

# UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE ENGENHARIA QUIMICA

SÍLVIA VAZ GUERRA NISTA

# MEMBRANAS DE NANOFIBRAS COM ALTA ADESÃO PARA LIBERAÇÃO BUCAL DE FÁRMACOS

# HIGH ADHESIVE NANOFIBERS MEMBRANE FOR BUCCAL DRUG DELIVERY

Campinas 2016 SÍLVIA VAZ GUERRA NISTA

# MEMBRANAS DE NANOFIBRAS COM ALTA ADESÃO PARA LIBERAÇÃO BUCAL DE FÁRMACOS

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

Orientador: LUCIA HELENA INNOCENTINI MEI

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA SÍLVIA VAZ GUERRA NISTA, E ORIENTADA PELA PROF.ª DRª LUCIA HELENA INNOCENTINI MEI

> CAMPINAS 2016

#### Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2012/11904-5

Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura Luciana Pietrosanto Milla - CRB 8/8129

Nista, Silvia Vaz Guerra, 1973-

N637m Membranas de nanofibras com alta adesão para liberação bucal de fármacos / Silvia Vaz Guerra Nista. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

> Orientador: Lucia Helena Innocentini Mei. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Eletrofiação. 2. Nanofibras. 3. Polímeros. 4. Liberação controlada. 5. Metronidazol. I. Mei, Lucia Helena Innocentini,1953-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

#### Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: High adhesive nanofibers membrane for buccal drug delivery Palavras-chave em inglês: Electrospinning

Nanofiber Polymers Drug delivery Metronidazole Área de concentração: Engenharia Química Titulação: Doutora em Engenharia Química Banca examinadora: Lucia Helena Innocentini Mei [Orientador] Ronaldo Aloisi Pilli Michelle Franz Montan Braga Leite André Luis Ferrari de Moura Giraldi Rosário Élida Suman Bretas Data de defesa: 14-04-2016 Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

#### Folha de aprovação

Tese de Doutorado defendida por Silvia Vaz Guerra Nista e aprovada em 14 de abril de 2016 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Profa. Dra. - Lucia Helena Inocentinni Mei Profª. Dra. Rosário Élida Suman Bretas mBL ant Profª. Dra. Michelle Franz Montan Braga Leite Kounth (1 Prof.Dr.Ronaldo Aloise Pilli Prof. Dr. André Luis Ferrari de Moura Giraldi

Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Dedico este trabalho aos meus pais Ivandir e Sebastiana, ao meu marido Agnaldo e ao meu filho Gabriel, pelo apoio, carinho e atenção durante a execução deste meu projeto.

### AGRADECIMENTOS A MINHA FAMÍLIA

A Deus pela sua presença constante em minha vida me protegendo e me guiando em tudo o que faço. Por me dar forças e naqueles momentos difíceis, mas principalmente por me oferecer tantos momentos alegres.

Este trabalho é fruto da contribuição e esforço da minha família, à qual ofereço os mais sinceros agradecimentos, pois sem eles nada seria possível.

Agradeço ao meu marido Agnaldo pelo incentivo e apoio constante que me ajudou a concluir mais esta etapa da minha vida. Ao meu filho Gabriel por me alegrar a cada dia com seu lindo sorriso sapeca e me ajudar a querer ser uma pessoa melhor.

Aos meus pais, pelo amor, confiança, incentivo e apoio incondicional que sempre me dedicaram.

### AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dra. Lucia Helena Innocentini Mei pela oportunidade de realizar este trabalho, pela confiança, liberdade de atuação, orientação construtiva e valiosas contribuições no andamento do trabalho.

A todas as amigas (os) do BIOMAT, Ananda, Ivanei, Ivi, Jesus Roberto, Larissa e Leonardo, que direta ou indiretamente contribuíram com ideias, sugestões ou simplesmente com sua amizade.

A Professora Dra. Michelle Franz Montan Braga Leite da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP) - UNICAMP, pelo empréstimo dos equipamentos para análise de mucoadesão/permeação e pela orientação na análise dos dados.

Agradeço aos doutorandos Luciano Serpe e Bruno Vilela Muniz da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP) que me ensinaram e acompanharam em todos os ensaios de permeação.

À Professora Dra. Elizabeth F. Martinez do Instituto e Centro de Pesquisas "São Leopoldo Mandic", pelos ensaios de citotoxicidade e análises microbiológicas.

Agradeço ao apoio financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo), com a bolsa de Doutorado Projeto 2012/11904-5, e pelo projeto Auxílio à Pesquisa 2013/04877-4 que garantiram a infraestrutura necessária à realização deste trabalho, dentre outros.

"São nossas escolhas que determinam quem realmente somos, bem mais que nossas habilidades. (J.K.Rowling)

"Nossa maior fraqueza esta em desistir. A melhor maneira de encontrar o sucesso é sempre tentar mais uma vez." (Thomas A. Edison)

#### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e caracterização de um sistema mucoadesivo de alto desempenho, baseado em membranas de nanofibras eletrofiadas a partir de soluções de polímeros mucoadesivos para liberação bucal de princípios ativos. Seu desenvolvimento deu-se em três fases.

A primeira foi dedicada à obtenção de membranas de nanofibras eletrofiadas com os seguintes polímeros mucoadesivos individuais: Alginato / PEO (Polióxido de Etileno), Quitosana/PEO, e à eletrofiação de suas misturas (Quitosana/PEO + Alginato/PEO). Membranas de Alginato/PEO, de Quitosana/PEO e de Acetato de Celulose (CA) foram incorporadas com 10 e 20% m/m do fármaco Metronidazol (MTZ), um antibiótico amplamente utilizado no tratamento de periodontites. As membranas de CA foram revestidas com as nanofibras de polímeros mucoadesivos, desenvolvidas pela técnica "*layer by layer*", obtendo-se mais um dispositivo de liberação além das membranas dos polímeros individuais. Todas as nanofibras preparadas não apresentaram defeitos, como contas, e apresentaram uma distribuição homogênea do diâmetro. Excelentes resultados foram obtidos para reticulação das membranas de nanofibras de SA/PEO e de CA revestida com SA/PEO, pela técnica desenvolvida a seco por atomização de CaCl<sub>2</sub> e posterior atomização com solução de quitosana, com uma perda de massa de apenas 41% após 24 horas, a 37°C, em soluções de simulação de fluido corporal.

Na segunda fase do trabalho, confirmou-se por análise microbiológica, utilizando-se а bactéria anaeróbica Gram negativa Α. actinomycetemcomitans, que o fármaco não perdeu sua eficácia durante o processo de eletrofiação. Através dos testes de Viabilidade Celular com Trypan Blue verificouse que todas as membranas com incorporação de até 10% do fármaco MTZ são biocompatíveis. Nos testes de liberação controlada in vitro do metronidazol, as membranas de SA/PEO e de CA revestida com SA/PEO apresentaram os melhores resultados de liberação do fármaco, onde se obteve o menor efeito burst, em relação às demais membranas testadas. O teste de permeação do fármaco Metronidazol, em epitélio oral fresco de suínos, mostrou que as duas membranas de CA revestidas apresentaram perfil e valores de Lag Time e Fluxo, em estado estacionário, menores que as membranas não revestidas.

A terceira fase permitiu determinar a membrana da nanofibra com melhores propriedades mucoadesivas para liberação do fármaco, através dos testes *in vitro* de desempenho de mucoadesão por adsorção de mucina, tempo e força de mucoadesão, que simulam as condições reais de aplicação dos dispositivos desenvolvidos na cavidade bucal.

As membranas de nanofibras de SA/PEO foram as mais adequadas para aplicação proposta em doenças periodontais. Suas nanofibras se apresentaram homogêneas e livres de defeitos. O perfil de liberação do fármaco, com e sem barreira epitelial, foi adequado ao objetivo proposto. Essas membranas são biocompatíveis, pelos resultados nos testes citotoxicológicos, e apresentaram as melhores performances de Tempo e Força de mucoadesão, superando os resultados das demais membranas.

**Palavras Chaves**: eletrofiação, nanofibras, polímeros mucoadesivos, liberação controlada, metronidazol.

#### ABSTRACT

This project was dedicated to the development and characterization of a mucoadhesive system of high performance adhesion, based on electrospun membranes made of mucoadhesive polymer solutions for oral release of active ingredients. Its development was carried on in three phases.

The first was devoted to obtain electrospun nanofibers membranes with individual mucoadhesive polymers, like Alginate/PEO and Chitosan/PEO, and with their their mixtures (chitosan/PEO + Alginate/PEO). Membranes of Alginate/PEO, Chitosan/PEO and also Cellulose Acetate (CA) were loaded with 10 and 20% w/w of drug metronidazole (MTZ), an antibiotic widely used in the treatment of periodontitis. The CA membranes were coated with nanofiber of mucoadhesive polymers by layer-by-layer technique, yielding an additional controlled release device. All nanofibers prepared showed no defects such as beads and presented a homogeneous distribution of the diameter. Excellent results were obtained for crosslinking the nanofiber membranes SA/PEO and CA-coated SA/PEO. These membranes, after the new technique developed of dry crosslinking of SA/PEO by atomization using CaCl<sub>2</sub> and subsequent atomization of chitosan solution, showed a weight loss of only 41% after 24 hours at 37 ° C in simulated body fluid solutions.

In the second phase, microbiological analysis was carried out to verify the drug efficiency in the membrane after the electrospinning process using anaerobic gram negative bacterium, A. actinomycetemcomitans, a metronidazole sensitive drug and present in periodontal pockets. Through the cell viability tests with Trypan Blue assay was found that the incorporation of 10% MTZ produced biocompatible membranes. The controlled release of Metronidazole *in vitro* was evaluated and the membranes of SA/PEO and of CA coated with SA/PEO showed the best results of drug release, with the lowest burst effect compared to other membranes tested. The permeation test across the porcine oral mucosa was measured in order to evaluate the barrier function of the membranes and showed that the two CA coated membranes presented similar profiles; Lag time and Steady state flux values were lower than the uncoated membranes.

The third phase of the project allowed us to determine the best mucoadhesive membrane for drug release, through the final tests of mucoadhesion

performance by adsorption of Mucin, time and mucoadhesion force that simulate the actual conditions of application of the devices developed in the oral cavity.

The SA/PEO nanofiber membranes were the most suitable for the proposed application in periodontal diseases. It presented homogeneous nanofiber and free of defects. The release profile was suitable for the drug with and without epithelial barrier. The results of the citotoxic tests showed that the membranes are biocompatible. The membranes had the best results in Time and mucoadhesion Force, surpassing the results of the other membranes.

**Keywords:** electrospinning, nanofiber, mucoadhesive polymers, drug delivery, metronidazole.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1 Desenho esquemático do equipamento de eletrofiação (RAMAKRISHNA et al., 2005).	37
Figura 1.2. Estrutura química dos monômeros da quitosana (Lawrie et al., 2007).	44
Figura 1.3. Estrutura química das unidades G e M do Alginato (LAWRIE et al., 2007).	44
Figura 1.4. Interações iônicas entre o alginato de sódio e a quitosana (Knill et al., 2004)	45
<b>Figura 1.5.</b> Esquema das ligações cruzadas do alginato de cálcio. As esferas em preto representam os íons Ca <sup>2+</sup> , enquanto as linhas representam as cadeias de alginato (Rodrigues et al., 2008).	47
Figura 1.6. Estágios das doenças periodontais. (Adaptado de: http://melhorcomsaude.com/ prevencao-tratamento-gengivite/)	48
Figura 1.7. Fórmula molecular do Metronidazol (Teixeira et al., 2013).	50
Figura 2.1. Foto do equipamento utilizado para eletrofiação do Alginato/PEO e Quitosana/PEO.	66
Figura 2.2. Bico atomizador utilizado para reticulação das membranas de SA/PEO	68
Figura 2.3. Esquema para reticulação da membrana de quitosana. Fitas de membrana indicadas acima.	71
<b>Figura 2.4.</b> Foto do acessório utilizado para eletrofiação da solução de Alginato/Quitosana/PEO em conjunto (a) acessório (b) esquema. (Fonte: Nista et al., 2015)	74
Figura 2.5. Foto do equipamento utilizado para eletrofiação da solução de SA/QUIT/PEO.	74
<b>Figura 2.6.</b> Fotomicrografia de fase de linhagem de fibroblastos gengivais humanos. Aumento original de 100x.	79

Figura 2.7. Sequencia do procedimento para preparação da mucosa oral suína82para teste de permeação.

Figura 2.8. Célula de Franz utilizada no teste de permeação (a), compartimento83receptor (b) e (c).área de permeação com mucosa e membrana

Figura 2.9. Montagem do experimento para determinação do Tempo de86Mucoadesão (a) montagem das mucosas bucais suinas no bequer, (b) banho86maria com controle de agitação e temperatura.

Figura 2.10.Montagem da mucosa oral suina no suporte para teste no87texturômetro (a) e montagem da membrana nanoestruturada no probe (b).

Figura 2.11. Montagem do experimento para determinação da Força de88Mucoadesão no analisador de textura.

Figura 3.1. Imagens de MEV com aumento de 7000 vezes para membrana90eletrofiada no pré-teste de eletrofiação de SA/PEO, sendo (a) amostra 4A e (b)amostra 5A.

Figura 3.2. Imagens de MEV com aumento de 7000 vezes para membrana90eletrofiada no pré-teste de eletrofiação de SA/PEO, sendo (a) amostra 3A e (b)amostra 5A.

Figura 3.3. Imagens de MEV com aumento de7000 vezes para membrana91eletrofiada no pré-teste de eletrofiação de SA/PEO, sendo (a) amostra 1A e (b)amostra 2A.

Figura 3.4. Imagens de MEV com aumento de 7000 vezes para membrana91eletrofiada no pré-teste de eletrofiação de SA/PEO, sendo (a) amostra 1A e (b)amostra 4A.

Figura 3.5. Imagem MEV, com aumento de 10000 vezes, para membrana94eletrofiada de SA/PEO nas condições definidas DOE I sendo (a) 3%SA/PEO,15kV, 15 cm; (b) 3%SA/PEO, 15kV, 20 cm; (c) 3%SA/PEO, 10kV, 20 cm; (d)3%SA/PEO, 10kV, 15 cm, (e) 4%SA/PEO, 15kV, 20 cm e (f) 4%SA/PEO, 15kV,15 cm.

Figura 3.6. Gráfico de Pareto dos efeitos para aspecto das membranas95nanoestruturadas obtidas de soluções de SA/PEO (50:50) em água deionizada.

Figura 3.7. Gráfico dos efeitos principais para aspecto das membranas96nanoestruturadas obtidas de soluções de SA/PEO (50:50) em água deionizada.

Figura 3.8. Imagem MEV, com aumento de 10000 vezes, para membrana 98 eletrofiada de SA/PEO nas condições definidas DOE II sendo (a) C1=3%SA/PEO, 15kV, 15cm; (b) C2=3%SA/PEO, 15kV, 20cm; (C) C3=3%SA/PEO, 20kV, 20cm; (d) C4=3%SA/PEO, 15cm; 20kV, (e) C5=4%SA/PEO, 15kV, 20cm; (f) C6=4%SA/PEO, 20kV. 20cm; (g) C7=4%SA/PEO, 15kV, 15cm; e (h) C8=4%SA/PEO, 20kV, 15cm.

Figura 3.9. Gráfico de Pareto dos efeitos para aspecto das membranas99nanoestruturadas obtidas de soluções de SA/PEO em água deionizada.

Figura 3.11.Gráfico de interações para aspecto das membranas100nanoestruturadas obtidas de soluções de SA/PEO em água deionizada.

Figura 3.12.: Imagem MEV, com aumento de 10000 vezes, para membrana101eletrofiada de Alginato de sódio/Poli (óxido de etileno) (SA/PEO) 50:50 m/m101utilizando-se como Água como solvente nas condições de processamento de D= 15 cm, V = 20kV e R = 1mL/h com: (a) UR<40%; (b) UR>50%.

**Figura 3.12.** Imagem MEV, com aumento de 10000 vezes, para membrana 103 eletrofiada de SA/PEO 50:50 m/m utilizando-se água como solvente nas condições de processamento de D = 15 cm, V = 25kV e R = 1mL/h com: (a) fiação após preparo; (b) fiação 24h após preparo.

**Figura 3.13.** Imagem MEV, com aumento de 10.000 vezes, para membrana 104 eletrofiada de SA/PEO 50:50 m/m em solução aquosa, nas condições de processamento de D = 10 cm, V = 20kV e R = 1mL/h com adição de: (a) sem acetona; (b) 5% acetona; (c) 10% acetona.

Figura 3.14. Imagem MEV, com aumento de 10.000 vezes, para membrana105eletrofiada de Alginato de sódio/Poli (óxido de etileno) (SA/PEO) 50:50 m/m emsolução aquosa nas condições de processamento de D = 15 cm, V = 15kV e R= 1mL/h com adição: (a) sem etanol; (b) 5% etanol.

**Figura 3.15.** Imagem MEV, com aumento de 10000 vezes, para membrana 107 eletrofiada de SA/PEO 50:50 m/m utilizando-se como Água como solvente nas condições de processamento de D = 15 cm, V = 20kV e R = 1mL/h com: (a) sem etanol; (b) 5% etanol; (c) 7% etanol.

Figura 3.16. Imagem MEV, com aumento de 5000 vezes, para membrana108eletrofiada de Alginato de sódio/Poli (óxido de etileno) (SA/PEO) 60:40 m/m108utilizando-se como Água como solvente nas condições de processamento de D= 15 cm, V = 20kV e R = 1mL/h com: (a) sem etanol; (b) 5% etanol.

Figura 3.17. Imagem MEV, com aumento de 5000 vezes, para membrana 108 eletrofiada de Alginato de sódio/Poli(óxido de etileno)(SA/PEO) 70:30 m/m utilizando-se como Água como solvente nas condições de processamento de D = 15 cm, V = 25kV e R = 1mL/h com: (a) sem etanol; (b) 5% etanol; (b) 7% etanol.

Figura 3.18. Imagem MEV, com aumento de 10000 vezes, para membrana108eletrofiada de Alginato de sódio/Poli (óxido de etileno) (SA/PEO) 80:20 m/m108utilizando-se como Água como solvente nas condições de processamento de D108= 15 cm, V = 25kV e R = 1mL/h com: (a) sem etanol; (b) 7% etanol.108

Figura 3.19. Imagem MEV, com aumento de 10000 vezes, para membrana109eletrofiada de Alginato de sódio/Poli (óxido de etileno) (SA/PEO) 90:10 m/mutilizando-se como Água como solvente nas condições de processamento de D= 15 cm, V = 25kV e R = 1mL/h com 7% etanol.

**Figura 3.20.** Imagem para membrana eletrofiada de SA/PEO 60:40 em solução 111 5% etanol nas condições de processamento de D = 15 cm, V = 20kV e R = 1mL/h após 5 horas de fiação com formação de estrutura 3D.

Figura 3.21. O mecanismo de formação de estruturas 3D em nanofibras de 113 SA/PEO: a) Fibras contendo cadeias de alginato carregadas negativamente em suas superfícies exteriores; b) Durante eletrofiação o alginato é preferencialmente dirigido para a superfície do cone de Taylor pela polaridade positiva da fonte do campo elétrico. PEO, um polímero neutro, permanece predominantemente dentro do interior da fibra (BONINO et al., 2012).

Figura 3.22. Imagens MEV, com aumento de 5000 vezes, para membrana 117 eletrofiada a partir da solução de 4%SA/PEO 60:40 com 5% etanol, nas condições de processamento com D = 15 cm, V = 20kV e R = 1mL/h e velocidades de rotação de (a)1600 rpm, (b) 2500 rpm, (c) 3500 rpm e (d) 4500 rpm. Figura 3.23. Imagens para membrana eletrofiada de SA/PEO 60:40 em solução1185% etanol nas condições de processamento de D = 15 cm, V = 20kV e R =1mL/h e velocidade de rotação de 2500 rpm, após 4 horas fiação.

**Figura 3.24.** Gráfico de Pareto dos efeitos para perda de massa das 121 membranas nanoestruturadas, obtidas de soluções de SA/PEO (60:40) em água deionizada a 37°C por: (a) 10 horas e (b) 24 horas.

Figura 3.25. Gráfico de interações para perda de massa das membranas122nanoestruturadas obtidas de soluções de SA/PEO (60:40) em água deionizadaa 37°C por (a) 10 horas e (b) 24 horas.

Figura 3.26. Gráfico de Cubo para perda de massa das membranas124nanoestruturadas obtidas de soluções de SA/PEO (60:40) em água deionizadaa 37°C por (a) 10 horas e (b) 24 horas.

Figura 3.27. Imagem MEV, com aumento de 5000 vezes, para membrana 125 eletrofiada de SA/PEO 60:40 m/m em solução 5% etanol (a) antes reticulação,
(b) após atomização com solução saturada de CaCl<sub>2</sub> nas condições do teste 4,
(c) após 24 horas em solução aquosa.

Figura 3.28. Imagem MEV, com aumento de 10000 vezes, para membrana126eletrofiada de SA/PEO 60:40 m/m em solução 5% etanol (a) após atomizaçãocom solução saturada de CaCl2 nas condições do teste 6, (c) após 5 horas emsolução aquosa.

**Figura 3.29.** Imagem das membranas de SA/PEO após reticulação por 128 atomização com: (a) Quitosana, (b) CaCl<sub>2</sub> e Quitosana.

Figura 3.30. Imagens das membranas de SA/PEO após incubação por 4 h em:131(a) solução tampão Fosfato e (b) solução saliva artificial, reticuladas por<br/>atomização com Quitosana (1) e com CaCl2 e Quitosana (2).131

Figura 3.31. Imagens das membranas de SA/PEO após incubação por 10 h132em: (a) solução tampão Fosfato e (b) solução saliva artificial, reticuladas por<br/>atomização com Quitosana (1) e com CaCl<sub>2</sub> e Quitosana (2).132

Figura 3.32.Imagens das membranas de SA/PEO após reticulação por132atomização com Quitosana: (a) nanofibras não danificadas e (b) filme fino sobrea membrana de SA/PEO

**Figura 3.33.** Imagens das membranas de SA/PEO após reticulação com (a) 133 atomização de CaCl<sub>2</sub>, e (b) posterior atomização de Quitosana.

**Figura 3.34.** Imagem da membrana de SA/PEO após reticulação por 134 atomização com solução de CaCl<sub>2</sub> e solução de Quitosana 3,5%, após incubação por 24h em solução saliva artificial.

Figura 3.35. Membrana de nanofibras de SA/PEO eletrofiada nas condições de135processo de V=25 kV, D=15 cm e R=1ml/h com adição de 10% deMetronidazol, sendo (a) imagem obtida por MEV com aumento de 10.000 e (b)histograma para diâmetro das nanofibras.

**Figura 3.36.** Imagens MEV, com aumento de 10000 vezes, para membrana 137 eletrofiada de Quitosana/Poli (óxido de etileno) (QUIT/PEO) nas condições de processamento de D = 15 cm, V = 20kV e R = 1mL/h em (a), (b) e (c) e D = 15 cm, V = 25kV e R = 1mL/h em (d) e (e) nas seguintes proporções de QUIT/PEO m/m: (a) 50:50; (b) 60:40; (c) 70:30; (d) 80:20 (e) 90:10.

Figura 3.37. Imagens para membrana de 6%QUIT/4,8%PEO (70:30) eletrofiada139com V=25 kV, D=15 cm e R=1ml/h e velocidade de rotação de 2500 rpm (a)aspecto e (b) microscopia com aumento de 10000x.

Figura 3.38. Resultado da reação entre quitosana e o glutaraldeído formando140ligação imina (C=N) conhecida como base de Schiff

Figura 3.39. Microscopia eletrônica de varredura, com aumento de 10000142vezes. Membranas de quitosana eletrofiadas, após dissolução parcial em águaa 37ºC (a) 10h - membrana não reticulada, (b)10 h - membrana reticulada por5h em vapor de glutaraldeído, (a) 24h - membrana não reticulada (b)24 hmembrana reticulada por 5h em vapor de glutaraldeído.

Figura 3.40. Microscopia eletrônica de varredura, com aumento de 10000143vezes. Membranas de QUIT/PEO eletrofiadas após 24 horas de dissolução a37ºC (a) imersa em solução tampão (b) imersa em solução de saliva.

Figura 3.41. Imagens para membranas eletrofiadas de QUIT/PEO solução1456%QUIT/4,8%PEO, V=25 kV, D=15 cm e R=1ml/h, com velocidade de rotação145de 2500 rpm, sendo: (a) lote antigo MKBG3334V, (b) lote novo SLBH1773V e(c) lote novo SLBH1773V após alteração com solução 4,5%QUIT/3,6%PEO,V=29 kV, D=10 cm e R=1ml/h.1000 cm e R=1ml/h.

Figura 3.42. Membrana de nanofibras de QUIT/PEO eletrofiadas nas condições146de processo de V=25 kV, D=10 cm e R=1ml/h com adição de 10% de10% deMetronidazol, sendo (a) imagem obtida por MEV com aumento de 10.000 e (b)16histograma para diâmetro das nanofibras.16

**Figura 3.43.** Membrana eletrofiada de CA nas condições de processamento de 147 D = 10 cm, V = 15kV e R = 1mL/h com 10% metronidazol, sendo (a) Imagens de MEV, com aumento de 5000 vezes (b) Histograma do diâmetro das nanofibras.

**Figura 3.44.** Imagens para membrana eletrofiada de Acetato de celulose-20%MTZ recoberta com membrana QUIT/PEO, 1ª Configuração: (a) membrana seca, (b) membrana em solução tampão a 37°C por 4 horas.

Figura 3.45. Imagens para membrana eletrofiada de Acetato de celulose-14920%MTZ recoberta com membrana QUIT/PEO, 2ª Configuração, sendo: (a)149membrana CA após atomização com solução de quitosana (b) membrana seca(c) membrana em solução tampão a 37°C por 1 semana.

Figura 3.46.Imagens para membrana eletrofiada de Acetato de celulose-15020%MTZ recoberta com membrana QUIT/PEO, 2ª Configuração: vista lateral.

**Figura 3.47.** Membrana de nanofibras de SA/PEO-QUIT/PEO eletrofiada nas 153 condições de processo de V=27 kV, D=10 cm e R=0,4ml/h, sendo (a) imagem obtida por MEV com aumento de 10.000 e (b) histograma para diâmetro das nanofibras.

Figura 3.48.Imagem MET, para membrana eletrofiada de SA/QUIT/PEO nas153condições de processamento de D = 10 cm, V = 27kV e R = 0.4mL/h.

**Figura 3.49.** Espectroscopia de infravermelho para membrana coaxial 155 eletrofiada de SA/QUIT/PEO nas condições de processamento de D = 10 cm, V = 27kV e R = 0,4mL/h (linha azul), e para Alginato/PEO (linha vermelha), Quitosana/PEO (linha verde) e PEO (linha marrom).

Figura 3.50. Difração de Raios-X para as amostras de QUIT/PEO, SA/PEO e156SA/PEO-QUIT/PEO.156

Figura 3.51. Termogramas DSC para membranas de nanofibras de SA/PEO,159QUIT/PEO e SA/PEO-QUIT/PEO.

Figura 3.52. Termogramas TGA para membranas de nanofibras de SA/PEO,160QUIT/PEO e SA/QUIT/PEO.160

**Figura 3.53.** Imagem MET, para membrana eletrofiada de SA/PEO-QUIT/PEO 161 nas condições de processamento de D = 10 cm, V = 27kV, R = 0,4mL/h e rotação 2500 rpm.

Figura 3.54. Imagens microscopia eletrônica de varredura (MEV), aumento16210.000 vezes, das nanofibras coaxiais eletrofiadas de SA/CHI/PEO após 24horas de incubação em água.

**Figura 4.1.** Resultados de crescimento celular para cultura de células de 167 Fibroblasto Gengival Humano, após 24, 48 e 72 horas de incubação das membranas de Quitosana, conforme determinado pelo teste de exclusão com corante vital Trypan Blue. Viabilidade celular em poliestireno (Controle). As barras de erro representam o desvio-padrão. (Non Parametric ANOVA Test. CONTROLE <sup>a</sup>; QUIT 0% MTZ <sup>a</sup>; QUIT 10% MTZ <sup>a</sup>, QUIT 20% MTZ <sup>a</sup>. As mesmas letras indicam que não ocorreu diferença estatística significativa entre os diferentes tipos de membrana (p<0,05)).

**Figura 4.2.** Resultados de crescimento celular para cultura de células de 168 Fibroblasto Gengival Humano, após 24, 48 e 72 horas de incubação, conforme determinado pelo teste de exclusão com corante vital Trypan Blue. Viabilidade celular em poliestireno (Controle). As barras de erro representam o desviopadrão. (Non Parametric ANOVA Test. CONTROLE <sup>a</sup>; QUIT 0% MTZ <sup>a</sup>; QUIT 10% MTZ <sup>a</sup>, QUIT 20% MTZ <sup>a</sup>. As mesmas letras indicam que não ocorreu diferença estatística significativa entre os diferentes tipos de membrana (p<0,05)).

**Figura 4.3.** Resultados de crescimento celular para cultura de células de 170 Fibroblasto Gengival Humano após 24, 48 e 72 horas de incubação, conforme determinado pelo teste de exclusão com corante vital Trypan Blue. Viabilidade celular em poliestireno (Controle). (Non Parametric ANOVA Test. CONTROLE <sup>a</sup>; CA 0% MTZ <sup>a</sup>; CA 10% MTZ <sup>a</sup>, CA 20% MTZ <sup>b</sup>. As mesmas letras indicam que não ocorreu diferença estatística significativa entre os diferentes tipos de membrana (p<0,05)).

Figura 4.4. Resultados de crescimento celular para cultura de células de171Fibroblasto Gengival Humano, após 24, 48 e 72 horas de incubação, conforme171

determinado pelo teste de exclusão com corante vital Trypan Blue. Viabilidade celular em poliestireno (Controle). As barras de erro representam o desviopadrão. (Non Parametric ANOVA Test. CONTROLE <sup>a</sup>; Alginato 0% MTZ <sup>a</sup>; Alginato 10% MTZ <sup>a</sup>, Alginato 20% MTZ <sup>a</sup>. As mesmas letras indicam que não ocorreu diferença estatística significativa entre os diferentes tipos de membrana (p<0,05)).

Figura 4.5. Curva de Calibração obtida por UV-vis para o Metronidazol em172solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,4.

Figura 4.6.Curvas de percentual de MTZ liberado por membranas173nanoestruturadas com 10% de Metronidazol.

Figura 4.7. Perfil de liberação de MTZ pela mucosa oral suína, obtida com176aplicação das membranas nanoestruturadas carregadas com 10% de MTZ,sobre condições de dosagem infinita (média ± SEM, n=6).

Figura 5.1. Resultados comparativos de mucoadesão, por adsorção de mucina,181entre membranas eletrofiadas.

Figura 5.2. Membranas aderidas a mucosa oral suina ao final do teste de 184 Tempo de Mucoadesão (após 24 h em banho 37°C e em agitação 50 rpm) sendo (a) membrana de CA revestida de SA, (b) membrana de SA/PEO e (c) imagem mostrando descolamento forçado da membrana de SA/PEO com espátula.

Figura 5.3. Parte superior da membranas de CA revestida com QUIT ainda186aderidas a mucosa oral suina ao final do teste de Força de destacamento eTrabalho de Mucoadesão.

### LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1.</b> Condições experimentais utilizadas para preparação das soluções de Alginato /PEO em água deionizada.	64
<b>Tabela 2.2.</b> Condições experimentais utilizadas para preparação das soluções de Alginato /PEO em água deionizada/acetona.	64
<b>Tabela 2.3.</b> Condições experimentais utilizadas para preparação das soluçõesde Alginato /PEO em água deionizada/etanol.	65
<b>Tabela 2.4.</b> Condições experimentais utilizadas no DOE para reticulação dasmembranas de Alginato/PEO.	67
<b>Tabela 2.5.</b> Condições experimentais utilizadas na preparação das amostras demembranas de SA/PEO reticuladas.	69
<b>Tabela 2.6.</b> Condições experimentais utilizadas na preparação das soluções de Quitosana/PEO.	70
<b>Tabela 3.1.</b> Parâmetros experimentais utilizados para eletrofiação de nanofibras de SA/PEO para pré-testes.	89
<b>Tabela 3.2.</b> Parâmetros experimentais utilizados para eletrofiação de nanofibrasde SA/PEO no DOE I.	92
<b>Tabela 3.3.</b> Resultados experimentais para análise da solução de SA/PEO em Água.	93
<b>Tabela 3.4.</b> Parâmetros experimentais utilizados para eletrofiação de nanofibrasde SA/PEO no DOE II.	97
<b>Tabela 3.5.</b> Resultados experimentais para análise da solução de SA/PEO em Água.	97
<b>Tabela 3.6.</b> Resultados experimentais para análise da solução de SA/PEO (50:50) em acetona/água.	104
<b>Tabela 3.7.</b> Resultados experimentais para análise da solução de SA/PEO (50:50) com etanol.	105

**Tabela 3.8.** Resultados experimentais para análise da solução de SA/PEO com109etanol.

Tabela 3.9.Resultados obtidos para reticulação das membranas de120Alginato/PEO.

Tabela 3.10.Resultados obtidos nos testes de perda de massa e129intumescimento das amostras de SA/PEO reticuladas, após 4 h de incubaçãoem solução tampão Fosfato e em solução saliva artificial.

**Tabela 3.11.** Resultados dos testes de perda de massa das amostras SA/PEO130reticuladas, após 10 h de incubação em solução tampão Fosfato e SalivaArtificial.

Tabela 3.12.Resultados obtidos para testes de perda de massa e134Intumescimento para amostras de SA/PEO reticuladas, após 4, 10 e 24h deincubação, em solução tampão Fosfato e em solução saliva artificial.

**Tabela 3.13.** Resultados experimentais para análise da solução de QUIT/PEO.138

**Tabela 3.14**. Dados obtidos na dissolução da membrana de QUIT/PEO em141água a 37ºC:

**Tabela 3.15**. Dados obtidos na dissolução parcial por 10 horas da membrana142de QUIT/PEO em solução tampão fosfato e em solução saliva artificial a 37ºC:

**Tabela 3.16**. Dados obtidos na dissolução por 24 horas da membrana de143QUIT/PEO em solução tampão fosfato e em solução saliva artificial a 37ºC:

**Tabela 3.17.** Resultados experimentais para análise da solução de QUIT/PEO,145teste novo lote.145

**Tabela 3.18.** Perda de massa e intumescimento para membranas162SA/QUIT/PEO.

**Tabela 4.1.** Tamanho do halo de inibição de *A. Actinomycetemcomitans* nos166testes microbiológicos, em função da concentração de fármaco MTZincorporado nas membranas de nanofibras.

**Tabela 4.2.** Valores médios de fluxo estado estacionário  $(J_{ss})$ , time lag e177quantidade total liberada em 5h  $(Q^{5h})$  para permeação através da mucosa oralsuína de MTZ encapsulado em membranas nanoestruturadas (n=6).

**Tabela 5.1.** Valores médios para Tempo de Mucoadesão (n=6) para183membranas nanoestruturadas.

**Tabela 5.2.** Valores médios para Força de destacamento e Trabalho de185Mucoadesão (n=6) para membranas nanoestruturadas.

### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	-	Absorbância
ANOVA	-	Análise de Variança
ATCC	-	American Type Culture Collection
BHI	-	Brain Heart Infusion
CA	-	Acetato de Celulose
DMAc	-	N, N - Dimetilacetamida
COD	-	Código do produto
СР	-	Carbopol
D	-	Distância entre agulha e o coletor
DMEM	-	Meio Essencial Mínimo de Eagle modificado por Dulbecco.
DRX	-	Difração de Raio-X
DSC	-	Calorimetria Diferencial de Varredura
DOE	-	Design of experiments
EDTA	-	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FTIR	-	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourrie
HPC	-	Hidroxipropil celulose
HPLC	-	Cromatografia Liquida de Alta Eficiência
MET	-	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	-	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTZ	-	Metronidazol
PAA	-	Poli (Ácido Acrílico)
PEO	-	Poli (óxido de etileno)
РНВ	-	Poli (Ácido Hidoxibutírico)

QUIT	-	Quitosana
R	-	Vazão de alimentação do polímero
SA	-	Alginato de sódio
SACA	-	Alginato/CaCl <sub>2</sub> /Quitosana
TGA	-	Termogravimetria
UR	-	Umidade Relativa
UV-Vis	-	Espectrometria na região UV Visível
V	-	Voltagem aplicada

## SUMÁRIO

1	CAPÍTULO 1	32
1.1.	Introdução	32
1.2.	Revisão Bibliográfica	35
1.2.1.	Processo de Eletrofiação	35
1.2.1.1.	Fatores que influenciam o processo de eletrofiação	38
1.2.1.1.1.	Parâmetros de Processo	38
1.2.1.1.2.	Parâmetros da Solução	40
1.2.1.1.3.	Parâmetros do Ambiente	42
1.2.2.	Alginato e Quitosana – Reticulação e Policomplexação	43
1.2.3.	Doenças Periodontais	47
1.2.4.	Metronidazol	50
1.2.5.	Sistemas de liberação de fármacos	51
1.2.6.	Mucoadesão	54
1.2.6.1.	Processos de mucoadesão	54
1.2.6.2.	Mucoadesão por adsorção de mucina	56
1.2.7.	Polímeros mucoadesivos em sistemas de liberação de fármacos	58
1.3.	Objetivo Principal	61
1.4.	Objetivos Específicos	61
2	CAPÍTULO 2 – MATERIAIS E MÉTODOS	63
2.1	Materiais	63
2.2	Membranas de Alginato/PEO	63
2.2.1	Preparação das soluções poliméricas de Alginato/PEO	63
2.2.1(a)	Solução de Alginato/PEO em água deionizada	63
2.2.1(b)	Solução de Alginato/PEO em água deionizada com adição de acetona	64
2.2.1(c)	Solução de Alginato/PEO em água deionizada com adição de etanol	65
2.2.1(d)	Soluções poliméricas de Alginato/PEO com Metronidazol	65

2.2.2	Eletrofiação das soluções de Alginato/PEO	65
2.2.2(a)	Nanofibras de Alginato/PEO puras	65
2.2.2(b)	Nanofibras de Alginato/PEO com Metronidazol	66
2.2.3	Reticulação das membranas de Alginato/PEO	67
2.2.3(a)	Reticulação iônica com CaCl $_2$ em etanol	67
2.2.3(b)	Reticulação pela complexação com Quitosana	68
2.2.4.	Membranas de Quitosana/PEO	69
2.2.4.1.	Preparação das Soluções de Quitosana/PEO	69
2.2.4.1(a)	Soluções poliméricas de Quitosana/PEO puras	69
2.2.4.1(b)	Soluções poliméricas de Quitosana/PEO com Metronidazol	70
2.2.4.2	Eletrofiação soluções de Quitosana/PEO	70
2.2.4.2(a)	Nanofibras de Quitosana/PEO puras	70
2.2.4.2(b)	Nanofibras de Quitosana/PEO com MTZ	71
2.2.4.3	Reticulação das Membranas de Quitosana/PEO com vapor de Glutaraldeído	71
2.2.5.	Membranas de Acetato de Celulose	72
2.2.5.1	Soluções de Acetato de Celulose com Metronidazol	72
2.2.5.2	Eletrofiação das soluções poliméricas de Acetato de Celulose com Metronidazol	72
2.2.5.3	Membranas de Acetato de celulose recobertas com quitosana	72
2.2.5.4.	Membranas de Acetato de Celulose recobertas com Alginato	73
2.2.6.	Membranas de nanofibras coaxiais de Alginato/Quitosana/PEO	73
2.2.7.	Caracterização das soluções poliméricas	74
2.2.8.	Caracterização das membranas eletrofiadas	75
2.2.8.1.	Microscopia Eletrônica de varredura (MEV)	75
2.2.8.2.	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	75
2.2.8.3.	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	76
2.2.8.4.	Teste de Intumescimento	76

2.2.8.5.	Percentual de Perda de Massa	76
2.2.9.	Testes de Liberação do Fármaco	77
2.2.9.1.	Quantificação do Metronidazol	77
2.2.9.2.	Teste de liberação de Metronidazol (MTZ)	77
2.2.10.	Análise Microbiológica	78
2.2.11.	Análise Citotoxicológica - Ensaio de Viabilidade Celular	79
2.2.11.1.	Linhagens celulares	79
2.2.11.2.	Cultivo celular	79
2.2.11.3.	Ensaio de viabilidade celular	80
2.2.12.	Teste de permeação do Metronidazol em mucosa bucal suina	81
2.2.12.1.	Quantificação Metronidazol	81
2.2.12.2.	Preparação do tecido para estudo permeação	82
2.2.12.3.	Experimento de permeação	83
2.2.13.	Ensaio <i>in vitro</i> de mucoadesão por mucina	84
2.2.14.	Ensaio <i>in vitro</i> de tempo de mucoadesão	84
2.2.15.	Ensaio <i>in vitro</i> de força de mucoadesão	86
3	CAPÍTULO 3 – DESENVOLVIMENTO DAS MEMBRANAS NANOESTRUTURADAS - RESULTADOS E DISCUSSÃO	89
3.1	Membranas de Alginato de sódio (SA) /Poli (óxido de etileno) - (PEO)	89
3.1.1.	Pré-testes para definição dos parâmetros do DOE para eletrofiação SA/PEO	89
3.1.2.	Planejamento de Experimentos para preparação das membranas de SA/PEO	91
3.1.2.1.	Análise da Influência da Concentração	92
3.1.2.2.	Efeito Umidade Relativa	100
3.1.2.3.	Efeito do tempo de preparo da solução	102
3.1.2.4.	Análise da Influência da Adição de um cossolvente	103
3.1.2.4. (a)	Adição Acetona	103

3.1.2.4. (b)	Adição Etanol	105
3.1.2.5.	Aumento da quantidade de SA na solução polimérica	107
3.1.2.6.	Efeito 3D	110
3.1.3.	Testes de reticulação	119
3.1.4.	Incorporação do fármaco Metronidazol em membranas de SA/PEO	135
3.2.	Membranas de Quitosana/PEO	135
3.2.1.	Preparação das Membranas	136
3.2.2.	Testes de reticulação	139
3.2.3.	Efeito troca de lote da quitosana Sigma	144
3.2.4.	Incorporação do fármaco Metronidazol na membrana QUIT/PEO	146
3.3.	Preparação das Membranas Revestidas de Acetato de Celulose	147
3.3.1.	Nanofibras de Acetato de Celulose com Metronidazol	147
3.3.2.	Revestimento da Membrana com Nanofibras de Quitosana	147
3.3.3.	Revestimento da Membrana com Nanofibras de Alginato	151
3.4.	Preparação das Membranas de nanofibras coaxiais de SA/QUIT/PEO	151
3.5	Conclusões	163
4	CAPÍTULO 4 – LIBERAÇÃO DO FÁRMACO METRONIDAZOL- RESULTADOS E DISCUSSÃO	165
4.1	Testes Microbiológicos	165
4.2	Testes Citotoxicológicos – Ensaios de Proliferação Celular	166
4.2.1	Membranas de QUIT/PEO	166
4.2.2	Membranas de Acetato de Celulose	169
4.2.3	Membranas de Nanofibras de SA/PEO	170
4.3	Teste de Liberação do fármaco metronidazol	171
4.3.1	Construção da Curva de Calibração	172
4.3.2	Teste de Liberação do fármaco Metronidazol	173
4.3.3.	Teste de Permeação Metronidazol em mucosa bucal suína	175

4.4.	Conclusões	178
5	CAPÍTULO 5 CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS MUCOADESIVOS. - RESULTADOS E	180
5 1	DISCUSSAO	100
5.1.1.	Mucoadesão por adsorção de mucina	180
5.1.2.	Tempo de Mucoadesão	182
5.1.3.	Força de Mucoadesão	184
5.2.	Conclusões	187
6	CAPÍTULO 6	188
	Conclusão Geral	188
7	Sugestões de Trabalhos Futuros	190
8	Referências	191
9	Apêndice	204
9.1.	Modelo da Régua utilizada para avaliação das membranas nanoestruturadas	204
9.2.	Produção Científica Durante o Doutorado	205

# **CAPÍTULO 1**

## 1.1. INTRODUÇÃO

A tecnologia de liberação controlada de fármacos apresenta-se como um desafio interdisciplinar para farmacêuticos, químicos, biólogos, engenheiros e para a comunidade da área da saúde (SIVAKUMAR et al., 2002). O desenvolvimento de polímeros para liberação controlada de fármacos vem crescendo rapidamente desde a década de 60, com um grande avanço na síntese e fabricação de sofisticados sistemas poliméricos (HUANG et al., 2003).

