

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais

**CURATIVOS BIODEGRADÁVEIS À BASE DE POLI (BUTILENO
ADIPATO-CO-TEREFTALATO) COM INCORPORAÇÃO DE
GENTAMICINA**

Jóice Maria Scheibel

Dissertação de mestrado

Porto Alegre, dezembro 2017.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais

**CURATIVOS BIODEGRADÁVEIS À BASE DE POLI (BUTILENO
ADIPATO-CO-TEREFTALATO) COM INCORPORAÇÃO DE
GENTAMICINA**

Jóice Maria Scheibel

Dissertação realizada sob a orientação da Prof. Dra. Rosane Michele Duarte Soares e coorientação do Prof. Dr. Daniel Eduardo Weibel, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em preenchimento parcial dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Materiais.

Porto Alegre, dezembro 2017.

AGRADECIMENTOS

À UFRGS por me proporcionar, mais uma vez, a possibilidade de estudar e por todas as oportunidades oferecidas;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro;

À minha orientadora professora Dr^a. Rosane Michele Duarte Soares, por ser um grande exemplo de profissional, por ter apostado em mim, por estar sempre disposta a ensinar e guiar seus alunos pelo mundo da pesquisa científica. Pela amizade, conselhos e incentivo nos momentos que mais precisei. Obrigada novamente por ter me aceito como sua aluna e orientanda, desde a graduação.

Ao meu coorientador professor Dr. Daniel Eduardo Weibel, pelos ensinamentos, pelas horas de conversa, pelos auxílios em experimentos e por sempre estar disposto a ajudar no crescimento pessoal.

À professora Dr^a. Roberta Bussamara, pelas contribuições na dissertação, pelas dicas e pela realização de testes importantes para o fechamento de resultados do nosso trabalho.

À professora Dr^a. Dinara Jaqueline Moura da UFCSPA pela colaboração no trabalho através da realização das análises biológicas, resultados estes que são essenciais para publicações em revistas internacionais.

Aos meus colegas de laboratório Felipe, Guilherme e Cleverson, por todos os momentos de auxílio, amizade e troca de experiências, realmente vocês foram muito importantes para a conclusão do meu mestrado. Agradeço também a Gabriela, o Thomaz, o Matheus e a Suélen pela amizade e companhia no laboratório durante os experimentos.

À aluna de Iniciação Científica Camila, pela amizade, por todo o auxílio na realização dos experimentos, pela dedicação de suas horas nesse trabalho de mestrado e por contribuir com seu conhecimento, ajudando a realizar as atividades da melhor forma possível

Às minhas colegas de mestrado Márcia e Diana, pelas horas de estudo, trocas de conhecimentos e pela grande amizade que construímos neste último ano da Pós-graduação.

Ao meu amigo e namorado Matheus, por ser esta pessoa motivadora, por simplesmente toda a felicidade que me proporciona, por não medir esforços no momento de me ajudar e por estar sempre ao meu lado torcendo pelo meu sucesso.

Aos meus queridos pais, Nilza e Décio, e irmãos, Jóneia e Giovane, pelo suporte, auxílio, incentivo e amor por todos estes anos, por segurarem a barra nos momentos mais complicados e por não desistirem de sonhar comigo.

LISTA DE TRABALHOS GERADOS DURANTE O MESTRADO

Trabalhos publicados em periódicos internacionais

Meira, Stela Maris Meister; Zehetmeyer, Gislene; **Scheibel, Jóice Maria**; Werner, Júlia Orlandini; Brandelli, Adriano. Starch-halloysite nanocomposites containing nisin: Characterization and inhibition of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. *Lebensmittel-Wissenschaft + Technologie/Food Science + Technology JCR*, v. 68, p. 226-234, 2016.

Zehetmeyer, Gislene; Meira, Stela Maris Meister; **Scheibel, Jóice Maria**; de Brito da Silva, Cláudia; Rodembusch, Fabiano Severo; Brandelli, Adriano; Soares, Rosane Michele Duarte. Biodegradable and antimicrobial films based on poly(butylene adipate-co-terephthalate) electrospun fibers. *Polymer Bulletin (Berlin. Print) JCR*, v. 74, p. 1-26, 2016.

Trabalho submetido em periódico internacional

Menezes, Felipe; Siqueira, Nataly; Fung, Sthepanie; **Scheibel, Joice**; Moura Dinara; Guvendiren, Murat; Kohn, Joachim; Soares, Rosane. Aligned PCL-based fiber mat scaffolds modified with gelatin and hydroxyapatite increased alkaline phosphatase activity in human mesenchymal stem cells (hMSC). *Materials Science & Engineering C*, 2017.

Resumos publicados em anais de congressos

Scheibel, J. M.; Reginatto, C. L.; Weibel, D. E. ; Soares, R. M. D. Antibiotic-loaded wound dressings obtained from the PBAT-gentamicin combination. In: XVI Brazil Meeting, 2017, Gramado. Anais XVI Brazil Meeting, 2017.

Zehetmeyer, Gislene; **Scheibel, J. M.**; Meira, Stela Maris Meister; Brandelli, A.; Soares, R. M. D. Efeito do método de processamento nos filmes e nanofibras de poli (butileno adipato-co-tereftalato) incorporados com nisina. In: 13º Congresso Brasileiro de Polímeros, 2015, Natal.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 BIOMATERIAIS	4
2.2 POLÍMEROS	6
2.2.1 Polímeros sintéticos	9
2.2.2 Poli(butileno adipato-co-tereftalato) - PBAT	11
2.3 MATERIAIS COM PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS	14
2.3.1 Gentamicina	16
2.4 PROCESSOS DE OBTENÇÃO DE BIOMATERIAIS POLIMÉRICOS	18
2.4.1 Revestimento	18
2.4.2.1 Parâmetros importantes no processo de eletrofiação	21
2.4.2.2 Propriedades da solução polimérica	21
3 OBJETIVOS	26
3.1 OBJETIVO	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4 EXPERIMENTAL	27
4.1 MATERIAIS	27
4.2 MÉTODOS	28
4.2.1 Preparo dos filmes de PBAT por casting (evaporação do solvente)	28
4.2.2 Irradiação dos Filmes com radiação eletromagnética	28
4.2.3 Inserção da gentamicina na superfície	29
4.2.4 Preparo das soluções poliméricas para o processo de eletrofiação	29
4.2.5 Eletrofiação das fibras de PBAT/gentamicina	29
4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES	30
4.3.1 Primeira abordagem	31
4.3.1.1 Determinação de Ângulo de Contato da Água (WCA – Water Contact Angle)	31
4.3.1.2 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier modo Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR)	31
4.3.1.3 Espectroscopia de Fotoelétron de Raios X (XPS – X Ray Photoelectron Spectroscopy)	32
4.3.2 Segunda abordagem	33
4.3.2.1 Determinação da condutividade das soluções de eletrofiação	33

4.3.2.2	Determinação da viscosidade das soluções de eletrofiação.....	34
4.3.2.3	Grau de Intumescimento (GI).....	34
4.3.2.4	Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	35
4.3.2.5	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	35
4.3.2.6	Microscopia eletrônica confocal	35
4.3.2.7	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	36
4.3.2.8	Determinação de Ângulo de Contato da Água (WCA – Water Contact Angle)	36
4.3.2.9	Perfilometria.....	37
4.3.2.10	Análise qualitativa por ensaio de halos de inibição em placas de petri (antibiograma)	37
4.3.2.11	Análise Quantitativa por inibição de crescimento bacteriano em meio líquido (microdiluição em caldo).....	38
4.3.2.12	Ensaio de citotoxicidade	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	40
5.1	PRIMEIRA ABORDAGEM	40
5.2	SEGUNDA ABORDAGEM	47
6	CONCLUSÕES	72
7	REFERÊNCIAS.....	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do poli(butileno adipato-co-tereftalato) ^{17,43}	11
Figura 2. Estrutura da Gentamicina ⁶⁸	17
Figura 3. Esquema ilustrativo de um filme preparado por revestimento ¹⁰⁹	19
Figura 4. Esquema do processo de eletrofiação ⁹⁹	21
Figura 5. Morfologia das fibras com beads ¹	23
Figura 6. Efeito do aumento da viscosidade da solução polimérica sobre a morfologia das fibras de eletrofiação ¹⁰⁵	24
Figura 7. Equipamento de eletrofiação utilizado para a preparação das fibras de PBAT e PBAT/gentamicina.	30
Figura 8. Variação do WCA em função do tempo de irradiação das amostras de PBAT preparadas pelo método de revestimento e tratadas com UV em presença de O ₂ atmosférico.	41
Figura 9. Espectros de FTIR-ATR das amostras de PBAT obtidas por casting, não irradiada e irradiada-UV por 90 min na presença de O ₂ atmosférico.	42
Figura 10. Atividade antimicrobiana dos filmes de casting de PBAT testados contra E. coli.	44
Figura 11. Espectro de varredura de XPS da amostra 2 de PBAT, preparadas por revestimento, irradiadas com UV por 90 min em presença de O ₂ atmosférico.	45
Figura 12. Espectro de varredura de XPS da amostra 3 de PBAT, preparadas por revestimento, irradiadas com UV por 90 min em presença de O ₂ atmosférico.	46
Figura 13. Valores da condutividade das soluções de PBAT e PBAT/gentamicina de acordo com a variação da temperatura.	48
Figura 14. Curvas de fluxo para as soluções de PBAT e PBAT/gentamicina.	49
Figura 15. Espectros de FTIR para as fibras de PBAT e PBAT/gentamicina.	51
Figura 16. Imagens de microscopia eletrônica de varredura para as fibras de PBAT e PBAT/gentamicina e as respectivas distribuições de frequência em função do diâmetro das fibras: (a) PBAT, (b) PBAT 0,5%, (c) PBAT 2%, (d) PBAT 5% e (e) PBAT 10%.	54
Figura 17. Perfil do grau de intumescimento das fibras de PBAT E PBAT/gentamicina em tampão PBS durante a análise de 48 horas.	55

Figura 18: Imagens de microscopia eletrônica de varredura para as fibras de PBAT e PBAT/gentamicina: (a) PBAT, (b) PBAT 0,5%, (c) PBAT 2%, (d) PBAT 5% e (e) PBAT 10%, após 48 horas de imersão em PBS.....	57
Figura 19. Imagens de microscopia eletrônica confocal das fibras de PBAT e PBAT/gentamicina: (a, b) PBAT puro, (c, d, e, f) 0,5% e (g, h, i, j) 10% de gentamicina.	58
Figura 20. Termogramas de DSC para as fibras de PBAT e para as fibras de PBAT/gentamicina: (a) ciclo do 1º resfriamento e (b) ciclo do 2º aquecimento.	61
Figura 21. Fotografia da gota de água na superfície da fibras de PBAT para determinação do WCA.	64
Figura 22. Imagens de perfilometria das superfícies das fibras de PBAT e PBAT/gentamicina: a) PBAT, b) 0,5%, c) 2%, d) 5%, e) 10% de gentamicina.	66
Figura 23. Atividade antimicrobiana do filme das fibras de PBAT e das fibras de PBAT/gentamicina testados contra E. coli. Os números indicam as amostras 1)PBAT; 2)PBAT0,5%; 3)PBAT 2%; 4)PBAT 5%; 5)PBAT 10%.....	68
Figura 24. Os resultados são expressos como porcentagem média em células tratadas em comparação com controle \pm desvio padrão da médiade quatro experimentos independentes.....	70
Figura 25. Fotografia morfológica das culturas celulares após 24 horas de exposição à extração, 100x.	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estrutura química dos meros constituintes de polímeros comumente usados na produção de biomateriais e exemplos de suas aplicações típicas ^{28,157-164}	8
Tabela 2. Etapas de preparação das amostras utilizadas para a análise antimicrobiana.	43
Tabela 3. Resultados de DSC para as fibras de PBAT e PBAT/gentamicina.	60
Tabela 4. Resultados de solubilidade para as fibras de PBAT e PBAT/gentamicina.	63
Tabela 5. Valores de rugosidade expressas como RMS (μm) das fibras de PBAT e PBAT/gentamicina.	65
Tabela 6. Atividade antimicrobiana do filme das fibras de PBAT e das fibras de PBAT/gentamicina testados contra <i>E. coli</i>	69

RESUMO

Tradicionalmente, no tratamento de feridas graves o antimicrobiano tópico deve ser aplicado uma a duas vezes ao dia na área lesada para reduzir as infecções. No entanto, os pacientes geralmente sofrem desconforto com a aplicação de drogas tópicas e com a troca de curativos. Nesse contexto, o desenvolvimento de sistemas curativos biodegradáveis contendo fármaco antimicrobiano são fundamentais para a promoção de ações terapêuticas, reduzindo as infecções causadas por microrganismos e podendo substituir os curativos convencionas que não possuem polímeros biodegradáveis em sua composição. Para ir de encontro com essa necessidade, filmes de PBAT e PBAT/gentamicina foram preparados por meio de duas abordagens. Na primeira abordagem filmes de PBAT obtidos por *casting* foram funcionalizados por radiação UV durante 90 minutos na presença de O₂ atmosférico para posterior inserção de gentamicina na superfície através de soluções tampões contendo EDC e gentamicina. A superfície das amostras foi analisada pelo WCA, FTIR-ATR e XPS. A análise antimicrobiana dos filmes também foi realizada. Os resultados para os filmes de PBAT por casting mostram que o tempo de irradiação produziu superfícies altamente hidrofílicas com grupos oxigenados enxertados na superfície do polímero (C=O e C-OH). A análise antimicrobiana indicou que a gentamicina não ligou covalentemente com o PBAT, porém observou-se a presença de nitrogênio na superfície das amostras pela análise de XPS. Na segunda abordagem foram preparadas fibras de PBAT e PBAT/gentamicina a partir da eletrofiação. As soluções utilizadas no processo de eletrofiação foram preparadas com diferentes concentrações de gentamicina e passaram por análises de condutividade e viscosidade. As fibras de PBAT e PBAT/gentamicina foram caracterizadas quanto a suas propriedades físico-químicas, morfológicas, térmicas, antimicrobianas e biológicas. Nos resultados obtidos para as fibras de PBAT e PBAT/gentamicina observou-se que não houve mudança nos espectros após a mistura dos materiais, uma vez que as bandas de absorção foram preservadas e não houve o aparecimento de novos picos. A presença da gentamicina modificou a morfologia das amostras, diminuindo o diâmetro das fibras. O grau de intumescimento foi alterado com o acréscimo de gentamicina e houve modificação da morfologia das fibras após 48 horas de imersão em PBS, porém as fibras mantiveram-se presentes. A gentamicina aumentou o grau de molhabilidade das fibras PBAT. As fibras de PBAT/gentamicina possuem atividade antimicrobiana frente às cepas de *E. coli* e não apresentaram citotoxicidade de acordo com o padrão ISO 10993-5. Estes resultados reforçam que o PBAT pode ser usado como um sistema curativo com incorporação de fármaco, mostrando ser uma alternativa interessante de curativo/adesivo para uso tópico.

