

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

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MANTAS DE NANOFIBRAS
POLIMÉRICAS ELETROFIADAS CONTENDO
PROANTOCIANIDINAS E SUA POTENCIAL APLICAÇÃO NO
TRATAMENTO DE LESÕES CUTÂNEAS**

Danilo André Locilento

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de
DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de
concentração: QUÍMICA GERAL.

Orientador: Daniel Souza Correa

São Carlos

2018



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 Tese de Doutorado do candidato Danilo André Locilento, realizada em 23/11/2018:

Prof. Dr. Daniel Souza Corrêa
EMBRAPA

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal
UFSCar

Profa. Dra. Rafaela Cristina Sanfelice
UFTM

Profa. Dra. Elaine Cristina Paris
EMBRAPA

Profa. Dra. Natália Mayumi Inada
IFSC/USP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Ana Frederica, minha companheira, por compartilhar comigo, ao longo destes 17 anos juntos, não só momentos de extrema felicidade como de profunda tristeza, mas também por sua inteligência, paciência e persistência, fundamentais e decisivos para que, juntos, pudéssemos chegar até aqui. Sempre faltarão palavras e dedicatórias para explicitar sua importância em minha vida. Você é minha inspiração. Amo você demais!

Às minhas queridas e amadas filhas, Ana Clara e Ana Luiza, que me ensinam e me fazem repensar a vida, diariamente. Vocês são tudo de melhor.

À minha mãe, Conceição, e ao meu pai, Arnaldo (in memoriam), que sempre apoiaram minhas decisões, por me ajudar em todos os momentos e principalmente pelo amor, dedicação e amparo dados a mim e a minha família.

“Sejamos o pesadelo daqueles que desejam roubar nossos sonhos.”

Che Guevara.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Daniel Souza Correa pela orientação, oportunidade, incentivo, amizade e por acreditar e confiar no meu trabalho.

Aos membros da banca pela disposição e contribuições

A todos os colegas de Grupo de pesquisa, com quem tive o prazer de conviver, que contribuíram para a realização deste trabalho.

Às Doutoradas Luiza Mercante e Rafaela Andre pela cooperação, incentivo, paciência e principalmente pela amizade e companheirismo construídos ao longo destes anos. Gratidão eterna a vocês.

À Profa. Dra. Fernanda Anibal do laboratório de inflamação e doenças infecciosas (LIDI) – Departamento de Morfologia e Patologia (DMP) – UFSCar, pela parceria e colaboração.

A todos os colaboradores e parceiros dos trabalhos desenvolvidos ao longo do doutorado. Em especial à Dra. Patrícia e Genoveva do Departamento de Morfologia e Patologia (DMP) – UFSCar, pela parceria e colaboração.

À Embrapa Instrumentação pela infraestrutura oferecida para o desenvolvimento deste trabalho. Em especial ao pessoal de suporte à pesquisa, Adriana, Viviane, Silviane, Joana, Matteo e Paulinho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de São Carlos (PPGQ – UFSCar), por toda estrutura oferecida.

Aos órgãos de fomento CNPq, FAPESP e SisNano.

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

LISTA DE ABREVIATURAS

Acet. – Acetona

AG – Ácido gálico

ALOE – Extrato seco de Aloe Vera (*Aloe barbadensis miller*)

DMF – *N,N*-Dimetilformamida

DPPH – 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl

F&C – Folin & Ciocalteu's

FTIR – Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

GC – Grupo controle

GSE – Extrato seco de semente de uva

HFF-1 – Fibroblasto de pele humana

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MNP – Manta de nanofibra polimérica

MTT – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

PBS – Tampão fosfato salino

PEO – Poli(óxido de etileno)

PLA – Poli(ácido láctico)

PLA/GSE10 – Poli(ácido láctico)/Extrato seco de semente de uva 10 %

PLA/GSE20 - Poli(ácido láctico)/Extrato seco de semente de uva 20 %

PLA/PEO – Poli(ácido láctico)/Poli(óxido de etileno)

PLA/PEO/GSE10 - Poli(ácido láctico)/Poli(óxido de etileno)/Extrato seco de semente de uva 10 %

PLA/PEO/GSE20 - Poli(ácido láctico)/Poli(óxido de etileno)/Extrato seco de semente de uva 20 % (m/m)

PLA/ALOE – Poli(ácido láctico)/Extrato seco de *Aloe Vera*.

PLA/ALOE/GSE10 - Poli(ácido láctico)/Extrato seco de *Aloe Vera*/Extrato seco de semente de uva 10%.

PLA/ALOE/GSE20 - Poli(ácido lático)/Extrato seco de *Aloe Vera*/Extrato seco de semente de uva 20%.

TGA – Análise termogravimétrica

UV-vis – Espectrofotômetro no ultravioleta visível

LISTAS DE TABELAS

TABELA 4.1- Composição química das diferentes MNPs obtidas pela técnica de eletrofição.	26
TABELA 5.1 - Tabela com o diâmetro médio das nanofibras para as diferentes formulações.	38
TABELA 5.2 - Valores médios máximos da taxa de liberação do GSE para diferentes mantas.	51
TABELA 5.3 – Mecanismos de liberação do GSE a partir dos parâmetros cinéticos para as diferentes mantas poliméricas.	59
TABELA 5.4 - Porcentagem de viabilidade da linhagem HFF-1, em 24 e 48 horas para o grupo controle.	61

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Representação esquemática dos critérios para um curativo ideal. Imagem adaptada da ref. ⁸ e reproduzida de acordo com os direitos autorais reservados à Elsevier (2017).	2
FIGURA 1.2 - Número de publicações científicas e patentes (histograma preto) e citações (curva azul) por ano, no período de 2009 a 2018, relacionadas à aplicações de nanofibras eletrofiadas para o tratamento de feridas. Pesquisa realizada na base de dados Web of Science no dia 20 de outubro de 2018, utilizando as palavras chaves: “ <i>electrospun nanofibers</i> ” e “ <i>wound dressing</i> ”.....	3
FIGURA 2.1 - Representação esquemática da estrutura da pele humana. Imagem retirada da ref. ²³ e reproduzida de acordo com os direitos autorais reservados à Elsevier (2017).	4
FIGURA 2.2 - Representação esquemática dos diferentes estágios de cicatrização de feridas dérmicas. Imagem adaptada da ref. ²⁹ e reproduzida de acordo com os direitos autorais reservados à ACS Publications (2017).	6
FIGURA 2.3 - Representação da estrutura química do monômero flavan-3-ol. ...	8
FIGURA 2.4 - Representação esquemática do arranjo experimental utilizado no processo de eletrofiação. Imagem adaptada da ref. ⁵⁶ e reproduzida de acordo com os direitos autorais reservados à Springer Nature (2017).	10
FIGURA 2.5 - Representação esquemática das possíveis aplicações de mantas de nanofibras na área biomédica. Figura adaptada da ref. ³ e reproduzida de acordo com os direitos autorais reservados à Elsevier (2018).	11
FIGURA 2.6 - (A) Imagem de MEV das nanofibras evidenciando a proliferação dos fibroblastos 3T6 após 72h de encubação e (B) fotografias evidenciando a evolução do fechamento de feridas tratadas com: controle (gaze), nanofibras sem e com o feno-grego. Figura adaptada da ref. ²¹ e reproduzida de acordo com os direitos autorais reservados à ACS Publications (2017).	12
FIGURA 4.1 - Fluxograma das etapas desenvolvidas ao longo do projeto de doutorado, visando desenvolver nanofibras poliméricas biodegradáveis contendo	

o composto antioxidante. As siglas encontram-se descritas na lista de abreviaturas.	18
FIGURA 4.2 - Fluxograma do processo de obtenção do extrato de Aloe.	20
FIGURA 4.3 - Esquema do processo de obtenção das soluções da PLA com adição do GSE.	21
FIGURA 4.4 - Esquema de obtenção das soluções PLA/PEO, PLA/PEO/GSE10 e PLA/PEO/GSE20.	23
FIGURA 4.5 - Esquema de obtenção das soluções PLA/ALOE, PLA/ALOE/GSE10 e PLA/ALOE/GSE20.	24
FIGURA 4.6 - Fotografia digital do aparato experimental da técnica de eletrofiação.	26
FIGURA 4.7 - Representação esquemática do procedimento experimental dos ensaios de liberação <i>in vitro</i> do GSE.	30
FIGURA 5.1 - Fotografias (A) das mantas poliméricas de PLA, PLA/GSE10 E PLA/GSE20, respectivamente. (B) imagem demonstrando a flexibilidade de uma das mantas.	34
FIGURA 5.2 - (A,C,E) Imagens de MEV e (B,D,F) histogramas de distribuição de diâmetros das nanofibras de PLA, PLA/PEO, PLA/ALOE, respectivamente.	36
FIGURA 5.3 - Imagens de MEV das nanofibras de (A) PLA/GSE10, (B) PLA/GSE20, (C) PLA/PEO/GSE10, (D) PLA/PEO/GSE20, (E) PLA/ALOE/GSE10 E (F) PLA/ALOE/GSE20.	37
FIGURA 5.4 - Espectros de FTIR das nanofibras de (A) PLA, PLA/PEO, PLA/ALOE e (B) GSE, PLA/GSE20, PLA/PEO/GSE20 e PLA/ALOE/GSE20	4040
FIGURA 5.5 – (A, C e E) curvas de TGA e (B, D e F) curvas de DTg das mantas de PLA, PLA/PEO e PLA/ALOE com 10 e 20 % (m/m) de GSE.	42
FIGURA 5.6 – Curvas de DSC (A, C e E) do primeiro e (B, D e F) segundo aquecimento das mantas PLA, PLA/PEO, PLA/ALOE, PLA/GSE 10 e 20 %, PLA/PEO/GSE 10 e 20 %, PLA/ALOE/GSE 10 e 20 %.	44

FIGURA 5.7 – Gráfico dos valores de ângulo de contato das mantas.	46
FIGURA 5.8 - (A) Curva de perda de massa das mantas em função do tempo em tampão PBs (ph 7,4 – 37 °C). Imagens de mev das nanofibras de (B)PLA, (C) PLA/PEO e (D) PLA/ALOE após o ensaio de degradação hidrolítica.....	47
FIGURA 5.9 – Mecanismo reacional entre o radical DPPH e antioxidante através da transferência do átomo de hidrogênio. ⁸⁴	49
FIGURA 5.10 – Percentual de consumo (atividade antioxidante) do radical DPPH pelo padrão ácido gálico, GSE em pó e GSE encapsulado na nanofibra.....	50
FIGURA 5.11 – (A) Perfis de liberação e (B) valores do percentual de liberação cumulativo em 5, 24, 336 e 720h para as mantas de PLA/GSE10, PLA/PEO/GSE10 e PLA/ALOE/GSE10 em tampão PBS (pH 7,4).	52
FIGURA 5.12 – (A) Perfis de liberação e (B) valores do percentual de liberação cumulativo em 5, 24, 336 e 720h para as mantas de PLA/GSE20, PLA/PEO/GSE20 e PLA/ALOE/GSE20 em tampão PBS (pH 7,4).	54
FIGURA 5.13 – Gráficos linearizados pelo modelo de Korsmeyer – Peppas para liberação de (A) PLA/GSE10, (B) PLA/GSE20, (C) PLA/PEO/GSE10, (D) PLA/PEO/GSE20, (E) PLA/ALOE/GSE10 e (F) PLA/ALOE/GSE20.....	58
FIGURA 5.14 - Avaliação do crescimento celular através do ensaio do MTT, em 24 horas, 48 horas em relação ao grupo controle (*) diferença significativa (p<0.05).	60
FIGURA 5.15 – Imagens digitais (A, B e C) das placas de inoculação. (A) placa contendo as mantas passando pelo processo de esterilização por luz UV, (B) placa com inóculo celular sobre as mantas e (C) placa com inóculo celular e MTT. (D e E), imagens de microscopia ótica das células de fibroblastos, linhagem HFF-1, (D) fibroblastos aderidos na placa, após 48 horas do inóculo grupo controle e (E) fibroblastos viáveis do grupo controle após a exposição ao reagente MTT, com alteração da coloração celular, indicativo de atividade metabólica e viabilidade celular.	61

FIGURA 5.16 – Imagens de MEV das mantas (A,B) PLA, (C,D) PLA/GSE10, (E, F) PLA/PEO/GSE10 e (G, H) PLA/ALOE/GSE10, evidenciando a adesão e proliferação dos fibroblastos, na qual, as imagens (A, C, E e G), mostram proliferação após 24 h de incubação celular e as imagens (B, D, F e H) após 48 h de incubação celular. 64

RESUMO

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MANTAS DE NANOFIBRAS POLIMÉRICAS ELETROFIADAS CONTENDO PROANTOCIANIDINAS E SUA POTENCIAL APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DE LESÕES CUTÂNEAS. O desenvolvimento de novas mantas de nanofibras poliméricas biodegradáveis e biocompatíveis são altamente desejáveis para aplicações biomédicas, incluindo a liberação controlada de medicamentos como curativos inteligentes. Assim, a presente tese teve como foco a obtenção, através da técnica de eletrofiação, de mantas de nanofibras biodegradáveis e biocompatíveis com propriedades antioxidantes, por meio da adição de extrato de semente de uva. As mantas foram obtidas utilizando o poli(ácido láctico) (PLA), poli(óxido de etileno) (PEO) e extrato de *Aloe Vera* (ALOE) como matriz, com a adição de extrato de semente de uva (GSE), uma rica fonte de antioxidantes naturais. As composições e características morfológicas das mantas foram otimizadas visando a obtenção de nanofibras homogêneas e hidrofílicas. Especificamente, foram produzidas mantas de nanofibras de PLA, PLA/PEO e PLA/ALOE sem incorporação do GSE e com incorporação de GSE à 10% e 20%, as quais foram caracterizadas de forma extensiva tanto do ponto de vista de composição e morfologia como do ponto de vista da biocompatibilidade, apresentando morfologia uniforme, randomicamente orientadas, com diâmetros entre 149 a 306 nm. A manta PLA/PEO apresentou natureza hidrofílica e as demais mantas, natureza hidrofóbica. As nanofibras de PLA, PLA/PEO e PLA/ALOE apresentaram alta eficiência de encapsulamento do GSE, próxima à 90%. A ação antioxidante do GSE também foi determinada confirmando sua alta capacidade antioxidante mesmo após o processo de eletrofiação. Dados experimentais do estudo de liberação *in vitro* mostraram que o GSE é liberado por transporte difusional, correspondendo satisfatoriamente ao modelo de Korsmeyer-Pepas. Além disso, uma liberação mais sustentada de GSE foi observada para as mantas PLA/PEO/GSE e PLA/ALOE/GSE. A viabilidade do crescimento de fibroblastos humano (HFF1) também foi avaliada, confirmando a biocompatibilidade de todas as mantas com destaque para a manta de PLA/PEO com GSE, a qual apresentou melhor adesão e proliferação celular quando comparada às mantas de PLA/GSE e PLA/ALOE/GSE. Assim, os resultados obtidos indicam o alto potencial das mantas carregadas com GSE na aplicação em sistemas tópicos para administração controlada como curativo inteligente.

ABSTRACT

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF ELECTROSPUN POLYMER NANOFIBERS CONTAINING PROANTHOCYANIDINES AND THEIR POTENTIAL APPLICATION IN SKIN INJURIES TREATMENT. The development of novel biodegradable and biocompatible nanofibrous membranes are highly desirable for biomedical applications, including drug delivery and wound dressing. Thus, the present thesis focused on the development using electrospinning technique of biodegradable and biocompatible nanofibrous membranes with antioxidant properties through the encapsulation of natural antioxidants. The membranes were obtained using the polylactic acid (PLA), polyethylene oxide (PEO) and *Aloe Vera* extract (ALOE) as a matrix, with the addition of grape seed extract (GSE), which is a rich source of natural antioxidants. The membranes compositions and morphological characteristics were optimized to obtain homogeneous nanofibers displaying hydrophilicity. Specifically, nanofibers mats of PLA, PLA/PEO e PLA/ALOE without and with GSE (10% and 20%) were characterized in terms of composition, morphology and biocompatibility, which presented uniform morphology, random orientation and diameters in the range 149 - 306 nm. The PLA/PEO nanofibers presented hydrophilic feature, while the other nanofiber mats presented hydrophobic feature. The PLA, PLA/PEO and PLA/ALOE nanofibers showed high encapsulation efficiency, with a percentage close to 90%. The antioxidant action of GSE was also determined confirming the high antioxidant capacity of GSE even after the electrospinning process. Experimental data obtained by the *in vitro* release studies showed that GSE is released by diffusional transport, corresponding satisfactorily to the Korsmeyer-Pepas model. In addition, a more controlled release of GSE was observed for the PLA/PEO/GSE and PLA/ALOE/GSE membrane. The viability of human fibroblast growth (HFF1) was also evaluated, confirming the biocompatibility of all the obtained membranes, especially the PLA/PEO membrane with GSE, which presented better cell attachment and proliferation when compared to PLA/GSE and PLA/ALOE/GSE membranes. Thus, the results indicate the high potential of membranes loaded with GSE for topical drug-delivery system as wound dressing.

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO E MOTIVAÇÃO	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 - LESÕES DA PELE E O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO	4
2.2 - EXTRATO DE SEMENTE DE UVA.....	7
2.3 - ELETROFIAÇÃO	9
2.4 - BIOMATERIAIS.....	13
3 - OBJETIVOS	16
3.1 - OBJETIVO GERAL.....	16
3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
4 - EXPERIMENTAL	17
4.1 - MATERIAIS.....	17
4.2 - MÉTODOS.....	17
4.2.1 - Purificação do extrato de semente de uva.....	18
4.2.2 - Obtenção do extrato de Aloe Vera.....	19
4.2.3 - Preparo das soluções poliméricas	20
4.2.4 - Produção de mantas pela técnica de eletrofiação	24
4.2.5 - Caracterização físico-química.....	26
4.2.6 - Estudo da degradação das MNPs.....	28
4.2.7 - Eficiência de encapsulamento.....	28
4.2.8 - Estudo de atividade antioxidativo do GSE.....	29
4.2.9 - Ensaio de liberação in vitro do GSE.....	30
4.2.10 - Ensaios biológicos in vitro.....	31
5 - RESULTADOS E DISCUSSÕES	34
5.1 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MANTAS POLIMÉRICAS	34
5.1.1 - Microscopia eletrônica de varredura	34

5.1.2 - Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier..	38
5.1.3 - Análises Térmicas.....	41
5.1.4 - Ângulo de contato.....	44
5.2 - ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO DAS MNPs.....	46
5.3 - EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO	47
5.4 - ESTUDO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO GSE	48
5.5 - ENSAIO DE LIBERAÇÃO IN VITRO DO GSE	50
5.6 - ENSAIOS BIOLÓGICOS	59
5.6.1 - Viabilidade e citotoxicidade celular(fibroblasto humana HFF-1)	59
6 - CONCLUSÕES.....	65
7 - PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO.....	67
8 - REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	69

1 - INTRODUÇÃO E MOTIVAÇÃO

O desenvolvimento de sistemas eficazes para o tratamento terapêutico de lesões cutâneas é um dos desafios mais importantes da medicina moderna.¹⁻⁸ Na Europa, a gestão de feridas consome cerca de 2 a 4% do orçamento destinado à saúde.⁵ De acordo com estudo realizado nos EUA, mais de 2 milhões de casos de feridas por queimadura e cerca de 7 milhões de pacientes com úlceras cutâneas crônicas (causadas por pressão, insuficiência arterial ou venosa e diabetes mellitus) apresentam um processo de cicatrização anormal, necessitando de cuidados constantes e por períodos prolongados.^{9,10} Pesquisas apontam que o gasto anual dos EUA com tratamento de feridas chegará ao valor de 22,4 bilhões de dólares em 2024.¹¹ Essas lesões, além de causarem danos físicos, mecânicos e térmicos, podem também afetar funções fisiológicas de outros tecidos, ocasionando desordens fisiológicas no ser humano.⁸ É improvável que esses números diminuam à medida que a sociedade global está envelhecendo, pois há uma incidência crescente de doenças crônicas como os diabetes.¹¹ Este elevado custo, financeiro e à saúde da população, tem intensificado o número de pesquisas direcionadas para o desenvolvimento de novos curativos mais eficazes, que sejam capazes de reduzir o tempo de cicatrização, evitar infecções bacterianas e reduzir a formação de cicatrizes.¹²

Um curativo ideal deve possuir características como: propriedade mecânica adequada, fornecer um ambiente úmido na interface da ferida, remover exsudatos adicionais, permitir a troca de gases, agir como uma barreira contra microrganismos e liberar mediadores de cicatrização e/ou antibacterianos de acordo com os requisitos da ferida, como representado na FIGURA 1.1.^{4,8}

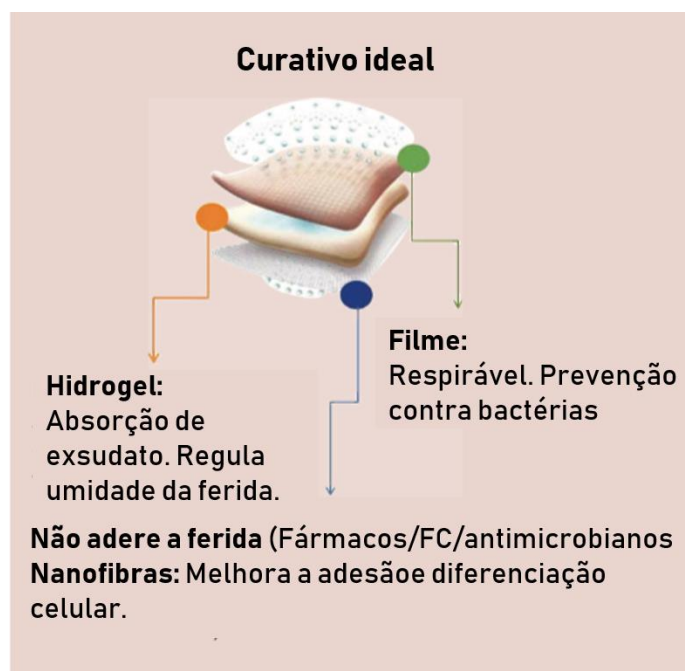


FIGURA 1.1 - Representação esquemática dos critérios para um curativo ideal. Imagem adaptada da ref.⁸ e reproduzida de acordo com os direitos autorais reservados à Elsevier (2017).

Embora diversos tipos de sistemas destinados ao tratamento de lesões encontrem-se disponíveis comercialmente,^{8,13} nenhum deles possui todas as propriedades mencionadas anteriormente. Devido às limitações dos curativos tradicionais, várias estratégias têm sido abordadas para o desenvolvimento de novos materiais multifuncionais que possam ser usados na terapêutica de feridas. Dentre elas, a produção de curativos biodegradáveis e biocompatíveis baseados em mantas de micro- ou nanofibras obtidas pelo processo de eletrofiação têm despertado grande interesse nos últimos anos.^{3,14-16} Esses materiais são altamente porosos e apresentam elevada razão área superficial/volume, o que facilita a permeação de gases, o transporte de nutrientes e a manutenção do equilíbrio de umidade na ferida.¹⁴ Adicionalmente, eles apresentam estrutura similar à matriz extracelular da pele, desempenhando assim um papel fundamental durante o processo de cicatrização de feridas.³ Outra vantagem do uso da técnica de eletrofiação é a possibilidade de encapsular agentes bioativos que desempenham um papel importante no processo de cicatrização de feridas.¹⁷ Dentre esses

compostos, o encapsulamento de extratos naturais com propriedades antioxidantes, como é o caso do extrato de semente de uva (GSE), se mostra como uma estratégia interessante visando diminuir respostas fisiológicas à feridas cutâneas, como processos de inflamação e oxidação.¹⁸⁻²⁰

O crescente interesse pelo uso de nanofibras eletrofiadas no tratamento de feridas pode ser observado com bases nos dados apresentados na FIGURA 1.2, indicando o uso de mantas de nanofibras como uma tecnologia “chave” para fornecer soluções adequadas para desenvolvimento de novos curativos multifuncionais. No entanto, vale ressaltar que apesar de crescente, o número de publicações ainda é relativamente baixo, principalmente no que diz respeito ao uso de nanofibras contendo extratos naturais antioxidantes para o tratamento de feridas, indicando a necessidade de novos estudos que possam contribuir com o desenvolvimento da área. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de mantas de nanofibras poliméricas biodegradáveis contendo o extrato de semente de uva com potencial aplicação para o tratamento de lesões.

