

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ESTUDO DO PROCESSO DE ELETROFIAÇÃO DE
MICRO/NANOFIBRAS DE POLÍMEROS
BIODEGRADÁVEIS PARA LIBERAÇÃO DO
ANTIBIÓTICO CLOXACILINA

SÃO CARLOS
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO DO PROCESSO DE ELETROFIAÇÃO DE
MICRO/NANOFIBRAS DE POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS PARA
LIBERAÇÃO DO ANTIBIÓTICO CLOXACILINA**

Rodrigo Schneider*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS, área de concentração: FÍSICO-QUÍMICA.

Orientador: Dr. Daniel Souza Correa

*** Bolsista Capes**

São Carlos
2018

Schneider, Rodrigo

ESTUDO DO PROCESSO DE ELETROFIAÇÃO DE
MICRO/NANOFIBRAS DE POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS PARA
LIBERAÇÃO DO ANTIBIÓTICO CLOXACILINA / Rodrigo Schneider. --
2018.

62 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus São
Carlos, São Carlos

Orientador: Daniel Souza Corrêa

Banca examinadora: Cauê Ribeiro de Oliveira, Iêda Maria Martinez Paino

Bibliografia

1. Fibras. 2. Eletrofiação. 3. Liberação de antibiótico. I. Orientador. II.
Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Ronildo Santos Prado – CRB/8 7325



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Rodrigo Schneider, realizada em 28/02/2018:

Prof. Dr. Daniel Souza Corrêa
Embrapa

Prof. Dr. Cauê Ribeiro de Oliveira
Embrapa

Profa. Dra. Iêda Maria Martinez Paino
USP

AGRADECIMENTOS

A minha mãe e ao meu pai que sempre me apoiaram desde minha graduação e seguiram me apoiando mesmo com a mudança de estado para São Paulo, me dando total suporte nos momentos complicados, para que eu pudesse dar continuidade a minha carreira acadêmica.

Ao meu irmão, Ricardo Schneider, pessoa de amor incondicional pela pesquisa acadêmica, grande incentivador e exemplo de profissional da área de Química.

Ao meu orientador Daniel Souza Correa, que além de possuir uma formação impecável é um profissional de altíssimo nível, que sabe coordenar o seu grupo de alunos e trata a todos com respeito, simplicidade e profissionalismo.

Aos demais membros do grupo de pesquisa coordenado pelo Daniel: Danilo, Murilo, Augusto, Paulo, Luiza, Rafaela André, Rafaela Sanfelice, Kelcilene, Fernanda, Vanessa e Adriana.

A todo suporte dado pela Embrapa Instrumentação por meio do projeto (L) e também, e em especial, as técnicas Adriana, Silviane e Joana, as quais sempre me auxiliaram muito ao longo dos experimentos. A CAPES e ao Departamento de Química da UFSCar que me oportunizaram o complemento da formação como bacharel em química, contribuindo por intermédio de sua estrutura e corpo docente, bem como a agência de fomento pelo financiamento da bolsa (Projeto: PROEX0107042).

Aos meus amigos que fiz na cidade e aos que moraram comigo: Fábio, Luis, Marcos, Sérgio e aos amigos do futebol sagrado de toda terça-feira.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATR – *Attenuated Total Reflectance* (Refletância total atenuada)

CHL – Clorofórmio

CLOX – Cloxacilina

DMF – N,N-dimetilformamida

DSC – *Differential Scanning Calorimetry* (Calorimetria diferencial exploratória)

EC – Ecovio

ECDC – *European Centre for Disease Prevention and Control*

ECNF – Ecovio Nanofibras

FTIR – *Fourier Transformed Infrared* (Espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier)

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

MET – Metanol

MEV – Microscopia eletrônica de Varredura

PBAT – Poli(butileno adipato-co-tereftalato)

PBS – *Phosphate buffer solution* (Solução tampão de fosfato)

PLA – Poli(ácido láctico)

TGA – Análise Termogravimétrica

XPS – *X-Ray Photoelectron Spectroscopy* (Espectroscopia de fotoelétrons por Raios-X)

LISTA DE TABELAS

TABELA 4.1 – Condições experimentais de eletrofiação. Concentrações poliméricas do polímero Ecovio [EC] (m.V^{-1}) e fluxos das soluções.....	19
TABELA 4.2 – Legenda para amostra e relação mássica entre cloxacilina (CLOX) e polímero Ecovio (EC) (m.m^{-1}) na solução polimérica.	20
TABELA 5.1 – Diâmetros médios e desvio padrão mensurados a partir das imagens de MEV das fibras de Ecovio (ECNF). Amostragem de $n=100$ fibras (ImageJ).	29
TABELA 5.2 - Efeito da adição de metanol 5% na mistura de solventes clorofórmio/N,N-dimetilformamida 85/10 v/v e efeito da massa de Cloxacilina (CLOX) no diâmetro das fibras de Ecovio (ECNF).	38
TABELA 5.3 – Eventos térmicos obtidos dos gráficos de TG e DTG.	41
TABELA 5.4 - Parâmetros cinéticos obtidos do perfil de liberação da Cloxacilina a partir ECNF_CLOX10 e ECNF_CLOX20 em meio pH 7,3 para os modelos cinéticos de Korsmeyer-Peppas, Hixson-Crowel e Higuchi.....	51
TABELA 5.5 - Parâmetros cinéticos obtidos do perfil de liberação da Cloxacilina a partir ECNF_CLOX20 em meio pH 5,5 para os modelos cinéticos de Korsmeyer-Peppas, Hixson-Crowel e Higuchi.	54

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Consumo de antibiótico médio (mg) por unidade de população corrigida (PCU - <i>Population Correction Unit</i>) para as três maiores fontes de proteínas consumidas no mundo: bovinos (<i>cattle</i>), frango (<i>chickens</i>) e suínos (<i>pigs</i>). Imagem retirada de Van Boeckel et al. ¹²	2
FIGURA 2.1 - Estrutura química do poli(butileno adipato-co-tereftalato).	6
FIGURA 2.2 - Estrutura química do poli(ácido láctico).	7
FIGURA 2.3 - Esquematização de diferentes tipos de geometria para liberação. Imagem adaptada da referência Wong e Shoi (2015) ⁵⁹	7
FIGURA 2.4 - Esquema do processo de liberação a partir de sistema de liberação dual baseado em nanofibras e nanopartículas de Eudragit L100. Imagem retirada da referência He et al. ⁶¹	8
FIGURA 2.5 - Esquematização do processo de eletrofiação. Imagem adaptada da referência Mercante et al. (2017) ⁶²	10
FIGURA 2.6 - Estrutura química do antibiótico (A) Cloxacilina e (B) Oxacilina.	15
FIGURA 4.1 - Fotografia digital do aparato instrumental de eletrofiação utilizado no presente trabalho.	19
FIGURA 5.1 - Esquematização do processo de encapsulamento do antibiótico Cloxacilina (CLOX) por eletrofiação no polímero Ecovio (EC), perfil de liberação em meio tamponado e ensaio microbiológico.	25
FIGURA 5.2 – Imagens de MEV representando o efeito do fluxo sob a morfologia das fibras de EC na concentração de 5% a) 0.2 mL.h ⁻¹ , b) 0.4 mL.h ⁻¹ e c) 0.6 mL.h ⁻¹	27
FIGURA 5.3 – Imagens de MEV representando o efeito do fluxo sob a morfologia das fibras de EC na concentração de 10% a) 0.2 mL.h ⁻¹ , b) 0.4 mL.h ⁻¹ e c) 0.6 mL.h ⁻¹	27
FIGURA 5.4 – Imagens de MEV representando o efeito do fluxo sob a morfologia das fibras de EC na concentração de 15% a) 0.2 mL.h ⁻¹ , b) 0.4 mL.h ⁻¹ e c) 0.6 mL.h ⁻¹	28
FIGURA 5.5 - Espectroscopia no infravermelho para ECNF na região de 500-4000 cm ⁻¹	30
FIGURA 5.6 - Ângulo de contato estático para fibra de EC (sem antimicrobiano) em função do tempo de deposição das fibras por eletrofiação de 30, 60 e 90 minutos. A direita, fotografia digital do ângulo de contato após 5 segundos de estabilização da gota sobre as fibras para a amostra com 30 minutos de deposição.	31
FIGURA 5.7 – Espectroscopia FTIR para o antibiótico Cloxacilina na região de 4000-500 cm ⁻¹	33
FIGURA 5.8 - Análise termogravimétrica do antibiótico Cloxacilina em atmosfera de N ₂ (10 °C.min ⁻¹).	34
FIGURA 5.9 - Curva de DSC para o antibiótico Cloxacilina (Panela hermética, Alumínio, 10 °C.min ⁻¹).	34
FIGURA 5.10 – Imagens de MEV para ECNF contendo 20% m.m ⁻¹ de CLOX usando DMF/CHL 15/85 v.v ⁻¹ como solventes.	35
FIGURA 5.11 – Imagens de MEV das fibras evidenciando o efeito da adição do metanol (MET) à solução de ECNF com a) 0% (v/v) MET (619 ± 115 nm) e b) 5% (v/v) MET (755 ± 232 nm). Efeito da adição CLOX na morfologia das fibras, c) ECNF_CLOX10 (656 ± 226 nm) e d) ECNF_CLOX20 (777 ± 232 nm).	37
FIGURA 5.12 – Espectroscopia de FTIR das fibras de ECNF contendo antibiótico Cloxacilina.	39
FIGURA 5.13 - Variação temporal do ângulo de contato da gota de água destilada para ECNF, ECNF_CLOX10 e ECNF_CLOX20.	40

FIGURA 5.14 - Análise termogravimétrica das fibras ECNF, ECNF_CLOX10 e ECNF_CLOX20.....	40
FIGURA 5.15 - DSC para as amostras ECNF, ECNF_CLOX10 e ECNF_CLOX20 a) primeiro aquecimento para remoção do histórico térmico de -40 à 170 °C, b) primeiro resfriamento e c) segundo aquecimento.	42
FIGURA 5.16 – Espectros de XPS para ECNF, ECNF_CLOX10 e ECNF_CLOX20.....	44
FIGURA 5.17 - Perfil de liberação da Cloxacilina a partir de ECNF_CLOX10 e ECNF_CLOX20 em meio neutro (pH 7,3). (a-c) Perfil de liberação após 5 horas, (b-d) perfil nos primeiros 60 minutos de liberação.	46
FIGURA 5.18 - Cinética de liberação com maior quantidade de dados experimentais no período inicial de 30 minutos liberação.	49
FIGURA 5.19 - Gráfico linearizado segundo modelo de Korsmeyer-Peppas para liberação de Cloxacilina a partir de ECNF_CLOX10 e ECNF_CLOX20 em meio neutro.	50
FIGURA 5.20 - Perfil de liberação da Cloxacilina a partir de ECNF_CLOX10 e ECNF_CLOX20 em meio ácido (pH 5,5). (a-c) Perfil de liberação após 5 horas, (b-d) perfil nos primeiros 60 minutos de liberação.	52
FIGURA 5.21 - Gráfico linearizado segundo modelo de Korsmeyer-Peppas para liberação de Cloxacilina a partir de ECNF_CLOX20 em meio ácido.....	53
FIGURA 5.22 - Imagens de MEV para ECNF_CLOX10 a) Após 2 minutos e b) 15 minutos de imersão em meio pH 7,30 evidenciando a formação dos poros.	55
FIGURA 5.23 – Imagens de MEV para ECNF_CLOX20 a) Após 2 minutos e b) 15 minutos de imersão em meio pH 7,30 evidenciando a formação dos poros.	55
FIGURA 5.24 – Imagens de MEV para fibras ECNF_CLOX20 após imersão em meio ácido (pH 5,5). A) Após 2 minutos e B) 15 minutos de imersão.....	56
FIGURA 5.25 - Zona de inibição de crescimento da bactéria <i>S. aureus</i> para amostras ECNF, ECNF_CLOX10 e ECNF_CLOX20.....	57
FIGURA 5.26 - Micrografias das fibras de ECNF após ensaio microbiológico da zona de inibição de crescimento de bactérias (superior). Inferior, micrografia ampliada da fibra indicando perda da atividade antimicrobiana e a presença dos poros da fibra ECNF_CLOX10 após ensaio após liberação.	58

SUMÁRIO

1 -	INTRODUÇÃO	1
2 -	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 -	Sistemas de liberação.....	4
2.1.1 -	Polímeros	4
2.1.2 -	Ecovio.....	6
2.1.3 -	Geometrias.....	7
2.2 -	Eletrofiação	9
2.2.1 -	Parâmetros da técnica de eletrofiação	10
2.2.2 -	Interação droga-polímero e influência sobre parâmetros de eletrofiação.....	11
2.3 -	Mastite bovina.....	14
2.4 -	Antibiótico Cloxacilina	15
3 -	OBJETIVOS	17
3.1 -	Objetivos gerais	17
3.2 -	Objetivos específicos	17
4 -	METODOLOGIA.....	18
4.1 -	Materiais	18
4.2 -	Métodos	18
4.2.1 -	Eletrofiação	18
4.2.2 -	Preparo das soluções poliméricas.....	19
4.2.3 -	Preparo de amostra para ensaio microbiológico	20
4.3 -	Técnicas de caracterização	21
4.3.1 -	Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) 21	21
4.3.2 -	Morfologia.....	21
4.3.3 -	Análises térmicas	21
4.3.4 -	Ângulo de contato e Espectroscopia de Fotoelétrons excitados por Raios X (XPS).....	22
4.3.5 -	Cinéticas de liberação	22
5 -	RESULTADOS E DISCUSSÕES	25
5.1 -	Síntese e otimização das fibras de Ecovio por eletrofiação	25
5.2 -	Síntese e otimização das fibras de Ecovio contendo Cloxacilina.....	32
5.2.1 -	Cloxacilina	32
5.2.2 -	Cristalização superficial da Cloxacilina.....	34
5.2.3 -	Solução para o problema da cristalização.....	36
5.2.4 -	Caracterizações: fibras de Ecovio contendo Cloxacilina.	38
5.3 -	Cinéticas de liberação.....	44
5.4 -	Ensaio microbiológico	56

6 -	CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS	59
7 -	PRODUÇÕES CIENTÍFICAS ASSOCIADAS AO TRABALHO.....	61
8 -	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

RESUMO

ESTUDO DO PROCESSO DE ELETROFIAÇÃO DE MICRO/NANOFIBRAS DE POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS PARA LIBERAÇÃO DO ANTIBIÓTICO CLOXACILINA. A mastite bovina é uma doença ocasionada por um processo inflamatório decorrente da contaminação por alguns tipos de bactérias e fungos provenientes do ambiente. Esta doença afeta principalmente o rebanho bovino leiteiro, trazendo prejuízos financeiros aos produtores rurais por meio da diminuição da produção de leite pelo rebanho. Neste trabalho foram desenvolvidas membranas poliméricas flexíveis biodegradáveis contendo antimicrobiano visando à utilização em sistemas de liberação de fármaco para aplicação tópica contra bactérias Gram-positivas causadoras da mastite. A técnica de eletrofiação foi empregada na produção das membranas constituídas fibras micro/nanométricas, cuja atividade antimicrobiana foi promovida pela adição do antibiótico b-lactâmico Cloxacilina (CLOX) na solução polimérica. Fibras da blenda PBAT (poli-(butileno adipato-co-tereftalato))/PLA (poli(ácido láctico)) com CLOX (ECNF_CLOX) foram caracterizadas por espectroscopia FTIR, microscopia eletrônica de varredura (MEV), ângulo de contato, calorimetria diferencial (DSC), análise termogravimétrica (TGA) e espectroscopia de fotoelétrons (XPS). As cinéticas de liberação foram realizadas em soluções tamponadas de pH = 7,3 e pH = 5,5. A determinação quantitativa da quantidade de CLOX liberada foi monitorada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os resultados mostraram uma rápida cinética de liberação em pH=7,3 e um liberação lenta para pH=5,5. A capacidade de liberação média para as duas membranas contendo CLOX foi de 70% em pH neutro e apenas de 12% em pH ácido. Esta liberação rápida está de acordo com o arranjo do fármaco previsto pela técnica de XPS que sugere uma distribuição de fármaco próxima a superfície das fibras. Ensaio microbiológicos contra *S. aureus* comprovaram a ação bactericida e bacteriostática das membranas contendo CLOX, evidenciando sua capacidade para desenvolver sistemas de liberação de fármaco.

ABSTRACT

STUDY OF ELECTROSPINNING PROCESS OF BIODEGRADABLE POLYMERS MICRO/NANOFIBERS FOR CLOXACILLIN ANTIBIOTIC RELEASE. Bovine mastitis disease is caused by some class bacteria and fungus from the environment, which affects the dairy cattle herd. This disease can cause financial damage to farmers by reducing cattle milk production. In this work we developed biodegradable flexible polymer mats added with antibiotic aiming at producing antibiotic release systems for use topical against Gram-positive bacteria that causes mastitis. The electrospinning technique was employed to produce the micro/nanofibers, which the antimicrobial activity was promoted by the addition of the b-lactam antibiotic Cloxacillin (CLOX) in polymer solution. PBAT (poly(butylene adipate-co-terephthalate)/PLA (poly(lactic acid)) blend fibers with CLOX (ECNF_CLOX) were characterized by FTIR spectroscopy, scanning electron microscopy (SEM), contact angle, differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetric analysis (TGA) and X-Ray photoelectron spectroscopy (XPS). Release kinetics were performed in buffered solutions of pH = 7.3 and pH = 5.5. Quantitative determination of the released CLOX concentration was monitored by high performance liquid chromatography (HPLC). The results showed rapid release kinetics at pH = 7.3 and prolonged release at pH = 5.5. The mean release capacity was 70% at neutral pH and only 14% at acidic pH. This rapid release is in accordance with the arrangement of the drug according to XPS technique, suggesting that the drug distribution is close to the surface of the fibers. Microbiological essay against *S. aureus* indicated the bactericidal and bacteriostatic effects of CLOX-containing fibers, suggesting its potential for designing drug release systems.

1 - INTRODUÇÃO

Os impactos ambientais da utilização incorreta de antibióticos, aliados à falta de saneamento básico são uma preocupação mundial, tendo como um dos resultados negativos a aceleração do processo evolutivo de resistência antimicrobiana¹⁻³. Em decorrência disso, a OMS (Organização Mundial da Saúde) recomendou que os seus países associados desenvolvessem um Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle de Resistência aos Antimicrobianos. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) foi responsável pelo desenvolvimento do plano, dividindo-se em diversos níveis para prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos.⁴

No Brasil existem cerca de cento e trinta antibióticos disponíveis comercialmente, que devem utilizados exclusivamente sob prescrição médica, sendo denominados de comercialização controlada⁵. Eles são utilizados para tratamento de infecções em humanos e muitos também são usados na cadeia produtiva de carnes de diferentes fontes. A cultura da utilização de antibióticos em animais é sustentada pela elevação da produtividade e de lucros (rápido ganho de peso, aumento da sanidade e controle sobre doenças convencionais). Isso tem prejudicado a qualidade de carnes e derivados alimentícios de animais como, por exemplo, do leite, uma vez que vem sendo encontrados resíduos dos medicamentos em produtos mesmo após várias etapas de industrialização⁶⁻¹⁰. Assim, o manejo de animais com antibióticos vem expondo a população ao risco da acumulação destes medicamentos ou de seus metabólitos no organismo, podendo vir a causar alterações no funcionamento de órgãos do corpo humano. Ainda no âmbito da saúde humana, a ingestão de alguns alimentos indevidamente preparados, contato direto e a contaminação de águas de consumo pela criação de animais tem tornado a população susceptível aos microrganismos resistentes¹¹.

Segundo estimativas¹² os países que mais utilizavam antibióticos na cadeia produtiva de aves, suínos e bovinos até o ano de 2015 eram China, Estados Unidos e Brasil, respectivamente, ocupando a primeira, segunda e terceira colocação. Estimativas sugerem que o consumo de antibióticos para o ano de 2030 no Brasil não crescerá acentuadamente, indicando que existem políticas públicas e novos modelos de produção visando à diminuição no consumo destes

medicamentos. Neste estudo, ainda foi estimado o consumo médio de antimicrobianos por unidade de correção populacional (do inglês, *Population Correction Unit*) que demonstra especialmente maior densidade de consumo médio para carne suína. O alargamento da curva para produção de carne de frango e bovinos indica diversos sistemas de produção regionalizados que utilizam diferentes quantidades de antimicrobianos ¹².

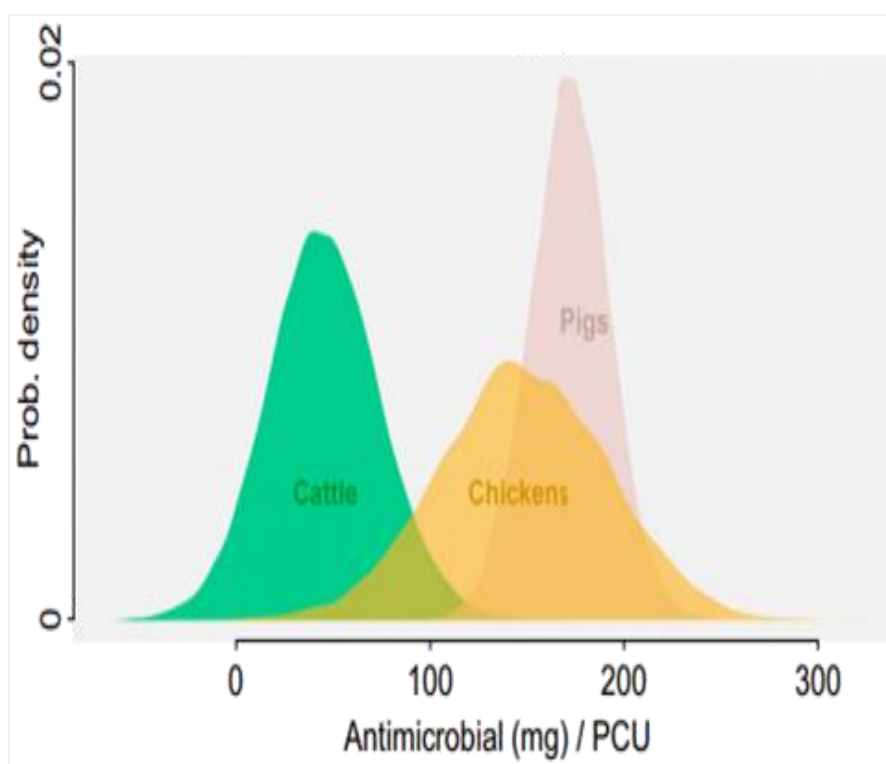


FIGURA 1.1 - Consumo de antibiótico médio (mg) por unidade de população corrigida (PCU - *Population Correction Unit*) para as três maiores fontes de proteínas consumidas no mundo: bovinos (*cattle*), frango (*chickens*) e suínos (*pigs*). Imagem retirada de Van Boeckel et al. ¹².

O rebanho bovino brasileiro, de corte e de leite, é afetado por diversas doenças tradicionais^{13,14} que são causadas por bactérias, incluindo: Clostridioses (*Clostridium* spp.)¹⁵, Dermatofilose (*Dermatophilus* spp.)¹⁶, Tuberculose bovina (*Mycobacterium bovis*)¹⁷ e Brucelose (*Brucella* spp).

Tendo em vista o grande número de doenças que acometem o rebanho e os riscos associados à resistência antimicrobiana é de grande interesse o desenvolvimento de novas plataformas que busquem diminuir os custos e proporcionar maior eficiência ao tratamento.

Uma vez que o desenvolvimento de novos medicamentos demandam altos investimentos financeiros em longo prazo, os esforços estão voltados para mecanismos que busquem melhorar a eficiência dos antimicrobianos já disponíveis atualmente, tanto para uso humano como veterinário. Isso passa também pela interpretação e entendimento do complexo processo de mutação gênica bacteriana que é capaz de tornar as bactérias mais resistentes apenas com o passar de alguns dias ¹⁸. Neste contexto, novos métodos de transporte/liberação de medicamentos antimicrobianos podem desempenhar um papel importante e avanços nestes campos podem vir a abrir novas perspectivas para o combate ao problema de resistência das bactérias aos antibióticos.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Sistemas de liberação

A utilização de polímeros surgiu como alternativa para modelagem da liberação de diferentes substâncias mediante o encapsulamento, buscando o prolongamento da propriedade desempenhada ou o incremento da eficiência da molécula de interesse. Com este propósito existem diferentes aplicações que vieram a se desenvolver na área medicinal, alimentícia, agrônômica e cosmética.

2.1.1 - Polímeros

Para o desenvolvimento dos sistemas liberadores de drogas a partir de matrizes poliméricas, a escolha do polímero deve ser baseada nas propriedades físico-químicas do medicamento, bem como na avaliação do estado físico do biomolécula que aumente sua eficiência: líquido^{19,20}, sólido²¹ ou gasoso^{22,23} (partículas para inalação). Um fator imprescindível exigido ao polímero é a inércia química frente a fluidos, células e tecidos. Se a interação existir, ela não deve causar efeitos colaterais (inflamações ou alergias)^{24,25}. Diferentes vias de administração, parenteral e enteral, também exigem propriedades físico-químicas específicas aos polímeros. Assim, um conjunto de fatores deve ser levado em conta para a seleção do polímero mais indicado para uma aplicação (mucuosidade^{26,27}, solubilidade em diferentes pHs²⁸, indução de crescimento celular^{29,30}, difusão aquosa^{31,32}).

Os polímeros naturais de origem vegetal e animal foram os primeiros veículos utilizados como transportadores de medicamentos. O baixo custo, biocompatibilidade, biodegradabilidade, estabilidade, baixa toxicidade e a obtenção por fontes renováveis favorece a combinação com diversas substâncias de interesse farmacêutico.

Alguns dos principais polímeros naturais vegetais são a celulose, amido, pectina e algumas gomas. A celulose, um polissacarídeo orgânico de fórmula $(C_6H_{10}O_5)_n$ e seus derivados (etil-celulose, metilcelulose e hidroximetil-celulose) são amplamente empregados como excipientes na forma sólida²⁵. A celulose pode ser considerada muito versátil, pois permite a produção fibras^{33,34}, nanocristais^{35,36} e micro/nanopartículas³⁷⁻³⁹, possibilitando o encapsulamento e

liberação de substâncias em uma grande extensão. O amido é o segundo polissacarídeo vegetal mais abundante e possui algumas propriedades semelhantes à celulose. O medicamento comercial Zithromax[®] (Pfizer) é um exemplo aplicação de liberação controlada por 24 horas, mediante difusão em matriz de amido pregelatinizado do antibiótico azitromicina.

Micropartículas de alginato vem sendo estudadas devido às suas excelentes propriedades mucoadesivas e de biocompatibilidade. O alginato ainda pode ser aplicado em via ocular, nasal, tópica ou local sem maiores efeitos colaterais ^{40,41}. Na classe dos polímeros naturais de fontes animais, além do alginato, possuem destaque a quitina e algumas gomas (xantana, tragacanto).

Dentre os polímeros sintéticos, aqueles aprovados para uso e mais comumente empregados em sistemas de liberação são os poliésteres: poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), poli(etileno glicol) (PEG) e poli(vinil álcool) (PVA). Poli(e-caprolactona) (PCL) e poli(N-vinilpirrolidona) (PVP) também são empregados como carregadores de drogas ²⁴.

Sistemas de liberação injetável na forma de microcápsulas de PLGA (L/G 75/25), contendo Naltrexona (opioide antagonista), são clinicamente aprovados para combate da dependência alcoólica desde 2006 (comercializado com o nome de Vivitrol[®]). Os primeiros estudos cinéticos de liberação deste tipo matriz com Naltrexona remetem a década de 80 ⁴².