Palavras-chave: Curativos de PBAT, polímero biodegradável, atividade antimicrobiana, gentamicina.

ABSTRACT

Traditionally in the treatment of serious wounds, topical antimicrobial should be applied 1–2 times daily to the injured area to reduce infections. However, patients often suffer from discomfort with the application of topical drugs and with the exchange of dressings. In this context, the development of biodegradable curative systems containing antimicrobial drug are fundamental for the promotion of therapeutic actions, reducing the infections caused by microorganisms and being able to substitute conventional dressings that there aren't biodegradable polymers in their composition. To meet this need, PBAT and PBAT/gentamicin films were prepared using two approaches. In the first approach PBAT films obtained by casting were functionalized by UV radiation for 90 minutes in the presence of atmospheric O₂ for subsequent insertion of gentamicin on the surface through buffer solutions containing EDC and gentamicin. The surface of the samples was analyzed by the WCA, FTIR-ATR and XPS. Antimicrobial analysis of the films was also performed. The results for the PBAT films by casting show that the irradiation time produced highly hydrophilic surfaces with oxygenated groups grafted onto the polymer surface (C=O and C-OH). Antimicrobial analysis indicated that gentamycin did not bind covalently with PBAT, but nitrogen was observed on the surface of the samples by XPS analysis. In the second approach, PBAT and PBAT/gentamicin fibers were prepared from the electrospun. The solutions used in the electrospun process were prepared with different concentrations of gentamicin and underwent conductivity and viscosity analyzes. The PBAT and PBAT/gentamicin fibers were characterized as their physical-chemical, morphological, thermal, antimicrobial and biological properties. In the results obtained for the PBAT and PBAT/gentamicin fibers, it was observed that there was no change in the spectra after the materials were mixed, since the absorption bands were preserved and there were no new peaks. The presence of gentamicin modified the morphology of the samples, reducing the diameter of the fibers. The degree of swelling was altered with the addition of gentamicin and there was a change in the morphology of the fibers after 48 hours of immersion in PBS, but the fibers remained present. Gentamicin increased the degree of wettability of PBAT fibers. PBAT/gentamicin fibers have antimicrobial activity against *E. coli* strains and did not present cytotoxicity according to ISO 10993-5 standard. These results reinforce that PBAT can be used as a curative system with drug incorporation, proving to be an interesting dressing/adhesive alternative for topical use.

Key-words: PBAT dressing, biodegradable polymer, antimicrobial activity, gentamicin.

1 INTRODUÇÃO

O tratamento de feridas graves não é uma tarefa fácil, pois a região afetada é facilmente infectada. Os organismos infecciosos visam, preferencialmente, feridas sob materiais curativos, levando a possíveis infecções que exigem remoção do curativo e excisão de feridas cutâneas^{2,3}.

A inibição da multiplicação e invasão bacteriana é especialmente importante em feridas contaminadas. Tradicionalmente, os antimicrobianos tópicos devem ser aplicados 1-2 vezes ao dia na área lesada para reduzir as infecções, no entanto, os pacientes muitas vezes sofrem de desconforto com a aplicação de medicamentos tópicos e a troca de curativos. Nesse contexto, a infecção pode ser reduzida usando curativos que incorporam antibióticos⁴⁻⁶, além disso, a substituição dos curativos e os danos infligidos no epitélio recém formado podem ser minimizados.

O mercado conta hoje com uma gama variada de curativos que têm por finalidade básica proteger feridas de possíveis infecções e ressecamento durante sua cicatrização. A evolução científica aliado à elevada incidência de feridas e seus altos custos para a saúde pública têm estimulado pesquisadores de diversas regiões do mundo a buscar soluções mais eficientes e baratas, pautados na convicção de que um curativo não tem apenas que proteger feridas. Um bom curativo deve proporcionar proteção aos ferimentos, potencializar condições adequadas para a recuperação dos tecidos lesados e dar suporte para a fixação celular e para o desenvolvimento do novo tecido sadio.

O desenvolvimento de um novo sistema de liberação de fármacos é fundamental na promoção das ações terapêuticas, contudo isto só é possível à medida que novas tecnologias são desenvolvidas, de forma a reduzir as limitações nas terapias existentes⁷.

Diversas técnicas são propostas visando a fabricação destes biomateriais, entre elas podemos destacar algumas como revestimento e eletrofiação. A técnica de eletrofiação tem sido amplamente estudada para aplicação biomédica, devido à sua capacidade de produzir *scaffolds* fibrosos em 3D semelhantes a matriz extracelular (MEC), apresentando características atraentes como nanofibras uniformes e contínuas em escala nanométrica, com elevada área superficial, elevada porosidade,

interconectividade por toda a sua extensão e larga escala de produção⁸⁻¹⁰. Adicionalmente a técnica de eletrofiação é considerada uma abordagem simples de baixo custo e bastante versátil, podendo-se utilizar o mesmo sistema para processar materiais sintéticos ou naturais com fácil incorporação de componentes funcionais, tais como proteínas, fatores de crescimento, genes, enzimas, drogas, cerâmicas bioativas, entre outros^{11,12}.

Curativos para feridas com antibióticos¹³ feitos de membranas poliméricas fornecem concentrações bactericidas de antibióticos durante o tempo prolongado necessário para tratar completamente a infecção particular. Atualmente, diversos polímeros são usados para este fim, e mais recentemente o poli (butileno adipato-co-tereftalato) (PBAT)^{10,12,14}, que é um copolímero alifático aromático que possui características atrativas como biocompatibilidade, baixa cristalinidade, flexibilidade e um elevado alongamento à ruptura. É considerado completamente biodegradável e possui balanço ajustável entre a biodegradação e as propriedades físicas desejáveis^{14,15}.

As membranas nanofibrosas carregadas de fármacos oferecem vantagens em relação aos convencionais. Os antibióticos locais e o anestésico têm a vantagem de fornecer altas concentrações de fármacos na área precisa requerida e a dose total de antibiótico aplicado localmente não é normalmente suficiente para produzir efeitos tóxicos sistêmicos. Sendo assim, para este sistema ter propriedade antimicrobiana, um fármaco que inibe o crescimento de vários microrganismos é a gentamicina¹⁶. Gentamicina é um antibiótico elaborado por fungos do gênero *Micromonospora* que é eficaz contra muitas bactérias gram-negativas, especialmente espécies de *Pseudomonas* e *Escherichia coli*, bem como certas bactérias Gram-positivas, particularmente *Staphylococcus aureus*¹⁷.

Atualmente, estudos envolvendo substâncias antimicrobianas na matriz polimérica de PBAT são desenvolvidos utilizando o método de *casting*^{18,19} e eletrofiação²⁰, porém estes trabalhos não apresentam aplicações na área de biomateriais. Nesse sentido, realizamos um estudo envolvendo uma abordagem diferente dos demais encontrados na literatura, pois utilizamos a combinação de PBAT com um aminoglicosídeo, a gentamicina, com o intuito de desenvolver um sistema curativo biodegradável e antimicrobiano.

Desta forma, esta dissertação apresenta o estudo acerca do desenvolvimento de filmes de PBAT obtidos pelo método de evaporação do solvente (*casting*), para posterior inserção de gentamicina na superfície, e também fibras de PBAT com e sem a incorporação de gentamicina.

Este trabalho está descrito em duas abordagens: a primeira abordagem refere-se aos resultados obtidos a partir de filmes obtidos por *casting*. Na segunda abordagem é discutida a caracterização dos filmes obtidos por eletrofiação. Até o presente momento não há relatos na literatura de fibras de PBAT obtidas por eletrofiação em combinação com o antibiótico utilizado, a gentamicina.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIOMATERIAIS

Biomaterial é definido como qualquer substância ou combinação de substâncias, de origem natural ou sintética, que podem ser usadas durante qualquer período de tempo, como parte ou como sistemas que tratam, aumentam ou substituem quaisquer tecidos, órgãos ou funções do corpo²¹.

Dada às especificidades que os biomateriais apresentam, a tendência é que eles sejam considerados uma classe especial de materiais. Biomateriais sob a forma de implantes (ligamentos, enxertos vasculares, válvulas cardíacas, lentes intra-oculares, implantes dentários, etc) e dispositivos médicos (marca-passos, biossensores, corações artificiais, etc) são amplamente usados para substituir e/ou restaurar a função de tecidos ou órgãos traumatizados ou degenerados, e assim, melhorar a qualidade de vida do paciente²².

Como característica imprescindível, estes materiais devem ser biocompatíveis, ou seja, não devem ser tóxicos, carcinogênicos, antigênicos nem mutagênicos, não devem interferir com a cicatrização dos tecidos lesados durante o ato cirúrgico e os tecidos do hospedeiro devem tolerar bem as propriedades biomecânicas dos materiais. Além disso, os materiais devem ser fabricáveis, esterilizáveis e estáveis durante a implantação, não estimulando ou provocando o mínimo de reações alérgicas ou inflamatórias²³.

A química da superfície do material deve permitir a adesão das células e os eventos celulares. O substrato deve ser biocompatível de modo que as células sejam capazes de expressar o seu fenótipo normal. Além disso, tamanhos de poro e das interligações entre os poros do substrato podem afetar o crescimento interno de tecido nos implantes e por isso devem ser levados em consideração^{24,25}.

Mais recentemente, com o advento dos materiais de segunda e terceira geração, o conceito de biofuncionalidade passou a ser incluído nas discussões sobre o desenvolvimento e análise de novos biomateriais. Isto porque a biofuncionalidade se refere às propriedades físicas e mecânicas que permitem que um biomaterial desempenhe a função planejada. Não basta ser biocompatível, precisa também

ser biofuncional. Embora este conceito seja algo não muito preciso, é consenso que a funcionabilidade está associada à aplicação a que se destina. Com isso, é conveniente agrupar os materiais pelo campo de aplicação a que se destinam, ao invés de usar a classificação tradicional em termos de propriedades gerais que eles apresentam²³.

Os biomateriais podem ser classificados de acordo com o comportamento biológico (bioinerte, biotolerados, bioativos e reabsorvíveis) e composição química (metálicos, poliméricos, compósitos e naturais)²³.

Levando-se em consideração a resposta biológica causada pelo biomaterial no tecido hospedeiro, podemos classificá-los em:

Bioinertes - não provocam reação de corpo estranho no organismo e estão em contato direto com o tecido receptor. Exemplos: titânio, zircônia e alumina²¹.

Biotolerados - moderadamente aceitos pelo tecido receptor e são geralmente envolvidos por tecido fibroso. Exemplos: aço inoxidável, ligas Cr-Co e poli (metilmetacrilato) (PMMA)²¹.

Bioativos - há ligação direta aos tecidos vivos devido aos íons, por exemplo, o Ca^{+2} e/ou PO_4^{-2} presentes nos substitutos ósseos, que favorecem uma ligação química com o tecido ósseo. Exemplos: hidroxiapatita (HAp) e biovidros²¹.

Reabsorvíveis - lentamente degradáveis e gradualmente substituídos pelos tecidos. Exemplos: fosfato tricálcio (TCP) e biovidros²¹.

A seleção de um material biocompatível deve iniciar com a identificação das propriedades requeridas para a aplicação em questão. Como essas propriedades são extremamente sensíveis a variações da estrutura do material em escala micro ou nanométrica, é fundamental que se tenha um entendimento de como se correlaciona a sua microestrutura com as propriedades desejadas²⁶.

A habilidade dos biomateriais de serem metabolizados pelo corpo permite que sejam gradualmente substituídos por novas células para formar tecidos funcionais²⁷. Na área biomédica, a exemplo do que ocorre em áreas que exigem elevada segurança, como a aeronáutica e a aeroespacial, o custo individual de uma peça não é, ou não deveria ser, o fator primordial na escolha da mesma. A seleção do material é apenas uma das etapas que garantirão – ou não – o sucesso de uma empreitada. Desde a identificação das necessidades de um paciente até a produção e comercialização de componentes biomédicos, passando pelo projeto, fabricação e testes, um longo caminho deve ser percorrido, dele participando engenheiros

(projetistas e de materiais), médicos/dentistas, biólogos, químicos, bioquímicos e até profissionais com formação em desenho industrial e marketing²⁸.

A caracterização do material não habilita o seu uso como biocomponente, mas pode – e deve – ser utilizada como uma pré-seleção de condições a serem testadas nas etapas seguintes. Os materiais “aprovados” nesta etapa terão que passar por testes laboratoriais (testes *in vitro*) e posteriormente por testes *in vivo* (em animais e testes clínicos). À medida que se percorre este caminho, os testes vão se tornando mais caros e complexos, devendo ser restringidos ao menor número de condições possíveis²¹.

Na engenharia de tecido, onde se usam os biomateriais para regeneração de tecidos ou órgãos, há necessidade de se desenvolver materiais com características diferentes para funções biológicas diferentes. Os tecidos biológicos diferem entre si. Por exemplo: o tecido mole como pele, e tecido duro como osso, possuem módulos de elasticidade variáveis, estruturas químicas diferentes, porosidades e mecanismo de regeneração peculiar. Sendo assim, devemos considerar os parâmetros biológicos para o desenho de novos biomateriais biocompatíveis²⁷. Estes parâmetros terão papéis preponderantes na adesão, proliferação, diferenciação e formação funcional dos tecidos.