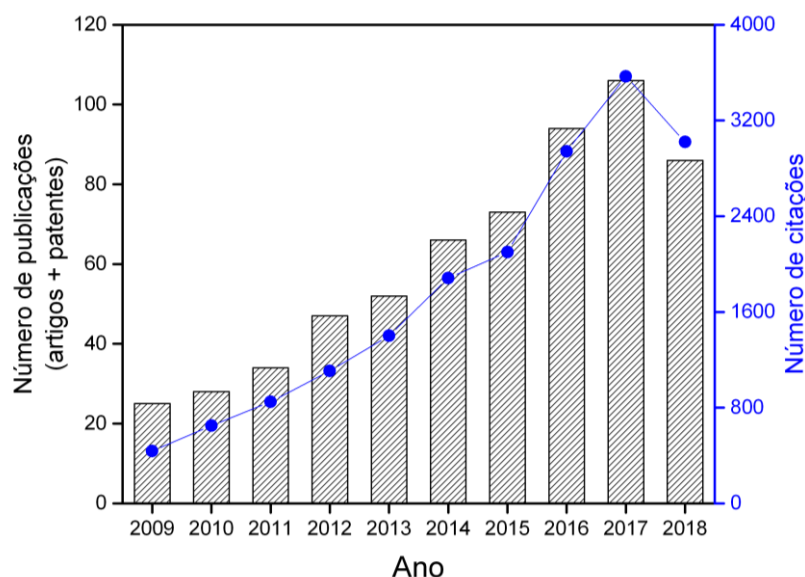


FIGURA 1.2 - Número de publicações científicas e patentes (histograma preto) e citações (curva azul) por ano, no período de 2009 a 2018, relacionadas às aplicações de nanofibras eletrofiadas para o tratamento de feridas. Pesquisa realizada na base de dados Web of Science no dia 20 de outubro de 2018, utilizando as palavras chaves: “*electrospun nanofibers*” e “*wound dressing*”.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Lesões da pele e o processo de cicatrização

A pele corresponde a cerca de 15% do peso corpóreo de um adulto, sendo considerado o maior órgão do corpo humano.²¹ A pele dos mamíferos é composta principalmente por duas camadas, a epiderme e a derme, as quais são sustentadas por um tecido subcutâneo, a hipoderme, conforme mostrado na FIGURA 2.1. A epiderme é a camada mais externa da pele e atua como uma barreira física, química e imunológica ao ambiente externo. Em contraste, a derme é rica em matriz extracelular, que proporciona resistência à tração e elasticidade. Outras estruturas como raízes do cabelo, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas estão localizados na parte dérmica.²²

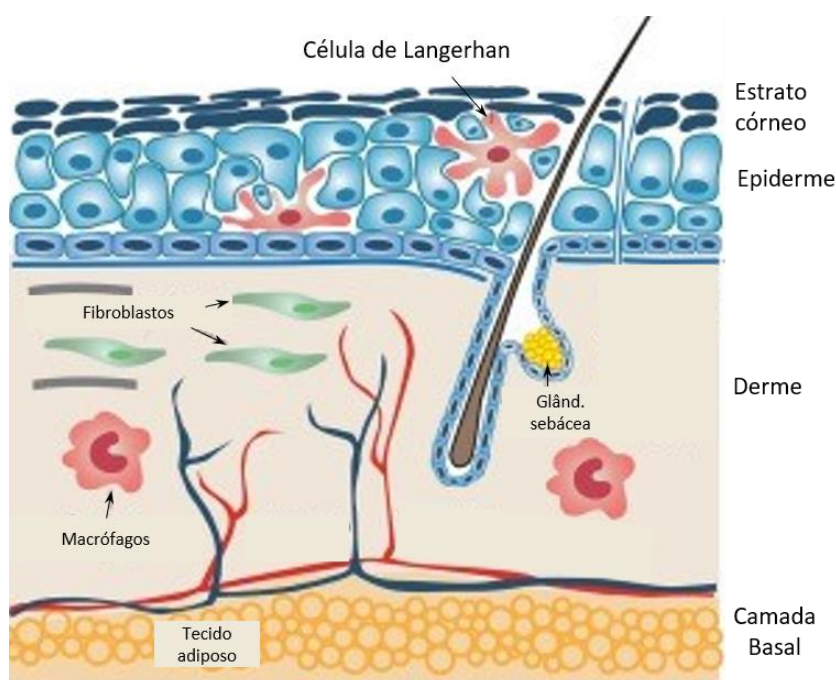


FIGURA 2.1 - Representação esquemática da estrutura da pele humana. Imagem retirada da ref. ²² e reproduzida de acordo com os direitos autorais reservados à Elsevier (2017).

A pele é caracterizada como um sistema de defesa extremamente eficiente, pois dentre outras funções, serve de barreira mecânica contra agentes infecciosos, regula a temperatura corpórea e a entrada e saída de eletrólitos, além

de armazenar uma grande quantidade de terminações nervosas.²³ Como a pele serve como uma barreira protetora contra o mundo exterior, qualquer ruptura/dano à sua estrutura deve ser rapidamente e eficientemente corrigido, uma vez que uma lesão a esse órgão pode ocasionar um desequilíbrio fisiológico e representar uma porta de entrada para organismos patogênicos oportunistas.²⁴

Uma ferida pode ser descrita como uma interrupção da continuidade de um tecido corpóreo, em maior ou em menor extensão, causada por qualquer tipo de trauma, seja ele físico, químico, mecânico, térmico ou desencadeado por uma afecção clínica.^{1,4,10,25-27} As feridas podem ser classificadas de acordo com vários critérios, sendo o mais comum o que leva em conta a natureza do processo de cicatrização envolvido, podendo ser divididas em feridas agudas e crônicas.¹⁴ As feridas agudas são geralmente originadas de cirurgias ou traumas na pele e a reparação ocorre em tempo adequado, podendo levar de 8 a 12 semanas, dependendo do tamanho, profundidade e extensão dos danos causados.¹⁴ As lesões crônicas são aquelas no qual o processo de cicatrização não ocorre espontaneamente, o que pode ocorrer pela inibição ou interrupção do mecanismo de cicatrização ou quando os tecidos são expostos a fatores ambientais prejudiciais.⁸ A não cicatrização das feridas podem ainda provocar o aumento da inflamação devido ao aumento do processo infeccioso, resultando em maiores chances de complicações.¹⁴

A cicatrização de feridas é um processo fisiológico que ocorre através de uma sequência de eventos celulares, culminando no restabelecimento da homeostasia tecidual.⁴ O processo de cicatrização é geralmente dividido em quatro fases sobrepostas, que são hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação, conforme ilustrado na FIGURA 2.2.²⁸ Após o dano celular, o primeiro evento desencadeado é a hemostasia, que ocorre no local da lesão para interromper o sangramento e minimizar a hemorragia por meio da cascata de coagulação. Em seguida, o sistema imune desencadeia o estágio inflamatório, o organismo utiliza mecanismos celulares e vasculares com o objetivo de eliminar

microrganismos e também organizar a matriz celular provisória. Na fase proliferativa ocorre liberação de fibroblastos, responsáveis pela síntese de colágeno, angiogênese e reepitelização, formando tecido de granulação que tem por finalidade restaurar a função de barreira da pele. Depois disso, em um processo mais lento, a remodelação de tecidos, comandada pelos fibroblastos que produzem colágeno, leva à formação da cicatriz. Após essa fase, a pele é completamente regenerada e suas funcionalidades são restauradas.¹³

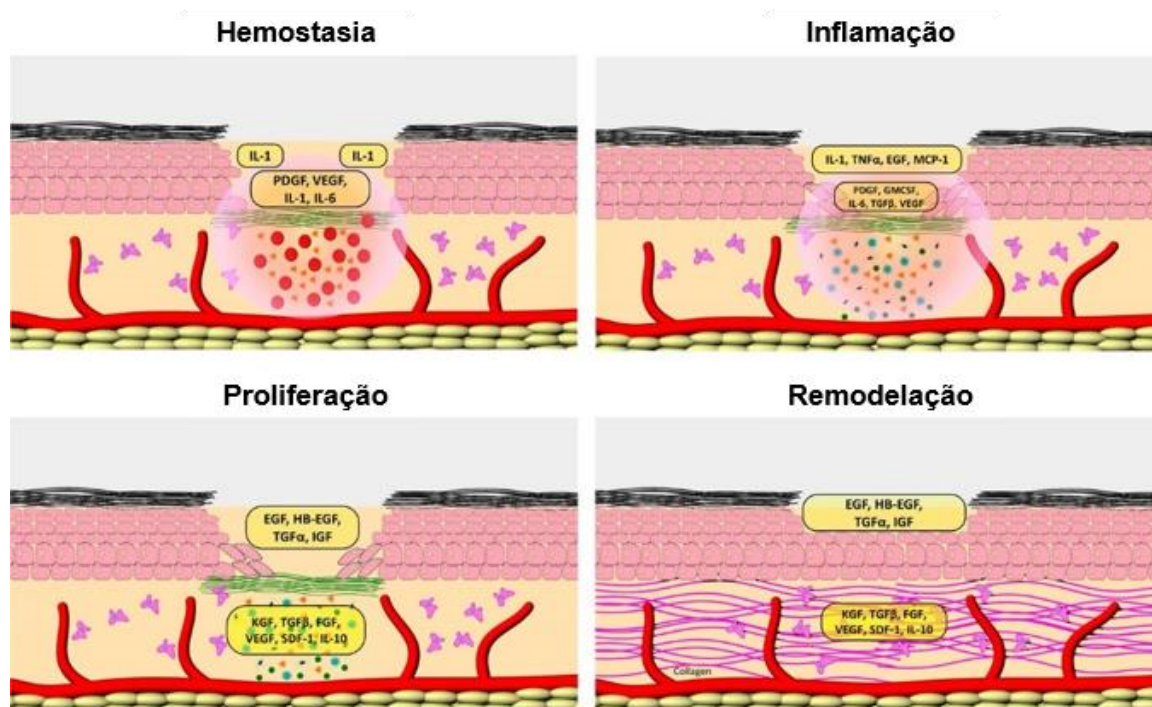


FIGURA 2.2 - Representação esquemática dos diferentes estágios de cicatrização de feridas dérmicas. Imagem adaptada da ref. ²⁸ e reproduzida de acordo com os direitos autorais reservados à ACS Publications (2017).

Embora a pele geralmente seja capaz de regenerar-se após uma lesão, como mencionado anteriormente, diversos fatores locais e sistêmicos podem interferir no processo de cicatrização, causando um desvio na sequência fisiológica, tornando a ferida crônica.²⁶

Várias células envolvidas no processo de regeneração tecidual, tais como os neutrófilos, macrófagos, células endoteliais e fibroblastos, produzem espécies reativas de oxigênio (ERO), como o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila, durante a cicatrização.^{18,24,29-31} Esses agentes

oxidantes são importantes no processo de coagulação e reepitelização. Entretanto, a superprodução de espécies reativas de oxigênio (ERO) interrompe o equilíbrio oxidante/antioxidante celular, o que torna o processo de regeneração tecidual e cicatrização de feridas lento, acarretando em infecções e no estresse oxidativo.²³ Nesse sentido, o interesse pelo uso de antioxidantes no tratamento de feridas crônicas vem crescendo, uma vez que vários estudos em animais e em humanos têm mostrado a eficácia desses compostos na cicatrização, principalmente em condições de produção excessiva de ERO e defesa antioxidante prejudicada.^{32,33}

Tratamentos utilizando fontes antioxidantes de origem vegetal, como proantocianidinas,³⁴ curcumina⁷ e própolis³⁵ resultaram, de uma maneira geral, em uma melhora da cicatrização de feridas e da defesa antioxidante. Um dos extratos vegetais que apresenta alto teor de proantocianidinas é o extrato de semente de uva.³⁶ Nesse cenário, a capacidade antioxidante do extrato de semente de uva pode ser de interesse clínico no tratamento de feridas, especialmente ferimentos crônicos, nos quais o processo fisiológico de cicatrização não ocorre de maneira eficiente devido à debilidade do organismo decorrente de doenças crônicas.¹³

2.2 - Extrato de semente de uva

A uva é uma das frutas das mais cultivadas no mundo, representando uma produção de mais de 77 milhões de toneladas em 2016, sendo a maior parte desta destinada para a produção de vinho.³⁷ Como parte do processo de produção de vinhos, uma grande quantidade de resíduos é obtida, correspondendo a aproximadamente 20% do peso das uvas. Esse resíduo, incluindo a casca e a semente de uvas, é frequentemente considerado como um problema ambiental, devido ao seu impacto negativo quando descartado, ou como um produto subvalorizado, sendo usado como fertilizante ou como ração animal.³⁸ Embora o bagaço possa ser utilizado para a produção de etanol ou óleo de semente de uva,

vários bioativos ainda permanecem em sua composição, tornando este resíduo um produto interessante para o desenvolvimento de insumos de valor agregado.³⁷

Em particular, o extrato de semente de uva (GSE) é conhecido por ser uma importante fonte de proantocianidinas.^{34,39-43} As proantocianidinas são compostos polifenólicos de alto peso molecular (acima de 500 Da)³⁴ compostas por unidades monoméricas de flavan-3-ol, como mostrado na FIGURA 2.3. As proantocianidinas podem ainda estar subdivididas em várias classes, baseadas nos padrões de hidroxilação ou substituições das suas unidades monoméricas e das ligações formadas entre elas.⁴⁴

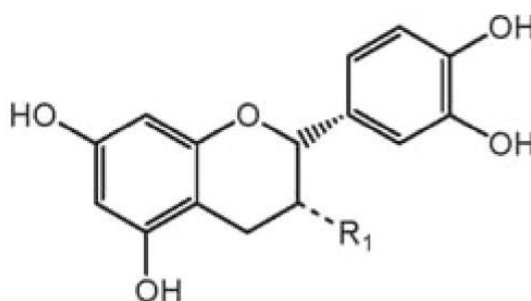


FIGURA 2.3 - Representação da estrutura química do monômero flavan-3-ol.

Além da elevada capacidade de eliminação de radicais livres apresentada pelas proantocianidinas (sendo de 20 a 50 vezes mais eficiente que a vitamina E ou C)^{19,45}, esses compostos vem recebendo atenção considerável na área da saúde devido às outras propriedades fisiológicas, tais como atividades antimicrobianas, bactericidas, antiinflamatórias, antitumorais e antialérgicas.^{39,44,45}

Apesar do amplo espectro de aplicações que vem sendo reportado para o GSE, o uso desses compostos tem sido limitado em aplicações farmacêuticas, devido à baixa solubilidade em água e alta instabilidade química em meio fisiológico, o que resulta em baixa biodisponibilidade, baixa permeabilidade e degradação antes de atingir a circulação sistêmica.⁴⁶⁻⁴⁸ Dessa forma, a sua utilização em sistemas que visam à aplicação em cicatrização cutânea se torna um desafio. Uma abordagem eficaz que permite a administração do

agente bioativo ao paciente acometido por uma ferida é a sua incorporação em sistemas poliméricos, o que interfere de forma positiva em seu perfil de biodisponibilidade, melhorando sua estabilidade, além de controlar a velocidade de liberação sem alterar a estrutura química do composto ativo.^{2,9,14,49-51}

Várias metodologias têm sido empregadas para o encapsulamento de biomoléculas com propriedades antioxidantes visando o desenvolvimento de curativos bioativos. Dentre elas, o uso de micro/nanofibras poliméricas obtidas pela técnica de eletrofiação têm despertado grande interesse por propiciarem um ambiente favorável para a regeneração tecidual e a entrega de moléculas bioativas de forma controlada para o local da ferida, além de auxiliarem no processo de adesão e proliferação celular.³⁰

2.3 - Eletrofiação

A técnica de eletrofiação se destaca por ser uma técnica de montagem experimental simples e que permite a produção de micro/nanofibras a partir de uma solução polimérica. As principais vantagens da técnica incluem um custo relativamente baixo do sistema, versatilidade, facilidade de processamento e possibilidade de produção de nanofibras com uma ampla gama de morfologias e materiais.^{3,13,16,50,52,53}

O aparato experimental utilizado no processo de eletrofiação é formado tipicamente por um reservatório contendo a solução, uma seringa com agulha, por uma fonte de alta tensão e por um coletor metálico para deposição das fibras, como esquematizado na FIGURA 2.4. Inicialmente, a solução polimérica contida no reservatório é forçada a escoar por um capilar (agulha) com o auxílio de uma bomba de infusão ou pela ação da gravidade. A gota da solução é mantida pela sua tensão superficial na extremidade do tubo capilar. Com a aplicação de um campo elétrico, cargas são criadas na superfície do líquido que geram uma força em direção oposta à força de tensão superficial, e a gota na ponta do capilar se alonga, formando o Cone de Taylor.^{13,30,54} Quando o campo elétrico atinge um

valor crítico, as forças elétricas vencem a força de tensão superficial e um jato de solução é ejetado a partir do Cone de Taylor. Durante a trajetória deste jato, as cadeias poliméricas sob estiramento, primeiramente polarizadas, são atraídas ao coletor, o solvente é evaporado e o polímero solidifica-se, o qual é coletado na forma de fibras. A distância entre a ponta da seringa e o coletor metálico (distância de trabalho) deve ter um valor mínimo que garanta a total evaporação do solvente, e um valor máximo de modo que o campo elétrico seja efetivo para estabilização do Cone de Taylor, e conseqüentemente, para formação das nanofibras.⁵⁶

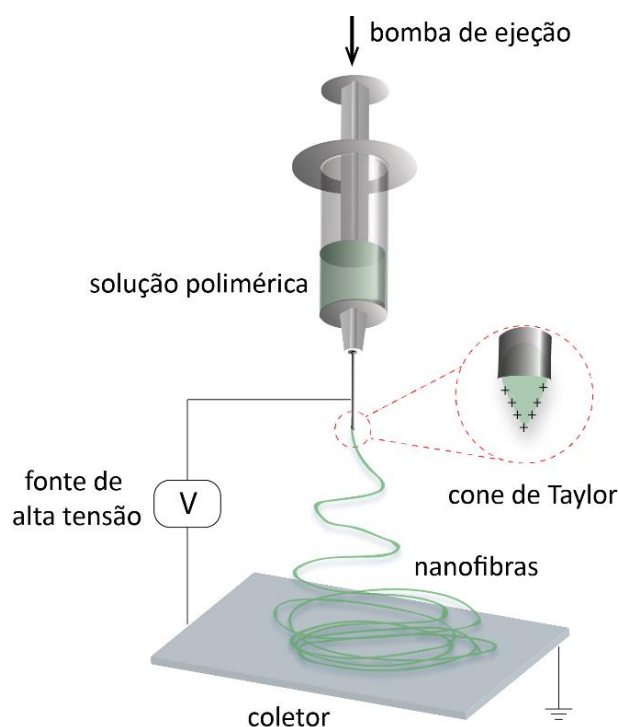


FIGURA 2.4 - Representação esquemática do arranjo experimental utilizado no processo de eletrospinning. Imagem adaptada da ref.⁵⁶ e reproduzida de acordo com os direitos autorais reservados à Springer Nature (2017).

A variação dos parâmetros experimentais da técnica de eletrospinning permite a obtenção de fibras com as mais diversas morfologias e estruturas.⁵⁵ Esses parâmetros podem ser classificados em três tipos: (i) parâmetros de processo (tensão aplicada, vazão, distância de trabalho, tipo de agulha, e tipo de coletor), (ii) parâmetros da solução (peso molecular e concentração do polímero,

viscosidade, tensão superficial, condutividade elétrica, propriedades do solvente) e (iii) parâmetros ambientais (temperatura e umidade).

As diferentes nanofibras que podem ser obtidas pela técnica de eletrofiação vêm apresentando potencialidade para aplicações na área biomédica, mas não apenas para a regeneração tecidual da pele, como também em sistemas para liberação de medicamentos, na regeneração tecidual de cartilagem, osso, válvulas cardíacas, músculo e tecido neural, conforme ilustrado na FIGURA 2.5.

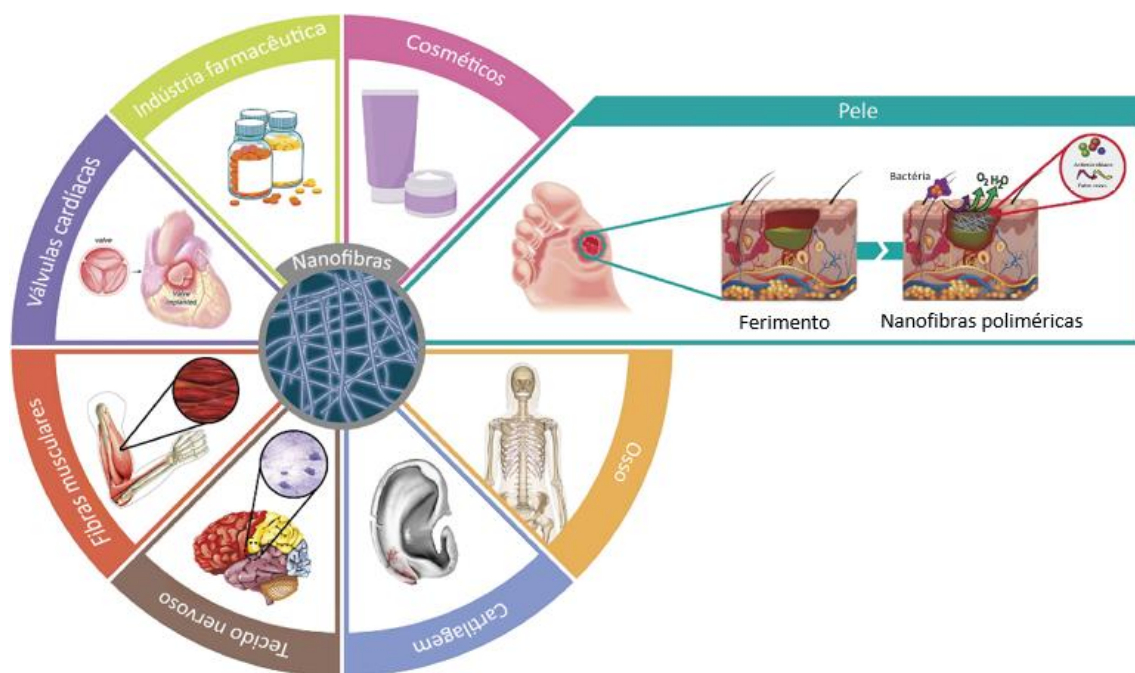


FIGURA 2.5 - Representação esquemática das possíveis aplicações de mantas de nanofibras na área biomédica. Figura adaptada da ref.³ e reproduzida de acordo com os direitos autorais reservados à Elsevier (2018).

A potencial aplicação das nanofibras nessas áreas se dá pelas propriedades que esses materiais apresentam, dentre as quais pode-se destacar: propriedades hemostáticas (cessa a hemorragia), alta capacidade de absorção de água, semi-permeabilidade, flexibilidade e capacidade de encapsulamento de fármacos e espécies bioativas.^{51,52,50,57,58}

Uma elevada quantidade do fármaco/bioativo de interesse pode ser incorporada às fibras utilizando o processo de eletrofiação. Além disso, a liberação dessas moléculas pode ser modulada de acordo com as características

da ferida a partir de ajustes na composição das fibras. A taxa de liberação de sistemas formados por polímeros hidrofílicos, por exemplo, tende a ser rápida limitando, portanto, sua aplicação em feridas que demandem longo prazo de tratamento. Por outro lado, o uso de polímeros hidrofóbicos tem se mostrado como opção ideal para fins de liberação controlada e prolongada.^{14,27}

Os avanços nas áreas de eletrofição tem permitido o desenvolvimento dos mais diversos tipos de materiais que possam ser utilizados como curativos bioativos para o tratamento de feridas.^{20,21,59,60} Selvaraj e colaboradores²⁰, por exemplo, demonstraram a viabilidade do uso de nanofibras poliméricas contendo o antioxidante natural “feno grego” para o tratamento de feridas. Nesse estudo, eles mostraram que a incorporação do feno grego às nanofibras favoreceu a proliferação de fibroblastos 3T6, como mostrado na FIGURA 2.6. Além disso, estudos *in vivo* demonstraram a maior velocidade de cicatrização da ferida após o uso das nanofibras contendo o antioxidante. As nanofibras mostraram boa aderência à superfície da ferida e, após 16 dias de tratamento, observou-se um fechamento completo da ferida, FIGURA 2.6 (B).

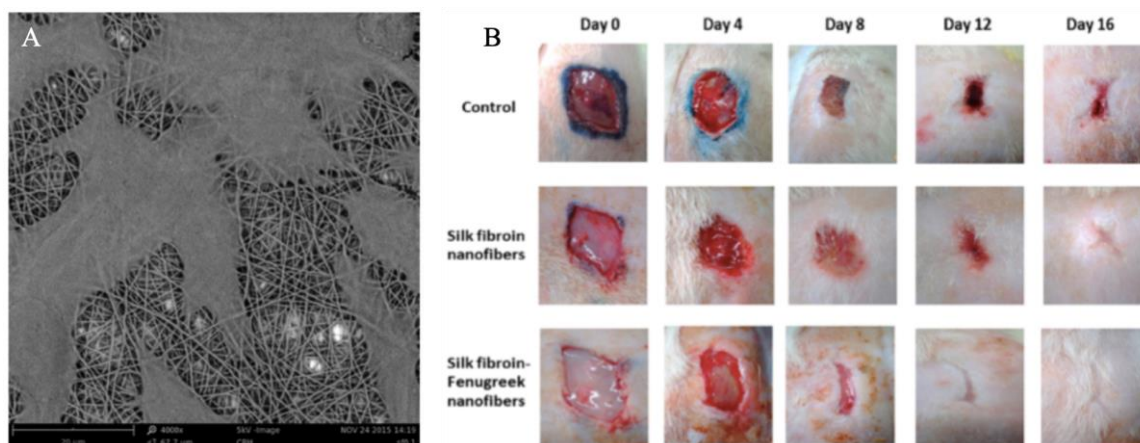


FIGURA 2.6 - (A) Imagem de MEV das nanofibras evidenciando a proliferação dos fibroblastos 3T6 após 72 h de encubação e (B) fotografias evidenciando a evolução do fechamento de feridas tratadas com: controle (gaze), nanofibras sem e com “feno-grego”. Figura adaptada da ref.²⁰ e reproduzida de acordo com os direitos autorais reservados à ACS Publications (2017).

Contudo, ainda se faz necessária a realização de novos estudos visando a avaliação do uso de diferentes composições poliméricas dependendo do fármaco/bioativo de interesse e do estágio da ferida, para que o processo de cicatrização possa ser melhorado. Por exemplo, a escolha no uso de polímeros solúveis em água, bem como aqueles com interações medicamentosas/polímeros mínimas (mecanismo de difusão), facilita a liberação rápida de fármacos. Em contraste, os processos de proliferação e remodelação em estágios tardios de cicatrização de feridas requerem a entrega sustentada dos bioativos e fatores de crescimento. Nesses casos, o uso de blendas ou fibras compósitas podem favorecer as interações droga-polímero beneficiando a entrega prolongada dos agentes biológicos.

