to the electric field strength, which is related to the geometry and the number of spinneret jets [66, 67]. For these reasons, many scholars have dedicated themselves to study the designer of these spinners, and numerous proposals have already been submitted, such as Edge Electrospinning, Blown Bubble Electrospinning, Rotating Roller Electrospinning, Rotary Cone Electrospinning, Gas Assisted Melt Differential Electrospinning, Melt Differential Electrospinning, Splashing Electrospinning, Two Layer Fluid Electrospinning, Bubble Electrospinning [20, 46, 53, 67].

13.5 Coaxial Electrospinning as an Excellent Process for Hollow Fiber and Drug Delivery Device Production

Coaxial electrospinning has emerged over the last decade to achieve the largest number of biotechnological applications, functionalizing nanofibers surfaces and generating shell-structured nanofibers for drug delivery [68–71]. Articles found in the literature have shown that solutions with a low electrical conductivity, and therefore unsuitable for electrospinning, can easily produce stretched thin filaments by coaxial electrospinning [69, 72].

In general the coaxial electrospinning process is very similar to traditional electrospinning.

Modification is made by inserting a smaller needle into the larger needle inner cylinder through which the liquid flows. That is, the fitting of the smaller needle is concentric within the larger needle, forming the coaxial arrangement that will allow the two polymer solutions to be ejected independently and simultaneously and, in this way, the combination of properties of different kinds of materials [70, 73].

The coaxial nanofiber is formed when polymeric solutions are charged with the application of high voltage, and charges are accumulated predominantly on the surface of the solution that will be the shell of the core-shell nanofiber [74, 75]. The drop of this solution lengthens and extends into a cone due to the repulsion of charges. The tensions generated in the shell solution cause shear in the core solution, through viscous flow and frictional contact between the solutions, causing it to deform into a conical shape. Before reaching the collector, as with traditional electrospinning, solvents evaporate, and core–shell nanofibers are formed [70, 76].

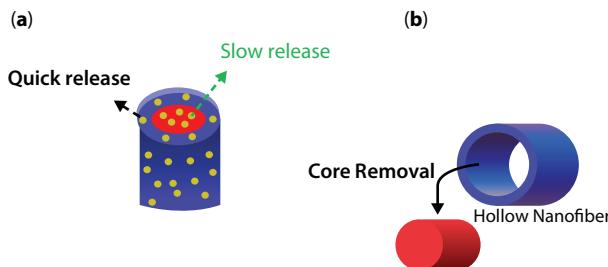


Figure 13.3 Cross-section of coaxial (a) drug-loaded core–shell fiber; (b) hollow fiber.

Regarding the viscosity of the system, there must be a sufficient viscosity of the shell solution over the core one to overcome the interfacial tension between them, allowing cone formation and enabling the core to form structure. The core fluid must also have a minimum viscosity to be continuously conducted without rupture [73].

The production of core–shell nanofibers is an excellent and versatile platform for controlled drug release (Figure 13.3a) because the ability to control the properties and composition of the nanofibers provides the possibility that the drug and/or protein encapsulated in the fiber core can be released through the shell layer in a controlled manner, lasting significantly longer than conventional fiber membranes [51, 77–79].

The coaxial electrospinning method has also been used in the manufacture of hollow nanofibers (Figure 13.3b); in this case, after electrospinning of the core–shell nanofibers the core material is removed by solvent dissolution or calcination [10, 30, 80].

Other parameters such as applied tension, needle-collector distance, humidity, flow rate, solvent, and concentration must be carefully evaluated to obtain a stable and homogeneous fiber system; that is, a core uniformly embedded in the shell to form core–shell nanofibers. Such parameters are the same as those that need special attention in traditional electrospinning.

13.6 Applications

Because it is a simple, versatile, and inexpensive process, the electrospinning has been highlighting in the production process of high-performance nanofibers. With this, countless applications have emerged in recent years in various areas of research.

Green electrospinning is a simple and versatile way to fabricate ultra-fine fibers that are attractive for air filtration and alleviate environmental

Table 13.2 Application of different electrospinning designers.

Polymeric system	Design electrospinning	Application	References
Ethanol/lignin/glycerin; PVP ^(a) /PCL ^(b) + key acid uranine/PCL + key acid blue	Triaxial electrospinning	Hollow carbon fiber, dual Release of functional molecules	[51, 81]
PLLA ^(c) /PEG ^(d)	Coaxial electrospinning	Nerve tissue, vascular structure	[82]
Aligned, multilayered PCL	Hydrospinning + gap electrospinning	Tendon, ligament, and cartilage grafts	[7]
PLA-co-PEG ^(e) blended with polypyrrole	Rotating collector	Nerve guidance conduits	[83]
PVA ^(f) /cellulose nanocrystals; polyacrylonitrile/Ag ^(g)	Green electrospinning	Filtration	[84, 85]
Ni-CoO ^(h) /CNF ⁽ⁱ⁾	Traditional electrospinning	Sensors	[86]
Hyaluronic acid/cyclodextrin	Vertical electrospinning with multiple needles and rotary collector	Drug delivery	[87]
Polystyrene/polyhydroxybutyrate nanofibers doped with porphyrin and graphene	Rotating collector	Sensors	[88]
Polycaprolactone/silk fibroin; PVA	Traditional electrospinning	Tissue engineering	[89, 90]

(Continued)

Table 13.2 Application of different electrospinning designers. (*Continued*)

Polymeric system	Design electrospinning	Application	References
Polystyrene	3D printers with near field electrospinning (NFES)	Flexible transparent electrodes	[91]
PCL	Hydrospinning	Tissue engineering	[92]
PVA/ $\text{Fe}_3\text{O}_4^{(j)}$ nanoparticles	Magnetic electrospinning	Fiber alignment	[56, 93]

(a) polyvinylpyrrolidone, (b) polycaprolactone, (c) poly(L-lactic acid), (d) poly-ethylene glycol, (e) poly(D,L-lactide)-co-poly(ethylene glycol), (f) polyvinyl alcohol, (g) silver, (h) nickel–cobalt oxide, (i) nanostructured carbon, (j) iron oxide (III).

issues even further. Claudia *et al.* [85] demonstrated in their studies that the production of Ag/PAN filters by green electrospinning was efficient. Their results showed a porosity of 96%, permeability $4.58\text{E}^{-13}\text{ m}^2$, filtration efficiency of approximately 100%, quality factor 0.04 Pa^{-1} , and excellent bactericidal activity [83].

Hydrospinning is a technique that allows the creation of highly porous and attractive devices for cell growth. The scaffolding created has higher porosity and a more interesting pore distribution than those obtained by conventional electrospinning. This was evidenced in the work of Tzezana *et al.* [92], in which scaffolding produced by hydrospinning showed a porosity of 99% and pores of diameter above 100 nm. In addition to promoting greater infiltration and proliferation of stem cells in their hydrospun scaffolding when compared to conventionally prepared [90].

The combination of nanostructured materials with many transducers has excelled in the production of chemical sensors as it has increased detection performance in recent decades. Avossa *et al.* [88] proposed the creation of a nanofibrous polymer conductive sensor associated with free-base tetraphenylporphyrin to stimulate selectivity and sensitivity of the polymer layer. The electrospinning process allowed, in a single step, the manufacture of a highly porous layer that adheres to the electrode surface. The sensor was able to work stably at 50°C to 70°C without any significant degradation [86].

Table 13.2 presents several other applications and the electrospinning designers used in the synthesis process of nanofibrous materials.

13.7 Conclusions and Future Perspectives

The electrospinning technique has excelled in membrane production due to the ease of incorporation of nanofiber additives, versatility in the control of diameter and microstructure, obtaining materials with high porosity and because it is a simple, direct and practical process. However, some challenges need to be overcome, such as the slow yield speed and the difficulty of obtaining nanofibers with diameters smaller than 100 nm.

In this way, we hope this chapter will contribute to the dissemination of knowledge and boost the research and development of innovations in electrospinning techniques for health promotion in tissue engineering and products that facilitate activities such as temperature sensors, pressure, and gas. Besides, the design and construction of electrospinning equipment for large-scale and continuous production is essential and deserves further study.

References

1. Li, Z. and Wang, C., Effects of working parameters on electrospinning, in: *One-dimensional nanostructures electrospinning technique and unique nanofibers*, pp. 15–19, Springer Briefs in Materials, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013.
2. Xue, J., Wu, T., Dai, Y., Xia, Y., Electrospinning and electrospun nanofibers: Methods, materials, and applications. *Chem. Rev.*, 119, 5298, 2019.
3. Nista, S.V.G., Peres, L., Marcos, A.D.A., Mei, L.H.I., Nanostructured membranes based on cellulose acetate obtained by electrospinning, part 1: Study of the best solvents and conditions by design of experiments. *J. Appl. Polym. Sci.*, 126, 71, 2011.
4. Nista, S.V.G., D'Ávila, M.A., Martinez, E.F., de Silva, A.S.F., Mei, L.H.I., Nanostructured membranes based on cellulose acetate obtained by electrospinning. Part II. Controlled release profile and microbiological behavior. *J. Appl. Polym. Sci.*, 2, 2772, 2013.
5. Min, L., Pan, H., Chen, S., Wang, C., Wang, N., Zhang, J., Cao, Y., Chen, X., Hou, X., Recent progress in bio-inspired electrospun materials. *Compos. Commun.*, 1, 12–20, 2018.
6. Li, D. and Xia, Y., Electrospinning of nanofibers: Reinventing the wheel? *Adv. Mater.*, 16, 1151, 2004.
7. Pelipenko, J., Kristl, J., Jankovi, B., Kocbek, P., The impact of relative humidity during electrospinning on the morphology and mechanical properties of nanofibers. *Int. J. Pharm.*, 456, 125, 2013.
8. Megelski, S., Stephens, J.S., Chase, D.B., Rabolt, J.F., Micro- and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers. *Macromolecules*, 35, 8456, 2002.

9. Yoon, J., Yang, H.-S., Lee, B.-S., Yu, W.-R., Recent progress in coaxial electro-spinning: New parameters, various structures, and wide applications. *Adv. Mater.*, 30, 1, 2018.
10. Song, W., Zhao, B., Wang, C., Lu, X., Electrospun nanofibrous materials: A versatile platform for enzyme mimicking and their sensing applications. *Compos. Commun.*, 12, 1, 2019.
11. Abdel-Hady, F., Alzahrany, A., Hamed, M., Experimental validation of upward electrospinning process. *ISRN Nanotechnol.*, 1, 1–14, 2011.
12. Sun, B., Long, Y.Z., Zhang, H.D., Li, M.M., Duvail, J.L., Jiang, X.Y., Yin, H.L., Advances in three-dimensional nanofibrous macrostructures via electro-spinning. *Prog. Polym. Sci.*, 39, 862, 2013.
13. Huang, Z.-M., Zhang, Y.-Z., Kotaki, M., Ramakrishna, S., A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Compos. Sci. Technol.*, 63, 2223, 2003.
14. Inozemtseva, O.A., Salkovskiy, Y.E., Severyukhina, A.N., Vidyasheva, I.V., Petrova, N.V., Metwally, H.A., Stetciura, I.Y., Gorin, D.A., Electrospinning of functional materials for biomedicine and tissue engineering. *Russ. Chem. Rev.*, 84, 251, 2015.
15. Pham, Q.P., Sharma, U., Mikos, A.G., Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: A review. *Tissue Eng.*, 12, 1197, 2006.
16. Mercante, L.A., Scagion, V.P., Migliorini, F.L., Mattoso, L.H.C., Correa, D.S., Electrospinning-based (bio) sensors for food and agricultural applications: A review. *Trends Anal. Chem.*, 91, 91, 2017.
17. Haider, A., Haider, S., Kang, I.-K., A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arab J. Chem.*, 11, 1165, 2018.
18. Sankaran, S., Deshmukh, K., Ahamed, M.B., Pasha, S.K.K., Electrospinning process, in: *Electrospun polymeric nanofibers: Fundamental aspects of electro-spinning processes, optimization of electrospinning parameters, properties, and applications*, pp. 380–388, Springer, Cham, 2019.
19. Sundaray, B., Subramanian, V., Natarajan, T.S., Xiang, R.-Z., Chang, C.-C., Fann, W.-S., Electrospinning of continuous aligned polymer fibers. *Appl. Phys. Lett.*, 84, 1222, 2004.
20. Salehhudin, H.S., Mohamad, E.N., Mahadi, W.N.L., Afifi, A.M., Multiple-jet electrospinning methods for nanofiber processing: A review. *Mater. Manuf. Process.*, 33, 479, 2018.
21. Li, Q., Jia, Z., Yang, Y., Wang, L., Guan, Z., Preparation and properties of poly(vinyl alcohol) nanofibers by electrospinning, in: *International Conference on Solid Dielectrics*, pp. 215–218, Winchester, 2007.
22. Moutloali, KPMRM., The influence of electrospinning parameters on the morphology and diameter of poly(vinylidene fluoride) nanofibers—Effect of sodium chloride. *J. Mater. Sci.*, 48, 5475, 2013.
23. Tang, X.-P., Si, N., Xu, L., Liu, H.-Y., Effect of flow rate on diameter of electrospun nanoporous fibers. *Therm. Sci.*, 18, 1447, 2014.

24. Ghelich, R., Rad, M.K., Youzbashi, A.A., Study on morphology and size distribution of electrospun NiO–GDC composite nanofibers. *J. Eng. Fiber Fabr.*, 10, 12, 2015.
25. Heikkila, P., Soderlund, L., Uusimaki, J., Kettunen, L., Harlin, A., Exploitation of electric field in controlling of nanofiber spinning process. *Polym. Eng. Sci.*, 47, 2065–74, 2007.
26. Wang, T. and Kumar, S., Electrospinning of polyacrylonitrile nanofibers. *J. Appl. Polym. Sci.*, 102, 1023, 2006.
27. Buchko, C.J., Chen, L.C., Shen, Y., Martin, D.C., Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films. *Polymer (Guildf)*, 40, 7397, 1999.
28. Li, D., Babel, A., Jenekhe, S.A., Xia, Y., Nanofibers of conjugated polymers prepared by electrospinning with a two-capillary spinneret. *Adv. Mater.*, 16, 2004, 2062.
29. Theron, S.A., Yarin, A.L., Zussman, E., Kroll, E., Multiple jets in electrospinning: Experiment and modeling. *Polymer (Guildf)*, 46, 2889, 2005.
30. Li, D. and Xia, Y., Direct fabrication of composite and ceramic hollow nanofibers by electrospinning. *Nano Lett.*, 4, 933, 2004.
31. Katti, D.S., Robinson, K.W., Ko, F.K., Laurencin, C.T., Bioresorbable nanofiber-based systems for wound healing and drug delivery: Optimization of fabrication parameters. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, 70, 286, 2004.
32. Kizildag, N., Beceren, Y., Kazanci, M., Cukul, D., Effect of needle diameter on diameter of electrospun silk fibroin nanofiber, in: *RMUTP International Conference: Textiles & Fashion*, pp. 1–7, 2012.
33. Pillay, V., Dott, C., Choonara, Y.E., Tyagi, C., Tomar, L., Kumar, P., Toit, L.C., Ndesendo, V.M.K., A Review of the effect of processing variables on the fabrication of electrospun nanofibers for drug delivery applications. *J. Nanomater.*, 1, 1–22, 2013.
34. Haider, S., Al-Zeghayer, Y., Ali, F.A.A., Haider, A., Mahmood, A., Imran, WAA-MM., Aijaz, M.O., Highly aligned narrow diameter chitosan electrospun nanofibers. *J. Polym. Res.*, 20, 1, 2013.
35. Lannutti, J., Reneker, D., Ma, T., Tomasko, D., Farson, D., Electrospinning for tissue engineering scaffolds. *Mater. Sci. Eng. C*, 27, 504, 2007.
36. Sill, T.J. and von Recum, H.A., Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*, 29, 1989–2006, 2008.
37. Tarus, B., Fadel, N., Al-Oufy, A., El-Messiry, M., Effect of polymer concentration on the morphology and mechanical characteristics of electrospun cellulose acetate and poly (vinyl chloride) nanofiber mats. *Alex. Eng. J.*, 55, 2975, 2016.
38. Zuo, W., Zhu, M., Yang, W., Yu, H., Chen, Y., Zhang, Y., Experimental study on relationship between jet instability and formation of beaded fibers during electrospinning. *Polym. Eng. Sci.*, 45, 704, 2005.
39. Fong, H., Chun, I., Reneker, D.H., Beaded nanofibers formed during electrospinning. *Polymer (Guildf)*, 40, 4585, 1999.

40. Zhang, C., Yuan, X., Wu, L., Han, Y., Sheng, J., Study on morphology of electrospun poly (vinyl alcohol) mats. *Eur. Polym. J.*, 41, 423, 2005.
41. Yang, Q., Li, Z., Hong, Y., Zhao, Y., Qiu, S., Wang, C., Wei, Y., Influence of solvents on the formation of ultrathin uniform poly(vinyl pyrrolidone) nanofibers with electrospinning. *J. Polym. Sci. B Polym. Phys.*, 42, 3721, 2004.
42. De Vrieze, S., Van Camp, T., Nelvig, A., Hagstro, B., Westbroek, P., De Clerck, K., The effect of temperature and humidity on electrospinning. *J. Mater. Sci.*, 44, 1357, 2009.
43. Wang, C., Chien, H.-S., Hsu, C.-H., Wang, Y.-C., Wang, C.-T., Lu, H.-A., Electrospinning of polyacrylonitrile solutions at elevated temperatures. *Macromolecules*, 40, 7973, 2007.
44. Casper, C.L., Stephens, J.S., Tassi, N.G., Chase, D.B., Rabolt, J.F., Controlling surface morphology of electrospun polystyrene fibers: Effect of humidity and molecular weight in the electrospinning process. *Macromolecules*, 37, 573, 2004.
45. Bhardwaj, N. and Kundu, S.C., Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnol. Adv.*, 28, 325, 2010.
46. Begum, H.A. and Khan, K.R., Study on the various types of needle based and needleless electrospinning system for nanofiber production. *Int. J. Text. Sci.*, 6, 110, 2017.
47. Kishan, A.P. and Cosgriff-Hernandez, E.M., Recent advancements in electrospinning design for tissue engineering applications: A review. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 150, 2892, 2017.
48. Jirsak, O., Sysel, P., Sanetrnik, F., Hruza, J., Chaloupek, J., Polyamic acid nanofibers produced by needleless electrospinning. *J. Nanomater.*, 1, 1–6, 2010.
49. Bedford, N.M., Dickerson, M.B., Drummy, L.F., Koerner, H., Singh, K.M., Vasudev, M.C., Durstock, M.F., Naik, R.R., Steckl, A.J., Nanofiber-based bulk-heterojunction organic solar cells using coaxial electrospinning. *Adv. Energy Mater.*, 2, 1136, 2012.
50. Yang, C., Yu, D.-G., Pan, D., Liu, X.-K., Wang, X., Bligh, S.W.A., Williams, G.R., Electrospun pH-sensitive core-shell polymer nanocomposites fabricated using a tri-axial process. *Acta Biomater.*, 35, 77, 2016.
51. Han, D. and Steckl, A.J., Triaxial electrospun nanofiber membranes for controlled dual release of functional molecules. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 5, 8241, 2013.
52. Khalf, A. and Madihally, S.V., Recent advances in multiaxial electrospinning for drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 112, 1, 2017.
53. Nayak, R., Padhye, R., Kyratzis, I.L., Truong, Y., Arnold, L., Recent advances in nanofibre fabrication techniques. *Text. Res. J.*, 82, 129, 2011.
54. Wang, X., Um, I.C., Fang, D., Okamoto, A., Hsiao, B.S., Chu, B., Formation of water-resistant hyaluronic acid nanofibers by blowing-assisted electrospinning and non-toxic post treatments. *Polymer (Guildf)*, 46, 4853, 2005.
55. Um, I.C., Fang, D., Hsiao, B.S., Okamoto, A., Chu, B., Electro-spinning and electro-blowing of hyaluronic acid. *Biomacromolecules*, 5, 1428, 2004.

56. Yang, D., Lu, B., Zhao, Y., Jiang, X., Fabrication of aligned fibrous arrays by magnetic electrospinning. *Adv. Mater.*, 19, 3702, 2007.
57. Sanchez, J.A.G., Furlan, R., Valle, R.L., Valle, P., da Silva, A.N.R., Influence of a magnetic field in the electrospinning of nanofibers using solutions with PVDF, DMF, acetone and Fe₃O₄ nanoparticles, in: *Symposium on Micoelectronics Technology and Devices*, pp. 1–3, 2013.
58. Arras, M.M.L., Grasl, C., Bergmeister, H., Schima, H., Electrospinning of aligned fibers with adjustable orientation using auxiliary electrodes. *Sci. Technol. Adv. Mater.*, 13, 1, 2012.
59. Zhu, Z., Chen, X., Du, Z., Huang, S., Peng, D., Zheng, J., Wang, H., Materials and manufacturing processes fabricated wavy micro/nano fiber via auxiliary electrodes in near-field electrospinning. *Mater. Manuf. Process.*, 31, 37, 2015.
60. Liu, B.Y., Zhang, X., Xia, Y., Yang, H., Magnetic-field-assisted electrospinning of aligned straight and wavy polymeric nanofibers. *Adv. Mater.*, 22, 2454, 2010.
61. Peng, H., Liu, Y., Ramakrishna, S., Recent development of centrifugal electrospinning. *J. Appl. Polym. Sci.*, 134, 44578, 2016.
62. Zhao, G., Zhang, X., Lu, T.J., Xu, F., Recent advances in electrospun nanofibrous scaffolds for cardiac tissue engineering. *Adv. Funct. Mater.*, 25, 5726, 2015.
63. Brown, T.D., Dalton, P.D., Hutmacher, D.W., Melt electrospinning today: An opportune time for an emerging polymer process. *Prog. Polym. Sci.*, 56, 116, 2016.
64. Kancheva, M., Toncheva, A., Manolova, N., Rashkov, I., Advanced centrifugal electrospinning setup. *Mater. Lett.*, 136, 150, 2014.
65. Liu, S.-L., Long, Y.-Z., Zhang, Z.-H., Zhang, H.-D., Sun, B., Zhang, J.-C., Han, W.-P., Assembly of oriented ultrafine polymer fibers by centrifugal electrospinning. *J. Nanomater.*, 2013, 1, 2013.
66. Wang, X. and Xu, W., Effect of experimental parameters on needleless electrospinning from a conical wire coil. *J. Appl. Polym. Sci.*, 123, 3703, 2011.
67. Wei, L., Yu, H., Jia, L., Qin, X., High-throughput nanofiber produced by needleless electrospinning using a metal dish as the spinneret. *Text. Res. J.*, 88, 80, 2018.
68. Chen, G., Guo, J., Nie, J., Ma, G., Preparation, characterization, and application of PEO/HA core shell nanofibers based on electric field induced phase separation during electrospinning. *Polymer (Guildf)*, 83, 12, 2016.
69. Feng, C., Liu, C., Liu, S., Wang, Z., Yu, K., Zeng, X., Electrospun nanofibrous with core-shell structure for treatment of the bladder regeneration. *Tissue Eng. Part A*, 1, 1289–1299, 2019.
70. Jiang, H., Wang, L., Zhu, K., Coaxial electrospinning for encapsulation and controlled release of fragile water-soluble bioactive agents. *J. Control. Release*, 193, 296, 2014.