Para sistemas de liberação sobre a pele, as membranas poliméricas são excelentes candidatos para criação de barreira física, evitando ou diminuindo a exposição do local às condições ambientais. A cinética de liberação se inicia com a difusão da molécula de interesse da região polimérica para a superfície da pele. Posteriormente a molécula se difunde para as camadas da pele mais internas. A ação é conseguida após atingir as camadas mais internas da pele. O transporte do medicamento é controlado pela velocidade de difusão através de três rotas que podem ocorrer simultaneamente: transcelular, intracelular e entre glândulas sebáceo-sudoríferas ou folículos ⁴³.

2.1.2 - Ecovio

O co-poliéster aromático alifático poli-(butileno adipato-co-tereftalato) (PBAT) foi sintetizado pela indústria agroquímica alemã BASF pela primeira vez na década de 90, sendo comercializado como Ecoflex[®]. Sua síntese é realizada através da poli-condensação do ácido adípico, ácido tereftálico e 1,4-butanodiol (FIGURA 2.1).

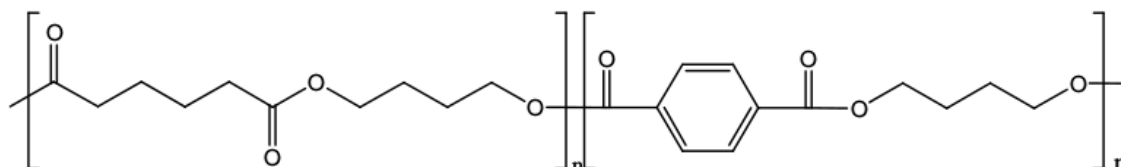


FIGURA 2.1 - Estrutura química do poli(butileno adipato-co-tereftalato).

O PBAT é semicristalino, utilizado na produção de sacolas plásticas e totalmente compostável, em que a combinação da cadeia linear com a unidade tereftálica confere ao poliéster excelentes propriedades mecânicas e de processamento. Este co-poliéster tem sido combinado com outros polímeros como: PLA⁴⁴, quitosana⁴⁵, polipirrol (PPy)⁴⁶, polibutileno succinato (PBS)⁴⁷, poli(propileno carbonato) (PPC)⁴⁸ e até grafeno^{49,50} para produção de blendas poliméricas com a finalidade de melhorar as propriedades mecânicas, permeabilidade, biodegradabilidade e até plataformas no campo dos biomateriais.

Trabalhos relacionados a degradação do PBAT demonstram que a quebra das ligações da cadeia principal por hidrólise, em meio salino tamponado, pode ocorrer apenas após 10 dias⁵¹. Em tampão fosfato, a hidrólise do PBAT se processa especialmente nas posições das ligações dos grupos éster, ocorrendo mesmo próximo a neutralidade, em pH 8. A avaliação das cinéticas de degradação seguem leis de velocidades lentas de ordem 1, tanto para o caso de hidrólise como para de decomposição no solo⁵². Em decorrência do processo de hidrólise e das excelentes propriedades mecânicas, a toxicidade deste polímero frente a microrganismos e células^{53,54} vem sendo estudada nos últimos anos.

A combinação dos polímeros PBAT (Ecoflex[®]) e PLA (FIGURA 2.2) produz uma blenda comercialmente conhecida como Ecovio[®] (BASF). A mistura é feita aproximadamente na proporção 50/50. A blenda combina as propriedades

biodegradáveis de cada polímero, além de conferir excelentes propriedades mecânicas, com um aumento substancial na tensão de alongação^{47,51,55}. Suas propriedades térmicas mantem-se praticamente inalteradas por se tratar de uma blenda imiscível⁵⁶.

Outra propriedade que foi potencializada com a mistura, além das propriedades mecânicas, é a biocompatibilidade. O PBAT tem sido estudado pra aplicações biomédicas recentemente na literatura e vem demonstrando resultados promissores^{46,54,57} e uma vez que a adição do PLA pode apresentar propriedades biocompatíveis e biodegradáveis, a mistura acaba potencializando estas características, com redução dos efeitos colaterais em futuras aplicações^{53,58}.

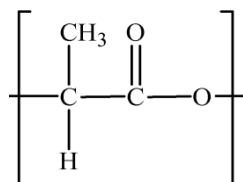


FIGURA 2.2 - Estrutura química do poli(ácido láctico).

2.1.3 - Geometrias

Diversas metodologias de síntese são empregadas para encapsulamento de moléculas de interesse e produção de sistemas de liberação. Contudo, cada metodologia de preparo podem trazer aspectos associados à geometria e influenciar na capacidade de encapsulamento, mecanismo de liberação e cinética. A FIGURA 2.3 traz algumas destas geometrias para encapsulamento.

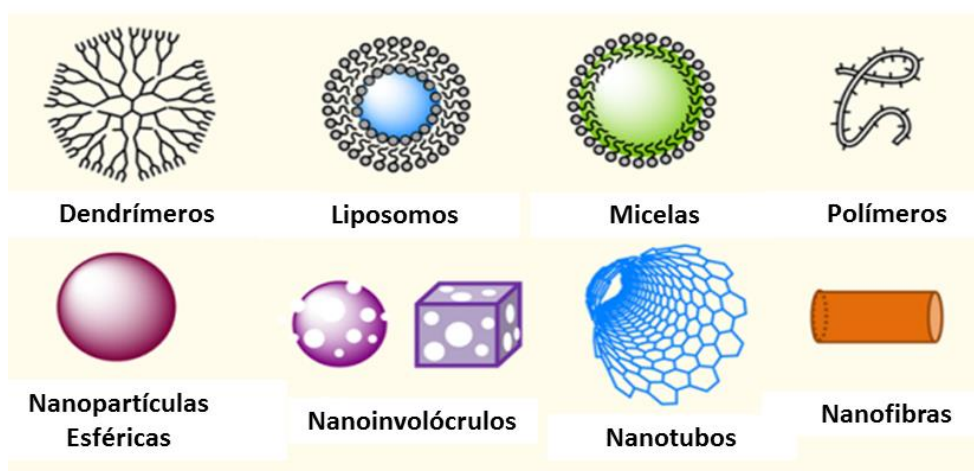


FIGURA 2.3 - Esquematização de diferentes tipos de geometria para liberação. Imagem adaptada da referência Wong e Shoi (2015)⁵⁹.

Lavielle et al.⁶⁰ compararam um sistema de liberação nanoparticulado com um sistema de liberação a partir de nanofibras para o polímero PLA, utilizando o corante rodamina como droga modelo. Foi observado que as nanopartículas possuem capacidade de liberação maior e mais rápida, enquanto que as fibras tem uma liberação mais lenta com menor capacidade de liberação.

A curcumina possui propriedades antitumorais, antioxidante e anti-inflamatória. Desta forma, ela é amplamente estudada em sistemas de liberação a partir de diversas plataformas. Filmes produzidos pela técnica de *casting* de acetato de celulose foram comparadas com fibras sintetizadas por eletrofiação com relação a suas cinéticas de liberação. Os sistemas liberadores contendo a curcumina, em concentrações (1, 5, 10 e 15%), indicam que as fibras estudadas possuem mais rápida taxa de liberação em relação aos filmes produzidos por *casting*³³.

A combinação de duas formas carregadoras podem ser produzidas visando otimizar o processo de liberação. Por exemplo, nanopartículas do polímero em bloco Eudragit (L100) (poli (metacrilato de metila-co-ácido metacrílico)) contendo peptídeo em um envoltório de nanofibras produzidas por eletrofiação permitem a liberação mediante estímulo do pH. A FIGURA 2.4 demonstra o esquema de liberação dividido em duas etapas que ocorre sujeito a ação do pH; na primeira etapa, a liberação das nanopartículas; na segunda, a liberação do peptídeo. Esta é uma combinação que permite o ajuste da cinética de liberação de nanomateriais com elevado refinamento, podendo ser explorada especialmente para sistemas de liberação gastro-intestinais⁶¹.

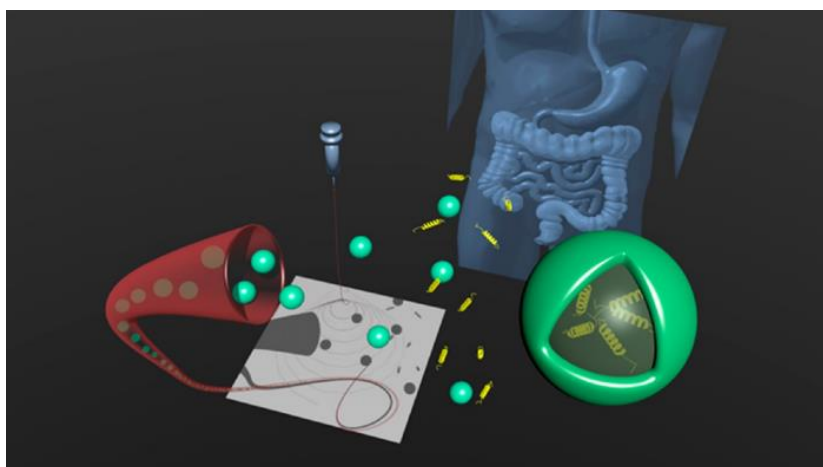


FIGURA 2.4 - Esquema do processo de liberação a partir de sistema de liberação dual baseado em nanofibras e nanopartículas de Eudragit L100. Imagem retirada da referência He et al.⁶¹.

2.2 - Eletrofiação

Fibras são materiais que apresentam duas características principais: (i) dimensão longitudinal muito maior que transversal (1D) e (ii) grande relação área superficial/volume. Um dos principais métodos de produção de micro- e nanofibras é a técnica de eletrofiação, que consiste na interação de um campo elétrico (kV) com soluções poliméricas contidas num capilar, conforme ilustrado na FIGURA 2.5, atingindo elevados níveis de reprodutibilidade, alcançando pequena dispersão nas suas dimensões micro/nanométricas e produzindo mantas flexíveis.

A versatilidade das fibras produzidas por eletrofiação permite a produção de materiais para as mais variadas aplicações⁶²: elementos filtrantes⁶³, sensores⁶⁴⁻⁶⁶, catalisadores^{67,68} e armazenamento de energia⁶⁹.

As soluções não condutoras com alguma viscosidade inerente, como soluções poliméricas, podem ser involuntariamente atraídas e forçadas ao estiramento a partir de um canal quando submetidas a grandes diferenças de potenciais elétricos. Para que isso ocorra, primeiramente a força elétrica deve ser suficiente para causar a descontinuidade na superfície da solução que se encontra na extremidade do canal. Em outras palavras, a gota sustentada pela tensão superficial da solução deve ser alongada pelas cargas elétricas e romper-se em um dado potencial elétrico por conta da repulsão entre as cargas. Depois do alongamento da gota e rompimento da tensão superficial, a solução deve ser continuamente expelida a partir seio da solução formando um cone. Um dos pesquisadores que dedicou-se aos estudos desse fenômeno elétrico com soluções foi Geoffrey I. Taylor⁷⁰. Ele foi tão importante para a este campo da pesquisa que o cone que governa o processo de eletrofiação leva seu nome como forma de homenageá-lo: o cone de Taylor.

A fabricação de fibras com diferentes características a partir de um polímero pode ser conseguida pela formação de um cone de Taylor estável, que permita a formação de um jato viscoso contínuo. Após o jato contínuo viajar por alguns centímetros ele passa a diferir em seu movimento, vindo a oscilar aleatoriamente descrevendo curvaturas⁷¹.

2.2.1 - Parâmetros da técnica de eletrofiação

A compreensão dos parâmetros que controlam a morfologia das fibras exige detalhados estudos. Isso se deve a influência simultânea destes durante o processo de estiramento. Em resumo, a eletrofiação possui variáveis que podem ser organizadas em grupos: (i) solução, (ii) aparato instrumental e (iii) ambientais ⁷².

Elas podem ser especificamente descritas como:

- I) Solução: Concentração polimérica, viscosidade, solventes empregados na solubilização, massa molar do polímero, pressão de vapor dos solventes, condutividade elétrica;
- II) Aparato instrumental: Distância coletor-agulha, diferença de potencial (kV), diâmetro da agulha, fluxo da solução polimérica, tipo de coletor;
- III) Ambientais: Temperatura e umidade relativa.

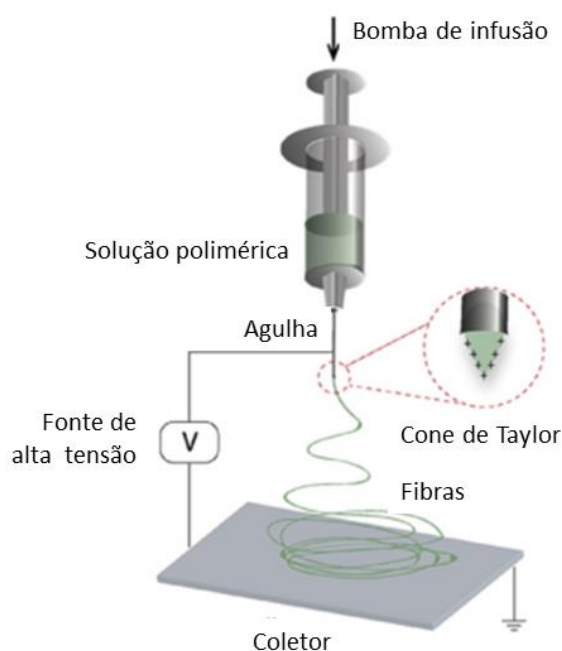


FIGURA 2.5 - Esquematização do processo de eletrofiação. Imagem adaptada da referência Mercante et al. (2017) ⁶².

Além da fabricação de fibras convencionais (uniaxiais) a eletrofiação permite a síntese de fibras coaxiais ⁷³⁻⁷⁷, triaxiais ^{78,79} e nanofibras de Janus ^{80,81}.

Sohrabi et al. ⁸² produziram fibras coaxiais de Nylon e poli(metil metacrilato) (PMMA) na qual o PMMA se encontra na camada interna, contendo o antibiótico Ampicilina (AC) imobilizado no PMMA. Neste estudo foram

avaliadas as cinéticas de liberação e atividade antibacteriana em função da concentração de AC. O estudo apresentou fibras com diâmetros externo que variavam entre 166 a 94 nm com pequena variação no diâmetro da fibra interna PMMA/AC. O perfil de liberação apresentou três estágios controlados pelo mecanismo de Korsmeyer-Peppas, com difusão segundo modelo Fickiano e não-Fickiano, cujas fibras demonstraram atividade antibacteriana ⁸².

Em outro recente trabalho, fibras PCL contendo metronidazol (MNA) com envoltório de Zeína foram desenvolvidas para aplicação na regeneração de tecidos. O perfil de liberação de Zeína/PCL-MNA se mostrou sustentado até 100 horas indicando que a zeína evita a liberação rápida. Como comparativo, a liberação de fibras uniaxiais de PCL-MNA sem zeína atinge a capacidade máxima de liberação em 50 horas. Foi também demonstrado a sua biocompatibilidade com células L929, demonstrando que o biomaterial possui viabilidade celular para recuperação de tecidos ⁸³.

2.2.2 - Interação droga-polímero e influência sobre parâmetros de eletrofiação

Uma variedade de polímeros e moléculas de interesse medicinal já foram empregados para o transporte e liberação de antimicrobianos. Neste sentido, cada sistema polímero-antimicrobiano apresenta suas características próprias e também propõem novas alternativas para processos de liberação.

Alguns tipos de drogas são pouco ou insolúveis em solventes orgânicos utilizados na eletrofiação. A Tetraciclina (TCL), um antibiótico insolúvel em clorofórmio (CHL), tem sua solubilização dificultada principalmente em soluções poliméricas da blenda PEVA/PLA 50/50, que são solúveis em clorofórmio (CHL). Para superar essa dificuldade e preparar soluções homogêneas de PEVA/PLA-TCL uma estratégia é adicionar metanol (MET), no qual a TCL é solúvel ⁸⁴. Entretanto, o metanol é tóxico a humanos, o que poderia trazer efeitos adversos durante sua aplicação. Levando em consideração suas propriedades físico-químicas pode-se utilizar este solvente em pequenas quantidades, uma vez que o MET tem baixo ponto de ebulição como CHL, 64.7 e 61.2 °C, respectivamente, além de condutividade elevada, atendendo as propriedades desejadas para um solvente de eletrofiação ⁸⁴. O mesmo recurso foi usado para produzir fibras PCL/PLA com TCL

por Haroosh, Dong e Lau ⁸⁵. Na mesma porcentagem de TCL (5%) a fibra PEVA/PLA 50/50 libera pouco mais de 30% da capacidade encapsulada em 100 horas, enquanto que a fibra PCL/PLA libera praticamente 75%, demonstrando uma interação mais forte entre PEVA-TCL do que PCL-TCL.

A mistura de polímeros para síntese de blendas pode ocasionar o processo de liberação rápida (do inglês, *burst release*) de fármacos. Quando a proporção de Poli(butileno adipato) (PBAd) aumenta de 0 para 50% na blenda PLA/PBAd a liberação de Teriflunomida (TFL) inicial praticamente aumenta por um fator próximo a dois.⁸⁶ Blendas de PCL/PLGA apresentaram cinéticas que variaram de 1 dia até 10 dias pela alteração na extensão da interação da droga hidrofílica Tenofovir com o polímero hidrofóbico PLGA ⁸⁷.

Três grandes desafios associados às aplicações práticas destes materiais nanoestruturados em sistemas de liberação são: capacidade de encapsulamento, liberação completa e manutenção da atividade. O processo de eletrofiação exige que os solventes sejam evaporados durante o estiramento, o que causa o transporte da droga para a superfície na maioria dos processos. Isso pode provocar a chamada liberação rápida do fármaco (*burst release*). Caso a interação fármaco-solvente seja forte existe a perda de moléculas para o ambiente acarretando na diminuição da concentração de medicamento imobilizada na matriz.

A presença de fortes interações entre a matriz e o fármaco encapsulado pode causar dificuldades para a sua liberação, mesmo após longos períodos, evitando, portanto, a atividade medicinal máxima. Para o caso de encapsulamento prolongado devido as fortes interações, processos de degradação das cadeias podem gerar substâncias que venham a reagir com o medicamento, o que causa a diminuição da sua concentração e conseqüentemente de sua eficiência. Uma vez que medicamentos são moléculas construídas especificamente para cada tipo de atividade biológica é importante que sua estrutura química seja mantida inalterada.

O encapsulamento de moléculas para produção de plataformas liberadores na eletrofiação pode ser realizado pela solubilização do agente terapêutico diretamente no(s) solvente(s) usado(s) para o preparo da solução polimérica. Para assegurar a homogeneidade na dispersão da droga na fase

polimérica é importante a formação de uma única fase. A solução polimérica contendo a droga pode ter algumas de suas propriedades alteradas, vindo a afetar os parâmetros de eletrofiação, tais como:

- a) Viscosidade e tensão superficial: interação da droga com o polímero por forças de dispersão de London e intercalação entre as cadeias poliméricas.
- b) Condutividade: alterada pela solubilização de alguns medicamentos (contra íon) e dipolos moleculares.
- c) Taxa de evaporação dos solventes: força de interação droga-solvente e cristalização superficial.

Em se tratando das soluções para eletrofiação, o aumento da viscosidade é decorrente do enovelamento das cadeias poliméricas e das interações solvente-polímero e polímero-polímero. A presença de moléculas de menor massa molar como os fármacos, com átomos/grupos funcionais distintos daqueles presentes na matriz polimérica, exercem diferentes efeitos sobre a viscosidade. Também nestes sistemas, a tensão superficial se altera causando um comportamento distinto do fluido frente as cargas elétricas ⁸⁸.

Em estudo reportado Sadrearhami, Morshed e Varshosaz ⁸⁹ fibras de PAN:Agar 90:10 w:w contendo Metotrexato (MTX) – um agente terapêutico anticâncer - tiveram seus diâmetros médios acrescidos de 299 nm para praticamente 1 µm com a concentração de MTX passando de 0% para 18% w:w. O aumento da viscosidade nestas amostras foi 3852 cp (0% MTX) para 9912 cp (18% MTX) sendo atribuída a interação droga-Agar. Em contraste, apesar da força de interação ser capaz de alterar a viscosidade para maiores valores, a capacidade de encapsulamento diminui com a carga de MTX ⁸⁹. Segundo Barrientos et al.⁹⁰, em estudo comparativo entre dois medicamentos, mostrou que a droga hidrofílica Irgasan (IRG) e a droga hidrofóbica Levofloxacina (LEVO) tem diferentes influências sobre a viscosidade da solução polimérica de PCL. O perfil de liberação da droga hidrofóbica LEVO a partir das fibras PCL-LEVO se apresentou mais sustentado que da droga hidrofílica (IRG), como resultado da interação com PCL.

O efeito de mudança da condutividade na presença de fármaco na solução polimérica foi observada por Wright et al.⁹¹ em fibras de PCNU (Poli(carbonato uretana)) contendo antibiótico ciprofloxacina (CF). A solução PCNU teve sua condutividade aumentada de 0,8 para 7,3 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Os autores destacam que existe uma distribuição mais homogênea em torno do valor médio do diâmetro das fibras com o aumento da condutividade⁹¹. A alteração do diâmetro em função da quantidade ou da presença de moléculas bioativas foi relatada em outros sistemas PCL/Tetraciclina (TCL)³⁴ e PU/Estradiol⁹².

A extensão da influência do diâmetro da fibra sobre a velocidade de liberação foi estudada por Rahma et al.⁹³ para fibras de PVP-Curcumina. Para isso, foram produzidas três fibras com diâmetros de: 2838 nm, 1148 nm e 372 nm. Constatou-se que fibras com maiores diâmetros possuem capacidade de liberar 100% da curcumina encapsulada nos primeiros 60 minutos, mas apresentam duas taxas de liberação, uma rápida e outra lenta. Em contraste, fibras de menor diâmetro tem uma taxa constante de liberação⁹³.

2.3 - Mastite bovina

A mastite é uma doença que traz grandes prejuízos à atividade agropecuária, pois pode levar a uma diminuição da produção leiteira, perda prematura (abate) ou substituição do animal e ao aumento nos custos da produção⁹⁴.

A mastite pode ser causada por microrganismos (bactérias, vírus, fungos e protozoários) ou por agentes externos (agrotóxicos, agentes de limpeza, lesões e cortes), denominadas como mastite infecciosa e não infecciosa, respectivamente. Quando a mastite apresenta sinais clínicos evidentes, sendo portanto de fácil detecção no animal, ela é então classificada como mastite clínica. Porém, a forma que traz maiores prejuízos aos produtores é a mastite subclínica, a qual não pode ser detectada prontamente¹³.

Os malefícios da doença são notados na região da glândula mamária dos animais, entre eles estão à dor durante a amamentação e a ordenha, contribuindo para o *stress* animal, causando a diminuição na produção diária de leite. Como consequência, o leite tem as suas propriedades físico-químicas

alteradas em face do combate do sistema imunológico animal à doença, tornando-o impróprio para consumo humano na maioria dos casos detectados. Como principais agentes causadoras da mastite tem-se as cepas das bactérias *Streptococcus* spp, *Staphylococcus* spp e *Pseudomonas* spp ^{10,13,95}.

2.4 - Antibiótico Cloxacilina

Segundo relatório publicado pela ECDC (*European Centre for Disease Prevention and Control*) os antibióticos da família das penicilinas estão entre os mais consumidos nos países da União Europeia até o ano de 2016 ⁹⁶. A Cloxacilina (CLOX) (C₁₉H₁₈N₃ClO₅) apresenta o anel β-lactâmico em sua estrutura, portanto, é um derivado da penicilina que vem sendo amplamente utilizado no tratamento de infecções em humanos e animais, especialmente aquelas causadas por bactérias Gram-negativas. A Oxacilina, que difere da CLOX pela presença de um átomo de cloro (FIGURA 2.6) apresenta baixa solubilidade aquosa, sendo normalmente administrada via injeções intramamarias ⁹⁷.

Uma das principais aplicações da CLOX é no tratamento da mastite bovina. Naturalmente, a aplicação em larga escala, descarte indevido e a eliminação pela excreção poderá causar o aparecimento deste antibiótico e de outros em águas destinadas para consumo humano. Resíduos deste antibiótico também já foram detectados em amostras de leite ^{9,98}.

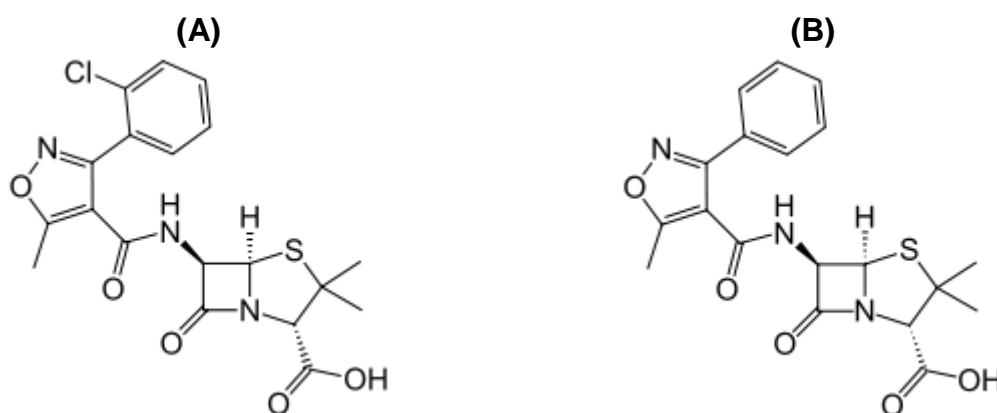


FIGURA 2.6 - Estrutura química do antibiótico (A) Cloxacilina e (B) Oxacilina.

Devido ao uso em larga escala e a eficiência desses antibióticos existe o interesse no desenvolvimento de novos sistemas de liberação para uso agropecuário. Por exemplo, biocompósitos de SiO_2 foram sintetizados por Balaure et al.⁹⁹ a partir da formação de mesoporos com diferentes quantidades de tirosina (1, 3 e 5%). Posteriormente, estes suportes mesoporos de sílica foram mergulhados em soluções de antibióticos utilizados para o tratamento de infecções por *S. aureus* (Cloxacilina, Eritromicina e Gentamicina). Após a caracterização do material, os testes *in vitro* demonstraram que o bionanocompósito (SiO_2 com antibióticos) é capaz de diminuir a concentração inibitório mínima, diminuindo a concentração de antibiótico necessária para morte de células⁹⁹. Em outro trabalho, um polímero tribloco constituído de Poliestireno (PS)/Poli(vinil pirrolidona) (PVP)/Poli(óxido de etileno) (PEO) foi escolhido estudado para liberação de CLOX em diferentes concentrações de íons H^+ , em pH's 3 e 7, respectivamente. Foi demonstrado que os agregados micelares de PS/PVP/PEO permitem o encapsulamento de CLOX, apresentam dimensão nanométrica e a interação CLOX-PS/PVP/PEO ocorre especilmnte por interação com PVP. O perfil cinético de liberação se apresentou mais rápido em pH 7 do que em pH 3¹⁰⁰.

3 - OBJETIVOS

3.1 - Objetivos gerais

Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de membranas poliméricas biodegradáveis flexíveis antimicrobianas com propriedades antimicrobianas, formadas por micro- e nanofibras eletrofiadas contendo antibiótico, visando futura administração via uso tópico. Busca-se também o estabelecimento de correlações entre as propriedades físico-químicas das micro- nanofibras e o meio externo, com a cinética e mecanismo de liberação visando conferir um aumento da eficiência do agente antimicrobiano.