2.4 - Biomateriais

Os biomateriais são definidos, segundo a Sociedade Europeia de Biomateriais, como “materiais destinados a interagir com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo”.⁶¹ São constituídos por materiais metálicos, cerâmicos, poliméricos e compósitos. Os biomateriais são amplamente utilizados nas diversas áreas da biomedicina com destaque à engenharia de tecidos que visa o crescimento e reparação de tecidos vivos, mimetizando a estrutura e a função de matrizes extracelulares específicas dos tecidos.^{61,62,63}

Os biomateriais são classificados como bioinertes ou biocompatíveis, bioativos, biorreabsorvíveis e inteligentes ou biomiméticos. Os biomateriais inteligentes ou biomiméticos possuem características para desencadear funções celulares e teciduais a partir de modificações das propriedades da superfície destes materiais quanto a rugosidade, topografia e química, alterando as respostas celulares como fixação, migração, proliferação e diferenciação. Além disso, a porosidade, o tamanho dos poros, a relação entre a

área superficial e volume e a interconectividade dos poros contribuem para o crescimento, especificidade e vascularização dos tecidos.^{64,65,66} Por contemplar todas as características de um biomaterial inteligente, as nanofibras poliméricas, obtidas principalmente pela técnica de eletrofiação, tornaram-se uma das plataformas mais utilizadas e investigadas para a produção destes biomateriais.^{60,67,68} Dentre a grande variedade de materiais utilizados na obtenção das nanofibras, destaca-se o poli (ácido lático) (PLA), polímero sintético derivado do ácido lático, o qual degrada-se pela hidrólise não enzimática, sendo eliminada através do metabolismo celular normal. É denominado um biomaterial por ser biocompatível, biodegradável e citocompatível.⁶⁷ O PLA vem sendo utilizado na engenharia de tecidos como *scaffold* para regeneração tecidual cutânea e também na distribuição e liberação de fármacos, fatores de crescimento e fitoativos, que auxiliem o crescimento e regeneração tecidual.⁶⁷

Devido a seu caráter hidrofóbico, o PLA apresenta baixa compatibilidade com fármacos hidrofílicos e, quando misturados, podem sofrer separação de fases. Além disto, quando obtida a nanofibra, o fármaco se distribui predominantemente na superfície da nanofibra. Esta característica influenciará nas propriedades da nanofibra, como por exemplo, no aumento da velocidade de liberação do fármaco em meio fisiológico, promovendo o efeito *burst*, devido a maior disponibilidade de fármaco na superfície da nanofibra.⁶⁹ Como forma de minimizar esta condição, faz-se necessária a utilização de blends poliméricas associando ao PLA outro polímero com caráter hidrofílico, como por exemplo, o poli (óxido de etileno) (PEO) um polímero sintético, que assim como o PLA, é um biomaterial por suas propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade e citocompatibilidade, mas apresenta caráter hidrofílico que, quando associado ao PLA na forma de blenda polimérica, promoverá a modulação no perfil de liberação do fármaco incorporado, já que o fármaco teoricamente estará disperso mais no interior das nanofibras.^{24,70,71}

Compostos de origem natural também podem agregar

características de caráter hidrofílico às nanofibras além de contribuir com propriedades naturais de atividade antiinflamatória, facilitador de matriz extracelular e cicatrizante, como é o caso do extrato de Aloe Vera (ALOE).^{72,73} O ALOE é um fitoativo, constituído de polissacarídeos, principalmente acemanana com propriedades anti-inflamatórias, cicatrizantes e facilitador de proliferação de fibroblastos.⁷² Por sua característica mucinaginosa de caráter hidrofílico, quando formada a blenda com PLA, mimetiza o comportamento do PEO modulando o perfil de liberação de fármacos.^{73,74,75}

3 - OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral

Produzir e avaliar o desempenho de diferentes mantas de nanofibras poliméricas biodegradáveis, utilizando como polímero base o PLA com adição de PEO e ALOE, produzidas pela técnica de eletrospinning contendo extrato de semente de uva, visando potencial aplicação em sistemas de liberação controlada de antioxidantes para uso no tratamento de cicatrização cutânea.

3.2 - Objetivos específicos

- Obtenção e caracterização de mantas biodegradáveis com diferentes composições poliméricas e concentrações de GSE;
- Estudo da influência da matriz polimérica na cinética e mecanismo de liberação do extrato de semente de uva (GSE);
- Avaliação da citotoxicidade e viabilidade celular das diferentes mantas poliméricas visando potencial aplicação no tratamento de lesões cutâneas.

4 - EXPERIMENTAL

4.1 - Materiais

O polímero poli (ácido lático), PLA, 4060D ($M_w = 119.000 \text{ g.mol}^{-1}$), foi adquirido da NatureWorks Ingeo[®]. O polímero poli (óxido de etileno), PEO, ($M_w = 100.000 \text{ g.mol}^{-1}$), os reagentes Folin & Ciocalteu's, F&C, Ácido gálico monohidratado, AG, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH, foram adquiridos da Sigma Aldrich. Os solventes *N,N*-Dimetilformamida, DMF, e Acetona foram adquiridos da Synth.

O extrato de semente de uva, GSE, foi adquirido da Empresa Galena – Química e Farmacêutica Ltda, com o nome comercial Procianin[®] (extrato de semente de uva padronizado), contendo quantidade superior a 96% de proantocianidinas. O extrato de Aloe Vera, Aloe, foi obtido das folhas da planta *Aloe barbadensis miller*.

O tampão fosfato salino, PBS, pH 7,4, foi produzido em água destilada utilizando fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) e o fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) adquiridos da Cromoline e Synth, respectivamente.

4.2 - Métodos

No fluxograma da FIGURA 4.1, encontram-se descritos resumidamente as diferentes etapas envolvidas para o desenvolvimento deste trabalho de doutorado assim como, a nomenclatura adotada para as diferentes mantas de nanofibras desenvolvidas. Cada uma dessas etapas encontra-se descritas em detalhes nos tópicos seguintes.

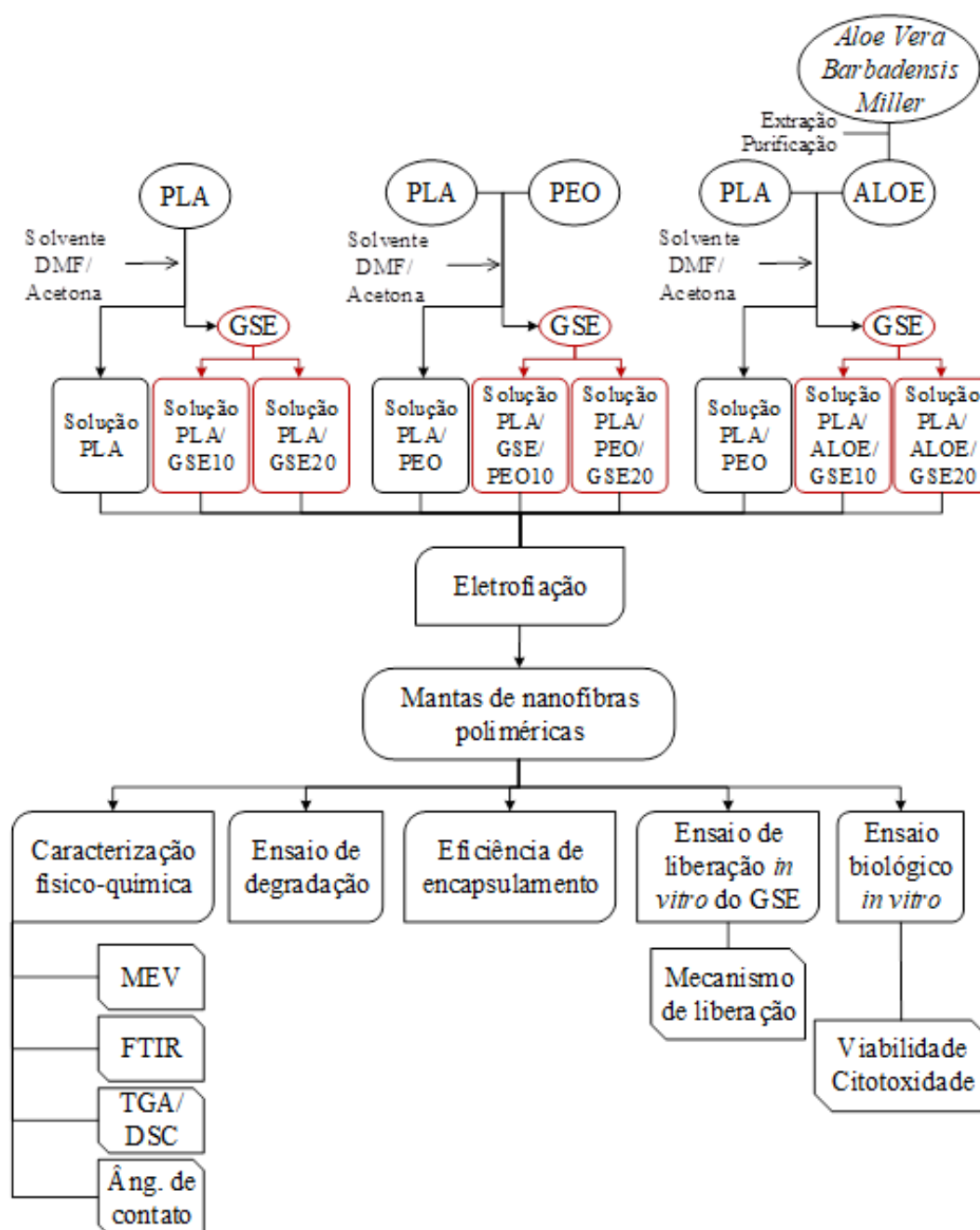


FIGURA 4.1 - Fluxograma das etapas desenvolvidas ao longo do projeto de doutorado, visando desenvolver nanofibras poliméricas biodegradáveis contendo o composto antioxidante. As siglas encontram-se descritas na lista de abreviaturas.

4.2.1 - Purificação do extrato de semente de uva

Visando uma maior eficiência do poder antioxidante do GSE, o extrato obtido comercialmente foi previamente purificado.⁶⁶ Para isso, 0,15 g de GSE foram solubilizados em 10 mL de água destilada na proporção 1:1 e a mistura

resultante foi mantida sob agitação magnética por 3 h a temperatura ambiente. Em seguida, a mistura foi filtrada em papel de filtro e a solução obtida foi congelada em nitrogênio líquido e liofilizada para obtenção do extrato na forma de pó.

4.2.2 - Obtenção do extrato de Aloe Vera

O extrato de Aloe foi obtido a partir das folhas da planta *Aloe barbadensis miller*. O extrato constitui-se essencialmente, de polissacarídeos e foi extraído adaptando-se a metodologia descrita por Chun Hui et al⁷⁶, conforme mostrado na FIGURA 4.2.

Folhas de *Aloe barbadensis miller* (3 kg) foram coletadas todas no mesmo dia, descascadas para extração da polpa gelificada e lavadas com água destilada. Em seguida, foi adicionada água destilada e a mistura foi homogeneizada com auxílio de misturador mecânico por 10 minutos até obtenção de uma solução viscosa, a qual foi aquecida à 45°C e filtrada à vácuo. O resíduo retido no filtro foi descartado e ao filtrado foi adicionado etanol para precipitação dos polissacarídeos. Após 12h em repouso, o material foi centrifugado e o sobrenadante descartado. Por fim, o precipitado foi lavado com etanol absoluto, congelado e liofilizado.

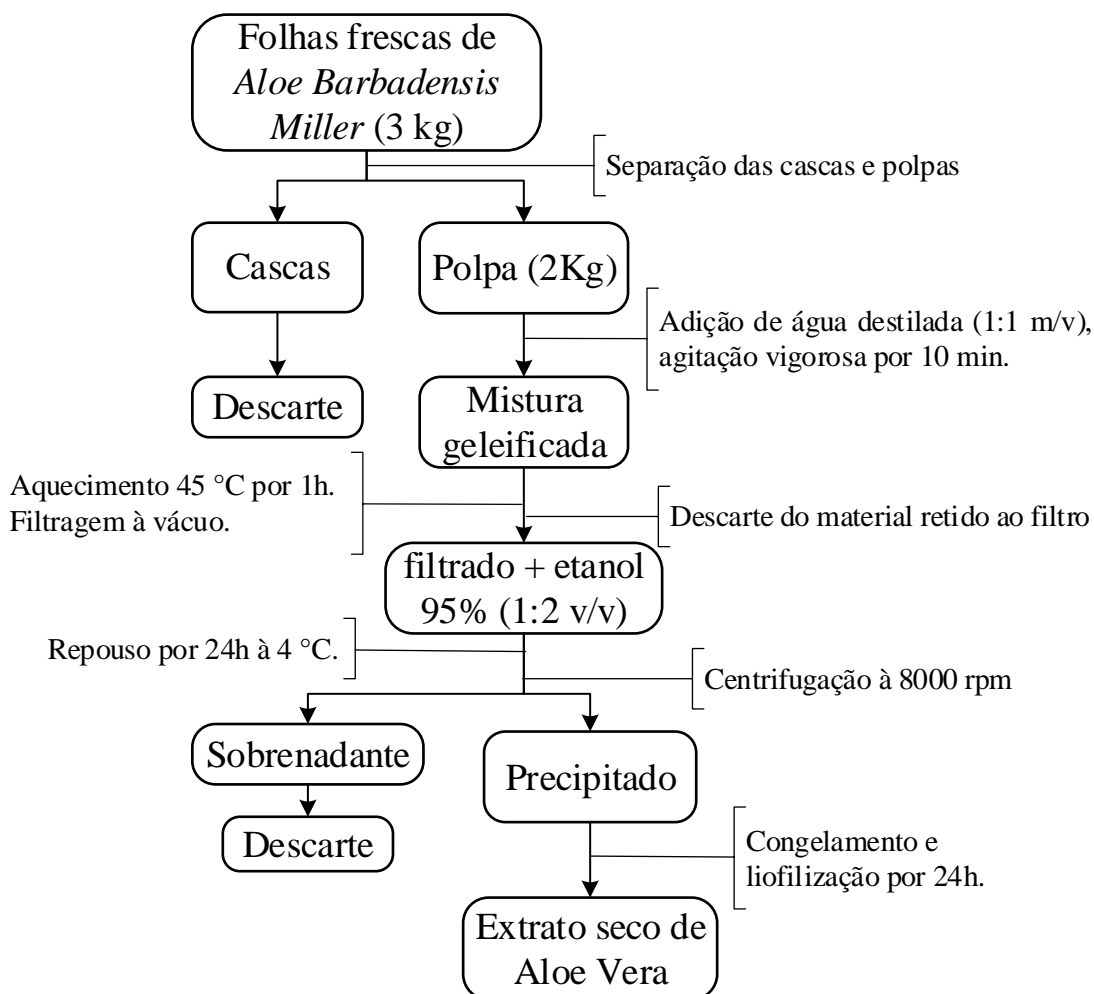


FIGURA 4.2 - Fluxograma do processo de obtenção do extrato de Aloe.

4.2.3 - Preparo das soluções poliméricas

Para produção das diferentes MNP foram preparadas soluções poliméricas de PLA, PLA/GSE, PLA/PEO, PLA/PEO/GSE, PLA/ALOE e PLA/ALOE/GSE. As composições destas soluções foram estudadas, analisadas e avaliadas exaustivamente, quanto ao solvente utilizado, concentração polimérica, proporções poliméricas das blendas e concentração incorporada de GSE. Durante estas extensivas análises, definiu-se a utilização dos solventes DMF e acetona na proporção 1:1, por esta mistura solubilizar tanto os compostos hidrofílicos quanto os hidrofóbicos. Quanto a concentração polimérica, a proporção de 9% de polímero (m/v) foi a que produziu nanofibras com melhores características morfológicas, adequadas ao estudo. Para as blendas poliméricas foi mantida a concentração total de polímeros à 9% (m/v), variando a proporção entre os

polímeros, sendo que a melhor proporção para a blenda PLA/PEO foi a de 88/12 (m/m). Para a blenda PLA/ALOE a proporção estabelecida foi de 95:05 (m/m), devido à dificuldade de solubilização de maiores concentrações de ALOE. Detalhes do preparo destas soluções são descritos a seguir.

4.2.3.1 - Soluções poliméricas de PLA e PLA/GSE

Após realização de testes iniciais para escolha e proporção dos solventes, uma solução 9% (m/v) de PLA em uma mistura de DMF e acetona (1:1 v/v) foi preparada sob agitação magnética por 3 h a temperatura ambiente. Para as soluções de PLA/GSE partiu-se de uma solução de PLA na mesma concentração descrita acima e adicionou-se duas concentrações do extrato: 10% e 20% (m/m) em relação ao PLA, as quais foram mantidas sob agitação magnética por 1 h a temperatura ambiente, como mostrado na FIGURA 4.3.

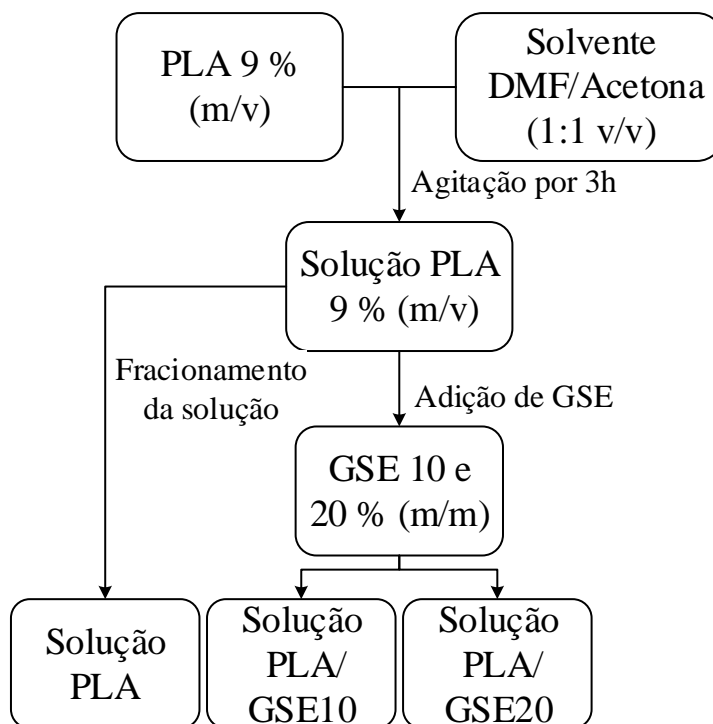


FIGURA 4.3 - Esquema do processo de obtenção das soluções da PLA com adição do GSE.

4.2.3.2 - Soluções da blenda polimérica PLA/PEO, PLA/PEO/GSE

A fim de avaliar a influência do caráter de hidrofiliçidade da superfície das mantas poliméricas no perfil de liberação do extrato, soluções contendo 9% (m/v) da blenda polimérica de PLA e PEO (88:12 m/m) foram preparadas em DMF e acetona (1:1 v/v).

Primeiramente, o PEO foi solubilizado em DMF e mantido sob agitação magnética por 1 h. Após, adicionou-se o PLA mantendo-se a agitação constante e, na sequência, adicionou-se acetona e a agitação foi mantida até total solubilização do PLA. As soluções de PLA/PEO/GSE foram preparadas com a adição do extrato nas concentrações de 10% e 20% (m/m) à mesma solução de PLA/PEO, FIGURA 4.4. A concentração do GSE foi calculada em relação à da blenda polimérica.

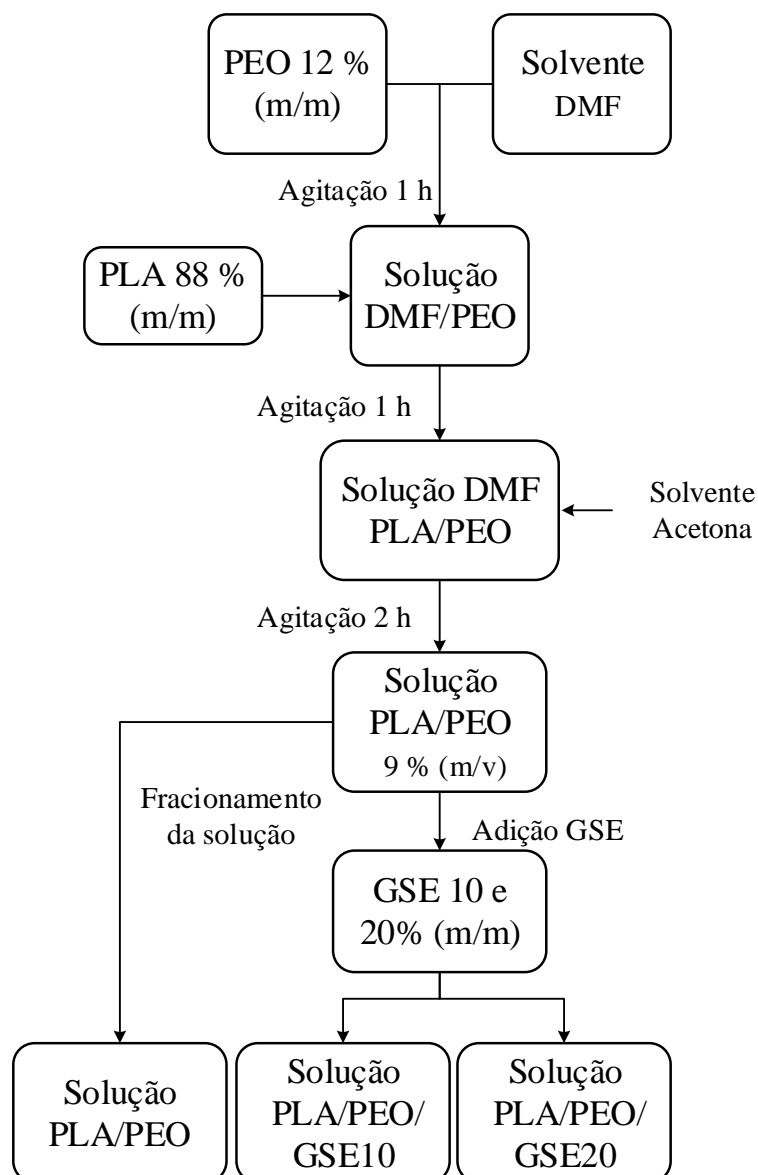


FIGURA 4.4 - Esquema de obtenção das soluções PLA/PEO, PLA/PEO/GSE10 e PLA/PEO/GSE20.

4.2.3.3 - Soluções da mistura PLA/ALOE e PLA/ALOE/GSE

Soluções contendo 9% (m/v) da mistura de PLA e ALOE (95:05 m/m) foram preparadas em DMF e acetona (1:1 v/v).

Primeiramente, o extrato de Aloe foi solubilizado em DMF, sob agitação magnética por 6 h. Após, adicionou-se o PLA mantendo-se a agitação constante e, na sequência, adicionou-se acetona e a agitação foi mantida até total solubilização do PLA. As soluções de PLA/ALOE/GSE foram preparadas com a adição do GSE nas concentrações de 10% e 20% (m/m) à mesma solução 9%

(m/v) PLA/ALOE, conforme mostrado na FIGURA 4.5. A concentração do GSE foi calculada em relação à massa total de PLA/ALOE.

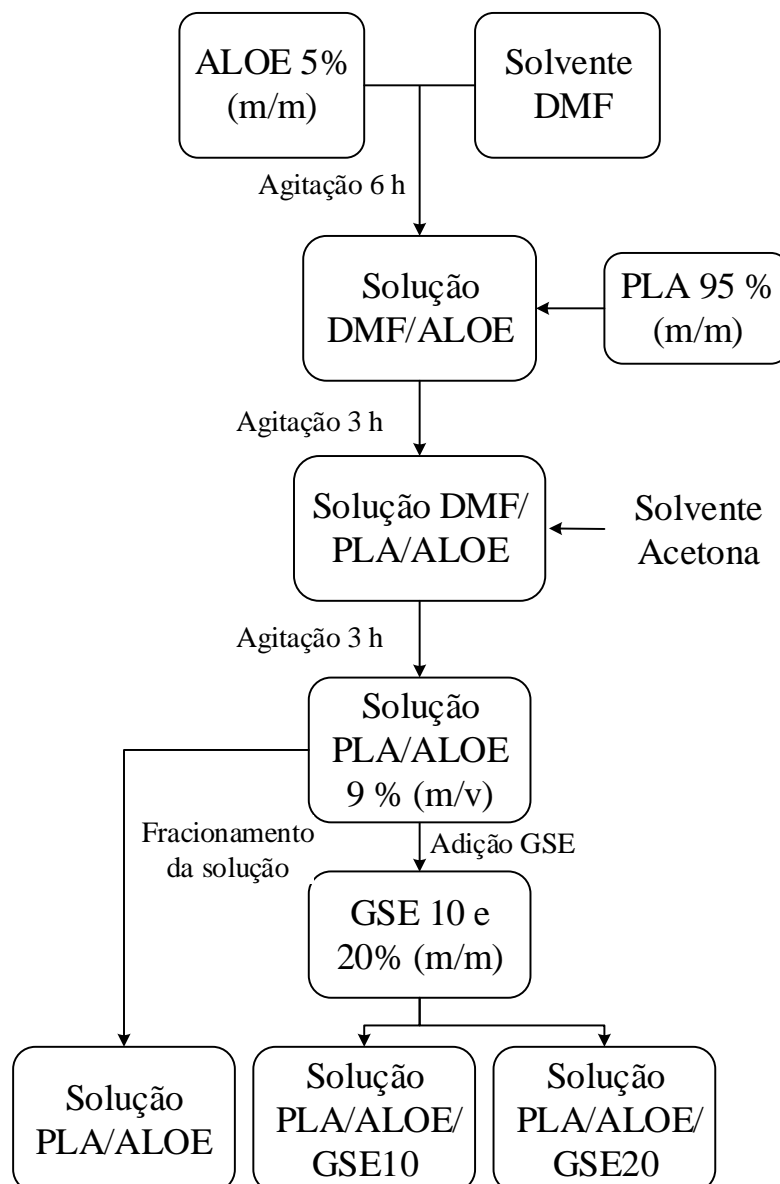


FIGURA 4.5 - Esquema de obtenção das soluções PLA/ALOE, PLA/ALOE/GSE10 e PLA/ALOE/GSE20.