71. Rafiei, S., Noroozi, B., Heltai, L., Haghi, A.K., An authenticated theoretical modeling of electrified fluid jet in core–shell nanofibers production. *J. Ind. Text.*, 47, 1791, 2018.
72. Li, D. and Xia, Y., Direct fabrication of composite and ceramic hollow nanofibers by electrospinning. *Nano Lett.*, 4, 933, 2004.
73. Li, F., Zhao, Y., Song, Y., Core-shell nanofibers: Nano channel and capsule by coaxial electrospinning, in: *Nanofibers*, Kumar, A. (Ed.), p. 438, 2010.
74. Elahi, F., Lu, W., Guoping, G., Khan, F., Core–shell fibers for biomedical applications-A review. *J. Bioeng. Biomed. Sci.*, 3, 1, 2013.
75. Pant, B., Park, M., Park, S., Drug delivery applications of core-sheath nanofibers prepared by coaxial electrospinning: A review. *Pharmaceutics*, 11, 305, 2019.
76. Greiner, A., Wendorff, J.H., Yarin, A.L., Zussman, E., Biohybrid nanosystems with polymer nanofibers and nanotubes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 71, 387, 2006.
77. Qi, H., Hu, P., Xu, J., Wang, A., Encapsulation of drug reservoirs in fibers by emulsion electrospinning: Morphology characterization and preliminary release assessment. *Biomacromolecules*, 7, 2327, 2006.
78. Zhang, Y.Z., Wang, X., Feng, Y., Li, J., Lim, C.T., Ramakrishna, S., Coaxial electrospinning of (Fluorescein Isothiocyanate-Conjugated Bovine Serum Albumin)-encapsulated poly(E-caprolactone) nanofibers for sustained release. *Biomacromolecules*, 7, 1049, 2006.
79. He, C.L., Huang, Z.M., Han, X.J., Liu, L., Coaxial electrospun poly(L-lactic acid) ultrafine fibers for sustained drug delivery. *J. Macromol. Sci. Part B Phys.*, 45, 515, 2006.
80. Dong, H. and Jones, W.E., Preparation of submicron polypyrrole/poly(methyl methacrylate) coaxial fibers and conversion to polypyrrole tubes and carbon tubes. *Langmuir*, 22, 11384, 2006.
81. Pourerkhabibi, V., Mohanty, A., Misra, M., Characterization of electrospun lignin based carbon fibers, in: *AIP Conference Proceedings*, pp. 1–5, 2015.
82. Ou, K.-L., Chen, C.-S., Lin, L.-H., Lu, J.-C., Shu, Y.-C., Tseng, W.-C., Yang, J.-C., Lee, S.-Y., Chen, C.-C., Membranes of epitaxial-like packed, super aligned electrospun micron hollow poly(L-lactic acid) (PLLA) fibers. *Eur. Polym. J.*, 47, 882, 2011.
83. Zhou, Z.-F., Zhang, F., Wang, J.-G., Chen, Q.-C., Yang, W.-Z., He, N., Jiang, Y.-Y., Chen, F., Liu, J.-J., Electrospinning of PELA/PPY fibrous conduits: Promoting peripheral nerve regeneration in rats by self-originated electrical stimulation. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 2, 1572, 2016.
84. Zhang, Q., Li, Q., Young, T.M., Harper, D.P., Wang, S., A novel method for fabricating an electrospun polyvinyl alcohol/cellulose nanocrystals composite nanofibrous filter with low air resistance for high-efficiency filtration of particulate matter. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 7, 8706, 2019.
85. Claudia, A., Bortolassi, C., Nagarajan, S., De Araújo, B., Giovana, V., Lopes, M., Huon, V., Soussan, L., Cornu, D., Miele, P., Bechelany, M., Efficient

- nanoparticles removal and bactericidal action of electrospun nanofibers membranes for air filtration. *Mater. Sci. Eng. C*, 102, 718, 2019.
- 86. Mei, Q., Fu, R., Ding, Y., Wang, A., Duan, D., Ye, D., Electrospinning of highly dispersed Ni/CoO carbon nanofiber and its application in glucose electrochemical sensor. *J. Electroanal. Chem.*, 847, 113075, 2019.
 - 87. Séon-lutz, M., Cou, A., Vignoud, S., Schlatter, G., Hébraud, A., Electrospinning in water and *in situ* crosslinking of hyaluronic acid/cyclodextrin nano fibers: Towards wound dressing with controlled drug release. *Carbohydr. Polym.*, 207, 276, 2019.
 - 88. Avossa, J., Paolesse, R., Di Natale, C., Zampetti, E., Bertoni, G., De Cesare, F., Scarascia-Mugnozza, G., Macagnano, A., Electrospinning of polystyrene/polyhydroxybutyrate nanofibers doped with porphyrin and graphene for chemiresistor gas sensors. *Nanomaterials*, 9, 280, 2019.
 - 89. Guo, T., Yang, X., Deng, J., Zhu, L., Wang, B., Hao, S., Keratin nanoparticles-coating electrospun PVA nanofibers for potential neural tissue applications. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 30, 9, 2019.
 - 90. Nazeer, M.A., Yilgor, E., Yilgor, I., Electrospun polycaprolactone/silk fibroin nanofibrous bioactive scaffolds for tissue engineering applications. *Polymer (Guildf)*, 169, 86, 2019.
 - 91. Youse, A.A., Mohebbi, A.R., Moghadam, S.F., Poursamar, S.A., Hao, L., Uniaxially aligned microwire networks for flexible transparent electrodes using a novel electrospinning set-up. *Sol. Energy*, 188, 1111, 2019.
 - 92. Tzezana, R., Zussman, E., Levenberg, S., A layered ultra-porous scaffold for tissue engineering, created via a hydrospinning method. *Tissue Eng.*, 14, 281, 2008.
 - 93. Liu, H.-Y., Xu, L., Tang, X.-P., Sun, Z.Q., Effect of Fe₃O₄ nanoparticles on magnetic electrospun nanofibers. *J. Text. Inst.*, 106, 503, 2014.



Review

Hyaluronic acid electrospinning: Challenges, applications in wound dressings and new perspectives

Karine Cappuccio Castro ^{a,*}, Maria Gabriela Nogueira Campos ^{b,c}, Lucia Helena Innocentini Mei ^a^a University of Campinas, Faculty of Chemical Engineering, Department of Materials Engineering and Bioprocess, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas, SP, Brazil^b University of Central Florida, NanoScience Technology Center, Orlando, FL, United States of America^c Federal University of Alfenas, Institute of Science and Technology, Poços de Caldas, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 November 2020

Received in revised form 14 January 2021

Accepted 15 January 2021

Available online 18 January 2021

Keywords:

Hyaluronan

Electrospun

Wound care

ABSTRACT

Hyaluronic acid (HA) has already been consolidated in the literature as an extremely efficient biopolymer for biomedical applications. In addition to its biodegradability, HA also has excellent biological properties. In the nano-fiber form, this polymer can mimic biological tissues, mainly the layers of the skin, and therefore has great potential as structures for the construction of wound dressings. Despite the numerous efforts from the scientific community proposing new dressings, this is an area in constant evolution. A dressing that brings together all the properties of an ideal dressing has not been developed yet. Electrospinning is a simple and versatile technique that correctly aligned with the functional properties of HA can produce multifunctional nanofiber structures capable of promoting skin recover quickly. This review discusses (i) key strategies for successful electrospinning of HA, (ii) main challenges and advances found in the electrospinning process, (iii) the bioactive properties of this polymer in the treatment of wounds, as well as (iv) the results obtained in the last decade by the *in vitro* and *in vivo* evaluation of the healing properties of these nanosystems.

© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	252
2. Electrospinning technique and its advantages in the production of dressings	252
3. Hyaluronic acid electrospinning	253
3.1. Molecular weight	253
3.2. HA degradation	253
3.3. Rheological properties	254
4. Strategies used for successful electrospinning of HA	254
4.1. Solvent mix	254
4.2. Crosslinking agent	255
4.3. Surfactant	255
4.4. Mixture of polymers	256
4.5. Chemical derivatives of hyaluronic acid	257
4.6. Modification in the electrospinning process	257
4.7. HA-based bilayer electrospun membranes	258
4.8. Combination of two or more strategies	259
5. <i>In vivo</i> and <i>in vitro</i> studies using electrospun HA membranes in healing processes	259
6. HA-based electrospun wound dressing acting as drug delivery system	261
7. New perspectives	262
8. Conclusion	264

* Corresponding author.

E-mail address: cappuccio.karine@gmail.com (K.C. Castro).

Declaration of competing interest	264
Acknowledgements	264
Declaration of competing interest	264
References	264

1. Introduction

The preparation of dressings for wound healing is currently of great interest to researchers. Many biopolymer-based dressings have been proposed in recent years, such as chitosan, collagen, gelatin, cellulose, and hyaluronic acid, as they are biocompatible biodegradable, and lack antigenicity [1]. For these dressings to achieve the desired applicability, some characteristics must be achieved, such as: (1) prevent and/or control infections, (2) provide an adequate degree of moisture within the wound, to create a biological environment with ideal conditions for the healing processes, (3) protect the wound and its surroundings from mechanical trauma, (4) absorb secretions, if necessary, (5) reduce necrosis of the wound surface, (6) stimulate growth factors, and (7) accelerate healing process [2,3].

The appropriate dressing will also depend on the type of chronic or acute wound, whether abrasions and superficial burns or diabetic ulcers, and venous leg ulcers cause it, for example. In addition to the loss of quality of life experienced by patients affected by these types of wounds, there is still a high expense to the health system [4]. The most used dressings nowadays still have the disadvantage of having a high absorbent capacity, making the wound environment dry. They also have great adhesion on the desiccated wound surface, inducing a new trauma during their removal [4,5].

Recently, the electrospinning technique has gained prominence in the production of dressings. It can produce fibers on the micro and nanometric scales with a high relationship between surface area and volume, high porosity and malleability, and suitable for loading several active ingredients [6]. Besides, it is an economically viable technique, with the possibility of large-scale production, which can produce three-dimensional biomimetic structures and with potential characteristics to simulate the skin layers [4,6].

Despite the technique's versatility, the polymeric solutions must have some suitable processability characteristics to obtain the ideal combination of parameters, such as viscosity, surface tension, concentration, and molecular weight. Therefore, not all polymers can be electrospun or have the capability to form nanofibers. Hyaluronic acid or hyaluronan (HA) has excellent characteristics for application in wound healing dressings. However, its high viscosity, even at low concentration in addition to its high surface tension, prevents this polymer from being electrospinnable in its natural conditions and by itself. On the other hand, HA is an essential component of the extracellular matrix (ECM). Depending on the molecular weight, this polymer influences various biological activities involved in inflammation and wound healing processes that support cell activation and induce dermis repair [7,8].

Many reviews on the use of HA for biomedical applications have already been addressed in the literature. Neuman et al. (2015) reviewed the role of HA in attenuating skin necrosis and its use in repairing wounds in humans, animal models and *in vitro* studies [9]. Snetkov et al. (2019) addressed the various methods for the synthesis of HA-based fibers and synthesized the main properties and biological activity of HA and the fibrous materials based on it [10]. The reviews by Zhao et al. (2015) and Jacob et al. (2020) aimed to provide an updated overview of the preparation of nanofibers from animal polysaccharides by electrospinning and their potential biomedical applications, such as tissue engineering, wound healing and drug delivery [11,12]. Růžičková et al. (2014) focused on the study of HA nanofibers for dressings and drug carriers [13]. Chen et al. (2018) summarized and critically evaluated recent developments and the effectiveness of HA for the treatment

of inflammatory diseases of the skin and joints [14]. Viagani et al. (2019) discussed the use of nanosystems, based on HA and chitosan or its derivatives, for the local treatment of chronic wounds [7]. Our review aims to present the main challenges related to HA electrospinning and how these challenges have been overcome over the years. In addition to discussing in detail how the biological properties of this polymer act in the healing process and how these nanofiber matrices are used as active ingredient nanocarriers.

Aligning the versatility of the electrospinning technique with the excellent properties of HA in the healing process to obtain a high-performance dressing is still an object of study by researchers around the world. This review also brings the main advances of this area and what we can expect for the future of the technique combined with the use of the HA.

2. Electrospinning technique and its advantages in the production of dressings

Electrospinning is a versatile technique widely used in several research areas, especially in the biomedical and pharmaceutical fields [15–17]. In a simplified way, electrospinning consists of a syringe pump responsible for ejecting the polymeric solution into stainless steel spinneret. A high voltage source applies a voltage between the spinneret and the grounded collector. The high-applied voltage creates a high external electric field that causes the drop of the polymeric solution on the tip of the needle to be positively charged and elongate to form a cone, also known as Taylor's cone [4,10]. When the applied voltage is sufficient for the electrostatic forces generated in the droplet to surpass the surface tension, a charged whip jet is ejected. During the jet's trajectory, the solvent evaporates, and the polymer solidifies, forming a nanofibrous layer deposited in a collector acting as a counter electrode [6,17,18].

Several parameters must be controlled for the electrospinning process to be successful and for the fiber morphology to reach the expected characteristics. Three categories of parameters are studied: (1) Process parameters (voltage, flow, and distance between the needle and the collector), (2) Solution parameters (electrical conductivity, viscosity, surface tension, solution concentration, and polymer molecular weight), and (3) Environmental parameters (temperature and humidity) [19,20].

The characteristics of the membrane obtained by electrospinning process, which make it a strong candidate to stimulate wound healing, are the high relationship between surface area and volume, the high porosity, the great flexibility, and the delicacy of the ultrafine membranes [6,17,18].

These properties allow the membranes to have moisture absorption capacity, good permeability for cell respiration, adequate conformation to the wound surface, and the potential to leave no scars. Depending on the polymeric system chosen, the membrane may have high biocompatibility with blood and tissues, increase skin cells' growth rate, induce healing and anti-inflammatory effects and present a degradation rate compatible with the regeneration rate of the new tissue [6,17]. Polysaccharides, such as chitosan, collagen, starch, cellulose, and hyaluronic acid, are among the most studied classes of natural polymers, as they have characteristics compatible with applications *in vivo* systems [4,12,21].

3. Hyaluronic acid electrospinning

Hyaluronic acid is a linear polysaccharide, a constituent of ECM widely used in tissue engineering [2,6,12]. It is a natural polymer consisting of alternating disaccharide units of β -1, 4-D-glucuronic acid and β -1, 3-N-acetyl-D-glucosamine, and can have low or high molecular weights (Fig. 1) [6,12]. Moreover, it is a hydrophilic polyanion with high swelling and water absorption capacity, has high biodegradability, biocompatibility, unique biological functions, such as mediation of cell adhesion, migration, proliferation, and also promotes the formation of granulation tissue [6,12,22,23].

3.1. Molecular weight

Hyaluronic acid is an anionic, non-sulfated glycosaminoglycan classified as a polymer of disaccharides which can range in size from 5000 to 20,000,000 Da. Depending on the molecular weight, HA polymers demonstrate different properties and hence functions and applications. For instance, in the human body, synovial liquid is constituted of HA with 6,000,000 - 7,000,000 Da and it can be partially degraded to less than 1,000,000 Da in case of rheumatic arthritis or osteoarthritis [24]. Table 1 shows the molecular weight of HA polymer in different biological samples.

Cowan et al. (2015) studied the content and size of HA in biological samples. The authors reported that high-molecular mass polymer (1,000,000 to 8,000,000 Da) is more usually synthesized and found in human body. However, when inflammatory or tissue-remodeling processes occur, HA is found in a broad range of molecular weight, while low molecular weight HA fragments can bind to proteins and act as sensors for cellular environment [25].

Cyphert et al. (2015) investigated the effects of HA molecular weight in cell biology. The authors reported that endogenous high molecular weight HA polymers have anti-inflammatory and antiangiogenic properties, especially in lung tissues, where inflammation and injury were inhibited by treatment with high molecular weight HA in a *in vivo* disease model. On the other hand, high molecular weight HA can be degraded to low molecular weight molecules and activate the expression of proinflammatory cytokines, chemokines, and growth factors, causing inflammatory diseases. It worth to mention that low molecular weight HA is also associate to angiogenesis and tumor growth. However, HA oligosaccharides showed both positive and negative effects on inflammatory response and tumor progression, depending on the cell type and disease model [34].

There are many studies in the literature about the effect of HA molecular weight on the healing process. All studies indicate that a high molecular weight increases cell quiescence and maintains tissue integrity, protects cells, and prevents apoptosis, in addition to acting directly in the inflammatory phase and stimulating fibroblast proliferation *in vitro* [14,26,29–31].

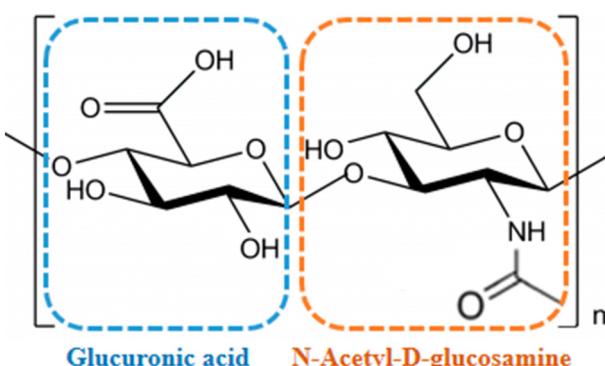


Fig. 1. Chemical structure of hyaluronic acid.

Table 1

Molecular weight of HA polymer in different biological samples.

Sample	Average Molecular Weight (kDa)	Ref.
Normal human synovial fluid	6,000–7,000	[25]
Human synovial fluid (arthritis)	<1,000	[24]
Normal rabbit vitreous	2,000–3,000	[26]
Normal bovine vitreous	500–800	[26]
Owl monkey vitreous	Very high molecular weight	[27]
Human milk	440	[28]
Human amniotic fluid	330	[29]
Human lymph fluid	800	[30]
Human blood serum	100–300	[30,31]
Young human cartilage	>2,000	[32]
Human skin	4,000–6,000	[33]

At the cellular level, HA is progressively degraded, generating fragments with smaller sizes. These fragments have different biological functions according to the molecular weight of the polymer [8,35]. A study proposed by D'Agostino et al. (2017) evaluated HA's bioactive properties with different molecular weights (1,800 to 6 kDa). Their results showed that all samples were able to accelerate wound healing, supporting cell activation and requesting repair of the dermis, except for HA at 6 kDa. As shown by Zhao et al. (2015) and Li et al. (2012), the team of D'Agostino et al. (2017) also showed that the type 1 transmembrane glycoprotein CD44 is the receptor for HA. More than that, the authors demonstrated that CD44 is only receptive to HA in the 1,800–15 kDa range. Below this molecular weight, there was no stimulation of this glycoprotein, in addition to impairing the repair process and increasing the levels of inflammatory cytokines [8,36,37].

The role of HA molecular weight in the proliferative phase of wound healing in a human keratinocyte *in vitro* model was studied by Ghazi et al. (2012). The authors showed for the first time the relationship between P2X7 receptor and hyaluronan in wound healing, suggesting fragment between 100 and 300 kDa as a new strategy to promote healing [38]. Garibaldi et al. (2008) reported that low molecular weight HA induces the production of keratinocytes and improves the self-defense of skin, without causing inflammatory response [39].

D'Agostini et al. (2015) reported the presence of both low and high molecular weight hyaluronan in the injury site. The authors demonstrated that low molecular weight HA (<20 kDa) plays an important role on triggering inflammatory response and activating the repair process. On the other hand, high molecular weight HA is associated to regenerative tissue repair with minimal inflammation and fibrosis [40]. Tolg et al. (2008) reported that fragments of HA of different size can also stimulate fibroblast migration and excisional wound repair, having the ability to promote wound closure with minimal fibrosis [41]. Yang et al. (2012) studied the effects of high and low molecular weight forms of hyaluronan on CD44 clustering. According to the authors, cell adhesion is specifically regulated by HA at different sizes: high molecular weight HA promotes aggregation of CD44 in clusters, while low molecular weight HA disrupts cells conglomerations [42].

As HA is present in all stages of wound healing and cells can be exposed to HA of different molecular weight at the same time, there are still a lot of unknowns about the influence of molecular weight on cell response since most of the studies evaluated the effect of a specific fragment size. Therefore, as changes on HA size are associate with several processes of tissue remodeling and wound healing, it is important to understand the balance of HA production and hyaluronidases, which control HA degradation along with ROS (reactive oxygen species) generated by macrophages, to propose new HA based wound dressings.

3.2. HA degradation

The mechanisms of HA degradation can be divided in two major pathways: direct/specific (enzymatic – hyaluronidases) and indirect/

non-specific (oxidative degradation by reactive oxygen species). In terms of enzymatic degradation, hyaluronidases are a class of highly homologous endoglycosidases that specifically hydrolyze the β -1,4 linkage of the HA molecule. This class of enzymes can be further divided into distinct groups according to the optimal activity conditions (acidic or neutral pH for instance). In mammals, 6 hyaluronidases (HYAL) can be found: HYAL1 (liver, plasma, urine), HYAL2 (heart, skeletal muscle, colon, spleen, kidney, liver, placenta, and lung), HYAL3 (brain, liver, testis, and bone marrow), HYAL4 (placenta and skeletal muscle), HYALP1 (chromosomes), and PH20/SPAM1 (sperm). Therefore, depending on the tissue location and environmental conditions, HA can be degraded by different enzymes into a range of fragment sizes. Although enzymatic reactions can generate reactive oxygen species that will also contribute to HA degradation, the oxidative degradation of HA is commonly observed during the inflammatory response, when reactive oxygen species such as superoxide, hydrogen peroxide, nitric oxide and peroxy nitrite are produced. Valachová et al. (2015) studied the Influence of tiopronin, captopril and levamisole therapeutics as protectants of the oxidative degradation of hyaluronan in joint inflammation process. According to the study, as tiopronin and captopril have similar chemical structure of glutathione, they were able to retard the oxidative degradation of HA by donating electrons [43]. In a further study, Valachová et al. (2016) confirmed the generation of hydrogen peroxide in HA degradation by applying the enzyme catalase in a Weissberger's biogenic oxidative system. The authors also showed the dose-dependent effect of catalase on inhibiting the degradation of HA macromolecules [44]. Valachová et al. (2021) examined the ability of ergothioneine, hercynine, and histidine to inhibit hyaluronan degradation induced by reactive oxygen species and determined its effect on the healing of skin wounds in ischemic rabbits when incorporated into hyaluronan chitosan membranes. As a result, the authors demonstrated that ergothioneine and histidine are potent in attenuating the degradation of free radical HA. On the other hand, hercynine did not show good results. *In vivo* tests show that the addition of ergothioneine and histidine to the chitosan/HA membranes contributes to a faster rate of healing of ischemic skin wounds in rabbits. Ergothioneine showed better results, especially in the early stages of healing, which is a positive result, considering that ergothioneine is an established and very potent antioxidant species, which functions in the body as a bulwark and a potent cytoprotective compound [45]. These findings can contribute for the development new treatments for wound healing based on the prevention or control of HA degradation to regulate tissue regeneration process.

3.3. Rheological properties

HA has rheological properties that hinder electrospinning, such as high surface tension and high viscosity, in addition to high hydrophilicity [2,6,12]. The polymeric solution of this polymer has a high level of conductivity and low evaporability, limiting the performance of the electrospinning process due to possible circuit failures between the needle and the collector. Wet fibers can act as electrical conductors between the electrodes, resulting in a short circuit [10].

Evaporation of the solvent is a parameter of great importance, so the use of volatile solvents is advisable. The relative humidity (RH) of the air has also a great influence on the nanofibers' morphology and the processability of the polymeric system. Yao et al. (2013) studied the effect of relative humidity and the proportion of dimethylformamide (DMF) related to deionized water as a solvent. The authors concluded that distinct nanofibers can be easily obtained when the volume ratio of 1:1 (DMF/deionized water) is used with a relative humidity of 18% or 26%, while at the same environmental conditions (RH of 18 or 26%), but different DMF/deionized water volume ratio (0.25:1), only adhered nanofibers were formed. Therefore, the higher volume ratio of DMF to deionized water can improve the HA solution's electrospinning capacity at the same relative humidity condition [46].

Hyaluronic acid electrospinning is of great interest, as the association of HA's excellent biological characteristics with the versatility and unique properties achieved by the technique is highly promising in the development of high-performance dressings. However, to ensure this polymer's processability, it is important to adopt some key strategies (detailed in the following sections). It is worth mentioning that a combination of two or more strategies is usually used.

Before applying any method, it is necessary to be cautious, as HA can be easily depolymerized (degraded), either by adding volatile solvents or adding some acid, for example [47]. An indication of polymeric degradation is the decrease in viscosity. This means that not every decrease in the polymeric system's viscosity is advantageous or represents the real panorama of the study. It is important to remember that HA's molecular weight also has a great effect on biological properties, as already mentioned.

4. Strategies used for successful electrospinning of HA

4.1. Solvent mix

One of the major problems with HA electrospinning is its high viscosity, which becomes even more critical when an aqueous solution of this polymer is used. It is known that the ionic nature of HA promotes long-range electrostatic interactions and the presence of counter ions induces an increase in the viscosity of these aqueous solutions [48]. High viscosities do not guarantee the adequate interlacing of polymer chains, as already been evidenced in highly viscous HA solutions; in fact, the lack of interlacing of the polymer chains causes electrospinning with unstable jets and, consequently, the formation of membranes with heterogeneous and discontinuous nanofibers.

There are several solutions to work around this problem: one of the most appreciated in literature is the mixture of organic solvents. They can decrease the viscosity and surface tension of polymeric solutions. The major disadvantage of this approach is that organic solvents are toxic, and their residues can make the material inappropriate to biological tissues and *in vivo* applications [49].

Table 2 shows some of the most used solvents for electrospinning HA. It is worth mentioning that the systems presented do not indicate pure HA's electrospinning in most of the works covered. In addition to solubilization in organic solvents, HA is also associated with other polymeric matrices. **Table 2** focuses only on organic solvents.