3.2 - Objetivos específicos

- Estudo da influência das variáveis da técnica de eletrofiação sobre a morfologia das fibras produzidas;
- Entendimento das interações entre polímero e antibiótico.
- Ensaio de sensibilidade *in vitro* da membrana antimicrobiana contra bactéria *S. aureus*.

4 - METODOLOGIA

4.1 - Materiais

A blenda polimérica Ecovio[®] (F2224) (EC) foi adquirida por doação realizada pela BASF. As soluções poliméricas foram preparadas utilizando os solventes clorofórmio (CHL), N,N-dimetilformamida (DMF) (Synth). O antibiótico Cloxacilina benzatina (CLOX) com pureza de 97,6 % foi adquirido da indústria Hebei Huari Pharmaceuticals Co. LTD.

As soluções tampão (pH 7,30 e pH 5,5) foram produzidas em água destilada utilizando fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) (Synth) e fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) (Cromoline).

4.2 - Métodos

4.2.1 - Eletrofiação

As soluções poliméricas foram eletrofiadas utilizando um sistema convencional de eletrofiação (FIGURA 4.1) disponível no Laboratório Nacional de Nanotecnologia Aplicado ao Agronegócio (LNNA) da Embrapa Instrumentação. O aparato é composto de uma fonte de alta tensão, uma bomba infusora, seringa e agulha, e coletor cilíndrico rotativo. Este aparato se encontra dentro de uma caixa de policarbonato para isolamento elétrico. Os parâmetros de empregados durante a eletrofiação foram otimizados em experimentos realizados ao longo do período do projeto e são mostrados a seguir: fonte de tensão elétrica no potencial elétrico de 20 kV; a distância entre coletor-seringa de 10 cm, com coletor cilíndrico em rotação de 400 rpm; seringa de 3 mL e agulha com diâmetro de 0,7 mm. Na TABELA 4.1 estão mostradas as concentrações poliméricas do polímero Ecovio, [EC], e os fluxos das soluções empregadas no presente trabalho.



FIGURA 4.1 - Fotografia digital do aparato instrumental de eletrofição utilizado no presente trabalho.

4.2.2 - Preparo das soluções poliméricas

Foram empregadas duas metodologias de produção das soluções poliméricas. Em um primeiro momento, o polímero Ecovio em forma de pellet foi solubilizado em uma mistura de solventes, DMF e CHL, na proporção 15/85 (v/v) pelo período de 2 horas em agitação magnética. Foram preparadas as concentrações poliméricas 5, 10 e 15% $m.V^{-1}$ de EC. Posteriormente, as soluções foram eletrofiadas, sendo então realizado o estudo dos efeitos sobre a morfologia das fibras causados pelos diferentes fluxos (0,2, 0,4 e 0,6 $mL.h^{-1}$) e concentrações poliméricas EC. As fibras não carregadas com antimicrobiano são denominadas como Ecovio nanofibras (ECNF).

TABELA 4.1 – Condições experimentais de eletrofição. Concentrações poliméricas do polímero Ecovio [EC] ($m.V^{-1}$) e fluxos das soluções.

Amostra	[EC] ($m.V^{-1}$)	Fluxo ($mL.h^{-1}$)
1	5%	0,2
2	5%	0,4
3	5%	0,6
4	10%	0,2
5	10%	0,4
6	10%	0,6
7	15%	0,2
8	15%	0,4
9	15%	0,6

Após análise da morfologia das fibras produzidas sob as condições testadas na TABELA 4.1 foi realizada a adição do fármaco CLOX nas soluções poliméricas de EC. Para isso, foi desenvolvida uma segunda metodologia de preparo das soluções de EC com CLOX para síntese da fibra carregada com antimicrobiano. Nesta etapa foi necessária a inserção solvente metanol na mistura de solventes clorofórmio/DMF para dissolução completa fármaco, passando para uma nova proporção entre os solventes de 5/10/85 MET/DMF/CHL (v/v/v). As soluções de EC carregadas com CLOX contendo 10% e 20% m.m⁻¹ CLOX/EC foram denominadas como ECNF_CLOX10 e ECNF_CLOX20 (TABELA 4.2).

TABELA 4.2 – Legenda para amostra e relação mássica entre cloxacilina (CLOX) e polímero Ecovio (EC) (m.m⁻¹) na solução polimérica.

Legenda	CLOX/EC (m.m ⁻¹)
ECNF	0 %
ECNF_CLOX10	10 %
ECNF_CLOX20	20 %

4.2.3 - Preparo de amostra para ensaio microbiológico

A atividade antimicrobiana da fibra de EC contendo antibiótico CLOX foi avaliada contra o micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC-25923) segundo adaptação da norma NCCLS (M2-A8). A concentração de *S. aureus* foi ajustada usando escala MacFarland em 1x10⁶ células.mL⁻¹ após crescimento pelo período de 12 horas, sendo então espalhada em placa de ágar contendo o meio Mueller-Hinton. As amostras de nanofibras antibacterianas contendo 0%, 10% e 20% m.m⁻¹ de CLOX foram cortadas em discos de 8.7±0.1 mm de diâmetro, secas em dessecador por 12 horas ao abrigo da luz e depositadas sobre o meio contendo o micro-organismo. As placas foram encubadas por 24 horas a 36±1 °C e após este período a zona de inibição do crescimento foi medida usando um paquímetro. Os ensaios foram realizados no Laboratório Nacional de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio (LNNA).

4.3 - Técnicas de caracterização

4.3.1 - Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR (*Fourier Transformed Infrared*) para as fibras de EC e EC_CLOX foram realizadas no equipamento Bruker (vertex 70) em módulo ATR (do inglês, *Attenuated Total Reflectance*) de 4000-500 cm^{-1} com 32 escaneamentos empregando resolução de 4 cm^{-1} .

4.3.2 - Morfologia

A morfologia das fibras de ECNF e ECNF_CLOX foram avaliadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV – JEOL 6510). Amostras de 5 mm^2 foram metalizadas sobre fita de carbono usando metalizador (Leica SCD 050). O diâmetro das fibras foi calculado usando software ImageJ empregando amostragem de 100 fibras.

4.3.3 - Análises térmicas

A análise Termogravimétrica (TGA) foi realizada em instrumento TA (Q500-Series) empregando fluxo de N_2 a 60 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ com intervalo de temperatura entre 30 e 700 $^\circ\text{C}$ e taxa de aquecimento de 10 $^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. As análises de calorimetria diferencial de varredura (DSC, *Differential Scanning Calorimetry*) foram conduzidas em um equipamento TA (Q-100 Series) com dois ciclos de aquecimento/resfriamento. O primeiro aquecimento foi realizado para remoção do histórico térmico da amostra, sendo realizado de -50 $^\circ\text{C}$ até 170 $^\circ\text{C}$, seguido de resfriamento até a temperatura de 25 $^\circ\text{C}$. O segundo aquecimento foi realizado de 25 $^\circ\text{C}$ até 170 $^\circ\text{C}$ do qual se extraíram as informações sobre a cristalinidade da matriz. Ambos os ciclos foram realizados em fluxo de N_2 a 50 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ sob taxa de aquecimento e de resfriamento de 10 $^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. A massa de amostra utilizada no TGA e DSC foi entre 6-8 mg previamente secas em dessecador pelo período de 24 horas.

4.3.4 - Ângulo de contato e Espectroscopia de Fotoelétrons excitados por Raios X (XPS)

Medidas de ângulo de contato foram realizadas no equipamento KSV Instruments (CAM 101) avaliando-se primeiro o efeito do tempo de deposição das fibras para aquelas sem carga de antibiótico (ECNF) sobre o ângulo de contato. Para isso, foram determinados três tempos de deposição das fibras 30, 60 e 90 minutos, sendo que as fibras foram coletadas sobre papel alumínio e o ângulo de contato inicial foi estimado em triplicata, com gotas de 4-5 μL a 25 °C e 30-35% de umidade relativa.

Um segundo estudo do ângulo de contato foi realizado observando a variação do ângulo em função do tempo de contato da gota com as fibras contendo antimicrobiano. Para isso, as fibras de ECNF, ECNF_CLOX10 e ECNF_CLOX20 foram depositadas em papel alumínio por 30 minutos e o ângulo de contato de uma gota (4-5 μL) foi acompanhado pelo período de 45 minutos em triplicata. Ao final, foi calculada a média dos ângulos para os tempos de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 minutos.

A análise química de superfície/próximo a superfície das fibras contendo antibiótico foi realizada utilizando Espectroscopia de Fotoelétrons excitados por Raios X (XPS, *X-Ray Photoelectron Spectroscopy*) no espectrômetro modelo ESCA+ (Scienta Omicron, Alemanha) usando fonte de radiação Al-Ka (1486.6 eV, 15 kV, 300W) e analisador de energia eletrônica hemisférico.

4.3.5 - Cinéticas de liberação

A cinética de liberação da CLOX foi investigada com auxílio da técnica CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) usando coluna C18 (poros de 5 μm , 250 mm por 4.6 mm, Microsorb MV-100), detector UV-Vis (356-LC) em 225 nm e fluxo em 0.6 $\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$. As condições cromatográficas consistem em um gradiente de eluição com acetonitrila (ACN)/0.1% ácido fórmico (ACF) em água. A corrida cromatográfica se inicia com os eluentes na proporção 70/30 ACN/ACF v/v com a rampa de 5 minutos até as proporções atingirem 50/50 v/v. Esta proporção é mantida por 3 minutos. Neste oitavo minuto a proporção inicial 70/30 ACN/ACF v/v volta a ser restabelecida, em uma rampa de 2 minutos. A coluna foi acondicionada

por 3 minutos antes da próxima injeção. Estes parâmetros foram determinados com base em uma adaptação de metodologia descrita na literatura⁹.

A curva analítica linear para quantificação da CLOX em solução foi realizada preparando-se uma solução estoque de 400 mg.L⁻¹ em PBS pH 7,3/metanol 87/13 v/v. Esta solução estoque foi então diluída para as seguintes concentrações: 5, 8, 12, 17,2 , 24, 30 e 36 mg.L⁻¹. As injeções para determinação da curva analítica foram realizadas em triplicata fornecendo a seguinte equação com coeficiente de correlação linear R² = 0,999:

$$\text{Área do pico (pH 7,3)} \left(\frac{\text{mA}}{\text{min}} \right) = 0,401. [\text{CLOX}] \quad (\text{Equação 1})$$

Nos mesmos moldes da curva acima, foi construída uma curva analítica de liberação para o pH 5,5 com coeficiente de correlação linear R² = 0,998.

$$\text{Área do pico (pH 5,5)} \left(\frac{\text{mA}}{\text{min}} \right) = 0,461. [\text{CLOX}] \quad (\text{Equação 2})$$

Com a intenção de compreender o perfil de liberação nos diferentes meio de liberação, amostras das fibras contendo CLOX ainda foram removidas dos frascos com 2 e 15 minutos de imersão em PBS para caracterização da morfologia por MEV. Esse procedimento foi realizado para identificar mudanças estruturais nas membranas em função da liberação da CLOX.

A capacidade de encapsulamento (CE) do fármaco CLOX pelas fibras foi determinada após a imersão das fibras ECNF_CLOX10 e ECNF_CLOX20 (15-18 mg) em 13 mL metanol contido em tubo Falcom. O procedimento foi realizado em triplicata, mantendo o sistema em agitação (150±5 rpm) e temperatura (36±1 °C). Posteriormente, uma alíquota foi diluída em tampão, injetada no HPLC e usando a curva de calibração determinou-se m_{CLOX} liberada em metanol. A m_{CLOX} teórica adicionada na solução de EC é fornecida pela TABELA 4.2, a CE é calculada pela Equação 3:

$$CE = \frac{m_{\text{CLOX}} \text{METANOL}}{m_{\text{CLOX}} \text{TEÓRICA}} \cdot 100 \quad (\text{Equação 3})$$

Gráficos do perfil de liberação foram construídos pela razão entre a concentração liberada no tempo t ([CLOX]_t) e a concentração máxima determinada pela capacidade de encapsulamento ([CLOX]_{CE}) em função do tempo de liberação (Equação 4). Amostras entre 20 e 25 mg de ECNF_CLOX10 e ECNF_CLOX20

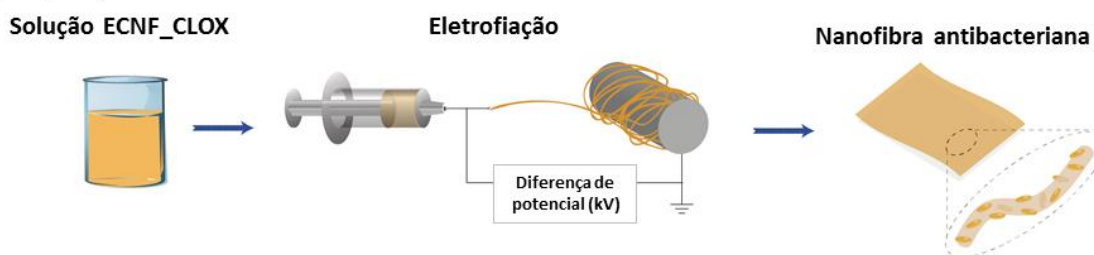
foram mergulhadas em tubo Falcom contendo 15 mL dos tampões. Alíquotas de 200 μ L era removidas em intervalos pré-determinados e injetadas no CLAE.

$$\% \text{ CLOX LIBERADA} = \left(\frac{[\text{CLOX}]_t}{[\text{CLOX}]_{CE}} \right) \quad (\text{Equação 4})$$

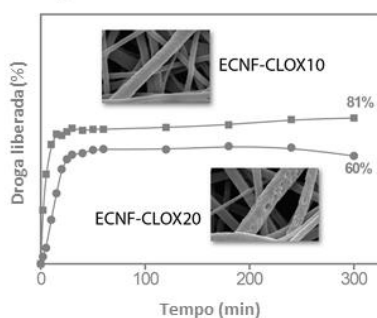
5 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

Este capítulo é dividido em quatro seções com a finalidade de organizar linearmente a sequência: produção e caracterização das fibras, perfil de liberação e ação antimicrobiana do material (FIGURA 5.1).

a) Preparação da amostra



b) Liberação de CLOX



c) Atividade antimicrobiana

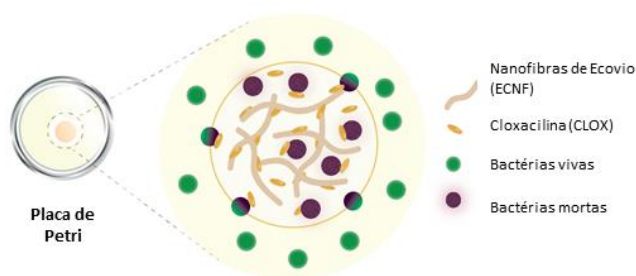


FIGURA 5.1 - Esquematização do processo de encapsulamento do antibiótico Cloxacilina (CLOX) por eletrospinning no polímero Ecovio (EC), perfil de liberação em meio tamponado e ensaio microbiológico.

5.1 - Síntese e otimização das fibras de Ecovio por eletrospinning

A propriedade viscoelástica do polímero Ecovio (EC) o torna um excelente candidato para produção de fibras pela técnica de eletrospinning. No presente estudo é proposto o emprego da mistura CHL/DMF 85/15 (v/v) como solventes para o EC. Os polímeros que compõem a blenda, PBAT e PLA, são miscíveis especialmente em CHL. Nas imagens da FIGURA 5.2 a FIGURA 5.4 estão mostradas as micrografias de MEV das nanofibras de EC (ECNF) obtidas a partir da eletrospinning de soluções com concentrações poliméricas diferentes e fluxos.

As imagens de MEV a seguir referem-se ao estudo da influência de dois parâmetros da eletrospinning sobre a morfologia das fibras: (i) fluxo e (ii)

concentração polimérica. Os demais parâmetros empregados na eletrospinação estão mostrados a seguir:

- Diferença de potencial: 20 kV;
- Distância coletor-agulha: 10 cm;
- Diâmetro da agulha: 0,7 mm;
- Rotação do coletor: 400 rpm;
- Umidade relativa: 30-40 °C;

Na primeira parte da análise das imagens pela caracterização de MEV foi avaliado a morfologia (poros, aglomerados, coalescimento) e homogeneidade das fibras ao se alterar a concentração polimérica e o fluxo. Posteriormente será feita a avaliação especificamente sobre o diâmetro das fibras.

Na concentração de 5% m.V⁻¹ (FIGURA 5.2) foram obtidas fibras descontínuas com presença de muitos aglomerados, possivelmente causados pela menor viscosidade da solução de 5% m.V⁻¹ de EC comparando com as soluções 10% e 15% m.V⁻¹. Em baixas concentrações, as cadeias poliméricas são insuficientes para manter estabilidade do Cone de Taylor e garantir um estiramento homogêneo levando a formação de gotas pelos solventes, causando aglomerados esféricos – elipsoidais (*beads*).

No caso de soluções com maiores concentrações (10% e 15% m.V⁻¹) o grau de emaranhamento das cadeias, interações polímero-polímero e solvente-polímero aumentam a viscosidade da solução. Sendo assim, a solução com concentração de 10% de EC (FIGURA 5.3) permite a obtenção de fibras com substancial diminuição dos *beads* em comparação com a FIGURA 5.2 para as três vazões. Porém, apesar do decréscimo na frequência nos três fluxos, apenas no fluxo de 0.6 mL.h⁻¹ ocorreu a formação de fibras com morfologia totalmente livre de *beads*.

Na concentração de 15% m.V⁻¹ foram obtidas fibras de EC livres de *beads* nos três fluxos avaliados (FIGURA 5.4), sugerindo assim que entre as três concentrações testadas a tendência observada é que as soluções mais concentradas de até 15% facilitam a síntese de fibras livres de *beads*.

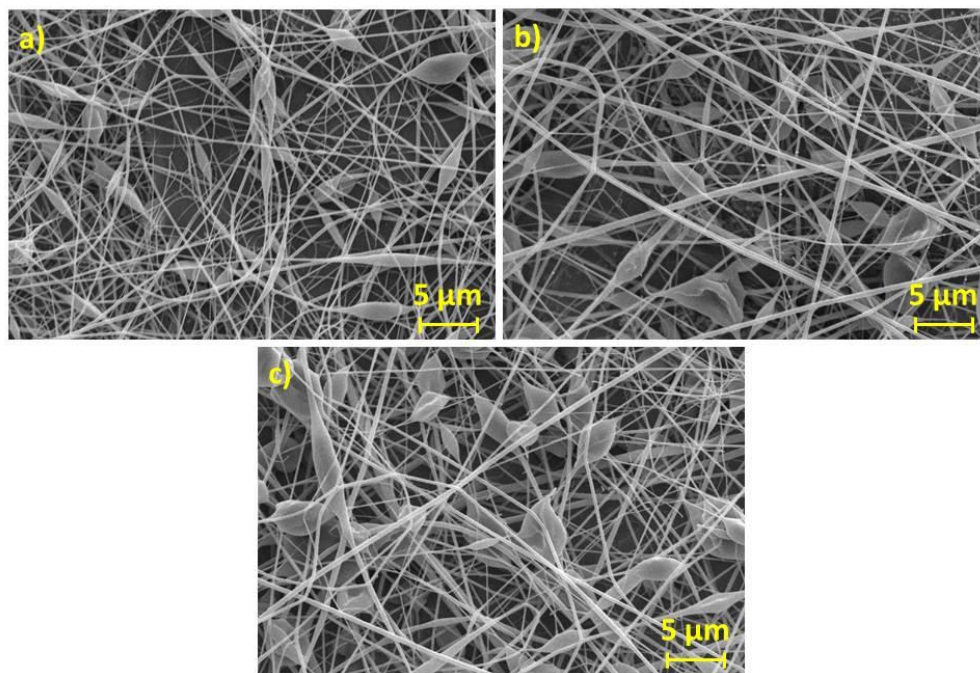


FIGURA 5.2 – Imagens de MEV representando o efeito do fluxo sob a morfologia das fibras de EC na concentração de 5% a) 0.2 mL.h^{-1} , b) 0.4 mL.h^{-1} e c) 0.6 mL.h^{-1} .

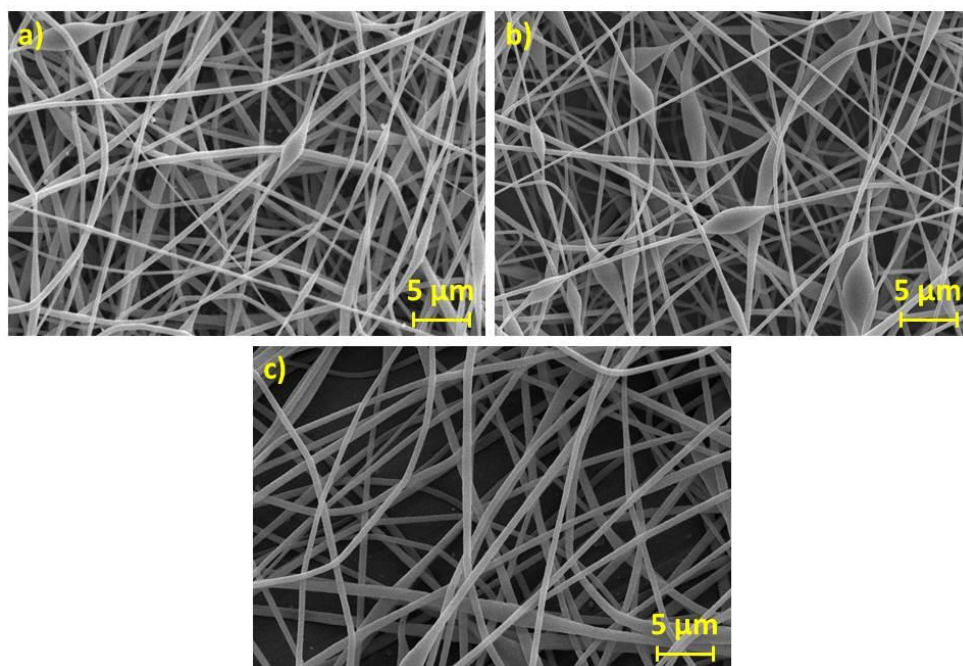


FIGURA 5.3 – Imagens de MEV representando o efeito do fluxo sob a morfologia das fibras de EC na concentração de 10% a) 0.2 mL.h^{-1} , b) 0.4 mL.h^{-1} e c) 0.6 mL.h^{-1} .

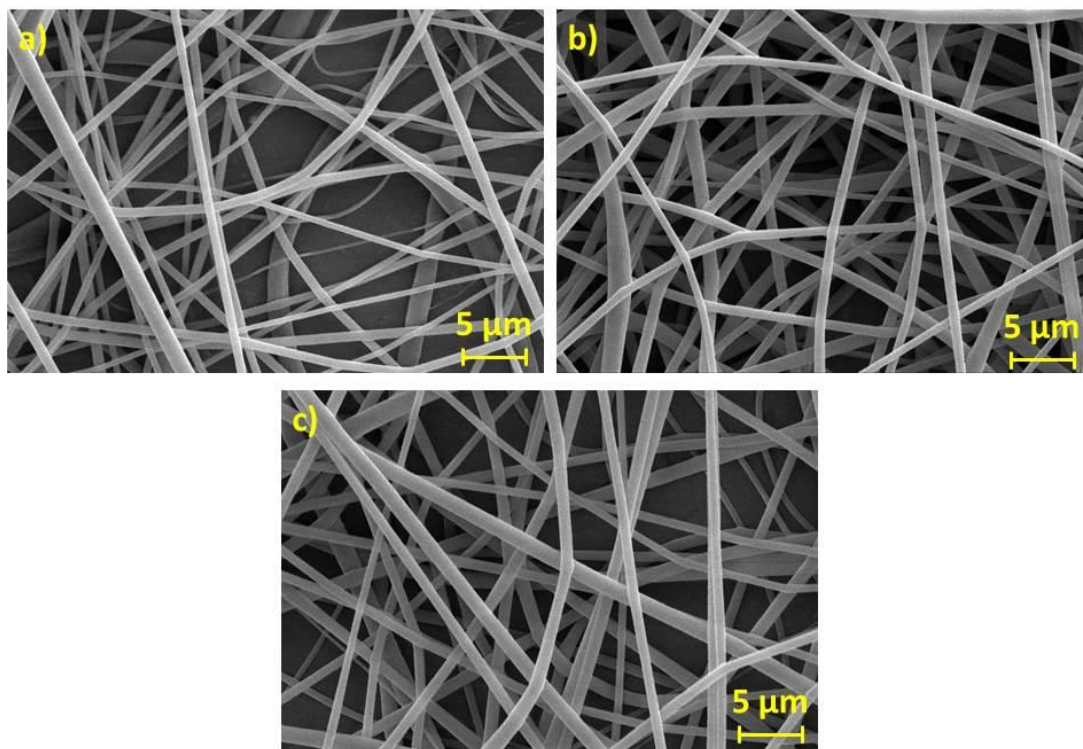


FIGURA 5.4 – Imagens de MEV representando o efeito do fluxo sob a morfologia das fibras de EC na concentração de 15% a) 0.2 mL.h^{-1} , b) 0.4 mL.h^{-1} e c) 0.6 mL.h^{-1} .

Das imagens presentes na FIGURA 5.2, FIGURA 5.3 e FIGURA 5.4 conclui-se que o fluxo apresenta influência negligenciável sob a morfologia das fibras nas concentrações de 5% e 15%, pois entre elas existe pequena alteração no diâmetro e na formação de poros. Entretanto, o fluxo apresenta efeito na concentração de 10%, uma vez que apenas em um dos fluxos avaliados ($0,6 \text{ mL.h}^{-1}$) as fibras formadas são livres de *beads*.

Outra importante observação é que em nenhuma das condições estudadas ocorreu a coalescência entre as fibras de ECNF, sugerindo que a mistura de solventes CHL/DMF tem capacidade de evaporação total durante o estiramento. O CHL é considerado excelente solvente para eletrofição, uma vez que possui alta pressão de vapor, separando-se rapidamente da fase polimérica, e por ser apolar assegurando a solubilização de diferentes polímeros. O DMF tem baixa pressão de vapor, mas por outro lado é um solvente polar que contribui no sentido de estabilizar as cargas elétricas e favorecer o estiramento.

Com base nas micrografias de MEV (três concentrações poliméricas cada uma delas eletrofiadas sob três fluxos distintos) tem-se um total de nove

morfologias para serem avaliadas. A TABELA 5.1 resume os parâmetros avaliados e a legenda das nove fibras produzidas. Além disso, apresenta os diâmetros médios calculados para cada amostra (1 à 9) (n=100 fibras, ImageJ).

Observando a TABELA 5.1 e levando-se em consideração: (a) o menor diâmetro médio; (b) ausência de *beads* e (c) menor desvio padrão, a condição de eletrofição que melhor satisfaz estas condições é aquela com 10% m.V⁻¹ eletrofiada com uma vazão de 0,6 mL.h⁻¹ (amostra 6). Esta condição foi escolhida para ser carregada com antibiótico. O diâmetro da fibra obtido nesta condição permite que as fibras apresentem uma elevada razão área superficial/volume, contribuindo para o processo de liberação de fármacos. Ainda segundo tabela abaixo, observa-se uma tendência de aumento do valor médio do diâmetro das fibras com o aumento da concentração polimérica. Essa observação é decorrente do aumento da viscosidade da solução.

TABELA 5.1 – Diâmetros médios e desvio padrão mensurados a partir das imagens de MEV das fibras de Ecovio (ECNF). Amostragem de n=100 fibras (ImageJ).