4.2.4 - Produção de mantas pela técnica de eletrofição

As diferentes soluções poliméricas descritas anteriormente foram empregadas para obtenção de MNPs utilizando-se a técnica de eletrofição, cuja imagem do aparato experimental está mostrada na FIGURA 4.6. O aparato é composto por uma fonte de alta tensão, empregada para tensões elétricas da ordem

de kVs, um coletor cilíndrico rotativo, uma bomba de infusão, e uma seringa de vidro acoplada a uma agulha hipodérmica de diâmetro interno 0,8 mm.

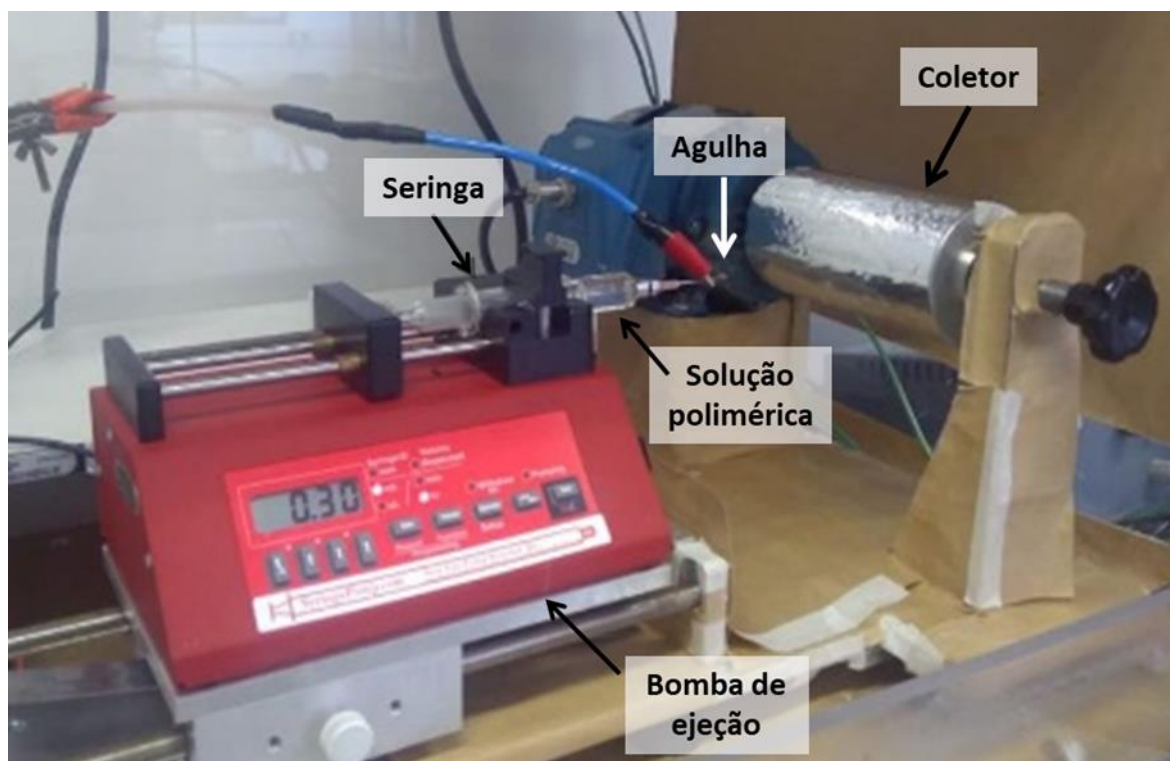


FIGURA 4.6 - Fotografia digital do aparato experimental da técnica de eletrofição.

Os parâmetros de eletrofição foram otimizados e os valores selecionados de tensão, distância de trabalho e vazão da solução polimérica foram 17 kV, 9 cm e 1 mL.h^{-1} , respectivamente. As mantas poliméricas eletrofiadas foram denominadas de acordo com a TABELA 4.1.

TABELA 4.1- Composição química das diferentes MNPs obtidas pela técnica de eletrofiação.

Sigla	PLA (% m/v)	PEO (% m/v)	ALOE (% m/v)	GSE (% m/m)
PLA	100	–	–	–
PLA/GSE10	100	–	–	10
PLA/GSE20	100	–	–	20
PLA/PEO	88	12	–	–
PLA/PEO/GSE10	88	12	–	10
PLA/PEO/GSE20	88	12	–	20
PLA/ALOE	95	–	5	–
PLA/ALOE/GSE10	95	–	5	10
PLA/ALOE/GSE20	95	–	5	20

4.2.5 - Caracterização físico-química

4.2.5.1 - Microscopia eletrônica de varredura

A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para analisar a morfologia e diâmetro das nanofibras. O equipamento utilizado foi um microscópio JEOL - modelo JSM 6510/GS, operando com uma tensão de 10 kV. Todas as amostras, foram fixadas em porta-amostra, utilizando fita de carbono e recobertas com ouro. O diâmetro das nanofibras foi estimado a partir das imagens de MEV considerando uma amostragem mínima de 100 fibras, utilizando o software ImageJ – *National Institutes of Health*, – (<http://imagej.nih.gov/ij>).

4.2.5.2 - Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

Os espectros na região do infravermelho (FTIR) das amostras foram adquiridos com um espectrofotômetro Bruker (Vertex 70), com módulo ATR no intervalo de 3000 cm^{-1} a 600 cm^{-1} . Foram realizadas 64 varreduras por espectro, utilizando resolução de 2 cm^{-1} .

4.2.5.3 - Análises térmicas

As análises termogravimétricas (TGA) foram realizadas utilizando o equipamento TA Instruments (Q500), em atmosfera de ar sintético com fluxo de $60\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e temperatura de 25 a 700°C com rampa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

As análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram feitas no equipamento TA Instruments (Q100), em atmosfera de nitrogênio com fluxo de $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ com rampa de aquecimento e resfriamento de $10^{\circ}\text{C}\text{ min}^{-1}$. As análises foram feitas na faixa de temperatura de 25 a 180°C .

4.2.5.4 - Ângulo de contato

As medidas de ângulo de contato foram realizadas no equipamento – CAM 101 modelo KSV Instruments, equipado com câmera CCD – KGV 5000. Para as medidas gotejou-se na superfície das mantas, 5 μL de uma solução Tampão Fosfato Salino (PBS pH 7,4) e o ângulo de contato foi calculado automaticamente pelo software – KSV CAM 2008. Os valores obtidos em quintuplicata por amostra, permitiram estimar o caráter hidrofílico/hidrofóbico das mantas.

4.2.6 - Estudo da degradação das MNPs

Para avaliar o perfil de degradação das diferentes mantas obtidas, 5 mg de cada MNP foram imersas em 10 mL de tampão PBS (pH 7,4) e mantidas sob agitação de 150 rpm a temperatura controlada de 37°C. As MNPs foram analisadas nos períodos de 7, 15, 21, 28 e 35 dias. As mesmas foram lavadas com água destilada e secas em dessecador à vácuo até massa constante. As análises foram realizadas em triplicata.

O percentual de perda de massa foi calculado de acordo com a EQUAÇÃO 1.

$$Perda\ Massa(\%) = \left(\frac{M_0 - M_t}{M_0} \right) \times 100 \quad \text{EQUAÇÃO 1}$$

Onde: M_0 (massa da amostra seca antes da incubação, mg);

M_t (massa da amostra seca após a incubação, mg).

4.2.7 - Eficiência de encapsulamento

A eficiência de encapsulamento (EE) foi determinada de acordo com metodologia reportada por CHYSINUAN et al. (2009)⁷⁷. Para isso, cerca de 6 mg das mantas de nanofibras contendo o GSE foram dissolvidas em uma mistura DMF/acetona (1:1, v/v) e a quantidade de extrato encapsulado foi determinada empregando-se a técnica de espectroscopia de UV-vis (Shimadzu – UV 1100), através do monitoramento da absorção em 278 nm. As análises foram feitas em triplicatas. Foram utilizadas como branco as mantas sem extrato, solubilizadas na mesma mistura de solventes. A concentração do extrato foi determinada utilizando uma curva de calibração previamente estabelecida e a eficiência de encapsulamento foi calculada de acordo com a EQUAÇÃO 2.

$$EE (\%) = \frac{\text{conc. de GSE na nanofibra}}{\text{conc. teórica de GSE}} \times 100 \quad \text{EQUAÇÃO 2}$$

Onde: conc. de GSE na nanofibra (concentração de GSE presente na nanofibra).

conc. teórica de GSE (concentração adicionada de GSE no preparo das nanofibras).

4.2.8 - Estudo de atividade antioxidativo do GSE

O método empregado para estabelecer a atividade antioxidante do GSE foi a do sequestro do radical DPPH, descrita por ANAMARIJA et al (2008), com modificações. O potencial oxidativo do GSE foi avaliado pela diminuição do valor de absorbância em 516 nm, decorrente do consumo do radical livre DPPH, utilizando o espectrofotômetro UV-vis, (Shimadzu, modelo 1100). Para a construção da curva de calibração, soluções metanólicas de DPPH nas concentrações 1, 5, 10, 20, 30 e 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foram utilizadas, na qual metanol foi empregado como branco.

Soluções metanólicas de GSE foram preparadas nas concentrações: 75; 56,25; 37,5; 18,75 e 7,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Também foram preparadas soluções metanólicas de ácido gálico nas mesmas concentrações, utilizado como amostra padrão do potencial oxidativo. Também foram dissolvidas em solução de DMF/acetona (1:1) mantas de PLA/GSE, PLA/PEO/GSE e PLA/ALOE/GSE, e soluções metanólicas destas misturas foram preparadas na concentração de 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. À estas soluções foi adicionado uma solução de DPPH em metanol (40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) na proporção 9:1 (v/v). As misturas reacionais foram mantidas ao abrigo de luz por 60 minutos e após este período, mediu-se os valores de absorbância das amostras. Todas as análises foram realizadas em triplicata e para determinar a atividade antioxidante do GSE em pó e do encapsulado nas nanofibras, utilizou-se a EQUAÇÃO 3.

$$AA (\%) = \frac{(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}})}{A_{\text{controle}}} \times 100 \quad \text{EQUAÇÃO 3}$$

4.2.9 - Ensaio de liberação *in vitro* do GSE

Para determinar a concentração de GSE liberado em tampão PBS, primeiramente, foi construída uma curva de calibração utilizando-se soluções de GSE em PBS nas seguintes concentrações: 0,12, 0,090, 0,060, 0,030, 0,015, 0,0075 e 0,0060 mg mL⁻¹. Os valores de absorbância foram medidos em 278 nm utilizando espectrofotômetro UV-vis (Shimadzu – 1100).

As MNPs contendo diferentes concentrações de GSE foram imersas em 15 mL de tampão PBS (pH 7,4) e mantidas sob agitação magnética à temperatura de 37°C. Em intervalos de tempo estabelecidos, foram retiradas alíquotas de 2 mL e igual volume de PBS foi adicionado. Os ensaios de liberação foram monitorados por um período de 720 horas, conforme ilustrado na FIGURA 4.7. Todos os resultados foram obtidos em triplicata. A taxa de extrato liberado foi calculada utilizando a EQUAÇÃO 4.

$$\text{Liberação acumulada (\%)} = (M_t / M_0) \times 100 \quad \text{EQUAÇÃO 4}$$

Onde: M_t : Massa de GSE liberada no instante t

M_0 : Massa de GSE encapsulada na manta polimérica

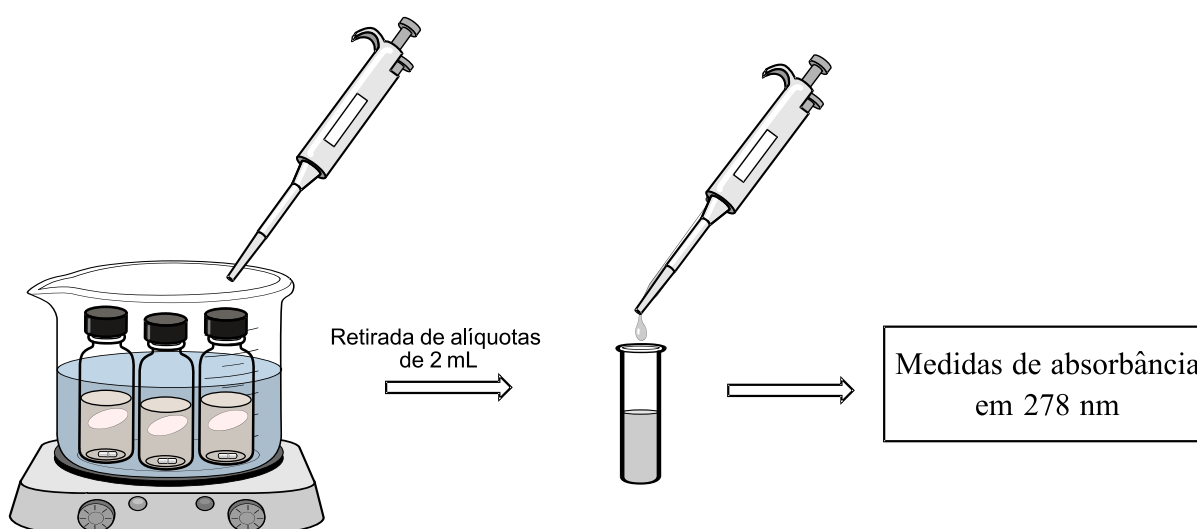


FIGURA 4.7 - Representação esquemática do procedimento experimental dos ensaios de liberação *in vitro* do GSE.

4.2.10 - Ensaios biológicos *in vitro*

Os ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular (adesão e proliferação) foram realizados no laboratório de inflamação e doenças infecciosas (LIDI) – UFSCar, em parceria com a Profa. Dra. Fernanda Anibal do departamento de morfologia e patologia (DMP) – UFSCar.

Para a realização dos ensaios *in vitro*, fibroblastos da linhagem HFF1 (fibroblastos de pele humana) foram cultivados no meio de cultura de Eagle, modificado por Dulbelcco (DMEM, Sigma Chemical Company, St. Louis MO, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução antibiótica Pen/Strep (Gibco, EUA). As células foram mantidas em estufa a 37°C, em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de CO₂ (Thermo Scientific, EUA). O monitoramento do crescimento celular foi realizado a cada 24 horas, utilizando microscópio invertido de fase (OLYMPUS, JAPÃO). Quando a monocamada celular tornou-se subcofluyente, foi realizado o subcultivo de perpetuação da linhagem celular. Para o repique, o sobrenadante foi removido, as células lavadas com PBS para a retirada de resíduos celulares e, após este procedimento, foram adicionados 5 mL da enzima Tryple® (Sigma, EUA) e mantido a 37°C. Após a incubação, realizou-se nova lavagem com meio de cultura. A separação das células e o meio foi realizada por centrifugação a 1500 rpm a 4°C por 5 minutos e, posteriormente, as células foram ressuspensas em meio de cultura.

4.2.10.1 - Cultivo dos fibroblastos em placas contendo as MNPs

Após os processos de cultivo celular alcançarem a qualidade e quantidade necessária de células, foram inoculadas 5×10^4 células por poço em placas de 24 poços. Em cada poço foram distribuídos os diferentes tipos de MNPs, exceto no grupo controle, no qual foram inoculadas as células sem MNP. As placas de poços utilizadas não continham tratamento anti-adesão celular em suas paredes, possibilitando a adesão celular não somente ao material, mas também às paredes dos poços. As placas com tratamento anti-adesão foram utilizadas para a

inoculação do grupo controle. Após a semeadura, as culturas foram mantidas em estufa a 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂. Para garantir reprodutibilidade dos dados, o ensaio foi realizado em triplicata.

4.2.10.2 - Ensaio de MTT

Para a avaliação da proliferação celular, foi analisada a atividade mitocondrial das células utilizando o ensaio de citotoxicidade baseado em MTT, que envolve a conversão do 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) em formazano insolúvel, cuja reação provoca a mudança de coloração do material mitocondrial de amarelo para roxo. Assim, após 24 horas do inóculo, cada poço recebeu 10% (v/v) de solução de MTT e após 4 horas de incubação, foi realizada a leitura da absorbância do inóculo em um leitor de microplacas, Multiskan FC (Thermo Scientific®), a 570 nm.

O ensaio de Azul de Trypan foi realizado para determinar a viabilidade e crescimento celular dos fibroblastos. O ensaio consiste na marcação por tingimento das células utilizando o reagente Azul de Trypan. Após a marcação foram retiradas alíquotas do inóculo celular de cada poço e inseridas em câmara de Neubauer para contagem destas células em microscópio invertido de fase (OLYMPUS, JAPÃO).

Após os ensaios de MTT, imagens de MEV das mantas foram obtidas para avaliar possíveis alterações da morfologia de HFF-1 e o processo de adesão celular após 12, 24 e 48 horas de incubação. Para isso, as mantas foram lavadas com tampão PBS, para remoção das células não aderidas, e posteriormente fixadas com o reagente Karnovsky's. As mantas foram desidratadas utilizando-se soluções etanólicas de diferentes concentrações e secas à temperatura ambiente.

4.2.10.3 - Análise estatística

Os resultados das médias e desvios-padrão foram submetidos a testes de Normalidade, utilizando o teste de Shapiro - Wilk`s para todas as variáveis. Para a comparação dos grupos experimentais foi utilizado o teste de ANOVA e teste post hoc de Tukey. Os valores apresentados foram considerados significativos quando $P \leq 0,05$. Para isto utilizou-se o software GraphPad Prism. (Versão 7.04 for Windows).⁷⁸

5 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 - Caracterização físico-química das mantas poliméricas

Durante o trabalho de doutoramento foram desenvolvidas 9 formulações distintas de mantas poliméricas: PLA, PLA/GSE10, PLA/GSE20, PLA/PEO, PLA/PEO/GSE10, PLA/PEO/GSE20, PLA/ALOE, PLA/ALOE/GSE10 e PLA/ALOE/GSE20. Para obtenção destas mantas com características adequadas para aplicação como matriz de liberação de antioxidante, iniciou-se pela otimização dos parâmetros da técnica de eletrospinning, incluindo as variáveis de processo (tensão, distância de trabalho e vazão de ejeção) e da solução polimérica (concentração polimérica e solventes). Após determinar a melhor condição experimental, mantas poliméricas flexíveis com aspecto homogêneo e de fácil manuseio foram obtidas como ilustrado na FIGURA 5.1.

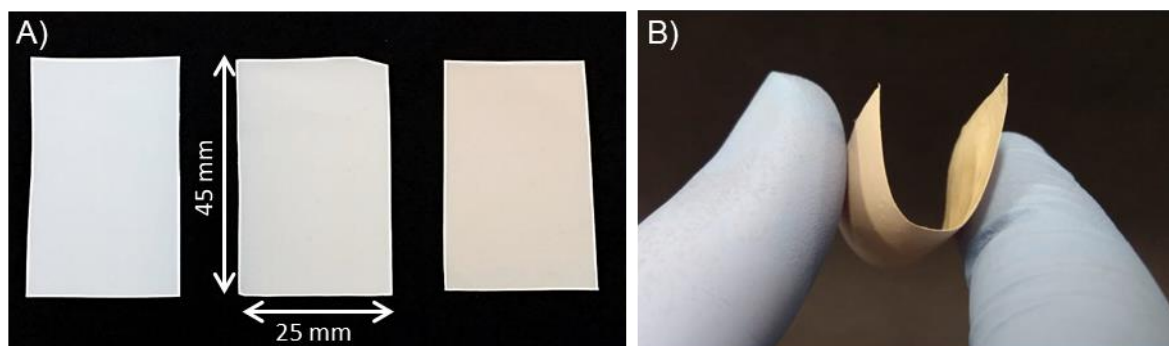


FIGURA 5.1 - Fotografias (A) das mantas poliméricas de PLA, PLA/GSE10 E PLA/GSE20, respectivamente. (B) imagem demonstrando a flexibilidade de uma das mantas.

5.1.1 - Microscopia eletrônica de varredura

As mantas foram caracterizadas por imagens de MEV para avaliação da morfologia e diâmetro das nanofibras. A FIGURA 5.2, mostra as imagens obtidas e os respectivos histogramas de distribuição de tamanho das nanofibras de PLA, PLA/PEO e PLA/ALOE. Como observado, foram obtidas nanofibras

homogêneas com superfície lisa e randomicamente orientadas para as três formulações. As nanofibras de PLA apresentaram diâmetro de 149 ± 23 nm de diâmetro, como mostrado na FIGURA 5.2 (A-B). A adição de PEO resultou em um aumento do diâmetro (304 ± 46 nm), mostrado na FIGURA 5.2 (C-D), devido ao aumento do volume livre que ocorre após a formação da blenda, o que pode ser atribuído as diferentes conformações entre cada uma das fases da blenda, reduzindo o empacotamento das cadeias de PLA ⁷⁹. O mesmo comportamento foi observado após a incorporação do extrato de *Aloe Vera* às nanofibras de PLA, FIGURA 5.2 (E-F), resultando em nanofibras com diâmetro de 281 ± 55 nm. É importante salientar que em função do reduzido diâmetro, as nanofibras possuem elevada razão área/volume o que é uma característica importante para a aplicação como matriz para liberação controlada de fármacos.

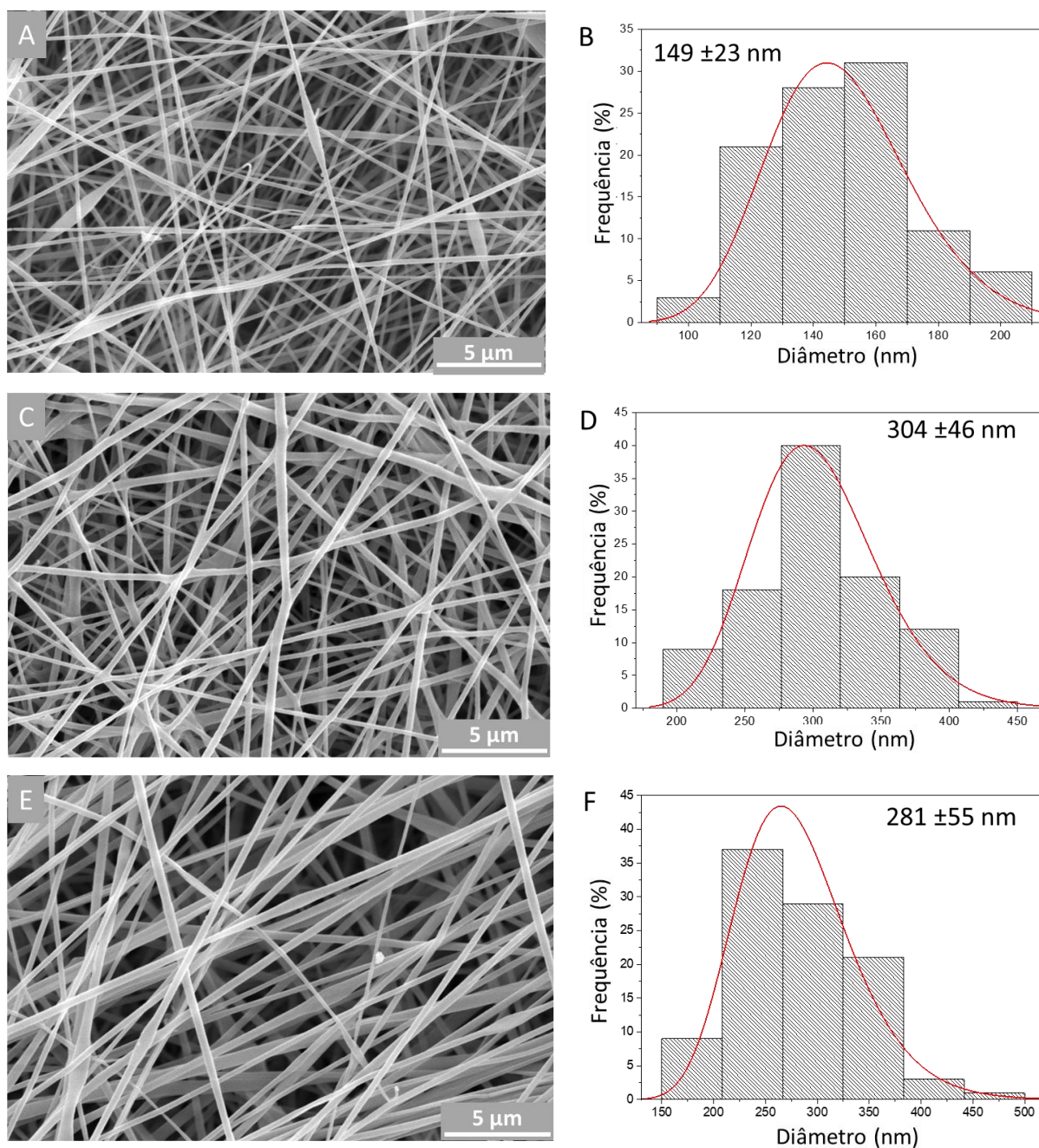


FIGURA 5.2 - (A, C, E) Imagens de MEV e (B,D,F) histogramas de distribuição de diâmetros das nanofibras de PLA, PLA/PEO, PLA/ALOE, respectivamente.

Após a incorporação do GSE nas concentrações de 10 e 20 % (m/m), não foi observado nenhuma alteração significativa na morfologia e diâmetros médios, como observado na FIGURA 5.3 e TABELA 5.1.