Hsu et al. (2010) electrospun collagen/HA membranes using a mixture of solvents. The authors showed that although formic acid (FA) is an excellent solvent for both polymers, this solvent alone was not efficient in enabling the electrospinning of none of the polymers separately and their blends. However, the collagen/HA electrospinning process was successful by mixing formic acid (FA) with other solvents. Although 2,2,2-trifluoroethanol (TFE) has already been a solvent used successfully to electrospun collagen, a TFE/FA mixture (70/30% v/v) used to dissolve HA, collagen, and HA/collagen did not show satisfactory results and gave rise to the formation of granules in the collector during electrospinning. On the other hand, the mixture involving 1,1,1,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) and FA (70/30% v/v) proved to be suitable for dissolving HA/collagen and gave rise to nanofibers homogeneous and without defects, however, the pure HA solution could not be manufactured in a nanofiber matrix by electrospinning. This study also addressed the effects of varying HA concentration in collagen/HA nanofibrous matrices on the behavior of fibroblasts, specifically if HA concentrations above 1.0% could inhibit cell adhesion and dissemination during the initial stages of incubation. As a result, the authors observed that there was a reduction the expression of CD44 mRNA by foreskin fibroblast cells grown on nanofibrous matrix with increasing HA concentrations up to 1.5%. It was also observed that a smaller proportion of TIMP1 (tissue inhibitors of metalloproteinases) to MMP1 (matrix metalloproteinases) in the cells of the foreskin that were grown in the collagen/HA nanofibrous matrices than in those that

Table 2

Summary of the main solvent mixtures to allow HA electrospinning.

Organic solvent	Ratio (v/v or w/w)	[HA] (w/v%)	Flow rate (mL/h)	Tension (kV)	Tip-to-collector distance (cm)	Ref.
NH ₄ OH ^a /DMF ^b	2:1	1.5	0.25	17	12	[22]
Water/DMF ^b	1:1	1.5	3.60	22	15	[50]
FA ^c /HFIP ^d	7:3	50, 100, 150 and 200	2.54	23	10	[51]
TFE ^e /FA ^c	7:3					
Chloroform/FA ^b	2:1	2.0	1.00	18	15	[52]
NaOH ^f /DMF ^b	4:1	1.0	2.50	25	15	[53]
Water/FA ^c /DMF ^b	25:25:50	0.8 to 1.2	0.30	20	15	[54]

^a Ammonium hydroxide.^b Dimethylformamide.^c Formic acid.^d 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol.^e 2,2,2-trifluoroethano hydroxide.^f Sodium hydroxide.

were grown in the collagen nanofibrous matrices, which is an important indicator so that there is no scarring formation [51].

Liu et al. (2011) used a solvent mixture containing deionized water, FA, and DMF to dissolve HA and improve the solution's physical properties. The results showed that stable electrospinning only occurred after mixing these three solvents. The authors also evaluated what was the role of FA and DMF in the final solution. They pointed out that FA increases ionic concentration and causes an improvement in electrical conductivity [54]. However, the excessive addition of FA evidenced the shearing thinning behavior and the jet elongation, which causes the fiber diameter to decrease to the point of preventing the formation of homogeneous fibers [54,55]. On the other hand, DMF significantly reduces surface tension and can generate a jet with a low charge density, making the process unfeasible [54].

4.2. Crosslinking agent

HA's high water absorption capacity makes its application in biomedical systems, such as controlled drug release, scaffolds for cell growth, and wound dressings difficult or impossible. Moreover, it makes the electrospinning process difficult when it comes to aqueous solutions. The solvent does not evaporate in the interval between the needle and the collector, causing the solution to drip or eject droplets into the collector [7,50,56].

Many research types have concentrated their efforts to solve this type of problem, and the focus has turned to the reticulation processes. Without the intention of discussing the mechanisms in which the crosslinking of HA occurs, this review aims to show which are the main crosslinking agents used along with the electrospinning process (Table 3).

The main crosslinking agents used for HA chains include carbodiimides, polyvalent hydrazides, aldehydes, sulfides, and polyfunctional epoxides, in addition to auto-crosslinking and photo-

crosslinking [47,50,57]. These reactions can occur in acidic, neutral, and alkaline conditions. The groups liable to crosslink in HA's native structure are the functional groups of carboxylic acid and hydroxyl [47,57]. The hydroxyl groups are usually cross-linked via the ether bond and the carboxyl groups via the ester bond [47,57].

Literature reports show that EDC is one of the most widely used crosslinking agents in the HA electrospinning process. This crosslinking agent is a water-soluble carbodiimide that offers some advantages compared to other crosslinkers, such as a smooth and easy control of the crosslinking reaction [50,59]. The fact is that EDC is a zero-length crosslinker, which means that the agent itself is not incorporated into the molecules. It just helps to facilitate bonding within the structure and being biocompatible and showing no cytotoxicity [50].

4.3. Surfactant

As already mentioned in the previous sections, one of the crucial parameters for electrospinning is the polymeric solution's surface tension. The process requires that the electric field's electrostatic forces overcome the surface tension of the solution and thus establish a continuous and stable jet. The big issue is that HA has a very high surface tension that requires the application of very high tension (or voltage) to the process, which does not guarantee the jet's stability and may render the process unfeasible.

The addition of surfactants is promising to reduce surface tension and allow HA's processability by electrospinning, as the surfactant molecules have both lipophilic and hydrophilic groups. When in solution, due to the lipophilic group's presence, these molecules preferentially occupy the surface of the liquid, decreasing the cohesive force between the solvent molecules and, consequently, decreasing the surface tension [60].

Uppal et al. (2011) verified the electrospray phenomenon by submitting aqueous solutions with concentrations between 1% and 4% of

Table 3

Summary of the main crosslinking agents used in HA electrospinning.

Crosslinking agent	Crosslinking concentration	Method	Crosslinking condition	Ref.
EDC ^a /NHS ^b	2% (w/w) _{EDC} 1% (w/w) _{NHS}	Crosslinker added to the solution to be electrospun	Aqueous crosslinker solutions, 30 min before electrospinning.	[48]
EDC ^a	50 mM	Immersion (10 mg electrospun membrane)	5 mL crosslinking medium (volume ratio of ethanol to water is 8/2), 4 °C, 24 h.	[50]
EDC ^a /NHS ^b	50 mM _{EDC} /50 mM _{NHS}			
EDC ^a	5 mM	Immersion (electrospun membrane)	1st step: 5 mM EDC solution in 95% ethanol, Room temperature, 24 h. 2nd step: immersion in 75% ethanol for 24 h.	[51]
Glutaraldehyde	20% (v/v)	Crosslinker (vapor phase)	24 h	[58]
EDC ^a	50 mM	Immersion (electrospun membrane)	50 mM EDC solution in 95% ethanol, 22 h.	[59]

^a (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride).^b N-hydroxysuccinimide.

HA to the electrospinning process. The authors added Cocamidopropyl betaine as a surfactant to make the process viable, which provided the jet stability for obtaining the membranes [1].

Séon-Lutz et al. (2019) used hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD) as a stabilizer for the HA electrospinning process and obtained uniform nanofibrous scaffolds. In this work, the authors concluded that even though the HP β CD effect was not prevalent in the studied system, the surface tension decreased significantly, making this an important molecule to be considered [48].

4.4. Mixture of polymers

The membranes of pure HA and in their native form are difficult to obtain by conventional electrospinning. Studies that approach this system in its genuine form still require advances. In order to take full advantage of the biological properties of HA and, at the same time, use the unique characteristics of the electrospinning technique, researchers associate HA with other polymeric matrices that have good processability characteristics or perform modifications on its surface, allowing it to be electrospinnable (Table 4) [61].

Table 4

Polymeric mixtures of HA and other polymers that make HA electrospinning viable.

Blend	[HA] (w/v%) ^j	Molecular weight of HA (Da)	Proportion ⁱ	Tension (kV)	Flow rate (mL/h)	Bead formation	Ref
HA-SF ^a /ZnO ^b	1.5	2×10^6	HA (shell) Addition of ZnO nanoparticles (1, 3 or 5% w/v) in SF 13% (w/v) solution (core)	17	0.25	No	[22]
HA/gelatin	1.5	2×10^6	Gelatin: 0.375%, 1.5% or 6% (w/v) HA/gelatin proportion: 100/5; 100/20; 100/80	22	3.6	No	[50]
PCL ^c /HA	2.0	2.5×10^6	PCL 10% (w/v) PCL/HA proportion: 10/1 (v/v)	18	1.0	No	[52]
PCL ^c /HA	1.0	$1.5\text{--}2.2 \times 10^6$	PCL 7% (w/v) PCL/HA proportion: 9/1 (v/v)	25	2.5	No	[53]
PU ^d /St(HA)	1.0	–	PU 12% (w/v) (core) HA 1% (w/v) was added to starch (St) solution 9% (w/v) (shell)	–	–	No	[58]
(Ag-PGA ^e /HA)-PVA ^f	0.25	–	Addition of 1% of Ag-PGA/HA dry powder to an 8% (w/v) PVA solution	11	1.3	Almost nonexistent	[62]
PLCL ^g /HA	2.0	–	HA (shell) PLCL 10% (w/v) (core)	16	0.15 (shell) 0.60 (core)	No	[63]
SF ^a /HA/THY ^h	20	Low molecular weight	SF 10% (w/v) SF/HA proportion: 2/1 (v/v) Addition of THY (5 mg/mL) and 2 mL of 8% (w/v) PEO to the SF/HA mixture	28	2.3	No	[64]
PVA ^b /HA-AgNPs	1.0	$0.15\text{--}0.17 \times 10^6$	PVA 16% (w/v) AgNO ₃ (0.1 M) PVA/HA-AgNPs proportion: 100/0; 95/5; 90/10; 80/20; 60/40; 50/50; 40/60	58	–	PVA/HA-AgNPs proportion: 40/60: No nanofiber 50/50: Nanofibers/bead	[65]
PVA/HA	2.0	1.6×10^6	PVA 6% (w/v) PVA/HA 75/25 (w/w)	25	0.3	No	[66]
PEO ⁱ /HA	–	8700	PEO/HA preparation: 3/1; 1/1; 1/3 (w/w) Total polymer concentration was kept at 8.0% (w/w) in all experiments	18	0.5	No	[67]

^a Silk Fibroin.

^b Zinc Oxide.

^c Polycaprolactone.

^d Polyurethane.

^e Polygalacturonic acid.

^f Poly(Vinyl Alcohol).

^g Poly(l-lactide)/Poly(e-caprolactone).

^h Thymol.

ⁱ Poly(ethylene oxide).

^j Solution in water or organic solvent.

As shown in Table 4, there is no standard protocol to be followed to be successful in the electrospinning process of HA. The key is that for any electrospinning process for nanofibers to form, the polymeric solution must reach a critical entanglement concentration (CEC) without reaching a too high viscosity, which also hinders its processability [7,68,69]. In addition to reaching the CEC at the same time that the viscosity is exceptionally high, the HA solution still presents high surface tension. It should also be noted that the CEC depends on the molecular weight of the polymer, the characteristics of the polymer chain, and the solvent used. Therefore, it is crucial to evaluate each polymer's contribution to the properties of the polymeric mixture [68,69].

The mixture of HA with other polymers and the addition of organic solvents can facilitate the electrospinning process. However, not all polymeric mixtures will be successful. However, it is relevant that these mixtures have inter- and intramolecular hydrogen bonds with the HA chains. These interactions can cause changes in the α -helix structure of this polymer, allowing greater flexibility and interlacing of its chains [7].

The study made by Abdel-Mohsen et al. (2019) evidenced that not all polymeric proportions will result in a mixture suitable for electrospinning. The authors proposed the electrospinning of PVA/HA-

AgNPs in different proportions. They noted that as the proportion of HA-AgNPs increased in the formulation, nanofibers' formation also increased. The proportion (50/50) showed beads' formation, while the process using a different proportion (40/60) was unsuccessful. It is important to remember that for this system the solvent used was water. The authors attribute the success of electrospinning to the fact that AgNPs have connected with HA functional groups (-OH, -NHCOCH₃ and -COO-) and as PVA functional groups (-OH, residual of -COCH₃), indicating that the AgNPs acted as physical crosslinking agents between the HA and PVA chains. This interaction also resulted in improvements in the mechanical properties of composite materials when compared to pure PVA membranes, as a result, Young's modulus increased from 175 MPa to 325 MPa [65].

An interesting approach was the use of coaxial electrospinning of HA to obtain core-shell fibers, as it is an effective mechanism to functionalize the outer nanofibers surface [63,67,70]. Studies in the literature show that solutions with low electrical conductivity and unsuitable characteristics for electrospinning can be easily stretched into thin filaments by coaxial electrospinning with a highly spinnable solution [63,71].

When using the technique, there must be sufficient viscosity of the shell material on the core material to overcome the interfacial tension between the two solutions, allowing the cone's formation and enabling the core to form the structure. The core fluid must also have a minimum viscosity to be conducted continuously without rupture [72]. Table 3 shows some approaches to coaxial electrospinning, whose mechanism allows greater versatility of the process, such as working with the same or different flow rates simultaneously and with solutions that are difficult to process.

Li et al. (2014) proposed in their studies the production of core-shell nanofibers of cellulose acetate (CA-shell) and sodium hyaluronate (HA-core), where HA carried Naproxen (NAP) loaded liposomes, the choice for HA as a core carrier was since this polymer was able to stabilize the liposomes loaded with NAP by adsorption on the surfaces. In this study, the authors compared the formulation with two other formulations: (1) CA electrospinning mixed with NAP and (2) Coaxial electrospinning with CA (shell) and the mixture of CA with NAP (core). The results showed that the drug dispersed homogeneously in the proposed polymeric matrices in all cases, and the electrospinning process took place successfully. The interesting point is that in the formulation with HA, the release of the drug occurred differently. While in the other formulations, the release occurred by a non-Fickian diffusion mechanism. In the formulation with HA the most accentuated release occurred in the first 8 h, followed by a sustained release for 12 days, making the material promising as a controlled release device [73].

4.5. Chemical derivatives of hyaluronic acid

As mentioned earlier, the modification of HA is another alternative to improve its processability by electrospinning. Methacrylate groups can be easily conjugated to the HA framework through hydroxyl groups. Kim et al. (2013) proposed MeHA (methacrylated hyaluronic acid) and photo-crosslinked membranes with adjustable mechanics and adhesiveness properties. The electrospinning process went smoothly, and the membranes were studied for cartilage repair. MeHA allowed the organization of the cytoskeleton differentially and the resulting ability of cells to exert traction on fibers, as well as increased cell dissemination, proliferation, and formation of focal adhesion [74].

Zhao et al. (2015) proposed another form of modification, in the process, preparing water-stable PVA/PEI nanofiber membranes by electrospinning and subsequently exposing these membranes in an activated HA solution [37]. The membranes showed good hemocompatibility and cytocompatibility. The presence of HA gave the membranes a high capacity to precisely capture cancer cells that overexpress the CD44 receptor [37].

Chemical modifications in HA are not only important for processability but also to prolong their degradation time. The presence of hydroxyl groups in the *N*-acetylglucosamine portion of HA is one of the main domains for cross-linking via a chemical reaction and covalent bond formation. Zamboni et al. (2020) proposed an alkyl based isocyanate crosslinking method, giving rise to stable carbamate crosslinks, in addition to forming a centrally located disulfide bond allowing versatility concerning reversible crosslinking [75].

Collins et al. (2013) showed in their studies that the improvement in the degradation time of HA is related to the properties of the polymeric solution. The authors pointed out that the control of the dissolution of HA is important because the dissolution and degradation of the solution are simultaneous processes during the preparation of the solution. Complete dissolution is also important to maximize intermolecular crosslinking and reduce the waste of intramolecular reactions, points that are important when modifying HA by chemical crosslinking to gain property and processability in the electrospinning technique. The results presented by the authors showed that the dissolution of optimal HA occurs between 24 and 40 h. Crosslinking reactions in HA films were carried out under these conditions, and the new materials were stable when swollen in water for up to 4 days [76].

4.6. Modification in the electrospinning process

A more complex alteration, but one that also allows the electrospinning of HA, is modifying the technique itself. Two proposals have already been discussed in the literature: co-electrospinning and blow-assisted electrospinning. Co-electrospinning is a method of producing mainly core-shell nanofibers, consisting of a polymer solution in the shell and a polymer solution or a non-polymeric Newtonian liquid or even a powder fill in the core. However, it can also be only a method for producing composite materials. There are three co-electrospinning systems: (1) Production of the composite material by injection at the same time of two different solutions using different parameters (Fig. 2A), (2) Production of core-shell nanofibers using a single-needle (Fig. 2B), and (3) Production of nanofibers using the double channel nozzle (Fig. 2C).

In the first co-electrospinning system, the composite material is formed by injecting two different solutions through separate syringes; this is an interesting method to increase the pore size, an important property that improves cell proliferation [79]. In the case of HA, this would not be the most suitable system, as the same problems found in conventional electrospinning would remain unsolved in this method.

The second system is a very interesting approach. Core-shell nanofibers are formed without conventional coaxial electrospinning; in this type of system, the solutions must be immiscible. The jet will be stabilized when both solutions are sufficiently viscous, and the shell solution presents good electrospinning properties [80,81]. This method is more appropriate for HA electrospinning, as it can work around the problems of high viscosity and high surface tension.

Finally, the third system, it will use the traditional coaxial electrospinning system. Two polymeric solutions are ejected in a double channel matrix, as previously pointed out in session 3.4 – Mixture of polymers.

Vitková et al. (2019) proposed two co-electrospinning approaches for HA. In the first, the authors used HA co-electrospinning in a mixture with highly spinnable polymers of PVA and PEO, respectively. The second proposal was HA co-electrospinning with the use of an intermediate solvent. To provide the formation of nanofibers, it was necessary to add a surfactant (BEC-Benzethonium chloride) to the HA/PVA system. Both HA/PEO and HA/PVA mixing solutions provided bead-on-string structured fibers. For systems using intermediate solvents, H₂O/Isopropanol (10:7%w/w) and H₂O/Ethanol/Methanol (5/5/1%w/w) were used. Both solvent mixtures facilitated the electrospinning of HA of molecular weight 600 and 1,180 kDa, while HA with lower molecular weights had a greater tendency to form spherical particles. The best results were achieved with

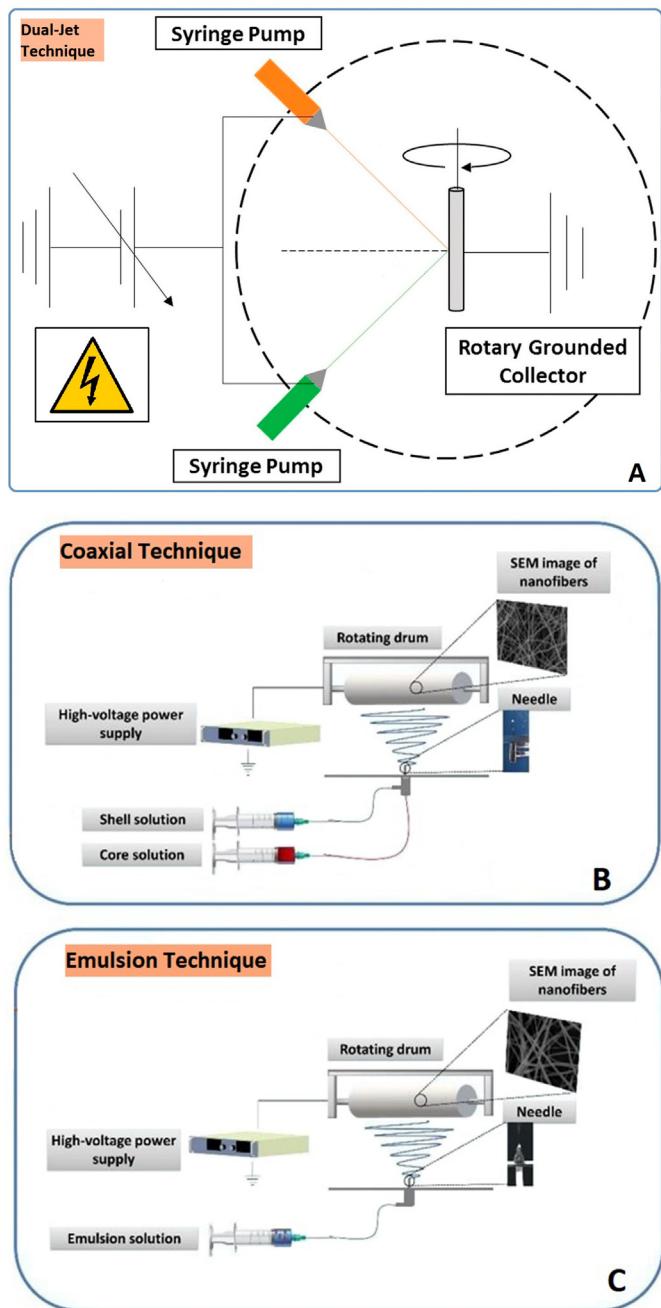


Fig. 2. Schematic diagram of co-electrospinning (A) Two syringe, (B) Double channel nozzle, and (C) Single-nozzle. Adapted from Su et al. and Scaffaro et al. [77,78], with permission from Elsevier.

the HA 1180 kDa solution in H₂O/Ethanol/Methanol (5:5:1% w/w) in concentrations of 2.2% and 1.5% (w/w) [61].

As mentioned earlier, the other form of electrospinning proposed was blow-assisted electrospinning; this modification in the process is effective and allows HA to be electrospun using water as a solvent [12]. The process consists of combining airflow, heating, and electrospinning [48].

Um et al. (2004) were the first to propose changing the technique. The authors aimed to circumvent the high viscosity and high surface tension of the aqueous solution of HA and other polymers that present this same problem [82]. In a simplified way, the process proposed by those researchers and still currently in use consists of a conventional electrospinning system coupled to a modified air blowing system that

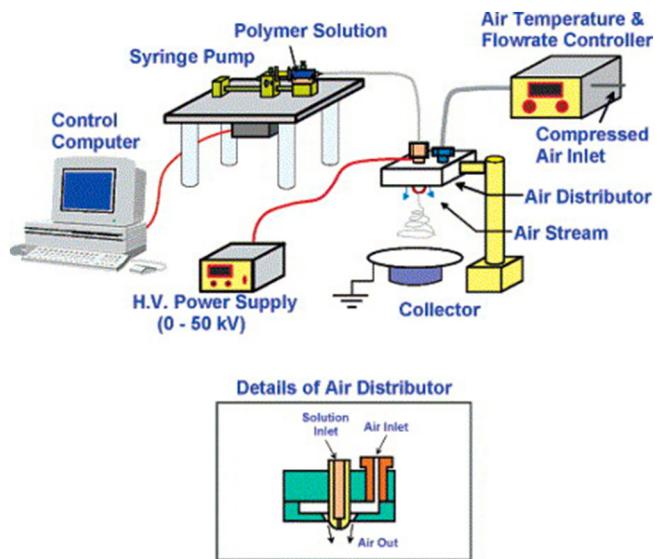


Fig. 3. Schematic diagram of blowing-assisted electrospinning. Adapted from Wang et al. [82], with permission from Elsevier.

applies two simultaneous forces, *i.e.*, an electrical force and a shear force on the polymeric solution (Fig. 3) [82]. This air blowing system consists of two components, a heater and a fan with controllable temperature and airflow.

The research carried out by Um et al. (2004) and Wang et al. (2005) showed that the blowing-assisted process has numerous advantages compared to conventional electrospinning, such as (1) the combination of the blowing force of the air and the applied electric field can overcome the high viscosity and high surface tension of the polymeric solution, (2) the use of an adequate temperature of the airflow can further reduce the viscosity, as well as facilitate the formation of the solution jet, (3) the blown air accelerates the solvent evaporation process, guaranteeing the formation of the fibers when they reach the collector, (4) the diameter of the fiber can be controlled through the temperature of the airflow direction, and airflow rate, and (5) the production rate can be increased, which facilitates large-scale membrane fabrication [82,83].

Arnal-Pastor et al. (2013) proposed the crosslinking of HA by divinylsulfone (DVS) in a single step using the blowing-assisted electrospinning technique. The procedure consisted of combining the aqueous HA solution with a DVS solution in a three-way valve to mix them and make the resulting solution electroblown immediately. Moreover, the needle was tilted at 40° and the collector at 80° concerning the horizontal plane. The authors obtained very thin membranes with uniform fibers' diameters varying from 150 to 200 nm, and stable in phosphate-buffered saline for more than 28 days. Despite the numerous advantages presented by this method, it was observed that the air blowing introduces instabilities in the electrodeposition process and can cause defects in the fibers [84].