Amostra	[EC] (m.V⁻¹)	Fluxo (mL.h⁻¹)	Diâmetro ± desvio padrão
1	5%	0,2	162 ± 50 nm
2	5%	0,4	210 ± 73 nm
3	5%	0,6	201 ± 85 nm
4	10%	0,2	432 ± 150 nm
5	10%	0,4	361 ± 103 nm
6	10%	0,6	619 ± 115 nm
7	15%	0,2	714 ± 249 nm
8	15%	0,4	857 ± 292 nm
9	15%	0,6	874 ± 249 nm

O espectro FTIR da FIGURA 5.5 corresponde a membrana de EC (0% CLOX) o qual permite identificar apenas os grupos funcionais referentes ao PLA e ao PBAT que compõem a blenda polimérica. Observando no sentido do menor número de onda para o maior, se destaca o pico de grande intensidade em 729 cm⁻¹ correspondente a vibração C-H em anel benzênico (C com hibridização sp²), porém, o estiramento da mesma ligação não pode ser observado entre 3000-3200 cm⁻¹. Picos na região entre 1000 e 1300 cm⁻¹ correspondem às vibrações do estiramento das ligações C-O-C de ésteres. Outros três picos de maior intensidade na região de 1714-1755 cm⁻¹ são indicados: em 1714 cm⁻¹ e 1729 cm⁻¹ são aqueles atribuídos as carbonilas do grupo éster tereftálico e do grupo éster alquila, enquanto que o pico

em 1755 cm^{-1} é referente à carbonila do PLA. Os modos vibracionais relacionados ao estiramento simétrico e assimétrico do $-\text{CH}_3$ figuram em 2993 e 2946 cm^{-1} , bem como a flexão desta ligação em 1454 cm^{-1} e são associados ao PLA^{55,101-103}.

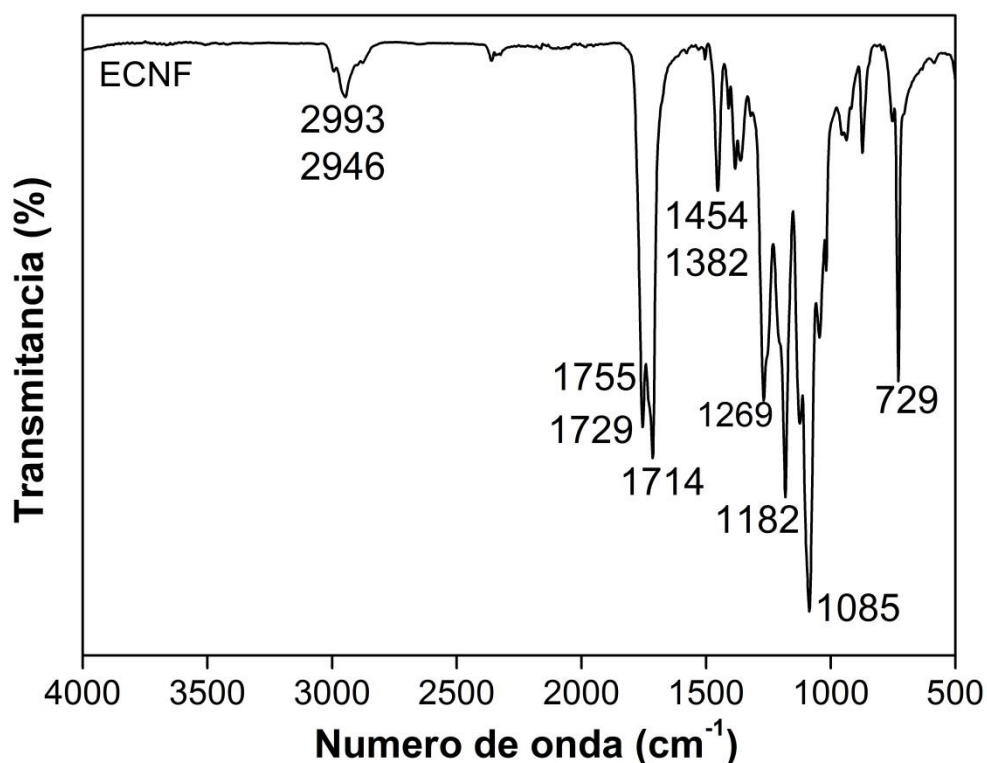


FIGURA 5.5 - Espectroscopia no infravermelho para ECNF na região de $500\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$.

A mistura dos solventes, CHL/DMF, utilizada para solubilização do polímero tem rápida evaporação durante o processo de eletrofiação e não são observados modos vibracionais que possam ser atribuídos a eles. Dessa maneira o gráfico FTIR ratifica o resultado previsto pelas FIGURA 5.2 à FIGURA 5.4, uma vez que não foram observados resíduos de solventes que levassem as fibras a coalescer. Esse resultado é interessante do ponto de vista para aplicações em sistemas liberadores, pois, a ausência dos solventes diminui a probabilidade de ocorrência de inflamações ou rejeição pelas células do organismo.

A medição do ângulo de contato estático (FIGURA 5.6) mostra o perfil hidrofóbico da blenda, que apresentou um ângulo de $135\pm 3^\circ$, $135\pm 1^\circ$ e $137\pm 2^\circ$ para 30, 60 e 90 minutos de eletrofiação, respectivamente. Apesar da superfície não apresentar-se plana a reprodutibilidade do experimento foi elevada quando avaliamos o desvio padrão. O tempo de deposição das fibras sobre o coletor não influenciou no ângulo de contato inicial, sugerindo a não dependência do ângulo com

a espessura da membrana fibrosa (camadas de fibras depositadas) ou a variação decorrente do diâmetro das nanofibras (619 ± 115 nm), mas sim com o caráter hidrofóbico da matriz polimérica.

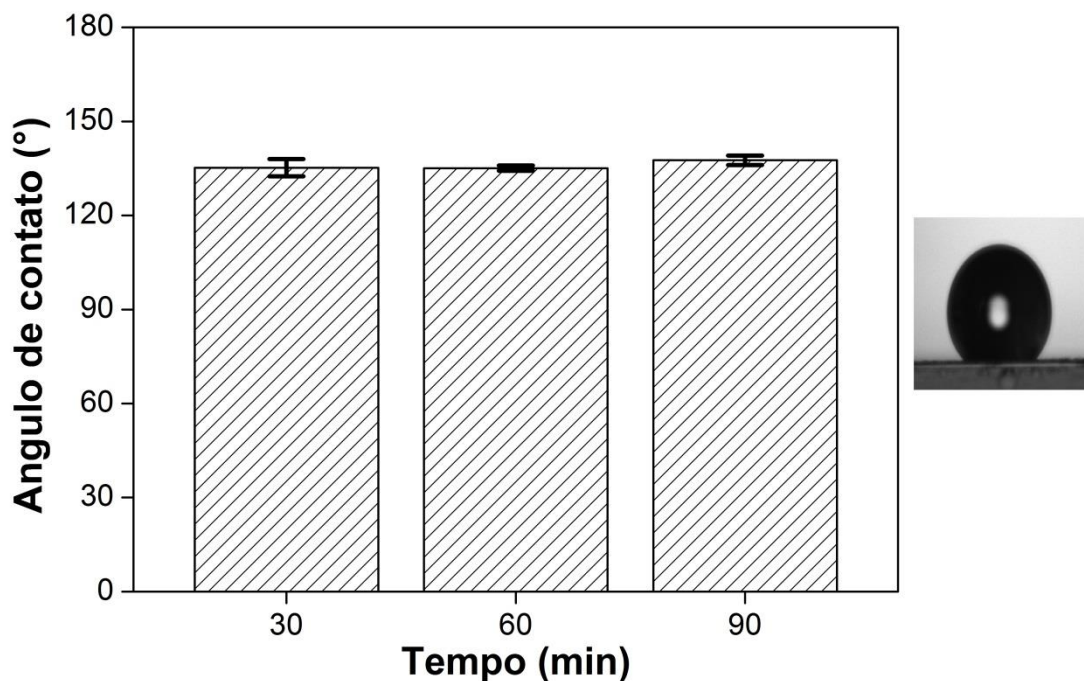


FIGURA 5.6 - Ângulo de contato estático para fibra de EC (sem antimicrobiano) em função do tempo de deposição das fibras por eletrofiação de 30, 60 e 90 minutos. À direita, fotografia digital do ângulo de contato após 5 segundos de estabilização da gota sobre as fibras para a amostra com 30 minutos de deposição.

O ângulo de contato permite inferir a respeito da interação que ocorre entre a matriz polimérica e o meio aquoso, tendo em vista que é neste meio em que ocorrerá a cinética de liberação do presente estudo. A combinação do PLA com PBAT (caráter hidrofóbico) e a geometria (fibras), com elevada razão área superficial/volume, torna as ECNF produzidas neste estudo altamente hidrofóbicas. O PLA é conhecido por sua característica hidrofóbica em filmes ($93,5^\circ$)¹⁰⁴ e fibras ($126,5^\circ$)¹⁰⁵. Filmes de PBAT são ligeiramente mais hidrofílicos que os de PLA, sendo encontrados na literatura ângulos de contato que variam entre $70-94^\circ$ ^{45,106}. Ao contrário, fibras de PBAT são mais hidrofóbicas, atingindo valores de até 137° ^{46,107}.

5.2 - Síntese e otimização das fibras de Ecovio contendo Cloxacilina

Conforme discutido na Seção 5.1, dentre as condições de eletrospiação estudadas no presente trabalho as fibras produzidas com fluxo de $0.6 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ e concentração de $10\% \text{ m}\cdot\text{V}^{-1}$ resultaram em melhor morfologia (fibras livres de *beads*, sem coalescer e com diâmetro médio de $619\pm 115 \text{ nm}$). Esta condição foi selecionada para encapsular o antibiótico CLOX.

5.2.1 - Cloxacilina

O fármaco CLOX apresenta maior número de picos em seu espectro de FTIR (FIGURA 5.7) quando comparado com a blenda EC. Isto se deve à presença de heteroátomos como S e N que compõem o anel β -lactâmico e isoxazol e ligações químicas mais polares quando comparada com as ligações presentes na blenda.

A frequência de absorção da ligação C=O das β -lactamas ocorre em 1770 cm^{-1} . A mesma ligação, mas agora para a amida secundária, sofre um efeito de conjugação pela ligação C=C (α,β -insaturada), aumentando a deslocalização da ligação π , levando o pico para 1683 cm^{-1} . O íon carboxilato gera uma espécie de dublete em que as ligações entre carbono e oxigênio ganham um caráter duplo de ligação π e simples, ocorrendo em 1564 e 1398 cm^{-1} . A deformação axial da ligação C-S é mostrada pelo modo vibracional em 696 cm^{-1} . Na região próxima a 3000 cm^{-1} estão os modos referentes às ligação com hidrogênio, mais precisamente em 3359 cm^{-1} aparece um pico referente à ligação N-H enquanto que as deformações simétrica e assimétrica para $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ são mostradas em 2968 e 2931 cm^{-1} . Entre $1000\text{-}1500 \text{ cm}^{-1}$ se encontram os modos referentes as ligações: C=N (1498 cm^{-1}), N-O (1294 cm^{-1}), N-C (1213 cm^{-1}) e C-O (1128 cm^{-1}). O modo vibracional do anel aromático o-substituído é mostrado em 750 cm^{-1} . O gráfico está em concordância com a literatura ¹⁰⁸.

A análise termogravimétrica (FIGURA 5.8) confirma o caráter higroscópico da CLOX, como mostrado no gráfico *inset*, em que ocorre 2.8% de perda de massa até a temperatura atingir $100 \text{ }^\circ\text{C}$ mesmo após a secagem do antibiótico. Acima desta temperatura se inicia a degradação do antibiótico com dois

estágios localizados em 125 °C e 150 °C. Um terceiro estágio da degradação se inicia em 490 °C. As temperaturas em que ocorrem perda de massa referente a 5%, 50% e 90% da massa inicial são 166 °C, 280 °C e 563 °C.

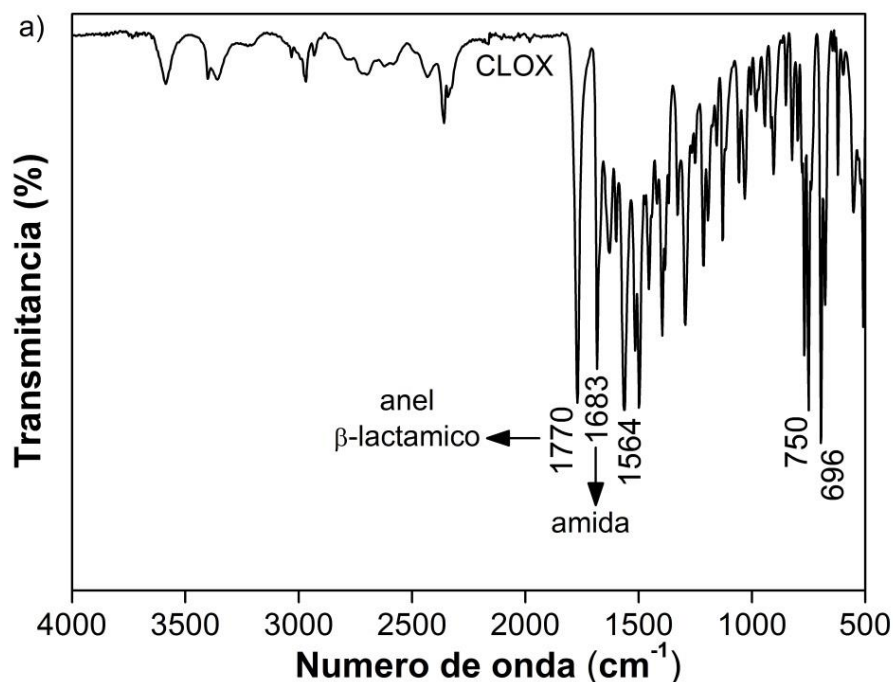


FIGURA 5.7 – Espectroscopia FTIR para o antibiótico Cloxacilina na região de 4000-500 cm^{-1} .

O gráfico de DSC para a CLOX (FIGURA 5.9) sugere que o antibiótico inicia o processo de fusão de seus cristais em baixas temperaturas. O pico largo em aproximadamente 108 °C, sugere que podem estar presentes cristais de vários tamanhos ou se deve a presença água quimicamente ligada na estrutura. Posteriormente, acima de 108 °C, a CLOX inicia um processo de degradação à 125 °C (pico exotérmico) gerando gases que levaram a abertura da panela hermética utilizada no experimento e impossibilitaram o término da corrida de DSC até a temperatura de 170 °C, a curva DSC esta em concordância com referência encontrada na literatura ⁹⁷.

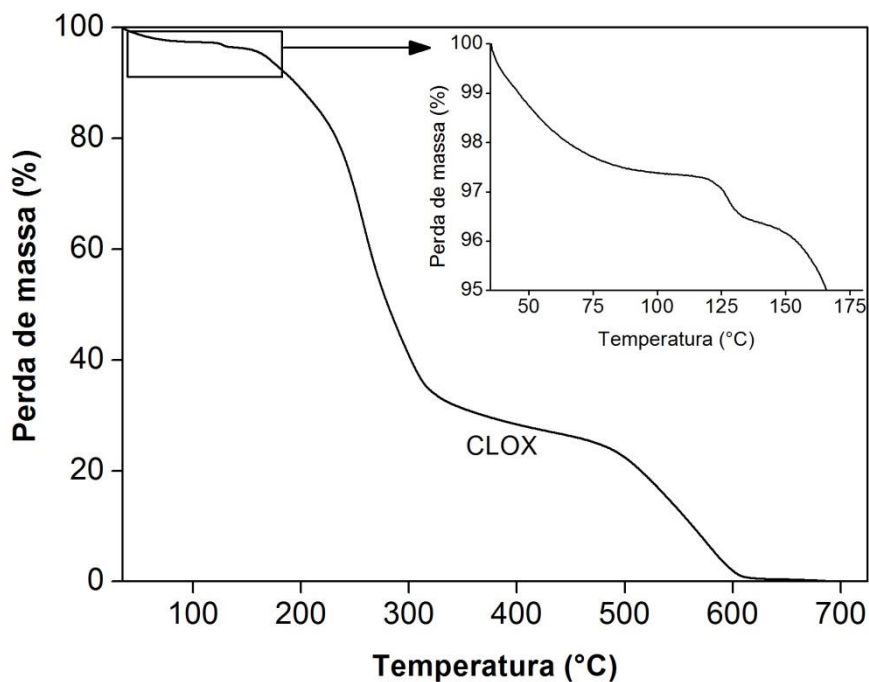


FIGURA 5.8 - Análise termogravimétrica do antibiótico Cloxacilina em atmosfera de N_2 ($10\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$).

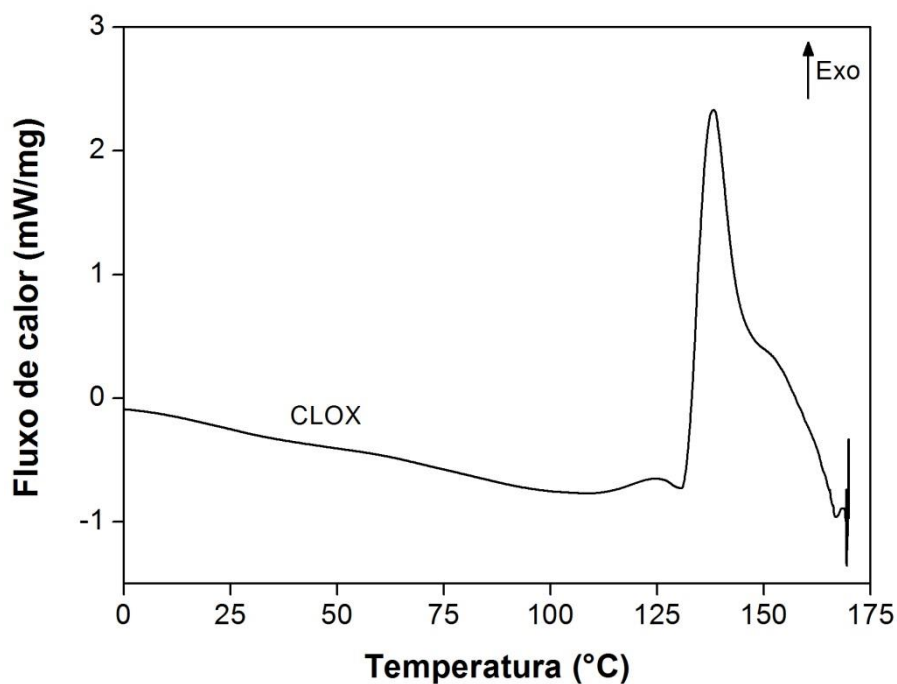


FIGURA 5.9 - Curva de DSC para o antibiótico Cloxacilina (Panela hermética, Alumínio, $10\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$).

5.2.2 - Cristalização superficial da Cloxacilina

A primeira tentativa de imobilizar e encapsular a CLOX nas fibras de Ecovio foi realizada mantendo-se apenas os solventes DMF/CHL 85/15 v/v, a fim de evitar alterações sobre os parâmetros de eletrofição pré-estabelecidos. Duas

soluções poliméricas (10% m.V⁻¹) contendo CLOX foram avaliadas, com o fármaco nas razões 10% m.m⁻¹ e 20% m.m⁻¹ de CLOX/EC, sendo denominadas como CLOX/EC_10 e CLOX/EC_20. Os resultados das micrografias das fibras carregadas com antibiótico são mostradas na FIGURA 5.10, fornecendo indícios sobre distribuição da CLOX, pois, demonstraram aglomerados brancos em sua superfície. Podem ser levantadas duas justificativas para este resultado: i) a distribuição do fármaco na superfície das fibras é influenciada pelo transporte de massa realizado pelos solventes, que acaba carregando a CLOX para a superfície durante o processo de estiramento das fibras, então, à medida que o solvente separa-se da matriz polimérica (evaporado) passa a ocorrer a precipitação do fármaco; ii) o fármaco se manteve parcialmente insolúvel em solução o que evitaria sua dispersão homogênea, prejudicando o encapsulamento da CLOX nas fibras.

Uma vez que estes cristais de CLOX formados na superfície apresentam heterogeneidade em relação a forma e a distribuição, a cinética de liberação e a atividade antimicrobiana poderiam ser prejudicadas.

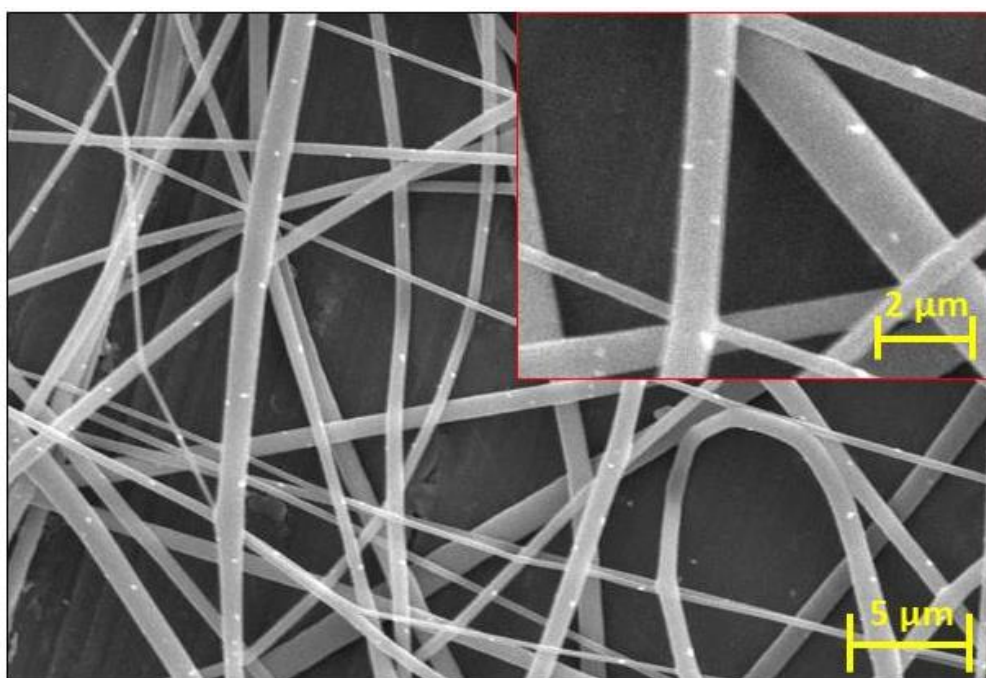


FIGURA 5.10 – Imagens de MEV para ECNF contendo 20% m.m⁻¹ de CLOX usando DMF/CHL 15/85 v.v⁻¹ como solventes.

Resultados da literatura⁸⁴ mostram que fibras produzidas a partir de soluções de poli(etileno-co-vinil acetato) (PEVA)/Tetraciclina (TTC) apresentam aglomerados na superfície decorrentes da cristalização da TTC. Após a liberação, a

morfologia das fibras PEVA torna-se lisa, devido à solubilização dos cristais de TTC. Em outro trabalho conduzido por Seif, Franzen e Windbergs¹⁰⁹. Os efeitos causados por um polímero hidrofóbico (PCL) e um hidrofílico (PVA) na distribuição da cafeína (CAF) (modelo de fármaco hidrofílico) e ácido flufenâmico (FFA) (modelo de fármaco hidrofóbico) foram estudados e demonstraram morfologias distintas com relação a cristalização superficial. Fibras de CAF-PVA e CAF-PCL apresentaram cristalização superficial quando a razão mássica CAF/polímero é 11/89 m.m⁻¹. Este processo foi justificado com base na compatibilidade entre polímero e molécula encapsulada, mas também com relação aos solventes empregados¹⁰⁹. Sofokleous, Stride e Edirisinghe¹¹⁰ demonstram uma combinação entre encapsulamento interno e decoração superficial com cristais em fibras produzidas por eletrofiação de Poli(ácido-D,L-láctico-co-glicólico) (PLGA) contendo fármaco Amoxicilina.

Além da superfície, a droga pode cristalizar-se ou ficar imobilizada na região amorfa do polímero, estando efetivamente encapsulada no volume livre entre as cadeias poliméricas. A visualização desta distribuição do fármaco ou biomolécula é dificilmente observada por micrografias, mas pode ser avaliada por imagens de microscopia confocal^{111,112} ou microtomografia¹¹³⁻¹¹⁵. Em polímeros não solúveis em água, essas regiões amorfas exercem papel fundamental no encapsulamento, pois geram ambientes hidrofóbicos que permitem a interação com medicamentos e biomoléculas pouco solúveis ou completamente insolúveis em água.

5.2.3 - Solução para o problema da cristalização

Para melhorar a dispersão do antibiótico na matriz polimérica foi realizada a adição de metanol (MET) na mistura inicial de solventes (CHL/DMF). O MET é considerado um excelente solvente para a CLOX. Devido a isso, 5% (v.v⁻¹) de MET foi adicionado aos demais solventes, reduzindo a porcentagem de DMF de 15 para 10%, alterando assim a proporção final dos solventes para 5/10/85 (v/v/v) MET/DMF/CHL o que promoveu a melhor solubilização e dispersão do antibiótico. As razões entre CLOX/EC foram mantidas em 10% m.m⁻¹ e 20% m.m⁻¹, sendo as fibras nomeadas como ECNF_CLOX10 e ECNF_CLOX20.

Apesar da adição do MET, as fibras não apresentaram *beads* e nem mesmo coalesceram (FIGURA 5.11) (a-b). Isso se deve ao MET ter baixo ponto de ebulição similar ao CHL, 64.7 e 61.2 °C, respectivamente, além de ser miscível no

DMF e CHL em pequenas proporções. Conforme mostra a morfologia das fibras na FIGURA 5.11 (c-d) a alteração da metodologia de preparo da solução polimérica mediante a adição de MET contribui para dispersão da CLOX e ainda sugere o encapsulamento do antibiótico, não sendo observados efeitos sobre a morfologia externa das fibras nesta ampliação (cristalização superficial ou poros), em contraste com o resultado previamente apresentado na FIGURA 5.10. Se encontra na figura o diâmetro médio das fibras calculados empregando amostragem de $n=100$ fibras.