Dispositivos poliméricos para liberação controlada de fármacos têm inúmeras vantagens, comparadas às formas normais de dosagem (VERRECK et al., 2003). Uma delas, por exemplo, diz respeito aos fármacos com um tempo médio de vida curto que podem ser protegidos da degradação enzimática. Além disso, os níveis de fármacos no plasma são continuamente mantidos em uma faixa terapêutica desejável, sendo que os efeitos colaterais nocivos observados na administração convencional podem ser reduzidos, ou eliminados, pela administração local. Entretanto, existem muitos problemas a serem resolvidos na área de desenvolvimento e pesquisa, como por exemplo, a baixa eficácia de certos sistemas de liberação controlada de fármacos, e o efeito de disparo inicial de grande quantidade da droga no organismo (*burst release*) (ZENG et al., 2003).

A administração de fármacos de maneira fisiologicamente aceitável pelos pacientes tem sido sempre uma preocupação da área médica (VERMA et al., 2011). Entre as várias vias de administração de fármacos, a via oral é a preferida do paciente e do médico (VERMA et al., 2011). No entanto, a administração oral tem desvantagens observadas como: metabolismo de primeira passagem hepática (onde a concentração do fármaco é significativamente reduzida pelo fígado antes de atingir a circulação sistêmica), degradação enzimática dentro do trato gastro intestinal, dificuldade de deglutição de alguns pacientes e dificuldade motora, especialmente em comprimidos, via não invasivo, além de certas classes de fármaco não poderem ser administradas por via oral, especialmente peptídeos, proteínas e vacinas (VERMA et al., 2011). Ao longo do tempo, os cientistas e investigadores nas

indústrias farmacêuticas estão centrados em rotas alternativas de administração de fármaco, com o objetivo de superar os inconvenientes da via oral.

As mucosas de absorção são consideradas sítios potenciais para a administração de princípios ativos. As rotas transmucosas para administração de medicamentos via circulação sistêmica (ou seja, o revestimento mucoso nasal, retal, ocular, vaginal e a cavidade oral) oferecem vantagens distintas sobre a administração por via oral para a entrega sistêmica da droga (SINGH et al., 2011).

Mesmo que as mucosas retal, ocular e vaginal, ofereçam vantagens certas, a cavidade bucal é a mais aceita pelos doentes (VERMA et al., 2011). Ela apresenta muitas vantagens para a liberação de fármacos, entre elas podemos citar (VERMA et al., 2011): (1) mucosas são altamente vascularizadas e qualquer droga que se difunda através da membrana tem acesso direto à circulação sistêmica; (2) evita o efeito de primeira passagem hepática e a exposição do fármaco nos fluidos gastrointestinais; (3) fácil acesso aos locais para aplicação e remoção dos sistemas de liberação; (4) melhora o desempenho de muitos fármacos, pelo tempo de contato prolongado na mucosa; (5) aceitação do paciente em comparação com outros sistemas de administração não oral; (6) tolerância, em comparação com a mucosa nasal e dérmica, para sensibilização potencial; (7) o maior tempo de residência pode levar a dosagens mais baixas de administração; (8) a presença de saliva garante quantidade relativamente grande de água para a dissolução de fármaco, ao contrário da membrana retal e transdérmica; (9) fornece uma rota alternativa para a administração de vários hormônios, analgésicos, esteroides, enzimas, agentes cardiovasculares; (10) sistema pouco invasivo em comparação as vias injetáveis, entre outros.

O desenvolvimento de um sistema bucoadesivo ideal para liberação de fármacos, como proposto neste trabalho, ainda se apresenta como um desafio para a área científica. Podemos citar como algumas características desejáveis para estes sistemas (VERMA et al., 2011): (1) a força de adesão mecânica à mucosa bucal deve ser adequada; (2) a liberação da droga deve ser realizada de forma controlada; (3) devem facilitar a taxa de absorção do fármaco; (4) devem ter boa aceitação do paciente; (5) não devem dificultar as funções normais como falar, comer e beber; (6) devem realizar a liberação unidirecional da droga no sentido da mucosa; (7) não

devem incentivar o desenvolvimento de infecções secundárias, como cáries; (8) devem ter uma boa resistência à ação de lavagem de saliva; (9) ter gosto aceitável.

Sistemas de entrega de fármaco via transmucosa oral geralmente são projetados para liberação rápida da droga e ação imediata, com rápido aparecimento desta na circulação sistêmica. Além disso, é esperado que a concentração da droga dentro do perfil terapêutico se mantenha numa faixa constante e que a liberação dure o período necessário de tempo (PATEL et al., 2011).

Várias empresas estão atualmente envolvidas no desenvolvimento e comercialização de tecnologias de liberação de fármaco, com base no sistema via transmucosa oral, devido às vantagens já descritas anteriormente. Uma das maiores limitações associadas com estes sistemas, é a dificuldade de sua fixação no local de absorção. Assim, faz-se necessário focarmos nossas pesquisas no sentido de melhorar a adesão dos dispositivos de liberação, especialmente utilizando sistemas mucoadesivos (PATEL et al., 2011) como o proposto neste trabalho.

O uso de membranas de nanofibras eletrofiadas, como agentes carreadores para fármacos, tem mostrado um futuro amplo em aplicações biomédicas, segundo a literatura científica (HUANG et al., 2003). A utilização de nanofibras poliméricas para sistemas de liberação de fármacos é baseada no princípio que a taxa de dissolução da partícula do fármaco aumenta com o aumento da área superficial da matriz (HUANG et al., 2003). Comparando-se com outras formas farmacêuticas, existem várias vantagens em se usar nanofibras eletrofiadas. Os fármacos podem ser convenientemente incorporados aos polímeros, antes ou durante a eletrofiação; além disso, o perfil de liberação da droga pode ser projetado por uma modulação da morfologia, da porosidade e da composição da membrana de nanofibras (HUANG et al., 2006).

Ao longo das últimas décadas, o conceito de utilização de polímeros bioadesivos, para prolongar o tempo de contato com a mucosa, ganhou notável atenção na liberação da droga via transmucosa (PATEL et al., 2011). No início dos anos 1980, o pioneiro no conceito de mucoadesão, professor Joseph R. Robinson da Universidade de Wisconsin, desenvolveu uma nova estratégia para prolongar o tempo de residência de vários fármacos na superfície ocular. Ao longo dos anos, os polímeros mucoadesivos mostraram-se capazes de aderir a várias outras

membranas mucosas. Muitas pesquisas ao longo dos últimos anos têm resultado em avanços profundos na compreensão dos conceitos e aspectos da mucoadesão (PATEL et al., 2011).

Na área odontológica a nossa contribuição se baseia em um dos grandes problemas de saúde da maioria da população brasileira, os problemas de saúde bucal. Esses problemas podem ser desenvolvidos tanto pelas imensas dificuldades de acesso aos serviços assistenciais ou medicamentos, quanto pelo material a preços inacessíveis (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

A escolaridade deficiente, a baixa renda, a falta de trabalho e de informações, junto com a má qualidade de vida, produzem efeitos devastadores sobre gengivas, dentes e outras estruturas da boca. Alem de infecções e dores, o psicológico de pacientes edêntulos pode ficar alterado devido sua baixa autoestima, chegando a isola-lo do convívio social (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

No Brasil, segundo o ministério da saúde (PROJETO SB BRASIL 2003: condições de saúde bucal da população brasileira 2002-2003: resultados principais), 53,5% dos indivíduos entre 15 a 19 anos e 66,71 % dos indivíduos entre 35 e 44 anos apresentam doenças periodontais. Tais doenças compreendem um grupo de infecções e condições inflamatórias, como gengivite e periodontite, que afetam os dentes e as estruturas de apoio. Isso leva a formação de bolsas entre a gengiva e os dentes que pode evoluir até a perda dos mesmos (BRUSCHI et al., 2006).

Com base nas informações encontradas na literatura científica, o desenvolvimento de um sistema para liberação bucal de fármaco com alta adesão apresenta-se como uma opção inovadora de novos materiais para a área odontológica podendo ser estendido para área médica dependendo do fármaco a ser incorporado.

## 1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 1.2.1. Processo de Eletrofiação

O processo de eletrofiação para produção de nanofibras poliméricas se tornou muito atrativo devido a sua metodologia de baixo custo, produzindo nanofibras a partir de uma grande variedade de materiais, de um modo relativamente simples, repetitivo e de fácil construção, sendo o único método que pode ser desenvolvido para produção em massa (RAMAKRISHNA et al., 2005).

Eletrofiação é basicamente o processo para produzir nanofibras através de um jato induzido por uma carga elétrica, de uma solução de polímero ou polímero fundido (UYAR et al., 2009). Tipicamente, eletrofiação é aplicada a uma gama de polímeros que são convencionalmente fiados como polioleofinas, poliamidas, poliésteres, aramidas e acrílicos; bem como biopolímeros como proteínas (MATTHEWS et al., 2002), DNA, polipeptídeos, polissacarídeos dentre outros. Muitas proteínas também têm sido eletrofiadas incluindo colágeno, gelatina (WNEK et al., 2003), fibrinogênio e seda. Dentre os polissacarídeos eletrofiados atualmente estão a celulose, o acetato de celulose, a quitina (PARK et al., 2006), a quitosana (KRIEGEL et al., 2009), o alginato (MOON et al., 2009), o acido hialurônico (OKAMOTO et al., 2004) e a dextrana.

Os equipamentos básicos de um aparato de eletrofiação, Figura 1.1 incluem uma agulha de pequeno diâmetro, uma fonte de alta voltagem e um coletor de metal (RAMAKRISHNA et al., 2005). O processo baseia-se em um eletrodo, que é conectado a uma fonte de alta voltagem até o tubo capilar, contendo a solução polimérica, e outro eletrodo no coletor. O tubo capilar e o coletor são mantidos a uma pequena distância um do outro. Uma chapa, de cobre ou de alumínio, tem sido normalmente utilizada como coletor das fibras durante o processo de eletrofiação. A solução de polímero é forçada através do embolo da seringa até a agulha, por gravidade ou por uma bomba. Inicialmente, como resultado da tensão de superfície, uma gota da solução fica pendente na ponta da agulha. O campo elétrico submetido na ponta do tubo capilar, que contém a solução polimérica, induz uma carga na superfície do líquido. Cargas de repulsão e contração mutua, na superfície carregada do contra eletrodo, causam uma força diretamente oposta à tensão de superfície. Aumentando-se o campo elétrico a valores críticos, as forças eletrostáticas superam a tensão superficial e ocorre a formação de um jato do fluido que é ejetado, seguindo o movimento cônico conhecido como cone de Taylor. No tempo entre a saída da seringa e o depósito no coletor, o solvente evapora e fibras
secas são depositadas. A fibra coletada normalmente se apresenta na forma de uma manta parecida com um não tecido (Ribeiro Neto et al.,2012).



**Figura 1.1.** Desenho esquemático do equipamento de eletrofiação (RAMAKRISHNA et al., 2005).

Embora o fundamento da eletrofiação seja simples, o processo é complexo devido ao grande número de parâmetros que influenciam o formato, o diâmetro e as dimensões da fibra resultante. Considerando que um polímero seja apto à formação de nanofibras, as características ideais que elas devem apresentar são: (1) diâmetros com valores estáveis e controláveis; (2) superfície da fibra livre de defeitos ou com defeitos controláveis e (3) nanofibras contínuas. Dentre estes parâmetros podemos citar a viscosidade da solução, a condutividade elétrica, a tensão de superfície, a massa molecular do polímero e sua distribuição, a força do campo elétrico, a natureza do contra eletrodo e a atmosfera do processamento (RAMAKRISHNA et al., 2005). Dessa forma é necessária a utilização de uma metodologia eficiente para o desenvolvimento de nanofibras a partir do processo de eletrofiação, que obtenha uma resposta rápida e confiável na avaliação de múltiplos fatores. Dentre estas metodologias podemos citar o DOE (Design of Experiments), uma ferramenta estatística onde se utiliza o planejamento fatorial (NISTA et al., 2012a). Esta metodologia apresenta-se atualmente como uma ferramenta de importância inigualável em projetos de pesquisa acadêmica, bem como em aplicações industriais, sendo esta a que será aplicada neste trabalho. Através dessa técnica é possível planejar o experimento, de forma a obter-se exatamente o tipo de informação desejada, num tempo e custo menores (BENÍCIO et al., 2001). Pelo planejamento fatorial pode-se determinar a influência de um ou mais parâmetros sobre outra variável de interesse, tornando possível observar efeitos de interação que não seriam possíveis de otimizar com estudos univariados. Deste modo, o efeito de parâmetros de fiação, tais como a concentração da solução, tensão, distância e velocidade de rotação, no diâmetro das fibras podem ser determinados com o auxilio de um DOE (NISTA et al., 2012a).

### 1.2.1.1. Fatores que influenciam o processo de eletrofiação

Como já citado, alguns parâmetros podem influenciar a transformação das soluções poliméricas em nanofibras, dentre estes podemos citar Parâmetros de Processo, Parâmetros da Solução e Parâmetros do Ambiente.

### 1.2.1.1.1. Parâmetros de Processo

Um elemento crucial na eletrofiação é a aplicação de alta voltagem na solução. A alta voltagem irá induzir a carga necessária na solução e, junto com o campo elétrico externo, irá iniciar o processo de eletrofiação quando as forças eletrostáticas na solução superarem a tensão superficial. Geralmente, voltagens (positivas ou negativas) maiores que 6kV são suficientes para romper a gota e formar o cone de Taylor.

Se a voltagem aplicada é alta, uma grande quantidade de cargas irá causar uma aceleração rápida no jato e um maior volume de solução irá sair da ponta da agulha. Isto resulta em um cone de Taylor maior e menos estável (RAMAKRISHNA et al., 2005; NISTA et al., 2012b). Assim, o suprimento de alta voltagem resulta em um campo elétrico que influenciará a morfologia da fibra obtida.

Na maioria dos casos, a alta voltagem irá levar ao maior estiramento da solução devido às grandes forças de Coulomb no jato. Esses feitos levam a redução do diâmetro da fibra e também garantem uma evaporação mais rápida do solvente e

a secagem da mesma. Porém, alta voltagem pode gerar formação de contas, devido a um aumento da instabilidade do jato e o recuo do cone de Taylor para a agulha. Assim, o efeito da voltagem não somente é responsável pela aparência física da fibra, mas também pela sua cristalinidade. O campo elétrico formado pode causar maior ordem nas moléculas de polímero, durante a eletrofiação, induzindo a uma maior cristalinidade (RAMAKRISHNA et al., 2005; NISTA et al., 2012b).

A vazão polimérica por sua vez irá determinar a quantidade de solução disponível para eletrofiação. Para uma dada voltagem, existe uma vazão correspondente para manter um cone de Taylor estável. Quando a vazão é aumentada, existe um aumento correspondente no diâmetro da fibra ou pode ocorrer à formação de contas.

Quando um grande volume de solução é alimentado na ponta da agulha, o solvente depositado na fibra pode não ter tempo suficiente para evaporar totalmente, causando fibras fundidas com aspecto de uma teia. Portanto, a baixa vazão é desejada, pois o solvente terá maior tempo para evaporar-se (RAMAKRISHNA et al., 2005; NISTA et al., 2012b).

O coletor utilizado no processo de eletrofiação também apresenta uma grande influencia na formação das nanofibras. A existência de um campo elétrico entre a fonte e o coletor é essencial para iniciar a eletrofiação, sendo este o parâmetro mais importante. O coletor deve ser feito de um material condutor, como uma folha ou placa de alumínio ou cobre, eletricamente aterrado para que haja uma diferença de potencial estável entre a fonte e o coletor (vide Figura 1.1). Quando um coletor não condutor é utilizado, as cargas rapidamente se acumulam, resultando em poucas fibras depositadas. Para um coletor condutor, as cargas das fibras devem ser dissipadas para que o mesmo promova uma maior atração das mesmas (RAMAKRISHNA et al., 2005; NISTA et al., 2012b).

Para um coletor condutivo, quando a velocidade de depósito é alta, e a malha da fibra é espessa o suficiente, poderá ocorrer um alto acúmulo de carga residual nesta malha, já que polímeros geralmente não são condutores. Quando isso acontece, é comum se observar a olho nu, pequenas depressões na malha da fibra.

A temperatura da solução polimérica tem o efeito de aumentar a taxa de evaporação do solvente e reduzir a viscosidade de uma solução polimérica. Com

viscosidades mais baixas, devido ao aumento da temperatura, aumenta-se a mobilidade das moléculas de polímero, assim as forças eletrostáticas são capazes de exercer uma força maior sobre a solução, estirando mais a mesma e, consequentemente, resultando em fibras de menor diâmetro (RAMAKRISHNA et al., 2005; NISTA et al., 2012b).

Quanto ao diâmetro interno da agulha por onde flui a solução, este tem efeito no processo de eletrofiação. Diâmetros internos menores são procurados para reduzir o entupimento, devido a menor exposição do solvente à atmosfera durante o processamento, além de reduzir o diâmetro da fibra (RAMAKRISHNA et al., 2005; NISTA et al., 2012b).

Variando a distância entre a agulha e o coletor, teremos uma influência direta no tempo entre a saída da solução da ponta da agulha e seu depósito, e também no campo elétrico formado. Se o tempo de percurso da solução for grande, teremos uma secagem melhor da fibra; porem, se este for curto, a mesma poderá não secar e se depositar ainda úmida, gerando a fusão das fibras entre si. Diminuindo-se a distância, temos também o efeito do aumento do campo elétrico que, como dito anteriormente, pode aumentar a instabilidade do jato e propiciar a formação de contas (RAMAKRISHNA et al., 2005 NISTA et al., 2012b).

### 1.2.1.1.2. Parâmetros da Solução

Dentre os parâmetros da Solução, a Viscosidade da Solução Polimérica e o Peso Molecular do polímero são fatores fundamentais parta a formação de nanofibras. Uma das condições necessárias para a eletrofiação ocorrer com formação das fibras, é que um polímero em solução tenha peso molecular adequado, além da viscosidade da solução. Como o jato sai da ponta da agulha durante a eletrofiação, a solução de polímero é estirada e viaja até o coletor plano. A eletrofiação envolve um estiramento rápido do jato eletrificado e uma rápida evaporação do solvente. Deste modo, as cadeias poliméricas emaranhadas experimentam uma forte força de cisalhamento durante o processo de eletrodeposição e solidificam rapidamente quando atingem o coletor, impedindo sua volta às condições de equilíbrio (RAMAKRISHNA et al., 2005 NISTA et al., 2012b). O peso molecular do polímero, que pode ser representado pelo comprimento médio das cadeias poliméricas, tem um efeito direto na viscosidade da solução, já que esta será função do nível de emaranhamento das cadeias poliméricas no solvente.

Similarmente ao aumento do peso molecular, um aumento na concentração irá resultar em um maior entrelaçamento das cadeias poliméricas na solução, o que é necessário para manter a continuidade do jato durante o processo de eletrofiação.

O jato eletrofiado, por sua vez, pode dividir-se em pequenas gotículas e resultar em contas ao longo da fibra, como efeito de uma instabilidade hidrodinâmica. A baixa viscosidade é comum encontrar contas depositadas ao longo das fibras, devido a uma grande quantidade de moléculas de solvente e poucas cadeias entrelaçadas, o que faz com que a tensão superficial seja o fator dominante do sistema ao longo do jato eletrofiado gerando instabilidade no mesmo. A viscosidade muito alta a solução pode secar na ponta da agulha, antes da eletrofiação ser iniciada (RAMAKRISHNA et al., 2005; NISTA et al., 2012b). Assim, um balanço é necessário para o sucesso da eletrofiação. Durante a eletrofiação, pode ocorrer a formação de um segundo jato a partir do jato principal, o qual é estável o suficiente para produzir fibras de pequenos diâmetros a uma dada viscosidade. Quando a viscosidade é alta o suficiente, a formação do segundo jato é pouco provável, sendo apenas o jato principal que irá contribuir para uma fibra com maior diâmetro.

A tensão superficial da solução polimérica também se apresenta como um fator decisivo na obtenção das nanofibras pelo processo de eletrofiação. Na eletrofiação, as cargas da solução polimérica devem ser altas o suficiente para vencer a tensão superficial da solução. A tensão de superfície tem o efeito de diminuir a área da superfície, por unidade de massa de um fluido. Na eletrofiação, quando a concentração de moléculas livres no solvente é grande, existe uma grande tendência das moléculas do solvente se agregarem e tomarem a forma esférica, como resultado da tensão superficial. Neste caso, ocorrerá o fenômeno denominado electrospray onde a solução se agregará em gotas, ou ocorrerá a formação da nanofibra com a presença de contas (RAMAKRISHNA et al., 2005; NISTA et al.,

2012b). Com o aumento da viscosidade da solução, ocorrerá uma interação maior entre o solvente e as moléculas do polímero e, assim, quando a solução for estirada pela influência das cargas, as moléculas do solvente que estão difundidas entre as moléculas do polímero, não conseguirão se agregar, reduzindo assim a influência da tensão superficial (RAMAKRISHNA et al., 2005; NISTA et al., 2012b). Em outras palavras, teremos uma maior interação entre as moléculas evitando a formação da instabilidade do jato.

Eletrofiação envolve estiramento da fibra causada por repulsão das cargas na sua superfície. Assim, se a condutividade elétrica da solução polimérica aumenta mais cargas podem ser carregadas pelo jato. A condutividade da solução polimérica pode ser aumentada pela adição de íons. Pequenas quantidades de sal ou polieletrólitos, podem ser adicionados à solução para aumentar as cargas e, como consequência, ocorrerá o estiramento da fibra sem a formação de contas e aumentará a probabilidade de fibras com menor diâmetro. Assim, o aumento do estiramento da solução reduz o diâmetro das fibras, já que a presença de íons aumenta a condutividade da solução. Assim à voltagem crítica para ocorrer a eletrofiação diminui; entretanto, existe um limite para a redução no diâmetro das fibras. Outro efeito do aumento das cargas é a grande instabilidade formada e, como resultado, temos um aumento na área de deposição das fibras (RAMAKRISHNA et al., 2005; NISTA et al., 2012b).

### 1.2.1.1.3. Parâmetros do Ambiente

A umidade do ambiente pode ter influencia na solução do polímero durante a eletrofiação, principalmente em polímeros hidrofóbicos. A alta umidade aumenta a facilidade de condensação de água na superfície da fibra, influenciando na sua morfologia. Esta umidade pode causar poros circulares na superfície da fibra, cujos tamanhos aumentam com o aumento da umidade, até a formação de estruturas não uniformes. Isto ocorre porque o vapor de água condensa na superfície das fibras durante o jato, devido ao resfriamento das suas superfícies causado pela evaporação rápida dos solventes voláteis. Os poros são, portanto, formados, tanto quando a água ou o solvente evaporam (RAMAKRISHNA et al., 2005; NISTA et al., 2012b). Para polímeros hidrofílicos, alta umidade pode dificultar a evaporação do solvente durante o processo de eletrofiação, dificultando ainda mais o processo podendo gerar fibras fundidas.

A composição do ar ambiente também tem efeito na eletrofiação, uma vez que diferentes gases têm diferentes comportamentos no campo eletrostático. Quando utilizamos atmosfera de gases com maior tensão de ruptura, como o freon, as fibras obtidas têm duas vezes o diâmetro das obtidas em outras condições (RAMAKRISHNA et al., 2005; NISTA et al., 2012b). Por sua vez, a redução da pressão ao redor do jato de eletrofiação não melhora o processo, em geral. Quando a pressão atmosférica é baixa, a solução de polímero na seringa terá uma grande tendência de fluir para fora da agulha, causando instabilidade no jato inicial e, assim, impossibilitando a fiação devido à descarga direta das cargas elétricas (RAMAKRISHNA et al., 2005; NISTA et al., 2012b).

### 1.2.2. Alginato e Quitosana – Reticulação e Policomplexação

Os polieletrólitos são macromoléculas que tem um papel importante no transporte de um número relativamente grande de grupos funcionais carregados, ou que podem tornar-se carregados. Eles podem ter a função de policátions ou poliânions, uma vez que a carga líquida destas macromoléculas em solução depende dos grupos funcionais, que podem estar carregados positiva ou negativamente, dependendo do pH do meio. (SIMSEK-EGE et al., 2003).

A quitosana e o alginato são polieletrólitos bem conhecidos, biocompatíveis, biodegradáveis e mucoadesivos, permitindo várias aplicações farmacêuticas e biomédicas (SARMENTO et al., 2007). Podem ser utilizados como agentes espessantes, na indústria alimentícia; como sistemas de liberação de fármaco, em aplicações farmacêuticas, e como biomateriais em cultura de células e cicatrização de feridas. Estes dois polissacarídeos também podem ser usados em conjunto, formando um complexo polieletrolítico, muito utilizado para encapsular proteínas, células e enzimas. (SIMSEK-EGE et al., 2003).

A quitosana é a forma acetilada da quitina, que é obtida após o tratamento da quitina com NaOH, Figura 1.2, mostra unidades acetiladas (2acetoamido-2deoxi-D-glicopiranose) e desacetiladas (2-amino-deoxi-D- glicopiranose), unidas por ligações glicosídicas, com predominância das unidades desacetiladas (KLEINUBING et al., 2013). A quitosana é normalmente extraída de casca de crustáceos como camarão, caranguejo e lagosta. Este mesmo polímero também pode ser encontrado nas cascas de alguns insetos, tais como besouros, e em alguns fungos (KNAUL et al., 1999). Ela tem sido investigada como veículo de entrega oral de fármaco, porque é capaz de reduzir a resistência elétrica transepitelial, abrindo transitoriamente um forte canal entre as células epiteliais. (SARMENTO et al., 2007)



Figura 1.2. Estrutura química dos monômeros da quitosana (Lawrie et al., 2007).

O alginato de sódio, Figura 1.3, é extraído principalmente de 3 espécies de alga, ou seja, a *Macrocystis pyrifera*, a *Laminaria hyperborea* e a *Ascophyllum nodosum*. Quimicamente é um biopolímero aniônico, composto de cadeias lineares de ácido  $\beta$ -D-manurônico (unidade M) e do ácido  $\alpha$ -L-gulurônico (unidade G). (KLEINUBING et al., 2013)



Figura 1.3. Estrutura química das unidades G e M do Alginato (LAWRIE et al., 2007).

O alginato é um dos polieletrólitos aniônicos mais estudados na complexação com a quitosana, porque o policomplexo formado entre estes dois polímeros ainda é biodegradável, biocompatível e mecanicamente mais resistente. (HAMMAN et al. 2010)

A formação do complexo polieletrolítico é facilitada por um mecanismo eletrostático, onde a neutralização de cargas ocorre por interações tipo ligações de hidrogênio, forças de Coulomb e forças de Van der Waals, Figura 1.4. (MENG et al., 2010)



Figura 1.4. Interações iônicas entre o alginato de sódio e a quitosana (KNILL et al., 2004)

Estudos sobre a biodegradabilidade dos complexos polieletrolíticos de quitosana-alginato mostraram que enquanto a quitosana sozinha foi degradada por lisozimas, o efeito destas enzimas no complexo polieletrólito foi negligenciável. O complexo mostrou alta capacidade de adsorção da lisozima, mas a degradação enzimática foi dificultada pela forte interação entre as cadeias poliméricas de quitosana e de alginato (HAMMAN et al., 2010).

Uma grande vantagem do complexo polieletrolítico quitosana-alginato é sua preparação que ocorre em água, dispensando o uso de solventes orgânicos tóxicos, no preparo de membranas de revestimento para sistemas de liberação controlada. As membranas assim obtidas são biodegradáveis e insolúveis em água, com grande potencial para aplicações biomédicas (MENG et al., 2010).

Na área de nanotecnologia, a formação deste polieletrólito tem sido muito explorada na produção de vários sistemas nanoparticulados de liberação controlada de fármacos, à base de polissacarídeos, para aplicação em diversos locais do corpo humano (GOYCOOLEA et al., 2009). Sua utilização pode ter aplicações promissoras na área odontológica, como a administração transmucosa de macromoléculas bioativas, devido às várias propriedades interessantes, como mucoadesão e bioadesividade. Este sistema tem uma elevada capacidade de se associar e liberar macromoléculas terapêuticas na sua forma bioativa, bem como melhorar o transporte de compostos bioativos através das bem organizadas barreiras epiteliais, tais como o ocular, nasal, oral e intestinal (GOYCOOLEA et al., 2009).

A reticulação do alginato também pode ser realizada na presença de cátions divalentes, graças a sua capacidade de formação de géis termoestáveis. Dentre estes cátions divalentes, o Ca<sup>+2</sup> é mais eficaz na interação com alginatos e, portanto, mais empregado. A formação de géis com cálcio ocorre por meio de ligações iônicas de dois grupos carboxilas de cadeias adjacentes com um íon Ca<sup>+2</sup> (ANDRADE et al., 2008).

As unidades G e M no alginato, em variadas proporções e arranjos sequenciais, resultam em diferentes orientações espaciais da cadeia polimérica. No entanto, apenas as unidades G são orientadas de forma a tornar os ácidos carboxílicos acessíveis para reticulação iônica. As propriedades gelificantes deste composto resultam da ligação cooperativa de cátions divalentes com os blocos homopoliméricos dos resíduos de guluronato, denominados blocos G (DONG et al., 2006; HOU et al., 2006, RODRIGUES et al., 2004). Dentre os cátions divalentes utilizados, destacam-se o magnésio, o cálcio, o estrôncio e o bário, sendo mais comumente empregado o cálcio como já mencionado. Os íons cálcio interagem cooperativamente com blocos de unidades G para formar pontes iônicas entre as diferentes cadeias, gerando géis fortes e termoestáveis (ANDRADE et al., 2008). Os íons divalentes estabelecem uma associação cooperativa entre os segmentos poliméricos G, formando estruturas agregadas, semelhante ao ovo numa "caixa de ovos" (TURBIANI et al., 2011), conforme esquematizado na Figura 1.5.



**Figura 1.5.** Esquema das ligações cruzadas do alginato de cálcio. As esferas em preto representam os íons Ca<sup>2+</sup>, enquanto as linhas representam as cadeias de alginato (RODRIGUES et al., 2008).

Os íons Ca<sup>2+</sup> localizam-se nas cavidades eletronegativas, interagindo ionicamente com os blocos de guluronato, um gel termoestável resistente (RODRIGUES et al., 2004).

A reação de reticulação com cálcio é muito rápida e intensa, gerando gelificações localizadas e produzindo uma estrutura heterogênea. Como consequência, o alginato tem sido utilizado, sobretudo como cobertura, aplicada diretamente sobre o alimento ou fármaco, cuja reticulação *in situ* se dá pelo contato com uma solução de CaCl<sub>2</sub> (TURBIANI et al., 2011).

### 1.2.3. Doenças Periodontais

As doenças periodontais compõem um grupo de infecções e condições inflamatórias, incluindo gengivite e periodontite, que afetam os dentes e as estruturas de apoio. Essas doenças ocorrem quando as bactérias da placa dentária invadem os tecidos circundantes e o acúmulo de placa na margem gengival induz resposta inflamatória (PERIOLI et al., 2004). Como resultado, temos a formação de bolsas entre a gengiva e o dente, que induzem a retração gengival e o desenvolvimento de um ambiente ideal para o crescimento de bactérias anaeróbicas, responsáveis pela doença que pode evoluir até a perda de dentes (PERIOLI et al., 2004).

O aparecimento das doenças periodontais pode ser causado por uma série de fatores de risco ambientais e adquirido, como hereditariedade, tabagismo, variação hormonal (durante a gravidez, menopausa), doenças sistêmicas (de Marfan e de Ehlers-Danlos, diabetes, osteoporose, HIV, neutropenias, doenças cardiovasculares), estresse, deficiências nutricionais, medicamentos (bloqueadores dos canais de cálcio, agentes imunomoduladores, anticonvulsivantes) e higiene bucal deficiente (ANTONINI et al., 2013; SHIFROVITCH et al., 2009).

A periodontite é a fase da doença periodontal que teve início no processo inflamatório da gengiva (gengivite) e que se estendeu para os tecidos de suporte do dente, gerando o rompimento das fibras que unem a gengiva, o dente e o osso de suporte. Forma-se dessa forma a bolsa periodontal, ou seja, um espaço entre o dente e a gengiva, Figura 1.6. Entretanto, se a periodontite não for tratada em seu estágio inicial, a bolsa periodontal ficará mais profunda e a gengiva afastada em relação ao dente (periodontite avançada). No caso da perda óssea ser muito extensa, o dente ficará com mobilidade e, dependendo da quantidade de osso perdido, poderá necessária а extração do ser dente (http://www.doencaperiodontal.com.br/doenca-periodontal/tratamento, acessado em 30-05-2016).





Existe uma variedade de patógenos responsáveis pelas doenças periodontais, dentre esses podemos citar espécies anaeróbicas Gram-negativas, como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Selenomonas* e *Campylobacter* e bastonetes gram-negativas anaeróbicas como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, espécies *cytophaga columnaris* e *corrodens eikenella* (NOYAN et al., 1997).

O sucesso do tratamento depende da inibição da destruição dos tecidos e eliminação ou controle dos agentes patógenos. Assim, o objetivo terapêutico é a remoção de bactérias e do cálculo responsáveis pela infecção pela limpeza mecânica e aplicação sistêmica de agentes antimicrobianos, tais como tetraciclina, metronidazol, clindamicina, ofloxacina, clorexidina e cetilpiridínio (YILMAZ et al., 1996). Nos estágios mais avançados da doença, há a necessidade de cirurgias, terapia fotodinâmica e o uso de antibióticos (NOYAN et al., 1997). O problema encontrado com estes fármacos é que, para se obter uma concentração eficaz do fármaco na bolsa periodontal após a administração sistêmica por ingestão, é necessário um período de tempo prolongado (LOESCHE et al., 1992). Além disso, quando são utilizados antibióticos de largo espectro, há sempre um risco de induzir resistência bacteriana. As tetraciclinas, em particular a doxiciclina, são usadas extensivamente no tratamento da doença periodontal, mas o desenvolvimento de resistência bacteriana induz a preferência pela utilização de metronidazol, muito seletivo contra bactérias anaeróbias (YILMAZ et al., 1996).

Agentes antimicrobianos são administrados por via oral para produzir um efeito sistêmico, mas esta aplicação induz alguns efeitos colaterais como hipersensibilidade, intolerância gastrointestinal, e o desenvolvimento de resistência bacteriana (NOYAN et al., 1997). Além disso, relata-se que este tipo de administração não garante uma adequada concentração no local da ação, pois o produto ativo não é mantido localmente por um período de tempo adequado. Uma solução para estes problemas pode ser a administração local do fármaco, formulado num sistema de entrega de liberação controlada, para ser colocado diretamente no sítio de ação (PERIOLI et al., 2004), como estamos propondo neste trabalho.

### 1.2.4. Metronidazol

O metronidazol (MTZ), Figura 1.7, um agente antimicrobiano principal representante do grupo Nitroimidazólicos, foi introduzido em 1959 para o tratamento da tricomoníase vaginal (TEIXEIRA et al., 2013). Ele é um fármaco parcialmente hidrofílico e um dos agentes antimicrobianos mais amplamente utilizados no tratamento de doenças periodontais como uma terapia adjuvante aos procedimentos periodontais (BERGAMASCHI et al., 2013) e em infecções vaginais (SHIFROVITCH et al., 2009). O seu princípio ativo atua sobre infecções anaeróbias (Peptococcus, Peptostreptococcus, Veillonella, Clostridium, Actinobacillus actinomycetemcomitans) ou infecções causadas por protozoários anaeróbios (Entamoeba histolytica, Giardia lamblia, Trichomonas vaginalis e Balantidium coli). Ele interage com o DNA (ácido desoxirribonucleico) e produz uma perda da estrutura helicoidal, uma ruptura da cadeia а inibição da síntese de ácidos nucleicos das respectivas е bactérias/protozoários, levando-as à sua morte (TEIXEIRA et al., 2013).

Além da sua utilização em doenças periodontais e infecções vaginais (tricomoníase e vaginose bacteriana), este fármaco já foi incorporado em sistemas de entrega de drogas em várias aplicações, tais como comprimidos para o tratamento de úlceras pépticas, microsferas para o tratamento de doenças associadas com o cólon e a mucosa gástrica, grânulos de gel de alginato para aplicações gástricas. Também é utilizado no tratamento de diarreia por *Clostridium difficile*, amebíase intestinal por *Entamoeba* e infecção por *Helycobacter pylori* (SHIFROVITCH et al., 2009).



Figura 1.7. Fórmula molecular do Metronidazol (TEIXEIRA et al., 2013).

Metronidazol também é usado, em combinação com outros antibióticos, em muitas infecções hospitalares graves, sendo um poderoso aliado no tratamento de diversas doenças potencialmente fatais como certas formas de peritonites (tipo de infecção abdominal), doença inflamatória pélvica, infecções puerperais (pósparto) e infecções da vesícula biliar (TEIXEIRA et al., 2013).

Ele porem apresenta muitos efeitos colaterais, sendo os mais comuns, distúrbios gastrointestinais, especialmente náusea e sabor metálico na boca. Também podem ocorrer diarreia ou constipação, fraqueza, enjoo, dor de cabeça, insônia e alterações de humor e de estado mental como depressão e confusão mental. Neuropatia periférica e convulsões epileptipformes são associadas a doses elevadas de metronidazol ou tratamento prolongado. Outros efeitos incluem desconforto uretral е escurecimento da urina (http://www.drugs.com/sfx/metronidazole-side-effects.html, consultado em 30-05-2016). Devido a esses efeitos colaterais a redução na dosagem é fundamental para diminuição do desconforto do paciente. Isto pode ser obtido com aplicação in situ do fármaco, obtendo-se a mesma concentração ativa com uma dosagem menor através do by-pass do sistema de primeira passagem hepático.

### 1.2.5. Sistemas de liberação de fármacos

A escolha do fármaco metronidazol (MTZ), como droga modelo do sistema mucoadesivo, foi feita devido ao conhecimento já disponível do mesmo na literatura técnica científica e de sua ação comprovada no tratamento de doenças periodontais (YILMAZ et al., 1996). Devemos enfatizar que, como já citado anteriormente, a partir deste trabalho abre-se a oportunidade de utilização destas membranas com vários fármacos para liberação *in situ*, principalmente via transmucosa oral. Para liberação *in situ* podemos citar o tratamento de doenças periodontais, o tratamento de gengivites e aftas, a liberação de analgésicos de ação rápida e a possível liberação de medicamentos antitumorais em neoplasias malignas na cavidade oral. Diversos fármacos podem ser liberados no organismo via transmucosa oral como; proteínas e peptídeos, insulina, calcitronina, hormônios,

analgésicos, enzimas, esteroides, agentes cardiovasculares, dentre outros. Muitos são hoje limitados à administração intradérmica ou intramuscular, devido à impossibilidade de administração via oral, que causaria a degradação destes agentes antes de chegar ao sitio de atuação (VERMA et al., 2011).

Podemos encontrar ainda vários desafios da administração de fármacos pela mucosa oral, tais como (VERMA et al., 2011): (1) Área de superfície limitada das mucosas da cavidade oral; pois a área disponível para a absorção do fármaco, de 170 cm<sup>2</sup>, representa aproximadamente 50 cm<sup>2</sup> de tecido não queratinizado. (2) Propriedades de barreira da mucosa. (3) A secreção contínua da saliva (0,5-2 l/dia) que leva a diluição subsequente da droga. (4) O perigo de asfixia por ingestão involuntária do sistema de entrega é uma preocupação. (5) Deglutição de saliva pode também potencialmente conduzir à perda de fármaco dissolvido ou suspenso e, finalmente, a remoção involuntária da forma de dosagem.

Dentre as pesquisas que envolvem o desenvolvimento de formulações para aplicação tópica em mucosa oral podemos citar o trabalho de Ishida et al. (1982), que desenvolveram uma nova forma de dosagem, via mucosa bucal para liberação in situ de fármacos. Eles utilizaram hidroxipropilcelulose (HPC) e Carbopol-934 (CP), contendo um anestésico local para dor de dentes e lidocaína como droga, também em base de HPC e CP. No trabalho de Collins et al. (1989) compactados contendo cloridrato de tetraciclina e ácido polihidroxibutirico (PHB), para tratamento de gengivite in situ, foram avaliados in vitro. Aumento da quantidade do fármaco de 30% a 60% causou um aumento progressivo na liberação da droga. No teste in vivo a média do grupo tratado mostrou uma redução desejável no quadro clínico, em comparação com o grupo controle. No trabalho de Elkayam et al. (1988) foi relatado o desenvolvimento de um sistema, de liberação sustentada de minociclina, para utilização no tratamento de doenças periodontais. Filmes de etilcelulose com polietilenoglicol foram preparados como dispositivos de liberação controlada. Os resultados do estudo clínico de curta duração indicam que a utilização do dispositivo em doença periodontal pode causar a completa erradicação das bactérias patogênicas da bolsa periodontal.

Taepaiboon et al. (2006) eletrofiaram PVA e funcionalizaram o material para liberação tópica de medicamentos. Foram incorporados 4 medicamentos

antiinflamatórios não esteroides (salicilato de sódio, diclofenaco de sódio, naproxeno e indometacina) à solução de PVA. As membranas de nanofibras foram comparadas com membranas *casting* na avaliação do perfil de liberação dos fármacos modelo. A aparência morfológica das nanofibras de PVA carregadas com fármaco dependeu da natureza do fármaco. Os resultados de ressonância magnética nuclear confirmaram que o processo de eletrofiação não afetou a integridade química das drogas. Como resultado foi observado que as membranas de nanofibras de PVA carregadas com os fármacos exibiram melhores características de liberação dos fármacos que as membranas *casting*.