4.7. HA-based bilayer electrospun membranes

The use of bilayers systems for making electrospun membranes is not only related to processability, but also to the gain of properties and the objective of mimicking the layers of the skin. The main advantage of having a two-layer structure lies in addressing two distinct functions during wound healing: (1) mechanical retention of the structure and (2) maintaining hydration in the wound bed to ensure adequate cell encapsulation [53,85]. The most recent studies using HA in this type of system, have added HA in the upper layer to promote greater

mechanical stability, hydration of the wound bed, and improved cytocompatibility [53,84–86].

These two-layer meshes have a very similar structure to ECM, as they have a high area-to-volume ratio, are highly porous, allow oxygen exchange, exudate absorption as well as cell infiltration, in addition to being used as efficient carriers for agents antibacterial and therapeutics that play an active role in the wound healing process [53].

Arnal-Pastor et al. (2013) studied two-layer membranes of HA and poly(L-lactic acid) (PLLA), in order to obtain two-layer membranes stably joined with an adherent face and the opposite non-adherent face. The addition of PLLA aims to overcome the disadvantages of reduced thickness and high equilibrium water content of HA membranes, which implies a lack of mechanical properties and limited management capacity. The authors demonstrated through biological *in vitro* tests that the nanofiber PLLA face is compatible with cells and promotes cell fixation and dissemination and, therefore, can be used as a cell supply vehicle, while the HA face prevents cell adhesion, and therefore can prevent post-surgical adhesions, for example [84].

Figueira et al. (2016) proposed a bilayer membrane in which the upper layer was composed of HA/PCL, to provide mechanical support and also to act as a physical barrier against external threats, and the lower layer composed of Chitosan (CS)/Zein (ZN)/Salicylic Acid (SA), to confer anti-inflammatory and antimicrobial activity. The presence of PCL in the upper layer is due to the difficult processability of HA by the electrospinning technique and the inadequate mechanical properties that affect its performance *in vivo*. The results showed that the membranes did not exhibit any toxic effect on human fibroblasts, since the cells were able to adhere, spread, and proliferate [53].

Chanda et al. (2018) proposed CS/PCL-HA bilayer membranes. To minimize the use of synthetic biopolymers, the authors electrospun the HA layer in the presence of water-soluble PEO, so that the PEO could be removed substantially after washing the scaffold. *In vitro* studies with Vero cells [renal epithelial cell, extracted from African Green Monkey (*Chlorocebus sp.*)] confirmed the increase in proliferation, growth, and migration of Vero cells in the CS/PCL-HA matrix when compared to monolayer membranes of PCL and CS/PCL [85].

Petrova et al. (2019) produced a bilayer non-woven material CS and HA, by needle-free electrospinning to assess its compatibility with mesenchymal stem cells (MSCs) to determine its potential for use in tissue regeneration. Biocompatibility tests showed greater cell adhesion for CS/HA (397 ± 39 cell/mm 2) when compared to CS-only membranes (281 ± 18 cell/mm 2). The cultivation of MSCs in CS and CS/HA matrices and the induction resulting from chondrogenic differentiation led to an increase in the expression of the SOX9, aggR, and collagen II (COL2A1) genes. These indicate a different role for CS and CS/HA matrices, which may be the creation of a microenvironment to support MSC potential or to stimulate chondrogenesis [86]. Thus, HA is used in tissue engineering to create structures that can control chondrogenesis and provide a favorable niche for stem cell chondrogenesis *in vitro* and *in vivo* [86,87].

4.8. Combination of two or more strategies

As previously presented, the most common is that two or more strategies are associated, as in general better processability results are achieved. Most of the works use the mixture of HA to other polymeric matrices together with the use of organic solvents.

Wang et al. (2016) produced PCL/HA membranes by electrospinning. In the study, the authors used chloroform to solubilize PCL and a mixture of chloroform with formic acid to solubilize HA, beyond the addition of span-80 as a surfactant. The solutions showed good processability, and the membranes presented an average diameter of 184 ± 6 nm and a pore size of 0.16 ± 0.02 μm^2 [52].

Figueira et al. (2016) proposed a bilayer PCL-HA/CS-ZN system. For the electrospinning of the HA-containing layer, the authors solubilized PCL in 3,3,3 Trifluoroethanol, and HA in a mixture containing NaOH and DMF. The produced membranes presented a network of highly

porous nanofibers composed of randomly oriented fibers with an average diameter of 472 ± 192 nm without defects [53].

Castro et al. (2020) electrospun HA/PVA membranes using water with solvent and adding maleic anhydride as a photocrosslinking agent. The membranes showed homogeneous diameter distribution and stability in phosphate-buffered saline [66].

5. *In vivo* and *in vitro* studies using electrospun HA membranes in healing processes

One of the main pillars of the application of biomaterials in the biomedical area is wound healing. The membranes produced by electrospinning are used mainly as dressings for wounds and medication release. In this review, we will focus on HA electrospinnable dressings. Before introducing the potential of these dressings, it is crucial to understand the healing steps and the main properties of a good dressing.

The healing process involves four major phases that act in an interconnected way: hemostasis, inflammation, proliferation, and remodeling [4,6,62]. Hemostasis occurs immediately after the injury; at this stage, the coagulation cascade is activated. Bleeding carries platelets, red blood cells, and fibrin, sealing the wound's edges, still without mechanical value, but facilitating exchanges. The formed fibrin clot establishes a waterproofing barrier that protects against contamination [4,6,62]. The inflammatory phase coincides with the hemostasis process, and for many authors, the two processes occur in a single phase.

The inflammatory response begins with vasodilation and increased vascular permeability, promoting chemotaxis (migration of neutrophils to the wound). The first cellular elements to reach the wound site are neutrophils and monocytes, which are attracted by chemotactic released by platelets, with the function of debriding wound surfaces, phagocytizing antigenic particles, and foreign bodies. Gradually neutrophils are replaced by macrophages, which play an essential role in the following stage; these cells are responsible for the secretion of growth factors and cytokines, causing the migration of keratinocytes and fibroblasts to the wound site (fibroplasty). This contributes to the angiogenesis and synthesis of the extracellular matrix necessary to start the proliferation stage and subsequent healing [4,6,62].

In the proliferation phase, fibroblasts proliferate under the action of cytokines that generate a process called fibroplasia. At the same time, there is a proliferation of endothelial cells, with the formation of rich vascularization (angiogenesis) and dense infiltration of macrophages, forming the granulation tissue, which consists of a capillary bed, fibroblasts, macrophages, a loose arrangement of collagen, fibronectin, and hyaluronic acid. New blood vessels are formed from pre-existing vessels during the angiogenesis process, which helps restore oxygen perfusion [4,6,62].

Finally, in the remodeling phase, collagen is deposited in an organized manner. At this stage, type III collagen is reabsorbed, and thicker collagen (type I collagen) is produced and organized along the tension lines. The tensile strength will never return to 100%, and the scar will gradually change its tone from dark red to light pink [4,6,62].

As previously described, wound healing is a complex biological process, composed of a series of sequential events that aim to repair injured tissue. The components of the extracellular matrix play an important role in regulating all stages of tissue repair and are not only associated with providing a microenvironment to the wound but are also involved in various signaling pathways that are activated in the wound bed during the healing process [88].

Studies have already shown that HA fragments of different molecular sizes can have different, sometimes opposite, properties. For example, it has been well documented that low molecular weight HA exhibits anti-inflammatory and immunosuppressive properties, whereas high molecular weight HA is a potent pro-inflammatory molecule. High molecular weight HA may have a different biological function

from low molecular weight HA, such as informing cells about stress conditions [88,89].

Although the study of HA's applicability in wound healing is recurrent, we will focus on electrospinnable dressings based on this polymer. The good results obtained by HA in the biomedical area, in general, are because it is the main component of ECM, in addition to presenting excellent biological activity [90]. When discussing dressings for wound healing, the scientific consensus is that HA has a healing effect and matrix organization. In the case of dressings produced by electrospinning, these devices would capture a greater amount of exudates due to greater contact surface, and act as a support to facilitate the migration and proliferation of cells in the wound, promoting tissue growth and faster wound healing [1,90]. Table 5 shows the main functions of HA in the wound healing process.

Shin et al. (2016) proposed HA/PLGA core/shell membranes loaded with epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG) to investigate the healing process through *in vivo* studies in STZ-diabetic rats. As a result, the authors reported that, after 14 days, the remaining area of the wound for the control groups, PLGA, HA/PLGA, HA/PLGA-EGCG, and Rapiderm® was 49.96%, 48.43%, 40.18%, 10.84%, and 24.87%, respectively. The values suggest that the synergistic effects of HA and EGCG released from HA/PLGA-EGCG matrices accelerated the wound healing process by eliminating ROS, mitigating inflammation, stimulating the re-epithelialization of inflammation, and promoting angiogenesis and reorganization of the ECM [90].

Uppal et al. (2011) compared the application of different dressings (adhesive bandage, sterilized solid HA, gauze with petroleum jelly, antibiotic dressing, and HA nanofiber dressing) for wound healing in pigs for 30 days. The results showed that the nanofibrous HA dressing showed better results than the others, except for the antibiotic dressing, which was not significantly different from HA nanofiber dressing. In conclusion,

the researchers reported that higher concentrations of HA help in the mitosis of epithelial cells, which accelerates healing. Also, HA can control phagocytosis by regulating macrophages' movement, acting positively in the inflammatory and proliferative stage of the healing process [1].

Although large surface areas and high porosities are an advantage of dressings produced by electrospinning, these characteristics, if not adequately controlled, can also be a drawback since a large surface area and the formation of small pores inherent to these structures allow these devices to have high adsorption of non-specific proteins and poor cell infiltration [36,91]. In order to solve these problems, Li et al. (2012) proposed a nanofibrous framework of hyaluronan (HA), silk fibroin (SF), and mixtures of poly(caprolactone) (PCL) via emulsion electrospinning in one-step, which allowed an increase in the pore size between the fibers and the formation of oriented pores within the structure. Biologically, HA extinguished non-specific proteins' adsorption, which resulted in a thicker fibrosis tissue and less macrophage adhesion *in vivo*, increased cell infiltration *in vitro*, and internal tissue growth *in vivo* [36]. *In vitro* culture of skin fibroblasts showed that there was not only a significant increase in cell proliferation and phalloidin protrusions but a decrease in the production of type I collagen. Finally, HA-based scaffolds interacted with the CD44 cell surface receptor to activate the TGF-β1/MMPs signaling pathways that lead to cell migration [36].

To increase porosity and mimic the layers of the dermis and epidermis, Miguel et al. (2019) proposed asymmetric membranes by electrospinning. The upper layer was produced with SF and PCL to reproduce the dense nature and impermeability of the epidermis. The lower layer was manufactured with SF and hyaluronic acid loaded with a thymol herbal medicine (THY), simulating the dermis. Asymmetric membranes showed mechanical properties, porosity, wettability, and structural organization similar to native human skin; the *in vitro* tests with human fibroblasts showed that the membrane promoted

Table 5
HA-based membranes and the main contributions to the wound healing process.

Membrane	Molecular weight of HA (Da)	[HA]	Flow rate (mL/h)	Tension (kV)	Contribution of HA in the healing process	Ref.
HA(core)/PLGA(shell)	$0.8\text{--}1.8 \times 10^6$	0.6% (w/v)	0.1 (core) 0.3 (shell)	15	1) Promotes wound healing by accelerating re-epithelialization, wound contraction, and angiogenesis; 2) Promotes reorganization of EMC; 3) Allows a continuous supply of oxygen and nutrient supplements that aid in healing.	[90]
HA	–	1–4% (w/w)	0.1–0.5	1–17.5	1) Aids in cellular repair, keeps the skin moist, and heals wounds faster; 2) Aids in mitosis of epithelial cells; 3) Aids in cell migration and cell proliferation, which promote tissue growth and angiogenesis; 4) Regulates phagocytosis by regulating the movement of macrophages; 5) Absorbs wound exudate, improving the healing process.	[1]
PCL/SF/HA	2.5×10^6	2% (w/v)	1.5	15–20	1) Important for maintaining matrix stability and tissue hydration; 2) Plays a major role in regulating cell functions through interaction with cell surface receptors CD44; 3) Reduces collagen deposition, acts in the prevention of fibrosis and the formation of scars in the healing process.	[36]
SF/HA	Low molecular weight	20% (w/v)	2.3	28	1) Stimulates the migration of inflammatory and fibroblast cells into the wounds, through its interaction with cell surface receptors CD44; 2) The low molecular weight of the HA favors cell migration and adhesion.	[64]
PCL/HA	$1.5\text{--}2.2 \times 10^6$	1% (w/v)	2.5	25	1) Presents controlled biodegradability; 2) Assist in healing by stimulating fibroblasts to the wound site.	[53]

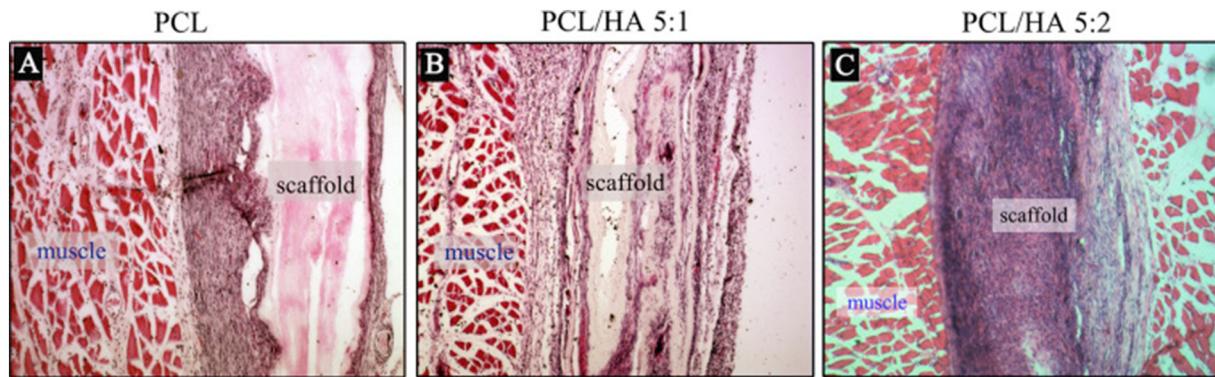


Fig. 4. Host cell infiltration analysis based on hematoxylin and eosin staining in HA-based scaffolds. Adapted from Qian et al. [92], with permission from Elsevier.

cell adhesion, proliferation, and dissemination [64]. Asymmetric membranes are a bet of researchers for making dressings with the purpose to mimic skin layers so that the upper layer is dense and/or hydrophobic microporous to prevent the penetration of bacteria, and the lower layer is macroporous, allowing the exudate absorption, gas exchange and cell migration/proliferation [19,64].

Figueira et al. (2016) produced bilayer membranes by electrospinning. The upper layer was composed of HA and PCL, responsible for acting as a physical barrier against external threats. The lower layer was composed of chitosan and zein loaded with salicylic acid to confer anti-inflammatory and antimicrobial activity. The physical-chemical properties of the membranes were satisfactory, presenting an optimum porosity of $90.40 \pm 4.25\%$, which corroborated with the biological tests that showed the human fibroblast ability to adhere, spread and proliferate on the material [53].

Qian et al. (2015) demonstrated that the increase in the proportion of HA improves cell infiltration *in vitro* and *in vivo*; Fig. 4 shows part of the results obtained by the authors when implanting different membranes subcutaneously *in vivo*. This study was important in demonstrating that the addition of HA overcomes the limitations of infiltration and cell growth, coming from inherently small pores of electrically spun scaffolds. The addition of HA can promote cell infiltration without the need to change the organization or microstructure of the scaffolds [92].

Hussein et al. (2020) have studied PVA/HA/L-arginine membranes for application in the wound healing process. The authors observed that the presence of HA in the formulation stimulates the closure of wounds, which can be seen in Fig. 5 through the wound scratch assay conducted in HFB-4 cells. They concluded that this effect is due to the stimulus of HA for migration and differentiation of epithelial cells [93].

6. HA-based electrospun wound dressing acting as drug delivery system

The benefits of HA nanofibers used for dressings have already been described in the previous sections. In this section, we will highlight how HA matrices can be used as medicine carriers to act in the wound healing process. The fact that HA has high solubility in aqueous media makes this polymer unusual material for transporting medicines. Electrospun HA membranes release the incorporated substance immediately upon contact with moisture, due to the influence of dissolution and swelling [13].

Eskandarinia et al. (2020) produced PU/HA dressings loaded with ethanol extract of propolis (EEP). The authors evaluated three concentrations of EEP (0.5, 1.0 and 2.0% w/w). The *in vitro* release studies showed that after the initial burst effect, the propolis release profile showed a sustainable and prolonged form for 48 h in all concentrations. The sample containing 2.0% (w/w) of EEP showed better antibacterial results against the bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, which was compatible with the controlled release assays, since this sample also showed higher levels of release over time. PU/HA samples

without EEP did not show antibacterial effects, this effect was attributed to EEP due to the presence of phenolic compounds, flavonoids and aromatic acids that are well-known antibacterial agents and are active during the healing process. In cell viability tests, the PU/HA sample exhibited greater cell viability compared to the PU sample, which was attributed to the incorporation of HA in its structure. Among the samples that contained EEP, the sample with 1.0% (w/w) of EEP stood out, as it presented adequate cell fixation and proliferation on the surface of the polymer matrix, in contrast, the sample containing 2.0% (w/w) of EEP showed less cell viability, which was attributed to the release of undesirable constituents of propolis [94].

In the studies by Shin et al. (2016), HA/PGA (core/shell) nanofibers were loaded with epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG) for the treatment of diabetic wounds. EGCG was studied in two concentrations (2 and 4% w/w), in this system the drug was incorporated into the nanofiber shell. The authors studied the controlled release of EGCG and of the HA that was at the core of the nanofibers. The matrices containing 4% (w/w) of EGCG were more suitable for the treatment of diabetic wounds because the released concentrations reached the minimum concentrations so that there is the pharmacological activity of the active principle. HA had a release profile similar to that of EGCG. The authors concluded that EGCG loading does not adversely affect the mechanical properties of the matrices and attributed the positive results of *in vivo* biological studies to the synergistic effects between EGCG and HA [90].

Lai et al. (2014) proposed collagen (Col) and hyaluronic acid (HA) inter-stacked nanofibrous loaded with multiple angiogenic growth factors (vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet-derived growth factor (PDGF), growth factor of basic fibroblast (bFGF) and endothelial growth factor (EGF)), able to mimic the skin layers. The growth factors were either directly incorporated into the nanofibers or encapsulated in gelatin nanoparticles (GNs) and the choice of each one was due to the synergistic effects in the angiogenesis process. In addition, the materials chosen to compose the polymeric matrix were capable of supporting the formation and development of vascularization and restoration of the functional properties of the injured tissue. Collagen stimulates targeted cell migration and inhibits wound contraction *in vivo* and HA reduces scarring. The release profile was different for the different growth factors. VEGF and PDGF-BB absorbed by GNs showed a slow and gradual release, as the nanoparticles were degraded. On the other hand, the patterns of bFGF and EGF release, which were directly dispersed within the nanofibers, reflected the initial rapid release due to the different fiber degradation rate (Fig. 6) [95].

Séon-Lutz et al. (2019) evaluated the encapsulation of Naproxen (NAP) in PVA/HA/HP β CD electrospun membranes. Here, the authors impregnated the drug by two methods: (1) immersion of electrospun membranes in aqueous NAP solution and, (2) impregnation of NAP in electrospun membranes using supercritical fluid (scCO_2). ScCO_2 -impregnated membranes had a total release 2.5 times greater than immersion-impregnated membranes. On the other hand, the membranes

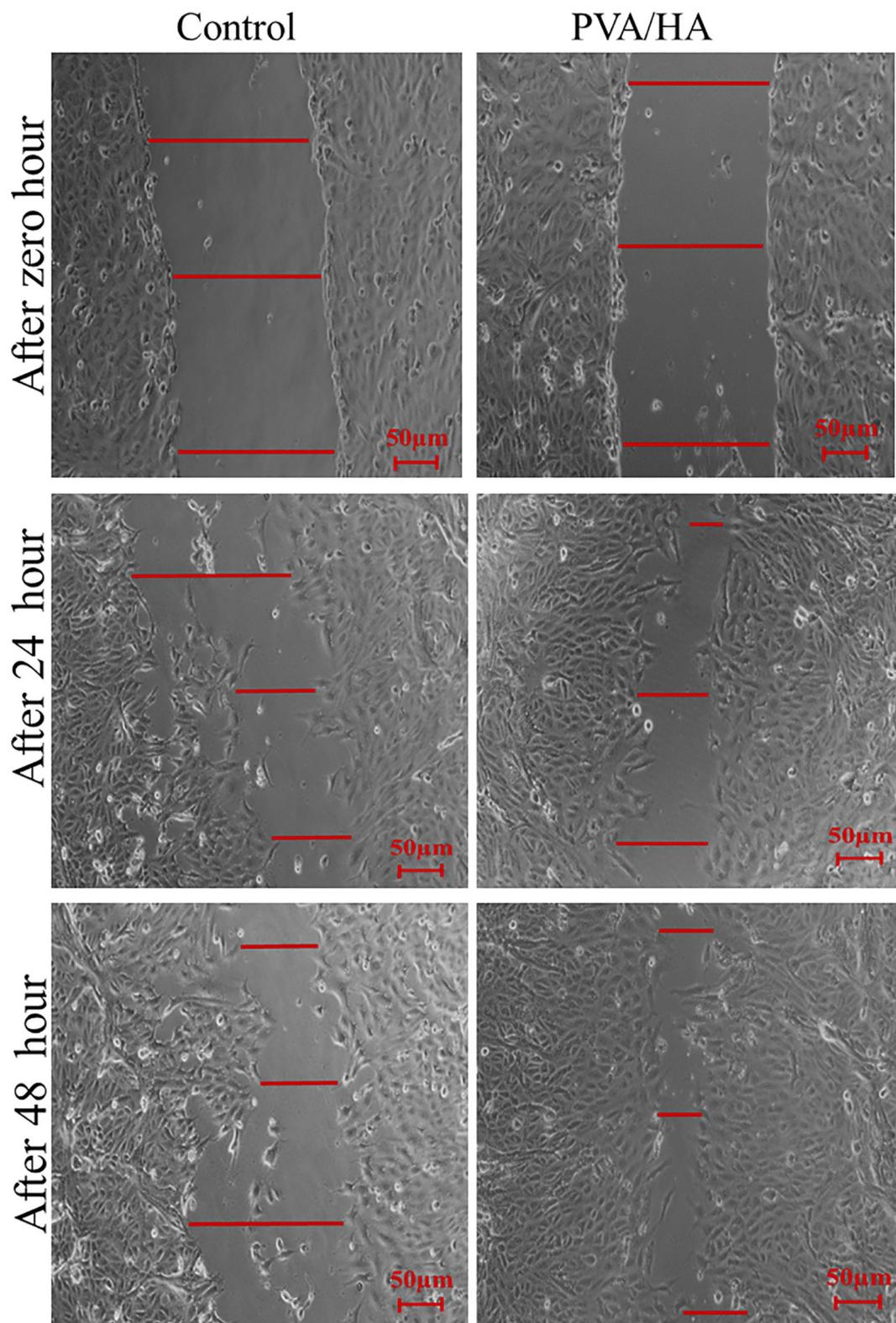


Fig. 5. Wound scratch assay of PVA/HA nanofibers scaffolds using NFs concentrations 1.5 (mg/mL) after 0, 24, and 48 h of incubation time. Adapted from Hussein et al. [93], with permission from Elsevier.

impregnated by immersion had less burst effect than the membranes impregnated by scCO₂, which caused 95% of the release of NAP was achieved only after 24 h in the case of impregnation with scCO₂ and after 48 h in the case of impregnation in aqueous solution. The degradation tests showed that the release occurred by diffusion of the swollen fibers in solution and not by the degradation of the membrane [48].