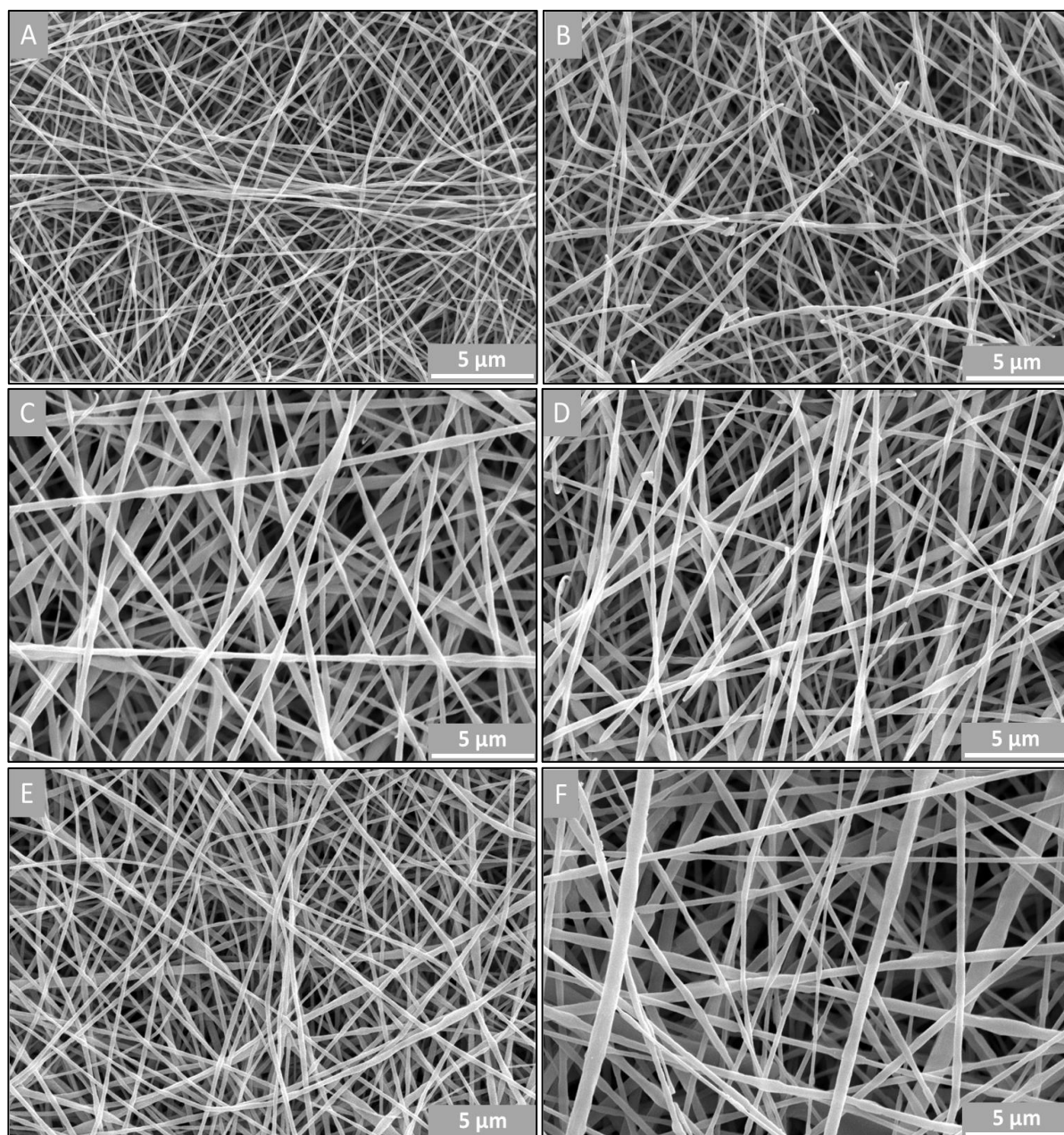


FIGURA 5.3 - Imagens de MEV das nanofibras de (A) PLA/GSE10, (B) PLA/GSE20, (C) PLA/PEO/GSE10, (D) PLA/PEO/GSE20, (E) PLA/ALOE/GSE10 E (F) PLA/ALOE/GSE20.

TABELA 5.1 - Tabela com o diâmetro médio das nanofibras para as diferentes formulações.

Amostras	Diâmetro médio (nm)
PLA	149 ±23
PLA/GSE10	130 ±25
PLA/GSE20	152 ±29
PLA/PEO	304 ±46
PLA/PEO/GSE10	271 ±66
PLA/PEO/GSE20	213 ±55
PLA/ALOE	281 ±55
PLA/ALOE/GSE10	233 ±54
PLA/ALOE/GSE20	306 ±64

5.1.2 - Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

A FIGURA 5.4 (A), apresenta os espectros de FTIR das nanofibras de PLA, PLA/PEO e PLA/ALOE. Em todas as amostras foi possível observar as bandas relativas às vibrações dos grupos funcionais do PLA, entre as quais podemos destacar as bandas em 1752 cm^{-1} relativa a ligação C=O, 1184 e 1086 cm^{-1} associadas ao grupamento C-O-C e em 1453 e 1382 cm^{-1} relacionadas a deformação da ligação C-H ⁸⁰. Além das bandas características do PLA, foi possível observar no espectro das nanofibras de PLA/PEO o modo de vibração adicional em 2890 cm^{-1} relacionado à deformação C-H da cadeia do PEO ⁷⁹. Para as nanofibras de PLA/ALOE o espectro obtido foi similar ao obtido pelas nanofibras de PLA, o que pode ser relacionado à sobreposição das bandas ou à baixa concentração de ALOE utilizada. A FIGURA 5.4 (B) apresenta o espectro do GSE puro e das nanofibras após a incorporação do mesmo. O GSE é composto principalmente por compostos fenólicos como procianidinas, catequinas, epicatequinas e ácido gálico, por exemplo¹⁹. Bandas características destes compostos foram observadas em 3300 cm^{-1} correspondente à ligação O-H, em 1604 e 1520 cm^{-1} referente à deformação do grupo -C=C-O de anéis

heterocíclicos, em 1437 cm^{-1} associada à deformação C-H de anéis aromáticos, em 1283 e 1104 cm^{-1} relativas à vibração C-O^{81,82}. Após a incorporação do GSE, um modo vibracional adicional, indicados por setas na FIGURA 5.4 (B), associado ao grupamento -C=C-O do extrato, foi observado em 1619 , 1616 e 1614 cm^{-1} para as nanofibras de PLA/GSE20, PLA/PEO/GSE20 e PLA/ALOE/GSE20, respectivamente. Essas bandas encontram-se deslocadas em relação ao espectro do GSE puro, indicando uma interação entre a matriz polimérica e o GSE, possivelmente através de ligações de hidrogênio^{47,80,83}. O mesmo comportamento foi observado para as nanofibras contendo 10 % (m/m) de GSE. Estes resultados demonstram que o método de incorporação do GSE às diferentes matrizes foi realizado com sucesso.

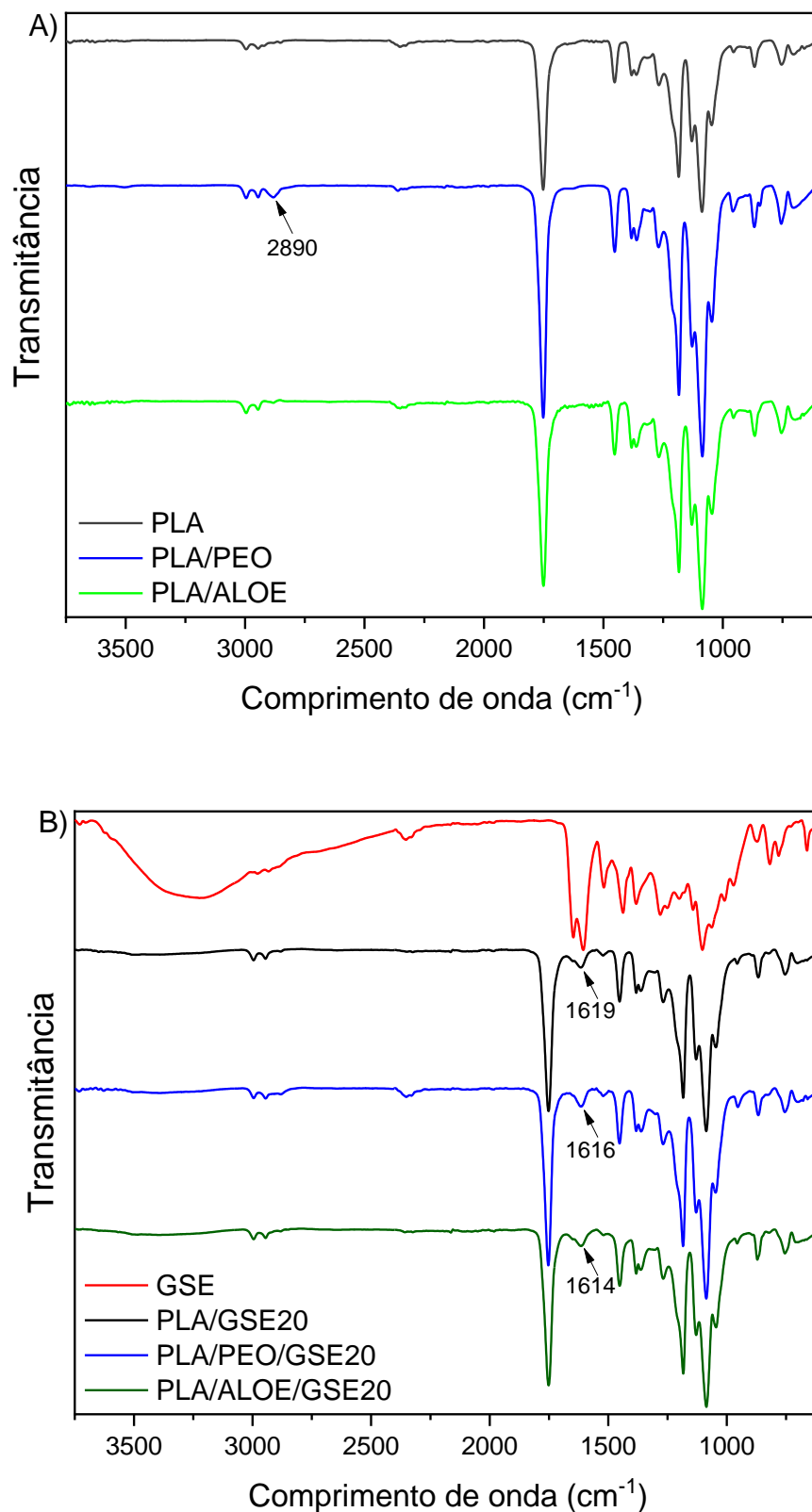


FIGURA 5.4 - Espectros de FTIR das nanofibras de (A) PLA, PLA/PEO, PLA/ALOE e (B) GSE, PLA/GSE20, PLA/PEO/GSE20 e PLA/ALOE/GSE20

5.1.3 - Análises Térmicas

Os termogramas apresentados na FIGURA 5.5 (A e B) mostram que as nanofibras de PLA, PLA/PEO e PLA/ALOE se decompõem em um único evento térmico. As nanofibras de PLA se decompõem na faixa de temperatura de 295 – 370 °C. Em consequência da adição do PEO e do ALOE foi observado uma diminuição da temperatura de início da degradação, para 220 °C, quando comparado às nanofibras de PLA. A diminuição da estabilidade térmica do PLA nestes casos pode ser atribuída ao fato que o PEO e o ALOE podem intercalar em torno das cadeias poliméricas do PLA, diminuindo as interações entre as cadeias poliméricas^{79,84}. Como pode ser observado na FIGURA 5.5 (C e E), a curva de TGA do GSE mostrou um evento inicial de perda de massa (4 %) abaixo de 100 °C associado a dessorção de moléculas de água, seguido por sua decomposição na faixa de 120 a 515 °C. A curva de DTg FIGURA 5.5 (D e F) para o GSE apresentou um pico largo entre 120 – 290 °C seguido por dois outros picos a 430 e 505 °C, sugerindo a sobreposição de vários processos que ocorrem em decorrência da variedade de moléculas que compõe o extrato^{84,85}. As curvas de TGA/DTg para as nanofibras contendo 10 e 20 % de GSE apresentaram perfil de degradação similar, onde foram observados dois estágios de perda de massa, relacionados à degradação da matriz polimérica seguida pela decomposição do extrato. A temperatura do segundo pico de degradação, correspondente à temperatura de degradação do GSE, diminuiu significativamente após o processo de encapsulamento, o que provavelmente está relacionado à dissolução/dispersão do composto bioativo antes do encapsulamento. Este mesmo comportamento foi observado por ACEITUNO-MEDINA et al, 2015 após a encapsulação de quercitina e ácido ferúlico em matriz do polissacarídeo Pululano, empregando-se a técnica de eletrofiação⁸⁶.

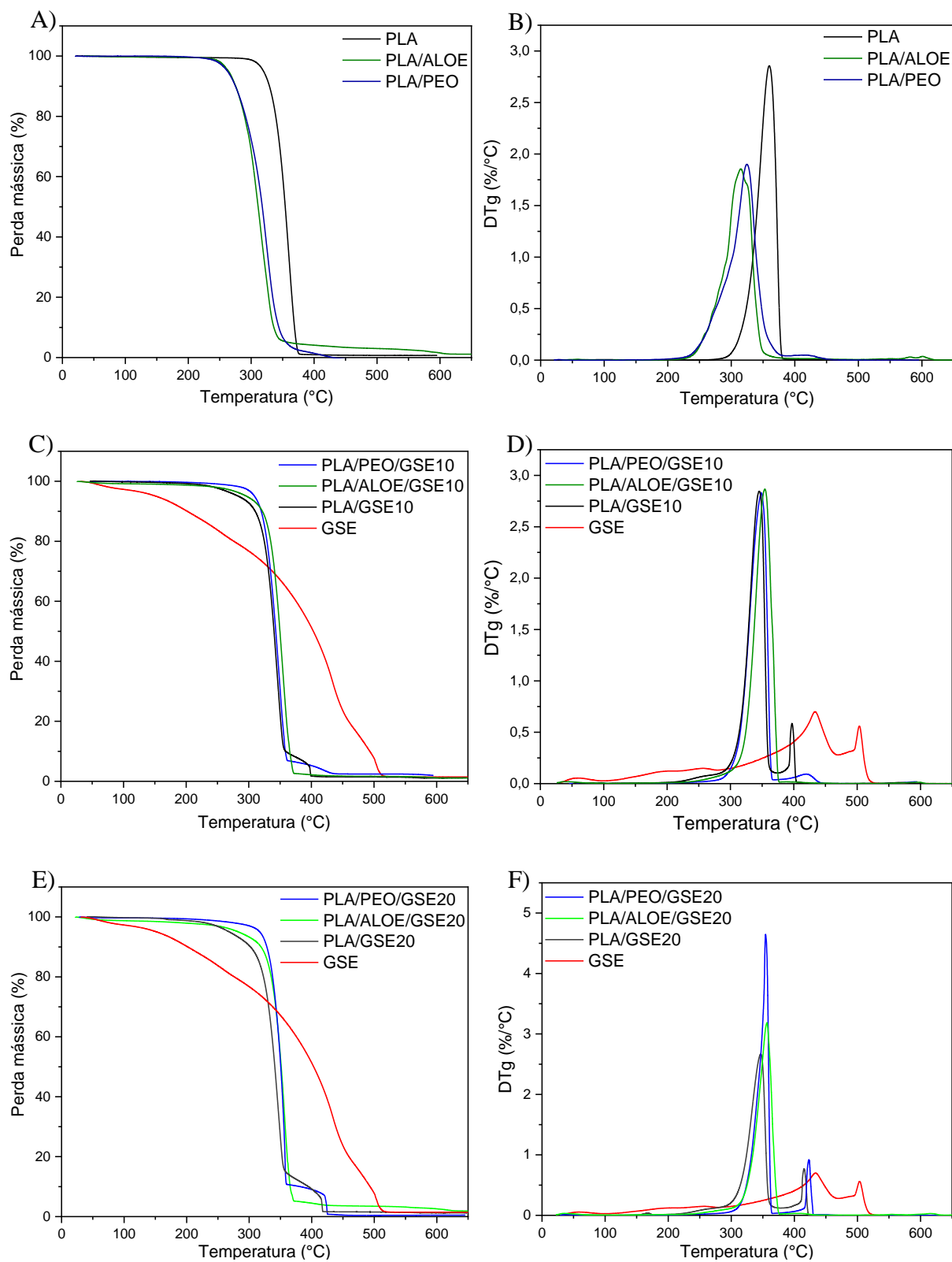


FIGURA 5.5 – (A, C e E) curvas de TGA e (B, D e F) curvas de DTg das mantas de PLA, PLA/PEO e PLA/ALOE com 10 e 20 % (m/m) de GSE.

As propriedades térmicas das mantas poliméricas também foram avaliadas pela técnica de DSC, conforme ilustrado na FIGURA 5.6 (A – F). Na primeira corrida de aquecimento, FIGURA 5.6 (C), todas as amostras apresentaram o evento térmico relacionado à transição vítrea (T_g) do PLA em torno de 60 °C. Após a incorporação do PEO foi observado o surgimento do pico em torno de 56 °C referente a temperatura de fusão (T_m) do PEO. Como se pode observar, existe uma sobreposição considerável entre esses dois eventos o que dificultou a análise quantitativa da miscibilidade dos polímeros na formação da blenda, cujo comportamento também foi observado por DAI et al (2015)⁷⁹. Neste mesmo estudo, os autores observaram o pico relacionado à fusão de nanofibras de PEO com mesmo peso molecular em 72 °C. Com base neste dado, observa-se um deslocamento da T_m do PEO para temperaturas mais baixas quando são formadas as mantas de PLA/PEO e PLA/PEO/GSE. Essa mudança possivelmente está relacionada com a alteração do empacotamento das cadeias do PEO pelo PLA, prejudicando a cristalinidade do PEO. O mesmo comportamento foi observado para nanofibras de blendas de PLA com diferentes concentrações de poli(butileno adipato) utilizado como matriz para liberação de agente antireumático.⁸⁷ De acordo com a FIGURA 5.6 (C e E), nenhum evento relacionado ao GSE e ao ALOE foi identificado. Além disso, a adição destes dois compostos não provocou nenhum deslocamento significativo na T_g do PLA, possivelmente devido à baixa concentração utilizada.⁷⁵ Na segunda corrida de aquecimento, FIGURA 5.6 (D e F), a T_g do PLA foi observada na mesma temperatura de 60 °C para todas as amostras.

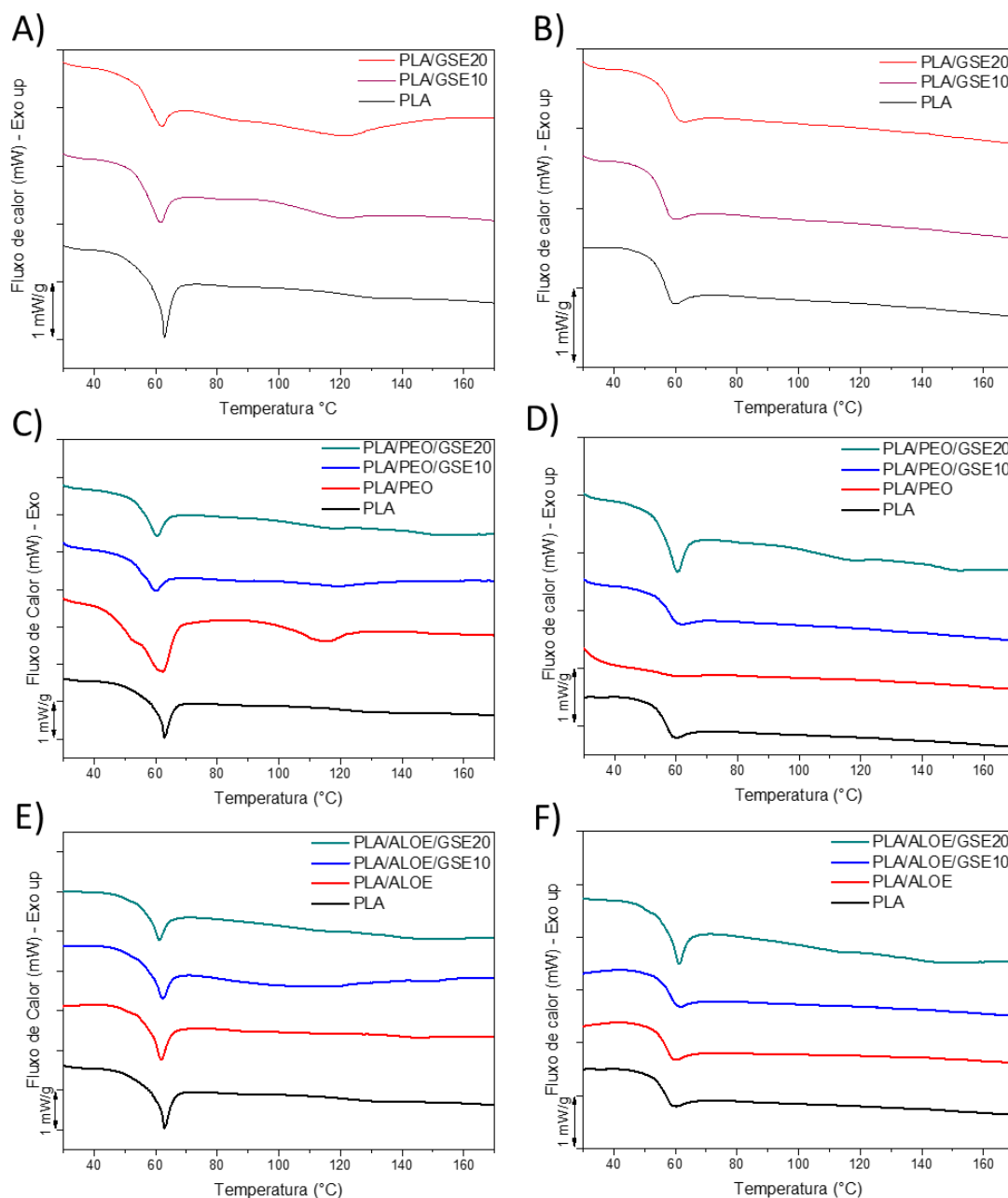


FIGURA 5.6 – Curvas de DSC (A, C e E) do primeiro e (B, D e F) segundo aquecimento das mantas PLA, PLA/PEO, PLA/ALOE, PLA/GSE 10 e 20 %, PLA/PEO/GSE 10 e 20 %, PLA/ALOE/GSE 10 e 20 %.

5.1.4 - Ângulo de contato

A natureza hidrofílica de um material é um parâmetro importante visando aplicações biomédicas, pois pode afetar a adesão e o crescimento celular em sua superfície⁸⁸. Para determinar esta natureza hidrofílica das mantas foram realizadas medidas de ângulo de contato. Como mostrado na FIGURA 5.7, as

mantas de PLA e PLA/ALOE apresentam natureza hidrofóbica com valores de ângulo em torno de 130° . Por outro lado, a blenda PLA/PEO apresentou um caráter hidrofílico, com ângulo de contato de 58° , originada pela presença do PEO na matriz, o qual introduz sítios preferenciais para interação com moléculas de água ³².

A incorporação de 10 e 20 % de GSE nas mantas de PLA e PLA/ALOE não resultou em qualquer alteração significativa no ângulo de contato, mantendo o caráter hidrofóbico das mantas. Entretanto, quando GSE foi adicionado nas mantas de PLA/PEO, as mantas apresentaram caráter hidrofóbico. Uma possível explicação para este comportamento é a formação de ligações de hidrogênio entre os grupamentos hidroxilas dos compostos fenólicos presentes no GSE e os grupos oxigenados presentes na cadeia do PEO levando, assim, a uma menor disponibilidade de sítios disponíveis para interação com moléculas de água ^{74,79}.

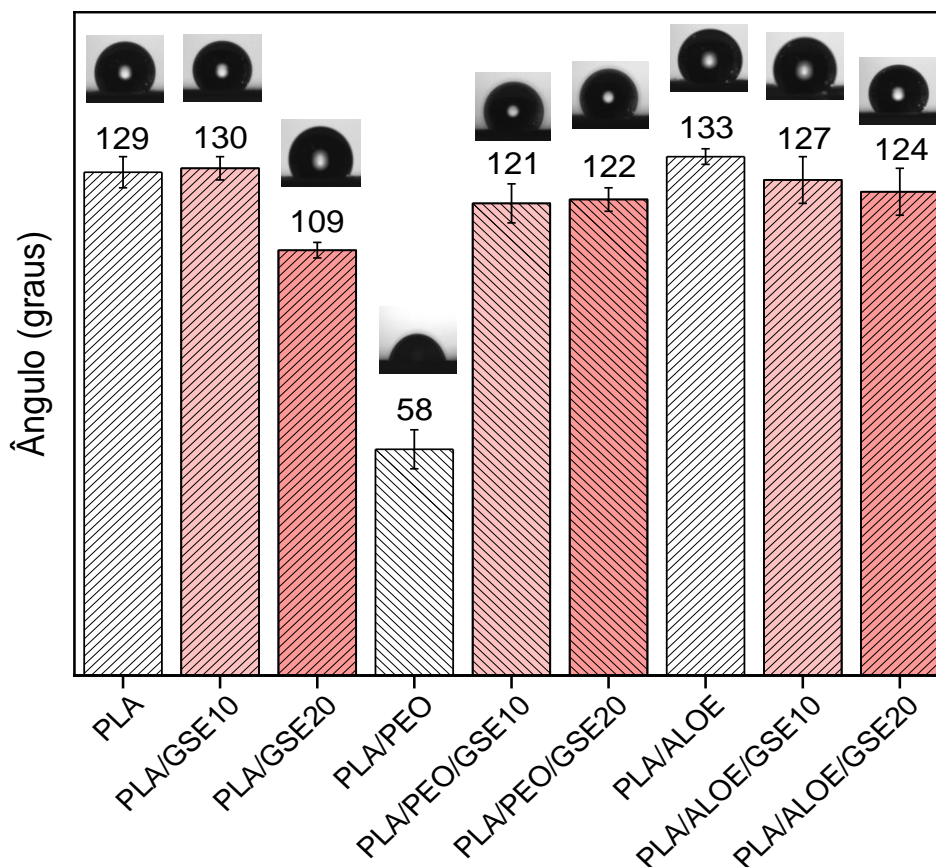


FIGURA 5.7 – Gráfico dos valores de ângulo de contato das mantas.