Supaphol et al. (2007) eletrofiaram uma solução de 16% de acetato de celulose, utilizando como sistema de solventes acetona/DMAc com as vitaminas A ou E incorporadas, para aplicação cosmética. As fibras obtidas apresentaram diâmetro da ordem de 200 nm, as quais foram comparadas com filmes contendo vitaminas e fármaco. Na maioria dos casos, as membranas de nanofibras carregadas com vitamina exibiram um aumento gradual na libertação cumulativa das vitaminas enquanto os filmes casting exibiu uma libertação brusca das vitaminas. Kenawy et al. (2002) estudaram a liberação de 5% de hidrocloreto de tetraciclina em PLA, PVA e suas blendas e foi verificado que as membranas eletrofiadas de PVA e PLA / PEVA (50/50) apresentaram uma libertação relativamente lenta da droga durante cerca de 5 dias. Outro trabalho muito interessante foi feito por Rodrigues Filho et al. (2009), que desenvolveram membranas de triacetato de celulose produzidas a partir de bagaço de cana como matriz, para liberação controlada de Doxiciclina para uso entérico e tópico. Os resultados mostraram que as membranas produzidas a partir de bagaço de cana de açúcar são adequadas para a produção de matrizes para a libertação controlada da droga, tanto para utilização entérica quanto uso tópico.

Dentre os trabalhos utilizando o fármaco metronidazol (MTZ), podemos citar Zamani et al. (2010) que desenvolveram com sucesso nanofibras de Poli ecaprolactona (PCL) contendo este fármaco em concentrações de3 5-10% m/m e avaliaram suas características para possível aplicação no tratamento tópico de doenças periodontais. Os resultados mostraram que o aumento da concentração de metronidazol causou um aumento na condutividade da solução e uma diminuição na viscosidade da mesma, bem como no diâmetro da nanofibra. Estudos *in vitro* da liberação da droga mostraram que a taxa de liberação da droga foi afetada pela sua concentração e razão de solventes.

### 1.2.6. Mucoadesão

Mucoadesão é uma propriedade desejada em biomateriais para aumentar a interação e duração do contato entre um polímero contendo um fármaco e uma superfície mucosa. Nesta interação mucosa-polímero, procura-se manter as concentrações do fármaco no organismo dentro do nível desejado para alcançar o resultado terapêutico esperado, eliminando o incômodo causado aos pacientes pela administração periódica oral do medicamento. Os atributos poliméricos necessários, para elevada mucoadesão, incluem hidrofilicidade para se obter uma boa afinidade polímero mucosa; carga potencial negativa do material para e presença de grupamentos no material que formem ligações de hidrogênio com a mucosa. O polímero também deve possuir uma flexibilidade suficiente para penetrar na rede de muco, ser biocompatível, não tóxico e economicamente viável (PATEL et al., 2011).

Os polímeros considerados mucoadesivos podem ser divididos em naturais e sintéticos. Dentre os primeiros, podemos citar como exemplo a agarose, a quitosana, a gelatina, o ácido hialuronico, o alginato de sódio, a goma xantana, a pectina, a goma guar, derivados de celulose (carboximetil celulose, hidroxietil celulose, hidroxipropil celulose, hidroxipropilmetil celulose). Como exemplo dos sintéticos temos o poli(oxido de etileno) e os acrílicos dentre outros (NAGAIV et al., 1985).

### 1.2.6.1. Processos de mucoadesão

Mecanismos de ligação do polímero na superfície mucosa ainda não são totalmente compreendidos. Para que ocorra a mucoadesão é necessário que ocorra ligação entre as moléculas e a superfície da mucosa. Sistemas adesivos que estabeleçam ligações químicas secundárias como, ligações iônicas, ligações de hidrogênio e forças de Van-der-Walls, são os preferidos, pois apesar de individualmente estas ligações terem um caráter fraco em conjunto conduzem a fortes adesões, devido ao desenvolvimento de diversos pontos de interação (DIAS et al., 2007).

Várias teorias têm sido propostas para os mecanismos de mucoadesão, porém para um mesmo sistema mais de uma teoria pode se complementar para a formação das ligações mucoadesivas (DIAS et al., 2007).

De acordo com a Teoria da Adsorção, a formação de uma ligação bioadesiva é o resultado das forças de Van der Walls ou ligações de hidrogênio que apesar de individualmente estas ligações terem um caráter fraco em conjunto conduzem a fortes adesões, devido ao desenvolvimento de diversos pontos de interação (D´AGOSTINI JUNIOR, 2009).

Na Teoria Eletronica, o material adesivo e o material biológico têm estruturas eletrônicas diferentes. Quando estas superfícies entram em contato forma-se uma dupla camada de carga elétrica na interface responsável pelo desenvolvimento da adesão (DIAS et al., 2007).

A Teoria do Intumescimento é aplicada principalmente em sistemas bioadesivos semissólidos e líquidos. Esta teoria usa as tensões de superfície para calcular o coeficiente de espalhamento, que é um parâmetro indicativo das propriedades da bioadesão do polímero (D´AGOSTINI JUNIOR, 2009).

De acordo com a Teoria da Difusão, as ligações bioadesivas são resultado da interpenetração e enrolamento das cadeias do polímero bioadesivo com as cadeias poliméricas do muco. Este processo é afetado pelo tamanho das cadeias do polímero e do seu intumescimento (DIAS et al., 2007).

A Teoria da Fratura avalia a força envolvida na separação da superfície do polímero com a superfície biológica e é relacionada com a capacidade bioadesiva do polímero avaliado (D´AGOSTINI JUNIOR, 2009).

Em bases gerais o processo de bioadesão pode ser descrito em três etapas: primeiro ocorre o intumescimento do polímero para permitir um contato com o tecido, depois acontece à interpenetração do polímero na camada mucosa e finalmente, a formação das ligações químicas com a mucosa (D´AGOSTINI JUNIOR, 2009).

### 1.2.6.2. Mucoadesão por adsorção de mucina

As mucosas são superfícies úmidas que revestem as paredes de várias cavidades do corpo, tais como a gastrointestinal, a oral, o trato respiratório e o reprodutivo. Estas cavidades consistem de tecido conjuntivo, revestido com uma camada epitelial, cuja superfície é coberta por muco (SOGIAS et al., 2008). O epitélio pode ser tanto de camada única, como no estômago, intestino delgado e grosso, ou constituído de várias camadas como encontrado no esôfago, vagina, córnea e oral. As membranas de camada única, que contêm células caliciformes, secretam muco diretamente sobre as superfícies epiteliais (SOGIAS et al., 2008). Considerando que as membranas contem várias camadas, ou são adjacentes a tecidos recipiente contendo glândulas especializadas (por exemplo, glândulas salivares), elas secretam muco para a superfície epitelial. O muco está presente como uma camada de gel aderida à superfície da mucosa, ou como um lúmen solúvel ou na forma suspensa, que protege as células epiteliais de danos físicos e químicos (SOGIAS et al., 2008). Adicionalmente, ele fornece lubrificação, atua como um agente molhante, e modula o conteúdo de água no tecido subjacente (SOGIAS et al., 2008).

Os principais componentes de todos os géis de muco são a mucina, os lipídios, os sais inorgânicos e a água que corresponde a mais de 95% do peso do muco, proporcionando um sistema altamente hidratante (SOGIAS et al., 2008).

Depois da água, o componente principal do muco é a mucina, uma glicoproteína de alta massa molar (106-107 Da). Ela tem aproximadamente 75% de oligossacarídeos ligados ao seu esqueleto, sob a forma de N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, frutose, galactose, ácido siálico e manose, alem de traços de sulfato. A estrutura primária da proteína (aproximadamente 25% da massa molar) é composta de serina ou treonina (HE et al., 1998). A mucina tende a formar agregados maiores por meio de interações hidrofóbicas, entre os grupos não polares, por ligação de hidrogênio, entre as unidades de açúcar; e por ligações dissulfeto, entre os resíduos de cisteína. A maioria das mucinas são carregadas

negativamente, devido à presença de resíduos de ácido siálico e derivados ésteres sulfatados, que são totalmente ionizados a pH baixos (HE et al., 1998).

Mucoadesão é um processo complexo e numerosas teorias foram apresentadas para explicar os mecanismos envolvidos. Estas teorias incluem intertravamento mecânico, eletrostática, difusão-interpenetração, adsorção e processos de fratura. Sem dúvida, as teorias mais aceitas são as fundamentadas na termodinâmica de energia de superfície e difusão-interpenetração (PATEL et al., 2011).

A quitosana possui grupamentos -OH e -NH<sub>2</sub> que podem dar origem a ligações de hidrogênio inter e intracadeias, e linearidade da cadeia suficiente para garantir sua flexibilidade. Por ser um polieletrólito, sua conformação se torna altamente dependente da força iônica. Estas propriedades são consideradas essenciais para mucoadesão. Conforme a literatura, a natureza catiônica de polieletrólitos promove uma forte interação eletrostática com mucus, ou seja, com a carga negativa da superfície das mucosas. (HE et al., 1998).

A importância da mucina para as propriedades mucoadesivas de quitosana foi inferida a partir de estudos envolvendo complexação quitosana-mucina *in vitro*. A interação da quitosana com mucina foi utilizada anteriormente, para avaliar as propriedades mucoadesivas deste polissacarídeo (HE et al., 1998).

As interações entre quitosana mucoadesiva e mucina são complexas, com contribuições de atração eletrostática, ligações de hidrogênio, e interações hidrofóbicas. Atração eletrostática entre a mucina carregada negativamente e a quitosana carregada positivamente é um processo de neutralização iônica, que parece ser o principal mecanismo para a mucoadesão da quitosana (SOGIAS et al., 2008).

Alginato, apesar de ser um polímero aniônico com grupamentos terminais carboxila, também é considerado um bom agente mucoadesivo. Os estudos de George et al. (2006) mostraram que o alginato tem maior adesão em comparação com outros polímeros mucoadesivos, tais como poliestireno, quitosana, carboximetilcelulose e poli (ácido láctico), sendo por isso uma boa opção de pesquisa.

Os polímeros polianiônicos, quando submetidos ao inchamento em água, formam emaranhados que interagem com a mucina na superfície do tecido, através dos grupamentos de ácidos carboxílicos ionizados que formam ligações de hidrogênio. Uma elevada densidade de carga no polímero é necessária, tanto para o intumescimento, quanto para ligação de hidrogênio permitindo a fixação (ROBINSON et al., 1987).

Foi relatado por Smedley et al. (2011) que o alginato apresenta excelente aderência em camadas de muco *in vivo*, pois aumenta a elasticidade das mucosas. Eles verificaram que na presença de alginato ocorre aumento no módulo de armazenamento dinâmico e na viscosidade do muco. No presente caso, em que os polímeros mucoadesivos são poliânions como a mucina, eles verificaram que além das interações eletrostáticas, as interações covalentes podem desempenhar um papel importante.

A hidratação do polímero e, consequentemente a desidratação do muco, provocam um aumento na interação do polímero com a mucosa, promovendo um aumento da mucoadesão. Com o intumescimento do polímero, aumenta a flexibilidade das cadeias poliméricas e favorece a interpenetração entre o polímero e as cadeias de mucina (ROSSI et al., 2005).

A efetivação de uma ligação mucoadesiva pode ser influenciada por numerosos fatores, entre os quais podemos incluir o próprio polímero e o ambiente, as variáveis fisiológicas e os fatores termodinâmicos e cinéticos.

### 1.2.7. Polímeros mucoadesivos em sistemas de liberação de fármacos

Alguns trabalhos da literatura mostram a utilização de sistemas desenvolvidos a partir de polímeros mucoadesivos para liberação de fármacos via transmucosa. Um deles é de Han et al. (1999), que desenvolveram discos mucoadesivos bucais de Carbopol 934 e hidroxipropilcelulose (CP:HPC) para liberação controlada de nalbufina. Altas taxas de liberação foram observadas para os discos carregados com maiores porcentagens de droga, sendo que estas quantidades não influenciaram nas propriedades adesivas do polímero.

Num outro trabalho, Shanker et al. (2009) desenvolveram uma formulação e avaliaram a entrega da droga cloridrato de tizanidina na mucosa bucal, carregada na forma de comprimidos bioadesivos. Os comprimidos foram preparados por polímeros compressão direta usando bioadesivos. tais como hidroxilpropilmetilcelulose, carboximetil celulose de sódio, ou uma combinação destes dois polímeros. Dois anos mais tarde, Kianfar et al. (2011) desenvolveram formulações de filmes bioadesivos a partir de k-carragenina, poloxâmero e poli (etileno glicol) ou glicerol, com carregamento da droga ibuprofeno para administração bucal. Os resultados mostraram que o grupo foi bem-sucedido na escolha desses sistemas para entrega de droga.

Trabalhos sobre a obtenção de sistemas poliméricos mucoadesivos preparados por eletrofiação ainda são escassos na literatura científica devido a sua complexidade. Eletrofiação de biopolímeros com propriedade mucoadesiva tem sido um grande desafio devido à limitada solubilidade destes na maioria dos solventes orgânicos, a pouca flexibilidade molecular (devido à dificuldade de emaranhamento das cadeias poliméricas, causado pela conformação rígida e prolongada da cadeia) e à facilidade para formar ligações de hidrogênio na estrutura tridimensional (a sua característica policatiônica em solução aquosa, aumenta a tensão de superfície da solução, exigindo tensões elétricas muito altas para ser eletrofiada). Utiliza-se normalmente um polímero auxiliar, por exemplo, o PEO, que também é mucoadesivo, muito utilizado para facilitar a eletrofiação por diminuir a condutividade da solução de polissacarídeos e aumentar o entrelaçamento das cadeias.

No entanto a ciência tem avançado como mostra o trabalho de Shami et al. (2011), por exemplo, onde foram preparadas nanofibras eletrofiadas de diferentes misturas de poli (ácido acrílico) (PAA) /polióxido de etileno (PEO). A morfologia e o diâmetro médio das fibras foram investigados utilizando (SEM), que mostrou fibras livres de defeitos na forma de contas e com diâmetro na faixa de 110 a 280 nm. Em outro trabalho, desenvolvido por Li et al. (2005), foram preparadas membranas de fibras ultrafinas por eletrofiação de misturas aquosas de poli (ácido acrílico) e poli (álcool vinílico), cujos diâmetros aumentaram de 270 a 450 nm com o aumento da proporção de PAA. No estudo de Alborzi et al. (2010), foi investigado o processo de eletrofiação de fibras de alginato de sódio e pectina, para serem utilizadas como veículo para a estabilização do ácido fólico. Foi incorporado poli (óxido de etileno) (PEO) para permitir efetivamente o processo de eletrofiação. Deste modo, fibras eletrofiadas de diferentes transições morfológicas foram obtidas, dependendo da proporção de mistura do alginato/pectina e de PEO utilizado, e da viscosidade da solução. Fang et al. (2011) também fabricaram nanofibras de alginato de sódio por eletrofiação a partir de soluções aquosas. Neste estudo, a capacidade de eletrofiação foi melhorada através da introdução de cátions (Ca<sup>2+</sup>) nas soluções. No trabalho de Wei Lu et al. (2006), alginato de sódio também foi eletrofiado a partir de solução aquosa contendo poli (óxido de etileno) (PEO), cujas fibras lisas apresentaram diâmetro em torno de 250 nm. A dissolução em água das membranas eletrofiadas foi contornada por reticulação, com uma combinação de cloreto de cálcio aquoso e diisocianato de hexametileno.

No trabalho de Dhanaraju et al. (2011) foi preparar e avaliar a liberação controlada cloridrato de propranolol modelo de droga em patches preparados por casting em um sistema de entrega da droga bucal. Os patches foram preparados com proporções variadas de Carbopol 934P (Cp934p), carboximetil celulose de sódio (SCMC) e hidroxi metil propil celulose (HPMC) revestidas com Eudragit NE30D (ED). Os resultados mostraram que a propriedade dos patches dependia significativamente da quantidade relativa de polímero hidrófilo. O estudo de libertação *in vitro* mostrou que a liberação da droga foi contínua e controlada pelo intumescimento e pelo mecanismo de difusão. Ranade et al. (2011) desenvolveram comprimido mucoadesivo de cloridrato de quinapril, preparados em duas camadas. Carbopol 974P e K4M hidroxipropilmetilcelulose foram escolhidos como os polímeros bioadesivos para formular comprimidos bucais da droga. O ácido cítrico foi escolhido como o intensificador da permeação. A formulação otimizada apresentou uma liberação de 98,3% do fármaco em 3h, uma força de bioadesão 553,9 dinas/cm.

Com base nas informações encontradas na literatura cientifica citada nesta revisão bibliográfica, o desenvolvimento de um sistema mucoadesivo para liberação bucal de fármaco com alta adesão apresenta-se como uma opção inovadora de novos materiais para a área médica e odontológica. A utilização de membranas nanoestruturadas de polímeros mucoadesivos nestes sistemas apresenta-se como inovadora do ponto de vista científico e desafiadora do ponto de vista técnico.

# 1.3. Objetivo Principal

Este trabalho tem como <u>OBJETIVO principal</u>: "Desenvolvimento e caracterização de um sistema mucoadesivo de alta adesão, de membranas de nanofibras para liberação bucal de princípios ativos, recomendados pela literatura médica e odontológica". Foi incorporado ao sistema de liberação o fármaco metronidazol, utilizado no tratamento de doenças periodontais, como modelo para avaliação do perfil cinético de liberação deste sistema.

# 1.4. Objetivos Específicos

Para atingirmos o objetivo principal o trabalho foi dividido em três etapas e teremos como meta os seguintes <u>OBJETIVOS específicos</u>:

# Desenvolvimento das membranas nanoestruturadas:

- Investigar os melhores parâmetros de eletrofiação de vários polímeros mucoadesivos individuais (Alginato/PEO, Quitosana/PEO) e de eletrofiação de suas misturas (Quitosana/PEO+Alginato/PEO). Nesta fase contaremos com a utilização de um DOE (Design of Experiments) com o objetivo de otimizar as condições de processo.
- Incorporar o fármaco metronidazol, um antibiótico utilizado para o tratamento de doenças periodontais, nas membranas utilizando as melhores condições obtidas no item 1, com várias concentrações do fármaco, para verificar a influencia da concentração do fármaco no processo de eletrofiação.

 Montar os sistemas de alta adesão, utilizando a membrana nanoestruturada de alginato (SA) /PEO, quitosana (QUIT) /PEO e Acetato de Celulose) (CA) /metronidazol revestida com barreiras de membranas nanoestruturadas mucoadesivas de: QUIT/SA/PEO, SA/PEO e QUIT/PEO (sistema *layer by layer*).

### Testes de liberação do fármaco

- Testar as membranas contendo o fármaco, em uma análise microbiológica envolvendo liberação do fármaco, com o objetivo de verificar se o fármaco não perdeu sua eficácia durante o processo de eletrofiação.
- 3. Testar o efeito citotóxico das melhores membranas para investigar sua biocompatibilidade *in vitro*.
- 4. Testar a liberação controlada *in vitro* do fármaco Metronidazol nos sistemas mucoadesivos.
- Testar a capacidade de permeação do fármaco Metronidazol através de mucosa oral suína, a fim de se obter os parâmetros de Fluxo de permeação e Time lag.

### Caracterização dos sistemas de alta adesão

1. Testar "performance" de mucoadesão dos sistemas mucoadesivos, quanto a adsorção de mucina, tempo e força de mucoadesão.

# Capítulo 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Materiais

Os materiais utilizados neste trabalho foram: Alginato de sódio (SA; de algas marrons), Quitosana (QUIT; baixa massa molar 20-300 cP, 1% em ácido acético 1%, a 25 °C), Acetato de Celulose (CA; pó branco; Mn = 29000 g/mol; grau de substituição = 40%) e Poli(óxido de etileno) (PEO; Mv ~ 900.000 g/mol), todos Sigma-Aldrich; N,N-Dimetilacetamida PA (DMAc) (Merck); Ácido Acético Glacial PA (Merck); Etanol absoluto (Merck); Acetona PA (Synth); Água Deionizada; Glutaraldeído (Merck), Cloreto de Cálcio (Synth), Metronidazol (2-Metil-5-nitroimidazol-1-etanol) (Sigma Aldrich), Glutaraldeído (Merck), Cloreto de cálcio (Synth), Acido acético (Merck), Solução tampão fosfato 0,1 M pH7,4 (solução saliva artificial), Ácido Periódico (Sigma), Acido Acético (Merck), Solução tampão fosfato 0,1 M pH7,4 (Solução Saliva Artificial), Reagente de Schiff (Sigma), Solução HCI 1M (Dinâmica), Metabissulfito de Sódio (Sigma), Mucina de estômago de porco (Sigma).

### 2.2. Membranas de Alginato/PEO

### 2.2.1. Preparação das soluções poliméricas de Alginato/PEO

Foram preparadas soluções poliméricas pela mistura de Alginato e PEO em água deionizada, em diferentes proporções e concentrações. Testou-se também a adição de etanol e acetona a solução polimérica para verificar se estes cossolventes auxiliariam no processo de eletrofiação melhorando o aspecto da membrana e reduzindo o número de defeitos nas nanofibras, como descrita a seguir.

### (a) Solução de Alginato/PEO em água deionizada.

Foram preparadas soluções de alginato/PEO, em proporção e concentrações variáveis, em água deionizada como pode ser verificado na Tabela

2.1. Estas soluções foram mantidas em agitação, por aproximadamente 2 horas, para a completa homogeneização. As concentrações de alginato e PEO foram definidas com base nos trabalhos de Lu et al. (2006); como a viscosidade da solução era muito alta, fixou-se como ponto máximo 4 % de alginato/PEO.

**Tabela 2.1 –** Condições experimentais utilizadas para preparação das soluções de Alginato /PEO em água deionizada.

Solução	% Alginato	% PEO
Solução	(m/m)	(m/m)
3%(SA/PEO) 50:50	1,5	1,5
4%(SA/PEO) 50:50	2	2
4%(SA/PEO) 60:40	2	2
4%(SA/PEO) 70:30	2	2
4%(SA/PEO) 80:20	2	2
4%(SA/PEO) 90:10	2	2
4%(SA/PEO) 100:0	2	2

# (b)Solução de Alginato/PEO em água deionizada com adição de acetona.

Prepararam-se soluções de 4% de alginato/PEO (m/m) na proporção de 50:50, em água deionizada com adição de acetona como cossolvente, conforme consta na Tabela 2.2. Estas soluções foram mantidas em agitação por aproximadamente 2 horas, para a completa homogeneização, e em repouso por 1 hora antes da fiação, para eliminação de microbolhas.

**Tabela 2.2 –** Condições experimentais utilizadas para preparação das soluções de Alginato /PEO em água deionizada/acetona.

Solução	% Acetona (m/m)	% Alginato (m/m)	% PEO (m/m)
4%(SA/PEO) 50:50	5	2	2
4%(SA/PEO) 50:50	10	2	2

# (c) Solução de Alginato/PEO em água deionizada com adição de etanol.

Prepararam-se soluções de 4% de alginato/PEO (m/m) na proporção de 50:50, em água deionizada, com adição de etanol como cossolvente, nas condições vistas na Tabela 2.3. Também neste caso, as soluções foram mantidas em agitação por aproximadamente 2 horas, para a completa homogeneização, e em repouso por 1 hora antes da fiação para eliminação de microbolhas.

Solução	% Etanol	% Alginato	% <b>PEO</b>
	(m/m)	(m/m)	(m/m)
4%(SA/PEO) 50:50	5	2	2
4%(SA/PEO) 50:50	7	2	2
4%(SA/PEO) 60:40	5	2	2
4%(SA/PEO) 70:30	5	2	2
4%(SA/PEO) 70:30	7	2	2
4%(SA/PEO) 80:20	7	2	2
4%(SA/PEO) 90:10	7	2	2

**Tabela 2.3 –** Condições experimentais utilizadas para preparação das soluções de Alginato /PEO em água deionizada/etanol.

# (d) Soluções poliméricas de Alginato/PEO com Metronidazol

Foram preparadas soluções de 4%SA/PEO 60:40 conforme descrito no item 2.2.1c. A estas soluções prontas foram adicionados 10 e 20% de Metronidazol, com base no polímero. As mesmas foram mantidas em agitação por 2 horas, para a completa homogeneização. As concentrações utilizadas de metronidazol foram baseadas em trabalhos da literatura (PERIOLI et al., 2004).

### 2.2.2. Eletrofiação das nanofibras de Alginato/PEO

(a) Nanofibras de Alginato/PEO puras

As soluções preparadas foram eletrofiadas em temperaturas de 25 a 31°C e umidade relativa (UR) variando de 31 a 58%, utilizando-se uma seringa de vidro de 20 ml, com uma agulha metálica de 4 cm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro interno. O polo positivo de uma fonte de alta tensão, projetada para trabalhar na faixa de 2 a 32 kV, foi conectado a agulha metálica da seringa; enquanto que o eletrodo terra foi utilizado para aterrar a placa coletora de cobre, com as dimensões de 30x40 cm. A vazão foi controlada por uma bomba marca KdScientific, modelo 100, conectada a seringa. A distância da agulha ao coletor variou entre 10 e 20 cm, a voltagem aplicada entre 10 e 25 kV, vazão entre 0,5 e 1 ml/h e velocidade de rotação de 1500 a 4000 rpm, dependendo do DOE e da solução eletrofiada. Nas figuras apresentadas neste trabalho citaremos: (i) a distância da agulha ao coletor como "D"; (ii) a voltagem aplicada como "V", e (iii) vazão como "R" com o objetivo de melhorar a visualização da legenda. As amostras das membranas nanoestruturadas foram coletadas em folhas de papel alumínio, as quais revestiam a placa de cobre durante os experimentos. Em cada teste foram eletrofiados aproximadamente 3 ml de solução polimérica. Na Figura 2.1 é possível observar fotos do equipamento utilizado na eletrofiação.



**Figura 2.1.** Foto do equipamento utilizado para eletrofiação do Alginato/PEO e Quitosana/PEO.

(b) Nanofibras de Alginato/PEO com Metronidazol

Para eletrofiação das membranas de nanofibras de SA/PEO, com incorporação do fármaco Metronidazol, utilizaram-se os mesmos equipamentos e condições ambientais descritos no item anterior para as Nanofibras de Alginato/PEO puras, porém nas seguintes condições de processo: voltagem=25 kV, distância=15 cm e vazão=1ml/l, em coletor rotativo e velocidade de 2500 rpm, melhor condição obtida nos testes anteriores.

### 2.2.3. Reticulação das membranas Alginato/PEO

### (a) Reticulação iônica com cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) em etanol.

As membranas de nanofibras de Alginato/PEO foram submetidas à reticulação com solução de CaCl<sub>2</sub> em etanol, por atomização, com tempo e altura de atomização pré-definidas por um DOE. Foi utilizado o atomizador de um leito fluidizado VFC-LAB micro, da marca Freud-Vector Corporation, Figura 2.2. O primeiro DOE realizado foi composto de 3 fatores e 2 níveis, com um total de 8 testes. Os 3 fatores utilizados foram concentração da solução CaCl<sub>2</sub> (10 e 20%), altura (distância entre a membrana e bico atomizador de 4 e 8 cm) e Pressão de atomização (10 e 15 psi), com a velocidade da bomba fixada em 3 rpm. Os parâmetros utilizados em cada teste estão reunidos na Tabela 2.4.

Teste	Concentração da Solução CaCl <sub>2</sub> (%)	Altura do bico Atomizador (cm)	Pressão de Atomização (psi)
1	10	4	10
2	10	4	15
3	10	8	10
4	10	8	15
5	20	4	10
6	20	4	15
7	20	8	10
8	20	8	15

**Tabela 2.4 –** Condições experimentais utilizadas no DOE para reticulação das membranas de Alginato/PEO.

Avaliou-se o percentual de perda de massa, a razão de intumescimento e a estrutura da membrana em cada condição.

Nas mesmas condições do DOE realizado em água, realizou-se teste de dissolução em solução tampão fosfato 0,1M / pH7, 4 e solução saliva artificial.



Figura 2.2. Bico atomizador utilizado para reticulação das membranas de SA/PEO

# (b) Reticulação pela complexação com Quitosana

As membranas de nanofibras de Alginato/PEO foram submetidas a testes de reticulação iônica, com solução de CaCl<sub>2</sub> em etanol, e de reticulação por complexação, através da pulverização de solução de quitosana em diversas concentrações (1,5%; 2,5%; 3,5%, 4,5%). Primeiramente realizou-se um pré-teste de perda de massa, para delinear os parâmetros que seriam estudados em profundidade em um segundo momento. Neste caso os testes foram realizados com uma única amostra. Dois grupos de amostras foram testados; no Grupo A havia amostras reticulada somente com reticulação por complexação, e no Grupo B estavam amostras reticuladas com reticulação iônica e por complexação. Na Tabela 2.5 encontram-se as condições de preparação de cada amostra.

As membranas de nanofibras de alginato foram atomizadas com as soluções de CaCl<sub>2</sub> em etanol e com quitosana, com tempo e altura de atomização pré-definidas por um DOE. Foi utilizado o atomizador de um leito fluidizado VFC-LAB micro, da marca Freud-Vector Corporation, Figura 2.6. A melhor condição obtida e utilizada para reticulação foi com solução CaCl<sub>2</sub> (10%), altura (distância entre a

membrana e bico atomizador) de 8 cm e Pressão de atomização de 15 psi, com a velocidade da bomba fixada em 3 rpm. As amostras foram deixadas por 4 e 10 h em incubação em solução tampão e em solução de saliva artificial, para avaliação do intumescimento e da perda de massa.

Tabela	2.5.	-	Condições	experimentais	utilizadas	na	preparação	das	amostras	de
membranas de SA/PEO reticuladas.										

Grupo	Amostra	Reticulação iônica Cacl₂	Reticulação Covalente (Quitosana)	Concentração solução Quitosana (%)
А	SA1,5	Não	Sim	1,5
Α	SA2,5	Não	Sim	2,5
А	SA3,5	Não	Sim	3,5
А	SA4,5	Não	Sim	4,5
В	SACA1,5	Sim	Sim	1,5
В	SACA2,5	Sim	Sim	2,5
В	SACA3,5	Sim	Sim	3,5
В	SACA4,5	Sim	Sim	4,5

Com base nos resultados obtidos neste pré-teste, as melhores membranas, foram submetidas a novos testes em triplicata para garantia dos resultados com avaliação estatística.

### 2.2.4. Membranas de Quitosana/PEO

### 2.2.4.1. Preparação das Soluções de Quitosana/PEO.

### (a) Soluções poliméricas de Quitosana/PEO puras

Prepararam-se soluções de 5% de quitosana (m/m) em ácido acético 1M. A solução PEO foi preparada adicionando-se 4% de PEO (m/m) em água deionizada. Neste caso, estas soluções foram mantidas em agitação por aproximadamente 4 horas para a completa homogeneização. A solução de quitosana/PEO foi preparada adicionando-se proporções variáveis das duas soluções anteriores conforme mostrado na Tabela 2.6. Estas soluções foram mantidas em agitação por aproximadamente 2 horas para a completa homogeneização. As concentrações de quitosana e PEO foram definidas com base nos trabalhos de Jeong et. al. (2011).

Solução		% QUIT	% <b>PEO</b>
Solução	Solução	(m/m)	(m/m)
	(QUIT/PEO) 50:50	5	4
	(QUIT/PEO) 60:40	5	4
	(QUIT/PEO) 70:30	5	4
	(QUIT/PEO) 80:20	5	4
	(QUIT/PEO) 90:10	5	4
	(QUIT/PEO) 100:0	5	4
	(QUIT/PEO) 70:30	6	4,8
	(QUIT/PEO) 70:30	7	5,6

**Tabela 2.6 –** Condições experimentais utilizadas na preparação das soluções de Quitosana/PEO.

### (b) Soluções poliméricas de Quitosana/PEO com Metronidazol

Foram preparadas soluções de 6%Quit/4,8%PEO (60:40) conforme descrito no item anterior. A estas soluções prontas foram adicionados 10 e 20% de Metronidazol, com base no polímero. As mesmas foram mantidas em agitação por 2 horas, para a completa homogeneização. As concentrações utilizadas de metronidazol foram baseadas em trabalhos da literatura (PERIOLI et al., 2004).

### 2.2.4.2. Eletrofiação soluções de Quitosana/PEO com e sem Metronidazol

### (a) Nanofibras de Quitosana/PEO

Para eletrofiação das membranas de nanofibras de QUIT/PEO, utilizaramse os mesmos equipamentos e condições ambientais descritos no item 2.2.2a.

### (b) Nanofibras de Quitosana/PEO com Metronidazol

Foram preparadas soluções de 6%Quit/4,8%PEO (60:40) conforme descrito no item 2.2.4.1.b. A estas soluções prontas foram adicionados 10 e 20% de Metronidazol, com base no polímero. As mesmas foram mantidas em agitação por 2 horas, para a completa homogeneização.

# 2.2.4.3. Reticulação das Membranas de Quitosana/PEO com vapor de Glutaraldeído

A reticulação da membrana de quitosana foi realizada em vapor de glutaraldeído 50%, segundo trabalho de Vondran et al. (2008), utilizando o esquema da Figura 2.7. Como é possível observar na figura, as membranas de quitosana ficaram na parte superior do recipiente, enquanto a solução de glutaraldeído ficou na parte inferior. Ressalta-se que o recipiente foi hermeticamente vedado com massa de modelar (Acrilex ®) entre a tampa e a cuba.

Vários tempos de reticulação foram testados, sendo que a membrana permaneceu no vapor de glutaraldeído por 1h, 5h e 10h.

Os testes de perda de massa foram realizados primeiramente em água. Avaliou-se a perda de massa, o percentual de absorção de água e a estrutura da membrana em cada condição.



Solução de Glutaraldeído

**Figura 2.3.** Esquema para reticulação da membrana de quitosana. Fitas de membrana indicadas acima.

Após a escolha da melhor condição em água, os testes foram realizados em solução de saliva e solução tampão.

### 2.2.5. Membranas de Acetato de Celulose

### 2.2.5.1. Soluções de Acetato de Celulose com Metronidazol

Preparou-se uma solução de DMAc, acetona e água na proporção de 32:63:5 m/m. A seguir, adicionou-se 15% m/m de acetato de celulose dissolvida em solução de DMAc/acetona/água (32:63:5). Esta solução foi mantida em agitação por aproximadamente 2 horas para a completa homogeneização. A esta solução pronta foi adicionado 20% de Metronidazol, com base no acetato de celulose, sendo as soluções resultantes mantidas em agitação por 2 horas para a completa homogeneização. As concentrações utilizadas de metronidazol foram baseadas em trabalhos da literatura (PERIOLI et al., 2004).

# 2.2.5.2. Eletrofiação das soluções poliméricas de Acetato de Celulose com Metronidazol

Para eletrofiação das membranas de nanofibras de Acetato de Celulose com incorporação do fármaco Metronidazol, utilizou-se os mesmos equipamentos e condições de ambientais descritos no item 2.2.2a, nas seguintes condições de processo Voltagem=15 kV, Distância=10 cm e Vazão=1ml/l, baseadas em trabalhos da literatura (NISTA et al., 2012a).

### 2.2.5.3. Membranas de Acetato de celulose recobertas com quitosana.

O recobrimento das membranas de Acetato de Celulose foi realizado por eletrofiação de camadas consecutivas de nanofibras, nas melhores condições obtidas na eletrofiação individual de cada uma delas, utilizando-se o coletor rotativo numa velocidade de 2500 rpm. Duas configurações foram testadas:

Configuração I

1ª camada – nanofibra QUIT/PEO

2ª camada – nanofibra CA + 10% ou 20% de MTZ

3ª camada - nanofibra QUIT/PEO
- Configuração II

1ª camada - nanofibra QUIT/PEO

2ª camada – nanofibra CA + 10%Metronidazol (MTZ) ou 20%(MTZ)

3ª camada – pulverização de solução 6%QUIT/4,8%PEO

4ª camada - nanofibra QUIT/PEO

# 2.2.5.4. Membranas de Acetato de Celulose recobertas com Alginato

O recobrimento das membranas de Acetato de Celulose foi realizado por eletrofiação de camadas consecutivas de nanofibras, nas melhores condições obtidas na eletrofiação individual de cada uma delas, utilizando-se o coletor rotativo numa velocidade de 2500 rpm. A configuração utilizada foi a que obteve melhores resultados, sendo:

1ª camada – nanofibra SA/PEO

2ª camada – nanofibra CA + 10%Metronidazol (MTZ)

3ª camada - nanofibra SA/PEO

A membrana obtida foi submetida à reticulação, conforme descrito no item 2.2.3.

# 2.2.6. Membranas de nanofibras coaxiais de Alginato/Quitosana/PEO.

As soluções de 4%Alginato/PEO (60:40) e 5%Quitosana/4%PEO (70:30) foram preparadas separadamente conforme descrito nos itens 2.2.1 e 2.2.4.1, e eletrofiadas simultaneamente com um acessório de eletrofiação coaxial. A solução de quitosana foi utilizada para compor a parte externa da nanofibras e a solução de alginato compôs a parte interna das mesmas.

A Figura 2.4a mostra o acessório utilizado para eletrofiação coaxial e a Figura 2.4b exibe um esquema de sua estrutura; enquanto que, na Figura 2.5 podese verificar o equipamento de eletrofiação montado com o acessório coaxial. As mesmas condições utilizadas para a eletrofiação das soluções SA/PEO e QUIT/PEO (item 2.2.2.) foram utilizadas aqui. Em cada teste foram eletrofiados aproximadamente 3 ml de solução polimérica.



**Figura 2.4.** Foto do acessório utilizado para eletrofiação da solução de SA/PEO e QUIT/PEO em conjunto (a) acessório (b) esquema. (Fonte: NISTA et al., 2015)



Figura 2.5. Foto do equipamento utilizado para eletrofiação da solução de SA/QUIT/PEO.

## 2.2.7. Caracterização das soluções poliméricas

Todas as soluções poliméricas foram caracterizadas através das análises de viscosidade, tensão superficial e condutividade. Utilizou-se um Reômetro programável (Programmable Rheometer) da marca Brookfield, Modelo LVDV3T, de tensão controlada ou CS, tipo cilindro coaxial no sistema ISO/DIN, com uma haste (spindle) nº 31 e cápsula 13RP, acopladas a um banho Brookfield modelo TC-

550MX para análise de viscosidade. Para análise de tensão superficial foi utilizado um Tensiômetro da Kruss, modelo K6, e para análise de condutividade um Multiparâmetro da Micronal, modelo AJX-522. Todas as medidas foram realizadas em triplicata a 25°C.

#### 2.2.8. Caracterização das membranas eletrofiadas

#### 2.2.8.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras das membranas nanoestruturadas de SA/PEO, QUIT/PEO, SA/QUIT/PEO e CA foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), com o objetivo de conhecer a morfologia e a distribuição das fibras obtidas, o diâmetro das mesmas, sua variação e a presença de contas, dentre outros aspectos. Para isso, utilizou-se um microscópio eletrônico de varredura Leica LEO 440i. Antes da análise as amostras foram secas a vácuo e recobertas com ouro.

Seguindo metodologia proposta por Nista et al. (2012a), para cada amostra foram obtidas 8 imagens, com diferentes aumentos, as quais foram analisadas utilizando-se o software Image Tool para a medida do diâmetro médio de 50 medidas por amostra. Gerou-se uma régua de notas para avaliação do aspecto das membranas, com valores de 1 a 10. A nota 1 significava ausência de fibras, nota 5 significava formação de fibras com muitos defeitos grosseiros e nota 10 correspondia às fibras com boa uniformidade e distribuição de diâmetro. Foram avaliadas 2 fotos, por amostra, por três pessoas independentes, onde as mesmas não tiveram acesso as nota dos demais. No Apêndice, consta o modelo da régua de notas utilizado para avaliação das membranas nanoestruturadas.

## 2.2.8.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As amostras das membranas nanoestruturadas de SA/QUIT/PEO foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), com o objetivo de verificar se a estrutura coaxial foi formada entre o Alginato e a Quitosana. As amostras foram coletadas em um *grid* de cobre de 300 mesh. Para as análises de MET utilizou-se um microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM 2100 e as imagens foram gravadas em uma câmera GATAN ESW 500.

#### 2.2.8.3. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

As amostras das membranas nanoestruturadas de SA/QUIT/PEO foram analisadas por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), para verificar a formação do policomplexo entre o Alginato e a Quitosana, através do aparecimento da banda a 1609 cm<sup>-1</sup>, resultado da interação iônica entre ácido carboxílico do alginato com o grupamento amina da quitosana (CRUZ et al., 2004; COSTA JR et al., 2008). Para tanto, utilizou-se um Espectrômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier marca ThermoScientífic, modelo Nicolet 6700.

#### 2.2.8.4. Teste de Intumescimento

Os testes de intumescimento e percentual de perda de massa in vitro permitem verificar a perspectiva de degradação, a qual está relacionada ao grau de hidratação do sistema e são importantes para verificar se o material apresenta estabilidade estrutural durante o período de liberação do fármaco (VAN DEN MOOTER et al., 1994).

As amostras foram pesadas inicialmente para determinação da massa seca. Depois foram deixadas imersas em água deionizada, a 37°C, por tempos prédeterminados. O excesso de água das membranas foi removido com um papel absorvente e as amostras foram pesadas (SHANKER et al., 2009). A razão de intumescimento foi determinada pela equação 2.1 abaixo;

Razão Intumescimento (%) = 
$$(Ws - Wd) / Wd \times 100$$
 (Eq 2.1)

onde Ws= massa da amostra úmida e Wd= massa da amostra seca.

#### 2.2.8.5. Percentual de Perda de Massa

A análise de percentual de desintegração das membranas de polímero mucoadesivo foi realizada, para verificar o tempo que as mesmas poderiam permanecer integras executando seu papel de mucoadesivo. Para realização destes testes as amostras secas foram pesadas e depois submersas em solução tampão fosfato 0,1M / pH=7,4. Em tempos pré-determinados as amostras foram secas a 60°C até massas constantes, e pesadas novamente. O percentual de perda de massa foi calculado pela equação 2.2, abaixo,

Perda massa (%) = 
$$100\% \times (Wb-Wa)/Wb$$
 (Eq 2.2)

onde Wb=massa amostra seca antes da imersão e Wb=massa da amostra seca depois da imersão.

# 2.2.9. Testes de Liberação do Fármaco

# 2.2.9.1. Quantificação do Metronidazol

A quantificação do fármaco metronidazol foi realizada através de medida direta no UV-vis. Diluiu-se a alíquota de 1 ml, retirada da amostra de liberação, com mais 7 ml de solução tampão fosfato 0,1M pH 7,4. Determinou-se a absorbância na região do ultravioleta, em 321 nm, utilizando-se um espectrofotômetro UV Visível (mod 8453, Agilent), conforme método estabelecido na literatura por vários autores (PERIOLI et al., 2004; SHIFROVITCH et al., 2009; SHANKAR et al., 2010).

Para a construção da curva de calibração, as soluções de metronidazol, em concentrações conhecidas, foram preparadas em solução tampão fosfato 0,1M pH 7,4. Foi construída uma curva na faixa de 1 a 20 µg/ml, para utilização na quantificação do fármaco nas alíquotas do teste de liberação. Para cada solução, de concentração conhecida, foram retiradas três amostras para leitura da absorbância.