Os requisitos fundamentais para o sucesso dos novos materiais devem incluir avaliação e resposta específica dos mediadores bioquímicos. Existe um desafio de trabalhar em ciência dos materiais modificando as propriedades dos materiais em relação às propriedades mecânicas, estrutura química, massa molar, origem dos monômeros, ligações cruzadas, morfologia de superfície, porosidade, capacidade de degradação e sua toxicidade. Deve-se também levar em consideração a capacidade do material de tomar forma durante sua síntese do desenho tridimensional do tecido a ser reconstruído²⁷.

2.2 POLÍMEROS

Os biomateriais poliméricos estão dentre os mais empregados no âmbito médico²⁹. As principais vantagens dos biomateriais poliméricos em comparação com os materiais cerâmicos ou metálicos incluem a facilidade de fabricação para produzir formas variadas (partículas, filmes, fios, dentre outros), o processamento secundário,

custo razoável e disponibilidade em encontrar materiais com propriedades mecânicas e físicas desejadas para aplicações específicas³⁰.

Polímeros são macromoléculas de alta massa molar formadas pela ligação de unidades repetitivas menores (meros) ao longo da cadeia principal. As ligações entre os meros são covalentes, no entanto, ligações de hidrogênio entre diferentes cadeias, assim como interações de van der Waals e reticulação por meio de ligações covalentes podem também ocorrer^{30,31}. Os polímeros do tipo termoplásticos, por exemplo, capazes de se fundir e solidificar repetidas vezes, são caracterizados por apresentar ligações químicas fracas de van der Waals entre as cadeias. Desta forma, sob aquecimento, as cadeias são capazes de deslizar entre si, podendo também ser observada a ruptura de interações intercadeias. Já os polímeros termorrígidos são caracterizados por uma estrutura tridimensional reticulada estabilizada por ligações covalentes fortes. Assim, estes materiais são insolúveis e as ligações são rompidas somente por elevadas quantidades de energia, com consequente degradação do polímero^{29,32}.

Diversos critérios devem ser considerados ao se selecionar um material polimérico, uma vez que cada polímero pode apresentar propriedades particulares que irão direcioná-lo para uma aplicação específica³³. Neste sentido, as formas que as cadeias podem assumir, a disposição das unidades monoméricas, a presença ou não de átomos ou grupos funcionais particulares, a rigidez estrutural, a polaridade da cadeia e a massa molar do polímero resultam em subclasses de compostos que podem apresentar comportamentos distintos e com potencial de aplicação visando diferentes finalidades²⁹.

Os polímeros podem ser obtidos a partir de reações de polimerização ou por meio de organismos vivos, classificando-se, assim, respectivamente, como sintéticos e naturais, os quais podem ser também quimicamente modificados. Os mais utilizados são os sintéticos devido a sua maior estabilidade durante o uso e por possuírem propriedades bem definidas e reprodutíveis, além de baixo custo. Na Tabela 1 são mostradas as estruturas monoméricas e aplicações de alguns tipos de polímeros comumente utilizados na constituição de biomateriais.

Tabela 1. Estrutura química dos meros constituintes de polímeros comumente usados na produção de biomateriais e exemplos de suas aplicações típicas^{29,160–167}.

Polímero	Estrutura	Aplicação
Polietileno (PE)		Tubos de drenagem e cateteres
Polipropileno (PP)		Suturas e reparo de hérnias
Poli(tereftalato de etileno) (PET)		Enxertos vasculares, reconstrução de ligamentos e fixação de implantes
Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA)		Suturas e suporte para crescimento celular
Poli(ε-caprolactona) (PCL)		Dispositivo para liberação de drogas e suporte para crescimento celular
Poli(cloroeto de vinila) (PVC)		Sacos para armazenamento de sangue
Poli(dimetilsiloxano) (PDMS)		Suporte para crescimento celular
Poli(2-hidroxietilmetacrilato) (poli(HEMA))		Lentes de contato
Ácido hialurônico		Carreador de células, substituto de fluido sinovial
Quitosana		Curativos, suporte para crescimento celular e dispositivo para liberação de drogas

A análise da forma de degradação dos polímeros é também de grande importância no direcionamento de sua aplicação específica, devendo-se considerar não somente a cinética do processo (que define sua duração *in vivo*), mas também a alteração progressiva de sua funcionalidade, já que modificações ocorrem progressiva e irreversivelmente na estrutura e composição do biomaterial, além das propriedades dos produtos gerados ao longo de sua decomposição que podem, eventualmente, ser citotóxicos. Os polímeros sintéticos e naturais se degradam de formas distintas, por meio da clivagem hidrolítica e enzimática de suas ligações, respectivamente³⁴. Desta forma, a degradação de um biomaterial polimérico deve ser bem elucidada para que haja segurança quando de seu contato com os fluidos fisiológicos do paciente.

2.2.1 Polímeros sintéticos

Vários dos polímeros sintéticos utilizados na produção de biomateriais apresentam cinética de degradação conhecida e podem ser sintetizados de forma controlada e reprodutível. Estes materiais são facilmente adaptáveis para exercer uma grande variedade de propriedades funcionais, sendo possível manipular, por exemplo, a forma e o tamanho dos dispositivos, assim como suas propriedades mecânicas (como a viscoelasticidade). Nesta categoria, os principais tipos de polímeros constituintes de biomateriais são: poliamidas, polietileno, polipropileno, poliácridatos, fluorocarbonos, poliésteres, poliéters, poliuretanos, entre outros^{29,35}.

Apesar das adequadas propriedades funcionais, os polímeros sintéticos geralmente não apresentam grupos químicos favoráveis para interação celular e podem ainda liberar subprodutos tóxicos na corrente sanguínea durante sua degradação, o que poderia desencadear reações inflamatórias no paciente ao longo de sua utilização^{29,33}. A degradabilidade destes materiais está relacionada com as ligações químicas hidroliticamente instáveis na cadeia principal do polímero. Os grupos funcionais sensíveis à hidrólise incluem, por exemplo, os ésteres, carbonatos, amidas, uretanos, ureias e anidridos³⁴.

Um exemplo deste caso é o poli(tereftalato de etileno) (PET) que foi originalmente desenvolvido para aplicações têxteis e alimentícias, mas é também utilizado para a confecção de suturas e enxertos vasculares^{29,36}. Por apresentar toxicidade durante a degradação, o PET necessita de um tratamento específico e

rigoroso na limpeza e lavagem do biomaterial a fim de não desencadear efeitos deletérios durante sua utilização²⁹.

O polietileno (PE) de alta densidade e alta massa molar é altamente estável, sendo caracterizado por ser não antigênico, não alergênico, não absorvível e por apresentar baixa taxa de desgaste. Tais propriedades fazem com que este material seja uma referência de substância inerte em termos de reação tecidual. O PE possui cadeia com estrutura linear e é o polímero base para outros materiais, tais como polipropileno e o politetrafluoretileno³⁷. As propriedades do PE de alta massa molar tornam este material propício para aplicação em próteses de joelho e quadril, porém, devido à apolaridade da cadeia polimérica, apresenta baixa reatividade química, o que restringe sua fixação ao tecido ósseo³⁸. Tal limitação pode ser contornada pela modificação da morfologia do polímero, por meio da inserção de poros no material³⁸, que melhor propicia e acomoda o crescimento celular na matriz.

O aumento da porosidade possibilita não somente maior aplicabilidade do PE de alta massa molar, mas também a de outros tipos de polímeros tanto sintéticos quanto de origem biológica, que podem ser utilizados com sucesso como *scaffolds* na área de Engenharia Tecidual. Para tal, os dispositivos devem ser produzidos de forma a mimetizar a matriz extracelular, permitindo a adsorção de compostos importantes, sendo suficientemente estáveis no meio de cultura das células neles inoculadas e no ambiente fisiológico no qual serão implantados, apresentando poros com arquitetura apropriada quanto ao formato e distribuição, ao tamanho (100 a 500 μm) e à interconectividade (>85%, 100 μm), dentre outras características de relevância^{39,40}.

Especificamente na área de Engenharia Tecidual, os polímeros sintéticos mais utilizados são os biodegradáveis, como os poliésteres alifáticos saturados, incluindo o poli(ácido lático) (PLA) e o poli(ácido glicólico) (PGA), bem como o copolímero poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PGLA)⁴¹. Tais compostos sofrem degradação hidrolítica por meio da desesterificação. Após degradados, os componentes monoméricos de cada polímero são removidos por vias naturais, havendo no organismo mecanismos altamente regulados para remover completamente os componentes monoméricos dos ácidos lático e glicólico, por exemplo³⁹. Devido a essas propriedades, tais polímeros têm sido utilizados na confecção de suportes tridimensionais para proliferação celular, como suturas biodegradáveis, dispositivos absorvíveis de fixação óssea e como matrizes para a liberação de fármacos³⁵.

2.2.2 Poli(butileno adipato-co-tereftalato) - PBAT

Dentre os materiais utilizados na área de biomateriais, os polímeros apresentam grande potencial de uso, pois são, geralmente, fáceis de produzir, manusear e apresentam características mecânicas semelhantes aos dos materiais biológicos.

O poli (butileno adipato-co-tereftalato) (PBAT) é um polímero alifático aromático com balanço ajustável entre a biodegradação e as propriedades físicas desejáveis, sendo um polímero considerado completamente biodegradável^{18,19,42,43}. Sua estrutura química está apresentada na Figura 1. A unidade repetitiva “x” (butileno adipato) representa 57% da sua composição e a unidade repetitiva “y” (butileno tereftalato) ocupa o resto da sua estrutura. PBAT é obtido pela reação de policondensação do poli(butileno adipato) e poli(butileno 10 tereftalato)^{44,45}, em que os monômeros aromáticos contribuem para a boa estabilidade térmica e propriedades mecânicas e os monômeros alifáticos fornecem flexibilidade e boa biodegradabilidade⁴⁵. Além disso, o PBAT é flexível e possui maior alongamento na ruptura que a maioria dos polímeros biodegradáveis, tais como o ácido poli lático (PLA), muito utilizado em parafusos de fixação ortopédica¹⁸.

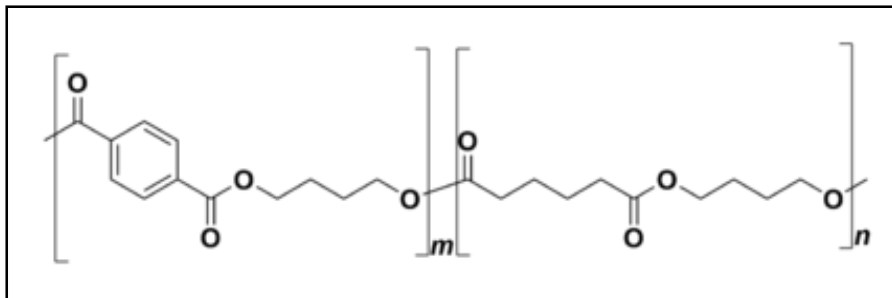


Figura 1. Estrutura química do poli(butileno adipato-co-tereftalato)^{18,44}.

O PBAT é comercialmente disponível, produzido pela empresa BASF (Alemanha) desde meados da década de 90. O mesmo também é conhecido por Ecoflex®, e foi o primeiro material totalmente biodegradável produzido pela empresa alemã. Sua eficiência de biodegradabilidade e compostabilidade são comprovadas

por certificações europeias (EN13432) e norte-americanas (ASTM 6400). O PBAT é um polímero totalmente livre de metais pesados, não apresenta toxicidade e é autorizado para aplicações em embalagens de alimentos pela Food and Drug Administration (FDA)⁴³.

O poli (butileno adipato-co-tereftalato) tem despertado especial interesse na substituição de polímeros sintéticos não biodegradáveis quando se leva em consideração fatores como o balanço da sua biodegradabilidade (ou seja, tempo de vida) e as suas propriedades físicas (por exemplo, propriedades mecânicas e térmicas), as quais podem ser ajustadas pelo controle da razão molar dos comônmeros nestes polímeros⁴⁶. Além disso, apresenta excelente compatibilidade com outros materiais e ainda, por apresentar excelente propriedade para extrusão de filmes. O PBAT é considerado um polímero completamente biodegradável¹⁸, apresentando um processo de degradação bastante acelerado. Pode degradar em poucas semanas, uma vez que entre em contato com o meio ambiente, através da intervenção de enzimas naturais. E como resultado, o produto final deste processo inclui água e dióxido de carbono, junto com a nova biomassa^{47,48}.

O processo de biodegradação no solo depende de um ambiente específico, sendo influenciado pelo clima, qualidade do solo e população de micro-organismos. Os poliésteres podem ser considerados materiais biodegradáveis, visto que a ligação éster pode sofrer hidrólise. Esta ligação é suscetível a ataques químicos e/ou biológicos, transformando as moléculas iniciais em fragmentos menores, capazes de atravessar a membrana celular de organismos⁴⁹. O PBAT apresenta na sua cadeia polimérica uma estrutura aromática, em contrapartida, a existência de heteroátomos e carbonila favorecem a ação de degradação. Além do mais, a degradação do PBAT é favorecida pelo polímero apresentar estrutura linear⁴⁹, uma vez que quanto maior o número de ramificações, menor ou mais lenta é a degradação. A biodegradação de polímeros biodegradáveis em geral, ocorre com a colonização de sua superfície por micro-organismos e a formação de biofilme⁴⁹.

O PBAT tem demonstrado elevado potencial para aplicações industriais e ambientais, e recentemente para possíveis utilizações na engenharia de tecidos^{14,50}. Jao et al.⁵¹ estudaram a biocompatibilidade in vitro de filmes de PBAT e concluíram que este biopolímero apresenta potencial para ser utilizado em aplicações biomédicas por não apresentar citotoxicidade e promover proliferação celular, especialmente após modificação da superfície das amostras com heparina, ácido hialurônico e quitosana.