7. New perspectives

Electrospinning gained notoriety for the production of materials applied to the biomedical area due to its versatility and simplicity. Wound dressings are the main representative of this category of biomaterials. The technique allows the formation of ultrafine membranes with the

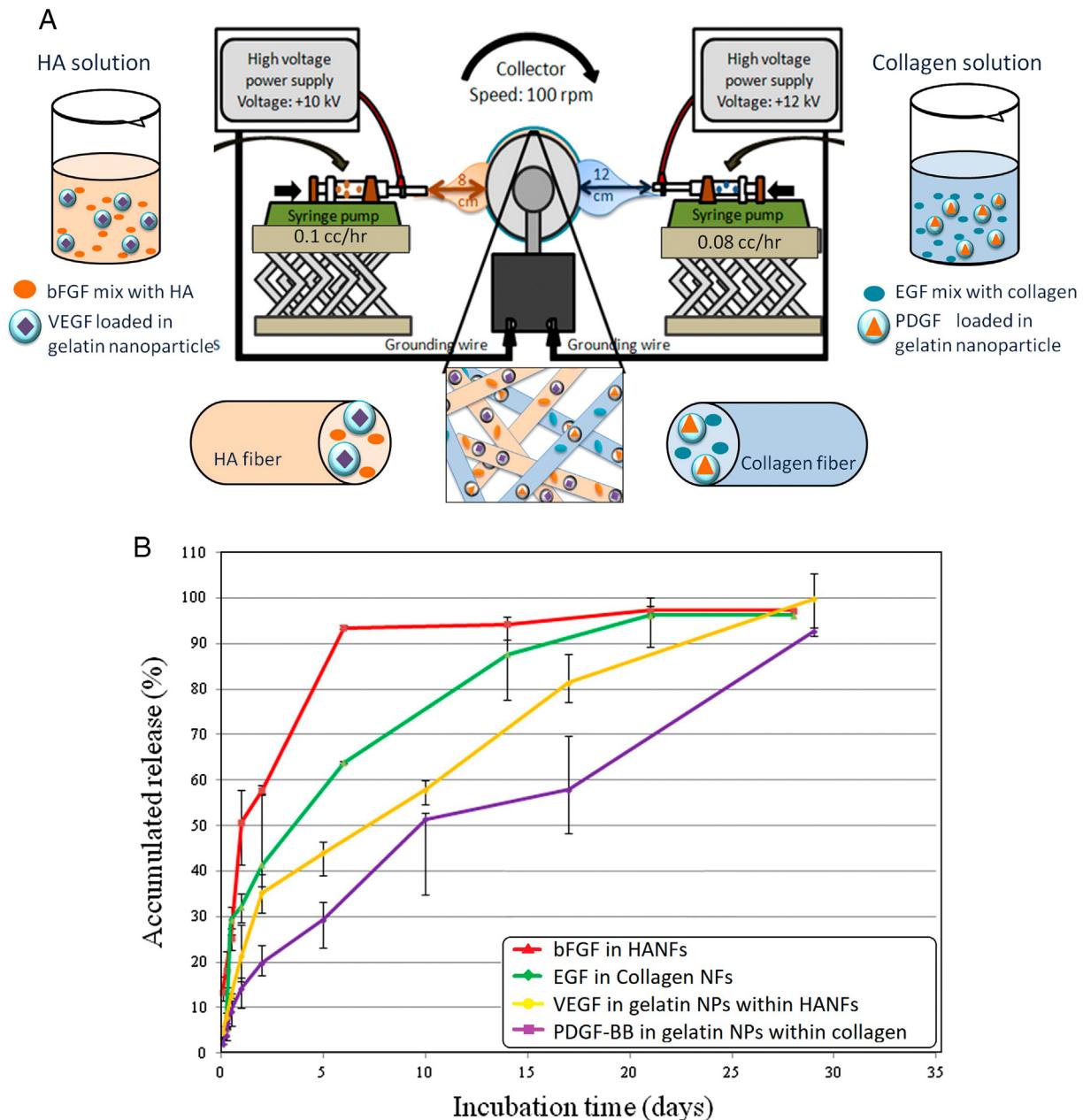


Fig. 6. Illustration of the encapsulation of different growth factors in collagen and HA nanofibers (left) and, release profile of encapsulated different kinds of growth factors: bFGF (▲) in HA nanofibers, EGF (◆) in Col nanofibers, VEGF (●) in GNs and then embedded within HA nanofibers, PDGF-BB (■) in GNs and then embedded within Col nanofibers (right). Adapted from Lai et al. [95], with permission from Elsevier.

ECM-like morphology of the skin. They have a high surface area/volume ratio, a porous structure that improves homeostasis and gas permeability, exudate absorption, adhesion, migration, and cell proliferation.

In line with these characteristics of the technique, researchers have found in hyaluronic acid the potential to combine its properties explored since its discovery with electrospinning peculiarities. HA has several essential characteristics for medical applications. However, its emphasis on dressings production is mainly due to its natural presence ECM and its involvement in the stages of inflammation and proliferation in the wound healing process.

Working with HA at the nanoscale is still a present challenge, especially in nanofibers' manufacture, as their rheological properties, such as high viscosity even at low concentrations, are unfavorable to the process. Although there are many strategies for nanofibers' production, electrospinning is the simplest and most cost-effective method.

However, it is necessary to have good strategies to achieve a homogeneous HA nanofiber mesh with an acceptable yield.

Blow-assisted electrospinning is still the best option for HA electrospinning, as it manages to break the barriers of high viscosity and high surface tension and allows to produce HA in the most varied ways, whether with or without modification of the surface, with or without the use of organic solvents and additives. On the other hand, the conventional method requires great caution and knowledge of the peculiarities of the electrospinning system.

The big bet to achieve a stable process for electrospinning of HA is coaxial and/or emulsion electrospinning. It allows the incorporation of bioactive substances that enhance their applicability in an effective and controllable way. The great challenge of electrospinning is still large-scale production due to its low production rates. On the other hand, portable electrospinning equipment already exists, which allows

the production of personalized dressings according to the type of wound. Brako et al. (2018) proposed a low-cost portable electrospinning device built with accessible components available on the market [96].

Another perspective that has been gaining ground in recent research is combining 3D printing and electrospinning techniques. They allow 3D constructions that reproduce in more detail the structure and properties of native skin ECM, increasing cell proliferation. Such properties were well presented in the research carried out by De Mori et al. (2018) that reported composite hydrogels' fabrication by 3D printing and electrospinning for tissue engineering [97].

8. Conclusion

Electrospinning is an emerging technique that allows the production of high-performance dressings and makes it possible to obtain structures capable of imitating ECM's native structure, which favors the healing process. HA is a glycosaminoglycan easily found in connective, neural, and epithelial tissues and the main component of ECM, which allows materials derived from this biopolymer to be bioreversible, inhibit the formation of scars and promote angiogenesis. The electrospinning of HA is still a challenge due to the rheological properties of its solution. Therefore, several strategies have been adopted over the years to enable the process of producing electrospinnable HA dressings that so far are promising and have been evidenced by *in vitro* and *in vivo* studies. The modification of the electrospinning process is already a reality, and the use of core-shell systems is currently preferred because in addition to allowing electrospinning of the HA, it also allows the functionalization of surfaces and the transport of bioactive products effectively.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements

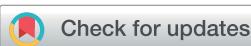
The authors thank CNPq (140567/2019-4) and CAPES for financial support. They also thank the Faculty of Chemical Engineering at the University of Campinas.

References

- [1] R. Uppal, G.N. Ramaswamy, C. Arnold, R. Goodband, Y. Wang, Hyaluronic acid nanofiber wound dressing-production, characterization, and *in vivo* behavior, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 97B (2011) 20–29, <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31776>.
- [2] W. Zhong, M.M.Q. Xing, H.I. Maibach, Nanofibrous materials for wound care, *Cutan. Ocul. Toxicol.* 29 (2010) 143–152, <https://doi.org/10.3109/15569527.2010.489307>.
- [3] A. Fahmy, E.A. Kamoun, R. El-Eisawy, E.M. El-Fakharany, T.H. Taha, B.K. El-Damhougy, F. Abdelhai, Poly(vinyl alcohol)-hyaluronic acid membranes for wound dressing applications: synthesis and *in vitro* bio-evaluations, *J. Braz. Chem. Soc.* 26 (2015) 1466–1474, <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150115>.
- [4] A. Memic, T. Abudula, H.S. Mohammed, K. Joshi Navare, T. Colombari, S.A. Bencherif, Latest progress in electrospun nanofibers for wound healing applications, *ACS Appl. Bio Mater.* 2 (2019) 952–969, <https://doi.org/10.1021/acsabm.8b00637>.
- [5] P.S. Murphy, G.R.D. Evans, Advances in wound healing: a review of current wound healing products, *Plast. Surg. Int.* 2012 (2012) 1–8, <https://doi.org/10.1155/2012/190436>.
- [6] S. Fahimirad, F. Ajalloueian, Naturally-derived electrospun wound dressings for target delivery of bio-active agents, *Int. J. Pharm.* 566 (2019) 307–328, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.05.053>.
- [7] B. Vigani, S. Rossi, G. Sandri, M.C. Bonferoni, C.M. Caramella, F. Ferrari, Hyaluronic acid and chitosan-based nanosystems: a new dressing generation for wound care, *Expert Opin. Drug Deliv.* 16 (2019) 715–740, <https://doi.org/10.1080/17425247.2019.1634051>.
- [8] A. D'Agostino, A. Stellavato, L. Corsuto, P. Diana, R. Filosa, A. La Gatta, M. De Rosa, C. Schiraldi, Is molecular size a discriminating factor in hyaluronan interaction with human cells? *Carbohydr. Polym.* 157 (2017) 21–30, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.125>.
- [9] M.G. Neuman, R.M. Nanau, L. Oruña-Sánchez, G. Coto, Hyaluronic acid and wound healing, *J. Pharm. Pharm. Sci.* 18 (2015) 53, <https://doi.org/10.18433/J3K89D>.
- [10] P. Snetkov, S. Morozkina, M. Uspenskaya, R. Olekhovich, Hyaluronan-based nanofibers: fabrication, characterization and application, *Polymers (Basel)* 11 (2019) 2036, <https://doi.org/10.3390/polym11122036>.
- [11] A.-T. Iacob, M. Drăgan, O.-M. Ionescu, L. Profire, A. Ficai, E. Andronescu, L.G. Confederat, D. Lupăscu, An overview of biopolymeric electrospun nanofibers based on polysaccharides for wound healing management, *Pharmaceutics.* 12 (2020) 983, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12100983>.
- [12] W. Zhao, W. Liu, J. Li, X. Lin, Y. Wang, Preparation of animal polysaccharides nanofibers by electrospinning and their potential biomedical applications, *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 103 (2015) 807–818, <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35187>.
- [13] J. Růžičková, V. Velebný, J. Novák, K. Szuszkievicz, K. Knotková, M. Foglarová, M. Pokorný, Hyaluronic acid based nanofibers for wound dressing and drug delivery carriers, in: *Intracel. Deliv. II*, 2014: pp. 417–433. doi:https://doi.org/10.1007/978-94-017-8896-0_20.
- [14] L.H. Chen, J.F. Xue, Z.Y. Zheng, M. Shuhaidi, H.E. Thu, Z. Hussain, Hyaluronic acid, an efficient biomacromolecule for treatment of inflammatory skin and joint diseases: a review of recent developments and critical appraisal of preclinical and clinical investigations, *Int. J. Biol. Macromol.* 116 (2018) 572–584, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.068>.
- [15] B. Balusamy, A. Senthizhan, T. Uyar, *Electrospun Nanofibrous Materials for Wound Healing Applications*, in: *Electrospun Mater.*, Elsevier Ltd., *Tissue Eng. Biomed. Appl. Res. Des. Commer.*, 2017 147–177, <https://doi.org/10.1016/B978-0-8-101022-8.00012-0>.
- [16] G.S. Selders, A.E. Fetz, C.J. Gehrmann, G.L. Bowlin, *Electrospun Systems for Drug Delivery*, in: *Electrospun Mater.*, Elsevier Ltd., *Tissue Eng. Biomed. Appl. Res. Des. Commer.*, 2017 115–146, <https://doi.org/10.1016/B978-0-8-101022-8.00011-9>.
- [17] E.A.G. Kalaf, K.R. Hixon, P.U. Kadakia, A.J. Dunn, S.A. Sell, *Electrospun Biomaterials for Dermal Regeneration*, in: *Electrospun Mater.*, Elsevier Ltd., *Tissue Eng. Biomed. Appl. Res. Des. Commer.*, 2017 179–232, <https://doi.org/10.1016/B978-0-8-101022-8.00005-3>.
- [18] M. Abrigo, S.L. McArthur, P. Kingshott, *Electrospun nanofibers as dressings for chronic wound care: advances, challenges, and future prospects*, *Macromol. Biosci.* 14 (2014) 772–792, <https://doi.org/10.1002/mabi.201300561>.
- [19] S.P. Miguel, D.R. Figueira, D. Simões, M.P. Ribeiro, P. Coutinho, P. Ferreira, I.J. Correia, *Electrospun polymeric nanofibres as wound dressings: a review*, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 169 (2018) 60–71, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.05.011>.
- [20] K.C. Castro, J.M. Costa, L.H.I. Mei, *Advances in Electrospinning Technique in the Manufacturing Process of Nanofibrous Materials*, in: *Electrospun Mater.*, Wiley, *Their Allied Appl.*, 2020 379–399, <https://doi.org/10.1002/9781119655039.ch13>.
- [21] K.Y. Lee, J. Jeong, Y.O. Kang, S.J. Lee, W.H. Park, *Electrospinning of polysaccharides for regenerative medicine*, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61 (2009) 1020–1032, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.07.006>.
- [22] Z. Hadisi, M. Farokhi, H.R. Bakhshehi-Rad, M. Jahanshahi, S. Hasanzpour, E. Pagan, A. Dolatshahi-Pirouz, Y.S. Zhang, S.C. Kundu, M. Alkbari, *Hyaluronic acid (HA)-based silk fibroin/zinc oxide core-shell electrospun dressing for burn wound management*, *Macromol. Biosci.* 20 (2020) 1900328, <https://doi.org/10.1002/mabi.201900328>.
- [23] F. Croisier, G. Atanasova, Y. Poumay, C. Jérôme, *Polysaccharide-coated PCL nanofibers for wound dressing applications*, *Adv. Healthc. Mater.* 3 (2014) 2032–2039, <https://doi.org/10.1002/adhm.201400380>.
- [24] A. Bjelle, T. Andersson, K. Granath, *Molecular weight distribution of hyaluronic acid of human synovial fluid in rheumatic diseases*, *Scand. J. Rheumatol.* 12 (1983) 133–138, <https://doi.org/10.3109/03009748309102899>.
- [25] M.K. Cowman, H.-G. Lee, K.L. Schwertfeger, J.B. McCarthy, E.A. Turley, *The content and size of hyaluronan in biological fluids and tissues*, *Front. Immunol.* 6 (2015) 1–8, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00261>.
- [26] U.B.G. Laurent, K.A. Granath, *The molecular weight of hyaluronate in the aqueous humour and vitreous body of rabbit and cattle eyes*, *Exp. Eye Res.* 36 (1983) 481–492, [https://doi.org/10.1016/0014-4835\(83\)90042-8](https://doi.org/10.1016/0014-4835(83)90042-8).
- [27] H.G. Lee, M.K. Cowman, *An Agarose gel electrophoretic method for analysis of hyaluronan molecular weight distribution*, *Anal. Biochem.* 219 (1994) 278–287, <https://doi.org/10.1006/abio.1994.1267>.
- [28] H. Yuan, R. Amin, X. Ye, C.A. de la Motte, M.K. Cowman, *Determination of hyaluronan molecular mass distribution in human breast milk*, *Anal. Biochem.* 474 (2015) 78–88, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.12.020>.
- [29] L.B. Dahl, I.M.S. Dahl, A.-L. Børresen, *The molecular weight of sodium hyaluronate in amniotic fluid*, *Biochem. Med. Metab. Biol.* 35 (1986) 219–226, [https://doi.org/10.1016/0885-4505\(86\)90077-0](https://doi.org/10.1016/0885-4505(86)90077-0).
- [30] A. Tengblad, U.B.G. Laurent, K. Lilja, R.N.P. Cahill, A. Engström-Laurent, J.R.R. Fraser, H.E. Hansson, T.C. Laurent, *Concentration and relative molecular mass of hyaluronate in lymph and blood*, *Biochem. J.* 236 (1986) 521–525, <https://doi.org/10.1042/bj2360521>.
- [31] Y. Sasaki, M. Uzuki, K. Nohmi, H. Kitagawa, A. Kamataki, M. Komagamine, K. Murakami, T. Sawai, *Quantitative measurement of serum hyaluronic acid molecular weight in rheumatoid arthritis patients and the role of hyaluronidase*, *Int. J. Rheum. Dis.* 14 (2011) 313–319, <https://doi.org/10.1111/j.1756-185X.2011.01683.x>.
- [32] M.W.A. Holmes, M.T. Bayliss, H. Muir, *Hyaluronic acid in human articular cartilage. Age-related changes in content and size*, *Biochem. J.* 250 (1988) 435–441, <https://doi.org/10.1042/bj2500435>.
- [33] R. Tammi, U.M. Ågren, A.-L. Tuukkanen, M. Tammi, *Hyaluronan metabolism in skin*, *Prog. Histochem. Cytochem.* 29 (1994) [https://doi.org/10.1016/S0079-6336\(11\)80023-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6336(11)80023-9) III–77.
- [34] J.M. Cypherd, C.S. Trempus, S. Garantziotis, *Size matters: molecular weight specificity of hyaluronan effects in cell biology*, *Int. J. Cell Biol.* 2015 (2015) 1–8, <https://doi.org/10.1155/2015/563818>.

- [35] R. Stern, A.A. Asari, K.N. Sugahara, Hyaluronan fragments: an information-rich system, *Eur. J. Cell Biol.* 85 (2006) 699–715, <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2006.05.009>.
- [36] L. Li, Y. Qian, C. Jiang, Y. Lv, W. Liu, L. Zhong, K. Cai, S. Li, L. Yang, The use of hyaluronan to regulate protein adsorption and cell infiltration in nanofibrous scaffolds, *Biomaterials*. 33 (2012) 3428–3445, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.01.038>.
- [37] Y. Zhao, Z. Fan, M. Shen, X. Shi, Hyaluronic acid-functionalized electrospun polyvinyl alcohol/poly(ethyleneimine) nanofibers for cancer cell capture applications, *Adv. Mater. Interfaces* 2 (2015) 1500256, <https://doi.org/10.1002/admi.201500256>.
- [38] K. Ghazi, U. Deng-Pichon, J.-M. Warnez, P. Rat, Hyaluronan fragments improve wound healing on *in vitro* cutaneous model through P2X7 purinoreceptor basal activation: role of molecular weight, *PLoS One* 7 (2012), e48351, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048351>.
- [39] S. Gariboldi, M. Palazzo, L. Zanobbio, S. Selleri, M. Sommariva, L. Sfondrini, S. Cavicchini, A. Balsari, C. Rumio, Low molecular weight hyaluronic acid increases the self-defense of skin epithelium by induction of β -defensin 2 via TLR2 and TLR4, *J. Immunol.* 181 (2008) 2103–2110, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.3.2103>.
- [40] A. D'Agostino, A. Stellavato, T. Busico, A. Papa, V. Tirino, G. Papaccio, A. La Gatta, M. De Rosa, C. Schiraldi, In vitro analysis of the effects on wound healing of high- and low-molecular weight chains of hyaluronan and their hybrid H-HA/L-HA complexes, *BMC Cell Biol.* 16 (2015) 19, <https://doi.org/10.1186/s12860-015-0064-6>.
- [41] C. Toig, P. Telmer, E. Turley, Specific sizes of hyaluronan oligosaccharides stimulate fibroblast migration and excisional wound repair, *PLoS One* 9 (2014), e88479, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088479>.
- [42] C. Yang, M. Cao, H. Liu, Y. He, J. Xu, Y. Du, Y. Liu, W. Wang, L. Cui, J. Hu, F. Gao, The high and low molecular weight forms of hyaluronan have distinct effects on CD44 clustering, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 43094–43107, <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.349209>.
- [43] K. Valachová, M. Baňasová, D. Topoľská, V. Sasinková, I. Juránek, M.N. Collins, L. Šoltés, Influence of tiopronin, captopril and levamisole therapeutics on the oxidative degradation of hyaluronan, *Carbohydr. Polym.* 134 (2015) 516–523, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.029>.
- [44] K. Valachová, D. Topoľská, R. Mendichi, M.N. Collins, V. Sasinková, L. Šoltés, Hydrogen peroxide generation by the Weissberger biogenic oxidative system during hyaluronan degradation, *Carbohydr. Polym.* 148 (2016) 189–193, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.063>.
- [45] K. Valachová, K. Svik, C. Biro, M.N. Collins, R. Juncik, L. Ondruska, L. Soltes, Impact of ergothioneine, herycynine, and histidine on oxidative degradation of hyaluronan and wound healing, *Polymers (Basel)* 13 (2020) 95, <https://doi.org/10.3390/polym13010095>.
- [46] S. Yao, X. Wang, X. Liu, R. Wang, C. Deng, F. Cui, Effects of ambient relative humidity and solvent properties on the electrospinning of pure hyaluronic acid nanofibers, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 13 (2013) 4752–4758, <https://doi.org/10.1166/jnn.2013.7197>.
- [47] M.A. Selyanin, P.Y. Boykov, V.N. Khabarov, F. Polyak, Hyaluronic Acid: Preparation, Properties, Application in Biology and Medicine, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2015 <https://doi.org/10.1002/9781118695920>.
- [48] M. Séon-Lutz, A.-C. Couffin, S. Vignoud, G. Schlatter, A. Hébraud, Electrospinning in water and *in situ* crosslinking of hyaluronic acid/cyclodextrin nanofibers: towards wound dressing with controlled drug release, *Carbohydr. Polym.* 207 (2019) 276–287, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.085>.
- [49] E. Pabjańczyk-Włazło, P. Król, I. Krucińska, M. Chrzanowski, M. Puchalski, G. Szparaga, S. Kadłubowski, M. Boguń, Bioactive nanofibrous structures based on hyaluronic acid, *Adv. Polym. Technol.* 37 (2018) 1929–1940, <https://doi.org/10.1002/adv.21851>.
- [50] S. Xu, J. Li, A. He, W. Liu, X. Jiang, J. Zheng, C.C. Han, B.S. Hsiao, B. Chu, D. Fang, Chemical crosslinking and biophysical properties of electrospun hyaluronic acid based ultra-thin fibrous membranes, *Polymer (Guildf.)* 50 (2009) 3762–3769, <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2009.06.009>.
- [51] F.-Y. Hsu, Y.-S. Hung, H.-M. Liou, C.-H. Shen, Electrospun hyaluronate–collagen nanofibrous matrix and the effects of varying the concentration of hyaluronate on the characteristics of foreskin fibroblast cells, *Acta Biomater.* 6 (2010) 2140–2147, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.12.023>.
- [52] Z. Wang, Y. Qian, L. Li, L. Pan, L.W. Njunge, L. Dong, L. Yang, Evaluation of emulsion electrospun polycaprolactone/hyaluronan/epidermal growth factor nanofibrous scaffolds for wound healing, *J. Biomater. Appl.* 30 (2016) 686–698, <https://doi.org/10.1177/0885328215586907>.
- [53] D.R. Figueira, S.P. Miguel, K.D. de Sá, I.J. Correia, Production and characterization of polycaprolactone–hyaluronic acid/chitosan–zein electrospun bilayer nanofibrous membrane for tissue regeneration, *Int. J. Biol. Macromol.* 93 (2016) 1100–1110, <https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2016.09.080>.
- [54] Y. Liu, G. Ma, D. Fang, J. Xu, H. Zhang, J. Nie, Effects of solution properties and electric field on the electrospinning of hyaluronic acid, *Carbohydr. Polym.* 83 (2011) 1011–1015, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.08.061>.
- [55] S.H. Tan, R. Inai, M. Kotaki, S. Ramakrishna, Systematic parameter study for ultra-fine fiber fabrication via electrospinning process, *Polymer (Guildf.)* 46 (2005) 6128–6134, <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2005.05.068>.
- [56] E. Pabjańczyk-Włazło, I. Krucińska, M. Chrzanowski, G. Szparaga, A. Chaberska, B. Kolesińska, A. Komisarczyk, M. Boguń, Fabrication of pure electrospun materials from hyaluronic acid, *Fibres Text. East. Eur.* 25 (2017) 45–52, <https://doi.org/10.5604/10.3001.0010.1688>.
- [57] M.N. Collins, C. Birkinshaw, Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering – a review, *Carbohydr. Polym.* 92 (2013) 1262–1279, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.028>.
- [58] M. Movahedi, A. Asefnejad, M. Rafienia, M.T. Khorasani, Potential of novel electrospun core-shell structured polyurethane/starch (hyaluronic acid) nanofibers for skin tissue engineering: *in vitro* and *in vivo* evaluation, *Int. J. Biol. Macromol.* 146 (2020) 627–637, <https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2019.11.233>.
- [59] R.L. Fischer, M.G. McCoy, S.A. Grant, Electrospinning collagen and hyaluronic acid nanofiber meshes, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 23 (2012) 1645–1654, <https://doi.org/10.1007/s10856-012-4641-3>.
- [60] M.J. Qazi, S.J. Schlegel, E.H.G. Backus, M. Bonn, D. Bonn, N. Shahidzadeh, Dynamic surface tension of surfactants in the presence of high salt concentrations, *Langmuir* 36 (2020) 7956–7964, <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c01211>.
- [61] L. Vítková, L. Musilová, E. Achbergerová, A. Minářík, P. Smolka, E. Wrzecionko, A. Mráček, Electrospinning of hyaluronan using polymer coelectrospinning and intermediate solvent, *Polymers (Basel)* 11 (2019) 1517, <https://doi.org/10.3390/polym11091517>.
- [62] M.R. El-Assar, O.M. Ibrahim, M.M.G. Fouad, N.G. El-Beheri, M.M. Agwa, Wound healing of nanofiber comprising Polygalacturonic/hyaluronic acid embedded silver nanoparticles: *in-vitro* and *in-vivo* studies, *Carbohydr. Polym.* 238 (2020) 116175, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116175>.
- [63] C. Feng, C. Liu, S. Liu, Z. Wang, K. Yu, X. Zeng, Electrospun nanofibers with core–shell structure for treatment of bladder regeneration, *Tissue Eng. Part A* 25 (2019) 1289–1299, <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2018.0255>.
- [64] S.P. Miguel, D. Simões, A.F. Moreira, R.S. Sequeira, I.J. Correia, Production and characterization of electrospun silk fibroin based asymmetric membranes for wound dressing applications, *Int. J. Biol. Macromol.* 121 (2019) 524–535, <https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2018.10.041>.
- [65] A.M. Abdel-Mohsen, D. Pavláňák, M. Čileková, P. Lepcio, R.M. Abdel-Rahman, J. Jančák, Electrospinning of hyaluronan/polyvinyl alcohol in presence of *in-situ* silver nanoparticles: preparation and characterization, *Int. J. Biol. Macromol.* 139 (2019) 730–739, <https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2019.07.205>.
- [66] K.C. de Castro, J. Burga-Sánchez, M.G. Nogueira Campos, L.H.I. Mei, Water-based synthesis of photocrosslinked hyaluronic acid/polyvinyl alcohol membranes via electrospinning, *RSC Adv.* 10 (2020) 31271–31279, <https://doi.org/10.1039/DORA04950F>.
- [67] G. Chen, J. Guo, J. Nie, G. Ma, Preparation, characterization, and application of PEO/HA core shell nanofibers based on electric field induced phase separation during electrospinning, *Polymer (Guildf.)* 83 (2016) 12–19, <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2015.12.002>.
- [68] B. Vigani, S. Rossi, G. Milanesi, M. Bonferoni, G. Sandri, G. Bruni, F. Ferrari, Electrospun alginate fibers: mixing of two different poly(ethylene oxide) grades to improve Fiber functional properties, *Nanomaterials*. 8 (2018) 971, <https://doi.org/10.3390/nano8120971>.
- [69] B. Vigani, S. Rossi, G. Sandri, M.C. Bonferoni, G. Milanesi, G. Bruni, F. Ferrari, Coated electrospun alginate-containing fibers as novel delivery systems for regenerative purposes, *Int. J. Nanomedicine* 13 (2018) 6531–6550, <https://doi.org/10.2147/IJN.S175069>.
- [70] H. Jiang, L. Wang, K. Zhu, Coaxial electrospinning for encapsulation and controlled release of fragile water-soluble bioactive agents, *J. Control. Release* 193 (2014) 296–303, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.025>.
- [71] D. Li, Y. Xia, Direct fabrication of composite and ceramic hollow nanofibers by electrospinning, *Nano Lett.* 4 (2004) 933–938, <https://doi.org/10.1021/nl049590f>.
- [72] F. Li, Y. Zhao, Y. Song, Core-Shell Nanofibers: Nano Channel and Capsule by Coaxial Electrospinning, in: Intech (Ed.), *Nanofibers*, InTech, Croatia, 2010: p. 438. doi: <https://doi.org/10.5772/8166>.
- [73] Z. Li, H. Kang, N. Che, Z. Liu, P. Li, W. Li, C. Zhang, C. Cao, R. Liu, Y. Huang, Controlled release of liposome-encapsulated naproxen from core-sheath electrospun nanofibers, *Carbohydr. Polym.* 111 (2014) 18–24, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.04.017>.
- [74] I.L. Kim, S. Khetan, B.M. Baker, C.S. Chen, J.A. Burdick, Fibrous hyaluronic acid hydrogels that direct MSC chondrogenesis through mechanical and adhesive cues, *Biomaterials*. 34 (2013) 5571–5580, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.04.004>.
- [75] F. Zamboni, E. Ryan, M. Culebras, M.N. Collins, Labile crosslinked hyaluronic acid via urethane formation using bis(β -isocyanatoethyl) disulphide with tuneable physico-chemical and immunomodulatory properties, *Carbohydr. Polym.* 245 (2020) 116501, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116501>.
- [76] M.N. Collins, C. Birkinshaw, Hyaluronic acid solutions-a processing method for efficient chemical modification, *J. Appl. Polym. Sci.* 130 (2013) 145–152, <https://doi.org/10.1002/app.39145>.
- [77] S. Su, T. Bedir, C. Kalkandelen, A. Ozan Başar, H. Turkoğlu Şaşmazel, C. Bulent Ustundag, M. Sengör, O. Gunduz, Coaxial and emulsion electrospinning of extracted hyaluronic acid and keratin based nanofibers for wound healing applications, *Eur. Polym. J.* 142 (2021) 110158, <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110158>.
- [78] R. Scaffaro, F. Lopresti, L. Botta, Preparation, characterization and hydrolytic degradation of PLA/PCL co-mingled nanofibrous mats prepared via dual-jet electrospinning, *Eur. Polym. J.* 96 (2017) 266–277, <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.09.016>.
- [79] Z. Tan, H. Wang, X. Gao, T. Liu, Y. Tan, Composite vascular grafts with high cell infiltration by co-electrospinning, *Mater. Sci. Eng. C* 67 (2016) 369–377, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.067>.
- [80] O. Nakhaei, N. Shahtahmassebi, M. Rezaee Roknabadi, M. Behdani, Co-electrospinning fabrication and study of structural and electromagnetic interference-shielding effectiveness of TiO₂/SiO₂ core–shell nanofibers, *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.* 122 (2016) 537, <https://doi.org/10.1007/s00339-016-0072-1>.