## 2.2.9.2. Teste de liberação de Metronidazol (MTZ)

Amostras da membrana de nanofibras foram colocadas em tubos de ensaio. Alíquotas de 10 ml de solução tampão fosfato 0,1M pH7,4 foram adicionadas em cada tubo, os quais foram deixados em estufa de cultura bacteriológica (mod 410N, Nova Ética), com temperatura controlada a 37°C. Em períodos prédeterminados, alíquotas de 1 ml da solução eram retiradas para análise quantitativa de metronidazol e substituídas por uma nova. Após, construiu-se a curva do perfil cinético de liberação, onde cada ponto representa a média de três ensaios. O tempo total do teste foi de 5horas.

#### 2.2.10. Análise Microbiológica

Os testes para análise antimicrobiana das membranas de nanofibras de Acetato de celulose, Alginato e Quitosana com metronidazol (10 e 20%) foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Instituto e Centro de Pesquisas São Leopoldo Mandic (Campinas, São Paulo), com o qual mantemos colaboração.

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.

Para as nanofibras com o fármaco Metronidazol, a atividade antimicrobiana foi avaliada através da utilização das bactérias anaeróbias *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Gram negativa, *A.actinomycetemcomitans,* ATCC 33384, sorotipo c), isoladas e mantidas no laboratório de Microbiologia do Instituto e Centro de Pesquisas São Leopoldo Mandic (Campinas-SP).

Estas cepas foram mantidas congeladas, para posterior ativação em meio de cultura caldo BHI (*Brain Heart Infusion,* Himedia, India), sendo mantidas em estufa bacteriológica, em condições de anaerobiose estrita para *A. actinomycetemcomitans* usando Anaerogen Compact<sup>™</sup> (Oxoid, Milão, Itália), ambas mantidas por 24h a 37°C.

Foram obtidos caldos contendo uma densidade final de 15x10<sup>8</sup> células/ml, correspondendo ao fator n.5 da escala de McFarland (Nefelobac, Escala Nefelométrica de McFarland, Brasil), e plaqueadas uniformemente com auxílio de alça Drigalski em Agar MH (Mueller Hinton). Após isto, as membranas com concentrações de 10 e 20% de Metronidazol, bem como membranas sem fármaco (teste branco) com aproximadamente 13 mm de diâmetro, foram colocadas com o auxílio de uma pinça estéril em pontos equidistantes. As placas foram incubadas em estufa de anaerobiose a 37°C por 48 horas para posterior interpretação e leitura dos resultados.

A avaliação foi realizada, verificando-se a presença ou ausência dos halos de inibição ao redor dos discos, contra um fundo preto. O diâmetro do halo foi medido com um paquímetro em mm, para posterior avaliação dos resultados. Os testes foram realizados em triplicata. Para controle negativo foi utilizado membranas de

cada polímero sema incorporação do fármaco e como controle positivo discos de papel filtro embebidos em uma solução aquosa de metronidazol.

# 2.2.11. Análise Citotóxicológica - Ensaio de Viabilidade Celular

### 2.2.11.1. Linhagens celulares

As linhagens celulares de fibroblastos humanos foram obtidas do Banco de células do Laboratório de Cultivo de Células do "Instituto e Centro de Pesquisas São Leopoldo Mandic", Campinas. Essas células foram isoladas previamente através do cultivo primário de gengivas humanas, removidas de três diferentes pacientes, por meio da técnica de *explant* (MARTINEZ et al., 2004; FRESHNEY, 2005), Figura 2.6. Estas foram utilizadas para todos os experimentos descritos a seguir, realizados em triplicata.



**Figura 2.6.** Fotomicrografia de fase de linhagem de fibroblastos gengivais humanos. Aumento original de 100x.

## 2.2.11.2. Cultivo celular

Os fibroblastos foram cultivados em meio essencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), composto de uma mistura de sais enriquecidos com aminoácidos e outros componentes essenciais para o crescimento celular. (Nutricell<sup>®</sup>, Campinas, SP, Brasil), suplementados com 10% de soro fetal Bovino

(Cultilab<sup>®</sup>, Campinas, SP, Brasil) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (penicilinaestreptomicina) (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA).

Todos os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar para manutenção da esterilidade dos materiais e das substâncias utilizadas para o cultivo celular.

As células de fibroblastos humanos foram mantidas em estufa a 37ºC, em atmosfera úmida, contendo 95% de ar atmosférico e 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). O meio de cultura foi trocado a cada 2-3 dias e a progressão da cultura foi avaliada por microscopia de fase, em culturas crescidas sobre poliestireno, que serviu como controle.

## 2.2.11.3. Ensaio de viabilidade celular

Para a avaliação de viabilidade celular, foi utilizado o método de exclusão vital por azul de *Trypan* em 1, 2 e 3 dias, das culturas celulares plaqueadas sobre as matrizes reabsorvíveis.

O ensaio avalia a integridade da membrana celular com base no princípio de que as células vivas, viáveis, possuem membranas celulares íntegras que bloqueiam a entrada do corante Tripan Blue, ficando com aspecto translúcido. O contrário ocorre com as células mortas, não viáveis, que por apresentarem danos em sua membrana permitem a incorporação deste corante e adquirem uma coloração púrpura.

As suspensões celulares foram obtidas através da tripsinização dos poços, com tripsina 0,25% contendo EDTA 0,2g/L (Nutricell, Campinas, SP, Brasil), e posteriormente inativadas com o próprio meio de cultura.

Após atingirem a subconfluência (efeito de recobrimento de células na garrafa em torno de 70 %), as células foram enzimaticamente removidas das placas e, o precipitado de células resultante da centrifugação foi ressuspenso em 1 mL de meio. Foram retirados 10  $\mu$ L da suspensão de células e a estes se juntou 10  $\mu$ L de azul de *Trypan*, sendo que 1  $\mu$ L desta solução foi colocado em um hemocitômetro (câmara de Neubauer-Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA) e levado ao

microscópio de fase invertida (Nikon, Eclipse TS100) para a contagem e observação das células.

O número total de células presentes em cada poço em diferentes tempos de análise foi obtido através da seguinte equação matemática, Eq 2.3:

N<sup>o</sup> total de células =  $(N^o de células contadas X Vol. inicial X Diluição X 10<sup>4</sup>) Eq 2.3$ 

Nº de quadrados usados para contagem

# 2.2.12. Teste de permeação do Metronidazol em mucosa bucal suina

### 2.2.12.1. Quantificação Metronidazol

O metronidazol foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiencia (Detector de luz UV/VIS Thermo Electron Surveyor UV/VIS Plus Detector - San Jose, CA, USA, acoplado a um amostrador automático Thermo Fischer Scientific Model Surveyor Autosampler Plus Lite – San Jose, CA, USA), seguindo metodologia da "The United States Pharmacopeia" - USP 37-NF 32 (2014). A quantificação foi realizada por HPLC nesta análise devido a maior sensibilidade do método na deteação do MTZ.

O metronidazol foi separado numa coluna C18 de fase inversa (5 µm, 150 x 4,60 mm, Phenomenex). A fase móvel consistia em metanol e solução de potássio di-hidrogênio fosfato (1,36 g/l) na proporção de 30:70, bombeado a 1 mL / min e um volume de injecção de 10 µl. A detecção do metronidazol foi monitorizada em 315 nm. Uma curva de calibração foi construída a partir de uma solução padrão, preparada por dissolução de metronidazol em fase móvel, seguido por diluição em três soluções de trabalho, (de 5, 50 e 100 µg / mL). Para cada concentração injetouse 5 amostras em três dias diferentes, a fim de se obter curvas de calibração, esses resultados foram analisados por análise de regressão linear da área de pico em função da concentração ( $r^2$ =0,9999). O limite de detecção foi de 1,66 µg / ml, e o limite de quantificação foi de 5,52 µg / mL. A coleta de dados foi realizada utilizando software ChromQuest 5.0 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).

O método foi validado em termos de especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação. A especificidade do método analítico foi avaliado, com o objetivo de confirmar que nenhum componente da mucosa oral suína iria interferir nas análises de metronidazol.

## 2.2.12.2. Preparação do tecido para estudo permeação

As cabeças de porco foram obtidas a partir de um matadouro local e transportadas para o laboratório em tampão fosfato isotônico a pH 7,4. A preparação de tecido foi adaptada a partir de uma metodologia descrita anteriormente (FRANZ-MONTAN et al., 2015). Dentro de 2 h de abate, as amostras da mucosa oral suina (a partir da região da bochecha) foram separadas da cabeça utilizando-se um bisturi e lavadas com solução salina, Fig. 2.7a e b. Mucosas com qualquer dano visual na superfície foram descartadas. Mucosas intactas foram imersas em solução salina a 65°C durante 60 s, e o epitélio foi cuidadosamente separado do tecido conjuntivo, Figura 2.7 c e d. Foi relatado anteriormente que este procedimento não influencia a integridade do epitélio da mucosa oral (DIAZ DEL CONSUELO et al., 2005). Para todos os experimentos foram utilizados somente epitélios frescos do mesmo animal. Além disso, todas os experimentos foram conduzidas com a mucosa de pelo menos três animais diferentes. As mucosas foram submetidas a teste de medida de resistividade para garantir sua integridade antes da utilização, as mucosas eram consideradas utilizadas somente se a resistividade em solução tampão fosfato 0,1 M pH7,4 fosse superior a 3 Kg $\Omega$ .cm<sup>2</sup>.



**Figura 2.7.** Sequencia do procedimento para preparação da mucosa oral suína para teste de permeação.

#### 2.2.12.3. Experimento de permeação

Estudos de permeação foram conduzidos em células de difusão de Franz (Sistema Transdérmico mamual, Hanson Research Corporation), com 1,77 cm<sup>2</sup> de área de permeação e um compartimento receptor de 7,0 ml de volume. A mucosa foi colocada sobre um filtro de celulose de 0,45 mm (tecido conjuntivo com o lado voltado para o filtro de membrana), devido à sua fragilidade, evitando quaisquer danos que poderiam alterar parâmetros de permeação, sem alterar o transporte de metronidazol, Figura 2.8. As membranas de SA/PEO, QUIT/PEO e de CA revestidas com SA/PEO e QUIT/PEO incorporadas com o fármaco foram colocadas em cima da mucosa no compartimento doador. As câmaras do receptor foram preenchidas com solução de saliva artificial degaseificada e agitadas magneticamente 400 rpm, a 37°C. Os experimentos de permeação foram realizados em condições não oclusivas, durante 5 h. Amostras de 300 µL foram periodicamente retiradas da fase receptora e analisadas por HPLC, sendo substituídas com solução receptora fresca, em volumes iguais. O fluxo de fármaco foi calculado a partir da inclinação da parte linear da curva (quantidades cumulativas de metronidazol transportadas através da mucosa, por unidade de Área x Tempo). O time lag (intervalo de tempo) foi obtido a partir da intercepção com o eixo do tempo.



**Figura 2.8.** Célula de Franz utilizada no teste de permeação (a), compartimento receptor (b) e (c).área de permeação com mucosa e membrana

#### 2.2.13. Ensaio *in vitro* de mucoadesão por mucina

Este ensaio foi realizado a partir do método colorimétrico Periodic Acid Schiff (MANTLE & ALEN, 1978). Uma solução do reagente de Schiff foi preparada a partir da mistura de 30 mL do reagente Schiff com 6 mL de uma solução aquosa de HCl 1 M. Foram então adicionados 0,1 g de metabissulfito de sódio a cada 6 mL da solução acima mencionada, e o resultante foi incubado em estufa a 37 °C, até tornar-se sem coloração ou amarelo pálido. A solução do reagente de ácido periódico foi preparada pela mistura de 10 µL de solução de ácido periódico 50% com 7 mL de solução de ácido acético 7% (HE et al., 1998). Através da análise dos valores de absorbância correspondentes às concentrações conhecidas de mucina em água ultrapura, foi construída uma curva analítica em 550 nm que corresponde ao comprimento de onda de máxima absorção da mucina na região do visível. Para isso, foram preparadas soluções de mucina com diferentes concentrações: 0,25; 0,5; 0,75 e 1 mg/mL, e então foram adicionados 0,2 mL do reagente de ácido periódico em cada uma das soluções. Estas amostras foram incubadas a 37 °C por 2 horas em banho com temperatura controlada. Após este período, 0,2 mL do reagente de Schiff foi adicionado a cada uma das soluções em temperatura ambiente, e 30 minutos após foi realizada a leitura em 550nm (RIBEIRO et al., 2014). O ensaio de mucoadesão das diferentes amostras de membranas foi feito pelo mesmo procedimento, sendo que uma amostra de 10 mg das membranas foi dispersa nas diferentes soluções de mucina e, após a adição dos reagentes pelo período de incubação acima descrito, o sobrenadante foi utilizado para a quantificação do conteúdo de mucina livre, estimado a partir da curva analítica da mucina.

#### 2.2.14. Ensaio *in vitro* de tempo de mucoadesão

O tempo de mucoadesão das membranas nanoestruturadas foi avaliado utilizando mucosa bucal suína, utilizando metodologia descrita na literatura (ISHIDA et al., 1982; CHUN et al., 2003, HAN et al., 1999, JAIN et al., 2008, DUCHENE et al., 1988) com pequenas adaptações para reduzir tamanho da amostra e volume das soluções utilizadas. Neste estudo para manter-se as características de tensão de cisalhamento do teste de Han et al. (1999) realizou-se um scale-up para agitadores seguindo metodologia de Geankoplis (1993). Calculou-se uma razão de escala (RE), considerando-se que o recipiente é um cilindro padrão com mesmo diâmetro e altura, utilizando-se as equações 2.4, 2.5 e 2.6, abaixo.

$$V = [\pi D_T^{3}/4]$$
 Eq 2.4

Onde D<sub>T</sub>=diâmetro do béquer e V=volume do béquer

$$RE = [V_2 / V_1]^{1/3} Eq 2.5$$

Onde V<sub>1</sub>=volume do béquer 1 e V<sub>2</sub>=volume do béquer 2

Com a razão de escala RE podemos calcular a velocidade de agitação necessária para o novo volume de béquer utilizando a equação 4.3.

$$N_2 = N_1 [1 / RE]^n$$
 Eq 2.6

Onde  $N_1$ =velocidade do agitador no béquer 1 e  $N_2$ = velocidade do agitador no béquer 2 e n=1 para líquidos.

Considerou-se um tamanho de barra magnética de 1/3 do diâmetro do fundo do béquer.

Utilizando-se esta metodologia descrita, reduziu-se o volume de solução de saliva artificial no béquer de 800 ml para 80 ml. Utilizou-se um béquer de 100 ml, uma barra magnética de 1,5 cm e uma velocidade de agitação de 50 rpm ao invés de 150 rpm como descrita na literatura.

A cabeça do porco foi obtido a partir de um matadouro local, conforme já citado anteriormente e transportados para o laboratório em tampão fosfato isotônico a pH 7,4. Dentro de 2 h de abate, as amostras da mucosa oral suína (a partir da região da bochecha) foram separadas da cabeça utilizando um bisturi e as partes

foram lavadas com solução salina, idem vistas na Fig. 2.7b no item 2.2.12.2. Mucosas com qualquer dano visual na superfície foram descartadas. Reduziu-se a espessura do pedaço de bochecha removendo-se tecido muscular para aproximadamente 0,5 cm. As mucosas bucais suínas foram cortadas em formato circular com diâmetro de 1,5 cm de diâmetro e colou-se 6 mucosas em cada béquer utilizando cola cianoacrilato (marca:Superbond®), Figura 2.9a. Fixaram-se as membranas a serem testadas, com diâmetro de 1 cm de diâmetro, nas mucosas ligeiramente úmidas aplicando uma pequena pressão com a ponta de uma espátula larga. Colocou-se 15µl de solução saliva em cima da membrana já aderida à mucosa. Completou-se o béquer com a solução saliva artificial e colocou-se em agitação em banho a 37°C, Figura 2.9b. O descolamento das membranas da mucosa foi acompanhando por um máximo de 24 h. O tempo para a membrana se separar da mucosa bucal suína foi registrado como o tempo de mucoadesão.



**Figura 2.9.** Montagem do experimento para determinação do Tempo de Mucoadesão (a) montagem das mucosas bucais suinas no bequer, (b) banho maria com controle de agitação e temperatura.

#### 2.2.15. Ensaio *in vitro* de força de mucoadesão

Testes de força de Mucoadesão foram realizados utilizando um analisador de textura, com uma célula de carga de 5 kg (TA-XT2i, Stable Micro Systems,

Surrey, Reino Unido). O método utilizado baseou-se no trabalho de Tobyn et al., 1997. A análise de textura é uma ferramenta útil e tem sido amplamente utilizada como um meio válido para a caracterização mecânica das formas de dosagem farmacêuticas mucoadesivas (EOUANI et al., 2001, PARK et al., 2002). Mucosa oral suina foi utilizada como a superfície de mucoadesão.

As cabeças de porco foram obtidas em um matadouro local (Frigorífico Angelelli / Piracicaba) e transportados para o laboratório em tampão fosfato isotônico, pH 7,4. Dentro de 2 h de abate, as amostras da mucosa oral suína (a partir da região da bochecha) foram separadas da cabeça com um bisturi, e as partes foram lavadas com solução salina, idem vistas na Fig. 2.7 b do item 2.2.12.2. Mucosas com qualquer dano visual na superfície foram descartadas. Reduziu-se a espessura do pedaço de bochecha, removendo-se tecido muscular para aproximadamente 0,5 cm.

A mucosa oral foi colocada no suporte do texturometro, voltada para cima, e este foi colocado na base do analisador, Figura 2.10a. As membranas testadas foram fixadas em suporte de alumínio, usando fita adesiva dupla-face de alta adesão (Fita adesiva dupla face Fixa Forte Scotch 3M), Figura 2.10b, e este fixado ao braço móvel do analisador de textura.



**Figura 2.10.** Montagem da mucosa oral suina no suporte para teste no texturômetro (a) e montagem da membrana nanoestruturada no probe (b).

A área de contato na mucosa foi umedecida com 15 µl de uma solução de saliva artificial. Uma força de contato de 0,5 N foi mantida durante 120s, e após este período a sonda foi retirada da mucosa oral, numa taxa de 5 mm s-1. A força de descolamento de pico (N) e o trabalho de adesão (área sob a curva de força / distância em mJ) foi registada no software Exponent (Stable Micro Systems) . A montagem do equipamento está ilustrada na Figura 2.11.



**Figura 2.11.** Montagem do experimento para determinação da Força de Mucoadesão no analisador de textura.

# **CAPÍTULO 3**

# DESENVOLVIMENTO DAS MEMBRANAS NANOESTRUTURADAS

# 3.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Membranas de Alginato de sódio (SA) /Poli (óxido de etileno) - (PEO)

# 3.1.1. Pré-testes para definição dos parâmetros do DOE para eletrofiação SA/PEO.

Alguns testes iniciais foram realizados para melhor definição dos parâmetros que seriam utilizados para o DOE. As condições testadas foram voltagem, distância, concentração SA/PEO e vazão, que foram levadas aos extremos verificando-se a fiabilidade da solução. As condições testadas podem ser verificadas na Tabela 3.1.

Amostra	Vazão (mL/h)	Potencial (kV)	Distância agulha-coletor (cm)	Concentração SA/PEO (%)
1 A	0,5	15	20	4
2 A	0,5	15	10	4
3 A	1	20	10	4
4 A	1	15	15	3
5 A	1	20	15	3

**Tabela 3.1.** Parâmetros Experimentais utilizados para eletrofiação de nanofibras de SA/PEO para pré-testes.

Avaliando-se as imagens obtidas com a análise de MEV pode-se verificar que foram obtidas melhores membranas com voltagens menores, com inicio de formação de fibras para as amostras 4A e 5A, como pode ser verificado nas Figuras 3.1a e 3.1b.



**Figura 3.1.** Imagens de MEV com aumento de 7000 vezes para membrana eletrofiada no pré-teste de eletrofiação de SA/PEO, sendo (a) amostra 4A e (b) amostra 5A.

Com relação às amostras 3A e 5A, Figuras 3.2a e 3.2b, respectivamente, verifica-se um início de formação de fibras obtida com menores distâncias, para a amostra 5A. Nas Figuras 3.3a e 3.3b, verifica-se o comparativo das amostras 1A e 2A em que se obtiveram melhores resultados com concentrações maiores de SA/PEO, Figura 3.3b. Apesar de um grande número de contas, obteve-se nanofibras.



**Figura 3.2.** Imagens de MEV com aumento de 7000 vezes para membrana eletrofiada no pré-teste de eletrofiação de SA/PEO), sendo (a) amostra 3A e (b) amostra 5A.

Quando a vazão de alimentação das soluções poliméricas foi avaliada, Figuras 3.4a e 3.4b, verificou-se que nas condições testadas a vazão não influenciou a formação da nanofibras, quando se compara as imagens 1A e 4A, pois se obteve membranas com aspectos semelhantes.



**Figura 3.3.** Imagens de MEV com aumento de7000 vezes para membrana eletrofiada no pré-teste de eletrofiação de SA/PEO), sendo (a) amostra 1A e (b) amostra 2A.



**Figura 3.4.** Imagens de MEV com aumento de 7000 vezes para membrana eletrofiada no pré-teste de eletrofiação de SA/PEO), sendo (a) amostra 1A e (b) amostra 4A.

Com base nestes resultados obtidos no pré-teste, definiu-se os limites dos parâmetros do DOE 1, isto é, distância entre agulha e coletor de 15 e 20 cm, voltagem aplicada de 10 e 15kV e concentração de SA/PEO de 3 e 4%, mantendose a vazão constante em 1 ml/h. Maiores detalhes podem ser verificados no próximo item.

# 3.1.2. Planejamento de Experimentos para preparação das membranas de Alginato/PEO.

Para otimizar as condições de obtenção de membranas de SA/PEO, fezse um planejamento fatorial 2<sup>3</sup> (3 fatores em 2 níveis) utilizando-se o DOE (Design of Experiments) para a avaliação dos múltiplos fatores a serem contemplados neste tipo de trabalho. Como resposta, escolheu-se o aspecto da membrana nanoestruturada, considerando-se como fatores a concentração do SA/PEO, a voltagem aplicada e a distância entre a ponta da agulha e o coletor. Tais fatores, variados em dois níveis (alto e baixo) como indicado na Tabela 3.2, foram escolhidos por serem fáceis de controlar no processo de eletrofiação. Utilizou-se o software Minitab para análise estatística dos dados. No trabalho realizado o diâmetro das nanofibras não foi fator decisivo na escolha das melhores condições de processo, determinou-se apenas que as nanofibras de SA/PEO e de QUIT/PEO deveriam ter diâmetros menores que 200 nm. No nosso ponto de vista a análise do aspecto da membrana é fundamental neste trabalho pois o objetivo é obter nanofibras mais homogêneas e livres de defeitos, reduzindo-se assim a variabilidade entre as amostras garantindo uma liberação de fármaco mais padronizada possível.

#### 3.1.2.1. Análise da Influência da Concentração

A tabela 3.2 apresenta os resultados para o aspecto da membrana, obtidos para cada um dos experimentos realizados, para obtenção de nanofibras de alginato/poli (oxido de etileno) (SA/PEO), variando-se a porcentagem de SA e de PEO, o potencial aplicado e distância da agulha ao coletor. A nota média para aspecto da membrana foi obtida através da avaliação de 2 imagens de MEV, por amostra, por três pessoas independentes seguindo modelo apresentado no Apêndice, onde as mesmas não tiveram acesso às notas dos demais.

Condição	% Alginato/PEO	Potencial (kV)	Distância agulha- coletor (cm)	Aspecto da membrana (nota média)
1	3	15	15	$6,0 \pm 0,5$
2	3	15	20	$4,0 \pm 0,5$
3	3	10	20	1,5 ± 0,3
4	3	10	15	$2,5 \pm 0,3$
5	4	15	20	$4,5 \pm 0,5$
6	4	15	15	$3,0 \pm 0,3$
7	4	10	20	Não fiou
8	4	10	15	Não fiou

**Tabela 3.2.** Parâmetros experimentais utilizados para eletrofiação de nanofibras de SA/PEO no DOE I.

Podemos observar que com voltagem de 10kV e concentração de 4% SA/PEO (condição 7 e 8) não foi possível obter-se nanofibras, provavelmente devido à alta viscosidade da solução na concentração de 4% SA/PEO, comparada com a de 3%, como pode ser verificado na Tabela 3.3, além da maior condutividade na solução de 4% SA/PEO.

% SA/PEO	Proporção (SA:PEO)	Viscosidade (cP)	Condutividade (mS)	Tensão Superficial (mN/m)
3	50:50	1611±17	2,340±0,001	55,0±0,8
4	50:50	3991±50	3,197±0,001	54,0±0,1

Tabela 3.3. Resultados experimentais para análise da solução de SA/PEO em Água.

Podemos observar nas Figuras 3.5(a - f) as imagens das membranas obtidas em cada condição do DOE descritas na Tabela 3.3.

Podemos observar na Figura 3.5 as imagens das membranas obtidas em cada condição do DOE I. Verifica-se uma grande variação no aspecto da membrana, como retratado nas notas descritas na Tabela 3.2. Nota-se que não foi possível obter nanofibras sem presença de contas, porém verifica-se que na condição 1 (Fig.3.5a) ocorreu a formação de fibras com maior consistência, diferente das demais condições. O diâmetro médio das nanofibras nesta condição 1, onde foi possível a obtenção de fibras, foi de 90 ± 30 nm, medida realizada utilizando o software Image Tools. Dessa forma, não se obteve experimentos com resultados satisfatórios, dentro do esperado, para uma nota mínima para o valor de aspecto 7 da membrana.

Na Fig. 3.6 encontra-se o gráfico de Pareto para os efeitos, que nos mostra a significância de cada fator (distância, voltagem e concentração) na resposta obtida para nota da membrana. O gráfico de Pareto dos efeitos é usado para comparar a magnitude relativa e a significância estatística dos efeitos principais e suas interações. Os efeitos são plotados em ordem decrescente do valor absoluto e uma linha de referência é definida, utilizando um valor de  $\alpha$ =0,05; ou seja, a

probabilidade de se fazer um erro tipo I (quando se conclui que existe uma diferença que não há) e é referida como o nível de significância. Qualquer efeito que se estende além desta linha de referência é significativo. Verificamos que o fator de maior relevância, e o único significante, correspondeu à voltagem aplicada na solução, cujo valor de Efeito foi maior que 2,823 (linha de referência).



**Figura 3.5.** Imagem de MEV, com aumento de 10000 vezes, para membrana eletrofiada de SA/PEO nas condições definidas DOE I sendo (a) 3%SA/PEO, 15kV, 15 cm; (b) 3%SA/PEO, 15kV, 20 cm; (c) 3%SA/PEO, 10kV, 20 cm; (d) 3%SA/PEO, 10kV, 15 cm, (e) 4%SA/PEO, 15kV, 20 cm e (f) 4%SA/PEO, 15kV, 15 cm.

A Figura 3.7 representa o gráfico dos efeitos principais para o aspecto da membrana. O gráfico de efeitos principais é utilizado para visualizar o efeito dos fatores sobre a resposta, e comparar a magnitude relativa dos mesmos. Uma linha de referência é desenhada na média geral. Verificando-se a linha que liga os níveis dos fatores podemos visualizar os efeitos principais. Se a linha é horizontal (paralela ao eixo x), não há efeito principal presente; ou seja, a média de resposta não muda dependendo do nível de fator. Entretanto, se a linha não é horizontal, existe um efeito principal presente e a média de resposta muda dependendo do nível de fator. Quanto maior a inclinação da linha, mais forte será o efeito. Podemos observar que uma maior inclinação das curvas pode ser verificada no quadrante da voltagem, que

é o fator determinante no aspecto da membrana e tem uma influencia muito maior do que os demais fatores, como visto no gráfico de Pareto (Fig. 3.6). Observa-se, porém, que quando a voltagem aumenta, tem-se um aumento na nota da membrana.



**Figura 3.6.** Gráfico de Pareto dos efeitos para aspecto das membranas nanoestruturadas obtidas de soluções de SA/PEO (50:50) em água deionizada.

É evidente, comparando-se as imagens da Figura 3.5, que ocorreu uma melhora significativa no aspecto da membrana com a formação de fibras e redução no número e no tamanho das contas, quando a voltagem foi de 10 para 15kV, conforme as Figuras 3.5a e 3.5d. Assim, o melhor resultado obtido para o aspecto da membrana foi com a concentração de 3% SA/PEO (1:1) m/m, voltagem de 15 kV e distância de 15 cm. Os resultados obtidos mostram que não foi possível obter uma membrana livre de defeitos e com boa regularidade de diâmetro das nanofibras, como o desejado. Dessa forma, novos testes foram realizados com base nas tendências verificadas na análise do DOE, utilizando-se voltagens maiores. Isso permitiu um aumento no campo elétrico gerado, possibilitando que este supere a tensão superficial da solução. Como resultado, espera-se a diminuição no número de contas e defeitos na membrana.





Com base nestes resultados, realizou-se um novo DOE denominado DOE Il para verificar o efeito de voltagens maiores nas soluções de SA/PEO.

A Tabela 3.4 apresenta os resultados para o aspecto da membrana, obtidos para cada um dos experimentos realizados, para obtenção de nanofibras de SA/PEO, variando-se a concentração de SA/PEO, o potencial aplicado e a distância da agulha ao coletor. A Tabela 3.5 apresenta os resultados obtidos para análise das soluções de SA/PEO em água.

Podemos observar nas Figs. 3.8(a - h) as imagens das membranas obtidas em cada condição do DOE II. Podemos observar uma grande variação no aspecto da membrana, como retratado nas notas descritas na Tabela 3.4. Verificase que a membrana obtida na condição 8, Fig. 3.8h, apresentou pouca presença de contas e poucos defeitos tipo conta que as demais condições, sendo a melhor condição desta rodada de DOE, com excelente formação das nanofibras e poucas contas. O diâmetro médio das nanofibras nesta condição, onde foi possível a obtenção de fibras, foi de 94±17 nm. Dessa forma, foram possíveis bons resultados dentro desta rodada de experimentos, onde houve a formação de uma membrana com nota mínima acima de 7, como desejada, para o aspecto da membrana.

Corrida	% Alginato/PEO	Potencial (kV)	Distância agulha- coletor (cm)	Aspecto da membrana (nota)
C1	3	15	15	$6,0 \pm 0,5$
C2	3	15	20	$4,0 \pm 0,5$
C3	3	20	20	$1,5 \pm 0,3$
C4	3	20	15	$2,0 \pm 0,4$
C5	4	15	20	$4,5 \pm 0,5$
C6	4	20	20	$7,0 \pm 0,3$
C7	4	15	15	$3,0 \pm 0,3$
C8	4	20	15	8,5 ± 0,3

**Tabela 3.4.** Parâmetros experimentais utilizados para eletrofiação de nanofibras de SA/PEO no DOE II.

Tabela 3.5. Resultados experimentais para análise da solução de SA/PEO em Água.

% SA/PEO	Proporção	Viscosidade	Condutividade	Tensão Superficial
	(SA:PEO)	(cP)	(mS)	(mN/m)
4	50:50	3991±50	3,197±0,001	54,0±0,1
4	60:40	5262±60	3,803±0,001	53,3±0,2
4	70:30	6450±75	4,500±0,001	54,0±0,3
4	80:20	6678±75	5,140±0,001	54,0±0,3
4	90:10	6620±75	5,757±0,002	51,3±0,2
4	100:0	7643±100	6,830±0,002	50,3±0,2

O gráfico de Pareto dos efeitos é usado para comparar a magnitude relativa e a significância estatística dos efeitos principais, e suas interações. Qualquer efeito que se estende além desta linha de referência é significativo, como já descrito anteriormente. Na Fig. 3.9 encontra-se o gráfico de Pareto para os efeitos, resultante do DOE II, que nos mostra a significância de cada fator (distância, voltagem e concentração) na resposta obtida para nota da membrana. Verificamos que o fator de maior relevância, e o único significante, correspondeu à interação entre voltagem aplicada na solução e concentração de SA/PEO, cujo valor de Efeito foi maior que 3,529 (linha de referência).

A Fig. 3.10 representa o gráfico de interação dos efeitos principais para o aspecto da membrana. O gráfico de interações é utilizado para visualizar o efeito da interação de dois fatores, sobre a resposta, e comparar a importância relativa dos

efeitos. Como já comentado anteriormente, a indicação é dada pela inclinação das duas linhas em cada quadrante. Se as linhas são paralelas entre si, não há interação, o cruzamento entre as linhas significa algum tipo de interação. Quanto maior a inclinação da linha, mais forte será o efeito.



**Figura 3.8.** Imagem MEV, com aumento de 10000 vezes, para membrana eletrofiada de SA/PEO nas condições definidas DOE II sendo (a) C1=3%SA/PEO, 15kV, 15cm; (b) C2=3%SA/PEO, 15kV, 20cm; (c) C3=3%SA/PEO, 20kV, 20cm; (d) C4=3%SA/PEO, 20kV, 15cm; (e) C5=4%SA/PEO, 15kV, 20cm; (f) C6=4%SA/PEO, 20kV, 20cm; (g) C7=4%SA/PEO, 15kV, 15cm; e (h) C8=4%SA/PEO, 20kV, 15cm.

Podemos observar que uma maior inclinação das curvas e um cruzamento entre as linhas, podem ser verificados no quadrante da concentração e voltagem, que são os fatores determinantes na nota da membrana e tem uma influencia muito maior do que os demais fatores, como visto no gráfico de Pareto (Fig. 3.9). Observa-se, porém, que quando a concentração aumenta, tem-se um aumento na nota da membrana.

É evidente, comparando-se as imagens da Figura 3.8, que ocorreu uma melhora significativa do aspecto da membrana com redução no número e no tamanho das contas, quando se aumentou a concentração de SA/PEO e o campo elétrico (através da diminuição da distância e aumento da voltagem aplicada). Assim, o melhor resultado obtido para o aspecto da membrana foi com a concentração de 4% SA/PEO (m/m) voltagem de 20 kV e distância de 15 cm. Os resultados obtidos mostram que foi possível obter uma membrana com poucos defeitos e com boa regularidade de diâmetro das nanofibras, como o desejado.



**Figura 3.9.** Gráfico de Pareto dos efeitos para aspecto das membranas nanoestruturadas obtidas de soluções de SA/PEO em água deionizada.

Os resultados do DOE II nos sugerem que podemos ter melhores resultados se utilizarmos concentrações maiores de SA/PEO na solução, mantendose a distância entre coletor e agulha, e voltagem fixada em 15 cm. Porém, não foi possível testar esta hipótese, pois se aumentando a concentração de SA/PEO de 4 para 5%, a viscosidade da solução fica muito alta, não sendo possível sua eletrofiação.



**Figura 3.10.** Gráfico de interações para aspecto das membranas nanoestruturadas obtidas de soluções de SA/PEO em água deionizada.

### 3.1.2.2. Efeito Umidade Relativa

Durante a realização do DOE II verificou-se uma forte influência da umidade relativa na eletrofiação das membranas de SA/PEO. As eletrofiações realizadas inicialmente para os testes dos DOEs não foram realizadas em ambiente com umidade controlada; ao contrário, a Umidade Relativa do ambiente variava de 30 a 58%, dependendo do clima na região de Campinas. Durante a análise de MEV de uma das rodadas do experimento, verificou-se que todas as amostras eletrofiadas em um dia específico não apresentavam formação de nanofibras. Foi verificado também que condições de fiação já testadas anteriormente com formação de fibras, não foram reprodutivas. Este efeito é característico, segundo Ramakrishna et al. (2005), de polímeros hidrofílicos, quando a umidade do ambiente é muito alta ou a distância entre a agulha e o coletor é muito pequena. Variando a distância entre a agulha e o coletor, temos uma influência direta no tempo entre a saída da solução da ponta da agulha e seu depósito. Se o tempo de percurso da solução até o coletor for grande, teremos uma secagem melhor da fibra; porem, se este for curto, a mesma poderá não secar e se depositar ainda úmida, gerando a fusão das fibras entre si. A umidade alta causa efeito semelhante, pois dificulta a evaporação do solvente (no caso a própria água) durante este percurso. Assim, para uma mesma distância agulha-coletor podemos ter a fusão das fibras para umidades relativas maiores.

O trabalho de Bonino et al. (2012) relata que a umidade relativa do ar é uma variável que tem efeitos significativos sobre eletrofiação. A umidade tem sido associada à criação/supressão de defeitos na forma de contas, bem como a formação de superfícies porosas em fibras. No caso de polímeros solúveis em água, a redução da umidade ambiente aumenta a taxa de evaporação deste solvente, fazendo com que o jato eletrofiado solidifique a uma distância mais próxima da fonte (agulha). O jato solidificado não mantém o seu comportamento viscoelástico, nem a sua capacidade de alongamento assim estão sujeitas a instabilidades adicionais. Portanto, as fibras solúveis em água que são eletrofiadas em baixa umidade (< 20 %) podem ter diâmetros maiores e menos defeitos de contas do que as eletrofiadas em umidade relativa alta (> 40 %). Apesar das implicações sobre a morfologia da fibra, poucos estudos de eletrofiação normalmente relatam o UR, muito menos as condições experimentais de controle ambientais. Variações em ambientes de laboratórios podem dificultar a reprodutibilidade dos resultados causados pelas variações semana a semana, em diferentes partes do planeta.

Nas Figuras 3.11a e 3.11b pode-se verificar o efeito da umidade relativa (UR) na eletrofiação das soluções de SA/PEO.



**Figura 3.11.** Imagem MEV, com aumento de 10000 vezes, para membrana eletrofiada de Alginato de sódio/Poli (óxido de etileno)(SA/PEO) 50:50 m/m utilizando-se como Água como solvente nas condições de processamento de D = 15 cm, V = 20kV e R = 1mL/h com: (a) UR<40%; (b) UR>50%.

Após a observação deste fato, iniciou-se um controle da UR durante o processo de eletrofiação, colocando-se os equipamentos em uma capela fechada junto com um desumidificador de ar, da marca Arsec mod 250 M3U, para controlar a UR abaixo de 40% com base nos estudos de Bonino et al. (2012). Este valor de UR foi estabelecido por testes comparativos realizados e dentro das limitações apresentadas pelo tipo de controle de condicionamento ambiente utilizado. Todos os testes do DOE apresentados foram realizados mantendo-se este controle. Seguiu-se este procedimento para a preparação de todas as membranas realizadas por eletrofiação.

#### 3.1.2.3. Efeito do tempo de preparo da solução

Foram realizados testes para verificar se o tempo entre o preparo da solução e o momento da eletrofiação influenciava na qualidade da membrana obtida. Em alguns polímeros naturais, o tempo entre o preparo da solução polimérica e sua eletrofiação pode alterar as características físico-químicas das mesmas, além da possível formação de fungos.

A eletrofiação de uma solução de SA/PEO 50:50 em água nas condições de processamento de D = 15 cm, V = 20kV e R = 1mL/h foi realizada com uma solução recém-preparada e com solução preparada a 24 horas. As membranas obtidas podem ser verificadas nas Figuras 3.12a e 3.12b.

Como pode ser observado na Figura 3.12, não houve perdas na qualidade da membrana quando se utilizou soluções preparadas 24 horas antes do momento da eletrofiação. Dessa forma, definiu-se como padrão a utilização de soluções de SA/PEO preparadas com no máximo 24 horas antes do processamento.



**Figura 3.12.** Imagem MEV, com aumento de 10000 vezes, para membrana eletrofiada de SA/PEO 50:50 m/m utilizando-se água como solvente nas condições de processamento de D = 15 cm, V = 25kV e R = 1mL/h com: (a) fiação após preparo; (b) fiação 24h após preparo.

#### 3.1.2.4. Análise da Influência da Adição de um cossolvente

Quando avaliamos os resultados obtidos no DOE II, descritos anteriormente, e a imagem da melhor membrana obtida, Figura 3.8h, verifica-se que há a possibilidade de melhora no aspecto da membrana e eliminação dos defeitos (contas e irregularidades), que ainda persistem em pequena quantidade. Como as condições de processamento estavam limitadas (voltagem aplicada e concentração da solução), não sendo possível a exploração além dos limites estudados, a adição de cossolventes orgânicos nestas soluções foi estudada. O objetivo deste teste foi melhorar a evaporação dos solventes e alterar as características físico-químicas das soluções poliméricas, tentando explorar novos limites de processamento. Dois cossolventes foram testados, ou seja, a acetona e o etanol, e os resultados obtidos podem ser verificados no item seguinte.

#### (a) Adição Acetona

Quando observamos as imagens das Figuras 3.13(a - c) podemos observar que com a adição de acetona à solução polimérica, nas mesmas condições de processamento, obtiveram-se membranas com maior número de defeitos.



**Figura 3.13.** Imagem MEV, com aumento de 10.000 vezes, para membrana eletrofiada de SA/PEO 50:50 m/m em solução aquosa, nas condições de processamento de D = 10 cm, V = 20kV e R = 1mL/h com adição de: (a) sem acetona; (b) 5% acetona; (c) 10% acetona.

Como se pode constatar na Tabela 3.6, os resultados obtidos na caracterização destas soluções com acetona mostraram um aumento significativo da viscosidade, além de uma diminuição discreta da condutividade e da tensão superficial.

% SA/PEO	% Acetona	Viscosidade (cP)	Condutividade (mS)	Tensão Superficial (mN/m)
4	0	3991±50	3,197±0,001	54,0±0,1
4	5	5790±75	2,763±0,007	52,7±0,2
4	10	7063±100	2,497±0,001	52,0±0,1

**Tabela 3.6.** Resultados experimentais para análise da solução de SA/PEO (50:50) em acetona/água.

Assim, pode-se atribuir o efeito observado, ao aumento da viscosidade que dificultou o processamento. O campo elétrico, formado em função da voltagem aplicada e da distância entre a agulha-coletor, não foi alto o suficiente para permitir o fluxo da solução para a formação de fibras uniformes. Além do aumento da viscosidade, verifica-se a redução na condutividade da solução que dificulta a formação das nanofibras devido à redução no número de cargas disponíveis na solução. A tensão superficial diminuiu com a adição da acetona, o que deveria facilitar a formação das nanofibras, porém, neste caso não foi suficiente para compensar o efeito dos outros dois parâmetros.

# (b) Adição Etanol

Diferente dos resultados obtidos com a adição de acetona como cossolvente, quando foi adicionado etanol na solução aquosa de SA/PEO houve uma melhora significativa no aspecto das nanofibras obtidas. Diferente dos resultados obtidos com a adição de acetona como cossolvente, quando foi adicionado etanol na solução aquosa de SA/PEO houve uma melhora significativa no aspecto das nanofibras obtidas. Nas Figuras 3.14a e 3.14b nota-se o grande efeito da adição de 5% de etanol à solução polimérica, quando as membranas são obtidas nas mesmas condições de processamento.

Na Tabela 3.7 verificam-se os resultados obtidos na caracterização das soluções poliméricas, com adição de etanol. Observa-se um aumento discreto da viscosidade e diminuição mais significativa na condutividade e na tensão superficial.



**Figura 3.14.** Imagem de MEV, com aumento de 10.000 vezes, para membrana eletrofiada de Alginato de sódio/Poli (óxido de etileno) (SA/PEO) 50:50 m/m em solução aquosa nas condições de processamento de D = 15 cm, V = 15kV e R = 1mL/h com adição: (a) sem etanol; (b) 5% etanol.