Fukushima K et al.¹⁴ avaliaram a citotoxicidade de nanocompósitos de PBAT com diferentes concentrações de argilas para aplicações biomédicas, concluíram que os nanocompósitos não mostraram efeitos significativos de citotoxicidade de acordo com os testes preliminares de biocompatibilidade, sugerindo que o material é atraente para engenharia de tecidos. Goes et al.⁵², avaliaram nanofibras de três polímeros biodegradáveis poli (D ácido láctico) (PDLA), poli (ϵ -caprolactona) (PCL), e poli (butileno adipato-cotereftalato) (PBAT) e seus nanocompósitos com uma nanoargila montmorilonita (MMT) produzidas por eletrospinação. A morfologia, o comportamento térmico e a estrutura interna das nanofibras foram analisados por microscopia eletrônica de varredura e transmissão, calorimetria diferencial de varredura e difração de raios X, respectivamente. Os autores verificaram que as nanofibras dos nanocompósitos possuíam diâmetros menores do que os correspondentes polímeros puros e que as nanofibras de PBAT puro e de PBAT/MMT apresentaram a menor cristalinidade de todas as mantas. A viabilidade celular de todas as nanofibras foi analisada pelo teste de MTT. Os resultados mostraram que nenhuma manta nanofibrilica apresentou toxicidade às células e que as nanofibras de PBAT puro e seu nanocompósito propiciaram ainda um ambiente mais favorável ao desenvolvimento celular de fibroblastos e cardiomiócitos do que as condições oferecidas pelos controles, provavelmente por apresentarem menores diâmetros e baixa cristalinidade em relação às demais nanofibras. Estes resultados mostram o potencial de uso destas mantas nanofibrilicas como suportes de crescimento celular. A principal limitação deste e de outros polímeros para aplicação médica é a fraca resistência mecânica, no entanto, verificou-se que a adição de partículas de tamanho nanométrico pode minimizar esta desvantagem, melhorando propriedades mecânicas, térmicas, além de induzir a osteogênese e acelerar o processo de osseointegração^{14,53,54}.

Rodrigues et al.¹⁰, avaliaram a influência da incorporação de baixos teores de nanotubos de carbono de múltiplas paredes (MWCNT) superhidrofílicos em compósitos de PBAT. Os autores verificaram que os *scaffolds* de PBAT assim como os compósitos com incorporação de 0,1 e 0,5% de sMWCNT não foram citotóxicos, apresentaram maior atividade de ALP e maior incorporação do corante vermelho de alizarina em relação ao grupo controle.

Este polímero exibe boas propriedades térmicas e mecânicas, as quais podem ser comparadas com aquelas do polietileno de baixa densidade (PEBD) em relação

às propriedades de tração^{55,56}. O PBAT possui um elevado alongamento na ruptura^{14,57}, em alguns casos, superior a 600%⁵⁸, apresenta temperaturas de processamento mais baixas, na faixa de 120-150°C^{50,59}. Além disso, apresenta baixa permeabilidade ao vapor de água⁶⁰.

Como a maioria dos polímeros semicristalinos, as propriedades finais do PBAT são conduzidas em função da sua morfologia, que por sua vez é controlada pela razão da composição entre as unidades do butileno tereftalato (BT) e as unidades do butileno adipato (BA). O PBAT contém pequenos cristais com uma ampla faixa de distribuição após a fusão, e a região cristalina é composta basicamente por unidades BT, enquanto que, todas as unidades BA se localizam na região amorfa^{46,61}.

2.3 MATERIAIS COM PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS

De modo geral, os materiais antimicrobianos são compostos que possuem a habilidade de inibir o crescimento ou matar determinados microrganismos. Esta propriedade é muito importante em materiais destinados aos mais diferentes usos, em especial àqueles que necessitam da isenção ou redução de agentes microbiológicos nocivos e das doenças por eles causadas. Estes materiais têm ampla aplicação nas indústrias de alimentos, em ambientes hospitalares e laboratoriais, produtos farmacêuticos e veterinários, entre outros. Com relação à saúde pública, em especial, muitos recursos podem ser economizados quando prioriza-se uma atuação preventiva e de controle. Neste contexto, a utilização de produtos antimicrobianos eficientes, que visam evitar contaminações causadas por fungos, bactérias e outros microrganismos de diferentes espécies podem ser de grande valia⁶².

Bactérias e fungos têm provocado epidemias durante toda a história de vida do homem, de modo que os agentes microbicidas já são conhecidos e utilizados há séculos, especialmente no que se refere ao tratamento de água, conservação de gêneros alimentícios e produtos farmacêuticos. As formas de se combater a atuação destes microrganismos consistia desde a utilização de jarros de prata e de cobre para o armazenamento de água, até a utilização de vinagre, vinho ou cloreto de mercúrio na limpeza de ferimentos⁶³. Porém, foi somente na metade do século XIX que se descobriu o papel dos microrganismos sobre uma variedade de doenças infecciosas que vinham assolando a humanidade desde os tempos mais antigos. A penicilina começou a ser usada nos anos 40, e tornou-se uma das principais salvadoras de vidas

na Segunda Guerra Mundial⁶⁴. Durante as duas décadas seguintes, novas classes de antimicrobianos foram sendo desenvolvidas, cada vez com um espectro antimicrobiano mais amplo e de maior atividade. No entanto, o uso demasiado de antibióticos e compostos antimicrobianos comuns, que deve resultar somente na eliminação dos microrganismos presentes em um sistema, pode também significar uma seleção indesejável que acaba por favorecer a permanência dos organismos mais resistentes aos agentes em questão. Com o surgimento de cepas bacterianas e fúngicas que oferecem resistência aos microbicidas habituais, tornando-os obsoletos e ineficazes, tem-se intensificado a busca por novos materiais com potencial antimicrobiano⁶⁵.

O tipo de atuação antimicrobiana de um material sobre os microrganismos distingue-se entre um efeito letal ou simplesmente inibitório, podendo ser classificado desta forma como bactericida⁶⁶. Denominam-se bacteriostáticos os agentes que detêm o crescimento e a reprodução dos microrganismos, impedindo desta forma a sua proliferação, mas sem provocar morte imediata. Materiais bactericidas, por sua vez, são aqueles que provocam danos irreversíveis às células, gerando alterações incompatíveis com a sobrevivência do microrganismo. Um material pode apresentar um comportamento totalmente bactericida, ou totalmente bacteriostático, ou ainda exibir ambos simultaneamente. A forma de ação mais adequada nem sempre é tão óbvia quanto parece, uma vez que pode ser bastante variável de acordo com o microrganismo sobre o qual está atuando. Isto significa que um agente que é bacteriostático para um organismo pode ser bactericida para outro organismo, ou ainda, para outra cepa do mesmo⁶⁷.

A necessidade apresentada pelas indústrias no desenvolvimento de produtos com ação bactericida, inibindo ou conduzindo à morte de colônias de determinados microrganismos, tem sido crescente. Muitos procedimentos têm sido sugeridos e adotados no processo de fabricação de diferentes produtos, visando sempre o controle e prevenção de possíveis doenças geradas pelos agentes patológicos, ao invés do combate apenas às possíveis infecções ocorridas já após o contato com os microrganismos. Com isto, as inúmeras atividades de pesquisa que se seguiram desde então têm proporcionado o desenvolvimento de materiais com propriedades especiais, denominados materiais antimicrobianos. Tais propriedades podem ser agregadas durante a sua produção, envolvendo técnicas específicas e formulações adequadas que forneçam a ação bactericida, mas que, ao mesmo tempo, não

comprometam as propriedades intrínsecas dos materiais, como as suas características mecânicas, elétricas, térmicas, magnéticas e outras.

Vários compostos apresentam um já conhecido efeito bactericida, especialmente os de natureza orgânica. Contudo, o uso deste tipo de composto apresenta diversas desvantagens, como baixos pontos de fusão e de ebulição, tendência de se volatilizar ou se decompor, além de serem muitas vezes tóxicos⁶⁸. Os sistemas poliméricos de liberação controlada representam uma nova estratégia para incorporação de substâncias ativas como: (1) maior controle da liberação do princípio ativo; (2) redução de doses tóxicas e subterapêuticas; (3) monitoramento dos níveis de fármaco no sítio de aplicação; (4) obtenção de altas concentrações de fármaco no local a ser tratado, quando comparadas com os níveis plasmáticos após administração oral; e (5) direcionamento do princípio ativo a alvos específicos, sem imobilização significativa das espécies bioativas. Além disso, diminui o intervalo de dosagem e reduz efeitos colaterais indesejados uma vez que utiliza uma menor quantidade do princípio ativo, resultando em menor custo⁶².

2.3.1 Gentamicina

O sulfato de gentamicina é um complexo de aminoglicosídeo produzido por fermentação de *Micromonospora purpurea* ou *M. echinospora*, utilizado como o sal de sulfato^{69,70}. Trata-se de um antibiótico de largo espectro e que apresenta sua ação por inibir o crescimento de uma vasta variedade de micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos, incluindo espécies resistentes à tetraciclina, cloranfenicol, canamicina, e colistina, especialmente as *Pseudomonas spp.*, *Proteus spp.*, *Staphylococcus spp.* e *Streptococcus spp.*^{71,72}.

Os antibióticos aminoglicosídeos, desde sua descoberta na década de 40, fazem parte de um importante acervo terapêutico antibacteriano. A partir do isolamento da estreptomicina em 1943, em uma cepa de *Streptomyces griseus* que produzia uma substância que inibia o crescimento de diversos micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos, inclusive do bacilo da tuberculose, foi possível isolar inúmeras novas substâncias com potencial antibacteriano⁷³. Os aminoglicosídeos recebem este nome por serem compostos basicamente por açúcares aminados e resultam em um pKa superior a 9,0⁷⁴.

O sulfato de gentamicina inibe a síntese proteica bacteriana por ligação à subunidade ribossomal 30S, levando à leitura incorreta do RNA mensageiro, ocasionando a morte celular^{71,75}. Tal produto é altamente solúvel em água (50 mg/mL), praticamente insolúvel em álcool e outros solventes orgânicos, estável à temperatura ambiente e em pH 6 a 8, possuindo estrutura polar catiônica, o que impede a sua absorção oral dificultando sua penetração intracelular^{69,73,76}. A Figura 2 ilustra o fármaco comercial e a estrutura da gentamicina.

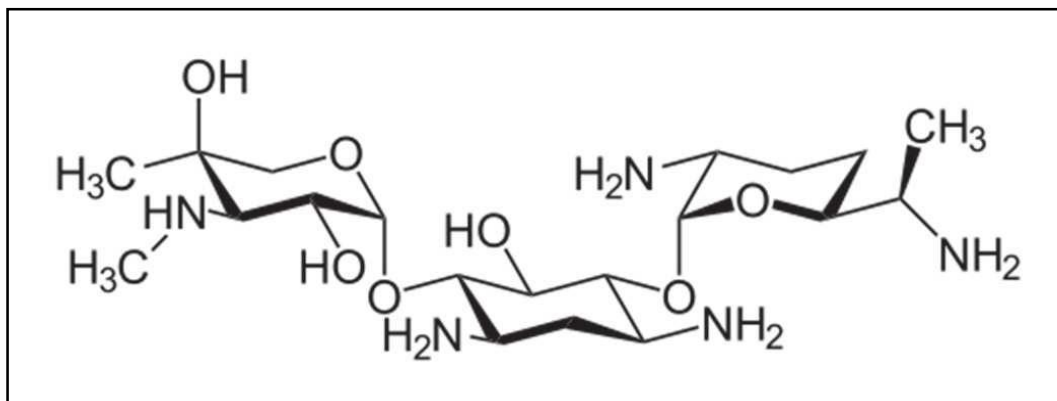


Figura 2. Estrutura da Gentamicina⁶⁹.

Devido a estas características, sua ação antimicrobiana ocorre sobretudo em meio aeróbio e em pH alcalino, dado que requer oxigênio para o transporte ativo nas células microbianas sendo mais ativo em meio alcalino do que ácido⁷³.

Pode ser utilizada no tratamento de infecções do trato biliar, endocardite, meningite, otites média e externa, septicemia, infecções de pele causadas por queimaduras ou devido a úlceras (causadas por *Pseudomonas spp.* e outros organismos Gram negativos), infecções do trato urinário (pielonefrite aguda). A gentamicina pode ser aplicada topicamente para tratamento de infecções locais, como impetigo contagioso, dermatite eczematosa e dermatite seborreica, e infecções oculares superficiais.

Como desvantagem, o sulfato de gentamicina, quando utilizado em altas concentrações e por um longo período de tempo, promove sérios problemas de toxicidade. Decorrente de sua absorção por meio intracelular, seus efeitos tóxicos mais relevantes são nefrotoxicidade, ototoxicidade e bloqueio neuromuscular⁷³.

Todavia, seu uso se faz importante pelo amplo espectro de ação diante das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, e baixo custo em relação a outras classes de antimicrobianos de igual efetividade⁷⁴. O modelo de liberação controlada de fármaco por meio transdérmico, tem o objetivo de atingir a corrente sanguínea através da pele ou uma ação local, contrastando diretamente com as formas farmacêuticas de uso tópico, nas quais a permanência do fármaco na pele é desejada. Assim, tanto o dispositivo de liberação do fármaco quanto as propriedades da pele servem como mecanismo de controle sobre a velocidade de liberação⁷.

A incorporação de antibióticos em dispositivos para liberação controlada tem se tornado uma prática comum no meio médico, pois proporciona uma elevada concentração do fármaco no local infectado, sem que haja toxicidade sistêmica⁷⁷. Em consequência do seu amplo espectro de ação, o aminoglicosídeo sulfato de gentamicina, configura-se como um dos antibióticos mais extensamente utilizados em dispositivos de liberação controlada, além de sua solubilidade e estabilidade em altas temperaturas⁷⁷.

Chen D. W., et al⁷⁸, investigaram liberação in vitro de vancomicina, gentamicina e lidocaína a partir de novas membranas nanofibras de PLGA/colágeno e obtiveram membranas extracelulares biomiméticas biodegradáveis para entrega prolongada de fármaco a longo prazo.