- [81] A.V. Bazilevsky, A.L. Yarin, C.M. Megaridis, Co-electrospinning of core–shell fibers using a single-nozzle technique, *Langmuir* 23 (2007) 2311–2314, <https://doi.org/10.1021/la063194q>.
- [82] I.C. Um, D. Fang, B.S. Hsiao, A. Okamoto, B. Chu, Electro-spinning and electro-blowing of hyaluronic acid, *Biomacromolecules*. 5 (2004) 1428–1436, <https://doi.org/10.1021/bm034539b>.
- [83] X. Wang, I.C. Um, D. Fang, A. Okamoto, B.S. Hsiao, B. Chu, Formation of water-resistant hyaluronic acid nanofibers by blowing-assisted electro-spinning and non-toxic post treatments, *Polymer (Guildf.)*. 46 (2005) 4853–4867, <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2005.03.058>.
- [84] M. Arnal-Pastor, C. Martínez Ramos, M. Pérez Garnés, M. Monleón Pradas, A. Vallés Lluch, Electrospun adherent–antiadherent bilayered membranes based on cross-linked hyaluronic acid for advanced tissue engineering applications, *Mater. Sci. Eng. C*. 33 (2013) 4086–4093, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.05.058>.
- [85] A. Chanda, J. Adhikari, A. Ghosh, S.R. Chowdhury, S. Thomas, P. Datta, P. Saha, Electrospun chitosan/polycaprolactone-hyaluronic acid bilayered scaffold for potential wound healing applications, *Int. J. Biol. Macromol.* 116 (2018) 774–785, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.099>.
- [86] V.A. Petrova, D.D. Chernyakov, D.N. Poshina, I.V. Gofman, D.P. Romanov, A.I. Mishanin, A.S. Golovkin, Y.A. Skorik, Electrospun bilayer chitosan/hyaluronan material and its compatibility with mesenchymal stem cells, *Materials (Basel)* 12 (2016) (2019)<https://doi.org/10.3390/ma12122016>.
- [87] C. Chung, J.A. Burdick, Influence of three-dimensional hyaluronic acid microenvironments on mesenchymal stem cell chondrogenesis, *Tissue Eng. Part A*. 15 (2009) 243–254, <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0067>.
- [88] M. Litwiniuk, A. Krejner, T. Grzela, Hyaluronic acid in inflammation and tissue regeneration, *Wounds*. 28 (2016) 78–88, <https://doi.org/10.1016/j.system.2012.10.017>.
- [89] E.A. Turley, P.W. Noble, L.Y.W. Bourguignon, Signaling properties of hyaluronan receptors, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 4589–4592, <https://doi.org/10.1074/jbc.R100038200>.
- [90] Y.C. Shin, D.-M. Shin, E.J. Lee, J.H. Lee, J.E. Kim, S.H. Song, D.-Y. Hwang, J.J. Lee, B. Kim, D. Lim, S.-H. Hyon, Y.-J. Lim, D.-W. Han, Hyaluronic acid/PLGA core/shell fiber matrices loaded with EGCG beneficial to diabetic wound healing, *Adv. Healthc. Mater.* 5 (2016) 3035–3045, <https://doi.org/10.1002/adhm.201600658>.
- [91] J. Rnjak-Kovacina, A.S. Weiss, Increasing the pore size of electrospun scaffolds, *Tissue Eng. Part B Rev.* 17 (2011) 365–372, <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2011.0235>.
- [92] Y. Qian, L. Li, C. Jiang, W. Xu, Y. Lv, L. Zhong, K. Cai, L. Yang, The effect of hyaluronan on the motility of skin dermal fibroblasts in nanofibrous scaffolds, *Int. J. Biol. Macromol.* 79 (2015) 133–143, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.04.059>.
- [93] Y. Hussein, E.M. El-Fakhary, E.A. Kamoun, S.A. Loufty, R. Amin, T.H. Taha, S.A. Salim, M. Amer, Electrospun PVA/hyaluronic acid/L-arginine nanofibers for wound healing applications: Nanofibers optimization and in vitro bioevaluation, *Int. J. Biol. Macromol.* 164 (2020) 667–676, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.126>.
- [94] A. Eskandarinia, A. Kefayat, M. Gharakhloo, M. Agheb, D. Khodabakhshi, M. Khorshidi, V. Sheikhmoradi, M. Rafienia, H. Salehi, A propolis enriched polyurethane-hyaluronic acid nanofibrous wound dressing with remarkable antibacterial and wound healing activities, *Int. J. Biol. Macromol.* 149 (2020) 467–476, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.255>.
- [95] H.-J. Lai, C.-H. Kuan, H.-C. Wu, J.-C. Tsai, T.-M. Chen, D.-J. Hsieh, T.-W. Wang, Tailored design of electrospun composite nanofibers with staged release of multiple angiogenic growth factors for chronic wound healing, *Acta Biomater.* 10 (2014) 4156–4166, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.05.001>.
- [96] F. Brako, C. Luo, D.Q.M. Craig, M. Edirisinghe, An inexpensive, portable device for point-of-need generation of silver-nanoparticle doped cellulose acetate nanofibers for advanced wound dressing, *macromol. Mater. Eng.* 303 (2018)<https://doi.org/10.1002/mame.201700586>.
- [97] A. De Mori, M. Peña Fernández, G. Blunn, G. Tozzi, M. Roldo, 3D printing and electrospinning of composite hydrogels for cartilage and bone tissue engineering, *Polymers (Basel)* 10 (2018) 285, <https://doi.org/10.3390/polym10030285>.



Cite this: RSC Adv., 2020, 10, 31271

Water-based synthesis of photocrosslinked hyaluronic acid/polyvinyl alcohol membranes via electrospinning†

Karine Cappuccio de Castro, *^a Jonny Burga-Sánchez, ^b Maria Gabriela Nogueira Campos ^c and Lucia Helena Innocentini Mei ^a

Electrospinning is a versatile and low-cost technique widely used in the manufacture of nanofibrous polymeric membranes applied in different areas, especially in bioengineering. Hyaluronic acid (HA) is a biocompatible natural polymer, but it has rheological characteristics that make the electrospinning process difficult. Thus, its association with another polymer such as poly(vinyl alcohol) (PVA) is an alternative, as PVA has good rheological properties for electrospinning. Based on this, the aim of this work was to produce, by the conventional electrospinning method, cross-linked HA/PVA membranes free from organic solvent with a low degradation rate in PBS 7.4 solution after the photocrosslinking process and without using any organic solvent. The results showed that the electrospinning occurred effectively for all conditions tested, but the best result for complete cross-linking only occurred with 15 and 30% crosslinker, which was evidenced by infrared spectroscopy. The addition of crosslinker favored the stability of the electrospinning jet, especially for 30% crosslinker concentration. The membranes did not show cytotoxicity even after the cross-linking process, which indicates that the material has potential as a drug delivery device.

Received 4th June 2020
Accepted 3rd August 2020

DOI: 10.1039/d0ra04950f
rsc.li/rsc-advances

1. Introduction

Recently, electrospinning has attracted great attention as it is an effective technique to produce nanofibrous membranes for a large variety of applications, especially in the pharmaceutical and medical fields,¹ including wound dressings,² drug delivery systems,³ and tissue engineering scaffolds.⁴

The study of the physical parameters that involve the electrospinning process, such as jet formation, as a function of electrostatic field strength; fluid viscosity; solvent composition, and molecular weight of polymers in solution, is of great importance as they directly impact the characteristics of the formed nanofibers.^{5,6} In addition to physical properties, polymers suitable for electrospinning should also present the desired characteristics for the final application. Specifically, for wound dressings that are utilized predominantly to improve the cicatrization environment in its various stages; the wound

surface must be covered by dressing materials to enhance and speed up the healing process.^{2,7}

Hyaluronic acid (HA) is a natural polysaccharide, commonly found in connective tissues in the body such as vitreous, umbilical cord, joint fluid, presenting very high viscosity and high surface tension in solution, even at very low concentrations.^{2,8} It consists of repeating disaccharide units of D-glucuronic acid and N-acetyl-D-glucosamine. Due to its unique rheological properties, biodegradability, and biocompatibility, HA has been the subject of study for many biomedical applications including drug administration, dermatological applications, wound dressings, and cell growth scaffolds.^{9–11}

Poly(vinyl alcohol) (PVA) is a synthetic polymer and has received great attention from several areas due to its low cost, high hydrophilicity, and excellent chemical resistance. PVA has been widely used for several biological applications due to its advantages such as non-toxic, non-carcinogenic, biodegradable, and bio-adhesive characteristics, as well as easy processing. As a result of the aforementioned features, PVA can simulate natural tissues and thus be accepted in body implants.^{3,12}

The production of nanofibers with HA in its native form by the conventional method of electrospinning is not viable due to the rheological properties of the HA solution. Pure HA nanofibers were reported by Um *et al.* (2004) and by Wang *et al.* (2005) by a blowing-assisted electrospinning process and the maximum reported HA concentration was 2.7%, even after adapting the process.^{11,13} In this work, we were able to

^aFaculty of Chemical Engineering, Department of Materials Engineering and Bioprocess, University of Campinas, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas, SP, Brazil. E-mail: cappuccio.karine@gmail.com

^bPiracicaba Dental School, Physiological Science Department, University of Campinas, Piracicaba, SP, Brazil

^cNanoScience Technology Center, University of Central Florida, Orlando, USA

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: [10.1039/d0ra04950f](https://doi.org/10.1039/d0ra04950f)

electrospinning high molecular weight HA at 2% by conventional electrospinning pathways when associated with PVA, which improves the rheological behavior of HA. In addition, PVA also improved the mechanical properties of HA membranes without altering their good compatibility for biological uses.

Electrospinning of the HA/PVA blend has already been reported with the use of surfactants or solvent mixtures.^{14,15} However, to our knowledge, this is the first study where no organic solvent or surfactant was used to prepare HA and PVA polymeric electrospinnable solutions (only water was used as a solvent), which reduces the toxicity of the final material.

The use of hydrophilic polymers is extremely advisable for making biomedical devices due to their solubility in water as well as the low-toxicity of the system. On the other hand, a highly soluble system will leach very quickly, making it impossible to use effectively when there is a need for contact with body fluids. Therefore the cross-linking process can be an interesting alternative to improve the device's stability and mechanical properties at physiological conditions. As our ultimate goal is to apply the herein prepared membranes as drug carriers for sustained release, we performed a photo-crosslinking step using maleic anhydride as a cross-linking agent.

Given this context, this study demonstrated that it is possible to obtain HA/PVA membranes by the conventional electrospinning technique, using high concentration of high molecular weight HA, and only water as solvent. The electrospinning process was stable and enabled obtaining dressings with desirable properties for applications in the biomedical field as drug carriers. This result has not been consolidated in the literature yet.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Photoinitiator 2-hydroxy-4'-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenone (Irgacure 2959, 98%, $M_w = 224.25 \text{ g mol}^{-1}$ Sigma Aldrich), polyvinyl alcohol (PVA, $M_w \approx 130 \text{ kg mol}^{-1}$, 86.5–89.5 mol% hydrolysis, Vetec), hyaluronic acid sodium salt (HA, cosmetic grade, Symbios, $M_w > 1.6 \text{ MDa}$, D-glucuronic acid ≥45%, bacterial), maleic anhydride (MA, $M_w \approx 98 \text{ g mol}^{-1}$, 98%, Dinâmica), saline phosphate buffer solution (PBS, pH 7.4 ± 0.2, Dinâmica), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Thermo Fisher Scientific Inc., Oregon, USA), calcein AM (component A) (Thermo Fisher Scientific Inc., Oregon, USA), ethidium homodimer-1 (component B) (Thermo Fisher Scientific Inc., Oregon, USA), were used without further purification.

2.2. Solution preparation

PVA (6% w/v) was dissolved in distilled water and stirred on a hot plate shaker at 80 °C for 2 h. HA solution (2% w/v) was prepared in NaCl aqueous solution (1% w/v), and at room temperature. PVA and HA were mixed in the proportion of 75PVA : 25HA, under vigorous agitation and at room temperature. Both MA (5%, 15%, 30% by weight of PVA and HA) and Irgacure 2959 (5% by weight of PVA and HA) were added to the

final solution and mixed under vigorous stirring overnight and at room temperature before the electrospinning process. The proportion of 75PVA/25HA was chosen after preliminary studies once it showed greater stability and yield in the electrospinning process.

2.3. Characterization of solutions

The electrical conductivity of the solutions was determined by an Anilox K0392 conductivity meter at 25 °C. Viscosity was measured in a Haake RheoStress 1 rheometer at 25 °C at a speed of 2 rpm to 5 rpm (keeping the torque at 50%). A measurement sensor system having a cylindrical rotor and pot with diameters of 3.6 mm and 4.8 mm respectively was utilized for PVA/HA membranes without crosslinker (spindle SC4-2) and pot with diameters of 3.2 mm and 9.4 mm respectively was utilized for PVA/HA membranes with a crosslinker (spindle SC4-34). Surface tension was measured by the ring method in a K6 Kruss Tensiometer.

2.4. Electrospinning step

The prepared electrospinning solutions were loaded in a 10 mL glass syringe with a metal needle (0.80 mm diameter inner). The distance between the needle tip and the aluminum-foil wrapped plane collector (10 × 30 cm) was adjusted to 15 cm (solution with and without a cross-linking agent). A high voltage current of 25 kV (DC) was applied between the needle and the collector to initiate the charged polymer solution jet, which was rate-controlled by the syringe pump. This value was fixed for all solutions, but with the addition of the cross-linking agent, it was possible to have a stable process and without changes in morphology with a voltage of 20 kV. The feed rate was fixed at 0.3 mL h⁻¹ and 1 mL h⁻¹ for solutions without a cross-linking agent and with a cross-linking agent, respectively. All experiments were performed at room temperature and relative humidity of 20 to 30%. The prepared nanofibers were carefully collected and stored at room temperature until the final cross-linking step.

2.5. Photocrosslinking reaction

In order to activate the photocrosslinking reaction in the fibers, all membranes were placed in a UV light reactor (BLACK LIGHT 8W F8T5BL – 300 mm at 365 nm – PHILIPS) for 40 min and then stored in a desiccator at room temperature for further analysis.

2.6. Characterization of electrospun hyaluronic acid/poly(vinyl alcohol) membranes

2.6.1. Scanning electron microscopy (SEM). The surface morphology of electrospun HA/PVA membranes was investigated by SEM (model Leo 440i – LEO Electron Microscopy/Oxford). The membranes were coated with 200 Å of gold (Sputter Coater EMITECH, model K450). To determine the diameter distribution, the ImageJ® software was used. The statistical analyzes were made in two SEM photomicrographs for each case.

2.6.2. Swelling behavior. The dried electrospun membranes were initially weighed and immersed into PBS 7.4 for 72 hours at room temperature to attain an equilibrium swelling state. Before measuring the weight of the swollen samples, the excess amounts of waters onto the surface were carefully removed by blotting with filter paper. The swelling ratio was calculated as follows:

$$\% \text{ swelling} = \frac{w_t - w_o}{w_o} \times 100$$

where w_t and w_o are the weights of swollen and dried samples, respectively.

2.6.3. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). Infrared spectra were collected on a spectrometer (Thermo Scientific – Nicolet 6700 – Madison/USA) and recorded from 500 to 4000 cm^{-1} . The occurrence of the esterification reaction (cross-linking) and inter- and intramolecular interactions between the polymers were characterized by the presence of characteristics functional groups of HA and PVA in the membranes.

2.6.4. Cell viability assay. The culture was grown according to the methodology described by Zhao.¹⁶ Once in confluence, immortalized human keratinocytes (HaCaT) were transferred to 24-well cell culture plates, at a concentration of 5×10^4 cells per mL and incubated at 37 °C in 5% CO₂ for 24 h. After the incubation period, the HA/PVA membranes, with different concentrations of cross-linking agent, were suspended inside the wells and remained in the culture medium in contact with the cells for 24 h. Briefly, the wells were washed with PBS (pH 7.4), and then 500 μL of DMEM with 0.5 mg mL^{-1} of MTT sodium salt was added. The plates were incubated for 3 h in MTT reduction. The medium was removed, the cells were washed with PBS again and 200 μL of absolute ethanol was added to each well to dissolve the formazan crystals. Optical density was measured using a microplate reader wavelength of 570 nm.

2.6.5. Live/dead assay. Live and dead cells were stained with calcein-AM (2 μM) and ethidium homodimer-1 (4 μM), respectively. Briefly, cells seeded on membranes (5×10^4 cells per membrane) and cultured for 24 hours were washed with PBS (pH 7.4) and incubated in live/dead solution for 30 minutes in an incubator at room temperature, protected from light. Excess dye was washed off using PBS and the cells were observed under inverted fluorescent microscope Zeiss Axiovert 40 CFL coupled to an AxioCam MEC camera (Carl Zeiss, Germany).

3. Results and discussion

Before defining the PVA/HA best ratio for the electrospinning process, a preliminary study was performed. Three proportions of PVA/HA were studied: 25/75, 50/50, and 75/25. In all proportions, the electrospinning process occurred and nanofibers were formed, but higher proportions of hyaluronic acid left the solution highly viscous, which caused instability in the electrospinning jet and gave rise to beaded nanofibers (Fig. 1). So, the condition chosen for this study was the one that

presented the formation of uniform nanofibers and stability in the electrospinning process (75/25).

Table 1 shows the rheological parameters of the cross-linking solutions with maleic anhydride (MA). These parameters play an important role in the properties of the formed nanofibers. Therefore, we carefully discussed their effects on the morphology of the nanofibrous membranes obtained in this work.

The addition of MA to the polymeric solution improved the electrospinning parameters, decreased the applied voltage, which was initially 25 kV and went to 20 kV, and the solution ejection flow, which went from 0.3 mL h^{-1} to 1 mL h^{-1} , since it reduces the solutions' viscosity and surface tension, facilitating its flow by the formation of a more homogeneous and defect-free system. MA addition also increased the solution electrical conductivity, causing it to have sufficient surface loads for Taylor cone generation, and consequently the formation of a stable jet. However, it was observed that above 30% of cross-linker the solution was no longer electrospinnable, resulting in a phenomenon similar to electrospray, *i.e.*, the deposition of small droplets in the collector.