**Tabela 3.7.** Resultados experimentais para análise da solução de SA/PEO (50:50) com etanol.

% SA/PEO	% Etanol	Viscosidade	Condutividade	Tensão
		(cP)	(mS)	Superficial
				(mN/m)
4	0	3991±50	3,197±0,001	54,0±0,1
4	5	5864±60	2,470±0,001	52,7±0,6
4	7	5828±60	2,457±0,001	51,0±0,3

Em comparação com os resultados obtidos com a adição da acetona, Tabela 3.6, o efeito nos parâmetros físico-químicos das soluções, são semelhantes com a adição do etanol. Verifica-se um aumento da viscosidade, uma redução da condutividade e da tensão superficial.

Segundo a literatura os alginatos têm suas propriedades afetadas tanto por fatores físicos como químicos. A quantidade de alginato dissolvido em água é limitada pela natureza física das soluções, mais do que pela solubilidade do composto em si (LEE et al., 2012). Aumentando-se a concentração do alginato, a solução passa do estado de líquido viscoso a uma pasta espessa, ponto no qual se torna muito difícil dispersar as moléculas restantes. A solubilização deste produto em água é difícil, se realizada na presença de compostos que competem com as moléculas de alginato pela água necessária para sua hidratação. Assim, a presença de açúcares, amido ou proteínas na água reduz a proporção de hidratação, requerendo maior tempo de mistura. Esse efeito também é observado quando utilizamos etanol ou outros solventes orgânicos, como a acetona, misturados á água pois estes também competem com as moléculas de alginato reduzindo a quantidade de água disponível para sua hidratação (CATARINA REIS, 2007). O alginato também é precipitado com o etanol em processos produtivos e de purificação, resultando em sais de alginato (GOMEZ et al., 2009). Segundo Shipa et al. (2003) concentrações elevadas de eletrólitos na solução causam um aumento na viscosidade até que a precipitação de sais de alginato ocorra.

Isso explica o aumento de viscosidade da solução observado quando adicionamos os cossolventes testados, etanol e acetona.

A melhoria na qualidade das fibras formadas, com a redução dos defeitos nos resultados obtidos com a adição de etanol, explica-se pela constante dielétrica do sistema de solvente utilizado. Segundo a literatura (RAMAKHRISNA et al., 2005) quando maior a constante dielétrica do solvente em uma solução polimérica para eletrofiação, menor a formação de contas, devido à melhora na solubilidade do polímero no solvente. Observa-se também um aumento da instabilidade do jato aumentando a área de deposição da fibra reduzindo o diâmetro das nanofibras. Para os sistemas de solventes utilizados, temos como valores de constante dielétrica  $\varepsilon =$ 75,8 para o sistema 95% água / 5% etanol e valor de  $\varepsilon =$  75,6 para o sistema 95% água / 5% acetona (VOLT et al., 2013). Dessa forma este pequeno aumento observado na constante dielétrica do sistema de solvente foi suficiente para melhorar aspecto da membrana reduzindo os defeitos em forma de contas.

A melhoria na qualidade das fibras formadas quando se adicionou etanol pode também ser atribuida à acetona apresentar um ponto de ebulição menor que o etanol. Dessa forma apresenta um processo de secagem da fibra entre a agulha e o coletor mais rápido do que quando utilizado o etanol, já que é mais volátil o que pode ter contribuído negativamente para a formação das fibras. Os valores obtidos nos parâmetros de solução com a adição de 5% de etanol mostraram-se ideais para obtenção de nanofibras com menor índice de defeitos como contas e irregularidades de diâmetro.

# 3.1.2.5. Aumento da quantidade de Alginato na solução polimérica

Com base nos resultados obtidos com a adição de etanol como cossolvente na solução polimérica de SA/PEO, decidiu-se estudar a possibilidade de aumentar a quantidade de SA na proporção de polímeros.

O aumento desta proporção é desejado, pois garante membranas com melhores propriedades mucoadesivas e com maior resistência a solubilização em água, já que é possível a reticulação do alginato, ao contrário do PEO que será lixiviado. Além da proporção de 50:50 SA/PEO, proporções de 60:40, 70:30, 80:20, 90:10 e 100:0, com adições de 5 e 7% de etanol foram testadas. As imagens comparativas dos testes realizados aparecem nas Figuras 3.15 a 3.19; e, na Tabela 3.8, os resultados da caracterização das soluções.



Figura 3.15. Imagem de MEV, com aumento de 10000 vezes, para membrana eletrofiada de Alginato de sódio/Poli (óxido de etileno) (SA/PEO) 50:50 m/m utilizando-se como Água como

solvente nas condições de processamento de D = 15 cm, V = 20kV e R = 1mL/h com: (a) sem etanol; (b) 5% etanol; (c) 7% etanol.



**Figura 3.16.** Imagem de MEV, com aumento de 5000 vezes, para membrana eletrofiada de Alginato de sódio/Poli (óxido de etileno) (SA/PEO) 60:40 m/m utilizando-se como Água como solvente nas condições de processamento de D = 15 cm, V = 20kV e R = 1mL/h com: (a) sem etanol; (b) 5% etanol.



**Figura 3.17.** Imagem de MEV, com aumento de 5000 vezes, para membrana eletrofiada de Alginato de sódio/Poli (óxido de etileno)(SA/PEO) 70:30 m/m utilizando-se como Água como solvente nas condições de processamento de D = 15 cm, V = 25kV e R = 1mL/h com: (a) sem etanol; (b) 5% etanol; (b) 7% etanol.



**Figura 3.18.** Imagem de MEV, com aumento de 10000 vezes, para membrana eletrofiada de Alginato de sódio/Poli (óxido de etileno)(SA/PEO) 80:20 m/m utilizando-se como Água como
solvente nas condições de processamento de D = 15 cm, V = 25kV e R = 1mL/h com: (a) sem etanol; (b) 7% etanol.



**Figura 3.19.** Imagem de MEV, com aumento de 10000 vezes, para membrana eletrofiada de Alginato de sódio/Poli (óxido de etileno)(SA/PEO) 90:10 m/m utilizando-se como Água como solvente nas condições de processamento de D = 15 cm, V = 25kV e R = 1mL/h com 7% etanol.

	Proporção		Viscosidada	Condutividade	Tensão
% SA/PEO		% Etanol		(mS)	Superficial
	(3A.PEU)		(CP)	(115)	(mN/m)
4	50:50	0	3991±50	3,197±0,001	54,0±0,1
4	50:50	5	5864±60	2,470±0,001	52,7±0,6
4	50:50	7	5828±60	2,457±0,001	51,0±0,3
4	60:40	0	5262±60	3,803±0,001	53,3±0,2
4	60:40	5	7760±100	3,293±0,001	50,0±0,1
4	70:30	0	6450±75	4,500±0,001	54,0±0,3
4	70:30	5	7940±100	4,133±0,001	50,7±0,2
4	70:30	7	8537±100	3,443±0,001	50,8±0,1
4	80:20	0	6678±75	5,140±0,001	54,0±0,3
4	80:20	7	8980±100	4,100±0,001	50,3±0,2
4	90:10	0	6620±75	5,757±0,002	51,3±0,2
4	90:10	7	8360±100	4,377±0,001	50,2±0,1

Em todas as proporções testadas foi possível verificar que a adição de etanol melhorou a qualidade da membrana de nanofibra eletrofiada. É interessante

verificar que na proporção de 90:10 SA/PEO, não houve formação de membrana sem a adição de etanol, porém quando este foi acrescentado, ocorreu a formação de nanofibras mesmo que com muitas contas e irregularidades, Figura 3.19.

Com base nestes resultados, pode-se afirmar que o etanol é um bom cossolvente para eletrofiação de soluções de SA/PEO, auxiliando a formação de nanofibras com maior consistência, diminui a incidência de defeitos e melhora a uniformidade no diâmetro das fibras.

Definiu-se como melhor membrana para continuidade dos testes a obtida com solução 4%SA/PEO na proporção de 60:40 em solução aquosa com 5% etanol eletrofiada com V=20kV, D=15 cm e R=1ml/h, Figura 3.16b.

#### 3.1.2.6. Efeito 3D

As membranas de SA/PEO produzidas para a análise do DOE I e II e para os testes com cossolventes, descritos anteriormente, foram fiadas com aproximadamente 1,5 a 2 ml de solução; ou seja, no máximo 2 h de fiação, devido à vazão de solução utilizada. Este procedimento é comum, visto que para análise por MEV a espessura das membranas deve ser a menor possível para evitar problemas de foco da imagem.

Para continuidade dos estudos, ou seja, para reticulação das membranas com CaCl<sub>2</sub> e testes de revestimento das membranas de acetato de celulose (CA), é necessária a produção de membranas eletrofiadas mais espessas. Para isso usouse aproximadamente 5 a 7 ml de solução e um tempo de duração do processo de eletrofiação de 5 a 7 horas.

Quando se iniciou a eletrofiação das membranas reticuladas de SA/PEO, observou-se a formação de uma estrutura 3D, com a formação de pequenos picos de aproximadamente 2 mm no centro da membrana, que aumentavam com o aumento do tempo de fiação chegando a até 1,5 cm após 4 horas de fiação. Na Figura 3.20 é possível verificar o efeito observado nas membranas de SA após 5 horas de fiação.

Muitos autores buscam a formação desta estrutura 3D em membranas de nanofibras, que apresentam grandes vantagens quando a aplicação desejada é

engenharia de tecidos. Como guia para auto-orientação celular, para regeneração de nervos e reestruturação óssea, estudos demonstraram que o 'scaffold' 3D de nanofibras podem melhorar a adesão e espalhamento das células de forma significativa, devido à nanotopografia superficial e a superfície interna aumentada da estrutura (WANG et al., 2009; BADROSSAMAY et al., 2010; UTTAYARAT et al., 2010; PARK et al. 2008; KIM et al., 2010; SHIM et al., 2010; CAI et al., 2012).



**Figura 3.20.** Imagem para membrana eletrofiada de SA/PEO 60:40 em solução 5% etanol nas condições de processamento de D = 15 cm, V = 20kV e R = 1mL/h após 5 horas de fiação com formação de estrutura 3D.

No caso deste trabalho, a formação deste tipo de estrutura não é desejada, visto que a superfície da membrana se torna irregular e com grande variação de espessura. No nosso entendimento, isso pode prejudicar a cinética de liberação da droga e dificultar a reprodutibilidade da ação da mesma no organismo. Entretanto, acredita-se que o efeito de mucoadesão das membranas não deve ser prejudicado com esta estrutura 3D, já que a mesma aumenta a área de contato com a mucosa.

O trabalho de Bonino et al. (2012) explica a formação de estruturas 3D em membranas eletrofiadas de misturas de SA/PEO. Ele demonstrou que essas arquiteturas únicas crescem na superfície da placa plana do coletor, sem a necessidade de qualquer modificação do aparelho de eletrofiação, e são autosuportadas quando o campo elétrico é removido. Este autor propôs um mecanismo para estas formações, baseado nas repulsões fibra-fibra de cargas superficiais, sobre o alginato, carregadas negativamente. Ainda, segundo este mesmo autor, estas formações em 3D podem ser observadas nas fibras produzidas com materiais de elevada densidade de carga na superfície (isto é, um polieletrólito), criando assim forças de repulsão entre fibras adjacentes.

O campo elétrico aplicado durante eletrofiação pode ter consequências significativas sobre a distribuição dos componentes nas fibras formadas. A circulação de uma espécie iônica dentro de um campo elétrico de corrente contínua é influenciada por uma série de forças e uma macromolécula carregada negativamente pode ser dirigida para a polaridade positiva da fonte do campo elétrico. Durante a eletrofiação, as espécies carregadas negativamente podem ser preferencialmente conduzidas para o cone de Taylor e para as superfícies do jato (SUN et al., 2008).

Acredita-se que a estrutura química do alginato, o qual contém grupos carboxílicos que podem se dissociar em íons carregados negativamente, contribui para as repulsões de Coulomb entre fibras vizinhas. Como resultado, as fibras à base de alginato são repelidas por fibras vizinhas e criam a estrutura 3D na membrana. No início da eletrofiação, quando as primeiras fibras são depositadas, as cargas superficiais das fibras são neutralizadas pela placa coletora aterrada. A partir do momento que a espessura da membrana aumenta, forma-se uma superfície carregada, pois a placa coletora não consegue mais neutralizá-las. Dessa forma, inicia-se o processo de repulsão entre as cargas das fibras provocando a formação dos picos.

Bonino et al. (2012) propõem que a interação entre o campo elétrico aplicado e a repulsão entre espécies carregadas influenciam a dinâmica de todo o processo de eletrofiação, desde a agulha até a placa coletora. Quando a solução polimérica passa através da agulha que está ligada à fonte de tensão, espécies carregadas negativamente são atraídas para o campo elétrico carregado positivamente sobre as paredes da agulha, bem como as superfícies exteriores do cone de Taylor. Por sua vez, o alginato torna-se concentrado na superfície das nanofibras resultantes, ao passo que PEO (neutro) permanece dentro do interior da nanofibra. Nas Figuras 3.21a e 3.21b pode-se verificar esta teoria proposta por Bonino et al. (2012).



**Figura 3.21.** O mecanismo de formação de estruturas 3D em nanofibras de SA/PEO: a) Fibras contendo cadeias de alginato carregadas negativamente em suas superfícies exteriores; b) Durante eletrofiação o alginato é preferencialmente dirigido para a superfície do cone de Taylor pela polaridade positiva da fonte do campo elétrico. PEO, um polímero neutro, permanece predominantemente dentro do interior da fibra. (BONINO et al., 2012)

Além de condutividade iônica da solução, a umidade relativa do ar é outra variável que tem efeitos significativos sobre a eletrofiação, como já citados anteriormente. O controle da UR ambiente também pode ser usado para manipular a formação de estruturas 3D em membranas eletrofiadas (BONINO et al., 2012). Polieletrólitos que formam filmes podem ser hidratados pela água, a partir de uma atmosfera de ambiente úmido, o que conduz a solvatação e uma maior mobilidade dos íons (SUN et al., 2007). Assim, alterando a umidade do ambiente de eletrofiação, alteramos a concentração de íons dissociados nas fibras, o que afeta as repulsões entre cargas nas mesmas e impulsiona a formação de estruturas 3D. Umidades elevadas (> 40 %) faz com que o polieletrólito dissocie-se em grupos com carga (R - COO - , Na + ), aumentando a sua densidade de carga. Como resultado, as fibras podem ser reorientadas por repulsões de cargas, pelas fibras adjacentes ou pelo campo elétrico, e podem levar a formação de estrutura 3D.

Bonino et al. (2012) verificaram que com umidade de aproximadamente 10 %, apenas uma pequena textura era visível a olho nu, na superfície da esteira. Com umidade na faixa de 20 %, estruturas 3D com aproximadamente 1 mm diâmetro já podiam ser vistas após 30 min de eletrofiação. Aumentando a umidade relativa eles verificaram que quanto maior a umidade maior a estrutura 3D formada. Com umidades relativas na faixa de 60 % a estrutura 3D não se formou após 40 minutos de eletrofiação. A membrana formada apresentava fibras fortemente compactadas, porém a imagem de MEV mostra um grande número de contas.

Como já foi demonstrado no item 3.1.2.2. no nosso experimento não podemos trabalhar com umidades acima de 40%, uma vez que as fibras se fundem antes de serem depositadas no coletor.

No ambiente disponível em nosso laboratório, não conseguimos alcançar umidades relativas abaixo de 28%, em função das condições climáticas da região de Campinas. Dessa forma a condição sugerida no trabalho citado não foi possível ser testada. Verificou-se, porém, em testes realizados com umidades na faixa de 28% em nossos experimentos, que a formação de estruturas 3D não foi eliminada nem reduzida.

Para este mesmo efeito 3D observado, Ramakrishna et al. (2005) descrevem que, quando se utilizam coletores isolantes, pode-se obter acúmulo de cargas de mesmo polo responsáveis pela formação 3D na estrutura da membrana, devido a forças repulsivas entre as nanofibras. Eles comentam também que quando se utilizam coletores condutores, como os utilizados neste trabalho, a partir do momento que o depósito de fibras no coletor aumenta e a espessura da membrana se torna alta, um alto acúmulo de cargas residuais ocorre na membrana, aumentando o isolamento do condutor e ocasionando a mesma estrutura tridimensional observada em coletores isolantes.

Quando Ramakrishna et al. (2005) utilizaram coletores porosos como grades, as membranas apresentaram-se pouco densas, ou menos empacotadas, que em superfícies lisas. Segundo eles, tal fato pode ser atribuído à taxa de difusão do solvente e velocidade de evaporação do solvente residual na membrana. Neste tipo de coletor, a evaporação é mais rápida nas partes porosas e mais lenta na parte lisa onde as fibras estão mais compactas e, portanto, dificultam a saída do solvente. Ramakrishna et al. (2005) notaram a formação de uma estrutura de colmeia neste tipo de coletor, onde a densidade de empacotamento das fibras é menor nas regiões porosas e maior nas regiões lisas.

Liu et al. (2002) cita que membranas formadas em água se apresentaram mais densas, quando comparadas com as membranas obtidas em coletores porosos. Esses pesquisadores ainda comentam que nas áreas lisas dos coletores porosos, o acumulo de solvente auxilia a compactação das fibras, durante o processo mais lento de evaporação. Surgem disso à diferença de densidade do material e as estruturas colmeia.

Acredita-se que esta seja a explicação para o efeito tridimensional observado nas nossas membranas. Nos picos formados, as áreas são menos densas e apresenta um acúmulo menor de fibras, tal como no algodão doce, com um fundo compacto (formação inicial homogênea da membrana). Supomos então que uma repulsão entre as fibras ocorra nestas regiões, devido a um aumento da densidade de cargas na membrana neste ponto específico. Provavelmente este é ocasionado por um acúmulo inicial maior de nanofibras neste ponto que na membrana como um todo. Normalmente observa-se a formação desta estrutura no centro do coletor rotativo na direção da ponta da agulha. Após o início da formação de pequenos acúmulos de fibras, a probabilidade de deposição das fibras diminui, por repulsão de cargas, aumentando a porosidade da estrutura nesta região, o que facilita a evaporação do solvente reduzindo a densidade de empacotamento. Nas regiões da membrana onde se observa mais compactação, a velocidade de difusão e evaporação do solvente é mais lenta, permitindo uma dissipação melhor das cargas e um empacotamento melhor como citado por Liu et al. (2002).

Dessa forma os picos seriam inicialmente formados por repulsão de cargas em pontos específicos onde o acúmulo de fibras foi maior durante o início da eletrofiação. Quando o processo de repulsão de cargas inicia-se e a estrutura porosa é formada, ela aumenta a difusão e a velocidade de evaporação do solvente gerando estruturas menos compactadas, com a formação dos picos menos densos. Os vales seriam as regiões onde ocorre uma evaporação mais lenta do solvente, nestes pontos tem-se uma dissipação melhor das cargas elétricas, favorecendo a compactação das fibras tornando a membrana mais densa nesta região.

Muitos outros autores estudaram este efeito 3D em eletrofiação de outras soluções poliméricas com o objetivo de controlar e aumentar a formação deste efeito (LI et al., 2004; WANG et al., 2010; ZHANG et al., 2008; BLAKENEY et al., 2011; WRIGHT et al., 2011; KIM et al., 2008; PHAM et al., 2006; GENTSCH et al., 2010). Com o objetivo de entender este tipo de formação nas membranas de SA/PEO desenvolvidas em nosso grupo, e reduzir ou eliminar estas estruturas, foram realizados vários testes baseados nestes estudos publicados na literatura científica, porém nenhum deles apresentou resultados positivos para eliminação do efeito observado. Entre eles podemos citar:

- Utilização de Placas Paralelas
- Ajuste do cone de Taylor
- Teste para direcionamento da fiação
- Teste usando isolante como coletor
- Adição de nanocristais de celulose (também usado para reforço)

Através do projeto FAPESP de Auxílio a Pesquisa, Nº 2013/04877-4, foi possível a aquisição de um coletor rotativo, marca INSTOR, com velocidade controlada na faixa de 1600 a 5000 rpm. Foram realizados testes com este coletor para verificar se a tração proporcionada na nanofibra, pela rotação do coletor, melhoraria a compactação da membrana eliminando o efeito 3D.

A solução de 4%SA/PEO 60:40, com 5% de etanol, foi eletrofiada utilizando como condições de processo: voltagem(V)=25 kV, distância agulha-coletor(D)=15cm e vazão(R)=1 ml/h, variando-se a velocidade de rotação do coletor. Na Figura 3.22 tem-se as imagens de MEV das membranas obtidas, onde as setas amarelas indicam a direção de alinhamento das nanofibras.

Observando as imagens da Figura 3.22, verifica-se que a 1600 rpm e 2500 rpm obtemos alinhamento parcial das nanofibras. Quando a velocidade de rotação foi aumentada para 3500 rpm, pode se observar que o alinhamento das fibras ocorreu e foi bem efetivo, com poucas fibras perpendiculares a direção do alinhamento. Quando se aumentou a velocidade para 4500 rpm, pouca diferença pode ser observada comparando-se com 3500 rpm.



**Figura 3.22.** Imagens de MEV, com aumento de 5000 vezes, para membrana eletrofiada a partir da solução de 4%SA/PEO 60:40 com 5% etanol, nas condições de processamento com D = 15 cm, V = 20kV e R = 1mL/h e velocidades de rotação de (a)1600 rpm, (b) 2500 rpm, (c) 3500 rpm e (d) 4500 rpm.

Com base nesses resultados, definiu-se a velocidade de 2500 rpm para continuidade dos testes. Trabalhos da literatura demonstram que um grande alinhamento das nanofibras aumenta sua resistência a tração na direção do alinhamento, porém reduz sua resistência na direção perpendicular (RAMAKRISHNA et al., 2005). No caso das membranas que estamos trabalhando, precisamos manter sua resistência nos dois sentidos, já que ela será utilizada com um ou como um "patch" para liberação de fármaco. Na membrana obtida com velocidade de rotação de 2500 rpm, observou-se uma morfologia híbrida com nanofibras alinhadas e também desordenadas, que mantém a estrutura da membrana resistente nos dois sentidos.

Prosseguindo as pesquisas, preparou-se uma membrana eletrofiando a solução de 4%SA/PEO 60:40 com 5% de etanol, nas condições descritas acima, com velocidade de 2500 rpm e por 4 horas de fiação. Na Figura 3.23 verifica-se a membrana obtida e pode-se observar a ausência completa dos picos característicos do efeito 3D.



**Figura 3.23.** Imagens para membrana eletrofiada de SA/PEO 60:40 em solução 5% etanol nas condições de processamento de D = 15 cm, V = 20kV e R = 1mL/h e velocidade de rotação de 2500 rpm, após 4 horas fiação (Dimensões: 20x12 cm).

A membrana obtida apresentou-se completamente homogênea, bem compactada e livre de defeitos macroscópicos. A tração exercida pelo coletor rotativo foi suficiente para a melhor compactação das membranas, o que provavelmente superou o efeito de repulsão das cargas pela tração mecânica exercida nas nanofibras.

Após todos os testes realizados, a melhor solução encontrada para eliminação do efeito 3D foi o leve alinhamento das nanofibras.

Em todos os testes posteriores com as membranas de SA/PEO, serão utilzadas apenas membranas obtidas nas condições de processamento: D = 15 cm, V = 20kV , R = 1mL/h, e velocidade de rotação de 2500 rpm, evitando o efeito 3D e melhorando a compactação das membranas.

## 3.1.3. Testes de reticulação

A reticulação das membranas de alginato se fez necessária devido à solubilidade deste polímero em meio aquoso. É necessário que as membranas permaneçam sem dissolver na mucosa oral, por determinado tempo, para garantir a liberação lenta do fármaco.

Para obter a melhor condição de reticulação de membranas de alginato, foram realizados testes com diferentes condições de atomização destas, com solução de cloreto de cálcio em etanol, seguindo procedimento descrito no item 2.2.3. Para otimizar as condições de reticulação das membranas de SA/PEO, fez-se um planejamento fatorial 2<sup>3</sup> (3 fatores em 2 níveis), utilizando-se o DOE (Design of Experiments) para a avaliação dos múltiplos fatores a serem contemplados neste tipo de trabalho. Como resposta, escolheu-se a perda de massa e a razão de intumescimento, os quais foram realizados segundo itens 2.2.8.4 e 2.2.8.5. Tais fatores, variados em dois níveis (alto e baixo) como indicado na Tabela 2.4, foram escolhidos por serem indicadores do grau de reticulação do polímero. Utilizou-se o software Minitab para análise estatística dos dados.

Os testes de dissolução das membranas de alginato foram realizados primeiramente em água, e os valores de perda de massa e razão de intumescimento foram medidos após 5, 10 e 24 horas a 37°C, cujos resultados estão apresentados na Tabela 3.9.

Na Fig. 3.24 encontra-se o gráfico de Pareto para os efeitos, que nos mostra a significância de cada fator (concentração cálcio, pressão e altura de atomização), na resposta obtida para percentual de perda de massa da membrana, em água deionizada, a 37°C por 10 e 24 horas. O gráfico de Pareto dos efeitos é usado para comparar a magnitude relativa e a significância estatística dos efeitos principais e suas interações. Os efeitos são graficados em ordem decrescente do valor absoluto; e uma linha de referência é definida, utilizando um valor de  $\alpha$ =0,05. Isto é a probabilidade de se fazer um erro tipo I (quando se conclui que existe uma diferença que não há) e é referida como o nível de significância. Qualquer efeito que se estende além desta linha de referência é significativo.

Nº Teste	1	2	3	4	5	6	7	8
Perda de massa (%)	-67±18	-100±1	-68±17	-1,3±0,3	-38±9	-7,3±0,1	-35±40	-10±1
Intumescimento (%)	0±0	0±0	6±9	15±6	12±14	31±39	3±8	9±9
			Após	s 10h no a	condicion	amento		
Nº Teste	1	2	3	4	5	6	7	8
Perda de massa (%)	-100±1	-100±1	-2±3	-5,2±0,2	-5,6±0,4	-7,3±0,4	-7,9±0	,6 -10±1
Intumescimento (%)	0±0	0±0	42±9	8±1	15±25	21±10	8±12	23±3
			Após	s 24h no a	condicion	amento		
Nº Teste	1	2	3	4	5	6	7	8
Perda de massa (%)	-100±0	100±0	-2,1±0,1	-4±2	-5,8±0,7	-6±1	-6,8±0,6	-5,9±0,3
Intumescimento (%)	0±0	0±0	22+9	12±5	4±5	30±3	15±9	9±8

Após 5h no acondicionamento

**Tabela 3.9.** Resultados obtidos para reticulação das membranas de Alginato/PEO.

Verificamos que, os fatores de maior relevância para os dois tempos de dissolução, correspondeu a concentração de cálcio na solução, a altura de atomização e a interação entre eles, cujo valor de Efeito foi maior que 4,18 (linha de referência) para dissolução por 10 h, e 2,63 para 24 horas. Para os resultados com 5h de dissolução, e para resultados de Intumescimento em todos os tempos de dissolução, nenhum fator mostrou-se significativo no gráfico de Pareto. Dessa forma, não obtivemos qualquer informação da interação entre estes fatores e as variáveis dentro dos níveis utilizados nos testes do DOE.

A Fig. 3.25 representa o gráfico de interação dos efeitos principais para percentual de perda de massa da membrana, em água deionizada a 37°C, por 10 horas e 24 horas. O gráfico de interações é utilizado para visualizar o efeito da interação de dois fatores, sobre a resposta, e comparar a importância relativa dos efeitos, sendo que a indicação é dada pela inclinação das duas linhas em cada quadrante. Se as linhas são paralelas entre si, não há interação, o cruzamento entre as linhas significa algum tipo de interação. Quanto maior a inclinação da linha, mais forte será o efeito.



**Figura 3.24.** Gráfico de Pareto dos efeitos para perda de massa das membranas nanoestruturadas, obtidas de soluções de SA/PEO (60:40) em água deionizada a 37°C por: (a) 10 horas e (b) 24 horas.

Podemos observar que uma maior inclinação das curvas e um cruzamento entre as linhas podem ser verificados no quadrante da altura e concentração, que são os fatores determinantes no percentual de perda de massa e tem uma influencia muito maior do que os demais fatores, como visto no gráfico de

Pareto (Fig. 3.24). Observa-se, porém, que quando a concentração aumenta junto com o aumento da altura, tem-se uma diminuição na perda de massa da membrana.



**Figura 3.25.** Gráfico de interações para perda de massa das membranas nanoestruturadas obtidas de soluções de SA/PEO (60:40) em água deionizada a 37°C por (a) 10 horas e (b) 24 horas.

O gráfico de cubo é usado para mostrar a relação entre fatores e uma resposta. Podemos verificar nos vértices do cubo as respostas, (% perda de massa) para a combinação dos fatores (concentração de cálcio, altura de atomização, pressão de atomização) representados nas arestas que compõem cada vértice. Assim, seguindo as arestas que nos levam aos fatores que compõem o vértice, podemos encontrar as condições que geraram esta resposta. Avaliando-se a Figura 3.26, verifica-se o ponto ótimo obtido dentro da rodada de experimentos, correspondendo a uma porcentagem de perda de massa de 2,53% para 10h, e de 2,14% para 24 horas. Ambos os pontos de menor perda de massa correspondem a mesma condição de reticulação, sendo o teste 3 da Tabela 2.4. Isto indicou uma boa consistência nos resultados dos testes do DOE, e demonstram que a reticulação por atomização das membranas de SA/PEO é possível e apresentam resultados positivos. Considerando que as membranas testadas são compostas de alginato, PEO e cloreto de cálcio, e que apenas o alginato foi reticulado, as massas perdidas são referentes também à perda dos outros componentes e não somente do alginato não reticulado. Levando em conta que só o PEO corresponde a 40% da massa total da membrana, os resultados obtidos em quase todos os testes realizados são muito representativos.

Com base nos resultados do DOE, somente baseado nas informações de % de perda de massa, a melhor condição de reticulação é a que utiliza solução de cloreto de cálcio 10%, altura de atomização de 8 cm e uma pressão de atomização de 10 psi.

Para a aplicação proposta para as membranas mucoadesivas, uma pequena perda de massa é essencial; porém, um baixo intumescimento também, visto que não se deseja que o patch aumente de tamanho na cavidade oral do paciente, o que causaria desconforto. Dessa forma, é preciso também avaliar os resultados da razão de intumescimento para definição final da melhor condição de reticulação. Avaliando os resultados da Tabela 3.9, para 24 h de dissolução, podemos verificar que tivemos 22% de intumescimento para a membrana, o que é um resultado alto para a aplicação desejada.



**Figura 3.26.** Gráfico de Cubo para perda de massa das membranas nanoestruturadas obtidas de soluções de SA/PEO (60:40) em água deionizada a 37°C por (a) 10 horas e (b) 24 horas.

Comparando este resultado com o teste 4, vemos que a perda de massa foi de apenas 4%, ou apenas 1,86 % maior; porém, a razão de intumescimento apresentou-se 10% menor, muito significativa para a aplicação final do material. Dessa forma decidiu-se utilizar a condição de reticulação do teste 4 do DOE, para continuidade dos trabalhos. Isso significa uma concentração da solução de cálcio de 10%, altura de atomização de 8 cm e pressão de atomização 15 psi. A escolha destas condições também está alinhada aos resultados do DOE. Como visto pelo gráfico de interação Figura 3.25a e 3.25b, para uma mesma condição de altura de atomização e de concentração de cálcio, a variação da pressão de atomização não altera os resultados de porcentagem de perda de massa.

Na Figura 3.27 podemos observar as imagens de MEV para a membrana de SA/PEO reticulada na melhor condição obtida, teste 4, antes e após a reticulação e após 24 h de dissolução em água a 37°C. Verifica-se a formação de um filme de CaCl<sub>2</sub> depositado sobre a superfície da membrana de nanofibras, Figura 3.27b.



**Figura 3.27.** Imagem de MEV, com aumento de 5000 vezes, para membrana eletrofiada de SA/PEO 60:40 m/m em solução 5% etanol (a) antes reticulação, (b) após atomização com solução saturada de CaCl<sub>2</sub> nas condições do teste 4, (c) após 24 horas em solução aquosa.

Na Figura 3.28 podemos verificar a membrana obtida no teste 6, após a reticulação e após 5h de dissolução em água a 37°C. Neste teste obtivemos uma perda de massa de 7,34%, em apenas 5h de dissolução. Podemos observar na imagem, após as 5h, comparativa com a inicial, que as nanofibras estão perdendo sua estrutura e formando uma rede de fibras coladas entre si, em um grau maior do que observamos na Figura 3.27c, para a condição 4 após 24h de dissolução.



**Figura 3.28.** Imagem de MEV, com aumento de 10000 vezes, para membrana eletrofiada de SA/PEO 60:40 m/m em solução 5% etanol (a) após atomização com solução saturada de CaCl<sub>2</sub> nas condições do teste 6, (c) após 5 horas em solução aquosa.

Os mesmos testes do DOE realizados em água, foram feitos em solução tampão fosfato 0,1 M pH7,4 e em solução de saliva artificial. Em todas as condições testadas, a % perda de massa foi total. Dessa forma uma reticulação complementar é necessária para garantir a estrutura necessária das membranas.

Segundo alguns autores, (BHATTARAI et al., 2007, PANDEY et al., 2005; ANDERSEN et al., 2012) e citado na revisão bibliográfica, a reticulação de nanofibras a base de alginato com íons metálicos bivalentes, tais como Ca<sub>2</sub><sup>+</sup>, Ba<sub>2</sub><sup>+</sup> ou Sr<sub>2</sub><sup>+</sup>, é via interação eletrostática de dois grupos carboxílicos em diferentes cadeias de alginato, em que a molécula polimérica perde a sua liberdade de movimento com a formação de uma estrutura de rede. A estrutura de alginato reticulado é estável em água na faixa de temperatura de 0-100 °C. Quando colocado em soluções de simulação de fluidos corporais, que contém íons salinos, a dissolução do aglomerado de nanofibras ocorre, como resultado da permuta de íons presentes na solução com íons de Ca<sup>2+</sup> ligados a carboxilas das cadeias de alginato. Durante este processo o alginato perde sua reticulação, dissolvendo-se no meio.

Segundo trabalho de Bhattarai et al. (2006), num meio de cultura celular, a perda de reticulação iônica do alginato é menos problemática, porque a concentração de sal iônico no meio de cultura de células *in vitro* é mantida em um nível mais baixo do que em tampões SBF e PBS. No meio de cultura celular a troca de íons é baixa, e a estrutura das nanofibras pode sobreviver um tempo maior, segundo os autores.

Outra metodologia para reticulação de alginato citada na literatura. (REDDY et al., 2010), é a utilização de ácido cítrico. O ácido cítrico, um produto metabólico e não tóxico ao organismo, pode reagir com os monômeros contendo grupamentos hidroxila em condições brandas, tendo-se mostrado útil para reticulação de celulose, amido, seda e alginato.

No trabalho de Reddy, N. & Yang, Y. Q. (2010) foi reportada a reticulação de amido, com adição de 5% de ácido cítrico na solução polimérica e posterior aquecimento dos filmes formados a 165°C. Este processo aumentou a resistência à tração e a estabilidade térmica de películas de amido, e diminuiu a perda de massa após a dissolução em água em 35%. Este método pode ser utilizado em outros polissacarídeos, com bons resultados.

Stone et al. (2013), utilizou esta metodologia para reticulação de membranas de nanofibras de Alginato/PVA. Foi adicionado também 5% de ácido cítrico na solução polimérica, com base na massa total de polímeros. Após a eletrofiação, as membranas foram aquecidas a 140°C por 2 horas para completa cura. Os resultados obtidos apresentaram uma membrana com maior estabilidade térmica, menor dissolução em água e em solução de simulação de fluido corporal (SBF).

Na nossa membrana, em particular, a cura por altas temperaturas não pode ser aplicada, pois isso poderia prejudicar a atividade do Metronidazol incorporado. Conforme indicações do fornecedor (Sigma) e da Farmacopéia Britânica (2011), o fármaco metronidazol deve ser armazenado na faixa de 2 a 8°C, e tem um ponto de fusão na faixa de 159-161°C. Uma caracterização termoanalítica de comprimidos contendo Metronidazol, feita por Rodrigues et al. (2008), mostrou que as formulações apresentaram fusão na faixa de 151-157°C, menor do que o fármaco puro, mas próxima o suficiente para comprometer sua atividade. Assim, existe a necessidade de optar-se por uma metodologia de reticulação mais branda.

Com base na avaliação bibliográfica realizada, uma nova metodologia de reticulação complementar foi testada, utilizando a complexação de polieletrólitos em temperatura ambiente. O alginato é um poliânion e, como já citado anteriormente, pode se complexar com um policátion, como a Quitosana. O complexo polieletrólito formado apresenta melhora no percentual de perda de massa, como desejado. Dessa forma, como citado no item 2.2.4.3 foi realizada a atomização de uma solução de quitosana, com concentrações variadas, nas membranas de SA/PEO, com e sem reticulação iônica com CaCl<sub>2</sub>.

Os resultados obtidos para % de perda de massa e % intumescimento no pré-teste podem ser verificados nas Tabelas 3.10 e 3.11. Os pré-testes não foram realizados em triplicata e apenas em solução tampão fosfato e solução de saliva artificial. Estas se mostraram críticas nos testes iniciais, após 4 e 10 horas de incubação. A Figura 3.29 mostra as membranas obtidas em cada tipo de reticulação. As que foram submetidas apenas a atomização com quitosana apresentaram-se transparentes, em relação as que foram atomizadas com CaCl<sub>2</sub> e Quitosana. Isso mostra claramente que a reticulação inicial com CaCl<sub>2</sub> ajuda a manter a estrutura da membrana.



**Figura 3.29** Imagem das membranas de SA/PEO após reticulação por atomização com: (a) Quitosana, (b) CaCl<sub>2</sub> e Quitosana.

		Solução Tampão		Solução Saliva	
Grupo	Amostra	%	% Perda de	%	% Perda de
	Amostra	Intumescimento	massa	Intumescimento	massa
А	SA1,5	26,7	83,3	682,8	69,0
А	SA2,5	248,5	74,2	317,2	81,0
А	SA3,5	382,4	67,6	677,1	51,4
A	SA4,5	70,2	94,7	344,6	76,8
В	SACA1,5	358,1	69,5	764,4	53,8
В	SACA2,5	439,0	41,5	1006,5	45,5
В	SACA3,5	517,2	50,5	1261,7	33,9
В	SACA4,5	821,8	41,8	815,1	47,9

**Tabela 3.10.** Resultados obtidos nos testes de perda de massa e intumescimento das amostras de SA/PEO reticuladas, após 4 h de incubação em solução tampão Fosfato e em solução saliva artificial.

SA= Alginato/Quitosana

SACA = Alginato/CaCl<sub>2</sub>/Quitosana

Podemos notar que os melhores resultados foram obtidos com as amostras do grupo B duplamente reticuladas por atomização com CaCl<sub>2</sub> e com Quitosana. Observou-se que neste grupo todas as amostras tiveram menores % perda de massa. Nas imagens das Figuras 3.30 e 3.31, para 4 e 10 horas de incubação, respectivamente, podemos observar as amostras em cada teste após secagem. Verificamos que as membranas com a dupla reticulação (identificadas com CA inicial nas imagens) apresentaram-se íntegras e planas em relação às demais, e visualmente pode-se verificar a menor perda de massa. As amostras apenas reticuladas com atomização de Quitosana se enrolaram e perderam a estrutura.

		Soluções				
		Tampão	Saliva			
Grupo	Amostra	% Perda de massa	% Perda de massa			
А	SA 1,5	58,8	65,5			
А	SA 2,5	84,0	70,4			
A	SA 3,5	81,0	73,8			
A	SA 4,5	91,7	84,1			
В	SACA 1,5	77,3	53,8			
В	SACA 2,5	59,0	44,8			
В	SACA 3,5	51,5	33,9			
В	SACA 4,5	68,6	34,4			

**Tabela 3.11.** Resultados dos testes de perda de massa das amostras SA/PEO reticuladas,após 10 h de incubação em solução tampão Fosfato e Saliva Artificial.

Nas Figuras 3.32 a e b e 3.33 a e b, podemos verificar a imagem de MEV da membrana de SA/PEO, após a reticulação por atomização com Quitosana, e após a reticulação por atomização com CaCl<sub>2</sub> e posterior atomização com Quitosana, respectivamente. Verifica-se que um filme bem fino foi formado, sobre a membrana, e que a estrutura da nanofibra não foi danificada.



**Figura 3.30.** Imagens das membranas de SA/PEO após incubação por 4 h em: (a) solução tampão Fosfato e (b) solução saliva artificial, reticuladas por atomização com Quitosana (1) e com CaCl<sub>2</sub> e Quitosana (2).

Como conclusão, o pré-teste de reticulação realizado mostrou que as membranas de SA/PEO com reticulação dupla, por atomização de CaCl<sub>2</sub> e de Quitosana, apresentaram melhores resultados. Com base nestas observações, realizou-se um teste completo, em triplicata, somente com as amostras que apresentaram melhores resultados. Após 4, 10 e 24 horas os resultados de perda de massa e intumescimento foram avaliados, cujos resultados e desvios se encontram na Tabela 3.12. Ressalta-se que alguns desvios são bem altos devido à dificuldade de manipulação das membranas úmidas que são muito sensíveis a manipulação.



**Figura 3.31.** Imagens das membranas de SA/PEO após incubação por 10 h em: (a) solução tampão Fosfato e (b) solução saliva artificial, reticuladas por atomização com Quitosana (1) e com CaCl<sub>2</sub> e Quitosana(2).



**Figura 3.32.** Imagens de MEV das membranas de SA/PEO após reticulação por atomização com Quitosana: (a) nanofibras não danificadas e (b) filme fino sobre a membrana de SA/PEO.



**Figura 3.33.** Imagens de MEV das membranas de SA/PEO após reticulação com (a) atomização de CaCl<sub>2</sub>, e (b) posterior atomização de Quitosana.

Nota-se que o melhor valor obtido, para perda de massa em solução de saliva, e a melhor simulação para a aplicação desejada, foram para atomização com a solução de Quitosana 3,5%. Os valores estão abaixo de 41%, como desejado, visto que temos um total de 40% de PEO na membrana, que é solúvel em água e não foi reticulado.

Na Figura 3.34 vemos a imagem de MEV da membrana de SA/PEO, após a 24 horas de incubação em solução tampão saliva artificial. Verificamos, nesta figura, uma membrana com reticulação dupla e as nanofibras que não se dissolveram neste período; isto é, permaneceram intactas no interior da membrana, recobertas pela camada atomizada da solução de 3,5% de quitosana.

Com base nos resultados obtidos, pode-se afirmar que a reticulação das membranas de nanofibras SA/PEO pelo método de atomização a seco foi bemsucedida e será, portanto, utilizada nas membranas para continuidade dos testes.