Em outro estudo¹⁶, desenvolveram nanofibras de PLGA/gelatina carregadas com gentamicina preparadas por eletrospinning e demonstraram que o fármaco estava disperso na matriz do polímero e apresentava potencial para ser utilizado em práticas de cuidados de feridas para prevenir infecção no local da ferida.

2.4 PROCESSOS DE OBTENÇÃO DE BIOMATERIAIS POLIMÉRICOS

2.4.1 *Casting*

Em geral um dos métodos mais empregados na preparação de filmes finos de sistemas poliméricos é o método de espalhamento de solução por *casting*. Além de eficiente na confecção de filmes finos, esse método é de fácil implementação e utilização. O método *casting* consiste em depositar a solução polimérica no substrato

desejado e deixar que o solvente utilizado se evapore. Com o aumento, controlado, da temperatura o solvente evapora mais rapidamente. O resultado é um filme polimérico fino e homogêneo. A técnica de revestimento (*casting*) (Figura 3) tem vantagem por não fazer-se necessário o uso de equipamentos⁷⁹⁻⁸¹.

Este processo é utilizado em muitos estudos para a obtenção de filmes de PBAT para diferentes objetivos, por exemplo, a obtenção de filmes para serem aplicadas como embalagens para alimentos⁸⁰, para realizar um estudo sobre a modificação nas propriedades mecânicas, térmicas, morfológicas e de biodegradação dos filmes⁸¹ e realizar uma avaliação dos resultados em relação a diferentes métodos de obtenção⁷⁹.

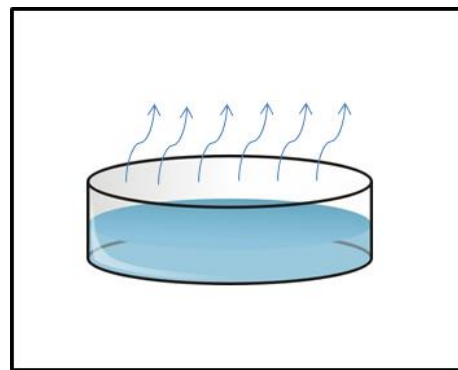


Figura 3. Esquema ilustrativo de um filme preparado por revestimento¹¹⁰.

2.4.2 Eletrofiação

A eletrofiação é uma técnica muito eficaz para a produção de fibras poliméricas com diferentes formas e tamanhos, dentro de uma escala entre micro e nanométrica, as quais são chamadas de estruturas primárias^{52,82,83}. O diâmetro final da fibra depende principalmente de três principais variáveis no processamento (taxa de fluxo da solução, tensão aplicada, distância entre a ponta da agulha e o coletor), além disso, depende também das propriedades da solução (viscosidade, condutividade e tensão superficial)⁸⁴.

A técnica de eletrofiação consiste na produção de fibras a partir da aplicação de um forte campo elétrico, tipicamente 10-30 kV⁸⁵, e da existência de uma diferença de potencial entre o tubo capilar que contém a solução de interesse e o coletor (Figura 4). Ambos são eletricamente condutores e separados a uma distância ótima entre os

dois⁸⁶. Inicialmente, a solução é mantida pela sua tensão superficial na forma de uma gota na extremidade do capilar. Com o aumento da tensão elétrica, a superfície da gota se alonga proporcionando a formação de uma gota, conhecida como cone de Taylor, a qual é ejetada quando as forças eletrostáticas superam a tensão superficial da solução^{52,87,88}. Durante a trajetória do jato, o solvente evapora e o polímero solidifica-se, resultando na formação de fibras ultrafinas que se depositam na superfície do coletor^{82,89,90}.

Nanofibras poliméricas podem ser obtidas por diferentes técnicas de processamento, tais como, síntese, separação de fase, auto organização e eletrofiação^{86,91}. Entretanto, o processo de eletrofiação tem um grande potencial para aplicação em escala industrial^{91,92}. Além disso, as fibras obtidas por eletrofiação são consideravelmente muito mais finas em diâmetro e, portanto, superiores em relação superfície-volume do que as fibras obtidas por extrusão mecânica convencional ou processo de fiação^{93,94}.

Neste sentido, o processamento de materiais poliméricos em escala sub e nanométrica ganha constante atenção em função das novas propriedades associadas à escala nanométrica, bem como das possíveis novas aplicações para estes materiais. Nanofibras são fibras sólidas ultrafinas notáveis por seu diâmetro muito pequeno (menores que 100 nm), sua grande área superficial por unidade de massa e tamanho de poro pequeno. Devido às propriedades inerentes do processo de eletrofiação, que pode controlar a deposição das fibras de polímero sobre um substrato alvo, nanofibras com complexo e formas tridimensionais sem emendas podem ser formadas^{90,95}.

Devido ao melhorado aumento da área superficial destes materiais, a técnica de eletrofiação é considerada uma técnica promissora para obtenção de filmes ativos para embalagens de alimentos. E nesta aplicação mencionada, é necessário um aumento na interação entre o aditivo e o alimento.

Conforme mencionado, devido à área superficial extremamente grande, a alta porosidade e a interconectividade das fibras, este tipo de material apresenta uma ampla gama de aplicações em diversas áreas, tais como, vestuário⁹⁶, embalagens de alimentos, liberação de drogas, membranas¹⁰, dispositivos médicos e aeroespacial^{94,97,98}. Fibras ultrafinas de polímeros têm sido também investigadas como potenciais biomateriais para liberação de peptídeos, proteínas, enzimas e drogas⁹⁹.

2.4.2.1 Parâmetros importantes no processo de eletrofiação

Existem alguns parâmetros que influenciam nas propriedades das fibras obtidas, como por exemplo^{88,91}:

- a viscosidade da solução;
- tensão elétrica aplicada;
- a vazão de alimentação (saída da solução do capilar);
- a distância de trabalho (entre a ponta da agulha e o coletor);
- a temperatura da solução;
- umidade;
- a velocidade do ar na câmara do eletrofiação.

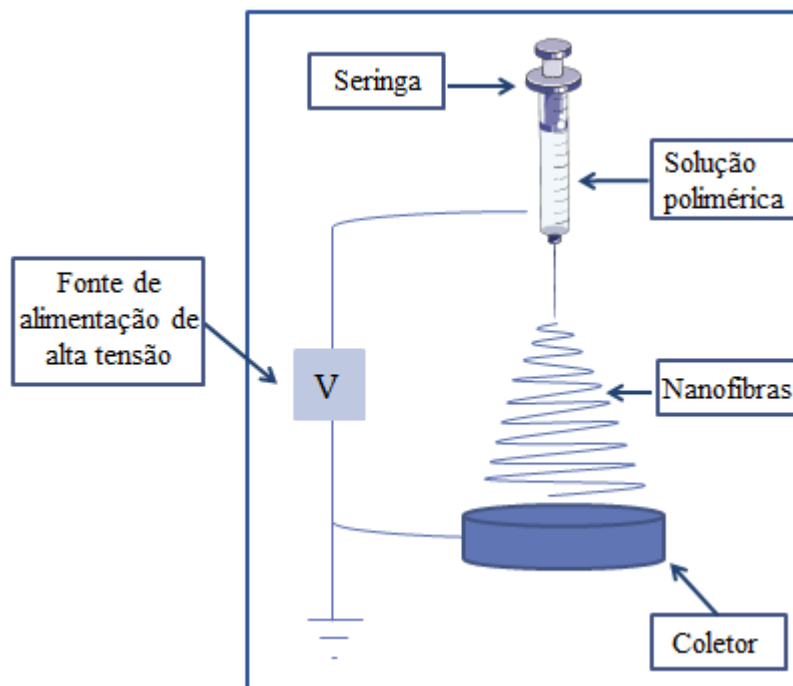


Figura 4.Esquema do processo de eletrofiação¹⁰⁰.

2.4.2.2 Propriedades da solução polimérica

As propriedades da solução do polímero têm a influência mais significativa na eletrofiação e no resultado da morfologia das fibras. A tensão superficial desempenha um papel na formação de *beads* ao longo do comprimento da fibra. A viscosidade da

solução e suas propriedades elétricas determinarão a extensão de alongamento da solução. Isto por sua vez tem um efeito resultante no diâmetro das fibras eletrofiadas¹⁰¹.

As nanofibras resultam da evaporação do solvente e solidificação do jato do polímero e o seu diâmetro está essencialmente relacionado com o jato característico de cada material. Um parâmetro muito importante que influencia no diâmetro da fibra é a viscosidade da solução. Quando a concentração for muito baixa, o grau de emaranhamento das cadeias poliméricas é pequeno, causando uma instabilidade capilar na extremidade do jato. Esta instabilidade pode ocasionar um espalhamento eletrostático (*electrospraying*) ao invés da eletrofiação. Neste caso, partículas esféricas ou nanofibras com *beads* são obtidas. Com o aumento da viscosidade e mantendo-se fixo os demais parâmetros do processo, existe uma tendência à formação de uma fibra contínua de polímero^{94,101}. Uma solução muito viscosa resulta em um diâmetro de fibra maior. No entanto, quando um polímero é dissolvido em um solvente, a viscosidade da solução é proporcional à concentração do polímero. Neste sentido, quanto maior a concentração do polímero maior será o diâmetro final das nanofibras⁹¹.

O diâmetro da fibra também pode ser alterado através da tensão elétrica aplicada. Em geral, a aplicação de uma tensão elevada ejeta mais fluidos em um jato, resultando em diâmetros de fibras maiores⁹¹. A tensão superficial está diretamente relacionada com a formação do cone de Taylor, pois este fenômeno ocorre quando a voltagem aplicada é suficientemente alta para fazer com que as forças eletrostáticas superem a tensão superficial da gota. A partir deste valor de voltagem, chamada de voltagem crítica, inicia-se o processo de fiação¹⁰¹. No entanto, como o jato se desloca no sentido da placa coletora, a tensão superficial pode causar a formação de *beads* ao longo do jato¹⁰¹. Para se obter nanofibras uniformes, é necessário que se tenha um grau de emaranhamento de cadeias na solução polimérica, a qual corresponde a um valor de concentração (viscoelasticidade) mínimo¹⁰¹, caso contrário, ocorre a liberação de pequenas gotas ou resulta em fibras contendo *beads*. E, quando a viscosidade é muito alta, a solução pode secar na ponta da agulha antes de iniciar a eletrofiação¹⁰¹.

A solução de eletrofiação sofre algumas mudanças decorrentes da tensão elétrica envolvida durante o processo, como por exemplo, a alongação da solução, que é causado pela repulsão das cargas na sua superfície. Por conseguinte, a adição

de um sal à solução faz com que a condutividade elétrica da solução aumente, resultando em uma maior mobilidade dos íons na solução¹⁰¹.

A formação de *beads* pode ocorrer se a solução não for suficientemente alongada. Portanto, quando uma pequena quantidade de sais é adicionada na solução, o aumento de cargas carregadas pela solução pode aumentar a sua alongação. E como resultado, fibras lisas são formadas que podem de outro modo produzir fibras com *beads*¹⁰¹.

Beads podem ser considerados como uma instabilidade capilar do jato devido ao desequilíbrio causado pelas flutuações na forma e densidade de cargas elétricas do jato^{101,102}. A Figura 5 mostra a morfologia de fibras com a presença de *beads*. Existem muitos fatores que afetam a formação de *beads* nas nanofibras e que podem também ser considerados os parâmetros mais significativos, como a voltagem aplicada, a viscoelasticidade da solução, a densidade de cargas elétricas e a tensão superficial da solução^{95,101}. Segundo Rutledge e Fridrikh¹⁰³ *beads* podem surgir devido a instabilidade no rompimento da gota que fica presa na ponta da agulha, dependente da concentração do polímero e composição do solvente. Além disso, *beads* também podem ser observados devido à baixa condutividade da solução, que resulta na alongação insuficiente do jato pela força elétrica para produzir uma fibra uniforme. Embora tais *beads* tenham sido classificados como defeitos ou subprodutos, e considerados indesejáveis, a sua presença pode ter benefícios para aplicações selecionadas, tais como, molhabilidade¹⁰⁴.

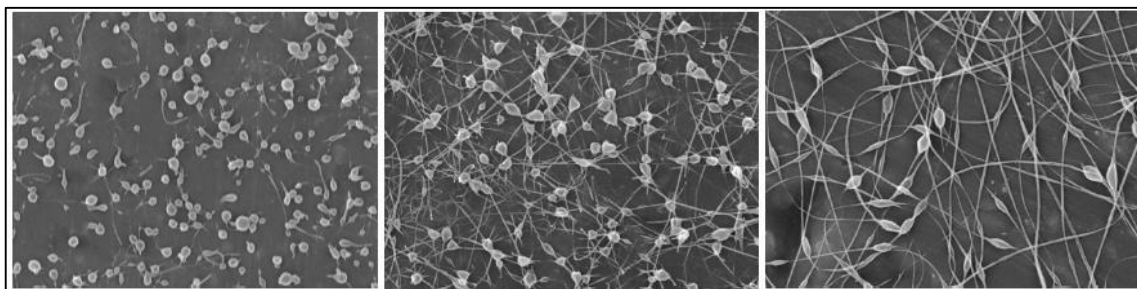


Figura 5. Morfologia das fibras com *beads*¹.

De forma interessante, a morfologia dos *beads* nas fibras muda de aspecto conforme a viscosidade da solução modifica¹⁰⁵. A partir de uma morfologia de gota arredondada com soluções de baixa viscosidade, para a forma de gotas alongadas ou

até fibras lisas quando uma viscosidade suficiente é alcançada, como mostrado na Figura 6. Não somente a forma dos beads pode modificar com a viscosidade, mas também o espaçamento entre eles aumenta.