5.2 - Estudos de degradação das MNPs

A estabilidade em meio biológico de um material para aplicação como curativo é um parâmetro que deve ser avaliado, pois determina o tempo de vida útil do material empregado.⁸⁹ A biodegradabilidade das mantas de PLA, PLA/PEO e PLA/ALOE foi avaliada por ensaio de degradação hidrolítica na presença de tampão PBS (pH 7,4) por 35 dias, sendo as curvas de perda de massa em função do tempo apresentadas na FIGURA 5.8 (A). Foi observado que a manta composta por PLA não apresentou nenhuma alteração de massa durante o tempo de estudo. A baixa taxa de degradação do PLA pode relacionar-se com a baixa penetração e difusão de água na matriz polimérica devido à sua natureza hidrofóbica⁹⁰, corroborando com os dados apresentados no estudo de ângulo de contato. Foi observado perda de massa de aproximadamente 5 e 8 % para as

mantas de PLA/ALOE e PLA/PEO, respectivamente, estando relacionadas com a saída do PEO e ALOE da matriz polimérica devido as suas características hidrofílicas. Estes valores são próximos às massas teóricas incorporadas ao PLA para obtenção das mantas, sendo 5 % para o ALOE e de 12 % para PEO. Imagens de MEV das mantas após os ensaios de degradação, FIGURA 5.8 (B-D) mostraram que a morfologia das nanofibras mantiveram-se praticamente inalteradas.

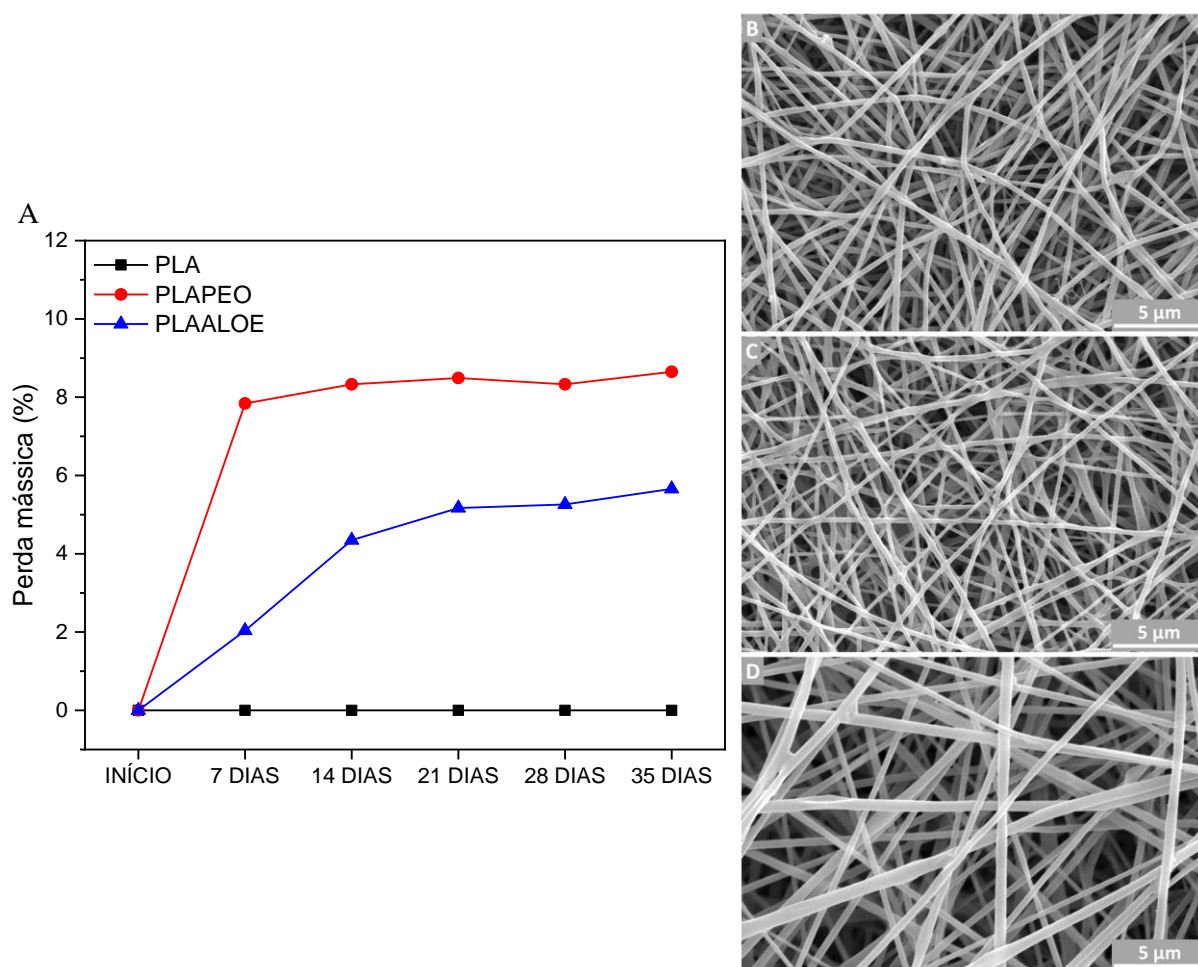


FIGURA 5.8 - (A) Curva de perda de massa das mantas em função do tempo em tampão PBS (pH 7,4 – 37 °C). Imagens de MEV das nanofibras de (B)PLA, (C) PLA/PEO e (D) PLA/ALOE após o ensaio de degradação hidrolítica.

5.3 - Eficiência de encapsulamento

A avaliação da eficiência de encapsulamento (EE) é outro parâmetro importante para aplicações biomédicas⁹¹. Para a concentração teórica de 10 % de

GSE foram encontrados valores de EE de 88 ± 2 , 87 ± 2 e 85 ± 3 para as nanofibras de PLA, PLA/PEO e PLA/ALOE. Valores similares de 86 ± 3 , 85 ± 2 e 86 ± 2 , foram encontrados para as nanofibras de PLA, PLA/PEO e PLA/ALOE contendo 20 % de GSE. Estes resultados indicam que a perda de GSE durante o processo de encapsulamento pela técnica de eletrofiação foi reduzida, oscilando entre 10 e 15 % evidenciando a alta eficiência de encapsulamento do GSE para estas matrizes poliméricas.

5.4 - Estudo de atividade antioxidante do GSE

O processo inflamatório é a resposta do sistema imunológico à injúrias, como uma lesão tecidual. Mediadores inflamatórios apresentam ainda a função de aumentar a permeabilidade vascular de modo que mais células de defesa cheguem a região afetada, auxiliando no processo de cicatrização⁹². Espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*) são importantes mediadores inflamatórios em condições patológicas⁴⁵, porém, o excesso de produção dessas espécies pode acarretar em uma perturbação no equilíbrio oxidativo celular, provocando danos aos tecidos e infecção, retardando o processo de regeneração tecidual⁹³. Sabe-se que o GSE possui uma forte ação antioxidante e capacidade de sequestrar ROS. Dessa forma, o GSE pode limitar o risco do desenvolvimento de processos associados ao estresse oxidativo tecidual⁴⁷. A fim de se avaliar a atividade antioxidante do GSE em pó e encapsulado nas nanofibras, foi realizado o ensaio de DPPH. Este método consiste na redução do radical DPPH relativamente estável à sua forma não radical na presença de um doador de H com atividade antioxidante⁸⁰, como esquematizado na FIGURA 5.9. O método de DPPH, por apresentar uma metodologia simplificada, com alta sensibilidade, rapidez, precisão e baixo custo, é amplamente utilizado para determinação da atividade antioxidante de extratos naturais e abundantes em grupamentos fenólicos, alimentos e amostras biológicas.^{41,94,95} O método consiste no monitoramento da absorbância da solução que decresce de acordo com o

consumo do radical DPPH, resultando na mudança da cor violeta escuro para o amarelo.⁹⁶

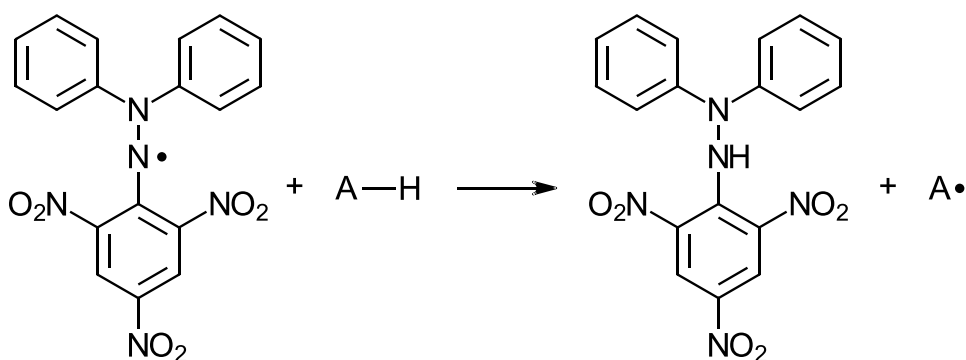


FIGURA 5.9 – Mecanismo reacional entre o radical DPPH e antioxidante através da transferência do átomo de hidrogênio.⁹⁷

Para balizar os valores obtidos de atividade antioxidante do GSE, foi utilizado como padrão de referência o ácido gálico, o qual possui elevada atividade antioxidante^{96,98}. Após 60 minutos, foram medidos os valores de absorvância das misturas reacionais de DPPH com os compostos antioxidantes e utilizando a equação 3, obteve-se os valores de atividade antioxidante tanto para o padrão, ácido gálico, como para o GSE na forma de pó e encapsulado nas nanofibras, FIGURA 5.10. Os resultados obtidos mostraram que o GSE, além de possuir atividade antioxidante semelhante ao ácido gálico, confirmando seu alto poder antioxidante, também reteve sua atividade antioxidante após o processo de eletrofiação, possibilitando a aplicação das mantas desenvolvidas neste trabalho como biomateriais para auxílio no tratamento de reepitelização tecidual.

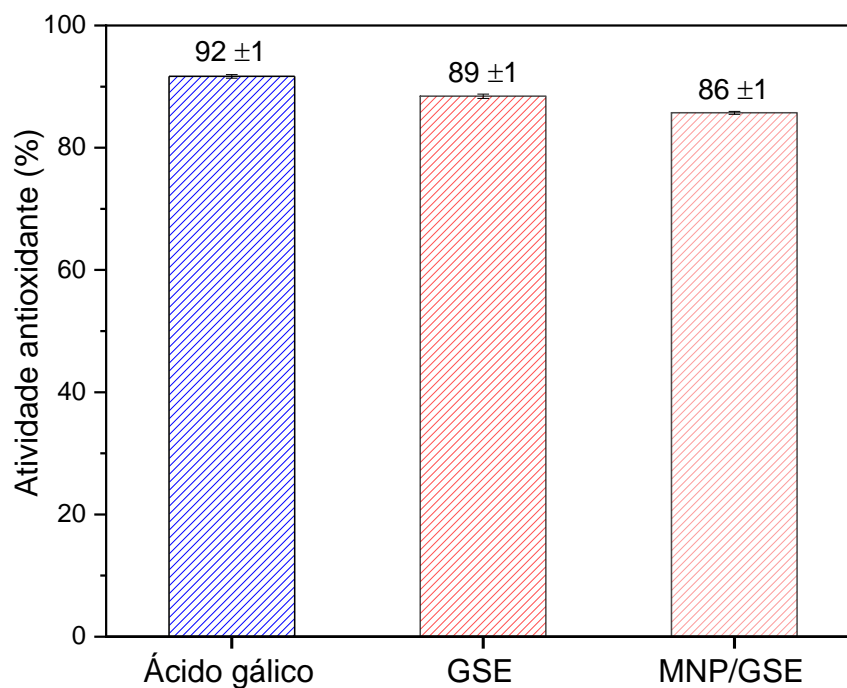


FIGURA 5.10 – Percentual de consumo (atividade antioxidante) do radical DPPH pelo padrão ácido gálico, GSE em pó e GSE encapsulado na nanofibra.

5.5 - Ensaio de liberação *in vitro* do GSE

O ensaio de liberação *in vitro* do GSE foi realizado utilizando-se as mantas de nanofibras poliméricas de PLA, PLA/PEO e PLA/ALOE contendo 10 e 20 % (m/m) de GSE. O ensaio foi realizado em tampão PBS (pH 7,4 – 37 °C) sob agitação de 30 rpm durante o período de 30 dias (720 h). Os valores do percentual cumulativo de liberação do GSE foram calculados a partir das leituras dos valores de absorbâncias em 278 nm (utilizando-se um espectrofotômetro UV-vis), utilizando-se a EQUAÇÃO 4 (Seção 4.2.9), e os valores médios máximos de liberação obtidos para cada um dos sistemas encontram-se na TABELA 5.2.

TABELA 5.2 - Valores médios máximos da taxa de liberação do GSE para diferentes mantas.

Amostras	Liberação média máxima (%)
PLA/GSE10	75 ±4
PLA/GSE20	69 ±2
PLA/PEO/GSE10	43 ±4
PLA/PEO/GSE20	38 ±3
PLA/ALOE/GSE10	63 ±9
PLA/ALOE/GSE20	50 ±3

Os perfis de liberação do GSE para as diferentes mantas encontram-se representados graficamente pela relação percentual cumulativo versus tempo nas FIGURAS 5.11 (A) e 5.12 (A). Distintos perfis de liberação foram observados para cada uma das mantas, dependendo de sua composição e da concentração de GSE. Para a liberação do GSE na concentração teórica de 10 % (m/m) , FIGURA 5.11 (A e B), as mantas compostas por PLA apresentaram um rápida liberação inicial (efeito *burst*), liberando cerca de 60 % do conteúdo total de GSE nas primeiras 24 h. Entre 24 e 336 h, observou-se um perfil de liberação mais prolongado, no qual houve a liberação de mais 16% do extrato, totalizando 76% ±4. Após 336 h o sistema atingiu o equilíbrio, não sendo mais observada se mais a liberação significativa de GSE. Para os sistemas PLA/PEO/GSE10 e PLA/ALOE/GSE10 perfis de liberação mais sustentáveis foram observados. Para a manta contendo PEO, nas primeiras 24 h de ensaio foram liberados apenas 20 % e essa liberação continuou ocorrendo, sendo observado no final das 720 h de ensaio um valor total de liberação de 43%±4 do GSE. As mantas de PLA/ALOE/GSE10, apresentaram o mesmo indicativo de continuidade da liberação até a 720^a hora, mas a taxa de liberação do GSE foi significativamente maior, totalizando ao final das 720 horas 63%±9 de liberação.

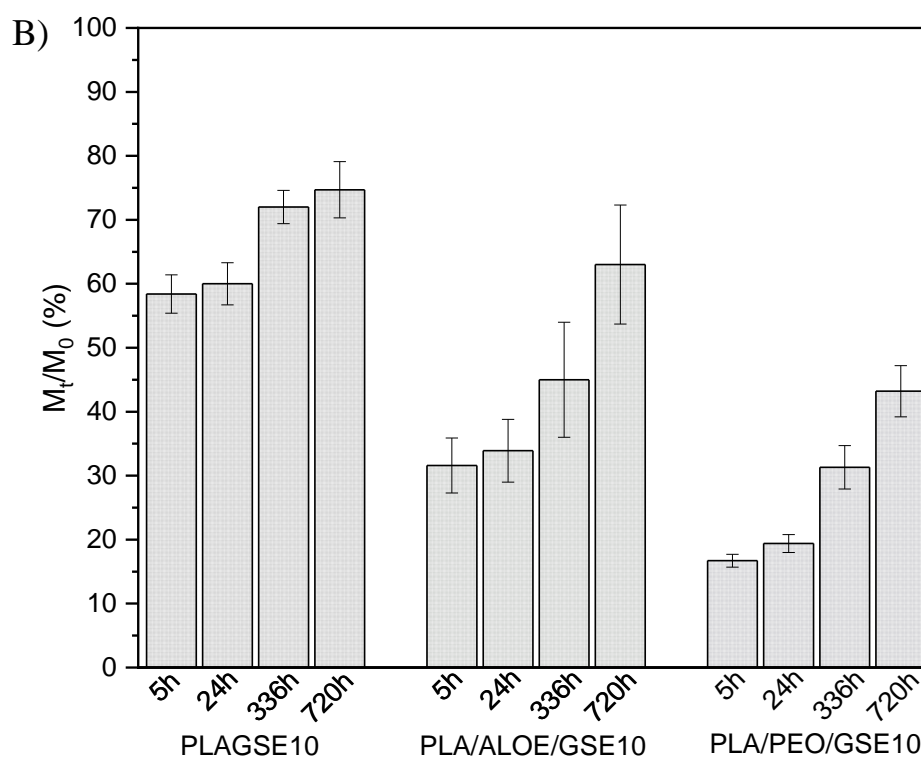
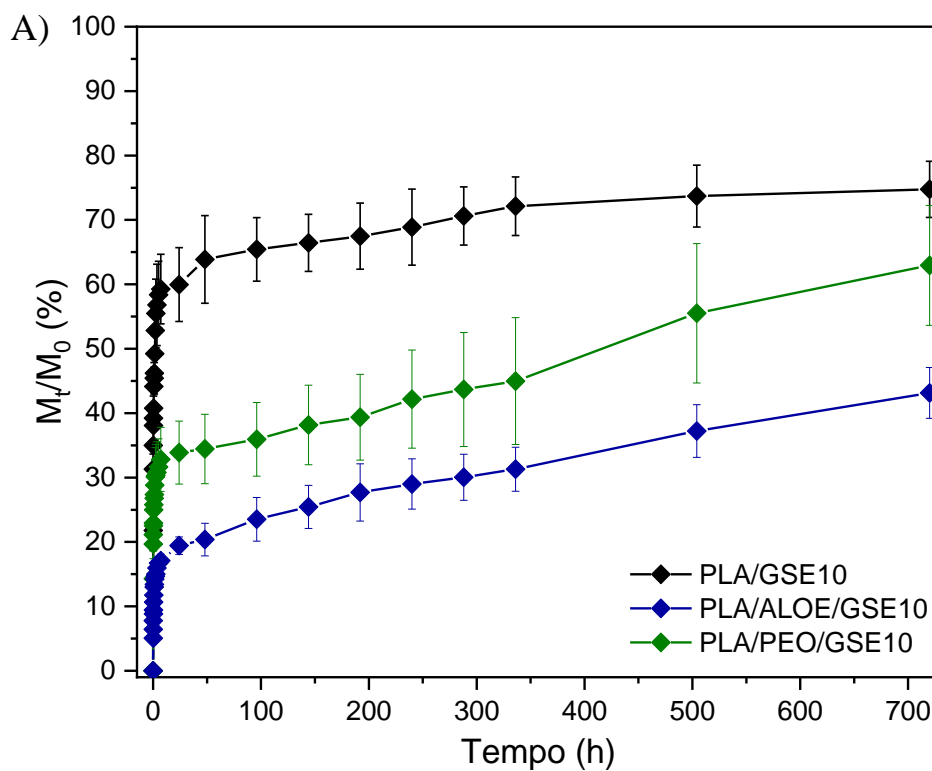


FIGURA 5.11 – (A) Perfis de liberação e (B) valores do percentual de liberação cumulativo em 5, 24, 336 e 720h para as mantas de PLA/GSE10, PLA/PEO/GSE10 e PLA/ALOE/GSE10 em tampão PBS (pH 7,4).

As mantas contendo GSE à concentração teórica de 20 % (m/m), FIGURA 5.12 (A e B), apresentaram perfis de liberação semelhantes aos observados para as mantas contendo 10 % (m/m). Ao final de 24h foram liberados aproximadamente 54, 22 e 34% de GSE e, ao final das 720 h de ensaio, o valor percentual cumulativo de liberação foi de 69, 38 e 50%, para as mantas de PLA/GSE20, PLA/PEO/GSE20 e PLA/ALOE/GSE20, respectivamente. Como se pode observar, as porcentagens de GSE liberada para os sistemas com 10 e 20% são muito semelhantes. Esse comportamento pode estar relacionado ao fato de que durante o processo de obtenção das nanofibras, a partir da solução com maior massa de GSE, uma quantidade significativa do extrato fica encapsulado mais internamente nas nanofibras, tornando o processo de liberação do GSE mais lento.^{24,99,100} Comportamento semelhante foi observado no estudo da liberação do fármaco rapamicina utilizando nanofibras de PEO e poli(D,L-ácido lático).⁷¹

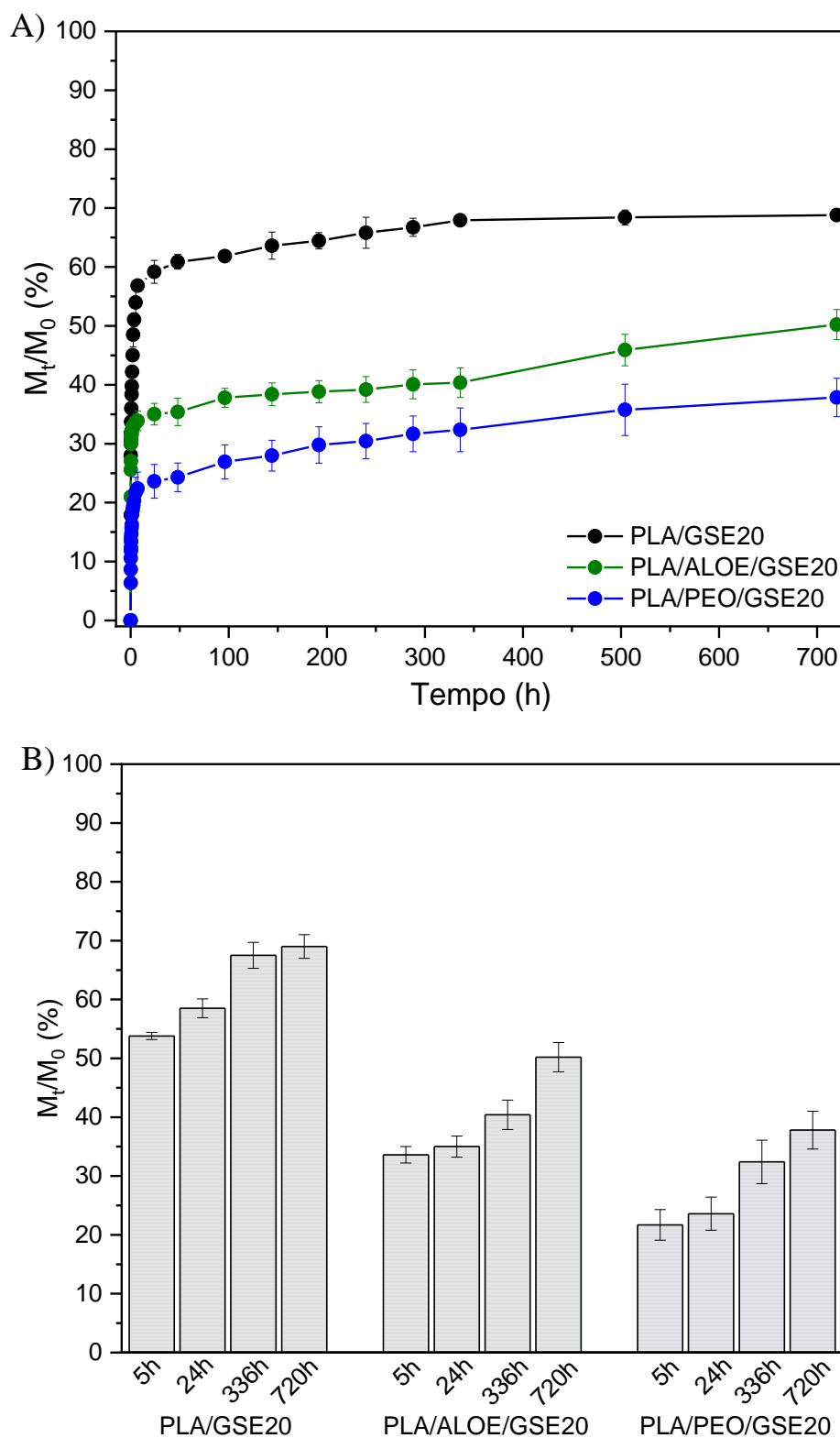


FIGURA 5.12 – (A) Perfis de liberação e (B) valores do percentual de liberação cumulativo em 5, 24, 336 e 720h para as mantas de PLA/GSE20, PLA/PEO/GSE20 e PLA/ALOE/GSE20 em tampão PBS (pH 7,4).