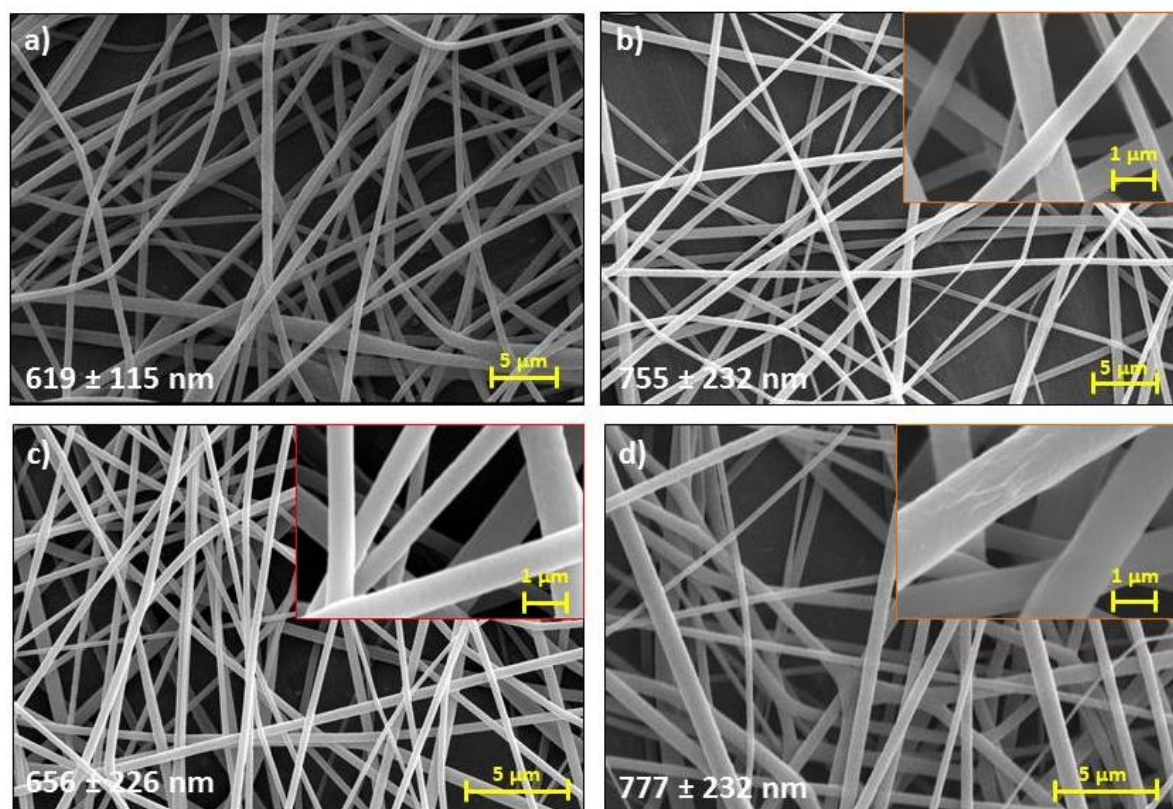


FIGURA 5.11 – Imagens de MEV das fibras evidenciando o efeito da adição do metanol (MET) à solução de ECNF com a) 0% (v/v) MET (619 ± 115 nm) e b) 5% (v/v) MET (755 ± 232 nm). Efeito da adição CLOX na morfologia das fibras, c) ECNF_CLOX10 (656 ± 226 nm) e d) ECNF_CLOX20 (777 ± 232 nm).

Apesar da melhora da morfologia e possivelmente da distribuição da droga, o desvio padrão praticamente dobrou comparando-se com as fibras obtidas sem a adição de MET. Isso pode ter sido causado pela contribuição do metanol na condutividade da solução, fazendo com que o cone de Taylor torne-se instável vindo a originar múltiplos jatos e até mesmo a variabilidade intrínseca do experimento. Estes jatos instáveis geravam fibras com diâmetros distintos afetando a homogeneidade da distribuição. Além disso, a interação que ocorre entre MET e EC também pode ter causado pequenas alterações na tensão superficial e viscosidade

da solução, acarretando em menor eficiência no estiramento. Em decorrência destes fatores todas as fibras com metanol apresentaram um aumento no desvio padrão (TABELA 5.2). A adição de 5% v/v MET aumenta o valor médio do diâmetro da fibra de EC de 619 para 755 nm, e a adição de 10 e 20% m.m⁻¹ CLOX deixa a fibra ECNF_CLOX10 com 656 nm e ECNF_CLOX20 777 nm, porém, não existe diferença estatística significativa entre as amostras levando em consideração o desvio padrão. Ainda assim, as fibras não coalesceram e nem formaram *beads* em presença de metanol.

TABELA 5.2 - Efeito da adição de metanol 5% na mistura de solventes clorofórmio/N,N-dimetilformamida 85/10 v/v e efeito da massa de Cloxacilina (CLOX) no diâmetro das fibras de Ecovio (ECNF).

[EC] (m.V ⁻¹)	% CLOX (m.m ⁻¹)	Amostra	Diâmetro ± desvio padrão
10%	0	ECNF (sem metanol)	619 ± 115 nm
10%	0	ECNF (com metanol)	755 ± 232 nm
10%	10	ECNF_CLOX10 (com metanol)	656 ± 226 nm
10%	20	ECNF_CLOX20 (com metanol)	777 ± 232 nm

5.2.4 - Caracterizações: fibras de Ecovio contendo Cloxacilina.

Os espectros de FTIR das fibras de EC contendo CLOX, ECNF_CLOX10 e ECNF_CLOX20 são mostrados na FIGURA 5.12. Eles apresentam muitas semelhanças, contudo, apontam para o aparecimento de dois modos vibracionais referentes ao antibiótico dentre aqueles modos vibracionais atribuídos ao polímero EC. A distinção entre os espectros corresponde apenas ao aparecimento de dois modos vibracionais em 702 cm⁻¹ e 1668 cm⁻¹, que correspondem, respectivamente, as ligações C-S e C=O do grupo amida da CLOX. Ao avaliar o espectro da CLOX (FIGURA 5.7) em comparação com os espectros das mantas ECNF_CLOX é possível constatar que ocorreu o deslocamento da frequência de absorção referentes a estas duas ligações. O modo vibracional do estiramento da ligação C-S encontrava-se em 696 cm⁻¹ enquanto que para o grupo C=O da amida ocorria em 1683 cm⁻¹. Possivelmente esses deslocamentos ocorram por interações entre os grupamentos químicos da matriz polimérica e do antibiótico.

Medidas do ângulo de contato para as fibras contendo antibiótico - ECNF_CLOX - não revelam alterações no caráter hidrofóbico das membranas em relação à ECNF, sugerindo o encapsulamento da CLOX no interior ou na proximidade da superfície das fibras. Como mostra a FIGURA 5.13 os ângulos de contato iniciais para ECNF, ECNF_CLOX10 e ECNF_CLOX20 foram de $138.0 \pm 1.1^\circ$, $137.1 \pm 1.0^\circ$ e $134.1 \pm 2.9^\circ$, respectivamente. Este resultado é coerente com a morfologia observada nas imagens de MEV da FIGURA 5.11, onde naquelas ampliações não foram visualizadas mudanças na rugosidade ou porosidade superficial das fibras em presença do antibiótico. A total absorção da gota pelas fibras ocorre entre 40-50 min, com ligeiro aumento na velocidade de absorção para fibra ECNF_CLOX10. Entretanto até praticamente 30 minutos a taxa de absorção da gota de água é idêntica para as três formulações.

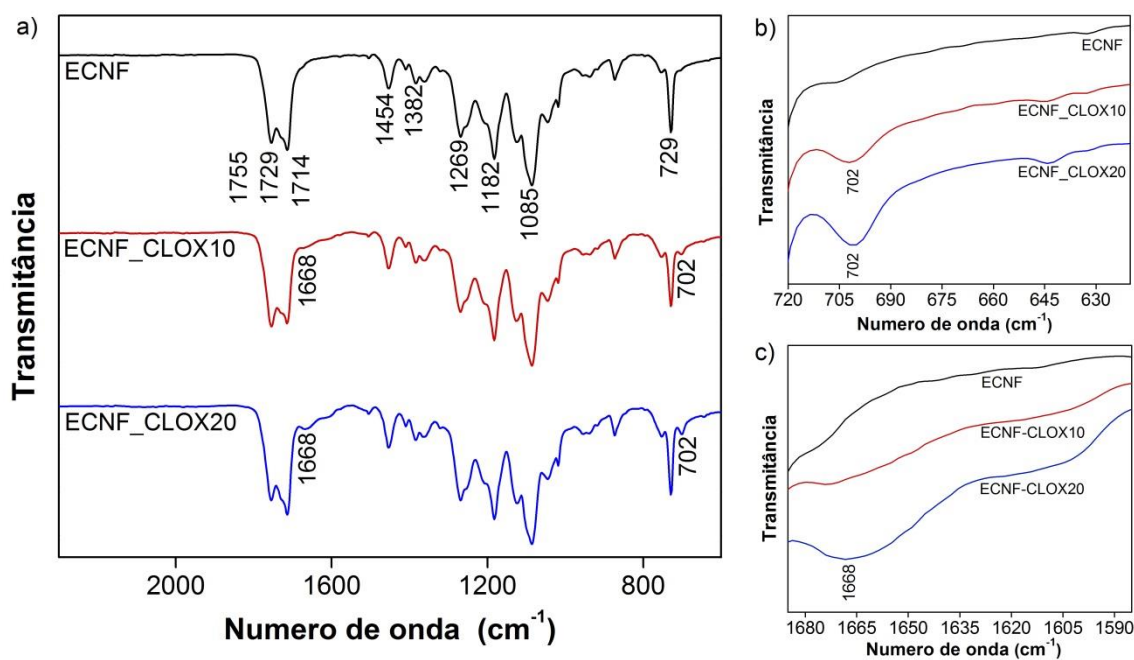


FIGURA 5.12 – Espectroscopia de FTIR das fibras de ECNF contendo antibiótico Cloxacilina.

As propriedades térmicas das fibras de ECNF e ECNF_CLOX foram caracterizadas por TGA e DSC. Os termogramas contidos na FIGURA 5.14 revelam uma diminuição na temperatura de início da degradação das fibras ECNF_CLOX10 e ECNF_CLOX20 em comparação com as fibras de ECNF. Mesmo na presença do antibiótico as fibras não apresentam perda de massa relativa significativa até a temperatura 200 °C, acima da qual a blenda começa sofrer com processos de degradação. A amostra ECNF inicia a degradação na temperatura de 290 °C,

enquanto as amostras ECNF_CLOX10 e ECNF_CLOX20 iniciam em 225 °C. A diminuição da estabilidade térmica da blenda pode indicar que os produtos de degradação da CLOX, que pode levar a formação de poros e aumento da área, o que acelerariam o processo de oxidação/degradação do PLA da blenda polimérica.

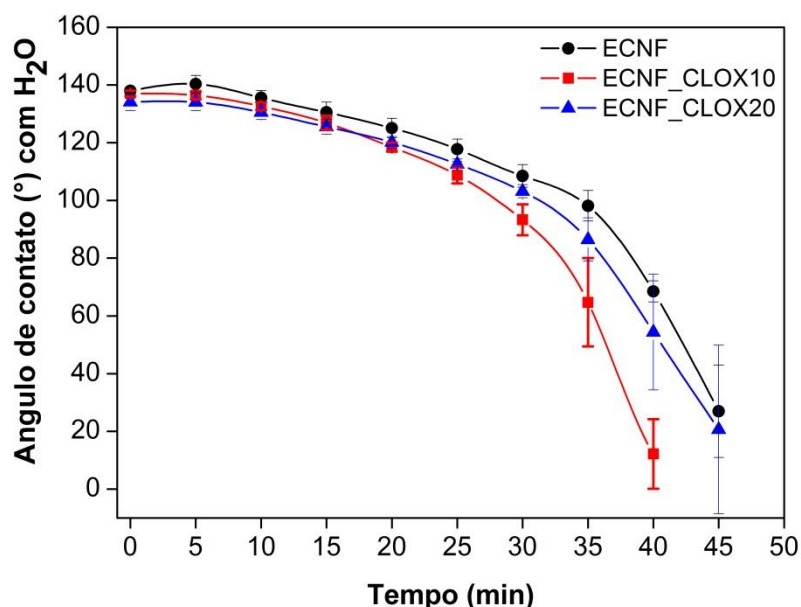


FIGURA 5.13 - Variação temporal do ângulo de contato da gota de água destilada para ECNF, ECNF_CLOX10 e ECNF_CLOX20.

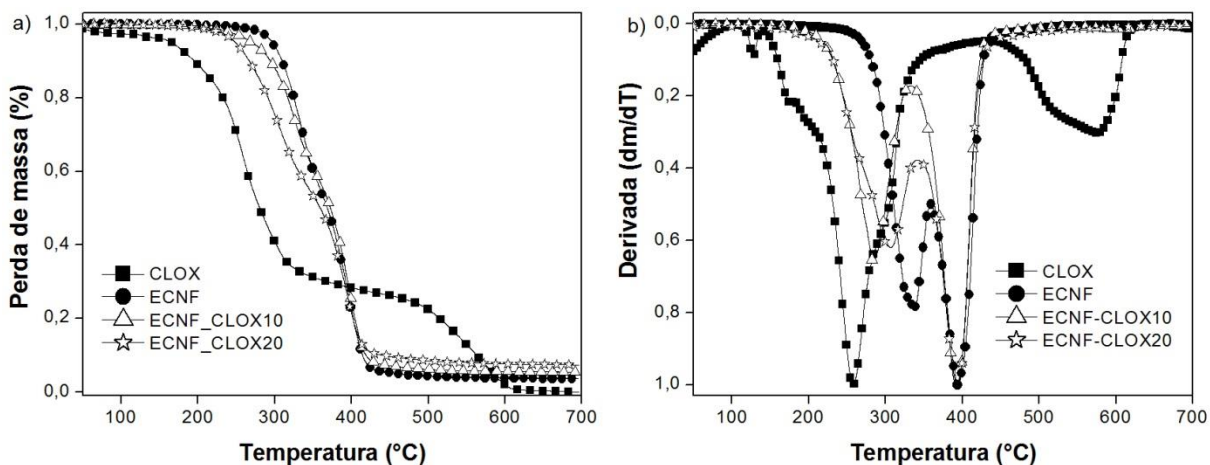


FIGURA 5.14 - Análise termogravimétrica das fibras ECNF, ECNF_CLOX10 e ECNF_CLOX20.

Uma vez que a matriz polimérica é composta de uma blenda entre PLA e PBAT, o gráfico de DTG (FIGURA 5.14b) para a ECNF apresenta dois picos que correspondem à temperatura em que a taxa de perda de massa é máxima: o primeiro, em 336 °C associado à fração do PLA; o segundo, em 394 °C refere-se à

fração do PBAT^{55,116}. Pode-se observar que a adição de CLOX diminui a estabilidade térmica da blenda. O pico da DTG atribuído à degradação da fração do PLA passou para temperaturas inferiores em presença de CLOX, encontrando-se em 282 °C para ECNF_CLOX10 e em 306 °C para ECNF_CLOX20, correspondendo a uma diferença de 54 °C e 30 °C, respectivamente. Em contraste, pode-se verificar que a adição de CLOX não causa deslocamentos significativos no pico de degradação atribuído ao PBAT (394 °C), indicando a interação preferencial da CLOX com o PLA em detrimento ao PBAT.

Na TABELA 5.3 se encontram as temperaturas correspondentes a 5%, 50% e 90% de perda de massa, $T_{5\%}$, $T_{50\%}$ e $T_{90\%}$, respectivamente, mostrando que o aumento na concentração de CLOX diminuiu a $T_{5\%}$ em 40 °C.

TABELA 5.3 – Eventos térmicos obtidos dos gráficos de TG e DTG.

Amostra	Temperatura (°C)			Onset PLA (°C)	Pico DTG	
	$T_{5\%}$	$T_{50\%}$	$T_{90\%}$		PLA	PBAT
CLOX^a	166 °C	280 °C	563 °C	-	-	-
ECNF	297 °C	368 °C	411 °C	290 °C	336 °C	394 °C
ECNF_CLOX10	271 °C	379 °C	411 °C	225 °C	282 °C	391 °C
ECNF_CLOX20	247 °C	349 °C	406 °C	225 °C	306 °C	394 °C

^a: Informações obtidas do termograma da FIGURA 5.8.

Em decorrência das alterações observadas acima nas análises de TGA, foram realizadas as corridas de DSC com o intuito de verificar mudanças na cristalinidade da blenda. Na primeira corrida de aquecimento, FIGURA 5.15(a), são exibidos os seguintes eventos característicos da blenda: a transição vítrea (T_g), temperatura de cristalização a frio (T_{cf}), temperatura de fusão (T_m) do PLA^{44,117}. A T_g do PLA ocorre em 60 °C, o pico largo exotérmico próximo a 90 °C é associado à T_{cf} que ocorre com o PLA devido ao caráter semicristalino e a T_m em 150 °C. Filmes produzidos por *casting*, a adição do polímero PBAT ao PLA induz o aparecimento do pico de cristalização a frio do PLA, acarretando em um aumento da capacidade de cristalização do PLA¹⁰⁹.

A curva de resfriamento, FIGURA 5.15 (b), sinalizou um efeito sobre a cristalinidade da blenda, com a passagem da temperatura do pico de recristalização (T_c) para menores temperaturas, de 70 °C para 59 °C, em presença de CLOX. Já na segunda corrida de aquecimento FIGURA 5.15 (c), para as três amostras, a T_g e a T_m do PLA se encontram nas mesmas temperaturas do primeiro aquecimento, de 60 °C e 150 °C, respectivamente. Ao contrário, é possível notar que o pico exotérmico

referente à cristalização a frio do PLA passou de 90 °C para 120 °C na ECNF, enquanto que nas amostras ECNF_CLOX10 e ECNF_CLOX20 passou para 140 °C e 142 °C, respectivamente. Os deslocamentos observados na T_{cf} em presença do antibiótico permitiram a visualização do pico de fusão do PBAT em 120 °C. Devido as amostras ECNF_CLOX10 e ECNF_CLOX20 apresentarem uma mudança na área do pico de cristalização a frio e na temperatura pico re-cristalização (corrida de resfriamento), tem-se como efeito a diminuição entalpia do pico T_m do PLA. Em outras palavras, este resultado pode indicar uma interação entre PLA/CLOX, em que a molécula de CLOX impede a reorganização das cadeias poliméricas e crescimento dos cristais do PLA, dificultando a nucleação e diminuindo o tamanho ou o número de cristais, o que diminui a área do pico T_m . Cabe ressaltar que não ocorreram eventos térmicos isolados que pudessem ser diretamente associados à CLOX em nenhuma corrida no DSC. Apesar das mudanças na cristalinidade do PLA e a possibilidade da cristalização da CLOX no interior das fibras, a análise de DRX não produziu resultados satisfatórios, não sendo apresentadas no presente trabalho.

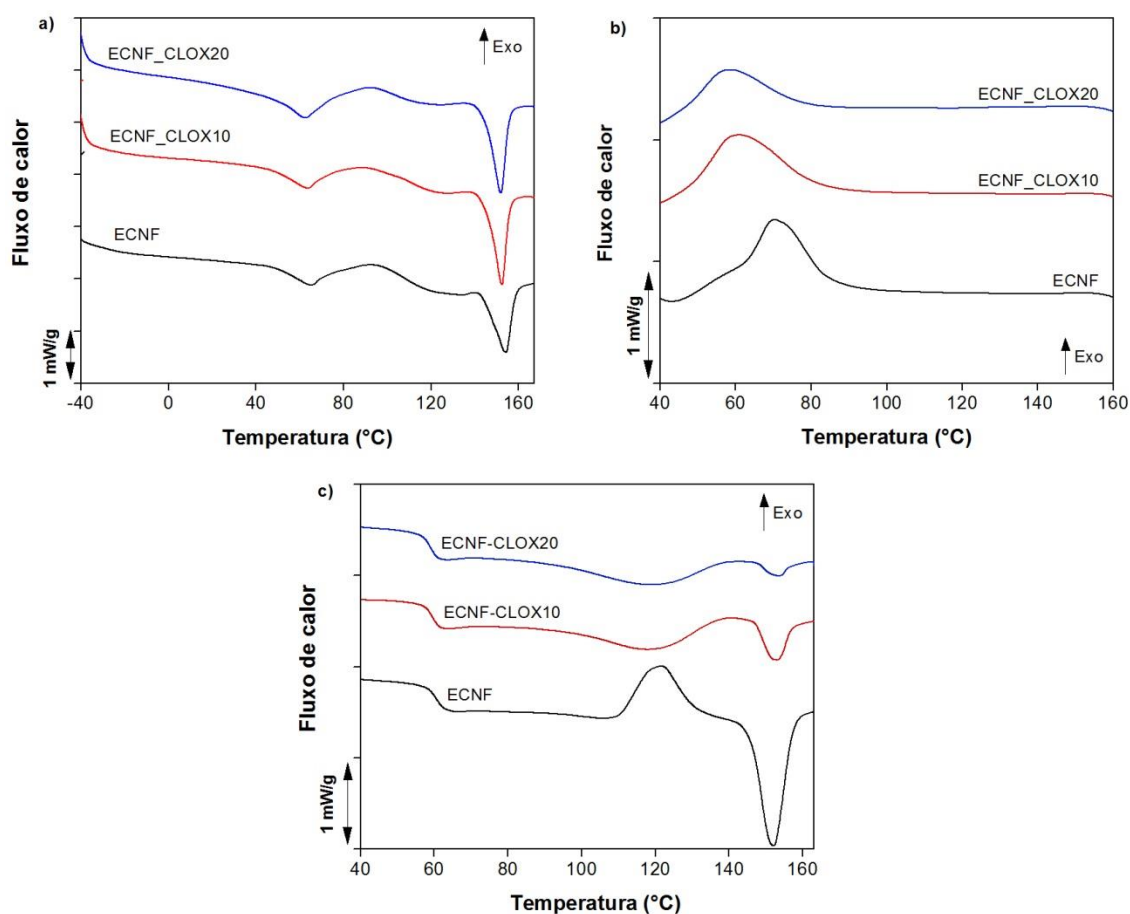


FIGURA 5.15 - DSC para as amostras ECNF, ECNF_CLOX10 e ECNF_CLOX20 a) primeiro aquecimento para remoção do histórico térmico de -40 à 170 °C, b) primeiro resfriamento e c) segundo aquecimento.

As caracterizações apresentadas até o momento sugerem uma distribuição homogênea do antibiótico na blenda. No início da seção foi demonstrado que a adição de metanol favorece o encapsulamento da CLOX. Os gráficos de FTIR demonstram que existe compatibilidade entre a fase polimérica e o antibiótico, uma vez que são observadas alterações na frequência dos modos vibrações das ligações. As análises térmicas (TGA e DSC) indicaram que a interação visualizada nos espectros de FTIR preferencialmente ocorre com a fração do PLA frente a fração do PBAT. Para complementar a caracterização do material foi realizada a técnica de espectroscopia de fotoelétrons excitados por de raios-X (XPS). Esta técnica vem sendo empregada para investigação e caracterização superficial de materiais, pois, permite o cálculo da composição (porcentagem atômica) dos átomos da superfície (penetração média de 50-100 nm), podendo ainda fornecer informações a respeito de interações entre grupos funcionais.

A varredura no XPS foi realizada de 0-800 eV para todas as amostras e foram seguidas de calibração utilizando elétron do nível C1s (285 eV). Na FIGURA 5.16, se pode notar a predominância dos átomos de carbono C1s (285 eV) e oxigênio O1s (530 eV) para a amostra ECNF. Estes átomos são os constituintes majoritários das estruturas química das cadeias do PLA e PBAT que compõem a blenda. O espectro se encontra em acordo com trabalhos recentemente reportados para os polímeros PLA e PBAT ^{105,118,119}.

Nos espectros de XPS para as amostras ECNF_CLOX10 e ECNF_CLOX20 em comparação com a amostra ECNF (FIGURA 5.16) observa-se o aparecimento de picos referentes aos átomos de N (1s, 400 eV), Cl (2p, 200 eV) e S (2p, 164 eV). O aparecimento destes átomos é referente à molécula da CLOX ($C_{19}H_{18}ClN_3O_5S$). As ampliações do espectro nas regiões dos picos da CLOX, nos gráficos presentes na FIGURA 5.16 (b-c), mostram o aumento na área do pico à medida que foi aumentada a carga de antibiótico na matriz, consequência do aumento da porcentagem composicional dos átomos N, Cl e S. De acordo com os resultados anteriores (FTIR, TGA, DSC e ângulo de contato) e a avaliação dos gráficos de XPS pode-se assumir que o antibiótico esteja distribuído próximo à superfície das fibras, confirmando assim o encapsulamento do antibiótico. Apesar desta distribuição próxima à superfície, os grupos funcionais polares carboxílicos,

como amida e o anel β -lactâmico da CLOX, não são capazes de alterar o ângulo de contato das fibras, conforme foi mostrado anteriormente na FIGURA 5.13.

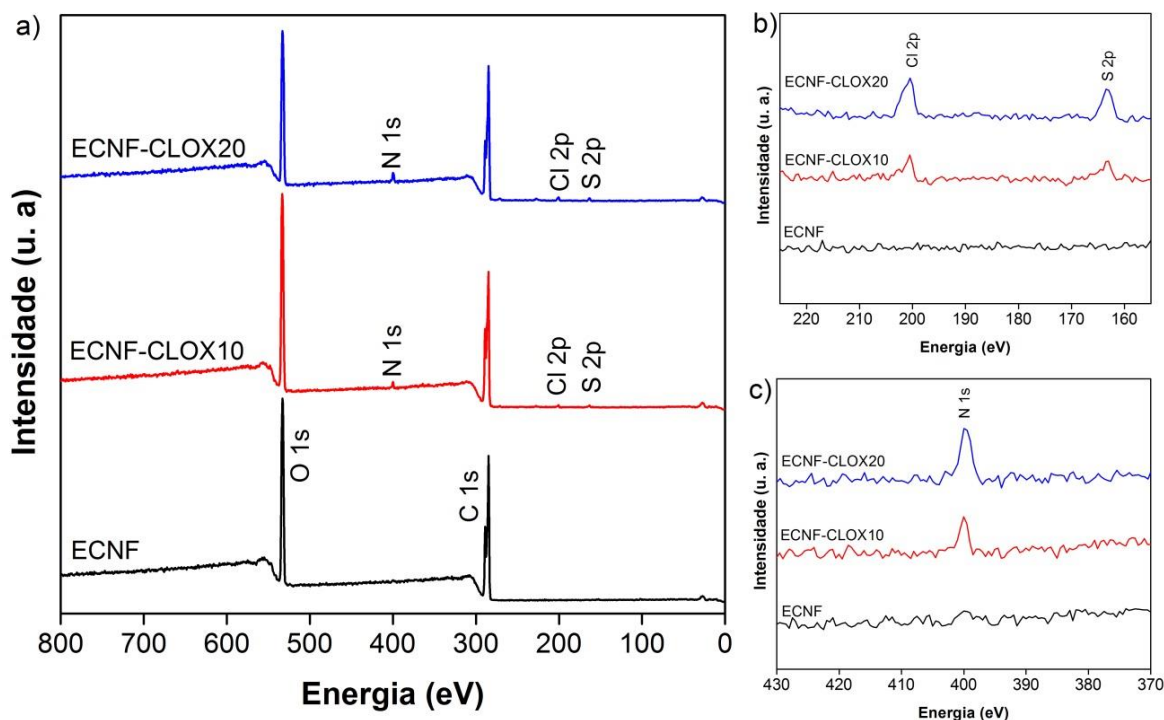


FIGURA 5.16 – Espectros de XPS para ECNF, ECNF_CLOX10 e ECNF_CLOX20.

Trabalhos recentes utilizam caracterizações superficiais por XPS para fibras de Poli(ácido L-láctico-co-D,L-lactico) (coPLA) e Poli(etileno glicol) contendo fármaco Ciprofloxacina (Cipro) demonstrando que ocorre um enriquecimento da superfície com ligações do tipo C-N, C=O e C-F correspondentes ao Cipro¹⁰⁵. Neste trabalho coPLA/PEG/Cipro não foram observadas alterações significativas sobre o ângulo de contato, assim como nas fibras ECNF_CLOX. As cinéticas ainda indicaram uma liberação que atinge o equilíbrio da liberação em cerca de 30-40 minutos de imersão, coerente com uma distribuição próxima a superfície¹⁰⁵.

5.3 - Cinéticas de liberação

Após a caracterização das fibras de Ecovio contendo o antimicrobiano CLOX, foi realizado o perfil de liberação do antibiótico a partir das nanofibras. Para comparação, a cinética foi conduzida em dois diferentes meios tamponados, de pH 7,3 e pH 5,5, tendo a concentração de CLOX sido monitorada pela técnica de CLAE.