SEM photomicrographs showed that increasing MA concentration decreased nanofiber diameter (Table 2) and made diameter distribution more homogeneous (Fig. 2). Although the average diameters are not statistically different, it is possible to observe a tendency of fiber diameter reduction for high crosslinker concentration (Table 2). In addition, it was possible to observe a greater interconnection of nanofibers with the increase of crosslinker concentration, suggesting that the membrane's porosity also decreased. However, additional studies on pores size distribution are under investigation.

Séon-Lutz *et al.* (2019) found similar fiber diameters (348 ± 51 nm) in their study with the addition of EDC and NHS as PVA-HA-HPβCD membrane's crosslinker, however with a modified electrospinning system.² In another work developed by Abdel-Mohsen *et al.* (2019) the fiber diameters were relatively smaller for the PVA/hyaluronan–AgNPs (225 nm) system. In this case, two points must be taken into consideration; first, the electrospinning system was modified and the voltage used was 58 kV; second, hyaluronan served only as reducing and stabilizing agent for the formation of silver nanoparticles, which made its concentration low in the composition.¹⁷

In our work, the membranes were submerged in a PBS 7.4 solution to verify their integrity (Fig. 3a), and as observed the 0 and 5% MA membranes dissolved instantly, while the 15 and 30% remained undissolved after 72 hours (Fig. 3b). Fig. 3c shows the swelling behavior of 15 and 30% MA membranes. Interestingly, in the first 12 hours, 15% MA membrane increased 5 times its initial weight ($S\% = 501$), while 30% MA swelled 296%. However, after 24 hours, 30% MA membrane reached around 550% swelling percentage and maintained it until 72 hours. On the other hand, 15% MA started showing a decrease in the swelling rate, and swelled 381% at 72 hours, suggesting weight loss. Therefore, the degree of cross-linking plays an important role in the membranes' water uptake kinetics and stability.

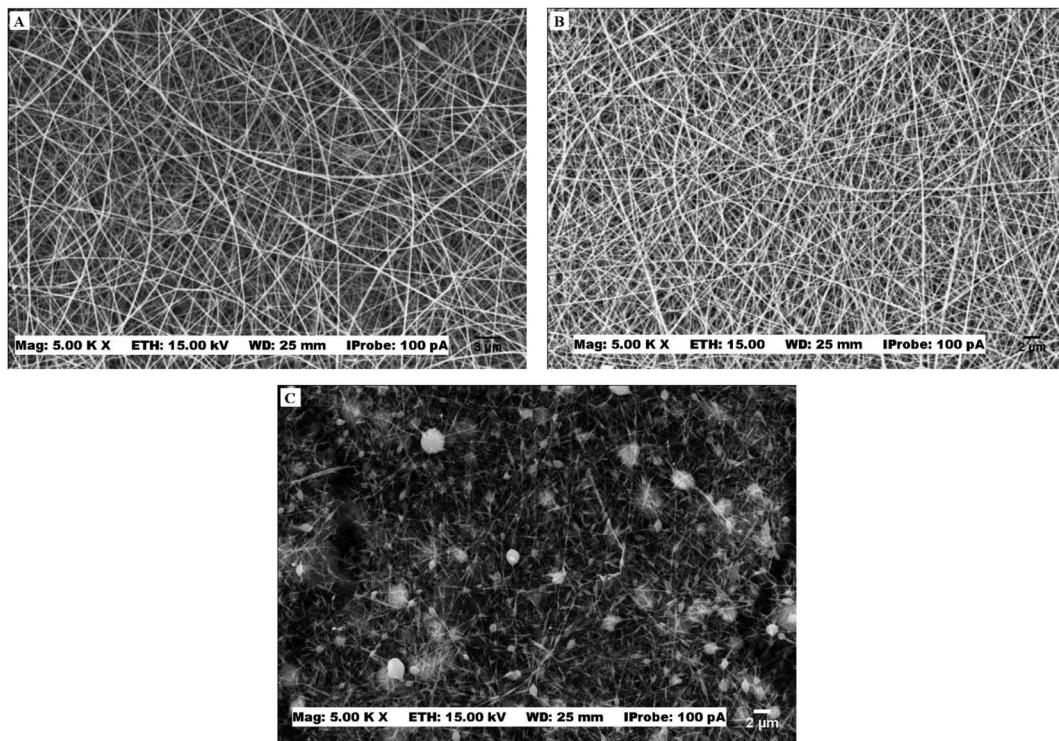


Fig. 1 SEM images of PVA/HA membranes with different proportions (A) 75PVA/25HA, (B) 50PVA/50HA (C) 25PVA/75HA.

This is an important result for the application of membranes to prolonged healing wounds. As observed in the SEM micrographs of Fig. 4, the fibers maintained their integrity; however, there were some points of coalescence and fibers swelling, especially after 72 hours. Séon-Lutz *et al.* (2019) found similar results after 48 h, but in their work, the cross-linking was activated by temperature in the presence of EDC and NHS.²

FTIR analysis (Fig. 5) was important to confirm the cross-linking reaction between PVA and HA chains and the effects of crosslinker concentration, by following the functional groups and the bonds present in the sample.

The spectrum revealed the main bands related to PVA and HA, as expected, since they are the major components of the membranes. The broadband around 3200–3400 cm⁻¹ may be related to the lengthening of the –OH bond and also to the lengthening of the –NH, as the cross-linking process increases with the addition of higher concentrations of MA, the intensity of this band decreases.^{2,18} The weak band close to 2900 cm⁻¹ attributed to

the stretching of the –CH vibration, also changes during the cross-linking process. Characteristic bands between 1600 and 1700 cm⁻¹ are related to bond stretching of amide carbonyl (–C=O) and carboxylic acid (–C=O) groups of the HA.^{19,20} Some characteristic bands near 1434 and 1089 cm⁻¹ for HA are due to amide-type –N–H bending and –C–O–C– bending vibrations, respectively² and the peak near 1420 cm⁻¹ correspond to the stretching of carboxyl bonds.^{21,22} All spectra show PVA characteristic peaks near 2945 cm⁻¹, 1734 cm⁻¹, and 1250 cm⁻¹, relative to alkyl, acetyl, and –C–O groups, respectively.^{23,24} The cross-linking was evidenced by the peak at 1700 cm⁻¹, which is a clear indication of the existence of the –CO–O– (Fig. 5 – Region I) stretching, most evident in both PVA/HA samples with MA concentrations of 15 and 30%.^{18,25,26} Another proof of cross-linking was the change in intensity at the peak of 1091 cm⁻¹, which is also relative to the cross-linking between –OH of the PVA structure and –C=O from MA molecule, giving rise to the –C–O–C– band (Fig. 5 – Region II).^{26,27} Another interesting observation was the disappearance of the peak at 1640 cm⁻¹, related to the –C=C– bond in MA molecule, suggesting that it was also involved in the photocrosslinking reaction.²⁸

Table 1 Rheological parameters of the polymeric solutions of PVA/HA with cross-linking agent

Samples	Superficial tension (mN m ⁻¹)	Electric conductivity (mS cm ⁻¹)	Viscosity (cP)
0% MA	45.3 ± 0.6	4.8 ± 0.3	4263 ± 18
5% MA	41.8 ± 0.8	6.0 ± 0.1	212 ± 1
15% MA	39.3 ± 0.6	10.8 ± 0.2	167 ± 2
30% MA	32.3 ± 0.6	15.3 ± 0.2	124.5 ± 0.3

Table 2 Average diameter of nanofibers before and after addition of different MA concentrations

	0% MA	5% MA	15% MA	30% MA
Diameter (nm)	308 ± 74	247 ± 101	226 ± 83	217 ± 65
Minimum diameter (nm)	162	110	108	100
Maximum diameter (nm)	595	576	499	448

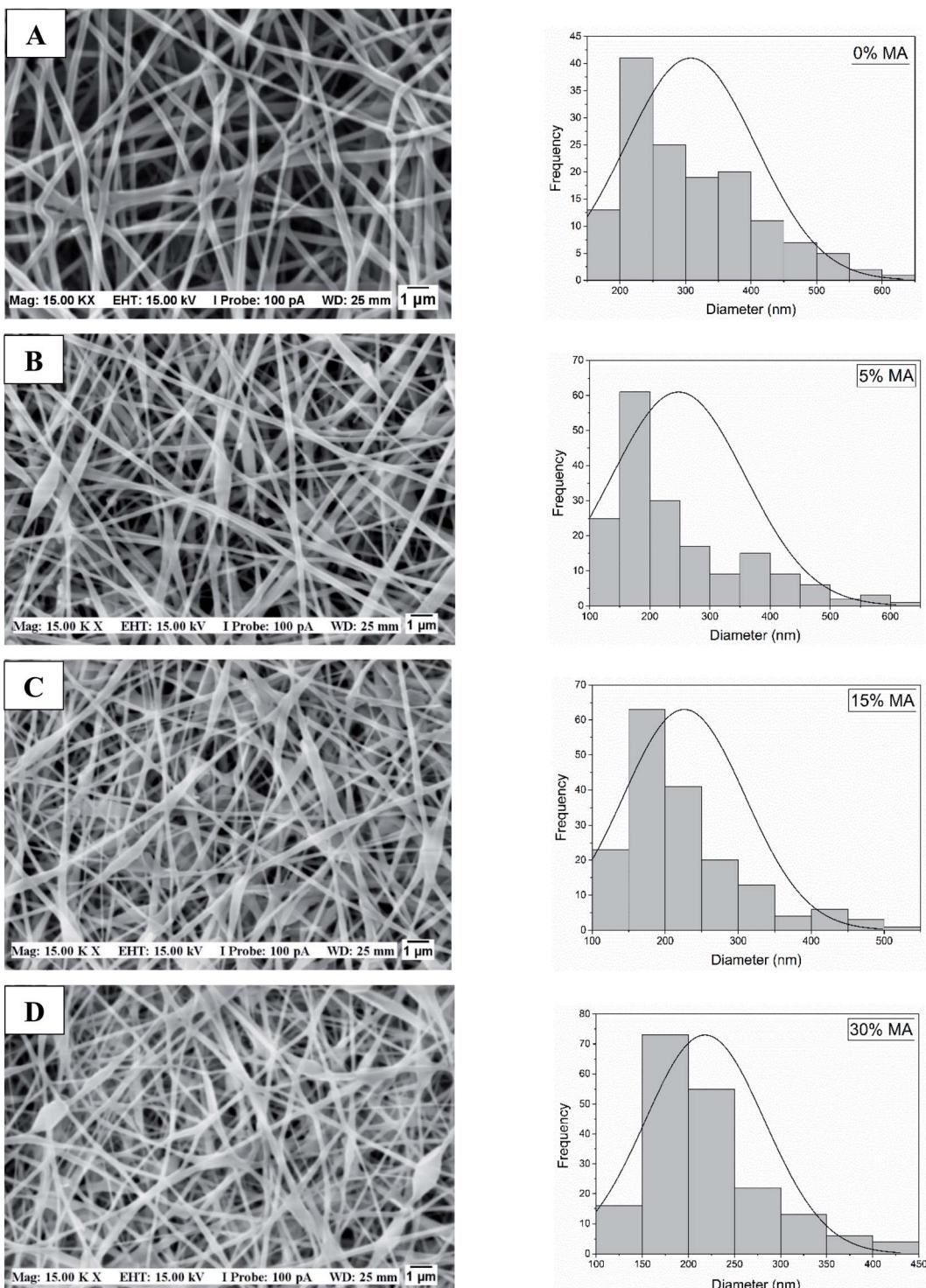


Fig. 2 SEM images of PVA/HA membranes with different MA concentrations (A) 0%, (B) 5% (C) 15% and (D) 30%. The relative humidity during the process varied between 20 and 30% for all cases.

These two types of reactions are the possible cross-linking routes that can occur in the studied systems (Fig. 6). To better understand these processes, the PVA/MA, HA/MA, and PVA/HA casting membranes were made separately. The casting membranes were prepared using the same concentrations used in the solutions that were electrospun. Membrane PVA/MA:

5 mL of PVA solution (6% w/v) were mixed by magnetic stirring with MA (30% relative to the mass of PVA) for 1 hour and poured into a Petri dish. Membrane HA/MA: 5 mL of HA solution (2% w/v) were mixed by magnetic stirring with MA (30% relative to the mass of HA) for 1 hour and poured into a Petri dish. Membrane PVA/HA: PVA (6% w/v) and HA (2% w/v) were

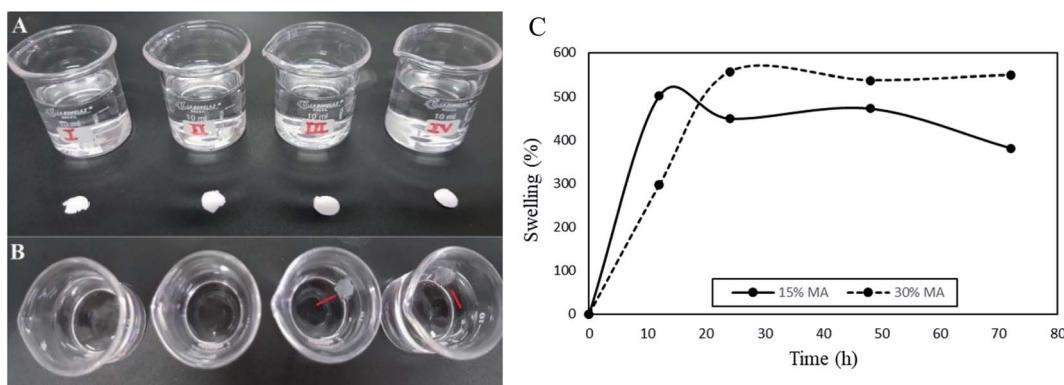


Fig. 3 Illustrative photos of membranes before (A) and after (B) immersion in PBS 7.4 solution for 72 hours. From left to right: (I) 0% MA, (II) 5% MA, (III) 15% MA and (IV) 30% MA. (C) Swelling behavior of 15% MA and 30% MA membranes at 12, 24, 48 and 72 hours.

mixed by magnetic stirring at a ratio of 75 : 25 for 1 hour and poured into a Petri dish. For all formulations, the process was performed under ambient conditions, without the addition of heat or UV light. It was verified that at room temperature the esterification reaction does not occur because the membranes were dissolved in PBS in less than 30 minutes. The same assay was performed with UV radiation and 5% of Irgacure 2959 was added concerning the mass of the polymer in solution. The solutions were then poured into the Petri dish and subjected to UV light for 40 minutes. As a result, the esterification reaction was efficient only for PVA.

Other aspects that may have contributed to the cross-linking stage were presented by Yang *et al.* (2008), in their studies, they showed that PVA and MA were efficiently cross-linked during the electrospinning process, without the need of heat treatment or UV radiation. PVA and MA reacted to form mono-esters or bis-esters during electrospinning, where the high electric field can stimulate the chemical activity of the molecules and cause the rapid evaporation of water, which can accelerate the esterification reaction and, as a consequence, increase the equilibrium constant.²⁹ It is noteworthy that the esterification reaction between (ii) PVA and MA is more likely to occur than the esterification reaction between (i) HA and MA or (iii) PVA and

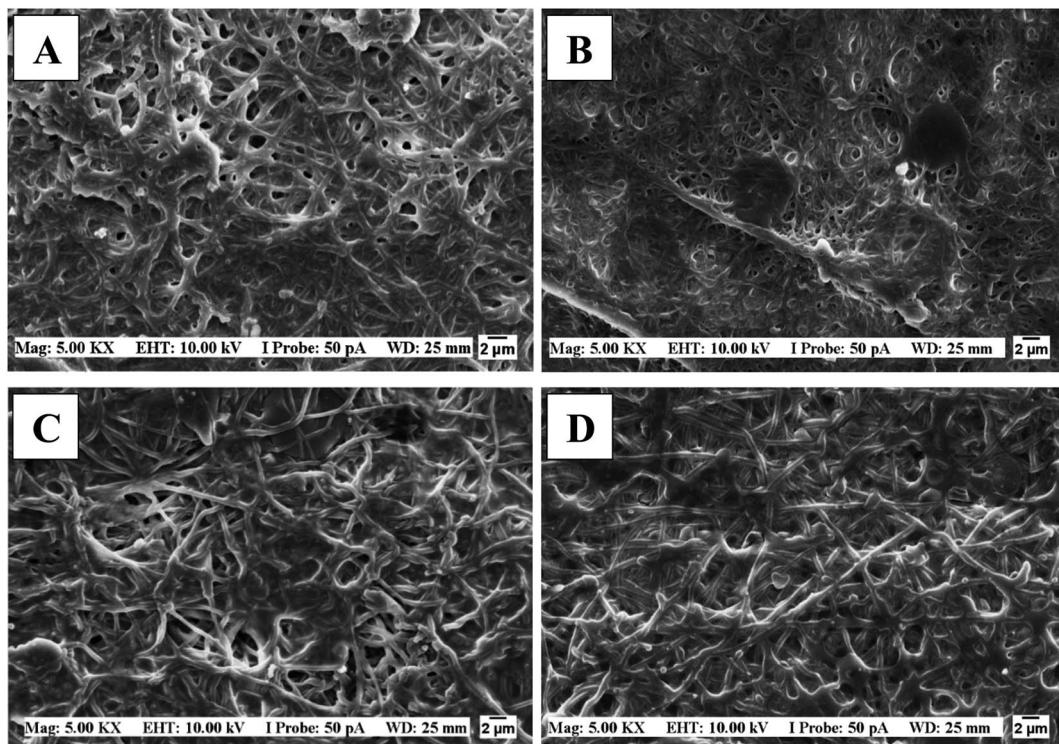


Fig. 4 SEM images of PVA/HA membranes: after 48 hours of immersion (A) 15% MA, (B) 30% MA. After 72 hours of immersion (C) 15% MA and (D) 30% MA.

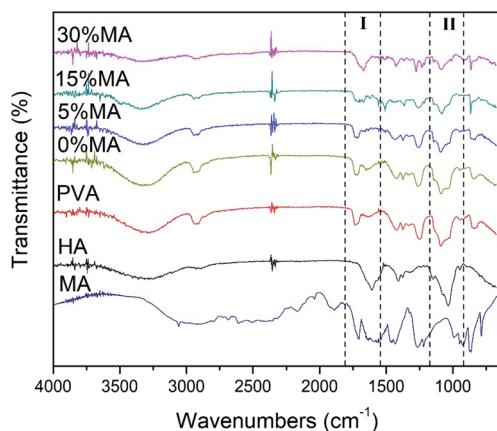


Fig. 5 FTIR spectra of the nanofibrous membranes and the respective formulation components.

HA since the reaction conditions are less favorable to (i) and (iii) than for (ii) (Fig. 6).

The hyaluronic acid cross-linking reaction usually occurs only after HA modification or if the conditions of the medium are favorable, such as the addition of an acidic catalyst together with an activating agent, or in the presence of acid anhydrides in basic medium,^{30,31} which is not the case of the system studied in this paper.

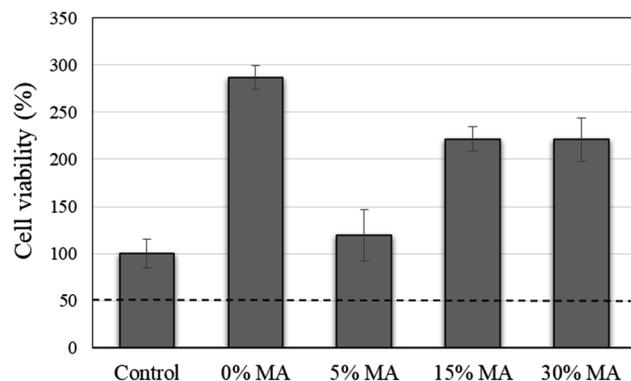


Fig. 7 Evaluation of cell viability of HaCaT cells after being cultured with the electrospun membranes for a period of 24 h.

Although the cross-linking reaction by Fig. 6(ii) occurs in the presence of the electric field, photocrosslinking was carried out to ensure a more effective cross-linking, since we have PVA and HA functional groups competing for the possible active reaction sites.

The HA/PVA membranes did not show direct cytotoxicity against HaCaT cells (Fig. 7). Indeed, they stimulated cell growth in comparison to the negative control of cytotoxicity (no treatment). Comparing the prepared membranes, the one without the cross-linking agent (MA 0%) showed the best cell viability

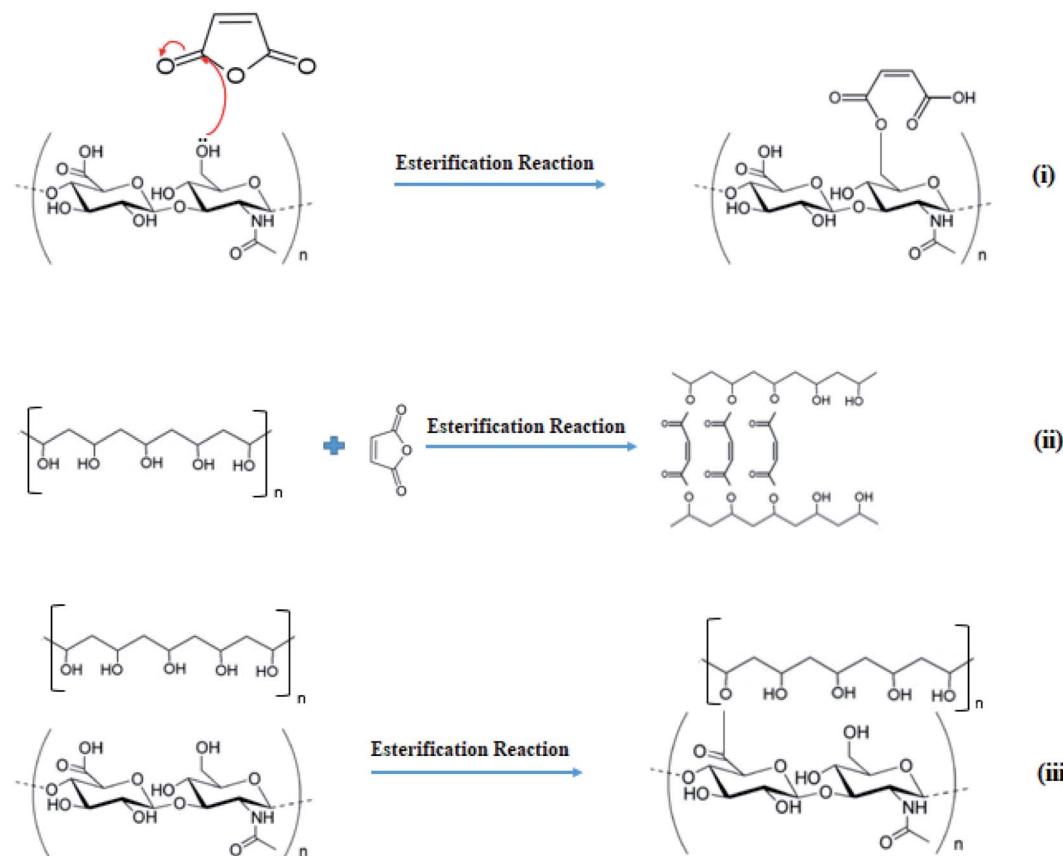


Fig. 6 Schematic representation of possible esterification reactions between (i) HA and MA, (ii) PVA and MA, (iii) PVA and HA.

result (290%), while membranes with MA concentrations of 15 and 30% showed similar cell viability (~225%). The membrane with 5% crosslinker showed less cell viability (120%), which was already expected since the cross-linking reaction was incomplete in this formulation (Fig. 3), as already discussed in the solubility test and FTIR analysis. It is known that unbound chemicals, such as crosslinker agents can be toxic to cells or prevent cell growth.