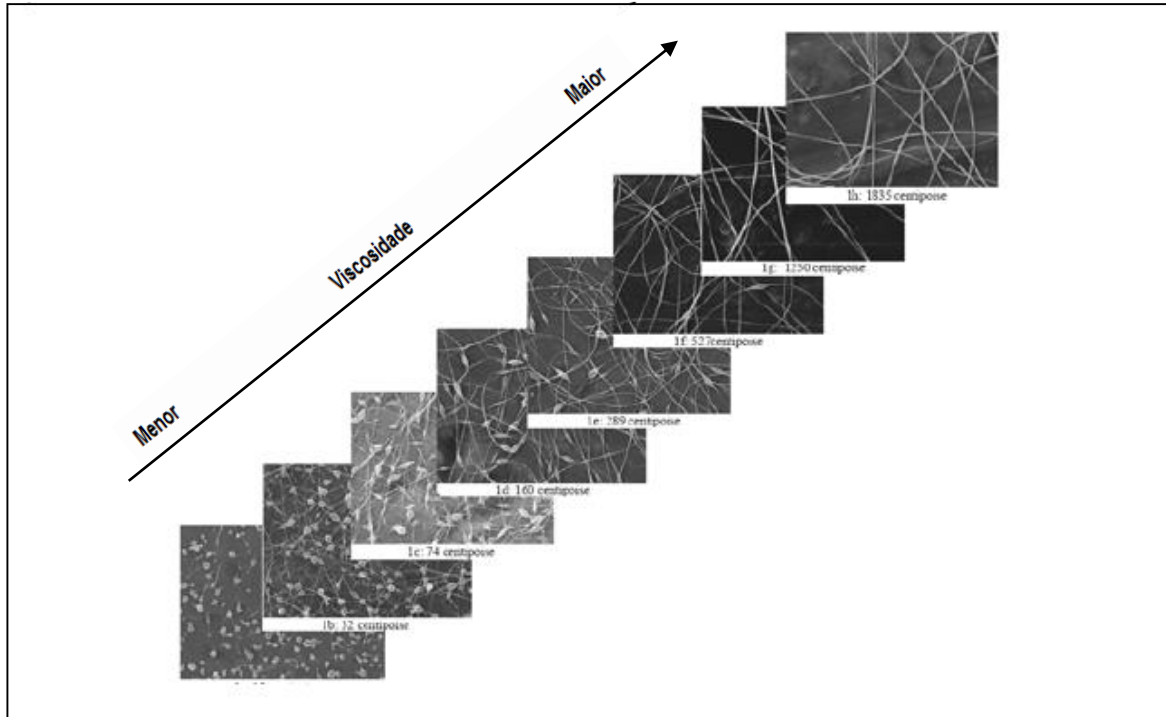


Figura 6. Efeito do aumento da viscosidade da solução polimérica sobre a morfologia das fibras de eletrofição¹⁰⁶.

A técnica de eletrofição apresenta grande versatilidade, através da qual é possível obter além de excelentes propriedades, os mais diversos tipos de fibras através de simples ajustes nas variáveis do processo¹⁰³. O fenômeno da formação de poros nas nanofibras obtidas por eletrofição se dá devido à evaporação do solvente. E é durante a evaporação do solvente que a solução torna-se termodinamicamente instável.

Este fenômeno ocorre devido à formação de duas fases na nanofibra, uma fase é rica em polímero e a outra é rica em solvente¹⁰¹. Desta forma a fase rica em polímero se solidifica logo que ocorre a segregação das duas fases enquanto que a evaporação do solvente ocasiona a formação de nanofibras porosas. Costa *et al.*⁹⁴ salientam que o processo de formação de poros não pode ser atribuído aos

fenômenos eletrostáticos desenvolvidos durante a eletrofiação, uma vez que a formação de fibras porosas pode ser obtidas por métodos que não usam tensão elétrica como é o caso da fiação por sopro em solução.

Ramakrishna⁹⁹ discute a formação de nanofibras e um provável mecanismo da formação de nanofibras ramificadas durante a eletrofiação pode ser explicado pela formação de jatos secundários a partir da formação do jato primário, ou pela separação do jato inicial em dois jatos menores. O alongamento e a evaporação do solvente leva a uma mudança dinâmica na forma e distribuição de cargas ao longo do jato. Desta forma, o desequilíbrio entre as forças elétricas e a tensão superficial do jato pode levar a instabilidade. Uma opção para reduzir esta instabilidade é através da criação de jatos secundários que darão origem as ramificações¹⁰¹.

Um procedimento bastante usado tem sido a incorporação de agentes antimicrobianos possibilitando a ação antimicrobiana destes materiais. Além disso, as fibras formadas são relativamente grandes em comprimento e são totalmente interligadas formando uma rede tridimensional. Como resultado, uma grande área de contato é acessível, como por exemplo, para reações de espécies químicas, migração de substâncias ou para afetar propriedades físicas desejadas ⁹⁴.

Eletrofiação é um processo para gerar fibras de polímero de escala micrométrica ou nanométrica com grandes áreas de superfície e alta porosidade. Para a pesquisa de engenharia de tecidos, a técnica de eletrofiação fornece uma maneira rápida de fabricar escapas fibrosas com dimensões comparáveis à matriz extracelular (ECM). Uma variedade de materiais podem ser utilizados no processo de eletrofiação, incluindo biomateriais naturais, bem como polímeros sintéticos¹⁰⁷.

Nesse sentido, percebemos que tanto o PBAT quanto a gentamicina, são materiais que possuem relevância e destaque para serem utilizados no desenvolvimento de sistemas curativos antimicrobianos e que as metodologias escolhidas são pertinentes na obtenção do biomaterial em estudo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO

Desenvolver sistemas curativos biodegradáveis utilizando poli(butileno adipato-co-tereftalato) (PBAT) com incorporação de fármaco antimicrobiano.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Modificar a superfície dos filmes poliméricos biodegradáveis de PBAT, preparados pelo método de *casting*, por radiação UV em presença de O₂ atmosférico.
- Inserir a gentamicina na superfície dos filmes obtidos por *casting* e caracterizar as propriedades físico-químicas superficiais dos filmes antes e após o tratamento.
- Preparar matrizes de PBAT e gentamicina a partir da combinação de diferentes formulações utilizando a técnica de eletrofiação;
- Caracterizar os filmes obtidos por eletrofiação quanto as suas propriedades morfológicas, estruturais, térmicas e físico químicas;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos filmes de *casting* e eletrofiados através do ensaio por zonas de inibição.
- Realizar ensaios biológicos para avaliação da citotoxicidade, biocompatibilidade, viabilidade, adesão e proliferação celular dos filmes.

4 EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAIS

Para a realização deste trabalho foram utilizados os seguintes materiais:

- Poli (butileno adipato-co-tereftalato) (PBAT) sob o código (Ecoflex® F Blend C1200), fornecido pela BASF Corporation (Florham Park, NJ, USA), na forma de pellets, densidade de $1,27 \text{ g cm}^{-3}$ a 23°C , índice de fluidez $13 \text{ g } 10^{-1} \text{ min}$ ($190^{\circ}\text{C}/2,16 \text{ kg}$);
- Sulfato de gentamicina, fornecida pela Pharmanostra. De acordo com o fabricante sua fórmula molecular é $\text{H}_2\text{O}_4\text{S}\cdot\text{x}$ (não especificado) e a descrição deste produto se apresenta como sendo um pó higroscópico, branco ou quase branco;
- 2,2,2-Trifluoroethanol (TFE) 99%, comercializado pela Sigma Aldrich. De acordo com o fabricante, a fórmula química deste, é representado por $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OH}$, possui ponto de ebulição em $74,0^{\circ}\text{C}$;
- Clorofórmio, P.A.-A.C.S. comercializado pela Synth, sendo sua fórmula molecular CHCl_3 com $\text{PM}=119,38 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$;
- 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) 98%, comercializado pela Sigma Aldrich. Sua fórmula molecular é $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_3\cdot\text{HCl}$ de $\text{PM}=191,70 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$;
- Fosfato de Potássio Monobásico, comercializado pela Sigma-Aldrich. Sua fórmula molecular é $\text{H}_2\text{K}_2\text{O}_4\text{P}$ $\text{PM}=136,09 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$;
- Fosfato de Potássio Dibásico, comercializado pela Vetec. Sua fórmula molecular é $\text{K}_2\text{HPO}_4\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ $\text{PM}=228,23 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$;
- Ácido acético glacial P.A.-A.C.S. comercializado pela Anidrol. Sua fórmula molecular é $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ $\text{PM}=60,05 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$;

- Acetato de sódio trihidratado P.A.-A.C.S. comercializado pela Vetec. Sua fórmula molecular é $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ $\text{PM}=136,08 \text{ g.mol}^{-1}$.

4.2 MÉTODOS

Os métodos utilizados para a preparação dos filmes por casting e eletrofição compostos por PBAT e gentamicina estão descritos nesta seção do trabalho.

4.2.1 Preparo dos filmes de PBAT por *casting*

Os filmes de PBAT obtidos por *casting* foram preparados em solução de concentração de 14 g/L em clorofórmio. Após, a solução em um recipiente fechado foi colocada no ultrassom para facilitar a solubilização do polímero durante 30 min, onde posteriormente foram postos em uma placa de Teflon para secagem do solvente. A placa de Teflon com a solução foi acondicionada em um ambiente com pequeno orifício na base para evitar contaminação do filme e também para evaporação lenta do solvente permitindo um filme de maior homogeneidade. A formação do filme se dá após completa evaporação do solvente.

4.2.2 Irradiação dos Filmes com radiação eletromagnética

Os filmes de PBAT foram irradiados com radiação UV por meio de uma lâmpada de vapor de mercúrio de média pressão e de 250 W sem bulbo externo em ambiente aberto e temperatura ambiente. A irradiação UV policromática dos filmes de PBAT na presença de O_2 atmosférico foi realizada com intuito de inserir grupamentos oxigenados na superfície do polímero biodegradável. O tempo de irradiação foi de 90 min. Após, os polímeros foram armazenados em dessecador até análise, caracterização da superfície e reações posteriores.

4.2.3 Inserção da gentamicina na superfície

A inserção de gentamicina no filme de PBAT modificado foi realizada através de diferentes etapas. Na presença de todas as etapas o procedimento foi 1) o filme de PBAT modificado foi imerso em 20 mL de uma solução tampão de pH 7,4 e sonicado durante 10 min; 2) o filme foi transferido para outro béquer e imerso em uma solução tampão de pH 4,0 contendo 0,02 M de EDC. Essa reação foi realizada em um banho com agitador a 4°C durante 2 horas. 3) Depois, o filme foi sonicado em 20 mL de solução tampão de pH 7,4 durante 10 minutos e 4) imerso em 20 mL de tampão de pH 4 contendo 0,1 g de gentamicina num banho de agitação a 4 °C por 24 horas. 5) Por fim, foi realizada a lavagem final da amostra a fim de retirar o excesso de gentamicina que não reagiu. A amostra foi colocada em 20 mL de uma solução tampão de pH 7,4 e sonicada durante 10 min.

4.2.4 Preparo das soluções poliméricas para o processo de eletrofiação

Foram preparadas cinco amostras de PBAT/gentamicina, variando a concentração de antibiótico em 0; 0,5; 2,0; 5,0 e 10% em massa em relação ao valor de massa total. As cinco diferentes formulações possuem 1,2 g e foram dissolvidas em 5 mL de TFE sob constante agitação, por 24 horas e em temperatura de 45°C. Este solvente foi utilizado, pois o polímero foi totalmente solubilizado e apresentou uma viscosidade ideal para a sua eletrofiação.

4.2.5 Eletrofiação das fibras de PBAT/gentamicina

As soluções poliméricas de PBAT e PBAT/gentamicina foram eletrofiadas utilizando um equipamento modelo INSTOR (Projetos e Robótica, Porto Alegre, Brasil) (Figura 7). O sistema é composto por uma fonte de alta tensão, um coletor cilíndrico coberto com folha de alumínio e uma seringa de 1 mL. A solução foi colocada em uma seringa de 1 mL com diâmetro de agulha de 0,4 mm. As fibras de PBAT e PBAT/gentamicina foram preparadas com uma taxa de fluxo constante de 1 mL h⁻¹, uma distância de 16 cm da ponta da agulha até o coletor e voltagem de 16 kV. A seringa foi disposta na posição vertical com a agulha em direção ao coletor. A agulha

foi conectada ao eletrodo emissor da polaridade positiva da fonte de alimentação da alta tensão. Todas as soluções foram eletrofiadas a temperatura ambiente. Para determinar a espessura dos filmes, foi utilizado um micrômetro Mitutoyo modelo Digimatic caliper BD013913. Um total de 7 medidas foram realizadas no filme para obter o valor médio da espessura. Os filmes foram produzidos com uma espessura de ~ 0,10 mm.

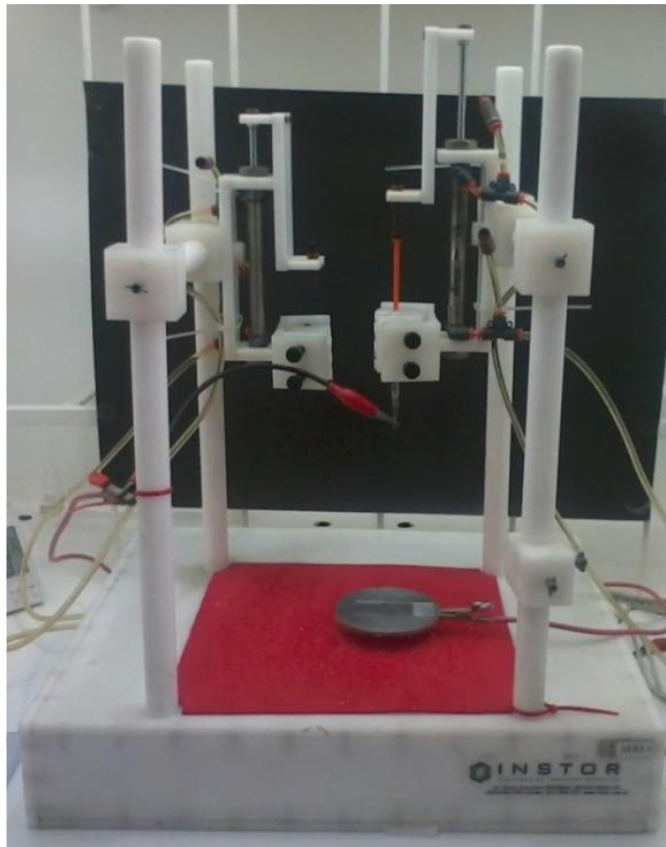


Figura 7. Equipamento de eletrofição utilizado para a preparação das fibras de PBAT e PBAT/gentamicina.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

As técnicas empregadas na caracterização dos filmes preparados a partir das duas abordagens neste trabalho assim como os equipamentos e condições utilizadas nas análises encontram-se descritas nesta seção do trabalho.