Para todas as amostras foi utilizado o método de retirada das alíquotas, no qual um 200 μ L de amostra são retiradas e substituídas pelo mesmo volume do solvente puro. Com o auxílio da curva de calibração e correção das concentrações foi possível obter as concentrações de CLOX em função do tempo de liberação. Cada amostra foi testada em triplicata. Posteriormente, essas concentrações foram normalizadas em termos da eficiência de encapsulamento para cada fibra, gerando os gráficos da FIGURA 5.17.

Podemos observar uma cinética rápida para ECNF_CLOX10 na qual após 20 minutos a porcentagem de CLOX liberada alcança 72%, enquanto que em 300 minutos atinge apenas 82%. ECNF_CLOX20 apresenta um perfil ligeiramente mais prolongado de liberação, sendo que 20 minutos se encontra em 52% mas o equilíbrio é atingido apenas após 40 minutos de liberação, quando a porcentagem atinge 62%. A reprodutibilidade da cinética se altera com a porcentagem de fármaco, uma vez que podemos observar maiores desvios padrão para a amostra ECNF_CLOX10 frente a ECNF_CLOX20.

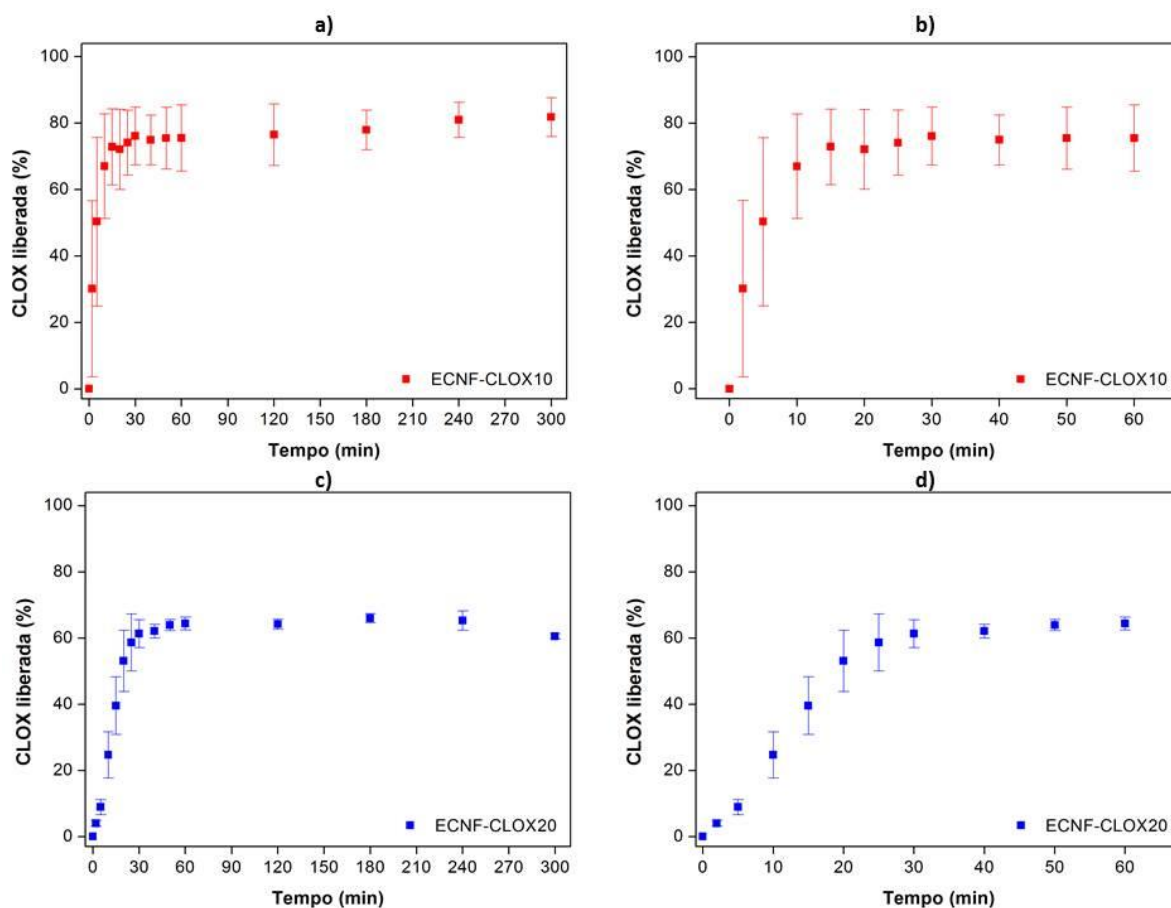


FIGURA 5.17 - Perfil de liberação da Cloxacilina a partir de ECNF_CLOX10 e ECNF_CLOX20 em meio neutro (pH 7,3). (a-c) Perfil de liberação após 5 horas, (b-d) perfil nos primeiros 60 minutos de liberação.

De modo similar aos resultados apresentados na FIGURA 5.17, Nazari et al.¹²⁰ produziram fibras de poli(vinil pirrolidona) (PVP) contendo anti-inflamatório Indometacina (INDO) (PVP/INDO) para serem empregadas como sistema liberador bucal. Os resultados da cinética de liberação também apresentaram rápido perfil de liberação e mesmo as fibras PVP/INDO contendo excipientes para controle da liberação, como hidroxipropil metilcelulose (HPMC) e etil celulose (Ethocel[®] E-10), apresentaram uma cinética de liberação que atingiu a máxima capacidade de liberação entre 15 a 60 minutos, semelhantemente a cinética das fibras ECNF_CLOX sem excipientes para controle da liberação. Em outro trabalho recente da literatura³⁴, quando a β -ciclo-dextrina (BCD) foi empregada como excipiente para o encapsulamento de tetraciclina (TTC), a cinética de liberação do antibiótico ficou 60% mais sustentada a partir das fibras de poli(vinil álcool) (PVA), em que a totalidade da TTC encapsulada é liberada em 325 horas. Apesar destes dois exemplos descreverem dois sistemas com velocidades de liberação completamente

distintos, de poucos minutos a muitas horas, os sistemas citados (PVA/TCC ou PVP/INDO) são ambos descritos pelo modelo de Higuchi¹²¹, ou seja, a cinética é controlada pela difusão do fármaco com uma dependência com a raiz quadrada do tempo.

Na literatura não são encontrados mecanismos de liberação desenvolvidos especialmente para fibras nas escalas micro- ou nanométricas. Portanto, para a modelagem dos dados experimentais a partir destes mecanismos existentes na literatura se fazem necessárias algumas considerações. A primeira delas diz respeito à geometria da matriz polimérica (esferas, cilindros, filmes, capsulas) e efeitos sobre morfologia (área superficial, densidade, porosidade, rugosidade). A segunda, diz respeito à homogeneidade da distribuição da fase dispersa. Polímeros podem possuir regiões amorfas e cristalinas, que vem a causar diferentes taxas de difusão. Aqui podem ser citadas também interações entre fármaco-polímero, bem como fármaco-fármaco, em cada um destes domínios. A terceira, são os fatores como a taxa de degradação (quebra de cadeias) e erosão, causadas por em pH's distintos e presença de microrganismos.

Ainda que alguns modelos cinéticos para sistemas poliméricos como de Korsmeyer-Peppas¹²², Higuchi¹²¹ e Hixson-Crowel¹²³ sejam aplicados a sistemas de liberação de fibras, eles não foram construídos para sistemas micro ou nanoestruturados. Porém, são robustos a ponto de fornecer bons indícios do mecanismo predominante sobre a liberação a partir das nanofibras. Nos modelos citados, é essencial a distribuição homogênea da droga na matriz polimérica, característica possivelmente foi obtida nas fibras ECNF_CLOX analisando os resultados anteriormente apresentadas pelas técnicas de caracterização (FTIR, DSC, TGA, XPS).

Higuchi é um modelo puramente difusional, que é regido pela primeira lei de Fick, descrevendo uma dependência da liberação com a raiz quadrada do tempo. Hixson-Crowel não envolve nenhum processo de difusão, sendo proposto para matrizes porosas com distribuição do medicamento na superfície. Neste modelo, a liberação depende exclusivamente da solubilidade do fármaco.

Baseando-se no valor do coeficiente n do modelo de Korsmeyer-Peppas (equação a seguir), é possível dividir a cinética em três casos de transporte:

Fickiano, não-Fickiano e Super-Caso II. Valores de $n \leq 0,5$ indicam liberações baseadas na segunda lei de Difusão de Fick (transporte Fickiano). Caso n esteja entre o intervalo $0,5 < n < 1$ a difusão é anômala (transporte não-Fickiano). Se $n > 1$ a difusão é não fickiana, chamada de Super Caso II. A constante k engloba fatores geométrico-estruturais da substância a ser liberada. É importante ressaltar que o modelo de K-P foi projetado para matrizes planas, em que o fator entre espessura-comprimento deve ser de pelo menos 10. Variações no modelo acima foram propostas para formas cilíndricas, em que: $n=0,43$ corresponde ao transporte Fickiano e $n > 0,89$ corresponde ao Super Caso II ¹²⁴. Além disso, o modelo preconiza que somente 60% dos pontos experimentais do início da liberação podem ser usados nos cálculos, portanto, a curva linearizada apresenta apenas quatro pontos ¹²⁵.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \text{ (Equação de Korsmeyer – Peppas (KP)) (Equação 5.1)}$$

$$\text{Log } \frac{M_t}{M_\infty} = n \log t + \log k \text{ (Linearização KP) (Equação 5.2)}$$

Com o propósito de compreender a cinética de liberação nos primeiros minutos de liberação, foram produzidas novas membranas e coletados novos dados cinéticos para intervalos menores que os apresentados na FIGURA. 5.18 (2 minutos entre cada alíquota). Esse acompanhamento minucioso da cinética inicial permitiu a obtenção de dados experimentais com maior precisão uma vez que observou-se menor desvio padrão para as medidas. A mais importante informação que pode ser obtida com a avaliação detalhada da cinética nos primeiros 30 minutos é a visualização do tempo necessário para liberação atingir a assíntota vertical, que foi de 10 minutos para ECNF_CLOX10 e 22 minutos para ECNF_CLOX20. Todavia, estes tempos encontrados para alcançar a assíntota estão coerentes com os tempos previstos nas cinéticas mostradas na FIGURA 5.17.

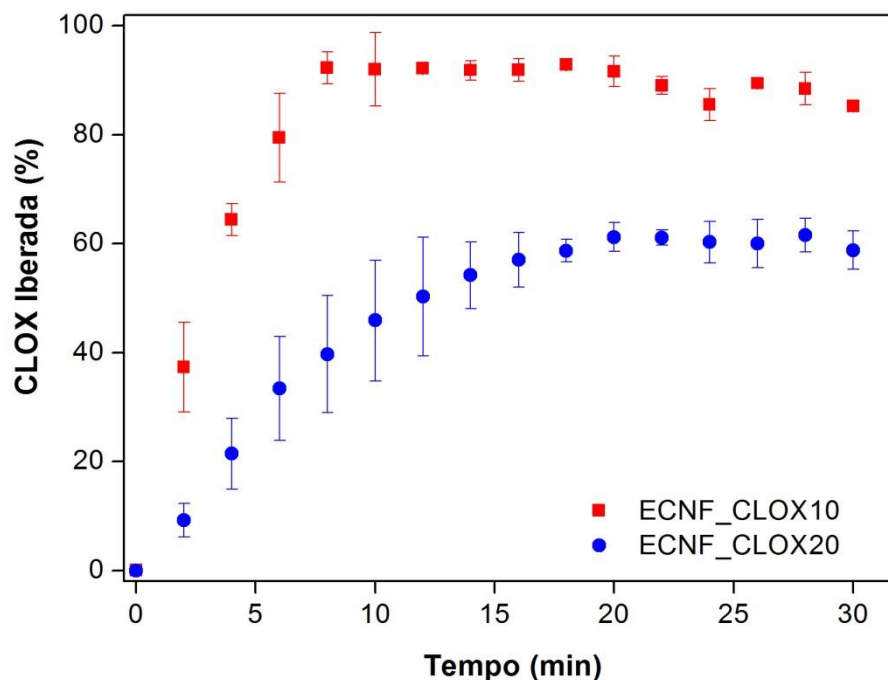


FIGURA 5.18 - Cinética de liberação com maior quantidade de dados experimentais no período inicial de 30 minutos liberação.

O gráfico linearizado do modelo de Korsmeyer-Peppas com base nos dados experimentais da FIGURA 5.18 se encontra na FIGURA 5.19 o qual melhor ajustou-se aos dados experimentais entre os três modelos cinéticos citados anteriormente. A partir dele é possível associar os coeficiente angular da curva analítica com o mecanismo predominante da liberação estando os resultados resumidos na TABELA 5.4. A escolha do número de pontos para linearização é baseada considerando que o modelo de Kosmeyer-Peppas descreve apenas 60% dos dados iniciais da liberação, correspondendo a 4 pontos e 7 pontos, respectivamente, para ECNF_CLOX10 e ECNF_CLOX20.

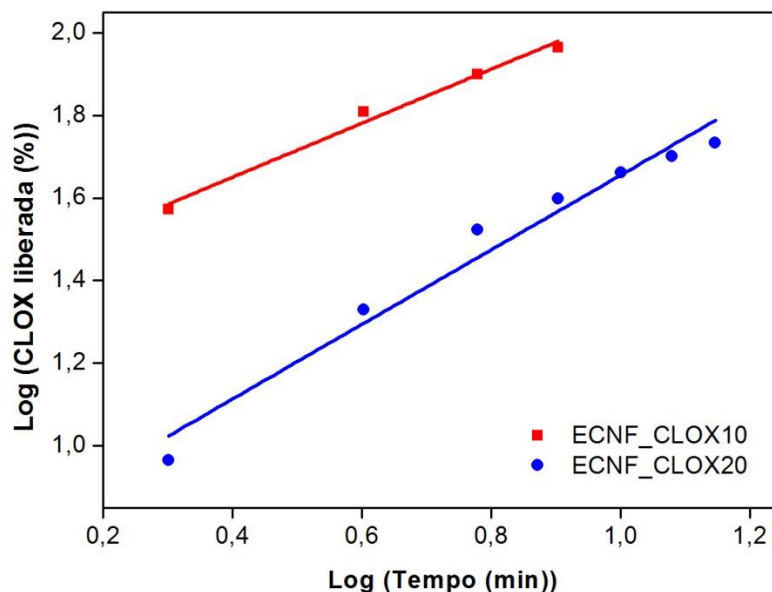


FIGURA 5.19 - Gráfico linearizado segundo modelo de Korsmeyer-Peppas para liberação de Cloxacilina a partir de ECNF_CLOX10 e ECNF_CLOX20 em meio neutro.

Com base no coeficiente de R^2 podemos concluir que apenas o aumento da concentração de CLOX de 10 para 20% promoveu alteração no mecanismo de liberação, uma vez que n passou de 0,65 para 0,90. Valores de n entre 0,45 à 0,89 são atribuídos ao transporte anômalo da droga, que envolve processos de difusão-erosão. O coeficiente linear, $\text{Log } k$, que está associado ao *burst* (liberação rápida) se modificou passando de 1,39 para 0,65 que pode sugerir indícios de mudança do mecanismo de liberação. Como consequência, ECNF_CLOX20 tem perfil de liberação lento em comparação com ECNF_CLOX10. Modelos de Hixson-Crowell e Higuchi também apresentaram coeficiente R^2 próximo a 1, sugerindo assim que outros parâmetros ou mecanismos, diferentes do modelo de Korsmeyer e Peppas, ocorrem conjuntamente nos primeiros minutos, o que torna difícil a distinção entre eles e a definição do mecanismo.

TABELA 5.4 - Parâmetros cinéticos obtidos do perfil de liberação da Cloxacilina a partir ECNF_CLOX10 e ECNF_CLOX20 em meio pH 7,3 para os modelos cinéticos de Korsmeyer-Peppas, Hixson-Crowel e Higuchi.

Amostra	Korsmeyer-Peppas			Mecanismo
	Log k	n	R ²	
ECNF_CLOX10	1,39	0,65	0,98	Transporte anômalo
ECNF_CLOX20	0,75	0,90	0,96	Transporte anômalo/Super Caso II
Amostra	Hixson-Crowel			Mecanismo
	A _{HC}	K _{HC}	R ²	
ECNF_CLOX10	0,90	7,0x10 ⁻²	0,99	Solubilidade do droga
ECNF_CLOX20	0,99	1,6x10 ⁻²	0,97	
Amostra	Higuchi			Mecanismo
	A _H	K _H	R ²	
ECNF_CLOX10	0	38,6	0,99	Difusão Fickiana (n = 0,5)
ECNF_CLOX20	-5,73	15,7	0,95	

Em geral, quando se trata de inflamações como no caso da mastite ocorrem alterações locais que normalmente causam a diminuição do pH (acidez local). Com este intuito, simulou-se a liberação da CLOX no pH 5,5. As membranas ECNF_CLOX10 e ECNF_CLOX20 foram submetidas à liberação em meio ácido sendo observadas mudanças no perfil de liberação como mostra a FIGURA 5.20. Podemos destacar principais diferenças entre a liberação em meio ácido em comparação com meio neutro que a cinética apresentou-se mais sustentada, porém, a capacidade de liberação máxima foi diminuída. Diferentemente das liberações em pH neutro, em meio ácido a liberação não atinge o equilíbrio após 60 minutos de liberação. Além disso, o acompanhamento realizado nos tempos de 120, 240 e 300 minutos sugerem que a liberação continua ocorrendo lentamente para ambas membranas.

A influência do meio ácido na liberação da CLOX de micelas PS-PVP-PEO também causou liberação mais lenta da CLOX. Esse resultado foi associado a protonação do PVP em meio ácido, que exerce forte interação eletrostática com a droga negativamente carregada.¹⁰⁰ Este pode ser um bom modelo de sistema de liberação e previsão de cinética de liberação da CLOX a partir de polímeros.

Processos de degradação da CLOX não são esperados neste pH, sugerindo que existe uma alteração da velocidade de difusão do fármaco em decorrência de mais fortes interações antibiótico-matriz (dificultando a liberação), causando menor velocidade de difusão, ou até mudanças na solubilidade da própria CLOX ¹²⁶.

Foram usados nove pontos experimentais para construção das curvas analíticas e aplicação dos modelos cinéticos para cinética em meio ácido, enquanto que nas liberações em meio neutro foram usados quatro pontos e sete pontos. Esse procedimento é justificado pois a liberação é mais sustentada em meio ácido, portanto, para a mesma porcentagem de 60% dos pontos iniciais existem mais pontos que participam da curva linear. Sendo assim, considerando que a maior porcentagem de liberação ocorre até 30 minutos de imersão (15 pontos), 60% destes pontos iniciais equivalem até o tempo de 18 minutos.

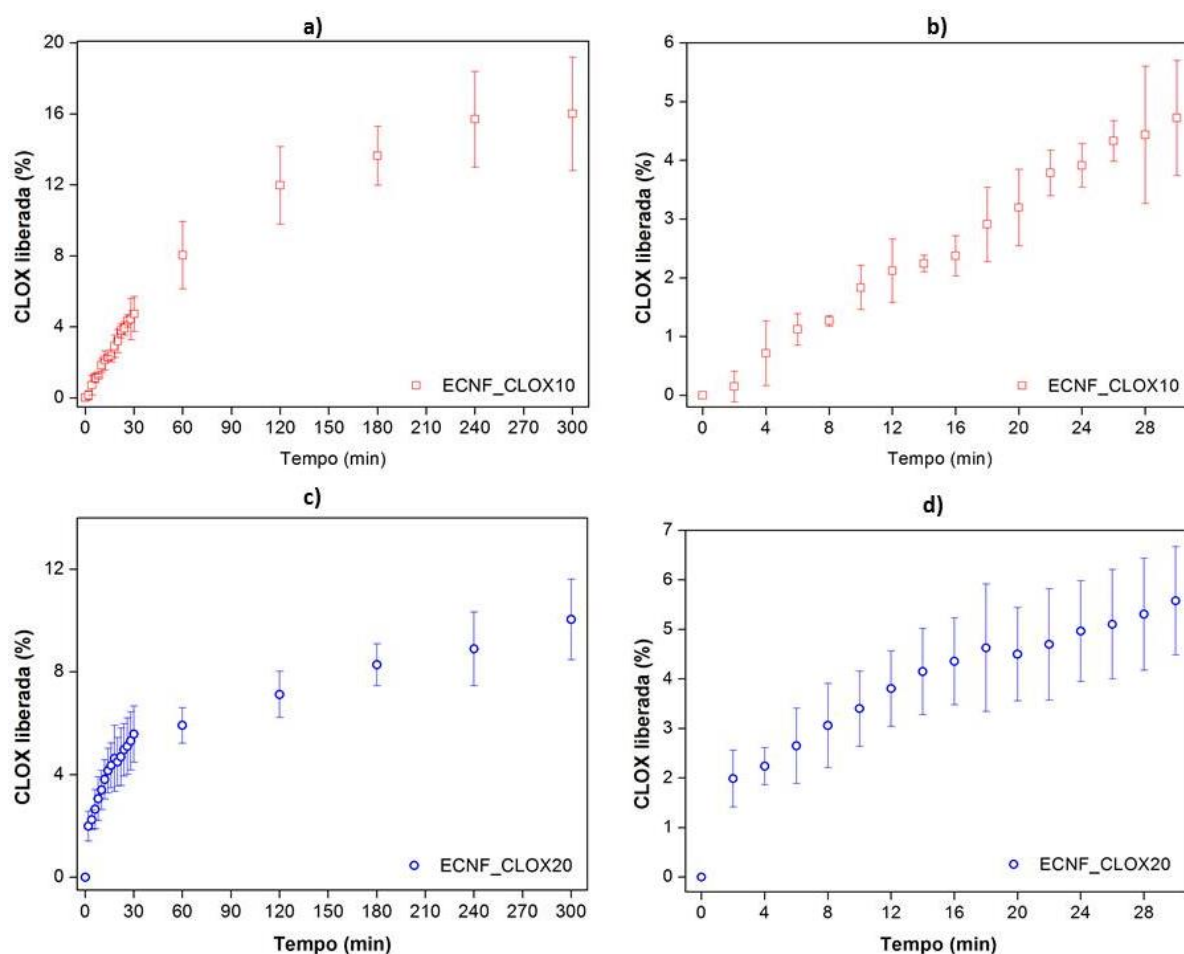


FIGURA 5.20 - Perfil de liberação da Cloxacilina a partir de ECNF_CLOX10 e ECNF_CLOX20 em meio ácido (pH 5.5). (a-c) Perfil de liberação após 5 horas, (b-d) perfil nos primeiros 60 minutos de liberação.

O transporte anômalo $0,43 < n < 0,89$ para cilindros¹²⁴ ou $0,5 < n < 1$ para matrizes planas¹²² corresponde a um sistema mais complexo de liberação que envolve tanto o mecanismo de transporte como também outros mecanismos simultaneamente. Entre estes outros mecanismos que podem atuar conjuntamente com a difusão podemos citar a velocidade de difusão de água, solubilidade do antibiótico, molhabilidade, efeitos do pH sobre a matriz e sob a força de interação fármaco-blenda. Em alguma extensão estes outros parâmetros podem exercer efeitos sobre a cinética, como no estudo proposto por Fredenberg et al.¹²⁷, que lista mais de 20 fatores que agem sobre perfil de liberação de uma matriz polimérica de PLGA. Como ambos mecanismos, Higuchi e Korsmeyer-Peppas, estão associados a difusão eles possivelmente ocorrem conjuntamente com outros processos físico-químicos¹²⁷ e o perfil de liberação torna-se demasiadamente complexo para ser descrito por apenas um modelo.

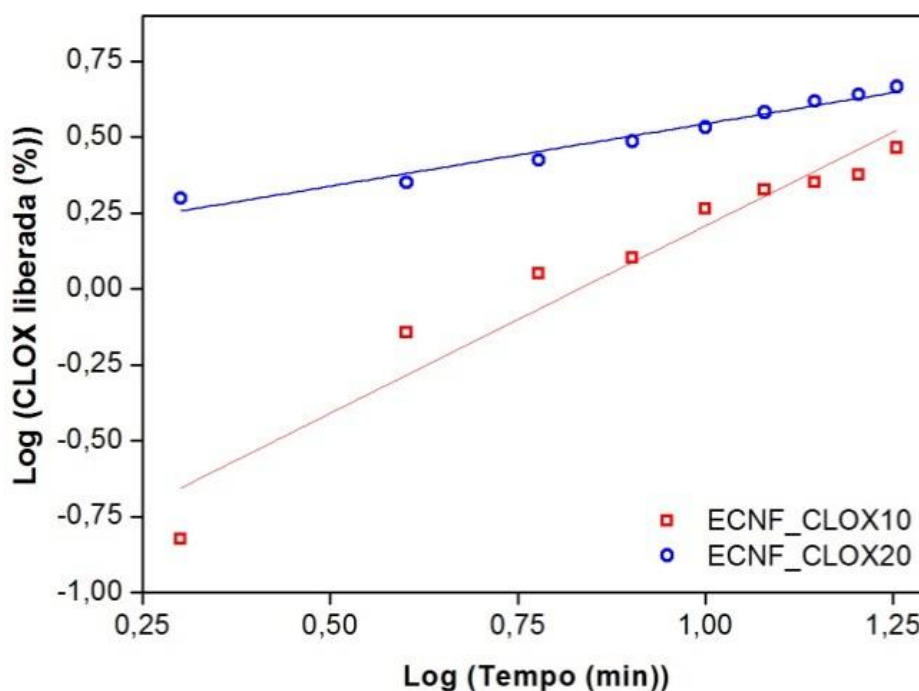


FIGURA 5.21 - Gráfico linearizado segundo modelo de Korsmeyer-Peppas para liberação de Cloxacilina a partir de ECNF_CLOX20 em meio ácido.

TABELA 5.5 - Parâmetros cinéticos obtidos do perfil de liberação da Cloxacilina a partir ECNF_CLOX20 em meio pH 5,5 para os modelos cinéticos de Korsmeyer-Peppas, Hixson-Crowel e Higuchi.

Korsmeyer-Peppas				
Amostra	k	n	R²	Mecanismo
ECNF_CLOX10	1,02	1,23	0,93	Não-Fickiano (Super Caso II)
ECNF_CLOX20	0,13	0,41	0,96	Fickiano
Hixson-Crowel				
	a	K_{HC}	R²	
ECNF_CLOX10	0,99	5,36x10 ⁻⁴	0,97	Solubilidade
ECNF_CLOX20	0,99	5,87x10 ⁻⁴	0,99	Da droga
Higuchi				
	a	K_H	R²	
ECNF_CLOX10	-1,17	0,92	0,98	Difusão Fickiana
ECNF_CLOX20	0,36	0,99	0,98	n=0,5

A mudança do perfil de liberação e dos parâmetros da equação linearizada (n e k) em função do pH também foi observada na morfologia das fibras após a liberação. Na FIGURA 5.22 existe a visível formação de poros na superfície das fibras que podem ser atribuídas a saída da CLOX em meio neutro para a amostra ECNF_CLOX10. Nota-se ainda que a formação de poros ocorre muito rapidamente, pois, em apenas 2 minutos de imersão surgem poros, decorrentes principalmente da saída do fármaco próximo ao limiar da superfície. Após 15 minutos de imersão para a fibra ECNF_CLOX20 ocorreu um aumento no tamanho e na profundidade dos poros, indicando que a CLOX está também internamente distribuída (FIGURA 5.23).