Live/dead assay was performed to analyze the cell survival at the surface of the membranes, by simultaneously staining live (green-labeled) and dead (red-labeled) cells. The images (Fig. 8) show that cells remain viable when in contact with membranes. Using the Fiji supplement from ImageJ® software, it was possible to calculate the percentage of live and dead cells from

Table 3 Percentage of live cells using image processing software Fiji (ImageJ® extension)

	0% MA	5% MA	15% MA	30% MA
Live cells (%)	99.5	97.1	92.4	83.9
Dead cells (%)	0.5	2.9	7.6	16.1

each sample (Table 3). These results corroborate the data obtained in the MTT assay, thus confirming the biocompatibility of these membranes. As the degree of cross-linking increases, the number of viable cells decreases, this may be related to the fact that the cross-linked membrane decreases water retention and HA, which is the protein present in the skin's ECM and with

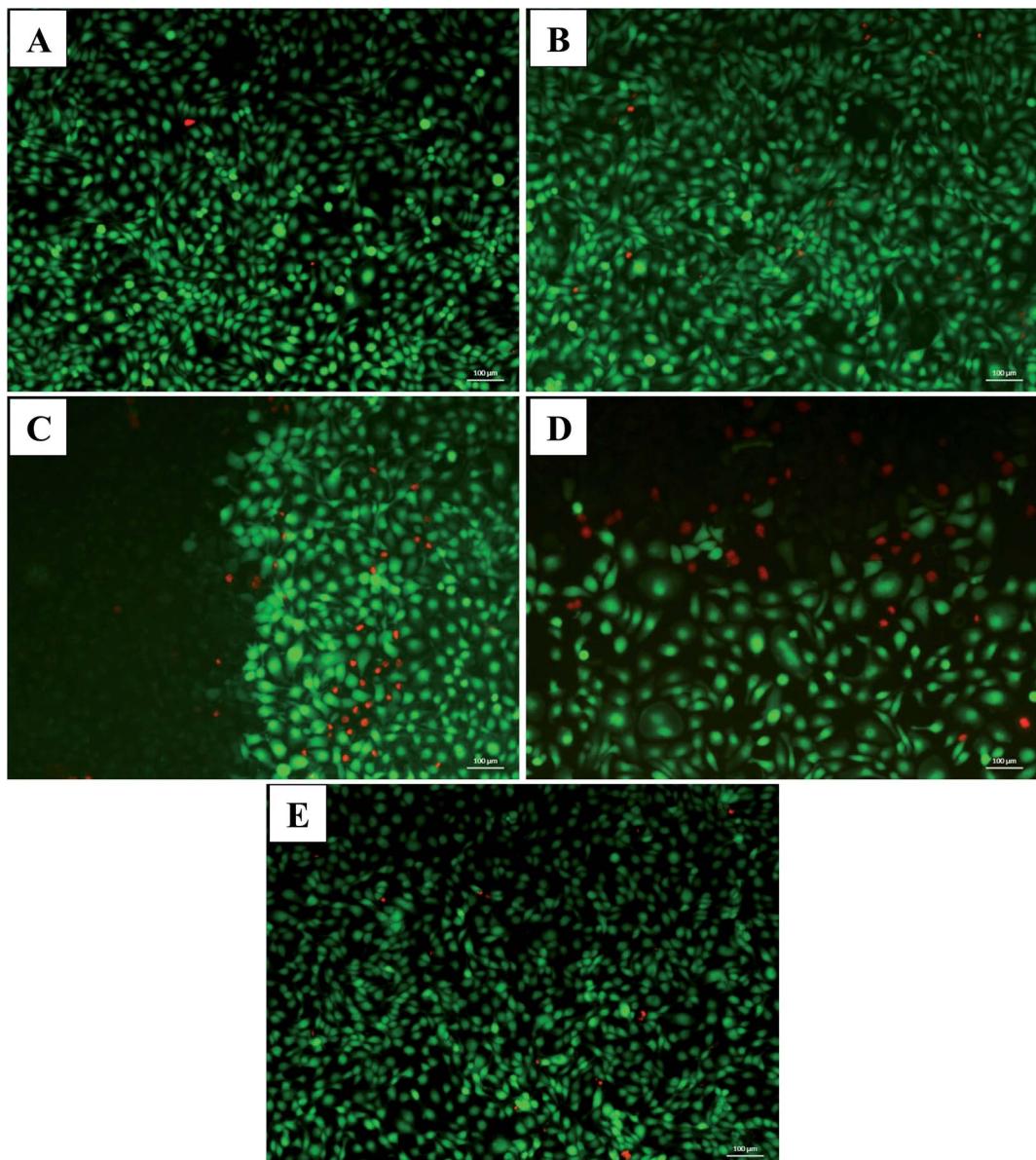


Fig. 8 Fluorescence microscopy images from a live/dead assay of HaCaT cultured on the surface of the produced HA/PVA membranes with different MA concentrations after 24 hours. (A) 0%, (B) 5% (C) 15%, (D) 30% and (E) control. Green channel: viable cells; red channel: dead cells.

excellent biological properties, not be free to stimulate migration and cell adhesion.¹⁴

The fact that the membranes have been successfully cross-linked and have demonstrated no cytotoxicity against human keratinocytes is an excellent indication for this material to be used as a potential carrier for sustained drug release.

4. Conclusion

The electrospinning of PVA/HA membranes was successful and the addition of a cross-linking agent caused an effective improvement in the rheological properties of the solution and improved the process conditions. This was extremely important especially in increasing the ejection rate of the polymer solution from 0.3 mL L⁻¹ to 1.0 mL h⁻¹, which is related to energy-saving and membrane production time. It was possible to obtain homogeneous nanofibers without the presence of beads, using only water as a solvent. Complete cross-linking reaction occurred with the addition of 15 and 30% crosslinker, meaning that the range of crosslinker concentration between 15 and 30% is interesting to investigate, focusing the application on controlled release modulated devices with different duration times before degrading. In addition, the membranes showed high cell viability, indicating that their use *in vivo* may be promising.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

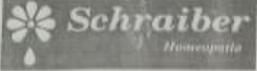
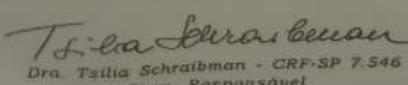
Acknowledgements

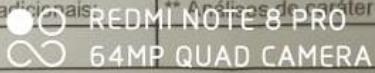
The authors thank CNPq (140567/2019-4) and CAPES for financial support. They also thank the Faculty of Chemical Engineering at the University of Campinas.

References

- 1 L. J. Villarreal-Gómez, J. M. Cornejo-Bravo, R. Vera-Graziano and D. Grande, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, 2016, **27**, 157–176.
- 2 M. Séon-Lutz, A.-C. Couffin, S. Vignoud, G. Schlatter and A. Hébraud, *Carbohydr. Polym.*, 2019, **207**, 276–287.
- 3 J. Jalvandi, M. White, Y. Gao, Y. B. Truong, R. Padhye and I. L. Kyratzis, *Mater. Sci. Eng., C*, 2017, **73**, 440–446.
- 4 B. Jankovic, J. Pelipenko, M. Skarabot, I. Musevic and J. Kristl, *Int. J. Pharm.*, 2013, **455**, 338–347.
- 5 S. Babitha, L. Rachita, K. Karthikeyan, E. Shoba, I. Janani, B. Poornima and K. Purna Sai, *Int. J. Pharm.*, 2017, **523**, 52–90.
- 6 S. Thakkar and M. Misra, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2017, **107**, 148–167.
- 7 N. Bhardwaj and S. C. Kundu, *Biotechnol. Adv.*, 2010, **28**, 325–347.
- 8 J. Li, A. He, C. C. Han, D. Fang, B. S. Hsiao and B. Chu, *Macromol. Rapid Commun.*, 2006, **27**, 114–120.
- 9 C. Feng, C. Liu, S. Liu, Z. Wang, K. Yu and X. Zeng, *Tissue Eng., Part A*, 2019, **25**, 1289–1299.
- 10 G. D. Prestwich, *J. Controlled Release*, 2011, **155**, 193–199.
- 11 I. C. Um, D. Fang, B. S. Hsiao, A. Okamoto and B. Chu, *Biomacromolecules*, 2004, **5**, 1428–1436.
- 12 J. A. Quinn, Y. Yang, A. N. Buffington, F. N. Romero and M. D. Green, *Polymer*, 2018, **134**, 275–281.
- 13 X. Wang, I. C. Um, D. Fang, A. Okamoto, B. S. Hsiao and B. Chu, *Polymer*, 2005, **46**, 4853–4867.
- 14 S. P. Miguel, D. Simões, A. F. Moreira, R. S. Sequeira and I. J. Correia, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2019, **121**, 524–535.
- 15 L. Vítková, L. Musilová, E. Achbergerová, A. Minařík, P. Smolka, E. Wrzecionko and A. Mráček, *Polymers*, 2019, **11**, 1517.
- 16 F. Li, Y. Zhao and Y. Song, in *Nanofibers*, InTech, 2010, p. 438.
- 17 A. M. Abdel-Mohsen, D. Pavliňák, M. Čileková, P. Lepcio, R. M. Abdel-Rahman and J. Jančář, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2019, **139**, 730–739.
- 18 B. Zeytuncu, M. Morcalı, S. Akman and O. Yucel, *J. Serb. Chem. Soc.*, 2015, **80**, 97–106.
- 19 E. Larrañeta, M. Henry, N. J. Irwin, J. Trotter, A. A. Perminova and R. F. Donnelly, *Carbohydr. Polym.*, 2018, **181**, 1194–1205.
- 20 Y. Zhao, Z. Fan, M. Shen and X. Shi, *Adv. Mater. Interfaces*, 2015, **2**, 1–9.
- 21 R. Gilli, M. Kacuráková, M. Mathlouthi, L. Navarini and S. Paoletti, *Carbohydr. Res.*, 1994, **263**, 315–326.
- 22 S. A. de Oliveira, B. C. da Silva, I. C. Riegel-Vidotti, A. Urbano, P. C. de Sousa Faria-Tischer and C. A. Tischer, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2017, **97**, 642–653.
- 23 S. K. Rai and P. Basak, *Int. Conf. Syst. Med. Biol. ICSMB 2010 - Proc.*, 2010, pp. 360–364.
- 24 J. M. Gohil, A. Bhattacharya and P. Ray, *J. Polym. Res.*, 2006, **13**, 161–169.
- 25 Y. B. Truong, J. Choi, J. Mardel, Y. Gao, S. Maisch, M. Musameh and I. L. Kyratzis, *Macromol. Mater. Eng.*, 2017, **302**, 1–9.
- 26 R. F. Majidi, N. Nezafati and M. Pazouki, in *6th International Conference on Nanotechnology (ICN2017)*, Dubai, 2017, pp. 1–4.
- 27 M. Pingrui, C. Cuixian, Y. Lixin, L. Jiding and J. Weijun, *Tsinghua Sci. Technol.*, 2000, **5**, 172–175.
- 28 F. J. Liou and Y. J. Wang, *J. Appl. Polym. Sci.*, 1996, **59**, 1395–1403.
- 29 E. Yang, X. Qin and S. Wang, *Mater. Lett.*, 2008, **62**, 3555–3557.
- 30 R. Buffa, V. Ÿ Velebn, L. Pospisilova, E. Prikopova, M. Pravda, P. Nikodym and L. Palek, WO 2010/105582Al, 2010, pp. 1–18.
- 31 A. V. Sochilina, A. G. Savelyev, P. A. Demina, N. V. Ierusalimsky, D. A. Khochenkov, R. A. Akasov, N. V. Sholina, E. V. Khaydukov and A. N. Generalova, *J. Phys.: Conf. Ser.*, 2018, **1124**, 1–6.

ANEXO A – LAUDO TÉCNICO DA TANCHAGEM

	LABORATÓRIO SCHRAIBER Av. Vasco Massafeli, 1605 - Colta - SP - CEP: 06703-600 CNPJ: 62.134.671/0001-00 - I.E.: 278.222.407.114	Página 12 de 12 Emitido em: 04/07/2016 11:20:20						
CERTIFICADO DE ANÁLISE								
Produto: PLANTAGO MAJOR TM Nome Científico: PLANTAGO SP. Lote: 6218 Fabricação: 17/03/2016 Validade: 5 anos		Uso Interno Origem: BRASIL, SUL NF: 00120633						
ESPECIFICAÇÕES								
Cor: CASTANHO ESVERDEADO/MARRON Odor: AROMÁTICO Sabor: ADSTRINGENTE Densidade: 0,890 - 0,925 Resíduo Seco: NÃO < 1,2% Teor Alcoólico: 62% - 68%	MÉTODO 1 3 3 1 3 1	RESULTADO MARRON AROMÁTICO ADSTRINGENTE 0,911 5,3% 65%						
Parte Usada: PLANTA TODA								
REAÇÕES DE IDENTIFICAÇÃO								
-TM + ác. Acético+sulf. Cobre +HCl -TM + FeCl3		coloração verde sombria(aucubosídeo) coloração verde sombra)						
		3 corresponde 3						
CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA								
1)sob luz UV 365 nm 2)c/ tricloreto de antimônio sob luz UV 365 nm 3)c/ anisaldeído sulf. No visível		-banda azul no Rf 0,30; banda violeta acinz. No Rf 0,45; banda azul no Rf 0,65 ; banda avermelhada no Rf 0,98, pode aparecer banda azul no Rf 0,95 -Banda vermelho-acastanhada no Rf 0,10; Banda esverdeada no Rf 0,45; banda azul no Rf 0,55; podem aparecer bandas róseas nos Rf(s) 0,80 e 0,90 -1 a 2 bandas violaceas no Rf 0,10; banda alaranjada no Rf						
		3 corresponde 3 3						
OBSERVAÇÕES								
Sinônimos: Plantago adriatica Campana,Plantago crenata Blanca Família: Plantaginaceae Nomes vulgares: Plantagem, Tanchagem, Tanchagem maior Habitat original: Europa, Norte da Ásia e América do Norte								
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; text-align: center; padding: 5px;"> Líquido Extrator </td> <td style="width: 50%; text-align: center; padding: 5px;"> Álcool em graduação específica acima descrita em laudo. </td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 5px;"> Proporção quantitativa entre a planta medicinal e o extrato </td> <td style="text-align: center; padding: 5px;"> 1:10 </td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 5px;"> Metais pesados </td> <td style="text-align: center; padding: 5px;"> Ausente </td> </tr> </table>			Líquido Extrator	Álcool em graduação específica acima descrita em laudo.	Proporção quantitativa entre a planta medicinal e o extrato	1:10	Metais pesados	Ausente
Líquido Extrator	Álcool em graduação específica acima descrita em laudo.							
Proporção quantitativa entre a planta medicinal e o extrato	1:10							
Metais pesados	Ausente							
REFERÊNCIAS PARA ANÁLISE MICROBIOLÓGICA								
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30%; text-align: center; padding: 5px;"> Contagem Bactérias heterotróficas 35°C / 48hs Fungos e Leveduras </td> <td style="width: 30%; text-align: center; padding: 5px;"> ESPECIFICAÇÕES <= 100 UFC/ml (7) <= 10 UFC/ml (7) </td> <td style="width: 40%; text-align: center; padding: 5px;"> RESULTADO De acordo (por amostragem) De acordo (por amostragem) </td> </tr> </table>			Contagem Bactérias heterotróficas 35°C / 48hs Fungos e Leveduras	ESPECIFICAÇÕES <= 100 UFC/ml (7) <= 10 UFC/ml (7)	RESULTADO De acordo (por amostragem) De acordo (por amostragem)			
Contagem Bactérias heterotróficas 35°C / 48hs Fungos e Leveduras	ESPECIFICAÇÕES <= 100 UFC/ml (7) <= 10 UFC/ml (7)	RESULTADO De acordo (por amostragem) De acordo (por amostragem)						
ESPECIFICAÇÕES								
1 - Schraiber Método: Densidade conforme Farm. Brasileira - 5ª edição; Método: Resíduo seco conforme sistema de secagem por infravermelho. Método: Teor alcoólico por alcoômetro / extração do álcool por destilação. (British Pharmacop. 2005, Farmacop. Portuguesa / Européia, 2005								
2 - GHP = German Homeopathic Pharmacopoeia 3 - HOME = Homeopathic Pharm. Et Monographies des Med. Courants								
○ REDMI NOTE 8 PRO ○ 64MP QUAD CAMERA								
www.schraiber.com.br - schraiber@schraiber.com.br - (11) 4184-4522								
 Dra. Tsilia Schraibman - CRF-SP 7.546 Farm. Responsável								

 MagisPharma Análise e Laboratório de Produtos					
LAUDO DE ANÁLISE DE MATERIAS PRIMAS					
Código/ N°Ficha Técnica:	2466/ FT1109	Matéria-prima:	TANCHAGEM TM		Lote Fabri.: -
Fornecedor:	SCHRAIBER			Lote Forn.: 6218	
Data análise:	09/07/16	Data e nº Nota Fiscal	04/07/2016 NF: 120633		Fabricação: 17/03/2016
Quantidade analisada:		Parte utilizada:	Planta inteira		Validade: 5 anos
CAS:	DCB:	P 344 () Sim (X) Não		Origem:	Brasil
Ensaios		Especificações Referências	Resultados do Fornecedor	Resultados Magispharma	
→CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS:		Castanho esverdeado/marrom	Marrom	Marrom	
Odor:		Aromático	Aromático	Aromático	
Sabor		Adstringente	Adstringente	-	
→ ENSAIOS					
→TEOR ALCOÓLICO:		62 - 68%	65%	-	
→RESÍDUO SECO:		Não < 1,3%	5,3%	-	
→pH:		-	-	-	
→DENSIDADE:		0,890 – 0,925 g/mL	0,911g/mL	0,9110 g/mL	
→OUTROS ENSAIOS:					
- FUNGOS E LEVED.		≤ 10 UFC/mL	De acordo	-	
- CONT. BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS		≤ 100 UFC/mL	De acordo	-	
-METAIS PESADOS		-	Ausente	-	
→CONSERVAÇÃO:				Temperatura ambiente, bem fechado, protegido da luz, calor e umidade.	
Referências:					
<input checked="" type="checkbox"/> Especificações contidas no certificado de origem do fabricante: Schraiber <input type="checkbox"/> Farmacopeia Brasileira (FB) <input type="checkbox"/> Farmacopeia dos Estados Unidos (USP) <input type="checkbox"/> Farmacopeia Britânica (BP) <input type="checkbox"/> Farmacopeia Europeia (EP) <input type="checkbox"/> Método Geral Farmacopeico (MG) <input type="checkbox"/> Farmacopeia Japonesa (JP)					
()Ficha de Referência - Anfarmag () Ficha de Especificação Ortofarma – Fórmula Certa					
Analista:	Juciane de Paula André	Resultado:	<input checked="" type="checkbox"/> APROVADO	<input type="checkbox"/> REPROVADO	
Farmacêutico Responsável	Rose Meire Saburi	Data de avaliação:	/ /	Ass:	
Informações adicionais:	*Os testes de solubilidade são realizados com reagentes em temperatura ambiente. **Anotações de caráter informativo realizadas pela farmácia.				
					

ANEXO B – CERTIFICADO DE ANÁLISE DO ÁCIDO HIALURÔNICO

Symbios

ESPECIFICAÇÃO TÉCNICA

Produto:	ÁCIDO HIALURÔNICO ALTO PESO MOLECULAR
INCI:	Sodium Hyaluronate
CAS:	9004-61-9.
Shelf-life	2 anos

Teste	Especificação
Aparência	Pó branco ou grânulos
% Hialuronato de Sódio	≥ 93,0
% ácido glucurônico	≥ 45,0
pH (solução aquosa 1%)	6,0 - 7,5
% Transparência	≥ 99,0
Perda ao secar	≤ 10,0
Peso molecular	Valor mensurado
Viscosidade intrínseca (dL/g)	Valor mensurado
Viscosidade cinemática	Valor mensurado
% Proteínas	≤ 0,1
Metais pesados	≤ 20 ppm
Contagem de bactérias	≤ 100 cfu/g

CARACTERÍSTICA CRÍTICA				
ORDEM	CARACTERÍSTICA	FORMA / INSTRUMENTO DE MEDIÇÃO	VALOR ESPEC MÍN/MÁX	VALOR ENCONTRADO
000001	APARÊNCIA	RESULTADOS TRANSCRITOS DO LAUDO ORIGINAL	PÓ OU GRÂULOS BRANCOS -	PÓ BRANCO
000002	% HIALURONATO DE SÓDIO	RESULTADOS TRANSCRITOS DO LAUDO ORIGINAL	>=93 -	97,1
000003	% ÁCIDO GLUCORÔNICO	RESULTADOS TRANSCRITOS DO LAUDO ORIGINAL	>=45 -	46,9
000004	PH (SOLUÇÃO AQUOSA 1%)	RESULTADOS TRANSCRITOS DO LAUDO ORIGINAL	6,000 - 7,500	6,6
000005	TRANSPARENCIA (%)	RESULTADOS TRANSCRITOS DO LAUDO ORIGINAL	>=99 -	99,8
000006	PERDA AO SECAR (%)	RESULTADOS TRANSCRITOS DO LAUDO ORIGINAL	- <=10	6,7
000007	PESO MOLECULAR	RESULTADOS TRANSCRITOS DO LAUDO ORIGINAL	VALOR AFERIDO -	$1,6 \times 10^6$
000008	VISCOSIDADE INTRINSECA (DL/G)	RESULTADOS TRANSCRITOS DO LAUDO ORIGINAL	VALOR AFERIDO -	24,9
000009	VISCOSIDADE CINEMÁTICA (MM2/S)	RESULTADOS TRANSCRITOS DO LAUDO ORIGINAL	VALOR AFERIDO -	56,7
000010	% PROTEÍNA	RESULTADOS TRANSCRITOS DO LAUDO ORIGINAL	- <=0,1	0,03
000011	METAIS PESADOS (PPM)	RESULTADOS TRANSCRITOS DO LAUDO ORIGINAL	- <=20	< 10
000012	CONTAGEM DE BACTÉRIAS (CFU/G)	RESULTADOS TRANSCRITOS DO LAUDO ORIGINAL	- <=100	< 10
000013	FUNGOS E LEVEDURAS (CFU/G)	RESULTADOS TRANSCRITOS DO LAUDO ORIGINAL	- <=10	< 10
000014	PSEUDOMONAS AERUGINOSA	RESULTADOS TRANSCRITOS DO LAUDO ORIGINAL	NEGATIVO -	NEGATIVO
000015	STAPHYLOCOCCUS AUREUS	RESULTADOS TRANSCRITOS DO LAUDO ORIGINAL	NEGATIVO -	NEGATIVO

ANEXO C – PERMISSÕES DE USO



[My Orders](#) [My Library](#) [My Profile](#) **Welcome cappuccio.karine@gmail.com** [Log out](#) | [Help](#) | [FAQ](#)

My Orders > Orders > All Orders

License Details

This Agreement between University of Campinas -- Karine Castro ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

[Print](#) [Copy](#)

License Number	5122551424729
License date	Aug 05, 2021
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Wiley Books
Licensed Content Title	Advances in Electrospinning Technique in the Manufacturing Process of Nanofibrous Materials
Licensed Content Author	Lucia Helena Innocentini Mei, Josiel Martins Costa, Karine Cappuccio Castro
Licensed Content Date	May 12, 2020
Licensed Content Pages	21
Type of Use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic
Format	Electronic
Portion	Text extract
Number of Pages	21
Will you be translating?	No
Title	OBTENÇÃO DE NANOFIBRAS ELETROFIADAS BASEADAS EM POLI(ÁLCOOL VINÍLICO) E ÁCIDO HIALURÔNICO PARA APLICAÇÕES NA ÁREA MÉDICA
Institution name	University of Campinas
Expected presentation date	Aug 2021
Order reference number	001
Portions	all
Requestor Location	University of Campinas Avenida Albert Einstein, 500
Publisher Tax ID	Campinas, 13083-852 Brazil Attn: University of Campinas EU826007151
Billing Type	Invoice
Billing address	University of Campinas Avenida Albert Einstein, 500
Total	Campinas, Brazil 13083-852 Attn: University of Campinas 0.00 USD



Hyaluronic acid electrospinning: Challenges, applications in wound dressings and new perspectives

Author: Karine Cappuccio Castro, Maria Gabriela Nogueira Campos, Lucia Helena Innocentini Mei

Publication: International Journal of Biological Macromolecules

Publisher: Elsevier

Date: 15 March 2021

© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

Journal Author Rights

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

[BACK](#)

[CLOSE WINDOW](#)

© 2021 Copyright - All Rights Reserved | [Copyright Clearance Center, Inc.](#) | [Privacy statement](#) | [Terms and Conditions](#)
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customerservice@copyright.com

Water-based synthesis of photocrosslinked hyaluronic acid/polyvinyl alcohol membranes *via* electrospinning

K. C. D. Castro, J. Burga-Sánchez, M. G. Nogueira Campos and L. H. I. Mei, *RSC Adv.*, 2020, **10**, 31271 **DOI:** 10.1039/D0RA04950F

This article is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported Licence](#). You can use material from this article in other publications, without requesting further permission from the RSC, provided that the correct acknowledgement is given and it is not used for commercial purposes.

To request permission to reproduce material from this article in a commercial publication, please go to the [Copyright Clearance Center request page](#).

If you are an author contributing to an RSC publication, you do not need to request permission provided correct acknowledgement is given.

If you are the author of this article, you do not need to request permission to reproduce figures and diagrams provided correct acknowledgement is given. If you want to reproduce the whole article in a third-party commercial publication (excluding your thesis/dissertation for which permission is not required) please go to the [Copyright Clearance Center request page](#).

Read more about [how to correctly acknowledge RSC content](#).