A liberação de fármacos encapsulados em nanofibras poliméricas pode ser afetado por diversos fatores⁵⁷. Esses fatores podem estar relacionados com parâmetros de processo para obtenção das mantas, o que irá influenciar na compatibilidade fármaco-polímero-solvente, afetando a distribuição do fármaco na matriz polimérica e também no processo de liberação. Isso ocorre porque a liberação dá-se na interface fibra/solução - tampão e, nesse caso, três pares de interações estão envolvidas nesse processo: entre a droga, a matriz da nanofibra e a solução - tampão.⁷¹ Todos eles podem afetar a taxa de difusão do fármaco e, assim, afetar a sua liberação da matriz polimérica.¹⁷ No caso das mantas de PLA/GSE, a rápida liberação (*burst*) observada nas primeiras 24 h, possivelmente está relacionada à distribuição preferencial do GSE na superfície das nanofibras.¹⁹ Isso ocorre devido à baixa solubilidade do GSE na acetona, solvente que apresenta maior afinidade pelo PLA. O mesmo comportamento foi relatado por ZENG *et al.* (2005). Nesse estudo, os autores avaliaram o perfil de liberação dos antitumorais cloridrato de doxorrubicina (hidrofílico) e paclitaxel (lipofílico) utilizando nanofibras de poli(L-ácido lático) (PLLA).¹⁰¹ O paclitaxel apresentou elevada solubilidade no solvente utilizado nas formulações, enquanto o cloridrato de doxorrubicina mostrou baixa solubilidade. Como resultado, durante o processo de eletrospinação, a rápida evaporação do solvente permitiu que o paclitaxel fosse completamente disperso e encapsulado dentro das nanofibras. Já no caso do cloridrato de doxorrubicina ocorreu a separação de fases durante o processo de fiação, resultando em uma grande porção do fármaco na superfície das fibras, promovendo maior liberação nas primeiras horas de ensaio.

Os perfis de liberação mais controlados observados para os sistemas contendo PEO e ALOE podem estar relacionados a diversos fatores. O primeiro é devido à formação de interações intermoleculares entre os grupamentos hidroxilas dos compostos fenólicos do GSE e os grupos oxigenados presentes na cadeia do PEO e na molécula de ALOE. Essas interações tendem a aumentar a interação GSE/matriz das nanofibras, diminuindo assim, a interação do GSE com

o tampão PBS^{74,79,102}. Outro fator é a questão da solubilidade dos compostos PEO, ALOE e GSE, os quais apresentam maior solubilidade em DMF, podendo favorecer um maior encapsulamento do GSE nas nanofibras. Por último, o maior diâmetro apresentado pelas nanofibras de PLA/PEO/GSE e PLA/ALOE/GSE também pode retardar o processo de liberação do extrato, uma vez que se levarmos em conta o processo de difusão do GSE na matriz polimérica, nanofibras com maior diâmetro apresentam um caminho mais longo para a difusão do extrato.¹⁰² A influência do diâmetro na liberação foi demonstrada por QIN *et al.* (2013) no estudo da liberação de aspirina em nanofibras de PLA.¹⁰³

O mecanismo envolvido na liberação de compostos bioativos de baixo peso molecular por materiais fibrosos depende de vários fatores, incluindo: o processo de molhabilidade e inchamento das mantas de nanofibras, da natureza cristalina do fármaco após o processo de encapsulamento e da difusão de oligômeros solúveis em água através das nanofibras, além da morfologia das nanofibras (área superficial, densidade, porosidade, rugosidade).¹⁷ O estudo da influência desses parâmetros e, a consequente descrição do mecanismo de liberação envolvido em sistemas de fibras poliméricas em micro/nanoescala ainda encontram-se em desenvolvimento na literatura e, para isso diversos modelos matemáticos têm sido empregados.^{47,104} Dentre eles, o modelo Korsmwyer-Peppas¹⁰⁴ vem sendo amplamente utilizado, uma vez que descreve de forma direta o perfil de liberação do fármaco a partir de um sistema polimérico. Este modelo pode ser representado pela EQUAÇÃO 5, na qual k é uma constante cinética, M_t/M_∞ é a fração do fármaco ao longo do tempo t e n é conhecido como expoente de liberação.

$$M_t/M_\infty = kt^n \quad \text{EQUAÇÃO 5}$$

Este modelo¹⁰⁵ categoriza os perfis de liberação com base no valor do expoente n . Para $n \leq 0,5$ o modelo corresponde a um mecanismo de difusão

Fickiana, enquanto se o valor de n estiver entre $0,5 < n < 1$ é considerado como um mecanismo de transporte de massa não-Fickiano (anômalo).⁸⁰ Os valores dos parâmetros cinéticos de liberação para as mantas de nanofibras poliméricas carregadas com GSE são apresentados na TABELA 5.3. O valor de n , FIGURA 5.13, menor que 0,5 sugeriu que a liberação de GSE mostrou um típico mecanismo de difusão Fickiano, no qual, a liberação ocorreu pelo gradiente de concentração entre nanofibras e meio liberado.⁸⁰

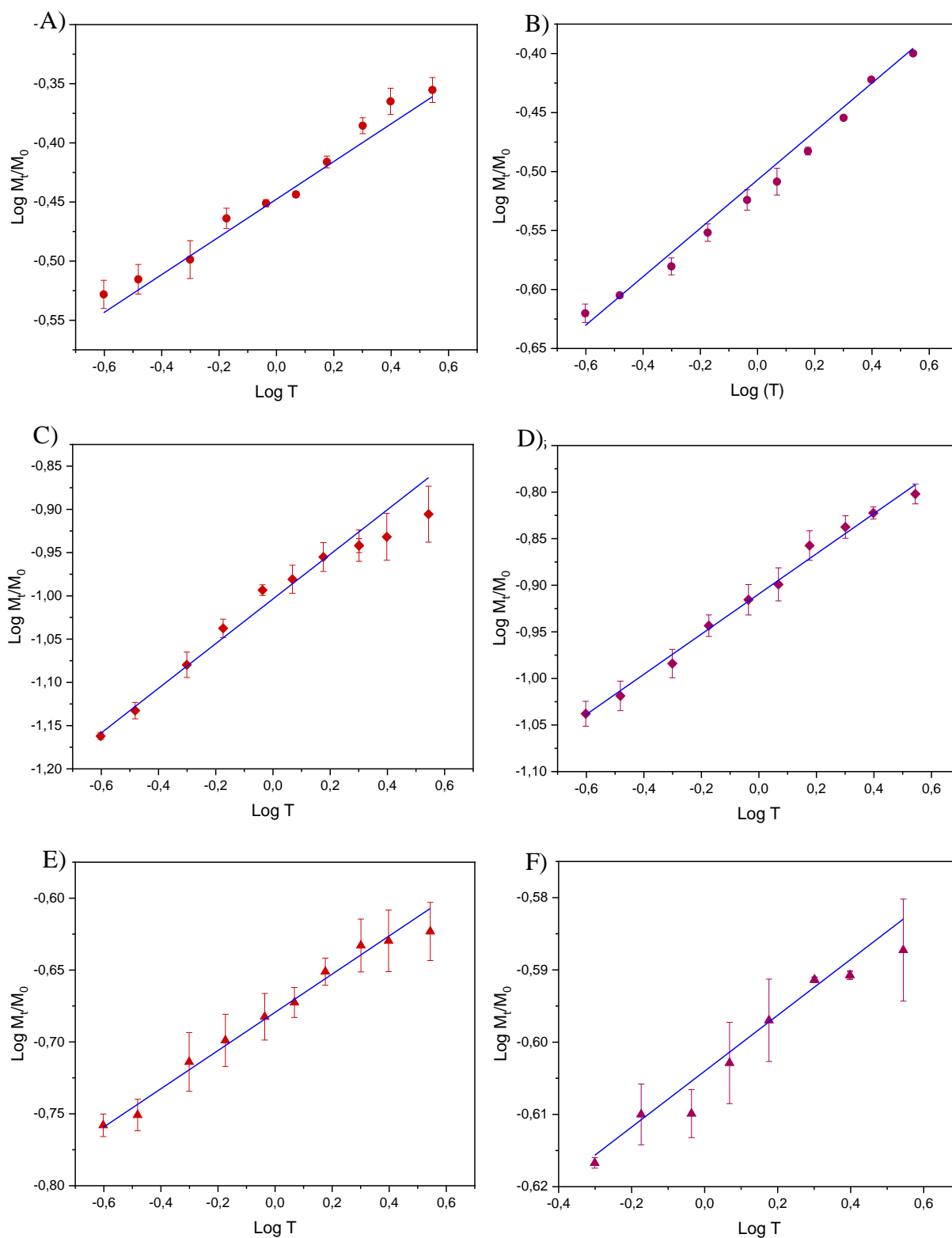


FIGURA 5.13 – Gráficos linearizados pelo modelo de Korsmeyer – Peppas para liberação de (A) PLA/GSE10, (B) PLA/GSE20, (C) PLA/PEO/GSE10, (D) PLA/PEO/GSE20, (E) PLA/ALOE/GSE10 e (F) PLA/ALOE/GSE20.

TABELA 5.3 – Mecanismos de liberação do GSE a partir dos parâmetros cinéticos para as diferentes mantas poliméricas.

Amostras	n	k (min ⁻¹)	R ²	Mecanismo
PLA/GSE10	0,16	0,44	0,985	Fickiano (Difusão)
PLA/GSE20	0,11	0,72	0,974	Fickiano (Difusão)
PLA/PEO/GSE10	0,26	1,00	0,982	Fickiano (Difusão)
PLA/PEO/GSE20	0,21	0,91	0,993	Fickiano (Difusão)
PLA/ALOE/GSE10	0,14	0,68	0,987	Fickiano (Difusão)
PLA/ALOE/GSE20	0,04	0,60	0,953	Fickiano (Difusão)

5.6 - Ensaios Biológicos

5.6.1 - Viabilidade e citotoxicidade celular (fibroblasto humana HFF-1)

Os estudos de viabilidade celular *in vitro* foram realizados com o intuito de se avaliar a biocompatibilidade das mantas obtidas. Dentre as células que participam do processo de cicatrização tecidual, os fibroblastos exercem papel fundamental na formação da matriz extracelular e de estruturas de colágeno responsáveis pelo suporte mecânico de células envolvidas durante o processo de regeneração do tecido lesionado.¹⁸

Os resultados do ensaio de viabilidade celular realizado a partir do estudo de MTT confirmaram a não citotoxicidade das mantas de nanofibras poliméricas, ou seja, o processo empregado para a obtenção das mantas mostrou-se potencialmente seguro para aplicações em meio biológico. Como mostrado na FIGURA 5.14, para as primeiras 24 horas, após o inóculo, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos quanto ao crescimento celular. Já após 48 horas, o grupo PLA apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo controle (84%±5). O grupo PLA/GSE10 mostrou para as 48 horas de inoculação um crescimento de 120%±4 significativamente superior ao grupo controle e ainda mais superior quanto comparado ao grupo PLA. Com relação ao

grupo GPLA/PEO/GSE10, é importante ressaltar que nas 48 horas este grupo apresentou crescimento celular superior ao grupo controle (110 ± 4), mas inferior ao grupo PLA/GSE10. O mesmo pode ser observado para o grupo PLA/ALOE/GSE10, que apresentou maior contraste ao MTT, indicando um maior crescimento celular. Este resultado pode ser explicado pela maior aderência das células às mantas de PLA/PEO/GSE10 e PLA/ALOE/GSE10, dificultando o desprendimento das células para realização do estudo, o que corrobora com as imagens de MEV mostrando a adesão celular sobre as mantas, FIGURA 5.16.

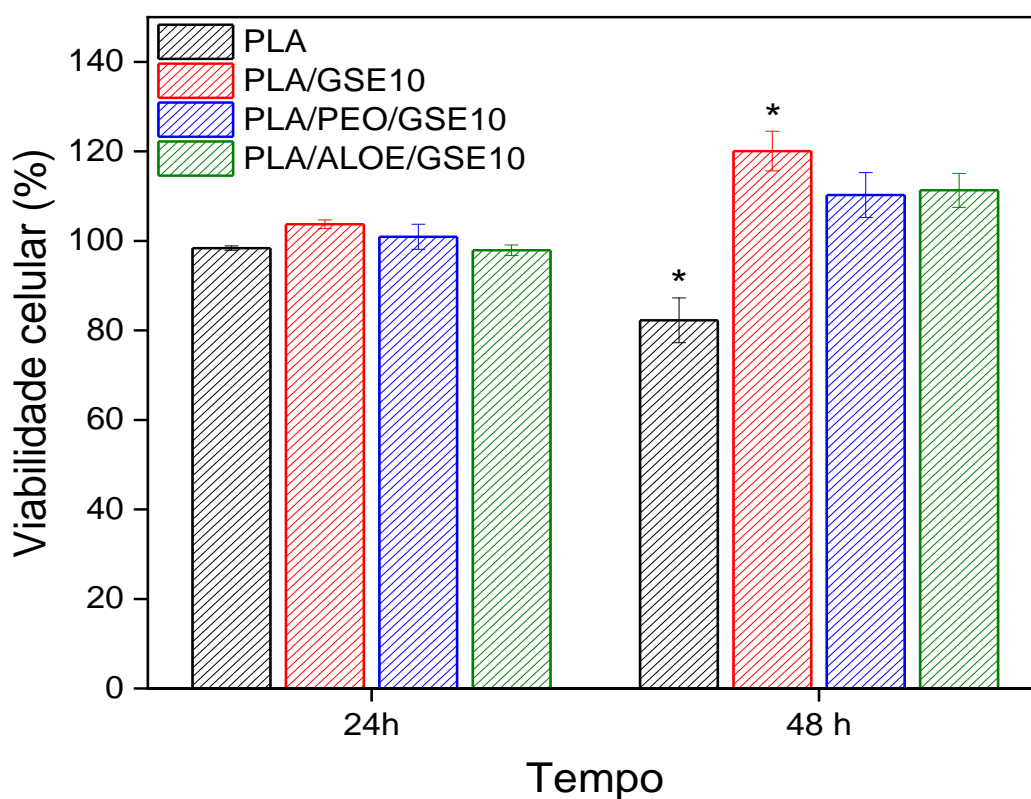


FIGURA 5.14 - Avaliação do crescimento celular através do ensaio do MTT, em 24 horas, 48 horas em relação ao grupo controle (*) diferença significativa ($p < 0.05$).

Em relação a viabilidade no ensaio do Azul de Trypan, foram verificadas as viabilidades nos dois tempos do grupo controle, TABELA 5.4.

TABELA 5.4 - Porcentagem de viabilidade da linhagem HFF-1, em 24 e 48 horas para o grupo controle.

	T 24h	T 48h
Grupo controle	98%	97%

Não foi possível estabelecer as viabilidades das células aderidas as mantas poliméricas, devido à dificuldade de desprendê-las do material. Na FIGURA 5.15 (D, E), podemos observar a morfologia das células antes e depois da adição do reagente MTT.

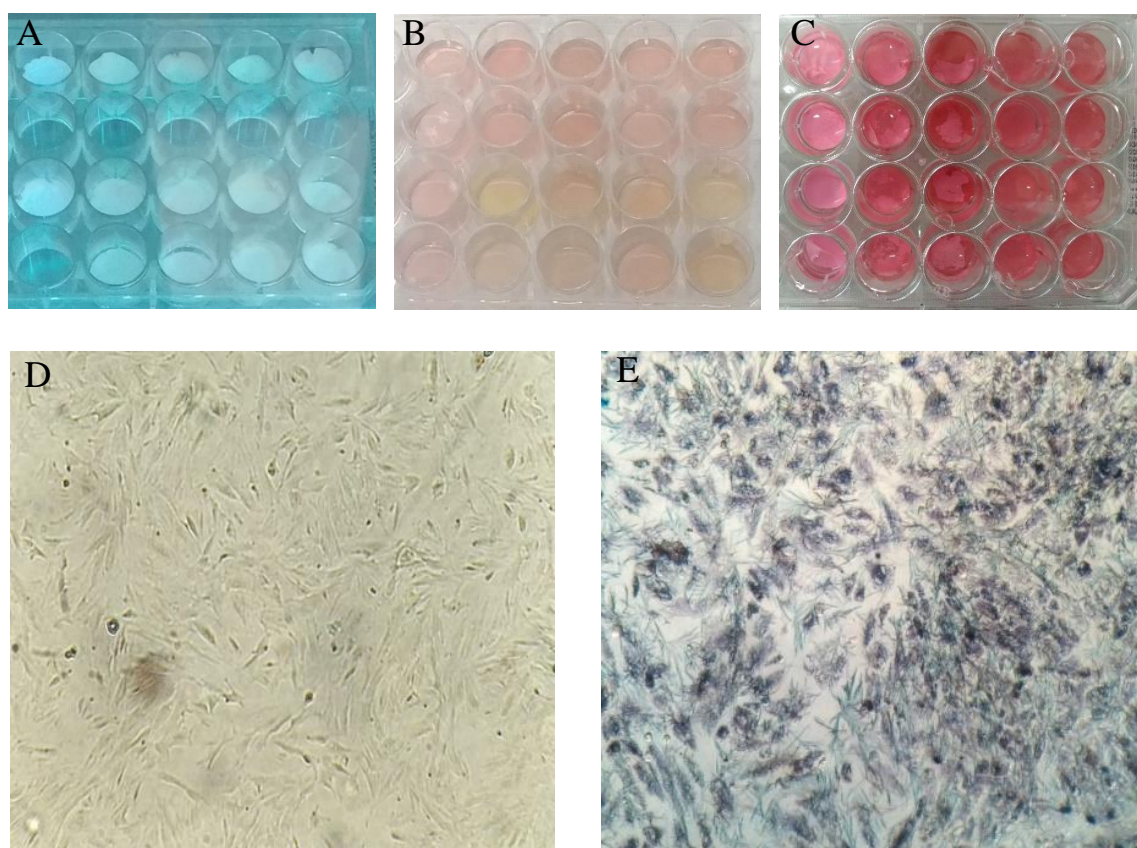


FIGURA 5.15 – Imagens digitais (A, B e C) das placas de inoculação. (A) placa contendo as mantas passando pelo processo de esterilização por luz UV, (B) placa com inóculo celular sobre as mantas e (C) placa com inóculo celular e MTT. (D e E), imagens de microscopia ótica das células de fibroblastos, linhagem HFF-1, (D) fibroblastos aderidos na placa, após 48 horas do inóculo grupo controle e (E) fibroblastos viáveis do grupo controle após a exposição ao reagente MTT, com alteração da coloração celular, indicativo de atividade metabólica e viabilidade celular.

Além da investigação da viabilidade celular, a biocompatibilidade de um material também está relacionada à capacidade de adesão celular na superfície do biomaterial.¹⁰⁴ A FIGURA 5.16, mostra as imagens de MEV de células de fibroblastos na superfície das mantas poliméricas em dois períodos de incubação, 24 e 48 horas. Como pode ser visto, não houve adesão e proliferação de fibroblastos sobre as mantas de PLA, tanto para as 24 horas, quanto para 48 horas de incubação, FIGURA 5.16 (A e B), respectivamente. Este fato pode estar relacionado às características hidrofóbicas da manta de PLA, como observado no estudo de ângulo de contato, desfavorecendo a interação entre as células e a superfície do material.¹⁰⁶

Para as mantas de PLA/GSE10, após 24 horas de incubação, percebeu-se esparsas áreas com células aderidas, FIGURA 5.16 (C), e após 48 horas, FIGURA 5.16 (D), notou-se uma maior aderência e proliferação das células sobre o material. A maior proliferação celular nestas mantas, quando comparadas às mantas de PLA, mesmo apresentando características hidrofóbicas, possivelmente está relacionada as propriedades do GSE no auxílio da proliferação de fibroblastos.²⁰

As mantas de PLA/PEO/GSE10 apresentaram, dentre todas as mantas, a maior adesão e proliferação celular nos dois períodos de incubação, FIGURA 5.16 (E, F), devido possivelmente ao maior caráter hidrofílico, o que é adequado para a adesão celular.¹⁰⁶ Além dessa maior proliferação, as células aderidas as mantas apresentaram morfologia mais extensa, indicando maior afinidade celular com o material, em comparação às outras mantas.⁵⁹ A FIGURA 5.16 (G, H), referente às mantas de PLA/ALOE/GSE10, mostra que assim como para as mantas PLA/PEO/GSE10, houve boa aderência e proliferação dos fibroblastos sobre o material. Mesmo mostrando-se um material, inicialmente, hidrofóbico, a adesão celular pode ser relacionada às características do extrato de *Aloe Vera* quanto a interação com os meios biológicos. GARCIA-ORUE 2017,

por exemplo, relatou o potencial uso de mantas eletrofição contendo extrato de *Aloe Vera* para o tratamento de ferimentos. Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que o Aloe estimula a ativação e proliferação de fibroblastos.⁷⁵

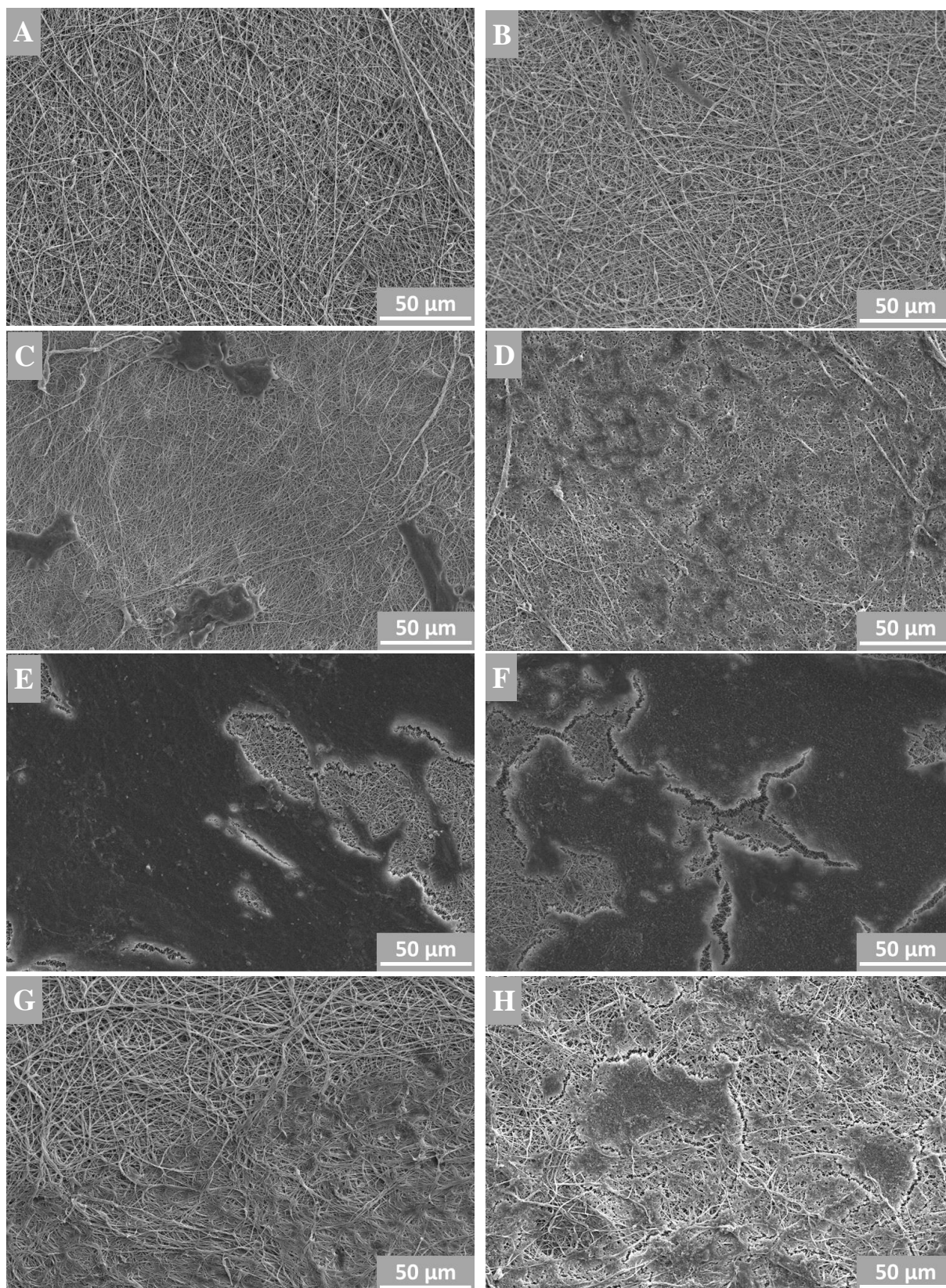


FIGURA 5.16 – Imagens de MEV das mantas (A,B) PLA, (C,D) PLA/GSE10, (E, F) PLA/PEO/GSE10 e (G, H) PLA/ALOE/GSE10, evidenciando a adesão e proliferação dos fibroblastos, na qual, as imagens (A, C, E e G), mostram proliferação após 24 h de incubação celular e as imagens (B, D, F e H) após 48 h de incubação celular.

6 - CONCLUSÕES

Na presente tese, foi possível demonstrar a importância da composição da manta polimérica eletrofiada e a sua influência no controle da liberação de fármacos e agentes antioxidantes. De acordo com os resultados apresentado aqui e com base nos objetivos propostos, foi possível concluir que o processo de liberação é dependente do caráter hidrofílico e da composição das mantas carregadoras bem como da porcentagem de GSE encapsulado. Como conclusões específicas:

A composição das mantas poliméricas foi otimizada com sucesso para as matrizes PLA, PLA/PEO e PLA/ALOE visando a obtenção de fibras de diâmetro nanométricos e hidrofiliabilidade modulável de acordo com a respectiva composição, como demonstrado por medidas de MEV e ângulo de contato, respectivamente;

O GSE foi encapsulado com sucesso nas três composições de mantas poliméricas chegando à uma porcentagem de 90% de encapsulamento, como indicado por medidas de FTIR, TG e DSC. Além disso, o poder antioxidante do GSE foi mantido mesmo após o processo de encapsulamento nas mantas poliméricas pelo processo de eletrofição;

O perfil de liberação de GSE mostrou-se dependente da composição da manta, sendo resultante de transporte difusional Fickiano, onde a adição do PEO alterou o perfil de liberação do GSE, promovendo a possibilidade de modulação da liberação;

Avaliação da viabilidade de crescimento celular de fibroblastos nas mantas demonstraram que as amostras carregadas com GSE são biocompatíveis. Além disso, a adição de PEO na matriz resultou em melhor adesão e maior proliferação celular, sugerindo maior biocompatibilidade. Tal fato pode ser atribuído ao maior caráter hidrofílico da manta PLA/PEO em comparação com as mantas PLA e PLA/ALOE.