		Solução Ta	ampão	Solução Saliva		
Tempo Dissolução	Concentração solução Quitosana (%)	% Intumescimento	% Perda de massa	% Intumescimento	% Perda de massa	
4	1,5	933 ± 307	49 ± 15	1082 ± 291	47 ± 9	
4	2,5	838 ± 95	51 ± 2	936 ± 71	45 ± 1	
4	3,5	997 ± 87	43 ± 4	881 ± 230	41 ± 5	
10	1,5	532 ± 195	54 ± 1	537 ± 147	46 ± 2	
10	2,5	890 ± 158	43 ± 6	519 ± 170	45 ± 1	
10	3,5	714 ± 33	52 ± 1	889 ± 320	37 ± 2	
24	1,5	840 ± 38	53 ± 1	935 ± 248	43 ± 3	
24	2,5	730 ± 183	54 ± 1	671 ± 153	45 ± 4	
24	3,5	717 ± 38	47 ± 6	866 ± 10	35 ± 2	

**Tabela 3.12.** Resultados obtidos para testes de perda de massa e Intumescimento para amostras de SA/PEO reticuladas, após 4, 10 e 24h de incubação, em solução tampão Fosfato e em solução saliva artificial.



**Figura 3.34.** Imagem de MEV da membrana de SA/PEO após reticulação por atomização com solução de CaCl<sub>2</sub> e solução de Quitosana 3,5%, após incubação por 24h em solução saliva artificial.

# 3.1.4. Incorporação do fármaco Metronidazol em membranas de Alginato/PEO

Utilizou-se a membrana obtida com uma solução de 2%SA/2%PEO (60:40) para a incorporação do fármaco metronidazol, utilizando as condições de processamento de V=25 kV, D=15 cm e R=1ml/h, com velocidade de rotação de 2500 rpm, a melhor obtida nos testes anteriores. A reticulação também foi realizada utilizando-se a melhor condição obtida, como descrito nos itens 2.2.3. A imagem de MEV desta membrana final obtida para continuidade dos testes pode ser observada na Figura 3.35a. O diâmetro médio das nanofibras obtidas foi de 132±47 nm como verificada a distribuição dos diâmetros no histograma da Figura 3.35b.



**Figura 3.35.** Membrana de nanofibras de SA/PEO eletrofiada nas condições de processo de V=25 kV, D=15 cm e R=1ml/h com adição de 10% de Metronidazol, sendo (a) imagem obtida por MEV com aumento de 10.000 e (b) histograma para diâmetro das nanofibras.

Esta membrana foi a escolhida para se realizar todos os testes de liberação controlada, a qual resultou de estudos prévios para a determinação das melhores condições de obtenção das nanofibras.

# 3.2. Membranas de Quitosana/PEO

## 3.2.1. Preparação das membranas

As membranas de Quitosana (QUIT) /Poli (óxido de etileno) - (PEO) foram produzidas inicialmente na proporção de 50:50 de uma solução 5% QUIT e 4% PEO. Foram utilizados como parâmetros de processo os melhores resultados obtidos na eletrofiação da solução de SA/PEO; isto é, V=20 kV, D= 15 cm e R=1ml/h. Estes parâmetros foram escolhidos para serem testados na eletrofiação coaxial das soluções de QUIT/PEO e SA/PEO em conjunto, com a expectativa de se conseguir fiar ambas as soluções nas mesmas condições de processo. Na Figura 3.36a pode-se verificar a imagem de MEV para a membrana obtida nestas condições de processamento. Observa-se que a membrana teve uma boa formação com nanofibras com diâmetro uniforme na faixa de 159±42nm e sem defeitos, como formação de contas.

Devido ao bom resultado obtido, resolveu-se aumentar as proporções de quitosana na solução, eletrofiando nas mesmas condições de processo, e verificar o efeito sobre o aspecto da membrana. Foram testadas proporções de 60:40, 70:30, 80:20, 90:10 e 100:0. A proporção 100:0 equivale a eletrofiação da solução pura de 5%QUIT. Nas Figuras 3.36(a - e) verifica-se a imagem de MEV para as membranas obtidas em cada uma destas proporções.

Quando foi utilizada a proporção 100:0 da solução 5%QUIT/4%PEO, não foi possível a obtenção de fibras depositadas no coletor. Para todas as outras proporções foi possível a obtenção de fibras. Nas proporções de 80:20 e 90:10 foi necessário um aumento da voltagem aplicada de 20 para 25 kV para que ocorresse a formação das nanofibras. Apenas na proporção de 90:10 ocorreu o aparecimento de defeitos na membrana, com a presença de contas.

Na Tabela 3.13 verificam-se os resultados da caracterização das soluções poliméricas testadas. Ocorreu uma diminuição da viscosidade da solução e um aumento da condutividade, com o aumento da proporção de Quitosana na solução polimérica.

Observando-se os resultados obtidos, observados na Figura 3.36 e na Tabela 3.13, escolheu-se a membrana obtida com solução 5%QUIT/4%PEO na proporção 70:30 para continuidade dos testes de reticulação e para o recobrimento da membrana de acetato de celulose com fármaco metronidazol. Esta escolha foi feita com base no aspecto da membrana obtida e nas condições de processamento, que são iguais aos da membrana de SA/PEO.



**Figura 3.36.** Imagens de MEV, com aumento de 10000 vezes, para membrana eletrofiada de Quitosana/Poli (óxido de etileno) (QUIT/PEO) nas condições de processamento de D = 15 cm, V = 20kV e R = 1mL/h em (a), (b) e (c) e D = 15 cm, V = 25kV e R = 1mL/h em (d) e (e) nas seguintes proporções de QUIT/PEO m/m: (a) 50:50; (b) 60:40; (c) 70:30; (d) 80:20 (e) 90:10.

As membranas para testes de proporção QUIT/PEO foram eletrofiadas por aproximadamente 1:30 h. Quando se iniciou os testes com aumento do tempo de eletrofiação de 5 para 7 horas, semelhante ao ocorrido com a eletrofiação de membranas de SA/PEO, alguns problemas foram observados. As membranas não apresentavam um acumulo abundante de fibras no coletor, mesmo após 5 horas de fiação; ao contrário, elas apresentavam-se finas e frágeis, não sendo possível a sua retirada do papel alumínio para testes posteriores. Mesmo para um tempo maior de eletrofiação, as membranas não apresentaram um aumento da espessura. Também se observou o aparecimento de gotas macroscópicas.

Como a viscosidade desta solução estava muito baixa, na faixa de 1223 cP, decidiu-se aumentar a quantidade de polímero na solução, aumentando-se assim a quantidade de cadeias poliméricas, facilitando o emaranhamento e provavelmente obtendo-se uma membrana com melhor formação.

% QUIT	% PEO	Proporção	Viscosidade	Condutividade	Tensão Superficial
		(QUIT:PEO)	(cP)	(mS)	(mN/m)
5	4	50:50	1265±13	3,317±0,001	52,3±0,6
5	4	60:40	1281±15	4,323±0,001	53,3±0,2
5	4	70:30	1223±15	4,377±0,001	52,7±0,2
5	4	80:20	1164±15	4,893±0,001	53,0±0,1
5	4	90:10	806±9	5,357±0,002	51,7±0,4
5	4	100:0	612±8	5,767±0,002	53,7±0,2
6	4,8	70:30	2406±30	5,033±0,003	51,8±0,1
7	5,6	70:30	5173±60	5,277±0,001	53,3±0,1

Tabela 3.13. Resultados experimentais para análise da solução de QUIT/PEO.

Mantendo-se a proporção de QUIT/PEO na solução polimérica, aumentou-se a quantidade de quitosana para 6 e 7% na solução. Na Tabela 3.13 verifica-se que quando a quantidade de quitosana na solução aumentou de 5 para 6%, houve aumento na viscosidade e na condutividade da solução. Quando se aumentou a concentração de Quitosana para 7%, ocorreu um aumento na viscosidade e um aumento na condutividade da solução. Com o aumento da concentração de polímero na solução temos um maior número de cadeias poliméricas disponíveis, o que facilita o processo de formação de fibras pelo emaranhamento das cadeias, quando a solução é tracionada em direção ao coletor.

A membrana obtida com a solução de 6%QUIT/4,8%PEO apresentou-se mais espessa e com melhor aspecto que as demais. Quando se aumentou a Quitosana para 7%, houve a formação da estrutura 3D, também observada na membrana de SA/PEO, e a membrana resultante também se aparentou frágil e com depósito de muitas gotas macroscópicas.

Com a utilização da solução de 6%QUIT/4,8%PEO foi necessário um aumento da voltagem aplicada de 20 para 25 kV, mantendo-se D=15 cm e R=1ml/h. Para a solução de 7%QUIT/5,6%PEO, as condições de processo utilizadas foram de V=25 kV, D=15 cm e R=0,5ml/h.

Com base nestes resultados, escolheu-se a membrana obtida com 6%QUIT/4,8%PEO (70:30) e eletrofiada com V=25 kV, D=15 cm e R=1ml/h, para continuidade dos testes

Com base nos bons resultados obtidos com a membrana de SA/PEO em coletor rotativo, resolveu-se utilizá-lo também na obtenção da membrana de QUIT/PEO. Na figura 3.37 pode-se verificar a imagem da membrana obtida, nas mesmas condições de processamento, porém com velocidade de rotação de 2500 rpm.



**Figura 3.37.** Imagens para membrana de 6%QUIT/4,8%PEO (70:30) eletrofiada com V=25 kV, D=15 cm e R=1ml/h e velocidade de rotação de 2500 rpm (a) aspecto (Dimensões: 20x12 cm) e (b) MEV com aumento de 10000x.

Com o alinhamento das nanofibras de QUIT/PEO, conseguiu-se obter uma espessura de membrana possível de ser descolada do papel alumínio e de se trabalhar com o material. As nanofibras se depositam preferencialmente em uma faixa de aproximadamente 8 cm no cilindro coletor, e não em toda a extensão, devido à formação de um cone de Taylor de pequeno diâmetro na saída da agulha. Na imagem de MEV, figura 3.37b verifica-se que as nanofibras ficaram muito alinhadas com a velocidade de 2500 rpm, e apenas poucas fibras estão na direção perpendicular a direção do alinhamento.

## 3.2.2. Testes de reticulação

Para obter a melhor condição de reticulação da membrana de QUIT/PEO, foram realizados testes conforme descrito no item 2.2.4.3.

A reticulação da quitosana com glutaraldeído ocorre através da formação de ligações imina (C=N), onde o nitrogênio se conecta a um grupamento alquila ou

arila, mas a nenhum átomo de hidrogênio (H), numa reação conhecida como base de Shiff, conforme mostra a Figura 3.38. Quanto menor o grau de acetilação da quitosana mais favorável a reticulação, porque os grupamentos amino livres no carbono 2 da quitosana reagem com os grupamentos carbonila do glutaraldeído (VONDRAN et al., 2008). O mecanismo preciso da reação e a estrutura dos compostos químicos formados não foram estudados em detalhes. Normalmente, três estruturas distintas são sugeridas:

- Ocorre a formação de apenas uma base de Schiff, com um grupamento aldeído do glutaraldeído, enquanto o outro grupamento aldeído fica livre e é comumente usado para uma reação subsequente;
- Ocorre reticulação com apenas uma molécula de glutaraldeído e duas unidades de quitosana, resultando na formação de duas bases de Schiff, envolvendo ambos os grupamentos aldeído.
- A reticulação não é formada com apenas uma molécula de glutaraldeído, mas com oligômeros resultantes da polimerização de glutaraldeídos; consequentemente, o tamanho da reticulação entre cadeias será maior (Vondran et al., 2008).





As amostras reticuladas por 1, 5 e 10 horas, em vapor de glutaraldeído, ficaram incubadas em água destilada a 37°C por 10 e 24 horas. Na Tabela 3.14 encontram-se os valores obtidos para % Intumescimento e para % perda de massa, das amostras reticuladas. Os sinais negativos indicam perda de massa e os positivos indicam ganho de massa. Esse ganho de massa provém do aumento da

umidade relativa do ar, quando a membrana foi pesada pela primeira e pela segunda vez, após a dissolução parcial devido à hidrofilicidade do polímero.

	Incubaç	ão - 10h	Incubaç	ão - 24h
Tempo de	Intumescimento	Perda de massa	Intumescimento	Perda de massa
reticulação (h)	%	%	%	%
0	316±12	-3,4±0,3	266±15	1,9±0,4
1	208, ±16	1,6±0,8	400±21	-8,8±0,7
5	133±8	1,7±0,2	166±10	0±0
10	124±10	-9,4±0,9	176±12	10±2

Tabela 3.14. Dados obtidos na dissolução da membrana de QUIT/PEO em água a 37ºC:

A perda de massa foi evidente quando conseguiu superar o aumento da umidade relativa do ar. Tal perda é devido à presença de PEO, componente polimérico que não é reticulado com vapor de glutaraldeído e que está presente em uma concentração de 30% em massa na membrana.

Na Figura 3.39, podemos verificar as imagens obtidas por MEV, da estrutura da membrana após a dissolução parcial em solução aquosa por 10 e 24 horas, onde nota-se que a estrutura da nanofibra permaneceu intacta no caso da membrana reticulada por 5h em vapor glutaraldeído.

Uma condição ótima seria aquela em que a membrana não perdesse massa e que intumescesse pouco, pois o dispositivo de liberação na cavidade oral não pode causar incomodo ao usuário, além de garantir a entrega de todo fármaco contido nela, pelo tempo necessário. Sendo assim, com menor absorção de água e sem perda de massa, a condição que melhor satisfaz nossa busca é a obtida com 5h de reticulação, que atendeu o desejado tanto em 10 quanto em 24 h de incubação.

Após a escolha da melhor condição em água, os testes foram realizados em solução de saliva e solução tampão. Os resultados obtidos encontram-se nas Tabelas 3.15 e 3.16.



**Figura 3.39.** Microscopia eletrônica de varredura, aumento de 10000 vezes. Membranas de quitosana eletrofiadas, após dissolução parcial em água a 37ºC (a) 10h - membrana não reticulada, (b)10 h - membrana reticulada por 5h em vapor de glutaraldeído, (a) 24h - membrana não reticulada (b)24 h membrana reticulada por 5h em vapor de glutaraldeído.

QUIT/PEO em so	lução tampão fosfato e em solução s	aliva artificial a 37ºC:	
	Solução Tampão Fosfato	Solução Saliva Artificial	

Tabela 3.15. Dados obtidos na dissolução parcial por 10 horas da membrana de

	Solução Tampão Fosfato		Solução Sal	iva Artificial
Tempo de	Intumescimento	Perda de massa	Intumescimento	Perda de massa
reticulação (h)	%	%	%	%
0	170,0	-5,45	157,43	0,68
5	265,68	9,46	262,37	-7,89

	Solução Tan	npão Fosfato	Solução Sal	iva Artificial
Tempo de	Intumescimento	Perda de massa	Intumescimento	Perda de massa
reticulação (h)	%	%	%	%
0	9,08	-0,92	6,74	-6,07
5	206,67	21,67	240,0	-3,33

**Tabela 3.16.** Dados obtidos na dissolução por 24 horas da membrana de QUIT/PEO em solução tampão fosfato e em solução saliva artificial a 37ºC:

Novamente temos que os sinais negativos indicam perda de massa e os sinais positivos indicam ganho de massa. O ganho de massa provém da água absorvida pela amostra (umidade do ar) e também pelo acúmulo dos sais da solução na membrana, após secagem. A perda de massa foi evidente devido à dissolução de PEO na solução, uma vez que esse polímero não é reticulado no processo; porém os valores são bem significativos, visto que o percentual deste em massa na membrana é de 30%. A membrana reticulada tem melhor poder de absorção de água, pois é mais porosa devido à preservação da estrutura da nanofibra, mantendo os poros interfibras, além da grande área superficial. Sem reticulação ocorre a perda da estrutura porosa da nanofibra, reduzindo assim a área de absorção de água, como observamos na Figura 3.40.



**Figura 3.40.** Microscopia eletrônica de varredura, aumento de 10000 vezes. Membranas de QUIT/PEO eletrofiadas após 24 horas de dissolução a 37ºC (a) imersa em solução tampão (b) imersa em solução de saliva.

Na Figura 3.40 podemos verificar as microscopias das membranas de QUIT/PEO, com 5h de reticulação em glutaraldeído e incubadas em soluções tampão e de saliva artificial, por 24 horas. Verifica-se que, em ambos os casos, a estrutura da membrana se mantêm íntegra, preservando sua estrutura.

Com base nos resultados obtidos com a reticulação das membranas de QUIT/PEO, concluiu-se que as membranas podem ser utilizadas com e sem reticulação, dependendo da aplicação e do tempo de dissolução desejado.

## 3.2.3. Efeito troca de lote da Quitosana Sigma

Durante os trabalhos foi necessária a troca de lote da Quitosana da marca Sigma utilizada. Os trabalhos iniciais foram realizados com um frasco de quitosana de baixo peso molecular da Sigma, lote MKBG3334V (COD 448869). Quando houve a necessidade da aquisição de um novo frasco do material, um novo lote foi recebido da Sigma, lote SLBH1773V (COD 448869), com características muito diferente do lote anterior. Pelo laudo de análise do produto fornecido pelo fornecedor, podemos verificar que apesar dos dois produtos estarem dentro da faixa de viscosidade especificada ( 20 a 300 cps, solução a 1% com 1% ácido acético) , o primeiro lote tem valores próximos ao limite inferior (35 cps) e o segundo lote próximo ao limite superior (235 cps). Essa mudança na faixa de massa molar alterou completamente as características da solução a ser eletrofiada, não sendo possível mais a obtenção das membranas nos parâmetros de solução e processo definidos anteriormente. Na Figura 3.41 temos o comparativo das imagens das membranas, obtidas nas mesmas características de solução e parâmetros de processo com os dois lotes.

Devido a estas alterações, foi necessária a retomada do desenvolvimento das membranas de QUIT/PEO novamente, estabelecendo novas condições de solução e de processo para obtermos novamente membranas aptas a continuidade dos trabalhos.

Várias concentrações de solução foram testadas e suas características analisadas, para tentar-se obter os bons resultados da solução desenvolvida anteriormente. Na Tabela 3.17 estão os resultados de viscosidade, condutividade e tensão superficial de todas as soluções testadas.


**Figura 3.41.** Imagens para membranas eletrofiadas de QUIT/PEO solução 6%QUIT/4,8%PEO, V=25 kV, D=15 cm e R=1ml/h, com velocidade de rotação de 2500 rpm , sendo: (a) lote antigo MKBG3334V, (b) lote novo SLBH1773V e (c) lote novo SLBH1773V após alteração com solução 4,5%QUIT/3,6%PEO, V=25 kV, D=10 cm e R=1ml/h (Dimensões: 20x12 cm).

Comparando-se os resultados da Tabela 3.17, verificamos que a viscosidade da solução de 6%QUIT/4,8%PEO do lote antigo era de 4130cP, e com o lote novo mudou para 15990 cP. Este grande aumento da viscosidade justifica a não reprodutibilidade nos resultados obtidos. Na mesma Tabela verifica-se que a solução preparada com o novo lote, que se aproximou aos valores da solução ideal com o lote antigo, foi a de 4,5%QUIT/3,6%PEO. Com base nestes resultados, preparou-se uma nova membrana com esta solução e eletrofiou-se, ajustando parâmetros de processo onde foi possível obter bons resultados, como mostra a imagem da membrana obtida, na Figura 3.41 c.

QUIT	PEO	Proporção	Lote	Viscosidade	Condutividade	Tensão Suporficial
%	%	(QUIT:PEO)	Quitosana	(cP)	(mS)	(mN/m)
5	4	60:40	MKBG3334V	1281 ± 15	4,323 ± 0,001	53,3 ± 0,2
5	4	70:30	MKBG3334V	1223 ± 15	4,377 ± 0,001	$52,7 \pm 0,2$
6	4,8	60:40	MKBG3334V	4130 ± 50	4,63 ± 0,002	53,0 ± 0,3
5	4	60:40	SLBH1773V	6780 ± 17	$3,10 \pm 0,05$	$47,3 \pm 0,6$
6	4,8	60:40	SLBH1773V	15990 ± 30	$5,28 \pm 0,04$	$55,7 \pm 0,6$
4	3,2	60:40	SLBH1773V	2563 ± 4	$4,18 \pm 0,04$	$54,3 \pm 0,6$
4	3,2	70:30	SLBH1773V	2963 ± 8	$4,81 \pm 0,05$	$52,3 \pm 0,6$
4	4,8	60:40	SLBH1773V	5058 ± 17	$3,40 \pm 0,10$	$54,3 \pm 0,6$
4,5	3,6	60:40	SLBH1773V	4114 ± 4	$4,38 \pm 0,06$	51,2 ± 0,3

Tabela 3.17. Resultados experimentais para análise da solução de QUIT/PEO, novo lote.

Verifica-se que a membrana apresentou boa distribuição de nanofibras no coletor, com poucos defeitos macroscópicos como gotas. Dessa forma esta nova configuração de solução e parâmetro de processo irá ser utilizada nos próximos testes com o novo lote de quitosana.

Com este trabalho definiu-se que os parâmetros indicativos para eletrofiação da Quitosana, devem ser ajustadas pelas características da solução polimérica, assim quando um novo lote for adquirido este ajuste será necessário para a eletrofiação das membranas.

# 3.2.4. Incorporação do fármaco Metronidazol em membranas de Quitosana/PEO

Utilizou-se a membrana obtida com uma solução de 4,5%QUIT/3,6%PEO (60:40) para a incorporação de 10 e 20% do fármaco metronidazol, utilizando as condições de processamento de V=25 kV, D=10 cm e R=1ml/h, com velocidade de rotação de 2500 rpm, a melhor obtida nos testes anteriores. A imagem de MEV desta membrana pode ser observada na Figura 3.42a, sendo esta a membrana utilizada para a continuidade dos testes. O diâmetro médio obtido para as nanofibras foi de 98±39 nm, e a distribuição do diâmetro pode ser visto no histograma da Figura 3.42b.



**Figura 3.42.** Membrana de nanofibras de QUIT/PEO eletrofiada nas condições de processo de V=25 kV, D=10 cm e R=1ml/h com adição de 10% de Metronidazol, sendo (a) imagem obtida por MEV com aumento de 10.000 e (b) histograma para diâmetro das nanofibras.

Esta membrana foi a escolhida para se realizar todos os testes de liberação controlada, a qual resultou de estudos prévios para a determinação das melhores condições de obtenção das nanofibras.

## 3.3. Preparação das Membranas Revestidas de Acetato de Celulose

#### 3.3.1. Nanofibras de Acetato de Celulose com Metronidazol

As membranas foram obtidas com a solução polimérica de 15% de CA em DMAc/Acetona/Água, nas condições de processo conforme trabalhos anteriores publicados em Nista et al. (2012a; 2013), apenas adicionando-se 10% de fármaco na solução polimérica. As membranas obtidas podem ser visualizadas na Figura 3.43a, e com 20% na Figura 3.43b. Uma boa formação das membranas foi conseguida, cujos diâmetros se apresentaram na faixa de 353±164nm, com adição de 10% de MTZ, Figura 3.43b.



**Figura 3.43.** Membrana eletrofiada de CA nas condições de processamento de D = 10 cm, V = 15kV e R = 1mL/h com 10% metronidazol, sendo (a) Imagens de MEV, com aumento de 5000 vezes (b) Histograma do diâmetro das nanofibras.

# 3.3.2. Revestimento da Membrana com Nanofibras de Quitosana/PEO

Através dos trabalhos realizados anteriormente e descritos em Nista et al. (2012a; 2013), verificou-se que a membrana de nanofibra de Acetato de Celulose apresenta-se muito versátil a incorporação de princípios ativos sem alterar a estrutura da nanofibra ou as condições de processamento durante a eletrofiação. A membrana é bem resistente a manipulação e adequação ao tamanho desejado do dispositivo de liberação. Dessa forma planejou-se a elaboração destes dispositivos revestidos para liberação bucal, com o objetivo de unir a flexibilidade de incorporação de princípios ativos na membrana de CA com a característica de mucoadesão obtida pelo revestimento com as nanofibras de polímero mucoadesivo. Para o recobrimento da membrana de Acetato de celulose, contendo o fármaco Metronidazol, com a membrana mucoadesiva de quitosana, conforme dispositivo de liberação proposto no trabalho, duas configurações de recobrimento foram testadas, conforme descrito no item 2.2.5.3.

Primeiramente fiou-se uma membrana de QUIT/PEO, por 3 horas. Sobre a membrana obtida foi eletrofiada uma segunda camada com solução de acetato de celulose com 10%MTZ e 20%MTZ, também por 3 horas. Finalmente uma nova camada de QUIT/PEO foi eletrofiada por mais 3 horas. Entre as camadas deixaram-se as membranas secarem por 1 dia.

Quando foi realizada a retirada da membrana do papel alumínio para testes de liberação do fármaco, observou-se que a camada superior de quitosana não estava aderida fortemente a membrana de acetato de celulose, e que com uma pequena tração ela se separava. Porém, a membrana inferior mantinha-se aderida, não sendo possível separá-la da membrana de CA. Na Figura 3.44a nota-se o efeito observado. Quando esta membrana foi colocada em solução tampão, a camada superficial de quitosana separou-se completamente das demais camadas, Figura 3.44b, a camada inferior por sua vez, manteve-se aderida a de CA.

Este efeito provavelmente ocorreu devido ao isolamento do coletor pela espessura das camadas anteriores; dessa forma, a última camada de quitosana não interage com a camada de CA como ocorre com a camada inicial. Para tentar contornar este problema e melhorar a adesão entre a 2ª e a 3ª camada, foi adicionado uma camada intermediaria da solução de quitosana atomizada criando uma camada muito fina de quitosana sobre a camada de CA. Esta camada se adere bem a camada de CA por se conectar aos poros da nanofibra, como pode ser verificada na Figura 3.45a. Assim, é de se esperar que quando uma próxima

camada de quitosana for eletrofiada, o contato ocorrerá apenas entre nanofibras de quitosana e, assim, obter-se-á uma melhor adesão.



**Figura 3.44.** Imagens para membrana eletrofiada de Acetato de celulose-20%MTZ recoberta com membrana QUIT/PEO, 1ª Configuração: (a) membrana seca, (b) membrana em solução tampão a 37°C por 4 horas.

Prosseguindo com as pesquisas, desenvolveu-se a configuração II para recobrimento, processada da seguinte forma:

- 1ª camada nanofibra QUIT/PEO
- 2ª camada nanofibra CA + MTZ
- 3ª camada pulverização de solução 4,5%QUIT/3,6%PEO por atomização
- 4ª camada nanofibra QUIT/PEO



**Figura 3.45.** Imagens para membrana eletrofiada de Acetato de celulose-20%MTZ recoberta com membrana QUIT/PEO, 2ª Configuração, sendo: (a) MEV da membrana CA após atomização com solução de quitosana (b) membrana seca (c) membrana em solução tampão a 37°C por 1 semana.

Nesta Configuração II de recobrimento foi observada uma grande melhora na adesão entre as camadas, Figura 3.45a e 3.45b. Com a amostra seca não foi possível separar as camadas e, em solução tampão, somente após 3 dias foi possível observar-se um descolamento inicial dessas camadas.

Na Figura 3.46 temos a imagem de MEV para a membrana recoberta, vista lateral. É possível notar cada membrana que compõe as camadas, e a separação entre as camadas de QUIT/PEO e Acetato de Celulose.





Observa-se pela Figura 3.46, que as camadas externas de QUIT/PEO são bem mais compactas que a camada interna, de acetato de celulose, e que não se nota um bom entrelaçamento entre as fibras, na interface, que garanta uma forte união entre as camadas. Assim, a delaminação da membrana de acetato de celulose, sob tração, pode reduzir a resistência a adesão do dispositivo final.

Assim, pode-se afirmar que a camada adicional de solução atomizada de QUIT/PEO melhorou a adesão entre as camadas de nanofibras, porém não se pode afirmar que o problema foi solucionado antes de estudarmos a performance do dispositivo pelos resultados dos testes de força de mucoadesão.

# 3.3.3. Revestimento da Membrana com Nanofibras de Alginato/PEO

Para o recobrimento da membrana de Acetato de celulose, contendo o fármaco Metronidazol, com a membrana mucoadesiva de alginato, conforme dispositivo de liberação proposto no trabalho, duas configurações de recobrimento foram testadas, conforme descrito no item 2.2.5.4.

Primeiramente fiou-se uma membrana de SA/PEO, por 3 horas. Sobre a membrana obtida foi eletrofiada uma segunda camada com solução de acetato de celulose com 10%MTZ e 20%MTZ, também por 3 horas. Finalmente uma nova camada de SA/PEO foi eletrofiada por mais 3 horas. Entre as camadas deixaram-se as membranas secarem por 1 dia. Na membrana recoberta com membrana SA/PEO, observou-se uma boa formação e boa distribuição. A delaminação entre as camadas da membrana de CA revestida de Quitosana, não foi observada nesta membrana.

Esta membrana foi reticulada, seguindo os passos descritos no item 2.2.3, da mesma forma que a membrana de SA/PEO. A atomização com CaCl<sub>2</sub> e posteriormente com solução de quitosana ajudou a unificação entre as camadas, porém como já foi descrito para a membrana revestida de Quitosana, não se pode afirmar que não teremos delaminação antes de estudarmos a performance do dispositivo pelos resultados dos testes de força de mucoadesão.

# 3.4. Preparação das Membranas de nanofibras coaxiais de Alginato/PEO-Quitosana/PEO

O avanço dos conhecimentos em eletrofiação, para obtenção de nanofibras core-shell carreadoras de agentes bioativos solúveis em água, bem como o domínio sobre o tempo de liberação destes bioativos com a garantia de sua integridade, tem se constituído num enorme desafio. A utilização de uma fieira composta de dois capilares coaxiais tem sido explorada na eletrofiação simultânea de duas soluções de polímeros diferentes, para obtenção de membranas nanoestruturadas tipo core-shell (SARVI et al., 2014). Esta técnica tem sido amplamente estudada no controle de estruturas secundárias de fibras, no encapsulamento de fármaco ou agentes biológicos em nanofibras, na preparação de

nanofibras a partir de materiais que não possuem propriedades de formação de filamento, e na adição de líquidos funcionais no interior das nanofibras que constituem a matriz carreadora. (YU et al., 2012)

A utilização de sistema coaxial para formação de polieletrólitos entre quitosana e alginato tem grandes vantagens. Além de se evitar uma etapa adicional de reticulação do biopolímero e alterações na morfologia das fibras, não necessita de solventes tóxicos ou de temperaturas elevadas, que são frequentemente prejudiciais para as células e os fatores bioativos incorporados. (YU et al., 2012)

As membranas de nanofibras coaxiais de SA/QUIT foram produzidas utilizando-se um acessório, conforme já descrito no item 2.2.6. A solução de SA foi utilizada no interior da nanofibra ("*core*"), e a solução de quitosana no exterior da fibra ("*shell*").

Várias condições de processo foram testadas para a obtenção das membranas de nanofibras coaxiais de SA/PEO e QUIT/PEO, SA (2,4%)/PEO (1,6%) 1:1 (w/w) - como *core*, e CHI(5%)/PEO(4%) - 70:30(w/w) - como *shell*. Em várias condições não foi possível obter nanofibras, devido à formação do gel entre quitosana e o alginato na ponta da agulha coaxial antes do início da formação do jato, o que impedia a formação de nanofibras. A melhor membrana de nanofibras coaxiais de SA/QUIT/PEO foi a obtida nas condições de eletrofiação de V = 27 kV, D = 10 cm e R = 0,4mL/h, conforme a imagem de MEV da Figura 3.47a. O diâmetro médio das nanofibras obtidas foi de 102±41nm, conforme verificado no histograma da Figura 3.47b.

Para esta membrana foram obtidas nanofibras com diâmetro na faixa de 102±41nm. Mesmo explorando-se todos os limites possíveis de processamento em nosso equipamento, não foi possível a obtenção de membranas livres de contas, o que não influencia na qualidade da membrana formada. Como observado em todas as membranas preparadas anteriormente, sem a utilização do coletor rotativo, após 4 horas de fiação observa-se um depósito abundante de nanofibras. Uma caracterização completa foi realizada para confirmação dos resultados desejados.



**Figura 3.47.** Membrana de nanofibras de SA/PEO-QUIT/PEO eletrofiada nas condições de processo de V=27 kV, D=10 cm e R=0,4ml/h, sendo (a) imagem obtida por MEV com aumento de 10.000 e (b) histograma para diâmetro das nanofibras.

Os resultados apresentados na Figura 3.48 foram realizados no Laboratório Nacional LNNano, possibilitando uma exploração completa da membrana.



**Figura 3.48.** Imagem de MET, para membrana eletrofiada de SA/QUIT/PEO nas condições de processamento de D = 10 cm, V = 27kV e R = 0.4mL/h.

Verifica-se na Figura 3.48a a formação da estrutura coaxial formada, detectada na análise de MET por diferença de massa onde o diâmetro externo da nanofibra é de 111 nm e o diâmetro interno de 18 nm. Também na Figura 3.48b nota-se que a formação da estrutura coaxial não está uniforme em toda a membrana. Indicando que a formação de fibras homogêneas do complexo aniônico

também ocorreu entre o alginato e a quitosana, demonstrando a necessidade de otimizar os parâmetros envolvidos no processo.

A espectroscopia na região do Infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) também foi refeita e empregada para confirmar a presença dos grupamentos funcionais nas amostras de alginato e quitosana, responsáveis pela interação iônica entre os grupamentos funcionais do alginato (-COOH) e da quitosana (-NH<sub>2</sub>). A Figura 3.49 apresenta os espectros das membranas de SA/PEO e de QUIT/PEO, bem como da membrana de nanofibras coaxiais de SA/PEO-QUIT/PEO.

No espectro de FT-IR da quitosana observa-se uma banda a 1653cm<sup>-1</sup> referente a vibração do grupo amina primária, um a 1595 cm<sup>-1</sup> referente ao estiramento do grupo amino secundária. A banda a 1380 cm<sup>-1</sup> referente a deformação -CH<sub>2</sub> e a absorção a 1160 cm<sup>-1</sup> referente as estiramento das pontes C-O-C. Para o espectro do alginato uma banda típica a 1621 cm<sup>-1</sup> referente a vibração do grupo C=O e a 1416 cm<sup>-1</sup> referentes a estiramento simétrico e assimétrico dos picos do grupo salino carboxilado. A banda próximo a 1320 cm<sup>-1</sup> do estiramento C-O, a 1130 cm<sup>-1</sup> do estiramento C-C, a 1090 cm<sup>-1</sup> do estiramento C-O, a 1020 cm<sup>-1</sup> do estiramento C-O estiramento C-O estiramento C-O.

A reação dos grupamentos carboxílicos do alginato com os grupamentos de amina da quitosana, formando um complexo aniônico, já é conhecida (GEORGE et al., 2006). Como resultado, mudanças são esperadas nas faixas de absorção destes grupamentos após a complexação. Como se pode observar, o pico do ácido carboxílico, perto de 1621 cm-1 (CRUZ et al., 2004), e o pico da amina, perto de 1653 cm-1 (COSTA JR et al., 2008) deslocou significativamente para 1609cm-1.

Li et al., 2012 encontraram resultados semelhantes em um estudo da interação entre o alginato e quitosana, com as mudanças nas bandas de absorção dos grupos carboxílicos e amida. Eles relataram que o pico característico do quitosana em 1653 cm<sup>-1</sup>corresponde a uma mudança de absorção do grupo amida, em 1609 cm<sup>-1</sup>; no entanto, o pico em 1595 cm<sup>-1</sup> do grupo-NH2 não foi observado, o que pode ser o resultado da formação do NH<sup>3+</sup>. Estes resultados também foram obtidos em nosso estudo e validados pelo estudo realizado por Li et al. (2012).

Gazori et al. (2009), obervaram resultados semelhantes em um estudo da interação entre o alginato e a quitosana, onde encontraram mudanças na faixa de absorção dos grupamentos ácidos carboxílicos e amida. As interações eletrostáticas entre os grupamentos carboxílicos do alginato e os grupamentos de amina da quitosana também já foram descritas por Wang et al., (2001) e Ribeiro et al. (2005).



**Figura 3.49.** Espectroscopia de infravermelho para membrana coaxial eletrofiada de SA/QUIT/PEO nas condições de processamento de D = 10 cm, V = 27kV e R = 0,4mL/h (linha azul), e para Alginato/PEO(linha vermelha), Quitosana/PEO (linha verde) e PEO(linha marrom).

Quando a estrutura coaxial é formada o complexo aniônico se forma na interface entre a quitosana e o alginato. Nas nanofibras onde a estrutura não é formada o complexo aniônico se forma de forma homogênea e dessa forma não podemos verificar a diferença de fase dentro da nanofibra.

Os resultados obtidos na análise de FTIR em nossos estudos confirmam a formação do complexo aniônico entre o Alginato e o PEO na nanofibra coaxial, e são respaldados pela literatura citada. A análise de DRX foi realizada para verificar se ocorreu uma diferença de cristalinidade, quando se compara as membranas individuais de SA/PEO e de QUIT/PEO com a membrana de SA/PEO-QUIT/PEO. A Figura 3.50 mostra os difratogramas obtidos para cada membrana respectivamente.



Figura 3.50. Difração de Raio-X para as amostras de QUIT/PEO, SA/PEO e SA/PEO-QUIT/PEO.

Para o nanofibra de SA/PEO observou-se picos em  $2\theta=17,2^{\circ}/19,2^{\circ}/23,3^{\circ}$ , para as nanofibras de QUIT/PEO observaram-se picos em  $2\theta=17,2^{\circ}/19,3^{\circ}/23,3^{\circ}$ . Sendo assim todas as membranas apresentaram tres picos próximos a  $2\theta=17^{\circ}, 2\theta=19^{\circ}$  e  $2\theta=23^{\circ}$ , porém a intensidade dos picos variou entre as amostras. Segundo a literatura (PARK et al.,2010; NASIR et al.,2005), os picos em  $2\theta=19^{\circ}$  e  $2\theta=23^{\circ}$  são referentes ao PEO. Tanto o alginato quanto a quitosana apresentam picos em  $2\theta=2$ 20, porém com intensidades muito baixas o que acaba sendo sobrepostos pelo pico do PEO (HU et al.,2005; PARKRAVAN et al.,2012). As análises de DRX encontradas na literatura para nanofibras de SA/PEO e QUIT/PEO também apresentam os mesmos picos encontrados nesse trabalho com diferentes intensidades dependendo da proporção SA e QUIT com o PEO (PARK et al.,2010; NASIR et al.,2005; HU et al.,2005; PARKRAVAN et al.,2012). Acredita-se que o pico a  $2\theta=17^{\circ}$  é referente à interação entre a quitosana com o alginato, conforme descreveu Nasir et al. (2005), que observou o aparecimento de um pico na faixa de  $2\theta=15^{\circ}$  quando preparou compostos de quitosana/PEO. Acredita-se que o mesmo tenha ocorrido nas nanofibras preparadas.

A membrana de SA/PEO apresentou-se como a mais cristalina e a QUIT/PEO como a de menor cristalinidade. Verifica-se que a membrana do complexo aniônico apresenta uma cristalinidade intermediária quando comparada com as membranas de SA/PEO e de QUIT/PEO individuais, confirmando também a formação de uma membrana com uma estrutura polimérica molecular diferente. É evidente que a cristalinidade do complexo iônico tem um valor intermédio entre a quitosana e o alginato, o qual pode ser atribuído a reorganização das estruturas da cadeia das misturas binárias, ou seja, QUIT / PEO e SA / PEO, segundo Abruzzo et al. (2013).

A Figura 3.51 mostra as curvas de DSC ilustram as membranas individuais de SA/PEO e QUIT/PEO e a membrana do complexo aniônico SA/QUIT/PEO. Verifica-se em todas as curvas um pico endotérmico próximo a 60°C, referente a fusão do PEO presente em todas as membranas, conforme citado por alguns autores (NETO et al., 2005; ÇAYKARA et al., 2005). Para a membrana de QUIT/PEO este pico apresenta-se pouco intenso e duplo em ~48 e 52°C; enquanto que para as membranas de SA/PEO e de SA/QUIT/PEO aparecem picos únicos em ~ 59°C e 57°C, respectivamente.

Verifica-se na curva para a membrana de QUIT/PEO, um pico endotérmico a ~110°C e um exotérmico a ~290°C. Para a membrana de SA/PEO observa-se um pico endotérmico a ~102°C e um exotérmico a ~248°C. Os picos endotérmicos, próximos de 100°C, são normalmente correlacionados com perda de água de associação dos grupos hidroxílicos dos polímeros. No caso dos picos exotérmicos, estes correspondem a degradação de Alginato, cujos valores são alterados em comparação com os polímeros sozinhos (SA >220 °C; CHI >300 °C; PEO >240 °C) (NETO et al., 2005; ÇAYKARA et al., 2005). Como observado, a temperatura de degradação de cada mistura de polímero não foi significativamente afetada pela presença de um componente sobre o outro, comparando-se com os valores de degradação dos componentes isoladamente. O deslocamento dos picos endotérmicos e exotérmicos dos componentes pode também indicar a formação do complexo iônico de quitosano-alginato, que envolve a formação de novas ligações químicas por complexação de polieletrólitos, como observado por outros autores (RIBEIRO et al., 2005; SMITHA et al., 2005).

Centralizando nossa discussão no resultado da análise térmica obtida para a membrana SA/PEO-QUIT/PEO, notam-se no termograma de DSC da Figura 2.60 três picos, um primeiro pico endotérmico que aparece em ~57°C característico da fusão do PEO, como já citado. Atribui-se seu deslocamento para valores menores, encontrados para PEO puro, devido às interações com a quitosana e o alginato. Para as membranas de QUI/PEO, observam-se dois pequenos picos nesta região, o que indica a formação de duas estruturas cristalinas diferentes. Em todas as curvas nota-se um pico endotérmico ao redor de 100°C, devido à perda de água desses materiais. As variações deste valor para cada sistema podem ser atribuídas às diferentes interações entre os polímeros e a água.

Finalmente, o terceiro pico do termograma para a membrana de SA/PEO-QUIT/PEO corresponde à degradação exotérmica dos polímeros em ~289°C, cujo valor tende para aquele obtido para a membrana SA/PEO. Deste modo pode-se afirmar que a presença de quitosana não altera significativamente a temperatura de degradação deste sistema. Entretanto, pode-se assumir que a presença do alginato diminuiu significativamente a temperatura de degradação do sistema Quitosana/PEO.

O deslocamento dos picos tanto endotérmico quanto o exotérmico, pode também indicar a formação do complexo aniônico Alginato-Quitosana, envolvendo a formação de novas ligações químicas pela complexação dos polieletrólitos, como observado por outros autores (RIBEIRO et al., 2005; SMITHA et al., 2005).

O termograma de TGA da membrana de SA/QUIT/PEO, Figura 3.52, apresenta duas regiões de perda de massa. A primeira refere-se ao Alginato (~ 220 °C); enquanto a segunda (entre 360-415 °C) é relacionada ao PEO presente em todas as membranas, conforme Çaykara et al. (2005). A diferença entre eles está relacionada às diferentes quantidades presente deste polímero em cada membrana. Nos trabalhos de Çaykara et al. (2005) eles demonstram que o PEO apresenta uma estabilidade térmica superior ao do alginato, e que nas blendas entre estes

polímeros temos dois picos distintos de degradação térmica, sendo o primeiro referente a degradação do alginato na faixa de 225 a 250°C e outro na faixa de 359 a 391°C referente ao PEO.