4.3.1 Primeira abordagem

4.3.1.1 Determinação de Ângulo de Contato da Água (WCA – Water Contact Angle)

A superfície dos filmes de casting foi analisada quanto ao seu caráter hidrofílico/hidrofóbico através de medidas de ângulo de contato da água (WCA), obtidas à temperatura ambiente, utilizando o método da gota séssil. O WCA das fibras foi realizado no equipamento Kruss DSA 30 composto de uma microseringa e uma câmera acoplada, utilizando o método da gota séssil. Na superfície do material depositou-se gentilmente gotas de água deionizada (3 μ L). Realizou-se três medidas em diferentes posições. As imagens foram digitalizadas no equipamento pelo software *Drop Shape Analysis System* e posteriormente os ângulos calculados pelo software *Surftens 4.5*.

4.3.1.2 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier modo Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR)

Análises de FTIR foram realizadas para identificação de grupos funcionais na região superficial das amostras. Ao incidir radiação eletromagnética na região do infravermelho (IV) sobre a amostra, as moléculas absorvem energia e vibram de acordo com a energia absorvida. A energia disposta nessa técnica é capaz de levar à frequências vibracionais de estiramento e de dobramentos das ligações moleculares que contenham um momento de dipolo permanente¹¹⁴.

Ao utilizar o modo ATR, a amostra é colocada sobre a superfície de um prisma ou cristal de reflexão interna. O feixe de IV ao percorrer o cristal que está em contato direto com a amostra reflete e cria uma onda evanescente capaz de percorrer o cristal de forma perpendicular. Uma parte dessa radiação é absorvida pelas moléculas da amostra e a onda evanescente é atenuada. Após diversas reflexões internas ao longo do cristal que está em contato com a amostra, o feixe de FTIR será levado até o detector. A profundidade de absorção na amostra está entre 0,5 – 3 μ m e depende do comprimento de onda e tipo de amostra¹¹⁵.

Os espectros de FTIR dos filmes foram obtidos através de espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), sendo que as medidas foram realizadas em modo de Refletância Total Atenuada (ATR). As amostras foram analisadas em um equipamento do modelo Alpha-P (Bruker) com prisma de Diamante, a 45 graus, no modo de refletância total atenuada entre 4000 cm^{-1} a 500 cm^{-1} , utilizando 24 varreduras em resolução de 4 cm^{-1} .

4.3.1.3 Espectroscopia de Fotoelétron de Raios X (XPS – X Ray Photoelectron Spectroscopy)

As amostras também foram caracterizadas por Espectroscopia de Fotoelétrons de Raios-X (XPS – X-Ray Photoelectron Spectroscopy) sendo possível identificar os elementos químicos e dessa forma avaliar possíveis mudanças no ambiente químico da superfície. Fótons energéticos incidem na amostra transferindo energia suficiente para que o elétron escape da camada mais interna do átomo e se dirija até o detector como um fotoelétron. Ele pode ser quantificado conforme equação abaixo¹⁰⁸:

$$E_b = hv - E_k - \omega \quad (1)$$

onde hv é a energia incidente do fóton, E_k é a energia cinética do fotoelétron, ω é a função trabalho do equipamento e E_b a energia de ligação do elétron de camada mais interna.

As amostras de PBAT foram fixadas com fita condutora de dupla face em um amostrador e colocadas sob ultra alto vácuo com pressão não superior a 10^{-9} Pa. Após, foram posicionadas na direção do feixe de radiação. As mesmas não apresentaram carregamento durante procedimento. As análises de XPS foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Análise de Superfícies (LAMAS) da UFRGS. Os dados de XPS foram obtidos com um analisador hemisférico de sete canais (Omicron) com fonte de excitação de Mg $K\alpha$ ($hv = 1253,6$ eV) para a primeira amostra e de Al $K\alpha$ ($hv = 1486,7$ eV) para a segunda amostra, com passo de energia de 50 eV para os espectros totais (survey). O sinal do C 1s em 285 eV foi utilizado para

calibração de todos os espectros. Todos os espectros de XPS foram analisados pelo software Casa XPS®.

4.3.1.4 Análise qualitativa por ensaio de halos de inibição em placas de petri (antibiograma)

A atividade antimicrobiana das amostras obtidas a partir das diferentes etapas de inserção de gentamicina, bem como a do filme de PBAT puro (utilizado como controle), foi realizada através do ensaio de halos de inibição em placas de petri (antibiograma). A bactéria utilizada para a realização do ensaio foi a *Escherichia coli* 11775™. A mesma foi inoculada em meio de cultura Luria Bertati líquido (triptona 10 g/L, NaCl 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L e água destilada), previamente esterilizado à 120°C e 1 atm. O inóculo foi mantido à 37°C, por 1 h, à 200 rpm. Posteriormente, 100 µL do inóculo foram transferidos e semeados em placas de petri com meio Luria Bertani (LB) sólido contendo 2% de ágar. Amostras de 1 cm de diâmetro de cada filme foram cortadas e expostas a luz UV por 10 min de cada lado para eliminar possíveis contaminações microbianas e, em seguida, essas amostras foram colocadas sobre a placa contendo a bactéria. As placas foram mantidas em estufa a 37°C por 24 horas. A atividade antimicrobiana foi verificada pela formação de halos ao redor dos filmes indicando nenhum crescimento de microrganismos ao redor das amostras. Todas as determinações foram feitas em triplicata (n=3) e utilizou-se como controle positivo placas contendo a bactéria sem a adição dos filmes. Esta análise foi realizada em parceria com o grupo de pesquisa da professora Roberta Bussamara da UFRGS.

4.3.2 Segunda abordagem

4.3.2.1 Determinação da condutividade das soluções de eletrofiliação

As medidas de condutividade foram realizadas utilizando um condutímetro de bancada Digimed, modelo DM31, previamente calibrado com solução padrão de KCl 0,01 mol L⁻¹. As análises foram realizadas em cinco temperaturas diferentes 20, 25, 35, 45 e 60 °C em duplicata.

4.3.2.2 Determinação da viscosidade das soluções de eletrofiação

Na determinação das viscosidades nas diferentes soluções poliméricas preparadas para o processo de eletrofiação foi utilizado um reômetro (ARES-G2, TA *Instruments*). Todos os experimentos foram realizados a 45°C utilizando um sistema de circulação para controle de temperatura e geometria cone placa (40 mm) com espaçamento de 0,042 mm. Este espaçamento foi constante para todas as medidas. O tempo de espera para estabilização da amostra foi de 30 segundos e as medidas foram conduzidas na faixa de cisalhamento de 0,1 até 300 s⁻¹.

4.3.2.3 Grau de Intumescimento (GI)

Para a análise do grau de intumescimento utilizaram-se amostras em triplicatas com dimensões de 10 mm x 10 mm. As fibras de PBAT e PBAT/gentamicina foram imersas em solução tampão fosfato (PBS) com pH 7,4 por 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240 min, 24 e 48 horas a 25 °C. Nos horários indicados, as amostras foram secas com papel filtro e pesadas antes de retornar à solução de PBS. Os cálculos do Intumescimento das fibras foram realizados conforme a Equação 2 ¹⁰⁹:

$$GI = \frac{M_i - M_f}{M_i} \times 100 \quad (2)$$

na qual o M_f é a massa da amostra após o tempo de imersão em solução tampão fosfato e M_i é a massa da amostra seca inicial.

4.3.2.4 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR do sulfato de gentamicina em pó, do filme de PBAT e dos filmes de PBAT/gentamicina foram obtidos através de espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). As amostras foram analisadas em um equipamento do modelo Alpha-P (Bruker) com prisma de Diamante, a 45 graus, entre 4000 cm^{-1} a 500 cm^{-1} , utilizando 24 varreduras em resolução de 4 cm^{-1} .

4.3.2.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A superfície dos filmes eletrofiados foi analisada através da Microscopia Eletrônica de Varredura. As amostras foram preparadas a partir de um pedaço de fibra que foi colocado sobre os suportes metálicos. Todas as amostras foram previamente recobertas com uma fina camada de ouro, de modo a aumentar a condutividade elétrica.

O diâmetro médio das nanofibras foi determinado utilizando um *software* de análise de imagens (*Image J; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA*).

4.3.2.6 Microscopia eletrônica confocal

A distribuição e a dispersão da gentamicina ao longo das fibras foi investigada, e para isso a gentamicina foi marcada com 2-(5'-isotiocianato-2'-hidroxifenil) benzotiazol¹⁷⁰ em solução de DMSO a temperatura ambiente. A marcação da gentamicina foi realizada em parceria com o grupo de pesquisa do professor Fabiano Rodembusch da UFRGS. O procedimento de preparação das fibras foi o mesmo descrito nos itens 4.2.4 e 4.2.5, porém as fibras foram depositadas sobre lâminas de vidro. As imagens foram obtidas por microscopia eletrônica confocal utilizando um microscópio Olympus FluoviewTM 1000 (Olympus® Inc., Tokyo, Japan). As imagens têm dimensões de 512 pixels, adquiridas com magnificação 40 x com a lente objetiva

UPLSAPO a 405 nm. O software *Olympus Fluoview Viewer Version 3.1.* foi utilizado para a aquisição e processamento das imagens.

4.3.2.7 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise do comportamento térmico das fibras de PBAT e PBAT/gentamicina foi determinada por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), utilizando um equipamento *Thermal Analyst Instruments Q20 (New Castle, DE, USA)*. Para a realização das análises foram utilizadas em torno de $7,0 \pm 0,3$ mg de amostra. As amostras foram aquecidas de 25°C à 200°C , com isoterma de 5 minutos. As amostras foram então resfriadas até -50°C e aquecidas novamente até 200°C . Todas as corridas foram conduzidas a uma taxa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e as análises foram realizadas em atmosfera de nitrogênio (50 mL min^{-1}). As medidas foram realizadas no primeiro resfriamento e no segundo ciclo de aquecimento, conforme norma ASTM D3418-08.

A partir dessas medidas foram avaliadas a temperatura de fusão (T_m), a temperatura de transição vítrea (T_g) dos materiais e a temperatura de cristalização (T_c). O grau de cristalinidade (X_c) dos materiais foi determinado a partir da seguinte relação:

$$X_c = \frac{\Delta H_m}{\Delta H^{\circ}_m \times W} \times 100 \quad (3)$$

na qual X_c é a cristalinidade, ΔH_m é a entalpia de fusão (J g^{-1}) da amostra, ΔH°_m é a entalpia de fusão do polímero puro, que para o PBAT ($\Delta H^{\circ}_m = 114 \text{ J g}^{-1}$) e W é a fração mássica de PBAT.

4.3.2.8 Determinação de Ângulo de Contato da Água (WCA – Water Contact Angle)

Idem ao item 4.3.1.1

4.3.2.9 Perfilometria

A rugosidade da superfície das fibras de PBAT e PBAT/gentamicina foi medida utilizando um perfilômetro Bruker Countor GT (*Bruker Nano Surfaces Division*, Santa Barbara, CA, USA). Foram realizadas três medidas para cada amostra e os resultados da rugosidade média quadrática (Rq), também conhecida por RMS, foram obtidos.

4.3.2.10 Análise qualitativa por ensaio de halos de inibição em placas de petri (antibiograma)

A atividade antimicrobiana das fibras de PBAT (utilizada como controle) e PBAT/gentamicina foi realizada através do ensaio de halos de inibição em placas de petri (antibiograma). A bactéria utilizada para a realização do ensaio foi a *Escherichia coli* 11775™. A mesma foi inoculada em meio de cultura Luria Bertati líquido (triptona 10 g/L, NaCl 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L e água destilada), previamente esterilizado à 120°C e 1 atm. O inóculo foi mantido à 37°C, por 1 h, à 200 rpm. Posteriormente, 100 µL do inóculo foram transferidos e semeados em placas de petri com meio Luria Bertani (LB) sólido contendo 2% de ágar. Amostras de 1 cm de diâmetro de cada filme foram cortadas e exposta a luz UV por 10 min de cada lado para eliminar possíveis contaminações microbianas e, em seguida, essas amostras foram colocadas sobre a placa contendo a bactéria. As placas foram mantidas em estufa a 37°C por 24 horas. A atividade antimicrobiana foi verificada pela formação de halos ao redor dos filmes indicando nenhum crescimento de microrganismos ao redor das amostras. Todas as determinações foram feitas em triplicata (n=3) e utilizou-se como controle positivo, placas contendo a bactéria sem a adição dos filmes. Esta análise foi realizada em parceria com o grupo de pesquisa da professora Roberta Bussamara da UFRGS.

4.3.2.11 Análise Quantitativa por inibição de crescimento bacteriano em meio líquido (microdiluição em caldo)

Para a realização da análise quantitativa das fibras de PBAT e PBAT/gentamicina foram seguidas as seguintes etapas. A bactéria *Escherichia coli* 11775™ foi inoculada em meio de cultura Luria Bertani líquido, previamente esterilizado à 120°C e 1 atm. O inóculo foi mantido à 37°C, por 1 h, à 200 rpm. Posteriormente, 100 µL do inóculo foram transferidos para placas de plástico estéreis, próprias para microdiluição, que possuem poços de fundo redondo, contendo 1000 µL do meio LB líquido.

Imediatamente após foram acrescentadas, em cada poço, as amostras de filmes previamente tratadas conforme descrito no item 4.3.1.4. A placa foi levada à estufa e mantida por 24 horas a 37°C. Foram utilizados como controles positivos o meio LB contendo apenas a bactéria e como controle negativo, apenas o meio LB.

A inibição microbiana foi determinada pela leitura da densidade ótica à 600nm em espectrofotômetro de microplacas (Model 550 – BioRad). Esta análise foi realizada em parceria com o grupo de pesquisa da professora Roberta Bussamara da UFRGS.