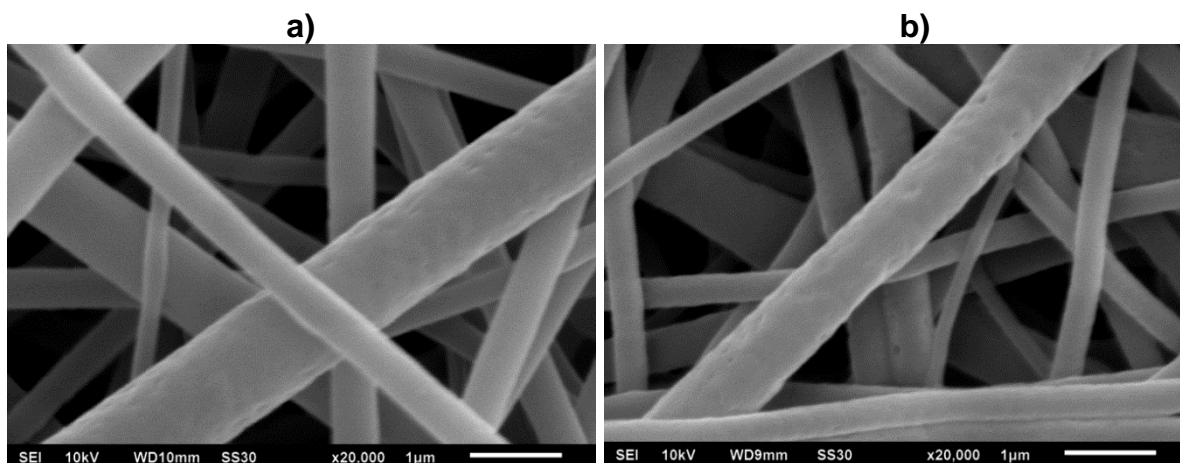


FIGURA 5.22 - Imagens de MEV para ECNF_CLOX10 a) Após 2 minutos e b) 15 minutos de imersão em meio pH 7,30 evidenciando a formação dos poros.

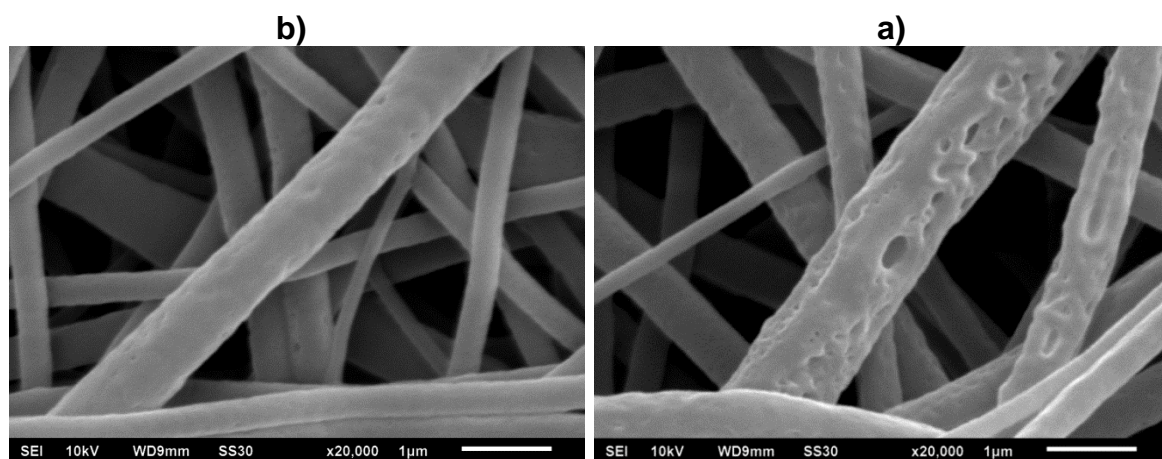


FIGURA 5.23 – Imagens de MEV para ECNF_CLOX20 a) Após 2 minutos e b) 15 minutos de imersão em meio pH 7,30 evidenciando a formação dos poros.

Os resultados das micrografias após imersão em meio ácido (FIGURA 5.24) para as fibras ECNF_CLOX20 praticamente não demonstraram poros de mesma geometria, profundidade e distribuição ao longo das fibras como a liberação em meio neutro. Esse resultado confirma que o meio ácido causa alteração no mecanismo, alterando a velocidade de difusão e o perfil de liberação como previsto

pelo modelo de Korsmeyer-Peppas. Existe uma diminuição no processo erosivo para liberação, uma vez que o meio ácido reteve a estrutura não porosa das fibras mostrada na Figura 5.3 (c), em contraste com erosão causada na fibra pela liberação em meio neutro mostrada na Figura 5.23.

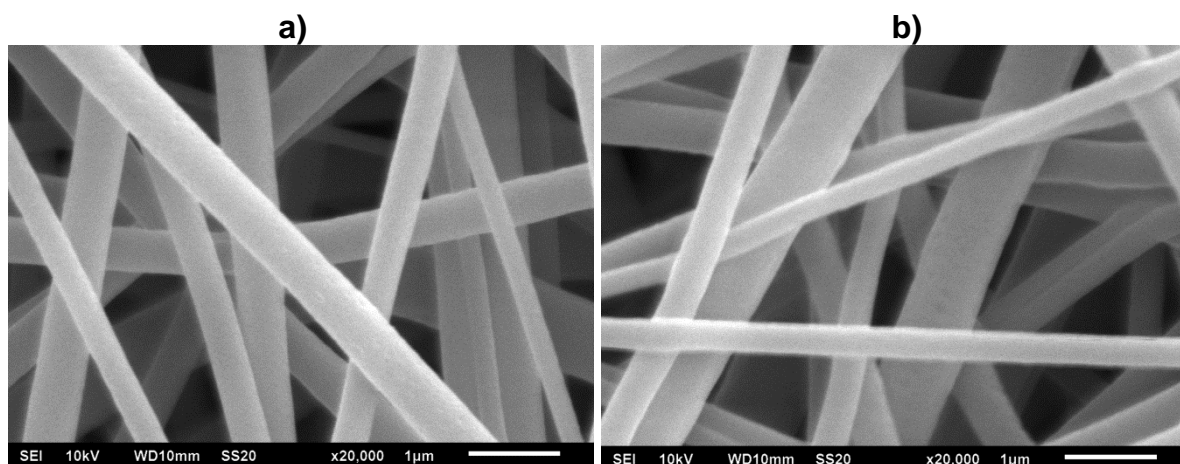


FIGURA 5.24 – Imagens de MEV para fibras ECNF_CLOX20 após imersão em meio ácido (pH 5,5). A) Após 2 minutos e B) 15 minutos de imersão

5.4 - Ensaio microbiológico

A prova de conceito da atividade antibacteriana das fibras contendo o antibiótico foi realizada observando a zona de inibição de crescimento da bactéria *S. aureus* cultivada em placa da Petri. Os discos da membrana de ECNF, sem fármaco, não mostram nenhuma zona de inibição de crescimento. Este resultado era previsto uma vez que a blenda não apresenta elevada toxicidade principalmente pela presença do PLA.

A atividade antimicrobiana das fibras com CLOX foi comprovada, como mostra FIGURA 5.25, na qual ocorreu um aumento da zona de inibição do crescimento da bactéria *S. aureus* com o aumento da concentração de CLOX nas fibras após 24 horas de incubação. ECNF-CLOX10 e ECNF-CLOX20 apresentam respectivamente 1,4 e 3,0 cm de zona de inibição de crescimento. Este resultado confirma que apesar da liberação em meio aquoso ocorrer rapidamente (até 1 hora) e a capacidade de encapsulamento ser baixa (40%), a concentração de antibiótico liberada a partir das fibras se encontra acima da concentração inibitória mínima, o que evita o crescimento das bactérias.

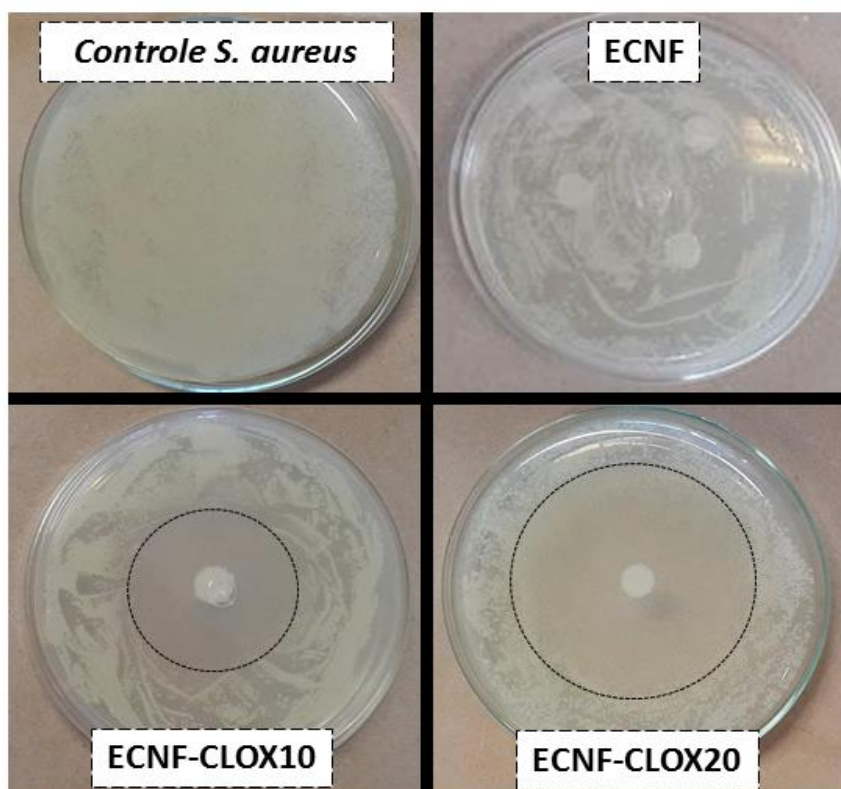


FIGURA 5.25 - Zona de inibição de crescimento da bactéria *S. aureus* para amostras ECNF, ECNF_CLOX10 e ECNF_CLOX20.

Outro ensaio microbiológico realizado foi o teste com uma membrana que havia sido submetida a liberação. Assim, após o período de liberação em meio aquoso pH 7,30 a membrana foi lavada e seca. No dia seguinte foi realizado o teste de crescimento idêntico ao anterior. O resultado mostrou que a fibra após a liberação não inibe o crescimento da bactéria *S. aureus*. Isso indica que após a difusão do fármaco a fibra permite a proliferação de bactérias sem causar a inibição, por não mais possuir atividade antibacteriana. Esta mesma amostra de fibra citada, foi metalizada e a morfologia foi observada no microscópio. O resultado dessa micrografia pode ser visualizado na FIGURA 5.26, em que podemos observar que após a liberação do antibiótico formaram-se os poros decorrentes da difusão e com a perda da atividade antimicrobiana existe a proliferação de bactérias na superfície das fibras.

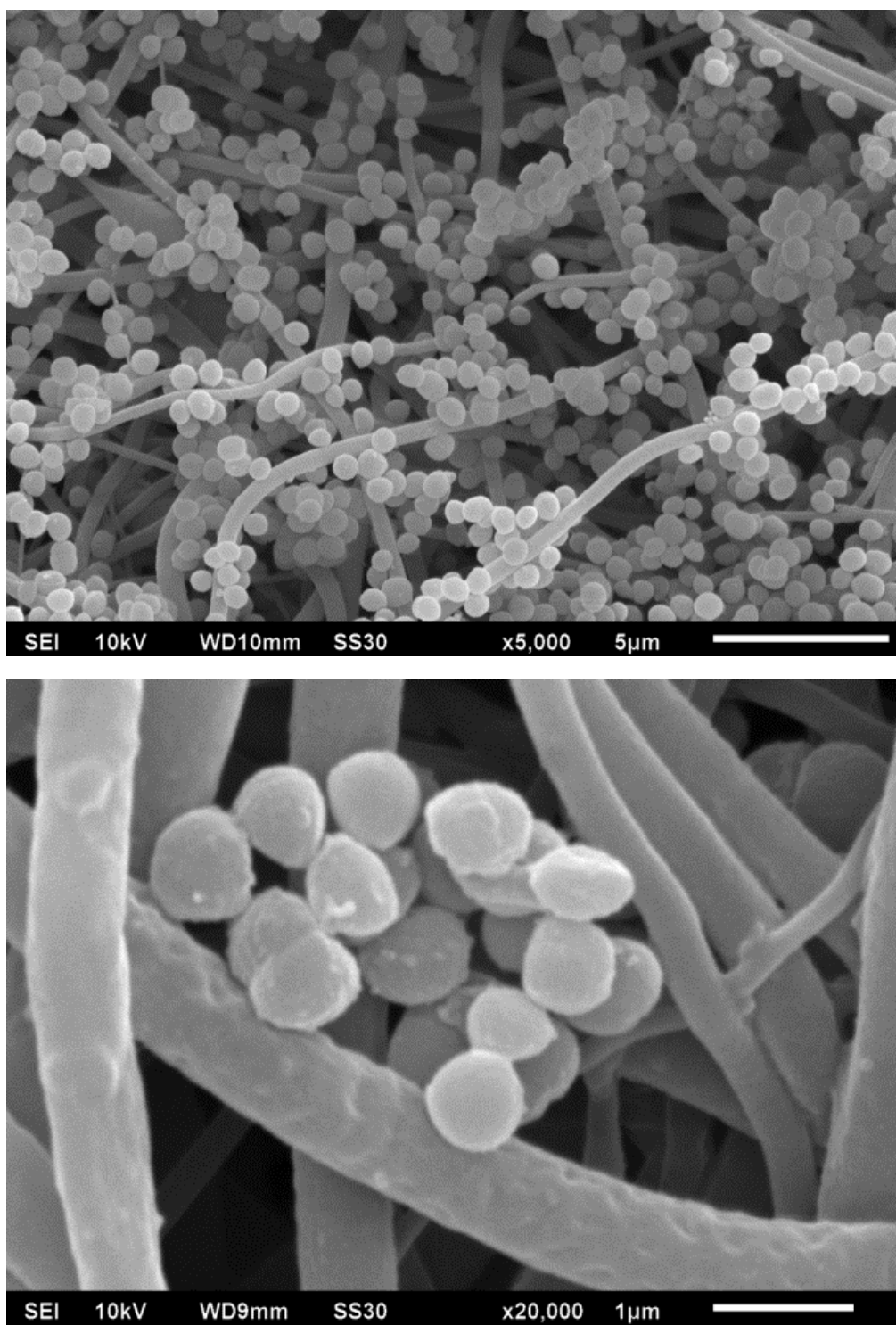


FIGURA 5.26 - Micrografias das fibras de ECNF após ensaio microbiológico da zona de inibição de crescimento de bactérias (superior). Inferior, micrografia ampliada da fibra indicando perda da atividade antimicrobiana e a presença dos poros da fibra ECNF_CLOX10 após ensaio após liberação.

6 - CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS

Neste trabalho foram desenvolvidas fibras poliméricas da blenda PBAT(poli(butileno adipato-co-tereftalato))/PLA (poli(ácido láctico)) - Ecovio[®] (BASF) - produzidas por eletrofiação, contendo o antibiótico Cloxacilina (CLOX) visando a obtenção de material com propriedades bactericidas. As fibras de composição otimizada apresentaram diâmetro de 600-700 nm. A adição do antibiótico cloxacilina não influenciou no diâmetro das fibras e nem na morfologia com relação à rugosidade e porosidade. As nanofibras da blenda PBAT/PLA com o antibiótico Cloxacilina apresentaram atividade antimicrobiana contra bactéria *S. aureus*, uma das bactérias causadoras da mastite bovina. Caracterizações dos grupos funcionais por FTIR indicam o encapsulamento do fármaco pelo deslocamento do número de onda de grupos funcionais do antibiótico (estiramentos das ligações C=O do anel β -lactâmico e ligação C-S). Análise térmica por TGA sugere a diminuição na estabilidade térmica e as curvas de DSC demonstram uma diminuição na cristalinidade do PLA em presença de cloxacilina. Neste sentido, pode-se inferir que o antibiótico interage mais fortemente com a fração láctica da blenda que com a fração do PBAT. A espectroscopia XPS revela uma distribuição do fármaco próximo ao limiar da superfície das fibras, confirmando o encapsulamento, corroborando com a rápida cinética de liberação observada em meio neutro (pH=7,30). O perfil de liberação em meio neutro apresenta um perfil de liberação que atinge o platô da liberação entre 20-30 minutos com capacidades máximas liberadas de 82% e 62% a depender da quantidade de droga. Ao contrário, quando cinética de liberação foi realizada em meio ácido (pH = 5,50) o perfil de liberação é sustentado por aproximadamente 3 horas, atingindo apenas 14% e 10% de sua capacidade de liberação neste período. Essa liberação sustentada pode estar associada a fatores como a solubilidade do antibiótico e a velocidade de difusão da água e do fármaco em função da concentração de íons hidrônio pela matriz polimérica. Em suma, os resultados obtidos indicam o potencial das nanofibras eletrofiadas contendo cloxacilina como plataformas bactericidas de liberação ajustável, para aplicação na medicina e na área veterinária.

Como perspectivas de trabalhos futuros existe a possibilidade do emprego de agentes de encapsulamento, utilizando excipientes, por exemplo, para prolongação da liberação e aumento da capacidade de encapsulamento do fármaco

nas fibras. A combinação da presente blenda, Ecovio, com outros polímeros para produção de fibras coaxiais também pode levar produção de sistemas inteligentes que possuam a capacidade de liberar o fármaco mediante estímulos externos e fisiológicos do próprio animal. Outras projeções de trabalhos futuros se encontram no encapsulamento de diferentes compostos, como fármacos anticâncer ou antitumorais, nanopartículas e extratos naturais para serem utilizados nos mais diversos tipos de tratamentos e enfermidades.

7 - PRODUÇÕES CIENTÍFICAS ASSOCIADAS AO TRABALHO

RESUMO PUBLICADO EM ANAIS DE CONGRESSO:

R. Schneider; D. S. Correa. "Estudo de parâmetros da eletrofição de polímero biodegradável e futuras aplicações em sistemas de liberação de fármaco". IX Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio, São Carlos – SP, 2017.

ARTIGO EM PERIÓDICO INDEXADO:

SCHNEIDER, R.; MERCANTE, L. A.; ANDRÉ, R. S.; LUIZ, H. C. MATTOSO; BRANDÃO, H. M.; CORREA, D. S. "Biocompatible electrospun nanofibers containing cloxacillin: antibacterial activity and effect of pH on the release profile". SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO.

CAPÍTULO DE LIVRO:

CORREA, D. S.; MERCANTE, L. A.; SCHNEIDER, R.; FACURE, M. H. M.; LOCILENTO, D. (2018) "Composite Nanofibers for Removing Water Pollutants: Fabrication Techniques." In: Martinez L., Kharissova O., Kharisov B. (eds.), Handbook of Biomaterials, Springer.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. HOMEM, V.; SANTOS, L. "Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices - A review". *Journal of Environmental Management*, 92 (10) : 2304, 2011.
2. HIRSCH, R.; TERNES, T.; HABERER, K.; KRATZ, K. L. "Occurrence of antibiotics in the aquatic environment" *Science of the Total Environment*, 225 (1–2) : 109, 1999.
3. GOBEL, A.; MCARDELL, C. S.; JOSS, A.; SIEGRIST, H.; GIGER, W. "Fate of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in different wastewater treatment technologies" *Science of the Total Environment*, 372(2–3) : 361, 2007.
4. ANVISA. Plano Nacional para a Prevenção e o Controle da Resistência Microbiana nos Serviços de Saúde. <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/271855/Plano+Nacional+para+a+Pre-venção+e+o+Controle+da+Resistência+Microbiana+nos+Serviços+de+Saúde/9d9f63f3-592b-4fe1-8ff2-e035fcc0f31d>. Published 2017. Acessado janeiro 23, 2018.
5. ANVISA. Lista de antimicrobianos registrados. 2014. http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/rdc0068_28_11_2014.pdf/729224fa-b118-4288-8fe9-64d444274ce7. Acessado fevereiro 2, 2018.
6. CINQUINA, A. L.; LONGO, F.; ANASTASI, G.; GIANNETTI, L.; COZZANI, R. "Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle" *Journal of Chromatography A*, 987(1–2) : 227, 2003.
7. ZENG, S.; BAILLARGEAT, D.; HO, H-P.; YONG, K-T. "Nanomaterials enhanced surface plasmon resonance for biological and chemical sensing applications" *Chemical Society Reviews*, 43 (10) : 3426, 2014.
8. LIU, S.; ZONG, J.; WEI, Z.; ZHANG, H.; BAI, L.; LIU, H.; YAN, H. "Determination of trace macrolide antibiotics in milk with online solid-phase extraction with an ionic-liquid-based monolithic column" *Journal of Applied Polymer Science*, 133(39):1, 2016.
9. BURMANCZUK, A.; GRABOWSKI, T.; OSYPIUK, M.; POLSKA, B.; KOWALSKI, C. "Determination of cloxacillin residues in dairy cows after intramammary administration" *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 40 (5), 2017.
10. MARTINI, C. L.; LANGE, C. C.; BRITO, M. A.; RIBEIRO, J. B.; MENDONÇA, L. C.; VAZ, E. K. "Characterisation of penicillin and tetracycline resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk samples in Minas Gerais, Brazil" *Journal of Dairy Research*, 84:202, 2017.
11. CHANG, Q.; WANG, W.; REGEV-YOCHAY, G.; LIPSITCH, M.; HANAGE, W. P. "Antibiotics in agriculture and the risk to human health: How worried should

- we be?" *Evolutionary Applications*, 8(3) : 240, 2015.
12. VAN BOECKEL, T. P.; BROWER, C.; GILBERT, M.; GRENFELL, B. T.; LEVIN, S. A.; ROBINSON, T. P.; TEILLANT, A.; LAXMINARAYAN, R. "Global trends in antimicrobial use in food animals" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(18) : 5649, 2015.
 13. OLIVEIRA, M. C. S. "*Doenças infecciosas em sistemas intensivos de produção de leite*. São Carlos - SP": EMBRAPA; 2006. Disponível em: <http://www.cppse.embrapa.br/sites/default/files/principal/publicacao/Documento s50.pdf>.
 14. BRANDINI, J. C. "*Doenças em bovinos confinados*. Campo Grande - MS: EMBRAPA" 1996. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/316986/doencas-em-bovinos-confinados>.
 15. BRANDI, I. V.; SANTOS, E. M. S.; CARVALHO, B. M. A.; DURÃES, C. A. F.; FARIAS, P. K. S.; SARI, R. S.; CANGUSSU, A. S. R.; PESSOA A. "Total combining power: Technique for the evaluation of the quality control process of clostridiosis vaccines" *Journal of Microbiological Methods*, 130:164, 2016.
 16. MAGONBEDZE, G.; SHIRI, T.; EDA, S.; STABEL, J. R. "Inferring biomarkers for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection and disease progression in cattle using experimental data" *Scientific Reports*, 7, 2017.
 17. SWEENEY, R. W.; COLLINS, M. T.; KOETS, A. P.; MCGUIRK, S. M.; ROUSSEL, A. J. "Paratuberculosis (Johne's Disease) in Cattle and Other Susceptible Species" *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 26(6) : 1239 2012.
 18. BAYM, M.; LIEBMAN, T. D.; KELSIC, E. D.; CHAIT, R.; GROSS, R.; YELIN, Y.; KISHONY, R. "Spatiotemporal microbial evolution on antibiotic landscapes" *Science*, 353(6304) : 1147, 2016.
 19. SZAFRANIEC, J.; BLAZEJCZYK, A.; KUS, E.; JANIK, M.; ZAJAC, Z.; WIETRZYK, J.; CHLOPICKI, S.; ZAPOTOCZNY, S. "Robust oil-core nanocapsules with hyaluronate-based shells as promising nanovehicles for lipophilic compounds" *Nanoscale*, 9(47), 2017.
 20. RIBEIRO, J. C.; RIBEIRO, W. L. C.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; MACEDO, I. T. F.; SANTOS, J. M. L.; PAULA, H. C. B.; MAGALHÃES, R. D.; BEVILAQUA, C. M. L. "Efficacy of free and nanoencapsulated *Eucalyptus citriodora* essential oils on sheep gastrointestinal nematodes and toxicity for mice" *Veterinary parasitology*, 204(3–4) : 243, 2014.
 21. BRISTOL, A.; HUBERT, S.; HOFMANN, F.; BAER, H. "Formulation development of SYN-004 (ribaxamase) oral solid dosage form, a β -lactamase to prevent intravenous antibiotic-associated dysbiosis of the colon" *International Journal of Pharmaceutics*, 534(1–2):25, 2017.
 22. OGIENKO, A. G.; BOGDANOVA, E. G.; TROFIMOV, N. A.; MYZ, S. A.; OGIENKO, A. A.; KOLESOV, B. A.; YUNOSHEV, A. S.; ZUBIKOV, N. V.; MANAKOV, A. Y.; BOLDYREV, V. V.; BOLDYREVA, E. V. "Large porous particles for respiratory drug delivery. Glycine-based formulations" *European*

- Journal of Pharmaceutical Sciences*, 110 : 148, 2017.
23. PRICE, D. N.; STROMBERG, L. R.; KUNDA, N. K.; MUTTIL, P. "In Vivo Pulmonary delivery and magnetic-targeting of dry powder nano-in-microparticles" *Molecular Pharmaceutics*, 14(12) : 4741, 2017.
 24. PORTO, I. C. C. M. "Polymer Biocompatibility". In: *Polymerization*. InTech; 2012.
 25. VISHAKHA, K.; KISHOR, B.; SUDHA, R. "Natural Polymers - A comprehensive Review" *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 3(4) : 1597, 2012.
 26. LAFOUNTAIN, J.S.; PRASAD, L. K.; MILLER, D. A.; MCGINITY, J. W.; WILLIAMS, R. O. "Mucoadhesive amorphous solid dispersions for sustained release of poorly water soluble drugs" *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 113:157, 2017.
 27. MAISEL, K.; REDDY, M.; XU, Q.; CHATTOPADHYAY, S.; CONE, R.; ENSIGN, L. M.; HANES, J. "Nanoparticles coated with high molecular weight PEG penetrate mucus and provide uniform vaginal and colorectal distribution *in vivo*" *Nanomedicine*, 11(11) : 1337, 2016.
 28. XIE, J.; LI, A.; LI, J. "Advances in pH-Sensitive Polymers for Smart Insulin Delivery" *Macromolecular Rapid Communications*, 38(23), 2017.
 29. MURUGESAN, B.; SONAMUTHU, J.; SAMAYANAN, S.; ARUMUGAM, S.; MAHALINGAM, S. "Highly biological active antibiofilm, anticancer and osteoblast adhesion efficacy from MWCNT/PPy/Pd nanocomposite" *Applied Surface Science*, 434 : 400, 2018.
 30. RAVICHANDRAN, R.; VENUGOPAL, J. R.; SUNDARRAJAN, S.; MUKHERJEE, S.; SRIDHAR, R.; RAMAKRISHNA, S. "Minimally invasive injectable short nanofibers of poly(glycerol sebacate) for cardiac tissue engineering" *Nanotechnology*, 23(38), 2012.
 31. GAO, L.; SUN, Q.; WANG, Y.; ZHU, W.; LI, X.; LUO, Q.; LI, X.; SHEN, Z. "Injectable poly(ethylene glycol) hydrogels for sustained doxorubicin release" *Polymers for Advanced Technologies*, 28(1) : 35, 2017.
 32. SHAH, S. S.; CHA, Y.; PITT, C. G. "Poly (glycolic acid-co-dl-lactic acid): diffusion or degradation controlled drug delivery?" *Journal of Controlled Release*, 18(3) : 261, 1992.
 33. SUWANTONG, O.; OPANASOPIT, P.; RUKTANONCHAI, U.; SUPAPHOL, P. "Electrospun cellulose acetate fiber mats containing curcumin and release characteristic of the herbal substance" *Polymer*, 48: 7546, 2007.
 34. MONTEIRO, A . P. F.; ROCHA, C. M. S. L.; OLIVEIRA, M. F.; CONTIJO, S. M. L.; AGUDELO, R. R.; SINISTERRA, R. D.; CORTÉS, M. E. "Nanofibers containing tetracycline/ β -cyclodextrin: Physico-chemical characterization and antimicrobial evaluation" *Carbohydrate Polymers*, 156 : 417, 2017.
 35. CHENG, M.; QIN, Z.; HU, S.; DONG, S.; REN, Z.; YU, H. "Achieving Long term sustained drug delivery for electrospun biopolyester nanofibrous membranes

- by introducing cellulose nanocrystals, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2017.
36. HOU, L.; FANG, J.; WANG, W.; XIE, Z.; DONG, D.; ZHANG, N. "Indocyanine green-functionalized bottle brushes of poly(2-oxazoline) on cellulose nanocrystals for photothermal cancer therapy" *J. Materials Chemistry B.*, 5(18) : 3348, 2017.
 37. DJEKIC, L.; JANKOVIC, J.; ČALIJA, B.; PRIMORAC, M. "Development of semisolid self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDSs) filled in hard capsules for oral delivery of aciclovir" *International Journal of Pharmaceutics*, 528(1–2) : 372, 2017.
 38. ESMAEILI, A.; BEHZADI, S. "Performance comparison of two herbal and industrial medicines using nanoparticles with a starch/cellulose shell and alginate core for drug delivery: In vitro studies" *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 158 : 556, 2017.
 39. VOON, L. K.; PANG, S. C.; CHIN, S. F. "Optimizing delivery characteristics of curcumin as a model drug via tailoring mean diameter ranges of cellulose beads" *International Journal of Polymer Science*, 2017.
 40. SOSNIK, A. "Alginate Particles as Platform for Drug Delivery by the Oral Route: State-of-the-Art" *ISRN pharmaceutics*, 2014.
 41. SZEKALSKA, M.; PUCILOWSKA, A.; SZYMANSKA, E.; CIOSEK, P.; WINNICKA, K. "Alginate: Current Use and Future Perspectives in Pharmaceutical and Biomedical Applications" *International Journal of Polymer Science*, 2016.
 42. AKALA, E. O.; WIRIYACOOKASEM, P.; PAN, G. "Studies on in vitro availability, degradation, and thermal properties of naltrexone-loaded biodegradable microspheres" *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 37(6) : 673, 2011.
 43. UCHECHI, O.; OGBONNA, J. D. N.; ATTAMA, A. A. "Nanoparticles for dermal and transdermal drug delivery" IN: *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*. SEZER, A. D. (Ed.). Londres, InTech, 2014.
 44. JIANG, L.; WOLCOTT, M. P.; ZHANG, J. "Study of biodegradable polylactide / poly(butylene adipate-co-terephthalate) blends" *Biomacromolecules*, 7 : 199, 2006.
 45. DÍEZ-PASCUAL, A. M.; DÍEZ-VICENTE, A. L. "Antimicrobial and sustainable food packaging based on poly(butylene adipate-co-terephthalate) and electrospun chitosan nanofibers" *RSC Advances*, 5 : 93095, 2015.
 46. CASTRO, J. G.; RODRIGUES, B. V. M.; RICCI, R.; COSTA, M. M.; RIBEIRO, A. F. C.; MARCIANO, F. R.; LOBO, A. O. "Designing a novel nanocomposite for bone tissue engineering using electrospun conductive PBAT/polypyrrole as a scaffold to direct nanohydroxyapatite electrodeposition" *RSC Advances*, 6(39) : 32615, 2016.
 47. ZHAO, P.; LIU, W.; WU, Q.; REN, J. "Preparation, mechanical, and thermal properties of biodegradable polyesters/poly(lactic acid) blends" *Journal of*

Nanomaterials, 2010.