A cristalinidade e o grau de acetilação da quitosana também influenciam sua temperatura máxima de degradação, conforme Nam et al. (2010). Em seus trabalhos foi verificado que com o aumento do grau de acetilação da quitosana a temperatura máxima de degradação diminui. O grau de acetilação da Quitosana utilizada neste trabalho foi cerca de 85% e sua temperatura máxima de degradação foi registrada em 257°C, sendo menor que o valor encontrado por Nam et al. (2010) de 272,8°C. Esta diferença provavelmente deve-se a incorporação do PEO que alterou o grau de cristalinidade das nanofibras.

A membrana de quitosana pura mostra também um pico exotérmico a 307 ° C, que pode ser atribuído à sua decomposição. No caso de QUIT / PEO os picos exotérmicos de decomposição são deslocados para 218 ° C. Isso indica que a adição de PEO reduz a estabilidade térmica da membrana de quitosana.



**Figura 3.52.** Termogramas TGA para membranas de nanofibras de SA/PEO, QUIT/PEO e SA/QUIT/PEO.

Podemos verificar na primeira região de perda de massa que temos temperaturas iniciais diferentes para cada membrana; isto é, para a membrana de para SA/PEO a perda de massa se inicia próximo de 208°C. Para as membranas de QUIT/PEO e de SA/PEO-QUIT/PEO, o início da perda se dá em torno de 238°C e 192°C, respectivamente. Comparando-se os valores obtidos para o início da degradação das três membranas, nota-se que QUIT/PEO apresenta uma melhor estabilidade térmica, seguida da membrana de SA/PEO e da SA/PEO-QUIT/PEO.

A mudança para uma temperatura mais baixa na degradação térmica do complexo iônico, de acordo Abruzzo et al. (2013), indica uma reorganização das cadeias de quitosana e de alginato, devido à sua complexação. Estes autores também detectaram, como em nosso estudo, duas fases distintas de degradação térmica; um para alginato e outro para a quitosana, com apenas uma etapa para o complexo de alginato-quitosana. Esta última mostra uma estabilidade térmica menor que as demais. A mudança para uma temperatura mais baixa na degradação térmica do complexo iônico indica que houve um rearranjo estrutural das cadeias da quitosana e do alginato devido à complexação. Este mesmo comportamento também foi observado por Abruzzo et al. (2013), que detectaram dois picos de degradação distintos de alginato e de quitosana, separadamente, e apenas um pico

quando ocorre uma complexação entre os dois polímeros como observado em nosso trabalho.

Apesar do sucesso na obtenção as membranas do complexo iônico entre a SA/PEO-QUIT/PEO, as membranas após 4 horas de fiação apresentam a estrutura 3D, não desejada para a aplicação final do produto a ser desenvolvido, como citado no início.

Produziu-se uma amostra para a análise de MET, Figura 3.53, nas mesmas condições de processamento, porém utilizando o coletor rotativo em uma velocidade de 2500 rpm. Após exploração completa da amostra, não foi detectada estrutura coaxial, indicando uma nanofibra mais homogênea do complexo aniônico SA/PEO-QUIT/PEO.



**Figura 3.53.** Imagem de MET, para membrana eletrofiada de SA/PEO-QUIT/PEO nas condições de processamento de D = 10 cm, V = 27kV, R = 0,4mL/h e rotação 2500 rpm.

Os resultados de perda de massa e taxas de intumescimento para membranas de nanofibras coaxiais de SA/PEO-QUIT/PEO são apresentados na Tabela 3.18. Independente do tempo foi observado o mesmo grau de perda de peso após 4, 10 e 24 h de incubação em água e atribuída apenas à presença de PEO (peso 40%) que foi atingido por este solvente. No que diz respeito à taxa de intumescimento, aumentou com o tempo e atingiu o valor de 75% em 24 horas,

como evidenciado na Tabela 3.18. Isto era esperado com base na natureza altamente hidrofílica do complexo. Uma vez que as membranas mantiveram a sua integridade durante os experimentos, estudos de perda de peso, que podem assegurar que o policomplexo de quitosana e alginato é muito estável e funcionam como uma ligação cruzada entre cadeias de polímero.

 Tempo Incubação (h)
 Perda de massa (%)
 Intumescimento (%)

 4
 53 ± 2
 24 ± 2

 10
 58 ± 3
 41 ± 1

 24
 57 ± 1
 75 ± 1

Tabela 3.18. Perda de massa e intumescimento para membranas SA/PEO-QUIT/PEO

O resultado da morfologia da membrana de SA/PEO-QUIT/PEO obtidas por MEV, Figura 3.54, revelaram que após 24 h de incubação, a estrutura das nanofibras foi mantida como desejado.



**Figura 3.54.** Imagens microscopia eletrônica de varredura (MEV), aumento 10.000 vezes, das nanofibras coaxiais eletrofiadas de SA/PEO-QUIT/PEO após 24 horas de incubação em água

Este resultado é muito promissor, uma vez que sugerem que estas membranas mucoadesivas podem ser utilizadas como sistema de entrega controlada de fármaco para administração tópica oral.

Não se obteve uma membrana homogênea apta a utilização final deste material conforme proposto inicialmente. Muito tempo e esforço devem ser aplicados a finalização deste material, o que não foi possível dentro do cronograma proposto.

## 3.5. CONCLUSÕES

As membranas de nanofibras de Alginato de sódio (SA) / Poli(óxido de etileno) - (PEO), de Quitosana (QUIT)/PEO e de Acetato de Celulose (CA) revestidas com SA/PEO e QUIT/PEO, viáveis para utilização no sistema de liberação bucal do fármaco proposto, foram desenvolvidas. Todas as nanofibras preparadas não apresentaram defeitos como contas e apresentaram uma distribuição homogênea do diâmetro. Foi possível a obtenção de membranas com todos os polímeros com uma boa espessura e uma boa resistência mecânica durante a manipulação.

Excelentes resultados foram obtidos para reticulação iônica das membranas de nanofibras de SA/PEO e de CA revestida com SA/PEO, pela técnica desenvolvida a seco por atomização de CaCl<sub>2</sub> e posterior atomização com solução de quitosana. Os resultados de intumescimento e perda de massa em água, solução tampão e em solução de saliva artificial, mostraram a eficácia da técnica de reticulação desenvolvida.

A reticulação das membranas de nanofibras de QUIT/PEO com vapores de glutaraldeído foi realizada com sucesso, apresentando excelentes resultados nos testes de intumescimento e perda de massa em água, solução tampão fosfato e solução saliva artificial.

A incorporação do fármaco Metronidazol nas membranas de nanofibras de CA, SA/PEO, QUI/PEO também foi bem-sucedida, com adição de concentrações de 10 e 20% m/m do fármaco. As membranas obtidas apresentaram uma boa formação e as nanofibras são uniformes e livres de defeitos, tais como contas.

Verificou-se que a mistura do poliânion alginato e do policátion quitosana forma um complexo iônico espontâneo, devido à reticulação iônica entre as cadeias, o que pode ser usado para obter nanofibras com estrutura coaxial (core-shell). As membranas de nanofibras do complexo iônico foram obtidas com sucesso, usandose duas misturas; uma de 4%SA/ PEO 60: 40 (w / w) em solução aquosa de etanol a 5%, como core; e outra de 5%QUIT/4%PEO, 70:30 (w / w), como shell. As técnicas de caracterização, ou seja, MEV, MET, DSC, TGA, FTIR e DRX sugerem fortemente a formação de uma estrutura molecular diferente nas membranas, onde a complexação de quitosana e alginato ocorreu, de acordo com outros estudos na literatura. As imagens de microscopia eletrônica de transmissão revelaram que a estrutura coaxial (core-shell) foi obtida, mas apenas parcialmente. A fragilidade da membrana obtida fez com que esta fosse excluída da continuidade deste trabalho como nanofibra para revestimento das membranas de nanofibras de CA, como havia sido proposto no inicio do trabalho.

# CAPÍTULO 4 LIBERAÇÃO DO FÁRMACO METRONIDAZOL

#### 4.1. Testes Microbiológicos

Para confirmar a ação do fármaco na membrana e garantir que o processo de eletrofiação não inibiu a eficácia do mesmo, foi realizado um teste micobiológico utilizando-se uma bactéria anaeróbica, Gram negativa (*A. actinomycetemcomitans*) sensível ao fármaco Metronidazol, sendo uma das bactérias anaeróbicas presente nas bolsas periodontais causadoras da periodontite (LINS et al., 2011).

Os resultados obtidos para a inibição do crescimento das bactérias podem ser verificados na Tabela 4.1. Verifica-se um aumento no diâmetro do halo de inibição com o aumento da concentração de Metronidazol na membrana, como desejado. Nota-se que a membrana de QUIT/PEO não reticulada apresentou um halo de inibição menor que a membrana reticulada com vapor de glutaraldeído. No teste realizado de citotoxidade, item 2.2.11, verificou-se que as membranas reticuladas apresentaram resultados de citotoxidade, o que pode ter contribuído para o maior halo de inibição formado.

Com base nos resultados obtidos, verifica-se que tanto as membranas de CA quanto as de SA/PEO e as de QUIT/PEO, incorporadas com o fármaco Metronidazol, apresentaram a ação antibacteriana esperada, com a formação do halo de inibição. O processo de eletrofiação não influenciou na forma de atuação do fármaco, já que o mesmo se manteve eficaz após ter sido submetido a altas voltagens utilizadas no processo. **Tabela 4.1.** Tamanho do halo de inibição de *A. Actinomycetemcomitans* nos testes microbiológicos, em função da concentração de fármaco MTZ incorporado nas membranas de nanofibras.

Tamanho médio do Halo de Inibição (cm)						
Quantidade Fármaco na membrana	10%	20%				
Membrana QUIT/PEO reticulado	2,1 <sup>a</sup> ± 0,2	$3,2^{a} \pm 0,3$				
Membrana QUIT/PEO	1,7 <sup>a</sup> ± 0,1	2,7 <sup>a</sup> ± 0,1				
Membrana SA/PEO	$3,3^{b} \pm 0,2$	$4,0^{b} \pm 0,2$				
Membrana CA	$5,0^{c,d} \pm 0,1$	$5,8^{c,d} \pm 0,1$				
Controle Negativo	$0^{c,d} \pm 0$	$0^{c,d} \pm 0$				
Controle Positivo	5,1 <sup>e</sup> ± 0,1	5,5 <sup>°</sup> ± 0,2				

ANOVA Test. As mesmas letras indicam que não ocorreu diferença estatística significativa entre os diferentes tipos de membrana. (p<0,001)

## 4.2. Testes Citotoxicológicos – Ensaios de Viabilidade Celular

O ensaio de viabilidade celular foi realizado pelo teste de exclusão do corante Trypan Blue. Neste teste, uma suspensão de células é simplesmente misturada com corante e seguidamente examinada visualmente para se observar se estão, ou não, coradas. Além disso, pode-se determinar o número de células viáveis, presentes nesta suspensão de células.

### 4.2.1. Membranas de Quitosana/PEO

As Figuras 4.1 e 4.2 ilustram os resultados de biocompatibilidade, medidos pelo crescimento celular no teste de exclusão com corante vital Trypan Blue. Foram testadas as membranas de nanofibras de Quit/PEO, com e sem reticulação, e com 0(zero), 10 e 20% MTZ.



**Figura 4.1.** Resultados de crescimento celular para cultura de células de Fibroblasto Gengival Humano, após 24, 48 e 72 horas de incubação das membranas de Quitosana, conforme determinado pelo teste de exclusão com corante vital Trypan Blue. Viabilidade celular em poliestireno (Controle). As barras de erro representam o desvio-padrão. (Non Parametric ANOVA Test. CONTROLE <sup>a</sup>; QUIT 0% MTZ <sup>a</sup>; QUIT 10% MTZ <sup>a</sup>, QUIT 20% MTZ <sup>a</sup>. As mesmas letras indicam que não ocorreu diferença estatística significativa entre os diferentes tipos de membrana (p<0,05)).

Na Figura 4.1 tem-se uma comparação do teste citotóxicologico para membranas de QUIT/PEO sem reticulação, onde notamos que tanto a membrana com 0% MTZ, quanto aquela com 10 %, apresentam um percentual de crescimento celular próximo ao controle. Porém, quando aumentamos a concentração do fármaco para 20%, a membrana apresentou resultados de crescimento celular inferiores, mostrando um pequeno grau de toxidade do fármaco, acima de determinadas concentrações. Este resultado nos indicam que altas concentrações do fármaco em questão podem ser tóxicas à celula. Esses resultados sugerem que devemos utilizar concentrações inferiores a 20% de MTZ nos testes *in vitro* e *in vivo* com os sistemas aqui estudados.

A Figura 4.2 exibe o comparativo do teste citotoxicológico para membranas de QUIT/PEO reticuladas. Pode-se verificar que as membranas com

0(zero), 10 e 20% de MTZ apresentam crescimento celular inferior ao controle, após 24 horas, mostrando um grau de toxidade para as células superior as membranas não reticuladas observadas na Figura 4.1. Este resultado sugere que a reticulação realizada com vapores de glutaraldeído, para a membrana de quitosana, torna o material tóxico para as células. Portanto, as membranas de quitosana reticuladas com glutaraldeído não devem ser utilizadas nos testes *in vitro* e *in vivo*, devido a sua toxicidade.



**Figura 4.2.** Resultados de crescimento celular para cultura de células de Fibroblasto Gengival Humano, após 24, 48 e 72 horas de incubação, conforme determinado pelo teste de exclusão com corante vital Trypan Blue. Viabilidade celular em poliestireno (Controle). As barras de erro representam o desvio-padrão. (Non Parametric ANOVA Test. CONTROLE <sup>a</sup>; QUIT 0% MTZ <sup>a</sup>; QUIT 10% MTZ <sup>a</sup>, QUIT 20% MTZ <sup>a</sup>. As mesmas letras indicam que não ocorreu diferença estatística significativa entre os diferentes tipos de membrana (p<0,05)).

O glutaraldeído é um dialdeído, usado como desinfetante e esterilizante, possui grande espectro de atividade contra bactérias, gram-positivas e negativas, esporos bacterianos, fungos e vírus. Ele é usado, principalmente, como esterilizante e desinfetante de equipamento médico-cirúrgicos que não podem ser submetidos a métodos físicos de esterilização. É extremamente empregado para desinfecção rigorosa de endoscópios de fibra ótica, para equipamento de anestesia gasosa, artigos metálicos e equipamentos de aspiração. A característica positiva mais evidente é o amplo espectro de ação que permite a utilização segura para os pacientes independentemente do tipo de patologia e tipo de microrganismo possivelmente associado á contaminação do material. A atividade biocida e inibitória do glutaraldeído é devida à alquilação dos grupos sulfidrila, hidroxila e amino encontrados nos microorganismos, alterando os ácidos nucléicos e a síntese de proteínas. O mecanismo de ação do glutaraldeído envolve uma associação forte com as camadas tanto externas quanto internas das células bacterianas, também inibe a germinação dos esporos bacterianos e posterior desenvolvimento (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Os resultados deste estudo demonstraram um percentual de células viáveis, nas membranas de Quitosana sem reticulação, com adição de 0(zero) ou 10% MTZ, quase igual ao do grupo controle (poliestireno). Pode-se dizer, portanto, que estas membranas de nanofibras são biocompatíveis.

#### 4.2.2. Membranas de Acetato de Celulose

A Figura 4.3 ilustra os resultados de biocompatibilidade obtidos com o teste de exclusão, usando o corante vital Trypan Blue. Foram testadas as membranas de nanofibras de acetato de celulose com 0%, 10% e 20% MTZ.

Podemos verificar que as membranas com 0% e 10% de MTZ apresentaram um percentual de células viáveis celular próximo ao controle. Porém, quando aumentamos a concentração do fármaco para 20% na membrana, como já foi comentado anteriormente para a membrana de Quitosana/PEO, os resultados de crescimento celular foram inferiores ao controle, mostrando um pequeno grau de toxidade para as células. Assim, este resultado corrobora aqueles obtidos para membranas de QUIT/PEO, também com 20% de MTZ, confirmando que concentrações superiores a 20% do fármaco podem ser tóxicas às celulas. Esse resultado limita em até 20% a concentração de MTZ permitida para a realização dos testes *in vitro* e *in vivo* para membranas.



**Figura 4.3.** Resultados de crescimento celular para cultura de células de Fibroblasto Gengival Humano após 24, 48 e 72 horas de incubação, conforme determinado pelo teste de exclusão com corante vital Trypan Blue. Viabilidade celular em poliestireno (Controle). (Non Parametric ANOVA Test. CONTROLE <sup>a</sup>; CA 0% MTZ <sup>a</sup>; CA 10% MTZ <sup>a</sup>, CA 20% MTZ <sup>b</sup>. As mesmas letras indicam que não ocorreu diferença estatística significativa entre os diferentes tipos de membrana (p<0,05)).

Os resultados deste estudo demonstraram que estas membranas de nanofibras são biocompatíveis quando adicionadas de 10% MTZ.

#### 4.2.3. Membranas de Nanofibras de Alginato/PEO

A Figura 4.4 ilustra os resultados de biocompatibilidade obtidos com o teste de exclusão, usando o corante vital Trypan Blue. Foram testadas as membranas de nanofibras de SA/PEO reticuladas com 0%, 10% e 20% MTZ.



**Figura 4.4.** Resultados de crescimento celular para cultura de células de Fibroblasto Gengival Humano, após 24, 48 e 72 horas de incubação, conforme determinado pelo teste de exclusão com corante vital Trypan Blue. Viabilidade celular em poliestireno (Controle). As barras de erro representam o desvio-padrão. (Non Parametric ANOVA Test. CONTROLE <sup>a</sup>; Alginato 0% MTZ <sup>a</sup>; Alginato 10% MTZ <sup>a</sup>, Alginato 20% MTZ <sup>a</sup>. As mesmas letras indicam que não ocorreu diferença estatística significativa entre os diferentes tipos de membrana (p<0,05)).

Podemos verificar que a membrana com 0% e 10% de MTZ apresentou um crescimento celular próximo ou superior ao controle. Porém, quando aumentamos a concentração do fármaco para 20% na membrana, como já foi comentado anteriormente para a membrana de Quitosana /PEOe de Acetato de celulose, os resultados de crescimento celular são inferiores, mostrando um pequeno grau de toxidade a células. Assim, este resultado corrobora aqueles obtidos anteriormente, confirmando que concentrações superiores a 20% do fármaco podem ser tóxicas à celula, o que direciona a realização dos testes *in vitro* e *in vivo* para membranas com no máximo 10% de MTZ.

### 4.3. Teste de Liberação do fármaco metronidazol

## 4.3.1. Construção da Curva de Calibração

Antes do início do teste de liberação controlada, foi necessário o desenvolvimento de um método de análise para determinação quantitativa do fármaco Metronidazol. Reproduziu-se um método já estabelecido na literatura por vários autores (PERIOLI et al.,2004; SHIFROVITCH et al., 2009; SHANKAR et al., 2010).

A análise baseia-se em uma medida direta através de determinação da absorbância em UV Vis em 321nm, conforme já citado anteriormente.

A curva de calibração obtida, Figura 4.5, mostra uma relação linear da concentração do Metronidazol com a absorbância, na faixa de 1 a 20 µg/ml. A equação da reta obtida pode ser descrita como (equação 4.1):

Onde :

[MTZ] = Concentração de Metronidazol (%) Abs= Absorbância



**Figura 4.5.** Curva de Calibração obtida por UV-vis para o Metronidazol em solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,4.

Esta equação obtida foi utilizada para a determinação quantitativa do fármaco, no teste de liberação das membranas de nanofibras, como será visto nos próximos itens. O valor de R<sup>2</sup> obtido de 0,9989 para esta curva nos indica que a equação pode ser utilizada com confiabilidade, no teste de liberação de MTZ, dentro desta faixa de concentração.

#### 4.3.2. Teste de Liberação do fármaco Metronidazol

Para o teste de liberação do fármaco metronidazol nas membranas nanoestruturadas, utilizou-se as membranas obtidas nas melhores condições de cada polímero e já citadas anteriormente. Testou-se a liberação em membranas incorporadas com 10 % do fármaco (m/m com base polímero). Esta dosagem foi a escolhida visto que, quando carregamos a membrana com 20% de fármaco ela será tóxica para as células (Vide item 4.2).

Foi realizado um teste de liberação comparativo entre as membranas de nanofibras. As curvas de liberação obtidas para este caso podem ser vistas na Figura 4.6.



**Figura 4.6.** Curvas de percentual de MTZ liberado por membranas nanoestruturadas com 10% de Metronidazol.

Pode-se observar nas Figuras 4.6 que houve diferença no perfil de liberação entre as membranas de nanofibras eletrofiadas. Em todos os casos podese notar um efeito *burst*, que varia dependendo do material da membrana testada.

Esse efeito é motivado pela liberação do fármaco existente na superfície do sistema matricial, o qual não encontra resistência para migrar para o ambiente ao redor, incentivado pela sua alta solubilidade em água.

Observando-se a Figura 4.6 vemos que as membranas de Quitosana e de CA revestida com Quitosana foram responsáveis pelos maiores efeitos burst, com 70% e 67% de liberação nos primeiros 15 minutos do teste com valores de 364 e 390 µg/ml respectivamente. Podemos observar também que a membrana de CA recoberta com Quitosana apresentou uma liberação ligeiramente mais lenta inicialmente. Essa diferença pode ser atribuída ao recobrimento da membrana, que funcionou como uma barreira para a difusão do fármaco. Como já citado no item 3.3 a membrana de CA revestida de Quitosana apresentou delaminação das camadas. Durante o teste de liberação observou-se que a agitação separou a camada de recobrimento que revestia a membrana de CA com fármaco. Essa delaminação é o motivo das curvas de Quitosana e de CA revestida com Quitosana serem muito parecidas. A barreira não atuou no controle da liberação do fármaco, como esperado, durante todo o processo de liberação. As maiores liberações obtidas com a membrana de CA revestida com Quitosana se devem, provavelmente, à matriz hidrofóbica de acetato de celulose que contem o fármaco hidrofílico, o que acelera a liberação deste para o meio aquoso. As matrizes de quitosana e de alginato são hidrofílicas e, dessa forma, retém um pouco mais o fármaco no seu interior pela afinidade com este devido à mesma polaridade.

Para as membranas de Alginato e de CA revestida de Alginato, obtevese o menor efeito burst; isto é, de 54% (406 µg/ml) e 40% (565 µg/ml), respectivamente. Da mesma forma que observado para as membranas de Quitosana, a membrana de CA revestida com Alginato apresentou uma curva de liberação mais lenta que a do Alginato. Neste caso, em que não ocorreu a delaminação das camadas, o recobrimento retardou a liberação do fármaco e apresentou a liberação mais lenta e com menor efeito *burst*. Podemos concluir que as membranas de Quitosana, Alginato e CA recoberta com Alginato podem ser utilizadas para liberação de MTZ com sucesso. Dependendo da aplicação, podemos modular a membrana para o fim desejado, quanto ao seu tempo de dissolução e quanto à quantidade de liberação do fármaco.

#### 4.3.3. Teste de Permeação do Metronidazol em mucosa oral suína

Os testes de liberação de MTZ apresentados no item anterior apenas indica a capacidade do fármaco ser liberado da matriz polimérica para um meio simulando fluido corporal. Para garantirmos que o fármaco que este fármaco entrará em contato com a corrente sanguínea e dessa forma inicie seu processo de ação é necessário o estudo de permeação do mesmo em mucosa oral, descrito neste item.

Nos estudos de permeação realizados *in vitro*, a separação de epitélio a partir de tecido conjuntivo é o primeiro passo na obtenção de uma membrana adequada para montagem do ensaio em células de difusão tradicionais. Esta separação é geralmente realizada por um processo de separação por calor, descrita no item 2.2.12.2, e não acarreta qualquer efeito significante na morfologia e permeabilidade do epitélio oral (DIAZ DEL CONSUELO et al., 2005; KULKARNI et al., 2010, 2011).

A permeabilidade de MTZ nos tecidos frescos foi estudada para cada tipo de matriz e os resultados comparados, a fim de determinar a influência das diferentes matrizes nanoestruturadas no processo de permeação do fármaco. A Figura 4.7 ilustra o perfil obtido para permeação de MTZ através da mucosa oral (epitélio não queratinizado) sob condições de dosagem infinita.

Verifica-se que as duas membranas de CA revestidas apresentaram perfil e valores semelhantes, com permeação mais lenta que as membranas não revestidas.

Como observado na curva de liberação do item 4.3.2, e já discutido anteriormente, o revestimento da membrana atua como uma barreira física. Assim, tem-se um maior controle da liberação do fármaco para o meio.

Devido à forma de montagem do dispositivo no teste de permeação, a membrana de CA revestida de Quitosana não apresentou a delaminação das

camadas e, desta forma, podemos verificar que o perfil de liberação é coerente com os resultados esperados.



**Figura 4.7.** Perfil de liberação de MTZ pela mucosa oral suína, obtida com aplicação das membranas nanoestruturadas carregadas com 10% de MTZ, sob condições de dosagem infinita (média ± desvio, n=6).

O fluxo em estado estacionário  $(J_{ss})$ , o time lag e a quantidade total permeada em 5h  $(Q^{5h})$  foram calculados na região linear do gráfico da quantidade acumulada de MTZ, transportado através do epitélio, em função do tempo. Os intervalos lineares foram tipicamente entre 0,25 e 5 h, e os valores do coeficiente de regressão para as curvas individuais ultrapassou 0,98. Os valores são apresentados na Tabela 4.2.

A estatística realizada seguiu uma análise para os valores de Fluxo e uma análise One-way Analysis of Variance (ANOVA paramétrica) para time lag e Q<sup>5h</sup>.

O fluxo (J<sub>ss</sub>) representa a velocidade com que o fármaco MTZ atravessa a barreira. Para as membranas testadas, os maiores valores de fluxo foram obtidos para a membrana de Alginato que apresenta diferença estatisticamente significativa em relação às membranas de CA revestidas de Quitosana. Os resultados são coerentes com o perfil de permeação obtido, Figura 4.7, onde os menores valores de

 $J_{ss}$  são encontrados para as membranas revestidas e os maiores para as membranas puras (Quitosana e Alginato).

**Tabela 4.2.** Valores médios de fluxo estado estacionário  $(J_{ss})$ , time lag e quantidade total liberada em 5h  $(Q^{5h})$  para permeação através da mucosa oral suína de MTZ encapsulado em membranas nanoestruturadas (n=6).

	Fluxo	Time lag	$Q_{5h}$
	J <sub>SS</sub> (µg/cm⁻².h⁻¹)	(h)	(µg/cm <sup>-2</sup> )
Membranas	Média	Média	Média
QUIT/PEO	$41,95^{ab} \pm 19,72$	$0,34^{a} \pm 0,19$	$274,39^{ab} \pm 88,15$
CA REVESTIDA QUIT/PEO	$23,39^{a} \pm 6,99$	$0,74^{b} \pm 0,32$	179,28 <sup>a</sup> ± 58,98
SA/PEO	$50,04^{b} \pm 9,11$	$0,48^{ab} \pm 0,17$	$311,85^{b} \pm 40,29$
CA REVESTIDA SA/PEO	$28,74^{ab} \pm 5,46$	$0,79^{b} \pm 0,20$	216,54 <sup>ab</sup> ± 46,44

ANOVA / Kruskal-Wallis Test. As mesmas letras indicam que não ocorreu diferença estatística significativa entre os diferentes tipos de membrana. Cada parâmetro foi avaliado separadamente. (Para Fluxo: CA revestida Quitosana x Alginato p<0,01; CA revestida Alginato x Alginato p<0,05)

O time lag é o tempo em que o fármaco demora a começar a permeação. Para as membranas testadas, a de Quitosana apresentou valores menores e as membranas revestidas um tempo maior de permeação.

Os valores de Q<sub>5h</sub> mostram que a membrana de Alginato e a de Quitosana são as que liberaram uma maior quantidade do fármaco no período de 5h.

Todos os resultados encontrados são condizentes com o esperado. As membranas revestidas apresentaram um menor fluxo, um maior time lag e uma menor quantidade de fármaco liberado em 5h. Como já comentado anteriormente, o revestimento age como uma barreira física adicional durante a liberação do fármaco da matriz polimérica nanoestruturada. Esses resultados corroboram com os obtidos no teste de liberação do fármaco em solução de saliva artificial sem barreira epitelial (Vide item 4.3.2).

Podemos comparar os resultados obtidos de permeação do fármaco no dispositivo desenvolvido, com resultados obtidos para administração oral do fármaco

MTZ. No trabalho de Pähkla et al. (2005) com uma administração oral de 1500 mg/dia de MTZ em forma de comprimidos, foi encontrado uma concentração média de 14,33 µg/ml no plasma, 15,15 µg/ml na saliva e 12,86 µg/ml no sulco gengival em 10 pacientes estudados. Já no trabalho de Bergamashi et al. (2013), com uma administração oral de 750 mg/dia de MTZ também na forma de comprimidos, foram encontrados valores médios de 11,3 µg/ml em plasma e 11,8 µg/ml em saliva em 13 pacientes voluntários. Para as amostras estudadas, verificamos uma faixa de permeação de 179 a 311  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> em 5 horas, ou seja aproximadamente 35,8 a 62,2  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> em 1 hora, com uma dosagem total inicial na faixa de 510 a 874  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>. Dessa forma podemos afirmar que a dosagem in situ do fármaco MTZ é muito mais eficiente e rápida para início da ação do fármaco no sitio ativo. Conseguimos obter uma dosagem local (comparável a saliva ou plasma) aproximadamente 3 vezes maior que a encontrada (35,8 µg comparada a 11,8 µg) com uma dosagem aproximadamente 1500 vezes menor que a administrada oralmente ( 500 μg comparado a 750 mg/dia) via comprimidos de MTZ, em apenas 1 hora após a administração. Isso mostra a vantagem do sistema proposto, reduzindo a dosagem administrada e dessa forma reduzindo os efeitos colaterais ao paciente como havia sido proposto.

## 4.4. CONCLUSÕES

Nos testes microbiológicos com as membranas de CA, SA/PEO, QUI/PEO com e sem reticulação, e com incorporação do fármaco metronidazol, a presença de um halo de inibição frente a bactéria anaeróbica *A. actinomycetemcomitans,* foi observado. Esses resultados indicam que o fármaco não perdeu sua ação ao ser submetido ao processo de eletrofiação, mantendo-se ativo contra a bactéria anaeróbica testada, presente em bolsas periodontais.

Nos testes citotoxicológicos realizados, as membranas de QUIT/PEO reticuladas com vapor de glutaraldeído apresentaram leve grau de toxidade, bem como as membranas com concentrações maiores de MTZ (20%). As demais

membranas testadas apresentaram resultados positivos, quanto à viabilidade celular, mostrando-se biocompatíveis.

Nos testes de liberação do fármaco metronidazol, realizados nas membranas de nanofibras de SA/PEO, e de CA revestida de SA/PEO, obteve-se o menor efeito burst, em relação às membranas de nanofibras de QUIT/PEO e de CA revestidas com QUIT/PEO. As membranas de CA, revestidas de SA/PEO, apresentaram uma redução no efeito burst de 14% em relação à membrana de SA/PEO, provavelmente devido à barreira física causada pela camada adicional de nanofibras. As membranas de SA/PEO e de CA revestidas com SA/PEO apresentaram os melhores resultados de liberação do fármaco.

O teste de permeação do fármaco Metronidazol (utilizado como uma droga modelo) em epitélio oral fresco de suínos foi realizado, a fim de se verificar a função de barreira da membrana carregada com o fármaco. No perfil de liberação notou-se que as duas membranas de CA revestidas apresentaram perfil e valores semelhantes, com permeação mais lenta que as membranas não revestidas. As membranas revestidas também apresentaram um menor Fluxo, um maior Time Lag e uma menor quantidade de fármaco liberado em 5h. Assim, foi confirmado que o revestimento agiu de fato como uma barreira física adicional à liberação de MTZ das matrizes poliméricas nanoestruturadas estudadas. Esses resultados corroboram com os obtidos no teste de liberação do fármaco em solução de saliva artificial sem barreira epitelial. Nos testes de permeação com os dispositivos desenvolvidos, foi possível obter com uma dosagem de MTZ aproximadamente 1500 vezes menor que a administrada oralmente, uma dosagem in situ do fármaco (comparável a saliva ou plasma) aproximadamente 3 vezes maior, em apenas 1 hora após a administração. Isso mostra a vantagem do sistema proposto reduzindo a dosagem administrada e, dessa forma, reduzindo os efeitos colaterais ao paciente como havia sido proposto. Todas as membranas apresentaram resultados excelentes nos testes de permeação comparados com a dosagem oral convencional, porém as membranas de CA revestidas apresentaram uma liberação mais lenta que as não revestidas.

# CAPÍTULO 5 CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS MUCOADESIVOS OBTIDOS POR ELETROFIAÇÃO

#### 5.1. Testes de Mucoadesão

Dois tipos de teste de mucoadesão foram realizados: teste dinâmico e estático. A análise de mucoadesão por adsorção de Mucina é considerado um teste estático já que a amostra fica em repouso durante o ensaio. Os testes de tempo e força de Mucoadesão podem ser considerados dinâmicos visto que uma força é aplicada em cada caso, cisalhamento e tração respectivamente, com o objetivo de simular as condições reais da cavidade bucal onde o material será aplicado.

#### 5.1.1. Mucoadesão por adsorção de mucina

O teste de mucoadesão para comparação entre as membranas de nanofibras desenvolvidas foi baseado num método colorimétrico de Schiff (PAS), utilizando ácido periódico (MANTLE E ALLEN, 1978). Assim, determinou-se a concentração de mucina livre, para os estudos da adsorção de mucina nas membranas obtidas com eletrofiação de soluções de polímeros mucoadesivos. Uma curva de calibração padrão para quantificação de mucina foi construída, e o valor de mucina livre foi calculado a partir dela, pela leitura de absorbância no UV-Vis em 550 nm. (HE et al., 1998). Primeiramente colocaram-se as amostras em contato com soluções de concentração conhecida de mucina. Após 1 hora de incubação, estas foram retiradas e a quantidade livre de mucina na solução residual foi calculada pela diferença entre os valores inicial e final. Este método baseia-se na interação da mucina com o material mucoadesivo; a mucina aderida na amostra é quantificada pela diferença entre a quantidade inicial e a quantidade livre no final (sobra).

Na Figura 5.1 estão os resultados comparativos de mucoadesão, por adsorção de mucina, entre as membranas de nanofibras mucoadesivas desenvolvidas. Pode-se observar que todas as membranas têm a capacidade de
adsorver a mucina, o que é atribuído à interação entre esta e a amostra, devido à ocorrência de mucoadesão.



**Figura 5.1.** Resultados comparativos de mucoadesão, por adsorção de mucina, entre membranas eletrofiadas. (ANOVA Test. QUIT/PEO<sup>a</sup>; SA/PEO<sup>b</sup>; CA revestida QUIT<sup>a,b</sup>, CA revestida SA<sup>b</sup>. As mesmas letras indicam que não ocorreu diferença estatística significativa entre os diferentes tipos de membrana (p<0,05)).

Foi demonstrado no trabalho de He et al. (1998) que a quantidade de mucina adsorvida em microesferas de quitosana aumenta quando aumenta a concentração da mucina, o que também foi observado em nosso estudo.

Verificamos que a membrana de nanofibras de QUIT/PEO foi a que apresentou melhor performance de mucoadesão, com uma faixa de adsorção de 28 a 75% entre as várias concentrações iniciais de mucina.

As membranas de nanofibra de acetato de celulose recobertas com nanofibras de QUIT/PEO também apresentaram bons resultados, na faixa de adsorção de 26 a 62%, entre as várias concentrações iniciais de mucina.

A faixa de adsorção de mucina pelas membranas de CA revestida de QUIT (20 - 59%) e pelas membranas de SA/PEO (13 - 62%) foram as mais baixas, o que significa menor grau de mucoadesão, em comparação às demais.

Tanto a membrana de CA revestida com SA como a de SA/PEO são reticuladas, o que diminui a flexibilidade das cadeias e a disponibilidade de grupos de ligação com a mucina nestas cadeias polimérica.

Segundo Figueiras et al. (2007), a flexibilidade é um dos parâmetros importantes no mecanismo de interpenetração e de entrelaçamento das cadeias. Os polímeros altamente solúveis em água e com funcionalidade maior que 2 adquirem a capacidade de formar ligações cruzadas e, consequentemente, sofrem uma diminuição da mobilidade individual de suas cadeias poliméricas. Com isso, a quantidade de grupamentos químicos disponíveis para adsorção irá diminuir com uma quantidade crescente do grau de reticulação, diminuindo também a força mucoadesiva (FIGUEIRAS et al., 2007).

Neste teste, o melhor resultado foi obtido pela membrana de nanofibras de QUIT/PEO que provavelmente deve-se a forte interação dos grupos livres (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) da quitosana catiônica com a mucina aniônica pois o elevado número de moléculas de ácido siálico e açúcar presentes na estrutura da mucina, coferem à mesma uma acentuada carga negativa. Consequentemente, a interação eletrostática com as cargas presentes na mucina pode favorecer a absorção dessas partículas através do muco e aumentar sua internalização pelas células epiteliais, as quais também são carregadas negativamente. A forte interação eletrostática entre os dois grupos, além da grande área de superfície da membrana devido às nanofibras, promoveu uma membrana com mucoadesão superior aos materiais encontrados na literatura até o momento.

## 5.1.2. Tempo de Mucoadesão

A Tabela 5.1 exibe o tempo médio de mucoadesão para as membranas nanoestruturadas mucoadesivas. Verifica-se que as membranas de SA/PEO e de CA revestidas com SA/PEO apresentaram o maior tempo de mucoadesão, dentre os outros grupos, mantendo-se fixas à mucosa durante as 24 horas de acompanhamento do teste, Figura 5.2.

Diferentemente dos resultados observados no teste de mucoadesão por adsorção de mucina, vistos anteriormente, as membranas de QUIT/PEO e de CA revestidas com QUIT/PEO apresentaram os menores tempos de mucoadesão. Isto provavelmente ocorreu pela característica do teste, já que neste a solução de saliva artificial não continha mucina, que é o componente principal no teste anterior.

Dessa forma, como citamos anteriormente, a mucina tem um papel fundamental nas ligações com a quitosana devido à característica catiônica da quitosana e aniônica da mucina. Não podemos afirmar neste caso, que esta é a razão fundamental para a diferença entre os resultados visto que a natureza do teste é totalmente diferente. No teste em questão (Tempo de Mucoadesão) tem-se uma força de cisalhamento aplicada a membrana favorecendo seu descolamento, ao contrário do teste anterior que é estático.

**Tabela 5.1.** Valores médios para Tempo de Mucoadesão (n=6) para membranas nanoestruturadas.

Membrana	Tempo Mucoadesão (h)
QUIT/PEO	9,5±10,6 <sup>a</sup>
CA Revestida QUIT	6,1±2,0 <sup>a</sup>
SA/PEO	24±0 <sup>b</sup>
CA Revestida SA	24±0 <sup>b</sup>

ANOVA / Kruskal-Wallis Test. As mesmas letras indicam que não ocorreu diferença estatística significativa entre os diferentes tipos de membrana. P<0,0001

Os resultados de tempo de Mucoadesão entre as membranas de SA/PEO revestida com SA apresentaram diferença estatisticamente significativa comparada com as membranas de QUIT/PEO revestida com QUIT.

Durante o teste, o comportamento das membranas também foi monitorado. A membrana de CA revestida com QUIT apresentou o descolamento das camadas já citado anteriormente, diferente da membrana de CA revestida com SA que se manteve integra até as 24 h de observação. A membrana de SA/PEO apresentou um intumescimento observável, porém permaneceu intacta e foi possível seu descolamento da mucosa após 24 horas do teste, Figura 5.2.



**Figura 5.2.** Membranas aderidas a mucosa oral suina ao final do teste de Tempo de Mucoadesão (após 24 h em banho 37°C e em agitação 50 rpm) sendo (a) membrana de CA revestida de SA, (b) membrana de SA/PEO e (c) imagem mostrando descolamento forçado da membrana de SA/PEO com espátula.

Com base nestes resultados verifica-se que as membranas de SA e a revestida com SA são as que mais resistirão aos movimentos da saliva dentro da cavidade oral, permanecendo mais tempo aderidas a mucosa.

# 5.1.3. Força de Mucoadesão

Os resultados para força de destacamento e trabalho de Mucoadesão podem ser consultados na Tabela 5.2.

A estatística realizada seguiu uma análise Kruskal-Wallis Test (Nonparametric ANOVA). Os resultados de força de destacamento não apresentaram diferença significativa entre as membranas. Para os resultados de trabalho de Mucoadesão, foi observada uma diferença significativa entre as membranas de SA e de CA revestida com QUIT.

A força de destacamento, pico máximo da curva de Força x tempo, é considerada dependente da formação de ligações de hidrogênio entre os grupamentos funcionais do adesivo e o muco (PARK et al., 2002). Dessa forma propõe-se que a membrana de SA/PEO apresenta um potencial de ligação de hidrogênio um pouco superior as demais membranas.

Os valores para trabalho de mucoadesão também são ligeiramente maiores para as membranas de SA/PEO, o que sugere que há outras ligações químicas que também são responsáveis por esse mecanismo. Ponchel et al., 1987, sugerem que o trabalho de aderência também é dependente da interpenetração das cadeias para o muco. O grau de interpenetração é maior em concentrações mais elevadas de polímero mucoadesivo na formulação, devido ao aumento do intumescimento do polímero. Isto resulta num aumento do entrelaçamento físico responsável por uma curva mais ampla força / distância e, portanto, pelo aumento dos valores de trabalho de aderência. Como já citado anteriormente no teste de tempo de Mucoadesão, verificou-se visivelmente um maior intumescimento da membrana de SA/PEO em relação às demais membranas após as 24 h do teste. Os resultados obtidos apresentam um desvio grande, o que pode ser justificado pela variação inerente entre as amostras de membranas de nanofibras devido a sua estrutura multicamadas, como visto no Cap 3 deste trabalho. Esta estrutura multicamadas formada pela deposição contínua da nanofibras secas no coletor, seguindo movimento helicoidal aleatório, contribui para pouca compactação entre as camadas e alta variabilidade, causando grande variação entre as amostras do teste.

	Trabalho Mucoadesão	
	Força destacamento (N)	(N.mm)
QUIT/PEO	0,26±0,16 <sup>a</sup>	0,93±0,63 <sup>ab</sup>
CA Revestida QUIT	0,11±0,02 <sup>a</sup>	0,21±0,04 <sup>a</sup>
SA/PEO	0,28±0,22ª	0,96±0,54 <sup>b</sup>
CA Revestida SA	0,10±0,03ª	0,23±0,08 <sup>ab</sup>

**Tabela 5.2.** Valores médios para Força de destacamento e Trabalho de Mucoadesão (n=6) para membranas nanoestruturadas.

ANOVA / Kruskal-Wallis Test. As mesmas letras indicam que não ocorreu diferença estatística significativa entre os diferentes tipos de membrana. Cada parâmetro foi avaliado separadamente. P<0,05

Durante o teste, o comportamento das membranas também foi monitorado. As membranas de CA revestidas, tanto com SA quanto com QUIT, apresentaram descolamento das camadas durante o ensaio. Este descolamento não foi em 100% das amostras, mas ocorreu numa frequência significativa. A Figura 5.3 mostra parte da membrana de CA revestida com QUIT que ficou aderida à mucosa, após a finalização do teste de tração.