Deste modo, os resultados obtidos demonstraram que a composição da matriz polimérica permite a modulação do perfil de liberação, em menos controlada (matriz de PLA) ou mais controlada e sustentada (matriz PLA/PEO e PLA/ALOE). Tal possibilidade de modulação, pode ser de grande valia para diferentes sistemas de aplicação e por conseguinte, diferentes necessidades. Assim, as mantas de nanofibras poliméricas desenvolvidas no presente trabalho apresentam grande potencial como alternativa para uma nova geração de curativos inteligentes.

7 - PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO

Artigos publicados

1) R.S. Andre, J.C. Pereira, L.A. Mercante, D. Locilento, L.H.C. Mattoso, D.S. Correa, ZnO-Co₃O₄ heterostructure electrospun nanofibers modified with poly(sodium 4-styrenesulfonate): Evaluation of humidity sensing properties. *Journal of Alloys and Compounds* **2018**, 767, 1022-1029.

2) L.A. Mercante, M.H.M. Facure, D.A. Locilento, R.C. Sanfelice, F.L. Migliorini, L.H.C. Mattoso, D.S. Correa, Solution blow spun PMMA nanofibers wrapped with reduced graphene oxide as an efficient dye adsorbent. *New Journal of Chemistry* **2017**, 41, 9087-9094.

Artigos aprovados para publicação

1) D.A. Locilento, L.A. Mercante, R.S. Andre, L.H.C. Mattoso, G.F. Luna, P. Brassolatti, F.A. Anibal, D.S. Correa, Biocompatible and biodegradable electrospun nanofibrous membranes loaded with grape seed extract for wound dressing application. *Journal of Nanomaterials* **2019**, in press (article ID 2472964).

Capítulo de livro

1) D.S. Correa, L.A. Mercante, R. Schneider, M.H.M. Facure, D. Locilento, Composite Nanofibers for Removing Water Pollutants: Fabrication Techniques. In: *Handbook of Biomaterials* **2017**, 1-27. Taylor&Francis

Resumos em congresso

1) L.A. Mercante, R.S. Andre, J. Pereira, D. Locilento, L.H.C. Mattoso, D.S. Correa, Humidity sensing properties of ZnO-Co₃O₄ nanofibers decorated with a polyelectrolyte. XVII Brazilian MRS Meeting - Natal-RN, **2018**.

2) L.A. Mercante, M.H.M. Facure, D.A. Locilento, R.C. Sanfelice, F.L. Migliorini, L.H.C. Mattoso, D.S. Correa, Adsorção de contaminantes orgânicos em nanofibras compósitas de PMMA-óxido de grafeno reduzido. IX Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio – São Carlos-SP, **2017**.

3) L.A. Mercante, M.H.M. Facure, D.A. Locilento, R.C. Sanfelice, F.L. Migliorini, L.H.C. Mattoso, D.S. Correa, Composite membranes based on polymeric nanofibers/graphene oxide with dye adsorption capability. XV Brazilian MRS Meeting – Campinas-SP, **2016**.

8 - REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Velnar, T., Bailey, T. & Smrkolj, V. The Wound Healing Process : an Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. *J. Int. Med. Res.* **37**, 1528–1542 (2009).
2. Saghazadeh, S. *et al.* Drug delivery systems and materials for wound healing applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **127**, 138–166 (2018).
3. Miguel, S. P. *et al.* Electrospun polymeric nanofibres as wound dressings: A review. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **169**, 60–71 (2018).
4. Torres, P., Castro, M., Reyes, M. & Torres, V. A. Histatins, wound healing, and cell migration. *Oral Dis.* **24**, 1150–1160 (2018).
5. Farokhi, M., Mottaghitalab, F., Fatahi, Y., Khademhosseini, A. & Kaplan, D. L. Overview of Silk Fibroin Use in Wound Dressings. *Trends Biotechnol.* **36**, 907–922 (2018).
6. Gianino, E., Miller, C. & Gilmore, J. Smart Wound Dressings for Diabetic Chronic Wounds. *Bioengineering* **5**, 51 (2018).
7. Mohanty, C. & Sahoo, S. K. Curcumin and its topical formulations for wound healing applications. *Drug Discov. Today* **22**, 1582–1592 (2017).
8. Zarrintaj, P. *et al.* Can regenerative medicine and nanotechnology combine to heal wounds? the search for the ideal wound dressing. *Nanomedicine* **12**, 2403–2422 (2017).
9. Parani, M., Lokhande, G., Singh, A. & Gaharwar, A. K. Engineered Nanomaterials for Infection Control and Healing Acute and Chronic Wounds. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **8**, 10049–10069 (2016).
10. Sinno, H. & Prakash, S. Complements and the Wound Healing Cascade: An Updated Review. *Plast. Surg. Int.* **2013**, 1–7 (2013).
11. Niu, Y., Li, Q., Ding, Y., Dong, L. & Wang, C. Engineered delivery strategies for enhanced control of growth factor activities in wound healing. *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2018). doi:10.1016/j.addr.2018.06.002
12. Mostafalu, P. *et al.* Smart Bandage for Monitoring and Treatment of Chronic Wounds. *Small* **14**, 1–9 (2018).
13. Mele, E. Electrospinning of natural polymers for advanced wound care: towards responsive and adaptive dressings. *J. Mater. Chem. B* **4**, 4801–4812 (2016).
14. Gizaw, M. *et al.* Electrospun Fibers as a Dressing Material for Drug and Biological Agent Delivery in Wound Healing Applications. *Bioengineering* **5**, 9 (2018).

15. Kavvoosi, G., Bordbar, Z., Dadfar, S. M. & Dadfar, S. M. M. Preparation and characterization of a novel gelatin–poly(vinyl alcohol) hydrogel film loaded with *Zataria multiflora* essential oil for antibacterial–antioxidant wound-dressing applications. *J. Appl. Polym. Sci.* **134**, (2017).
16. Soares, R. M. D., Siqueira, N. M., Prabhakaram, M. P. & Ramakrishna, S. Electrospinning and electrospray of bio-based and natural polymers for biomaterials development. *Mater. Sci. Eng. C* **92**, 969–982 (2018).
17. Sebe, I., Szabó, P., Kállai-Szabó, B. & Zelkó, R. Incorporating small molecules or biologics into nanofibers for optimized drug release: A review. *International Journal of Pharmaceutics* (2015). doi:10.1016/j.ijpharm.2015.08.054
18. Akbik, D., Ghadiri, M., Chrzanowski, W. & Rohanizadeh, R. Curcumin as a wound healing agent. *Life Sci.* **116**, 1–7 (2014).
19. Lin, S. *et al.* Green electrospun grape seed extract-loaded silk fibroin nanofibrous mats with excellent cytocompatibility and antioxidant effect. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* (2016). doi:10.1016/j.colsurfb.2015.12.001
20. Selvaraj, S. & Fathima, N. N. Fenugreek Incorporated Silk Fibroin Nanofibers - A Potential Antioxidant Scaffold for Enhanced Wound Healing. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9**, 5916–5926 (2017).
21. Gilotra, S., Chouhan, D., Bhardwaj, N., Nandi, S. K. & Mandal, B. B. Potential of silk sericin based nanofibrous mats for wound dressing applications. *Mater. Sci. Eng. C* **90**, 420–432 (2018).
22. Minutti, C. M., Knipper, J. A., Allen, J. E. & Zaiss, D. M. W. Tissue-specific contribution of macrophages to wound healing. *Semin. Cell Dev. Biol.* **61**, 3–11 (2017).
23. Zhao, X. *et al.* Antibacterial anti-oxidant electroactive injectable hydrogel as self-healing wound dressing with hemostasis and adhesiveness for cutaneous wound healing. *Biomaterials* **122**, 34–47 (2017).
24. Martin, P. Wound Healing—Aiming for Perfect Skin Regeneration. *Science (80-.)*. **276**, 1–7 (1997).
25. Chan, G. & Mooney, D. J. New materials for tissue engineering: towards greater control over the biological response. *Trends Biotechnol.* **26**, 382–392 (2008).
26. Borda, L. J., Macquhae, F. E. & Kirsner, R. S. Wound Dressings: A Comprehensive Review. *Curr. Dermatol. Rep.* **5**, 287–297 (2016).
27. Zahedi, P., Rezaeian, I., Ranaei-Siadat, S. O., Jafari, S. H. & Supaphol, P. A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous

- polymeric bandages. *Polym. Adv. Technol.* **21**, 77–95 (2010).
28. Hamdan, S. *et al.* Nanotechnology-Driven Therapeutic Interventions in Wound Healing: Potential Uses and Applications. *ACS Cent. Sci.* **3**, 163–175 (2017).
 29. Gonzalez, A. C. de O., Costa, T. F., Andrade, Z. de A. & Medrado, A. R. A. P. Wound healing - A literature review. *An. Bras. Dermatol.* **91**, 614–620 (2016).
 30. Rieger, K. A., Birch, N. P. & Schiffman, J. D. Designing electrospun nanofiber mats to promote wound healing-a review. *J. Mater. Chem. B* **1**, 4531–4541 (2013).
 31. Chen, S. *et al.* Recent advances in electrospun nanofibers for wound healing. *Nanomedicine* **12**, 1335–1352 (2017).
 32. Merrell, J. *et al.* Curcumin loaded poly (ϵ -Caprolactone) nanofibres: Diabetic wound dressing with antioxidant and anti-inflammatory properties. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **36**, 1149–1156 (2009).
 33. Dunnill, C. *et al.* Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *Int. Wound J.* **14**, 89–96 (2017).
 34. Mellado, C. *et al.* Development of Graphene Oxide Composite Aerogel with Proanthocyanidins with Hemostatic Properties As a Delivery System. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **10**, 7717–7729 (2018).
 35. Pérez, M. J., Zampini, I. C., Alberto, M. R. & Isla, M. I. Prosopis nigra Mesocarp Fine Flour, A Source of Phytochemicals with Potential Effect on Enzymes Linked to Metabolic Syndrome, Oxidative Stress, and Inflammatory Process. *J. Food Sci.* **83**, 1454–1462 (2018).
 36. Göktürk Baydar, N., Özkan, G. & Yaşar, S. Evaluation of the antiradical and antioxidant potential of grape extracts. *Food Control* **18**, 1131–1136 (2007).
 37. Silva, V. *et al.* Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of phenolic compounds extracted from wine industry by-products. *Food Control* **92**, 516–522 (2018).
 38. Beres, C. *et al.* Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. *Waste Manag.* **68**, 581–594 (2017).
 39. Ku, C. S., Sathishkumar, M. & Mun, S. P. Binding affinity of proanthocyanidin from waste Pinus radiata bark onto proline-rich bovine achilles tendon collagen type I. *Chemosphere* **67**, 1618–1627 (2007).
 40. Tsuruya, M. *et al.* Acceleration of Proliferative Response of Mouse

- Fibroblasts by Short-Time Pretreatment with Polyphenols. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **174**, 2223–2235 (2014).
41. Göktürk Baydar, N., Özkan, G. & Yaşar, S. Evaluation of the antiradical and antioxidant potential of grape extracts. *Food Control* **18**, 1131–1136 (2007).
 42. Su, Y. R. *et al.* Effect of Grape Seed Proanthocyanidin-Gelatin Colloidal Complexes on Stability and in Vitro Digestion of Fish Oil Emulsions. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 10200–10208 (2015).
 43. Yourdkhani, M., Leme-Kraus, A. A., Aydin, B., Bedran-Russo, A. K. & White, S. R. Encapsulation of grape seed extract in polylactide microcapsules for sustained bioactivity and time-dependent release in dental material applications. *Dent. Mater.* **33**, 630–636 (2017).
 44. Cos, P. *et al.* Proanthocyanidins in Health Care: Current and New Trends. *Curr. Med. Chem.* **11**, 1345–1359 (2004).
 45. Perumalla, A. V. S. & Hettiarachchy, N. S. Green tea and grape seed extracts - Potential applications in food safety and quality. *Food Res. Int.* **44**, 827–839 (2011).
 46. Barras, A. *et al.* Formulation and characterization of polyphenol-loaded lipid nanocapsules. *Int. J. Pharm.* **379**, 270–277 (2009).
 47. Gibis, M., Ruedt, C. & Weiss, J. In vitro release of grape-seed polyphenols encapsulated from uncoated and chitosan-coated liposomes. *Food Res. Int.* **88**, 105–113 (2016).
 48. Fernández, K., Aburto, J., Von Plessing, C., Rockel, M. & Aspé, E. Factorial design optimization and characterization of poly-lactic acid (PLA) nanoparticle formation for the delivery of grape extracts. *Food Chem.* (2016). doi:10.1016/j.foodchem.2016.03.083
 49. Ding, F., Deng, H., Du, Y., Shi, X. & Wang, Q. Emerging chitin and chitosan nanofibrous materials for biomedical applications. *Nanoscale* **6**, 9477–9493 (2014).
 50. Wen, P., Zong, M. H., Linhardt, R. J., Feng, K. & Wu, H. Electrospinning: A novel nano-encapsulation approach for bioactive compounds. *Trends Food Sci. Technol.* **70**, 56–68 (2017).
 51. Xie, J., Li, X. & Xia, Y. Putting electrospun nanofibers to work for biomedical research. *Macromol. Rapid Commun.* **29**, 1775–1792 (2008).
 52. 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 Anal. Chem.* **91**, 91–103 (2017).

53. Singh, N. & Singh, A. RECENT REVIEW ON NANOFIBER FOR DRUG DELIVERY SYSTEMS. *Amandeep al. World J. Pharm. Res.* **6**, 611 (2017).
54. Abrigo, M., McArthur, S. L. & Kingshott, P. Electrospun nanofibers as dressings for chronic wound care: Advances, challenges, and future prospects. *Macromol. Biosci.* **14**, 772–792 (2014).
55. Cheng, H., Yang, X., Che, X., Yang, M. & Zhai, G. Biomedical application and controlled drug release of electrospun fibrous materials. *Mater. Sci. Eng. C* **90**, 750–763 (2018).
56. Correa, D. S., Mercante, L. A., Schneider, R., Facure, M. H. M. & Locilento, D. A. Composite Nanofibers for Removing Water Pollutants: Fabrication Techniques. in *Handbook of Ecomaterials* 1–29 (Springer International Publishing, 2018). doi:10.1007/978-3-319-48281-1_172-1
57. Ignatova, M. G. *et al.* Poly(3-hydroxybutyrate)/caffeic acid electrospun fibrous materials coated with polyelectrolyte complex and their antibacterial activity and in vitro antitumor effect against HeLa cells. *Mater. Sci. Eng. C* **65**, 379–392 (2016).
58. Yakub, G. *et al.* Chitosan/ferulic acid-coated poly(ϵ -caprolactone) electrospun materials with antioxidant, antibacterial and antitumor properties. *Int. J. Biol. Macromol.* **107**, 689–702 (2018).
59. Selvaraj, S., Durairandy, N., Kiran, M. S. & Fathima, N. N. Anti-oxidant enriched hybrid nanofibers: Effect on mechanical stability and biocompatibility. *Int. J. Biol. Macromol.* **117**, 209–217 (2018).
60. Mei, L. *et al.* Nanofibers for improving the wound repair process: The combination of a grafted chitosan and an antioxidant agent. *Polym. Chem.* **8**, 1664–1671 (2017).
61. Fergal, O. J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Mater. Today* **14**, 88–95 (2011).
62. Kowalski, P. S., Bhattacharya, C., Afewerki, S. & Langer, R. Smart Biomaterials: Recent Advances and Future Directions. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **4**, 3809–3817 (2018).
63. Navarro, M., Michiardi, A., Castaño, O. & Planell, J. . Biomaterials in orthopaedics. *J. R. Soc. Interface* **5**, 1137–1158 (2008).
64. Holzapfel, B. M. *et al.* How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**, 581–603 (2013).
65. Pérez, R. A., Won, J.-E., Knowles, J. C. & Kim, H.-W. Naturally and synthetic smart composite biomaterials for tissue regeneration. *Adv. Drug*

- Deliv. Rev.* **65**, 471–496 (2013).
66. Locilento, D. A. Preparo , Obtenção E Caracterização De Esponjas Quitosana / Colágeno Para Liberação Controlada De Extrato De. (Universidade de São Paulo, 2012).
 67. Santoro, M., Shah, S. R., Walker, J. L. & Mikos, A. G. Poly(lactic acid) nanofibrous scaffolds for tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **107**, 206–212 (2016).
 68. Agarwal, S., Wendorff, J. H. & Greiner, A. Progress in the Field of Electrospinning for Tissue Engineering Applications. *Adv. Mater.* **21**, 3343–3351 (2009).
 69. Lasprilla, A. J. R., Martinez, G. A. R., Lunelli, B. H., Jardini, A. L. & Filho, R. M. Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices - A review. *Biotechnology Advances* **30**, 321–328 (2012).
 70. Schneider, R. *et al.* Biocompatible electrospun nanofibers containing cloxacillin: Antibacterial activity and effect of pH on the release profile. *Funct. React. Polym.* **132**, 26–35 (2018).
 71. Kuang, G. *et al.* Biphasic drug release from electrospun polyblend nanofibers for optimized local cancer treatment. *Biomater. Sci.* **6**, 324–331 (2018).
 72. Balaji, A. *et al.* Biomaterials based nano-applications of Aloe vera and its perspective: a review. *RSC Advances* (2015). doi:10.1039/c5ra13282g
 73. Suganya, S. *et al.* Aloe vera incorporated biomimetic nanofibrous scaffold: A regenerative approach for skin tissue engineering. *Iran. Polym. J. (English Ed.)* (2014). doi:10.1007/s13726-013-0219-2
 74. Chen, H., Jiang, C., Wu, H. & Chang, F. Hydrogen bonding effect on the poly(ethylene oxide), phenolic resin, and lithium perchlorate-based solid-state electrolyte. *J. Appl. Polym. Sci.* **91**, 1207–1216 (2004).
 75. Garcia-Orue, I. *et al.* Novel nanofibrous dressings containing rhEGF and Aloe vera for wound healing applications. *Int. J. Pharm.* **523**, 556–566 (2017).
 76. Chun-hui, L., Chang-hai, W., Zhi-liang, X. & Yi, W. Isolation, chemical characterization and antioxidant activities of two polysaccharides from the gel and the skin of Aloe barbadensis Miller irrigated with sea water. *Process Biochem.* **42**, 961–970 (2007).
 77. Chuysinuan, P., Chimnoi, N., Techasakul, S. & Supaphol, P. Gallic Acid-Loaded Electrospun Poly(L-Lactic Acid) Fiber Mats and their Release Characteristic. *Macromol. Chem. Phys.* **210**, 814–822 (2009).

78. Kido, H. W. *et al.* Porous poly (D,L-lactide-co-glycolide) acid/biosilicate@composite scaffolds for bone tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **105**, 63–71 (2017).
79. Dai, R. & Lim, L. T. Release of allyl isothiocyanate from mustard seed meal powder entrapped in electrospun PLA-PEO nonwovens. *Food Res. Int.* **77**, 467–475 (2015).
80. Altan, A., Aytac, Z. & Uyar, T. Carvacrol loaded electrospun fibrous films from zein and poly(lactic acid) for active food packaging. *Food Hydrocoll.* **81**, 48–59 (2018).
81. Nogales-Bueno, J. *et al.* Study of phenolic extractability in grape seeds by means of ATR-FTIR and Raman spectroscopy. *Food Chem.* **232**, 602–609 (2017).
82. Wang, H. *et al.* Kinetics and Antioxidant Capacity of Proanthocyanidins Encapsulated in Zein Electrospun Fibers by Cyclic Voltammetry. *J. Agric. Food Chem.* (2016). doi:10.1021/acs.jafc.6b00540
83. Ignatova, M. G. *et al.* Electrospun Nanofibrous Mats Containing Quaternized Chitosan and Polylactide with In Vitro Antitumor Activity against HeLa Cells. *Biomacromolecules* **11**, 1633–1645 (2010).
84. Chieng, B. W., Ibrahim, N. A., Yunus, W. M. Z. W. & Hussein, M. Z. Plasticized poly(lactic acid) with low molecular weight poly(ethylene glycol): Mechanical, thermal, and morphology properties. *J. Appl. Polym. Sci.* **130**, 4576–4580 (2013).
85. Părpăriță, E., Nistor, M. T., Popescu, M. C. & Vasile, C. TG/FT-IR/MS study on thermal decomposition of polypropylene/biomass composites. *Polym. Degrad. Stab.* **109**, 13–20 (2014).
86. Aceituno-Medina, M., Mendoza, S., Rodríguez, B. A., Lagaron, J. M. & López-Rubio, A. Improved antioxidant capacity of quercetin and ferulic acid during in-vitro digestion through encapsulation within food-grade electrospun fibers. *J. Funct. Foods* **12**, 332–341 (2015).
87. 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. *Eur. J. Pharm. Sci.* **88**, 12–25 (2016).
88. Kai, D. *et al.* Sustainable and Antioxidant Lignin-Polyester Copolymers and Nanofibers for Potential Healthcare Applications. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **5**, 6016–6025 (2017).
89. Liu, X. *et al.* Ciprofloxacin-loaded sodium alginate/poly (lactic-co-glycolic acid) electrospun fibrous mats for wound healing. *Eur. J. Pharm.*

- Biopharm.* **123**, 42–49 (2018).
90. Oyarzabal, A., Mugica, A., Müller, A. J. & Zubitur, M. Hydrolytic degradation of nanocomposites based on poly(L-lactic acid) and layered double hydroxides modified with a model drug. *J. Appl. Polym. Sci.* **133**, 2–11 (2016).
 91. Cheng, M. *et al.* Achieving Long-Term Sustained Drug Delivery for Electrospun Biopolyester Nanofibrous Membranes by Introducing Cellulose Nanocrystals. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **3**, 1666–1676 (2017).
 92. Lee, E. J. *et al.* Application of materials as medical devices with localized drug delivery capabilities for enhanced wound repair. *Prog. Mater. Sci.* **89**, 392–410 (2017).
 93. Ahmed, R. *et al.* Novel electrospun chitosan/polyvinyl alcohol/zinc oxide nanofibrous mats with antibacterial and antioxidant properties for diabetic wound healing. *Int. J. Biol. Macromol.* (2018). doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.08.057
 94. Ignatova, M., Manolova, N., Rashkov, I. & Markova, N. Antibacterial and antioxidant electrospun materials from poly(3-hydroxybutyrate) and polyvinylpyrrolidone containing caffeic acid phenethyl ester – “in” and “on” strategies for enhanced solubility. *Int. J. Pharm.* **545**, 342–356 (2018).
 95. Friaa, O. & Brault, D. Kinetics of the reaction between the antioxidant Trolox® and the free radical DPPH• in semi-aqueous solution. *Org. Biomol. Chem.* **4**, 2417–2423 (2006).
 96. Safaei, N. *et al.* Comparative effect of grape seed extract (*Vitis vinifera*) and ascorbic acid in oxidative stress induced by on-pump coronary artery bypass surgery. *Ann. Card. Anaesth.* (2017). doi:10.4103/0971-9784.197834
 97. Raghavendra, M., Yatish, K. V. & Lalithamba, H. S. Plant-mediated green synthesis of ZnO nanoparticles using *Garcinia gummi-gutta* seed extract: Photoluminescence, screening of their catalytic activity in antioxidant, formylation and biodiesel production. *Eur. Phys. J. Plus* **132**, (2017).
 98. Mandic, A. I., Đilas, S. M., Četković, G. S., Čanadanović-Brunet, J. M. & Tumbas, V. T. Polyphenolic Composition and Antioxidant Activities of Grape Seed Extract. *Int. J. Food Prop.* (2008). doi:10.1080/10942910701584260
 99. Andre, R. S. *et al.* Biocompatible electrospun nanofibers containing cloxacillin: Antibacterial activity and effect of pH on the release profile. *React. Funct. Polym.* **132**, 26–35 (2018).
 100. Em, P. D. E. P., Recursos, E. E., Ciências, C. D. E. & Da, B. E.

Universidade Federal De São Carlos. (2004).

101. Zeng, J. *et al.* Influence of the drug compatibility with polymer solution on the release kinetics of electrospun fiber formulation. *J. Control. Release* **105**, 43–51 (2005).
102. Chou, S. F., Carson, D. & Woodrow, K. A. Current strategies for sustaining drug release from electrospun nanofibers. *J. Control. Release* **220**, 584–591 (2015).
103. Qin, J. *et al.* Evaluation of drug release property and blood compatibility of aspirin-loaded electrospun PLA/RSF composite nanofibers. *Iran. Polym. J. (English Ed.)* **22**, 729–737 (2013).
104. Dash, S., Murthy, N., Nath, L. & Chowdhury, P. KINETIC MODELING ON DRUG RELEASE FROM CONTROLLED DRUG DELIVERY SYSTEMS. *Acta Pol. Pharm. ñ Drug Res.* **67**, 217–223 (2010).
105. Dubey, P. & Gopinath, P. Fabrication of electrospun poly(ethylene oxide)-poly(capro lactone) composite nanofibers for co-delivery of niclosamide and silver nanoparticles exhibits enhanced anti-cancer effects in vitro. *J. Mater. Chem. B* **4**, 726–742 (2016).
106. Hu, J. *et al.* Electrospinning of poly(glycerol sebacate)-based nanofibers for nerve tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C* **70**, 1089–1094 (2017).