48. PAN, H.; HAO, Y.; ZHAO, Y.; LANG, X.; ZHANG, Y.; WANG, Z.; ZHANG, H.; DONG, L. "Improved mechanical properties, barrier properties and degradation behavior of poly(butylenes adipate-co-terephthalate)/poly(propylene carbonate) films" *Korean Journal of Chemical Engineering*, 34(5) : 1294, 2017.
49. REN, P. G.; LIU, X. H.; REN, F.; ZHONG, G. J.; JI, X.; XU, L. "Biodegradable graphene oxide nanosheets/poly-(butylene adipate-co-terephthalate) nanocomposite film with enhanced gas and water vapor barrier properties" *Polymer Testing*, 58:173, 2017.
50. KASHI, S.; GUPTA, R. K.; KAO, N.; BHATTACHARYA, S. N. "Electrical, thermal, and viscoelastic properties of graphene nanoplatelet/poly(butylene adipate-co-terephthalate) biodegradable nanocomposites" *Journal of Applied Polymer Science*, 133(27) : 1, 2016.
51. OYAMA, H. T.; TANAKA, Y.; HIRAI, S.; SHIDA, S.; KADOSAKA, A. "Water-disintegrative and biodegradable blends containing poly(L-lactic acid) and poly(butylene adipate-co-terephthalate)" *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics*, 49(5) : 342, 2011.
52. KIJCHAVENGKUL, T.; AURAS, R.; RUBINO, M.; SELKE, S.; NGOUAJIO, M.; FERNANDEZ, R. T. "Biodegradation and hydrolysis rate of aliphatic aromatic polyester" *Polymer Degradation and Stability*, 95(12) : 2641, 2010.
53. PALSIKOWSKI, P. A.; ROBERTO, M. M.; SOMMAGGIO, L. R. D.; SOUZA, P. M. S.; MORALES, A. R.; MARIN-MORALES, M. A. "Ecotoxicity evaluation of the biodegradable polymers PLA, PBAT and its blends using allium cepa as test organism" *Journal of Polymers and the Environment*, 1, 2017.
54. ARSLAN, A.; ÇAKMAK, S.; CENGİZ, A.; GUMUSDERELIOĞLU, M. "Poly(butylene adipate-co-terephthalate) scaffolds: processing, structural characteristics and cellular responses" *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 27(18) : 1841, 2016.
55. AL-ITRY, R.; LAMNAWAR, K.; MAAZOUZ, A. "Improvement of thermal stability, rheological and mechanical properties of PLA, PBAT and their blends by reactive extrusion with functionalized epoxy" *Polymer Degradation and Stability*, 97(10):1898, 2012.
56. DIL, E. J.; CARREAU, P. J.; FAVIS, B. D. "Morphology, miscibility and continuity development in poly(lactic acid)/poly(butylene adipate-co-terephthalate) blends" *Polymer (United Kingdom)*, 68:202, 2015.
57. FUKUSHIMA, K.; RASYIDA, A.; YANG, M. C. "Characterization, degradation and biocompatibility of PBAT based nanocomposites" *Applied Clay Science*, 80–81:291, 2013.
58. WENG, Y. X.; JIN, Y. J.; MENG, Q. Y.; WANG, L.; ZHANG, M.; WANG, Y. Z. "Biodegradation behavior of poly (butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT), poly (lactic acid) (PLA), and their blend under soil conditions" *Polymer Testing*, 32:918, 2013.
59. WONG, P. T.; CHOI, S. K. "Mechanisms of Drug Release in Nanotherapeutic

- Delivery Systems" *Chemical Reviews*, 115(9) : 3388, 2015.
60. LAVIELLE, N.; HÉBRAUD, A.; THONY-MEYER, L.; ROSSI, R. M.; SCHLATTER, G. "3D Composite Assemblies of Microparticles and Nanofibers for Tailored Wettability and Controlled Drug Delivery" *Macromolecular Materials and Engineering*, 302(8), 2017.
 61. HE, C. W.; PAROWATKIN, M.; MAILANDER, V.; FLECHTNER-MORS, M.; ZIENER, U.; LANDFESTER, K.; CRESPIY, D. "Sequence-controlled delivery of peptides from hierarchically structured nanomaterials" *ACS Applied Materials and Interfaces*, 9(4) : 3885, 2017.
 62. MERCANTE, L. A.; SCAGION, V. P.; MIGLIORINI, F. L.; MATTOSO, L. H. C.; CORREA, D. S. "Electrospinning-based (bio)sensors for food and agricultural applications: A review" *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 91:91, 2017.
 63. WANG, J.; ZHAO, W.; WANG, B.; PEI, G.; LI, C. "Multilevel-layer-structured polyamide 6/poly(trimethylene terephthalate) nanofibrous membranes for low-pressure air filtration" *Journal of Applied Polymer Science*, 134(16) : 1, 2017.
 64. HU, M.; KANG, W.; LI, Z.; JIE, S.; ZHAO, Y.; LI, L.; CHENG, B. "Zinc(II)porphyrin-poly(lactic acid) nanoporous fiber membrane for ammonia gas detection" *Journal of Porous Materials*, 23(4) : 911, 2016.
 65. HUANG, Y.; LO, T.; CHEN, C.; WU, K.; LIN, C.; WHANG, W. "Chemical electrospinning of magnesium-ion linked binder-less PEDOT : PSS nanofibers for sensing organic gases" *Sensors and Actuators B*, 216:603, 2015.
 66. PAUL, K. B.; SINGH, V.; VANJARI, S. R. K.; SINGH, S. G. "One step biofunctionalized electrospun multiwalled carbon nanotubes embedded zinc oxide nanowire interface for highly sensitive detection of carcinoma antigen-125" *Biosensors and Bioelectronics*, 88:144, 2017.
 67. ZHONG, Y.; QIU, X.; CHEN, D.; LI, N.; XU, Q.; LI, H.; HE, J.; LU, J. "Flexible electrospun carbon nanofiber/Tin(IV) sulfide coresheath membranes for photocatalytically treating chromium(VI)-containing wastewater" *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(42):28671, 2016.
 68. MOHAMED, A.; OSMAN, T. A.; TOPRAK, M. S.; MUHAMMED, M.; YILMAZ, E.; UHEIDA, A. "Visible light photocatalytic reduction of Cr(VI) by surface modified CNT/titanium dioxide composites nanofibers" *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 424:45, 2016.
 69. LIU, Y.; MA, Q.; YANG, M.; DONG, X.; YANG, Y.; WANG, J.; YU, W.; LIU, G. "Flexible hollow nanofibers: Novel one-pot electrospinning construction, structure and tunable luminescence-electricity-magnetism trifunctionality" *Chemical Engineering Journal*, 284:831, 2016.
 70. TAYLOR, G. I. "Electrically Driven Jets" *Proceedings of the Royal Society of London Series A, Mathematical and Physical Sciences*, 313(1515) : 453, 1969.
 71. KOWALEWSKI, T. A.; BLONSKI, S.; BARRAL, S. "Experiments and modelling of electrospinning process" *Bulletin of the Polish Academy of Sciences: Technical Sciences*, 53(4) : 385–394, 2005.

72. CORREA, D. S.; MERCANTE, L. A.; SSCHNEIDER, R.; FACURE, M. H. M.; LOCILENTO, D. "Composite Nanofibers for Removing Water Pollutants: Fabrication Techniques" In: *Handbook of Ecomaterials*. Springer. MARTÍNEZ, L.; KHARISSOVA, O.; KHARISOV, B. (Eds.). 2018.
73. ABDURIZZAGH, K.; SUNDARARAJAN, V. M. "Modeling the permeability of multiaxial electrospun poly(ϵ -caprolactone)-gelatin hybrid fibers for controlled doxycycline release" *Materials Science and Engineering: C.*, 76:161, 2017.
74. GUO, Z.; TANG, G.; ZHOU, Y.; SHUWU, L.; HOU, H.; CHEN, Z.; CHEN, J.; HU, C.; WANG, F.; SMEDT, S. C.; XIONG, R.; HUANG, C. "Fabrication of Sustained-release CA-PU Coaxial Electrospun Fiber Membranes for Plant Grafting Application" *Carbohydrate Polymers*, 169:198, 2017.
75. XU, Y.; LI, J. J.; YU, D. G.; WILLIAMS, G. R.; YANG, J. H.; WANG, X. "Influence of the drug distribution in electrospun gliadin fibers on drug-release behavior" *European Journal of Pharmaceutical Sciences.*, 106 : 422, 2017.
76. POORMINA, B.; KORRAPATI, P. S. "Fabrication of chitosan-polycaprolactone composite nanofibrous scaffold for simultaneous delivery of ferulic acid and resveratrol" *Carbohydrate Polymers*, 157 : 1741, 2017.
77. YU, D. G.; YU, J. H.; CHEN, L.; WILLIAMS, G. R.; WANG, X. "Modified coaxial electrospinning for the preparation of high-quality ketoprofen-loaded cellulose acetate nanofibers" *Carbohydrate Polymers*, 90(2) : 1016, 2012.
78. YU, D. G.; LI, X. Y.; WANG, X.; YANG, J. H.; BLIGH, S. W. A.; WILLIAMS, G. R. "Nanofibers Fabricated Using Triaxial Electrospinning as Zero Order Drug Delivery Systems" *ACS Applied Materials and Interfaces*, 7(33) : 18891, 2015.
79. KHALF, A.; SINGARAPU, K.; MADIHALLY, S. V. "Influence of solvent characteristics in triaxial electrospun fiber formation" *Reactive and Functional Polymers*, 90:36, 2015.
80. SHI, Y.; LI, Y.; WU, J.; WANG, W.; DONG, A.; ZHANG, J. "A novel transdermal drug delivery system based on self-adhesive Janus nanofibrous film with high breathability and monodirectional water-penetration" *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 25(7) : 713, 2014.
81. ROH, K. H.; YOSHIDA, M.; LAHANN, J. "Compartmentalized, multiphase nanocolloids with potential applications in drug delivery and biomedical imaging" *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*, 38(12) : 1008, 2007.
82. SOHRABI, A.; SHAIBANI, P. M.; ETAYASH, H.; KAUR, K.; THUNDAT, T. "Sustained drug release and antibacterial activity of ampicillin incorporated poly(methyl methacrylate)-nylon6 core/shell nanofibers" *Polymer (United Kingdom)*, 54(11) : 2699, 2013.
83. HE, M.; JIANG, H.; WANG, R.; XIE, Y.; ZHAO, C. "Fabrication of metronidazole loaded poly (ϵ -caprolactone)/zein core/shell nanofiber membranes via coaxial electrospinning for guided tissue regeneration" *Journal of Colloid and Interface Science*, 490:270, 2017.
84. KENAWY, E-R.; BOWLIN, G. L.; MANSFIELD, K.; LAYMAN, J.; SIMPSON, D. G.; SANDERS, E. H.; WNEK, G. E. "Release of tetracycline hydrochloride from

- electrospun poly(ethylene-co-vinylacetate), poly(lactic acid), and a blend" *Journal of Controlled Release*, 81(1–2) : 57, 2002.
85. HAROOSH, H. J.; DONG, Y.; LAU, K. T. "Tetracycline hydrochloride (TCH)-loaded drug carrier based on PLA:PCL nanofibre mats: Experimental characterisation and release kinetics modelling" *Journal of Materials Science*, 49(18) : 6270, 2014.
 86. SIAFAKA, P. I.; BARMBALEXIS, P.; BIKIARIS, D. N. "Novel electrospun nanofibrous matrices prepared from poly (lactic acid)/poly (butylene adipate) blends for controlled release formulations of an anti-rheumatoid agent" *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88:12, 2016.
 87. CARSON, D.; JIANG, Y.; WOODROW, K. A. "Tunable Release of Multiclass Anti-HIV Drugs that are Water-Soluble and Loaded at High Drug Content in Polyester Blended Electrospun Fibers" *Pharmaceutical Research*, 33(1) : 125, 2016.
 88. ARAÚJO, E. S.; NASCIMENTO, M. L. F.; OLIVEIRA, H. P. "Electrospinning of polymeric fibres: An unconventional view on the influence of surface tension on fibre diameter" *Fibres and Textiles in Eastern Europe*, 24(1) : 22, 2016.
 89. SADREARHAMI, Z.; MORSHED, M.; VARSHOSAZ, J. "Production and evaluation of polyblend of agar and polyacrylonitrile nanofibers for in vitro release of methotrexate in cancer therapy. *Fibers and Polymers*, 16(2) : 254, 2015.
 90. BARRIENTOS, I. J. H.; PALADINO, E.; BROZIO, S.; PASSARALLI, M. K.; MOUG, S.; BLACK, R. A.; WILSON, C. G.; LAMPROU, D. A. "Fabrication and characterisation of drug-loaded electrospun polymeric nanofibers for controlled release in hernia repair" *International Journal of Pharmaceutics*, 517(1–2) : 329, 2017.
 91. WRIGHT, M. E.; PARRAG, I. C.; YANG, M.; SANTERRE, J. P. "Electrospun polyurethane nanofiber scaffolds with ciprofloxacin oligomer versus free ciprofloxacin: Effect on drug release and cell attachment" *Journal of Controlled Release*, 250:107, 2017.
 92. UNNITHAN, A. R.; SASIKALA, A. R. K.; MURUGESAN, P.; GURUSAMY, M.; WU, D.; PARK, C. H.; KIM, C. S. "Electrospun polyurethane-dextran nanofiber mats loaded with Estradiol for post-menopausal wound dressing" *International Journal of Biological Macromolecules*, 77:1, 2015.
 93. RAHMA, A.; MUNIR, M. M.; KHAIRURRIJAL, P. A.; SUENDO, V.; RACHMAWATI, H. "Intermolecular interactions and the release pattern of electrospun curcumin-polyvinylpyrrolidone) fiber. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 39(2) : 163, 2016.
 94. ROLLIN, E.; DHUYVETTER, K. C.; OVERTON, M. W. "The cost of clinical mastitis in the first 30 days of lactation: An economic modeling tool" *Preventive Veterinary Medicine*, 122(3):257, 2015.
 95. DEB, R.; KUMAR, A.; CHAKRABORTY, S.; VERMA, A. K.; TIWARI, R.; DHAMA, K.; SINGH, U.; KUMAR, S. "Trends in diagnosis and control of bovine

- mastitis: a review" *Pakistan journal of biological sciences : PJBS.*, 16(23):1653, 2013.
96. ECDC. Summary of the latest data on antibiotic consumption in the European Union. <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/antibiotics-consumption-EU-data-2014.pdf>. Acessado fevereiro 2, 2018.
 97. LI, J.; WANG, Z.; BAO, Y.; WANG, J. "Solid-Liquid Phase Equilibrium and Mixing Properties of Cloxacillin Benzathine in Pure and Mixed Solvents" *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 52:3019, 2013.
 98. WRAIGHT, M. D. "A comparative efficacy trial between cefuroxime and cloxacillin as intramammary treatments for clinical mastitis in lactating cows on commercial dairy farms" *New Zealand Veterinary Journal*, 51, 26, 2003.
 99. BALAURE, P. C.; POPA, R. A.; GRUMEZESCU, A. M.; VOICU, G.; RADULESCU, M.; MOGOANTA, L.; BALSEANU, T.; MOGOSANU, G. D.; CHIFIRIUC, M. C.; BLEUTU, C.; HOLBAN, A. M.; BOLOCAN, A. "Biocompatible hybrid silica nanobiocomposites for the efficient delivery of anti-staphylococcal drugs" *International Journal of Pharmaceutics.*, 510(2) : 532, 2016.
 100. KHANAL, A.; NAKASHIMA, K. "Incorporation and release of cloxacillin sodium in micelles of poly(styrene-b-2-vinyl pyridine-b-ethylene oxide)" *Journal of Controlled Release*, 108(1):150, 2005.
 101. WENG, Y. X.; JIN, Y. J.; MENG, Q. Y.; WANG, L.; ZHANG, M.; WANG, Y. Z. "Biodegradation behavior of poly (butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT), poly (lactic acid) (PLA), and their blend under soil conditions.; 2013.
 102. MUTHURAJ, R.; MISRA, M.; MOHANTY, A. K. "Biodegradable biocomposites from poly(butylene adipate-co-terephthalate) and miscanthus: Preparation, compatibilization, and performance evaluation" *Journal of Applied Polymer Science*,134(43) : 1, 2017.
 103. ZEHETMEYER, G.; MEIRA, S. M. M.; SCHEIBEL, J. M.; SILVA, C. B.; RODEMBUSCH, F. S.; BRANDELLI, A.; SOARES, R. M. "Biodegradable and antimicrobial films based on poly(butylene adipate-co-terephthalate) electrospun fibers" *Polymer Bulletin*, 74(8) : 3243, 2017.
 104. WANG, L.; RHIM, J.; HONG, S. "Preparation of poly (lactide)/ poly (butylene adipate-co-terephthalate) blend films using a solvent casting method and their food packaging application" *LWT - Food Science and Technology*, 68:454, 2016.
 105. TONCHEVA, A.; PANEVA, D.; MAXIMOVA, V.; MANOLOVA, N.; RASHKOV, I. "Antibacterial fluoroquinolone antibiotic-containing fibrous materials from poly(l-lactide-co-d,l-lactide) prepared by electrospinning" *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 47(4) : 642, 2012.
 106. JAO, W-C., LIN, C-H.; HSIEH, J-Y.; YEH, Y-H.; LIU, C-Y.; YANG, M-C. "Effect of immobilization of polysaccharides on the biocompatibility of poly(butylene adipate-co-terephthalate) films" *Polym. Adv. Technol.*, 543, 2009.
 107. RODRIGUES, B. V. M.; SILVA, A. S.; MELO, G. F. S.; VASCONCELLOS, L.

- M. R.; MARCIANO, F. R.; LOBO, A. O. "Influence of low contents of superhydrophilic MWCNT on the properties and cell viability of electrospun poly (butylene adipate-co-terephthalate) fibers" *Materials Science and Engineering C*, 59 : 782, 2016.
108. CHAO, J-B.; MENG-DAN, X.; CAI-XAI, Y.; HUANG, S. "Synthesis of Zn(II)-cloxacillin sodium complex and study of its interaction with calf thymus DNA" *Biochemistry (Moscow)*, 72(2):153, 2006.
109. SEIF, S.; FRANZEN, L.; WINDBERGS, M. "Overcoming drug crystallization in electrospun fibers - Elucidating key parameters and developing strategies for drug delivery" *International Journal of Pharmaceutics*, 478(1) : 390, 2015.
110. SOFOKLEOUS, P.; STRIDE, E.; EDIRINSINGHE, M. "Preparation, characterization, and release of amoxicillin from electrospun fibrous wound dressing patches" *Pharmaceutical Research*, 30(7) : 1926, 2013.
111. ZEHETMEYER, G.; MEIRA, S. M. M.; SCHEIBEL, J. M.; OLIBEIRA, R. V. B.; BRANDELLI, A.; SOARES, R. M. D. "Influence of melt processing on biodegradable nisin-PBAT films intended for active food packaging applications" *Journal of Applied Polymer Science*, 133(13) : 1, 2016.
112. ACEITUNO-MEDINA, M.; MENDOZA, S.; RODRÍGUEZ, B. A.; LAGARON, J. M.; LÓPEZ-RUBINO, A. "Improved antioxidant capacity of quercetin and ferulic acid during in-vitro digestion through encapsulation within food-grade electrospun fibers" *Journal of Functional Foods*, 12:332, 2015.
113. GAMBLE, J. F.; TERADA, M.; HOLZNER, C.; LAVERY, L.; NICHOLSON, S. J.; TIMMINS, P.; TOBYN, M. "Application of X-ray microtomography for the characterisation of hollow polymer-stabilised spray dried amorphous dispersion particles" *International Journal of Pharmaceutics*, 510(1) : 1, 2016.
114. GUO, Z.; YIN, X.; LIU, C.; WU, L.; ZHU, W.; SHAO, Q.; YORK, P.; PATTERSON, L.; ZHANG, J. "Microstructural investigation using synchrotron radiation X-ray microtomography reveals taste-masking mechanism of acetaminophen microspheres" *International Journal of Pharmaceutics*, 499(1–2) : 47, 2016.
115. MONKARE, J.; PAJANDER, J.; HAKALA, R. A.; SAVOLAINEN, P.; JARVELAINEN, M.; KHORONEN, H.; SEPPALA, J. V.; JARVINEN, K. "Characterization of internal structure, polymer erosion and drug release mechanisms of biodegradable poly(ester anhydride)s by X-ray microtomography" *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 47(1) : 170, 2012.
116. LU, X.; ZHAO, J.; YANG, X.; XIAO, P. "Morphology and properties of biodegradable poly (lactic acid)/poly (butylene adipate-co-terephthalate) blends with different viscosity ratio" *Polymer Testing*, 60:58, 2017.
117. XIAO, H.; LU, W.; YEH, J. "Crystallization Behavior of Fully Biodegradable Poly (Lactic Acid)/ Poly (Butylene Adipate- co -Terephthalate) Blends" *Journal of Applied Polymer Science*, 112(6) : 3754, 2009.
118. JAO, W. C.; LIN, C. H.; HSIEH, J. Y.; YEH, Y. H.; LIU, C. Y.; YANG, M. C.

- "Effect of immobilization of polysaccharides on the biocompatibility of poly(butyleneadipate-co-terephthalate) films" *Polymers for Advanced Technologies*, 21(8) : 543, 2009.
119. WU, M.; KLEINER, L.; TANG, F-W.; HOSSAINY, S.; DAVIES, M. C.; ROBERTS, C. J. "Surface characterization of poly(lactic acid)/everolimus and poly(ethylene vinyl alcohol)/everolimus stents" *Drug Delivery.*, 17(6) : 376, 2010.
120. NAZARIN, K.; KONTOGIANNIDOU, E.; AHAMAD, R. H.; GRATSANI, A.; RASEKH, M.; ARSHAD, M. S.; SUNAR, B. S.; ARMITAGE, D.; BOUROPOULOS, N.; CHANG, M-W.; LI, X.; FATOURUS, D. G.; AHMAD, Z. "Development and characterisation of cellulose based electrospun mats for buccal delivery of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)" *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 102:147, 2017.
121. HIGUCHI, W. I. "Analysis of data on the medicament release from ointments" *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 51(8) : 802, 1962.
122. KORSMEYER, R. W.; PEPPAS, N. A. "Effect of the morphology of hydrophilic polymeric matrices on the diffusion and release of water soluble drugs" *Journal of Membrane Science*, 9(3) : 211, 1981.
123. HIXSON, A. W.; CROWELL, J. H. "Dependence of Reaction Velocity upon Surface and Agitation: III—Experimental Procedure in Study of Agitation" *Industrial and Engineering Chemistry*, 23(10) : 1160, 1931.
124. RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. "A simple equation for description of solute release I:FICKIAN AND NON-FICKIAN RELEASE FROM NON-SWELIABLE DEVICES IN THE FORM OF SLABS, SPHERES, CYLINDERS OR DISCS" *Journal of Controlled Release*, 5:23, 1987.
125. COSTA, P. L. J. "Modelling and Comparison of Dissolution Profiles. *European Journal of Pharmaceutical Science*, 13:123, 2001.
126. MALAKAR, J.; NAYAK, A. K.; PAL, D. "Development of cloxacillin loaded multiple-unit alginate-based floating system by emulsion-gelation method" *International Journal of Biological Macromolecules*, 50(1) : 138, 2012.
127. FREDENBERG, S.; WAHLGREN, M.; RESLOW, M.; AXELSON, A. "The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems--a review" *International journal of pharmaceuticals*, 415(1–2) : 34, 2011.