**Figura 5.3.** Parte superior da membranas de CA revestida com QUIT ainda aderidas a mucosa oral suina ao final do teste de Força de destacamento e Trabalho de Mucoadesão.

Este resultado já era esperado após as observações do comportamento das membranas revestidas, nos testes anteriores. Apesar do trabalho realizado com o objetivo de aumentar a coesão entre as camadas de diferentes polímeros eletrofiados *layer-by-layer*, eles não apresentaram o efeito desejado, quando a força é realizada no sentido da deposição das camadas no coletor durante a eletrofiação.

Salientamos que, quando o dispositivo for utilizado na cavidade oral durante o processo de liberação do fármaco, a força presente será a de cisalhamento, simulada no teste de tempo de Mucoadesão. A força de destacamento somente será realizada sobre o dispositivo no momento da sua retirada.

Considerando que as duas forças (cisalhamento e destacamento) são importantes para a performance do produto, caso haja o desenvolvimento comercial do mesmo, a membrana de SA/PEO apresentou os melhores resultados.

Podemos comparar os resultados obtidos com valores encontrados na literatura, para força de destacamento em teste de mucoadesão. No trabalho de Bernkop-Schnürch et al. (2001), foram encontrados resultados de 75 mN para força

máxima de destacamento, para discos de alginato preparados por compressão; e no trabalho de Roldo et al. (2004), resultados de 0,1mN para força máxima de destacamento para discos de quitosana, de baixa massa molar, também preparados por compressão. Estes resultados comparados com os obtidos de 280 mN, para as nanofibras de SA/PEO e de 260 mN para as nanofibras de QUIT/PEO, mostram que como proposto no trabalho, as membranas de nanofibras apresentam performance de mucoadesão superior aos dispositivos encontrados na literatura preparados por outras técnicas.

### 5.2. Conclusões

Excelentes resultados foram obtidos, tornando possível uma avaliação comparativa do poder de adesão das membranas estudadas. Os melhores resultados foram obtidos com as membranas puras (sem revestimento) e revestidas de QUIT/PEO, provavelmente devido a forte interação dos grupos livres (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) da guitosana catiônica com a mucina aniônica. O teste de tempo de Mucoadesão mostrou melhores resultados para as membranas puras (sem revestimento) e revestidas de SA/PEO. Neste teste, a força de cisalhamento aplicada à membrana aderida na mucosa oral suína simula os movimentos da saliva na cavidade oral. No teste de Força de Destacamento e Trabalho de Mucoadesão, as membranas sem revestimento de SA/PEO e QUIT/PEO foram as que exibiram melhor performance. Neste teste uma força de tração na direção da deposição das fibras é aplicada na membrana simulando a força realizada para retirada do dispositivo na cavidade bucal. As membranas revestidas apresentaram fragilidade entre as camadas, o que interfere nos resultados de a adesão, pois as camadas se separam entre si antes da camada adesiva se soltar da mucosa, portanto, não são recomendadas. Salientamos que as os resultados de força de mucoadesão encontrados nos testes realizados para as nanofibras mucoadesivas desenvolvidas apresentaram performance de mucoadesão superior aos dispositivos encontrados na literatura preparados por outras técnicas.

# **CAPÍTULO 6**

# **CONCLUSÃO GERAL**

Com base em todos os resultados obtidos a membrana de nanofibra mais adequada para aplicação proposta em doenças periodontais é a de SA/PEO da seguinte forma:

- Solução polimérica de 4% SA/PEO (60:40) com 5% etanol
- Condições de processo de eletrofiação V=20kV, D=15 cm, v=1ml/h, R=2500 rpm
  - Com adição de 10% MTZ

 Reticulada por atomização com solução 10% CaCl<sub>2</sub> e solução 3,5% quitosana.

Elas apresentaram nanofibras homogêneas e livres de defeitos, membranas bem formadas, formação do perfil de liberação do fármaco adequado com e sem barreira epitelial, resultados positivos quanto a testes microbiológicos, são biocompatíveis pelos resultados nos testes citotoxicológicos e apresentaram as melhores performances de Tempo e Força de mucoadesão, superando os resultados das demais membranas.

A membrana de nanofibras de SA/PEO final obtidas neste trabalho apresenta-se eficaz como agente liberador de Metronidazol, podendo ser utilizada como possível dispositivo para auxiliar no tratamento de doenças periodontais como proposto. Esta membrana com 10% MTZ com uma dosagem aproximadamente 1500 vezes menor que a administrada oralmente (via comprimido) alcançaram uma dosagem *in situ* do fármaco (comparável a saliva ou plasma) aproximadamente 3 vezes maior em apenas 1 hora após a administração. Isso mostra a vantagem do sistema proposto reduzindo a dosagem administrada e dessa forma reduzindo os efeitos colaterais ao paciente como havia sido proposto.

Enfatiza-se que o metronidazol foi utilizado como droga modelo e que a incorporação de outro fármaco é possível, estendendo as possibilidades de

utilização do dispositivo para liberação de qualquer outra droga via mucosa bucal, sendo necessários apenas testes específicos para cada fármaco.

As outras três membranas finais desenvolvidas também podem ser utilizadas como dispositivos liberadores de Metronidazol. Elas podem ser utilizadas em diferentes tipos de aplicação, pois cada uma apresenta uma característica própria, bem explorada durante o trabalho. As membranas de SA/PEO e QUIT/PEO são bioabsorviveis, podendo ser submetidas às aplicações intra e extracorpóreas. Devido à natureza não bioabsorvível do Acetato de Celulose, as membranas contendo esse material não poderão ser utilizadas em aplicações intracorpóreas. Várias concentrações do fármaco nas quatro membranas podem ser moduladas já que a adição do mesmo não alterou as características das nanofibras.

# SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

A continuação destas pesquisas visa:

- Obter nanofibras coaxiais de SA/QUIT/PEO, com o objetivo de controlar a barreira de difusão da droga em mucosas diferentes.
- Incorporar o fármaco MTZ no *"core"* da nanofibra coaxial, realizar testes de liberação e permeação deste fármaco e comparar com os resultados obtidos neste trabalho.
- Realizar testes *in vivo*, induzindo a formação da periodontite em camundongos e avaliar a ação da membrana desenvolvida.

# REFERÊNCIAS

- Abruzzo, A.; Bigucci, F.; Cerchiara, T.; Saladini, B.; Gallucci, M.C.; Cruciani, F.; Vitali, B.; Luppi, B. "Chitosan/alginate complexes for vaginal delivery of chlorhexidine digluconate", *Carbohydr. Polym.*, *2013*, 91, 2, 651-658.

- Alborzi, S.; Lim, L.T.; Kakuda, Y. "Electrospinning of Sodium Alginate-Pectin Ultrafine Fibers", *J. of Food Sci. 2010*, 75, 1, 100-107.

- Andersen, T.; Strand, B. L.; Formo,K.; Alsberg E.; Christensen, B.E. "Alginates as biomaterials in tissue Engineering" *Carbohydr. Chem. 2012*, 37, 227-258.

- Antonini R, Cancellier K, Ferreira GK, Scaini G. "Pathophysiology of periodontal disease", *Revisão Fisiopatologia 2013*, 2, 2, 90.

- Badrossamay, M.R.; McIlwee, H.A.; Goss, J.A.; Parker, K.K.; "Nanofiber assembly by rotary jet-spinning", *Nano Letters 2010*, 10, 2257–61.

- Benício, B.N.; Scarminio, I.S.; Bruns, R.E., "Como fazer experimentos", Editora da Unicamp, Campinas, 2001.

- Bergamaschi CDC, Berto LA, Venâncio PC, Cogo K. "Concentrations of metronidazole in human plasma and saliva after tablet or gel administration", *Journal of Pharmacy and Pharmacology 2013*, 66, 40-47.

- Bernkop-Schnürch A, Kast CE, Richter MF. "Improvement in the mucoadhesive properties of alginate by the covalent attachment of cysteine", *J Control Release*. *2001*, 71, 3, 277.

- Bhattarai, N.; Li, Z. S.; Edmondson, D.; Zhang, M. Q. "Alginate-Based Nanofibrous Scaffolds: Structural, Mechanical, and Biological Properties", *Adv. Mater. 2006*,18, 11, 1463–7

- Bhattarai, N.; Zhang, M. "Controlled synthesis and structural stability of alginate-based nanofibers", *Nanotechnology 2007*, 18, 455601.

- Blakeney, B. A.; Tambralli, A.; Anderson, J. M.; Andukuri, A.; Lim, D. J.; Dean, D. R.; Jun, H. W. "Cell infiltration and growth in a low density, uncompressed three-dimensional electrospun nanofibrous scaffold", *Biomaterials 2011*, 32, 1583 – 1590.

- Bonino, C. A.; Efimenko , K.; Jeong ,S. I.; Krebs, M. D.; Alsberg,E.; Khan, S. A. "Three-Dimensional Electrospun Alginate Nanofiber Mats via Tailored Charge Repulsions" *Small 2012*, 8, 12, 1928-36.

- BRITISH Pharmacopoeia 2011. London: Stationery Office, 2011.

- Bruschi ML, Panzeri H, Freitas O De, et al. Sistemas de liberação de fármaco intrabolsa periodontal. Rev Bras Ciências Farm. 2006;42(1):29-47.

- Cai, Y.Z.; Zhang, G.R.; Wang, L.; Jiang, Y.Z.; Ouyang, H.W.; Zou, X.H.; "Novel biodegradable three-dimensional macroporous scaffold using aligned electrospun nanofibrous yarns for bone tissue engineering", *J. of Biomed. Mater. Res. A 2012*, 100, 1187–94.

- Çaykara, T.; Demirci, S.; Eroğlu M.S.; Güven, O. "Poly(ethylene oxide) and its blends with sodium alginate", *Polymer 2005*, 46, 24, 10750–10757.

- Chun, M. K.; Kwak, B. T.; Choi, H. K. "Preparation of Buccal Patch Composed of Carbopol, Poloxamer and Hydroxypropyl Methylcellulose" *Arch Pharm Res* 2003, 26, 11, 973-978.

- Collins, A. E.M.; Deasy P.B.; MacCarthy, D. J.; Shanley D.B. "Evaluation of a controlled-release compact containing tetracycline hydrochloride bonded to tooth for the treatment of periodontal disease", *Int. J. of Pharmac.*, *1989*, 51, 103-114.

- Costa Jr, E. S.; Mansur, H.S. "Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli(álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido", *Química Nova 2008*, 31, 6, 1460-1466.

- Cruz, M. C. P. "Influência do Poli (Etileno Glicol) (PEG) no Processo de Microencapsulação da Oxitetraciclina no Sistema Alginato/Quitosana: Modelamento "in vitro" da Liberação Oral", 143f. Tese de Doutorado – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP, 2004.

 D´Agostini Jr, O "Síntese, caracterização e avaliação da biocompatibilidade e biodesão de nanopartículas de N-Carboximetilquitosana em redes híbridas com ácido poliacrílico", Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí, 2009.

- Dias S, Figueiras A, Barata P, Oliveira R, Veiga F. "A administração na mucosa bucal como uma estratégia alternativa à via oral", *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde-Porto (FCE) 2007*, 4, 118.

- Diaz Del Consuelo, I., Pizzolato, G.P., Falson, F., Guy, R.H., Jacques, Y.,. Evaluation of pig esophageal mucosa as a permeability barrier model for buccal tissue. *J. Pharm. Sci. 2005*, 94, 2777–2788.

- Diaz-Del Consuelo, I., Jacques, Y., Pizzolato, G.P., Guy, R.H., Falson, F.,. Comparison of the lipid composition of porcine buccal and esophageal permeability barriers. *Arch.Oral Biol.* 2005, 50, 981–987

- Duchene, D., Touchard, F., Peppas, N.A. Pharmaceutical and medical aspects of bioadhesive systems for drug administration. *Drug Dev. Ind. Pharm. 1988*, 14, 2–3, 283–318.

- Elkayam', R.; Friedman, M.; Stabholz, A.; Soskolne, A.W.; Sela, M.N.; Golub, L. "Sustained Release Device Containing Minocycline For Local Treatment of Periodontal Disease", *Journal* of *Controlled Release 1988*, 7, 231-236.

- Eouani, C., Piccerelle, P., Prinderre, P., Bourret, E., Joachim, J. In-vitro comparative study of buccal mucoadhesive performance of different polymeric films. *Eur. J. Pharm. Biopharm. 2001*, 52, 45–55.

- Fang,D.; Liua,Y.; Jianga,S.; Nieb,J.; Mab, J. "Effect of intermolecular interaction on electrospinning of sodium alginate", *Carbohydrate Polymers 2011*, 85, 276–279.

- FARMACOPEIA Brasileira. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010. 2 v.

- Figueiras at al, Carvalho, R.; Veiga, F., "Sistemas mucoaderentes de liberação de fármacos na cavidade oral: mecanismos de mucoadesão e polímeros mucoaderentes", *RLCTS 2007*, 4, 2, 216-233.

- Franz-Montan, M., Cereda, C.M., Gaspari, A., da Silva, C.M., de Araújo, D.R., Padula, C., Santi, P., Narvaes, E., Novaes, P.D., Groppo, F.C., de Paula, E.,. "Liposomal-benzocaine gel formulation: correlation between in vitro assays and in vivo topical anesthesia in volunteers" *J. Liposome Res. 2013*, 23, 54–60.

-Franz-Montan, M.; Baroni, D.; Brunetto, G.; Sobral, V. R. V.; Silva, C. M. G.; Venância, P.; Zago, P. W.; Cereda, C. M. S.; Volpato, M. C.; Araujo, D.R.; Paula, E.; Groppo, F. C. " Liposomal lidocaine gel for topical use at oral mucosa: characterization, in vitro assays and in vivo anesthetic efficacy in humans", *J. Liposome Res. 2015*, 25, 1, 9-11.

- Gazori, T.; Khoshayand, M. R.; Azizi, E.; Yazdizade, P.; Nomani, A.; Haririan, I. "Evaluation of Alginate/Chitosan nanoparticles as antisense delivery vector: Formulation, optimization and in vitro characterization" *Carbohydrate Polymers 2009*, 77, 599–606.

- Geankoplis, C.J., Transport process and Unit Operations, 3<sup>ª</sup> Ed, Prentice Hall, New Jersey, 1993.

- Gentsch, R.; Boysen, B.; Lankenau, A.; Borner, H. G. "Single-Step Electrospinning of Bimodal Fiber Meshes for Ease of Cellular Infiltration", *Macromol. Rapid Commun. 2010*, 31, 59 – 64

- George, M.; Abraham, E. T. "Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan — a review", *Journal of Controlled Release 2006*, 114, 1–14.

- Gomez, C.G.; Lambrecht, M.V.P.; Lozano, J.A.; Rinaudo, M.; Villar, M.A. "Influence of the extraction-purification conditions on final properties of alginates obtained from brown algae (Macrocystis pyrifera)", Inter. J. of Biol. Macromol. 2009, 44, 365.

- Han, R.; Fang J.; Sung, K.C.; Hu, O.Y.P "Mucoadhesive buccal disks for novel nalbuphine prodrug controlled delivery: effect of formulation variables on drug release and mucoadhesive performance", Int. J. of Pharmac., *1999*, 177, 201–209.

- He, P.; Davis, S. S.; Illum, L., "In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres", *International Journal of Pharmaceutics 1998*, 166, 75–68.

-Hu C, Gong RH, Zhou FL. "Electrospun Sodium Alginate / Polyethylene Oxide Fibers and Nanocoated Yarns", *International Journal of Polymer Science* 2015, Article ID 126041.

- Huang, Z.; He, C.; Yang, A.; Zhang, Y.; Han, X.; Yin, J.; Wu, Q. "Encapsulating drugs in biodegradable ultrafine fibers through co-axial electrospinning", *J. Biomed Mater. Res A 2006*, 77, 1, 169-179.

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

- Ifuku, S.; Saimoto, H." Chitin nanofibers: preparations, modifications, and applications" *Nanoscale. 2012*, 4, 11, 3308-18.

 Ishida M.; Naoki, N.; Tsuneji, N. "Mucosal Dosage Form of Lidocaine for Toothache using Hydroxypropyl Cellulose and Carbopol", *Chem Pharm Bull 1982*; 30, 980-984.

- Jain S. K.; Jain, A.; Gupta, Y.; Kharya A. "Design and development of a mucoadhesive buccal film bearing progesterone", *Pharmazie 2008*; 63, 129–135.

- Jeong, S.I.; Krebs, M.D.; Bonino, C.A.; Samorezov, J.E.; Khan, S.A.; Alsberg, E. " Electrospun Chitosan-Alginate nanofibers with in situ polyelectrolyte complexation for use as tissue engineering scaffolds", *Tissue Engineering: Part A 2011*, 17, 1-2, 59-71.

- Kenawy, E.; Bowlin, G. L.; Mansfield, K.; Layman, J.; Simpson, D. G.; Sanders, E. H.; Wnek, G. E. "Release of tetracycline hydrochloride from electrospun poly(ethylene-co-vinylacetate), poly(lactic acid), and a blend", *J. Control Release 2002*, 81, 57-64.

- Kianfar, F.; Antonijevic, M.D.; Chowdhry,B.Z.; Boateng, J.S. " Formulation Development of a Carrageenan Based Delivery System for Buccal Drug Delivery Using Ibuprofen as a Model Drug", *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, *2011*, 2, 582-595

- Kim, S.J.; Jang, D.H.; Park, W.H.; Min, B.M. "Fabrication and characterization of 3-dimensional PLGA nanofiber/microfiber composite scaffolds", *Polymer 2010*, 51, 1320–7.

- Kim, T. G.; Chung, H. J.; Park, T. G. "Macroporous and nanofibrous hyaluronic acid/collagen hybrid scaffold fabricated by concurrent electrospinning and deposition/leaching of salt particles", *Acta Biomaterialia 2008*, 4, 1611 – 1619.

- Knaul JZ, Hudson SM, Creber K a M, Carolina N. Improved Mechanical Properties of Chitosan Fibers. Polymer (Guildf). 1999;72:1721-1731.

- Kriegel, C.; Kit, K. M.; McClements, D. J.; Weiss, J. "Electrospinning of chitosan-poly(ethylene oxide) blend nanofibers in the presence of micellar surfactant solution" *Polymer 2009*, 50, 189-200.

- Kulkarni, U., Mahalingam, R., Pather, I., Li, X., Jasti, B.,. "Porcine buccal mucosa as in vitro model: effect of biological and experimental variables" *J. Pharm. Sci. 2010*, 99, 1265–1277.

- Kulkarni, U.D., Mahalingam, R., Li, X., Pather, I., Jasti, B., "Effect of experimental temperature on the permeation of model diffusants across porcine buccal mucosa" *AAPS PharmSciTech 2011*, 12, 579–586.

- Lee, K.Y; Mooney, D.J. "Alginate: Properties and biomedical applications", *Progress in Polymer Science* 2012,.37:106–126.

- Li, D.; Wang, Y.; Xia, Y. "Electrospinning Nanofibers as Uniaxially Aligned Arrays and Layer-by-Layer Stacked Films", *Adv. Mater. 2004*, 16, 361.

- Li, L.; Hsieh, Y.L. " Ultra-fine polyelectrolyte hydrogel fibres from poly(acrylic acid)/poly(vinyl alcohol)", *Nanotechnology 2005*, 16, 2852–2860.

- Li, D.; Li, P.; Zang, J.; Liu, J. "Enhanced hemostatic performance of tranexamic acid-loaded chitosan/alginate composite microparticles" *J. Biomed. Biotech. 2012*, Article ID 981321, 9 pages.

 Lins, CEC "Estudo in vitro da liberação controlada de clorexidina, incorporada em filme de quitosana, para potencial aplicação na cavidade oral.", Dissertação de Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Minas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

- Liu, H.Q.; Hiseh, Y.L. "Ultrafine Fibrous Cellulose Membranes from Electrospinning of Cellulose Acetate" *J. Polym. Sci. Pol. Phys. 2002*, 40, 2119-2129.

- Loesche, W. J., Giordano, J., Hujoel, P., Schwarcz, J. & Smith, B. A. "Metronidazole in periodontitis: reduced need for surgery", *Journal of Clinical Periodontology 1992*, 19, 103.

- Lu, J.; Zhu,Y.; Guo,Z.; Hu,P.; Yu, J. " Electrospinning of sodium alginate with poly(ethylene oxide)", *Polymer 2006*, 47, 8026-8031.

- Mantle, M.; Allen, A., "A colorimetric assay for glyco-proteins based on the periodic acid:schiff stain", *Biochem. Soc. Trans. 1978*, 6, 607–609.

- Matthews, J. A.; Wnek, G. E.; Simpson, D. G.; Bowlin, G. L. "Electrospinning of collagen nanofibers", *Biomacromolecules 2002*, 3, 232-238.

- Minko, T. "Soluble polymer conjugates for drug delivery", *Drug Disc. Today* – *Technol. 2005*, 2, 1, 15-20.

- Moon, S; Farris, R. "Electrospinning of heated gelatin-sodium alginatewater solution", *Polym. Eng. Sci. 2009*, 49(8),1616-1620.

- Nagaiv, T. " Adhesive Topical Drug Delivery System", Journal of Controlled Release 1985, 2, 121-134

- Nam, Y. S.; Park, W.H.; Ihm, D.; Hudson, S. M. "Effect of the degree of deacetylation on the thermal decomposition of chitin and chitosan nanofibers", *Carbohydr. Polym. 2010*, 80, 291-295.

- Nasir NFM, Zain NM, Raha MG, Kadri NA, Kangararau J, Lumpur K. "Characterization of Chitosan-poly (Ethylene Oxide) Blends as Haemodialysis Membrane", *American J. of Appl. Sci. 2005*, 2, 12, 1578.

- Neto, C. G. T.; Giacometti, J. A.; Job, A. E.; Ferreira, F. C.; Fonseca, J. L. C.; Pereira, M. R. "Thermal analysis of chitosan based networks", *Carbohydr. Polym. 2005*, 62, 97-103.

- Nista, S.V.G.; Peres, L.; D'Àvila, M.A.; Schmidt, F.L.; Mei, L.H.I. " Nanostructured membranes based on cellulose acetate obtained by electrospinning, Part 1: Study of the best solvent and conditions by design of experiments", *J of Appl. Polym. Sci., 2012a*, 126, E70-E78.

 Nista, S V G. "Desenvolvimento e Caracterização de Nanofibras de Acetato de Celulose para Liberação Controlada de Fármacos", Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP, 2012b.

- Nista, S.V.G; D'Avila, M.A; Martinez, E.F; 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", Journal Apply Polymer Science. 2013, 130, 4, 2772-2779.

- Nista S V G, Bettini J, Mei, L H I "Coaxial nanofibers of chitosan – alginate – PEO polycomplex obtained by electrospinning", *Carbohydr Polym. 2015*, 127, 222.

- Noyan, U.; Yilmaz, S.; Kuru, B.; Kadir, T.; Acar, O.; Buget, E. "A clinical and microbiological evaluation of systemic and local metronidazole delivery in adult periodontitis patients", *J. Clin. Periodontol. 1997*, 24, 3, 158.

- Ojha SS, Stevens DR, Stano K, Hoffman T, Clarke LI, Gorga RE. "Characterization of Electrical and Mechanical Properties for Coaxial Nanofibers with Poly (ethylene oxide) (PEO) Core and Multiwalled Carbon Nanotube / PEO Sheath", *Biomacromolecules 2008*, 9, 2523.

- Okamoto, A.; Chu, B. "Electro-spinning and electro-blowing of hyaluronic acid", *Biomacromolecules 2004*, 5, 1428-1436.

- Pähkla ER, Pähkla R, Koppel T, Saag M." Metronidazole concentrations in plasma , saliva and periodontal pockets in patients with periodontitis", *J Clin Periodontol 2005*, 32, 163.

- Pandey, R., Khuller, G.K. "Alginate as a Drug Delivery Carrier." Handbook of Carbohydrate Engineering", Taylor & Francis, New York, 2005.

- Park, H., Park, K. "Polymers in Pharmaceutical Products In: Polymer of Biological and Biomedical Significance", Washington, American Chemical Society, *1993*, 540, 1, 3-15.

- Park, C.R.; Munday, D.L. "Development and evaluation of a biphasic buccal adhesive tablet for nicotine replacement therapy" *Int. J. of Pharm. 2002*, 237, 215–226.

- Park, S.H.; Kim, T.G.; Kim H.C.; Yang, D.Y.; Park, T.G. "Development of dualscale scaffolds via direct polymer melt deposition and electro-spinning for applications in tissue regeneration" *Acta Biomaterialia 2008*, 4, 1198–207.

- Park SA, Park KE, Kim WD. "Preparation of Sodium Alginate/Poly(ethylene oxide) Blend Nanofibers with Lecithin", *Macromol Res. 2010*, 18, 9, 891.

- Pakravan M, Heuzey MC, Ajji A. "Core-shell structured PEO-chitosan nanofibers by coaxial electrospinning", *Biomacromolecules 2012*, 13, 2, 412.

- Patel, V.F.; Liu, F.; Brown, M.B. " Advances in oral transmucosal drug delivery", *J. of Control. Release 2011*, 153, 106-116.

- Perioli, L.; Ambrogi, V.; Rubini,D.; Giovagnoli, S.; Ricci, M.; Blasi, P.; Rossi, C. "Novel mucoadhesive buccal formulation containing metronidazole for the treatment of periodontal disease", *J. of Control. Release 2004*, 95, 521–533.

- Pham, Q. P.; Sharma, U.; Mikos, A. G. "Electrospun poly(epsiloncaprolactone) microfiber and multilayer nanofiber/microfiber scaffolds: characterization of scaffolds and measurement of cellular infiltration", *Biomacromolecules 2006*, 7,2796 – 2805.

- Ponchel. G., Touchard, F., Duchene. D., Peppas, N.A. "Bioadhesive analysis of controlled release systems I. Fracture and poly(acrylic acid) containing systems" J. Control interpenetration analysis in Release 1987, 5, 129-141.

- Ramakrishna,S.; Fujihara, K.; Teo,W. ; Lim,T.; Ma,Z. "An Introduction to Electrospinning and Nanofibers", World Scientific, Singapore, 2005.

- Reddy, N.; Yang, Y. Q. "Cítric acid cross-linking of starch films", *Food Chemistry 2010*, 118, 702–711.

- Ribeiro, A. J., Silva, C., Ferreira, D., Veiga, F. "Chitosan-reinforced alginate microspheres obtained through the emulsification/internal gelation technique", *European Journal of Pharmaceutical Sciences 2005*, 25, 31–40.

- Ribeiro, L. M. N.; Alcântara, A. C. S.; Darder, M.; Aranda, P.; Araújo-Moreira, F, M.; Ruiz-Hitzky, E., "Pectin-coated chitosan–LDH bionanocomposite beads as potential systems for colon-targeted drug delivery", *International Journal of Pharmaceutics 2014*, 463, 1-9.

- Ribeiro Neto, W.A.; Pereira , I.H.L.; Ayres, E.; Paula, A.C..; Averous, L.; Góes, A.M.; Oréfice, R.L.; Bretas, R.E.S. "Influence of the microstructure and mechanical strength of nanofibers of biodegradable polymers with hydroxyapatite in stem cells growth. Electrospinning, characterization and cell viability", *Polymer Degradation and Stability* 2012, 97, 2037.

- Robinson, J. R.; Longer, M. A.; Veillard, M., "Bioadhesive Polymers for Controlled Drug Delivery", *Ann. N. Y. Acad. Sci 1987*, 507, 307-314.

- Rodrigues Filho, G.; Toledo, L. C.; Silva, L. G.; Assunção, R. M. N.; Meireles, C. S.; Cerqueira, D. A.; Ruggiero, R. "Membranes of cellulose triacetate produced from sugarcane bagasse cellulose as alternative matrices for doxycycline incorporation", *J. Appl. Polym. Sci. 2009*, 113, 3544-3549. - Rodrigues, P.O.; Cardoso, T.M.; Silva, M.A.S.; Matos, J.R. "Caracterização Termoanalítica e Estudo do Perfil de Dissolução de Comprimidos contendo Metronidazol", *Lat. Am. J. Pharm. 2008*, 27, 4, 528-34

- Roldo M, Hornof M, Caliceti P, Bernkop-Schnürch A." Mucoadhesive thiolated chitosans as platforms for oral controlled drug delivery: Synthesis and in vitro evaluation", *Eur J Pharm Biopharm*. *2004*, 57, 1, 115.

- Rossi, S.; Sandri, G.; Caramella, C.M., "Drug delivery/formulation and nanotechnology - Buccal drug delivery: A challenge already won?", *Drug Discovery Today: Technologies 2005*, 2, 1.

- Sarvi, A.; Chimello, V.;Silva, A.B.; Bretas, R.E.S.; Sundararaj, U. "Coaxial Electrospun Nanofibers of Poly(vinylidenefluoride)/Polyaniline Filled With MultiWalled Carbon Nanotubes", *Polymer Composites* 2014, 35,6, 1198.

- Shami,Z.; Sanjani, N.S. "Preparation of PAA/PEO blend nanofibers via electrospinning process", *e-Polymers 2011*, 70, 1-10.

- Shankar, N. B.; Kumar, R. P.; Kumar, N. U.; Brata, B. B. " Development and characterization of bioadhesive gel of microencapsulated metronidazole for vaginal use" I*ranian J. of Pharm. Res. 2010*, 9 (3), 209.

- Shanker,G.; Kumar, C. K.; Sekhara, C.; Gonugunta,R.; Kumar, B.V.; Veerareddy. P.R. "Formulation and Evaluation of Bioadhesive Buccal Drug Delivery of Tizanidine Hydrochloride Tablets", *PharmSciTech 2009*, 10, 2, 530-539.

- Shifrovitch,Y.; Binderman,I.; Bahar, H.; Berdicevsky,I.; Zilberman, M " Metronidazole Loaded Bioabsorbable Films as Local Antibacterial Treatment of Infected Periodontal Pockets" *J Periodontol 2009*, 80, 2, 330-337.

- Shilpa, A.; Agrawal, S.S.; Ray, A.S. "Controlled Delivery of Drugs from Alginate Matrix", *J.Macromol. Sci. Part C—Polymer Reviews* 2003, 43, 2, 187.

- Shim, I.K.; Jung, M.R.; Kim, K.H.; Seol, Y.J.; Park, Y.J.; Park, W.H.; Lee, S.J. "Novel three-dimensional scaffolds of poly(L-lactic acid) microfibersusing electrospinning and mechanical expansion: fabrication and bone regeneration", *J. of Biomed. Mater. Res. Part B: Applied Biomaterials 2010*, 95, 150–60.

- Singh, S.G.; Singh, R. P.; Gupta, S. K.; Kalyanwat, R.; Yadad, S. "Buccal mucosa as a route for drug delivery: mechanism, design and evaluation", *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci*, *2011*, 2, 3, 358-372.

- Sivakumar, M.; Rao, K. P. "Preparation, characterization and *in vitro* release of gentamicin from coralline hydroxyapatite-gelatin composite microspheres", *Biomaterials 2002*, 23, 3175-3181.

- Smedley, Y.M.; Marriott, C.; Hodges, N.; James, S.L. "Rheological Interactions of Cystic Fibrosis Tracheal Mucin and *Pseudomonas Aeruginosa* Extracellular Alginate", *J. Pharm. Pharmacol.* 2011, 38, 12.

- Smitha, B.; Sridhar, S.; Khan, A. A. "Chitosan-sodium alginate polyion complexes as fuel cell membranes", *European Polym. J.*, *2005*, 41, 1859-1866.

- Sogias, I.; Williams A.; Khutoryanskiy, V., "Why is chitosan mucoadhesive?", *Biomacromolecules 2008*, 9, 1837-1842

- Stone, S. A.; Gosavi, P.; Athauda, T. J.; Ozer, R.R. "In situ citric acid crosslinking of alginate/polyvinyl alcohol electrospun nanofibers", *Materials Letters 2013*, 112, 32–35.

- Sun, X. Y.; Shankar, R.; Borner, H. G.; Ghosh, T. K.; Spontak, R. J. "Field-Driven Biofunctionalization of Polymer Fiber Surfaces during Electrospinning", *Adv. Mater. 2007*, 19, 87 – 91.

- Sun, X.Y. "Concurrent and Sequential Surface Modification of Electrospun Polymer Micro/Nano Fibers", PhD Dissertation, North Carolina State University, Raleigh, NC 2008.

- Supaphol, P., Taepaiboon, P.; Rungsardthong, U.; "Vitamin-loaded electrospun cellulose acetate nanofiber mats as transdermal and dermal therapeutic agents of vitamin A acid and vitamim E", *Eur. J. Pharm Biopharm*. *2007*, 67, 387-397.

- Taepaiboon P, Rungsardthong U, Supaphol P. Drug-loaded electrospun mats of poly(vinyl alcohol) fibres and their release characteristics of four model drugs. Nanotechnology. 2006;17(9):2317-2329.

 Teixeira, P H S P. "Estabilidade de lotes de produção para soluções de perfusão de metronidazol", Dissertação de Mestrado em Química, Área de especialização em Controle de Qualidade e Ambiente, Universidade de Coimbra, 2013.

- The United States Pharmacopeia, USP 37-NF 32, 2014: The National Formulary. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention, 2013.

- Tobyn, M.J., Johnson, J.R., Dettmar, P.W., . Factors affecting in vivo gastric mucoadhesion IV. Influence of tablet excipients, surfactants and salts on the observed mucoadhesion of polymers. *Eur. J. 1997*, 43, 65–71.

- Uttayarat, P.; Perets, A.; Li, M.; Pimton, P.; Stachelek, S.J.; Alferiev, I.; Composto, R.J.; Levy, R.J.; Lelkes, P.I. "Micropatterning of three-dimensional electrospun polyurethane vascular grafts", *Acta Biomaterialia 2010*, 6, 4229–37.

- Uyar, T.; Besenbacher, F. "Electrospinning of cyclodextrin funcionalized polyethylene oxide (PEO), *Eur. Polym. J.* 2009, 45, 1032-1037.

- Van Den Mooter, G.; Samyn, C.; Kinget, R. Characterization of colonspecific azo polymers: A study of the swelling propertoes and the permeability of isolated polymer films, *International Journal of Pharmaceutics 1994*, 111, 2, 127.

- Verma, S.;Kaul, M.; Rawat, A.; Saini, H. "An overview on buccal drug delivery system", *Int. J. Pharm. Sci. Res. 2011*, 2, 6, 1303-1321.

- Verreck, G.; Chun, I.; Rosenblatt, J.; Peeters, J.; Dijck, A. V.; Mensch, J.; Noppe, M.; Brewster, M. E. " Incorporation of drugs in an amorphous state into electrospun nanofibers composed of a water-insoluble, nonbiodegradable polymer", *J. Control. Release 2003*, 92, 349-360.

- Voet, D., Voet, J. G. "Bioquímica", 4. ed., 2013, Porto Alegre, Artmed.

- Vondran, J. L.; Sun, W.; Schauer, C.L. "Crosslinked, Electrospun Chitosan–Poly(ethylene oxide) Nanofiber Mats", *J Appl Polym Sci 2008*, 109, 968.

- Yilmaz S, Kuru B, Noyan U, Kadir T, Acar O, Büget E. "A clinical and microbiological evaluation of systemic and local metronidazole delivery in early onset periodontitis patients", *J Clin Periodontol.* 1997, 24, 158.

- Wang, L., Khor, E., Lim, L.Y. "Chitosan-alginate-CaCl2 system for membrane coat application", *Jf Pharma Sci 2001*, 90, 1134–1142.

- Wang, W.; Itoh, S.; Konno, K.; Kikkawa, T.; Ichinose, S.; Sakai, K.; Ohkuma,T.; Watabe, K. "Effects of Schwann cell alignment along the oriented electrospun chitosan nanofibers on nerve regeneration", *Jf Biomed Mat Res Part A 2009*; 91:994–1005.

- Wang, Y.; Li, H.; Wang, G.; Yin, T.; Wang, B.; Yu, Q.; "Electrospinning of Polymer Nanofibers with Ordered Patterns and Architectures", *J. Nanosci. Nanotechnol 2010*, 10, 1699. - Wnek, G. E.; Carr, M. E.; Simpson, D. G.; Bowlin, G. L. "Electrospinning of nanofibers fibrinogen structures", *Nano Letters* 2003, 3, 213-216.

- Wright, L. D.; Andric, T.; Freeman, J. W. "Utilizing NaCl to increase the porosity of electrospun materials", *Mater. Sci. Eng. C. 2011*, 31, 30 – 36.

- Zamani, M.; Morshed, M.; Varshosaz, J.; Jannesari, M. "Controlled release of metronidazole benzoate from poly e-caprolactone electrospun nanofibers for periodontal diseases", *Eur. J. of Pharmac. and Biopharmac 2010*, 75, 179–185.

- Zeng, J.; Xu, X.; Chen, X.; Liang, Q.; Bian, X.; Yang, L.; Jing, X. " Biodegradable electrospun fibers for drug delivery", *J. Control. Release 2003*, 92, 227-231.

- Zhang, D. M.; Chang, J. "Electrospinning of Three-Dimensional Nanofibrous Tubes with Controllable Architectures" *Nano Lett. 2008*, 8, 3283 – 3287.

# **APÊNDICE**

# nanoestruturadas. Apêndice 1 – Modelo da régua utilizada para avaliação das membranas

Ex:1	Nº Amostras		
	Não houve formação de fibras	1	Nota
	Pouca formação de fibras e muitos defeitos	2	Nota
	Houve formação de fibras, porém elas estão coladas entre si	3	Nota
		4	Nota
	Houve formação de fibras, porem estas apresentam muitos defeitos grosseiros	5	Nota
		6	Nota
	Houve formação de fibras, porem apresentam defeitos sutis	7	Nota
		8	Nota
	Houve formação de fibras, as quais se apresentam pouca irregularidade, mantendo o mesmo diâmetro durante toda a extensão, porém fibras diferentes apresentam diâmetros diferentes.	9	Nota
	Houve formação de fibras, as quais se apresentam regulares, mantendo o mesmo diâmetro durante toda a extensão, e todas as fibras apresentam o mesmo diâmetro, a manta apresenta-se uniforme.	10	Nota

204

# Apêndice 2. - Produção Científica Durante o Doutorado

# 1. Artigos publicados:

**Nista, Silvia Vaz Guerra;** D'Avila, Marcos Aquira; Martinez, Elizabeth Ferreira; Silva, Almenara S. F; Mei, Lucia Helena Innocentini "Nanostructured Membranes Based on Cellulose Acetate Obtained by Electrospinning. Part II. Controlled Release Profile and Microbiological Behavior", Journal Apply Polymer Science. 2013, 130, 4, 2772-2779. (DOI: 10.1002/app.39362)

**Nista, Silvia Vaz Guerra**; Bettini, Jefferson; Mei, Lucia Helena Innocentini, "Coaxial Nanofibers of Chitosan-Alginate-PEO polycomplex obtained by electrospinning", Carbohydrate Polymers 2015, 127, 222–228. (http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.063)

Segala, Karen.; **Nista, Silvia Vaz Guerra**; Bizarria, Maria Trindade Marques.; Cordi, Livia; Ávila Junior, José; Kleinubing, Sirlene Adriana, Cruz, Debora Cristina; Brocchi, Marcelo; Caballero, Nelson Eduardo Duran; Lona, Liliane Maria Ferrareso.; Mei, Lucia Helena Innocentini "Silver nanoparticles incorporated into biopolymer nanostructured membranes produced by electrospinning: a study of the antimicrobial activity", Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences 2015, 51, 911. (DOI:10.1590/s1984-82502015000400017)

Nonato, Renato C.; Morales, Ana Rita ; Vieira, Amanda F. M. ; **Nista, Silvia Vaz Guerra** ; Mei, Lucia Helena Innocentini ; Bonse, Baltus C. "Solution Parameters in the Manufacture of Ceramic ZnO Nanofibers made by Electrospinning". Applied Physics. A, Materials Science & Processing, 2016, 122, 214. (DOI:10.1007/s00339-016-9752-0)

# 2. Trabalhos completos apresentados em Congressos Internacionais

**Nista, S.V.G;** Mei, L.H.I; Melo, T.B. "Membranas de Nanofibras Mucoadesivas de Quitosana/PEO" In: XIV Latin American Symposium on Polymers (Simpósio Latino Americano de Polímeros SLAP) and XII Ibero American Congress on Polymers (Congresso Ibero Americano de Polímeros - CIP), 2014, Porto de galinhas.

**Nista, S.V.G.;** Mei, L.H.I.; Pinheiro, I. F.; Morales, A. R.; Portugal, R. V.; Cassago, A. . "Alginate Membranes Reinforced by Cellulose Nanocrystals". In: XIV Latin American Symposium on Polymers (Simpósio Latino Americano de Polímeros SLAP) and XII Ibero American Congress on Polymers (Congresso Ibero Americano de Polímeros - CIP), 2014, Porto de Galinhas.

Nonato, R. C.; Vieira, A.F.M.; **Nista, S.V.G.;** Mei, L.H.I.; Bonse, B.C.; Morales, A.R. "Nanofibras de ZnO feitas por eletrofiação: Fabricação e Caracterização" In: XIV Latin American Symposium on Polymers (Simpósio Latino Americano de Polímeros SLAP) and XII Ibero American Congress on Polymers (Congresso Ibero Americano de Polímeros - CIP), 2014, Porto de Galinhas.

# 3. Trabalhos completos apresentados em Congressos Nacionais

**Nista, S.V.G.;** Mei, L.H.I.; "Desenvolvimento de Nanofibras de Polímero Mucoadesivo Utilizando Design of Experiments". In: 12 Congresso Brasileiro de Polímeros (12 CBPol), 2013, Florianópolis - SC. 12 Congresso Brasileiro de Polímeros (12 CBPol), 2013.

# 4. Trabalhos apresentados em Congressos Internacionais

**Nista, S.V.G;** Mei, L.H.I; Melo, T.B. "Mucoadhesive polymer nanofibers Crosslink by New dry Technique". In: 8th ECNP International Conference on Nanostructured Polymers and Nanocomposites, 2014, Dresden - Germany.

**Nista, S.V.G;** Mei, L.H.I; Pinheiro, I. F.; Morales, A. R. "Membranes of chitosan reinforced with cellulose nanocrystals" In: 8th ECNP International Conference on Nanostructured Polymers and Nanocomposites, 2014, Dresden - Germany.

Morales, A. R. ; Mei, L.H.I.; **Nista, S.V.G.;**; Nonato, R. C. ; Vieira, A. F. M. ; Bonse, B. C. . "ZnO Micro and Nanofibers made by electrospinning: Fabrication and Characterization". In: 14th International Conference on Nanotechnology - IEEE Nano, 2014, Toronto. 14th International Conference on Nanotechnology - IEEE Nano, 2014.

**Nista, S.V.G;** Mei, L.H.I; Pinheiro, I. F. "Electrospinning of Alginate Nanofibers Reinforced by Cellulose Nanocrystals". In: 4th International Advances in Applied Physics and Materials Science Congress & Exhibition, 2014, Fethiye - Turkey.