4.3.2.12 Ensaio de citotoxicidade

Uma avaliação de citotoxicidade indireta das amostras foi realizada de acordo com a norma ISO 10993. Em primeiro lugar, as membranas de PBAT foram esterilizadas por etanol a 70%, seguidas de radiação ultravioleta (UV) durante 1 h (30 minutos cada lado). Posteriormente, as amostras foram lavadas com uma solução salina tamponada com fosfato (PBS) durante 5 min para remover qualquer solvente residual. Resumidamente, os meios de extração foram preparados por imersão das amostras (6 cm²) em 1 mL de Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose (DMEM) suplementado com 5% de Soro de bovino fetal (SBF) a 37 °C em 95% de ar umidificado contendo 5 % de CO₂ e incubado durante 24 h.

A exclusão do azul de Tripán é baseada na integridade da membrana celular e foi usada para determinar a viabilidade celular. Para estas experiências, a linha celular de glioma de rato C6, obtida da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland, EUA) foi plaqueada em placas de 48 poços (1 x 10⁵ células por poço) e

cultivada em DMEM suplementado com 5% de SBF a 37 °C numa atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ durante um dia antes da exposição ao meio exposto ao PBAT. Após 24 h, o meio de cultura da placa de cultura de tecido de 48 poços foi removido e o meio de extração preparado foi adicionado aos poços e as células foram incubadas durante 24 h. Posteriormente, a viabilidade celular foi quantificada por análise de azul de tripan . Resumidamente, para cada tratamento, misturaram-se 10 µL de suspensão celular com 10 µL de solução a 0,4% de azul de tripan. A citotoxicidade (taxa de inibição do crescimento celular) foi determinada a partir do número de células viáveis (sem cor) em amostras tratadas como uma porcentagem do controle de PBS. Utilizamos o contador de células Condens® Automated (Invitrogen, Califórnia, Estados Unidos). A análise de citotoxicidade foi realizada em parceria com o grupo de pesquisa da professora Dinara Moura da UFCSPA.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 PRIMEIRA ABORDAGEM

Neste tópico abordaremos os resultados obtidos a partir das análises realizadas em filmes de *casting* com o intuito de verificar a modificação superficial e incorporação de gentamicina.

Medidas de ângulos de contato da água foram realizadas na superfície dos filmes de PBAT, antes e após os diferentes tempos de irradiação com lâmpada UV. A medida foi imediatamente após a deposição das gotas em três locais distintos na superfície dos filmes e então foi calculado a média dos ângulos a partir do ângulo de cada gota. A técnica de WCA é bastante simples e revela informações sobre a primeira monocamada da superfície sendo a primeira técnica de caracterização a ser utilizada¹⁰⁸.

Os filmes de PBAT apresentaram caráter levemente hidrofílico com WCA de aproximadamente 80°. Resultados semelhantes foram encontrados na literatura onde Wang *et al.*¹⁰⁸ prepararam blendas de PLA/PBAT, bem como filmes de PBAT e de PLA puros utilizando o método de *casting* e investigaram o ângulo de contato para estes materiais, verificando que o filme de PBAT puro apresenta ângulo de contato de 72,9°. No entanto, quando o filme de PBAT é irradiado por 10, 20 e 30 min, o WCA aumenta, alterando o caráter para hidrofóbico. Ao irradiar por períodos maiores o WCA da superfície começa a apresentar decréscimo (Figura 8). Dados semelhantes foram relatados por Belmonte¹¹⁰, que caracteriza este comportamento como anômalo, uma vez que observa-se o aumento do ângulo de contato em tempos de irradiação menores.

Neste trabalho observou-se a dependência do WCA com o tempo de irradiação, onde o maior tempo de irradiação confere à superfície maior hidrofilicidade. Ao atingir 90 min de irradiação o WCA foi próximo a 0°, não sendo possível realizar a medida do ângulo da gota.

Devido ao menor valor de ângulo de contato obtido com maiores tempo de tratamento UV, podendo encontrar um aumento na presença de grupos hidroxila (O-

H)¹¹¹⁻¹¹³, as demais etapas desta abordagem foram realizadas com amostras de filmes de PBAT com 90 minutos de irradiação.

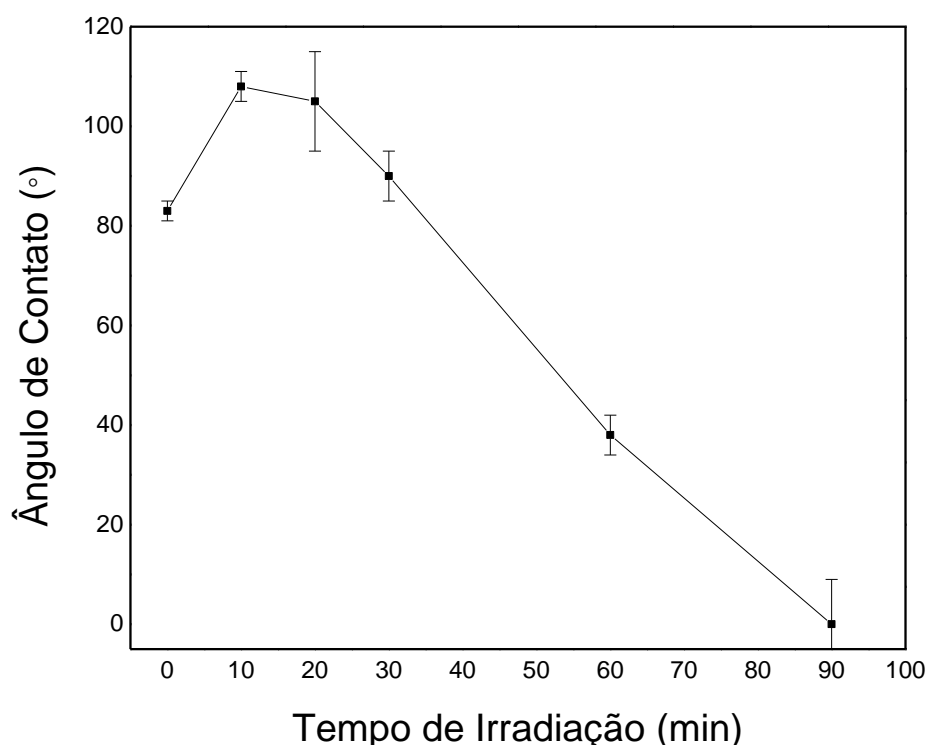


Figura 8. Variação do WCA em função do tempo de irradiação das amostras de PBAT preparadas pelo método de *casting* e tratadas com UV em presença de O₂ atmosférico.

O espectro FTIR-ATR do filme de PBAT sem tratamento (Figura 9) apresenta uma banda aguda em 726 cm⁻¹, referente às vibrações dos quatro ou mais grupos metileno adjacentes (-CH₂-), entre 900-700 cm⁻¹ uma banda de dobramento dos substituintes do anel benzênico^{112,116,117}. Em 1250 cm⁻¹ é possível visualizar uma banda atribuída ao estiramento da ligação C-O do éster alifático-aromático, em 1710 cm⁻¹ a banda refere-se ao estiramento da carbonila do éster alifático-aromático e em 3000 cm⁻¹ o estiramento está relacionado a ligação C-H das frações aromáticas e alifáticas. Espectros semelhantes também são encontrados nos trabalhos de Li *et al* e Al-Itryet *al*^{117,118}.

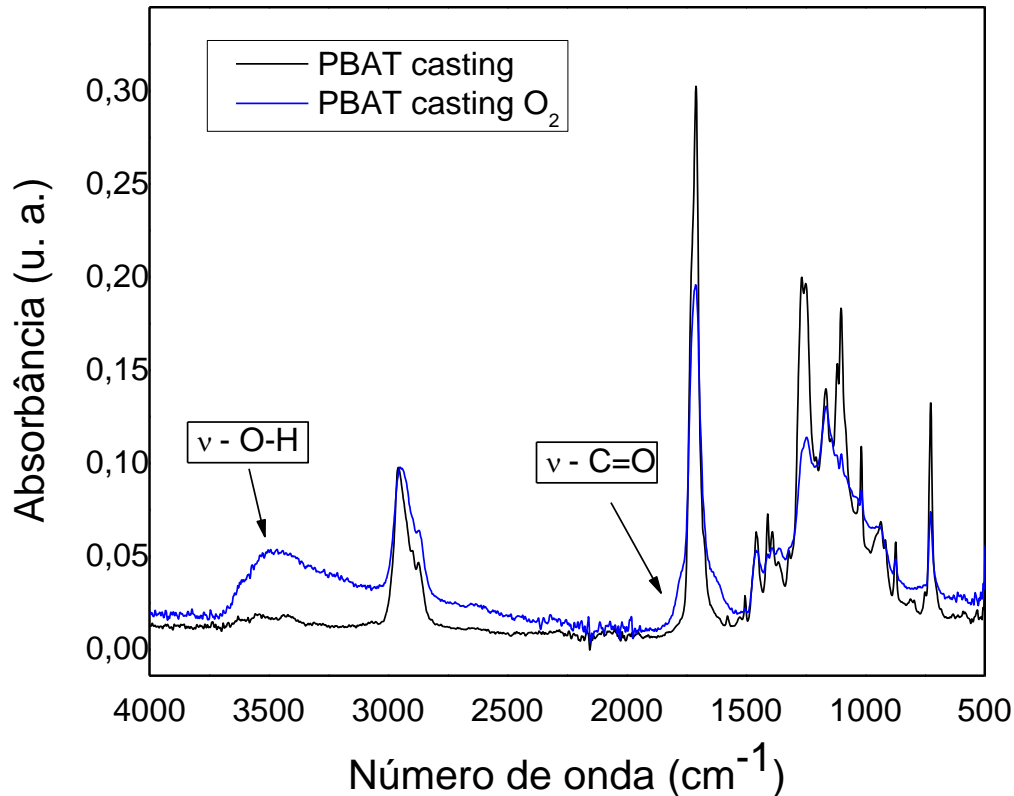


Figura 9. Espectros de FTIR-ATR das amostras de PBAT obtidas por *casting*, não irradiada e irradiada-UV por 90 min na presença de O₂ atmosférico.

Nesta mesma figura (Figura 9) é possível analisar os espectros de PBAT irradiados com UV em presença de O₂ atmosférico. Nota-se um aumento na presença de grupos hidroxila (O-H) utilizando um tempo de tratamento UV de 90 minutos^{111,113,119}, indicado por uma banda de estiramento entre 3600-3100 cm⁻¹. Este mesmo comportamento foi encontrado por Belmonte¹¹⁰, que analisou espectros de FTIR-ATR de filmes de PBAT obtidos a partir da técnica de revestimento (*casting*), não irradiados e irradiados com lâmpada UV em diferentes tempos. Neste trabalho¹¹⁰, a presença de grupos hidroxila (O-H) foi aumentando de acordo com o aumento do tempo de irradiação.

Outro ponto importante é que quando avaliamos a banda da carbonila do éster em 1710 cm⁻¹ identificamos um alargamento do lado esquerdo da banda e isso pode indicar a formação de novos grupos carbonila. Um outro ombro à direita da banda 1710 cm⁻¹ pode indicar a presença de éster de baixo peso molecular¹¹¹. É possível perceber uma diminuição da intensidade da banda referente à carbonila de

éster^{111,113,119}alifática-aromática em 1710 cm⁻¹, bem como da banda de ligação C-O^{111,119}alifático-aromático em 1250 cm⁻¹ e também da banda dos grupos metila em 725 cm⁻¹, podendo indicar uma cisão da cadeia.

A partir dos espectros de FTIR-ATR das amostras de PBAT obtidas por *casting*, não irradiada e irradiada-UV por 90 min na presença de O₂ atmosférico podemos inferir que foi possível inserir grupamentos oxigenados na superfície das amostras, podendo-se assim avançar para a etapa das reações e inserção da gentamicina. Nesta etapa foram realizadas diferentes sequências de reações (Tabela 2) e sempre após a análise antimicrobiana dos materiais, para verificar se a gentamicina estava presente na superfície do filme.

A escolha da sequência de reações, pH, temperatura e tempos utilizados foram baseados em estudos prévios da literatura⁵¹.

Tabela 2. Etapas de preparação das amostras utilizadas para a análise antimicrobiana.

<i>Amostra</i> (PBAT <i>casting</i>)	Irradiação 90 min	EDC – tampão			Gentamicina – Tampão		Atividade antimicrobiana
		Tampão pH 7,4 <u>Etapa 1</u>	tampão pH 4,0 <u>Etapa 2</u>	Tampão pH 7,4 <u>Etapa 3</u>	– Tampão pH 4,0 <u>Etapa 4</u>	Tampão pH 7,4 <u>Etapa 5</u>	
1	-	-	-	-	-	-	não
2	x	x	x	x	x	-	sim
3	x	x	x	x	x	x	não
4		-	-	-	x	x	não

A amostra 1 (Figura 10) trata-se do filme de PBAT obtido por *casting*, sem tratamento superficial, utilizado como branco para as demais amostras. Como

esperado, esta amostra não exibiu halo de inibição contra a bactéria *E. coli*, corroborando com os resultados de de Venkatesan e Rajeswari¹²⁰ que desenvolveram filmes antimicrobianos de PBAT e nanopartículas de ZnO, testando sua atividade antimicrobiana contra a *E. coli*. Neste estudo, os autores observaram que apenas os filmes com a presença de nanopartículas apresentaram halos de inibição.

A amostra 2 (Figura 10) foi a única que apresentou halo de inibição e isto pode ser devido à adsorção de gentamicina na superfície da amostra, pois quando comparamos a amostra 2 com a amostra 3, que não apresentou atividade antimicrobiana, percebemos que a diferença se deve ao acréscimo da lavagem nesta amostra (etapa 5). Sendo assim, a etapa da lavagem pode estar retirando a gentamicina adsorvida e deixando apenas a quantidade de gentamicina ligada covalentemente. No estudo realizado por Jao *et al*¹, percebemos que não houve a etapa de lavagem final, para as amostras contendo heparina e, desta forma, há a possibilidade deste polissacarídeo estar somente adsorvido na superfície.

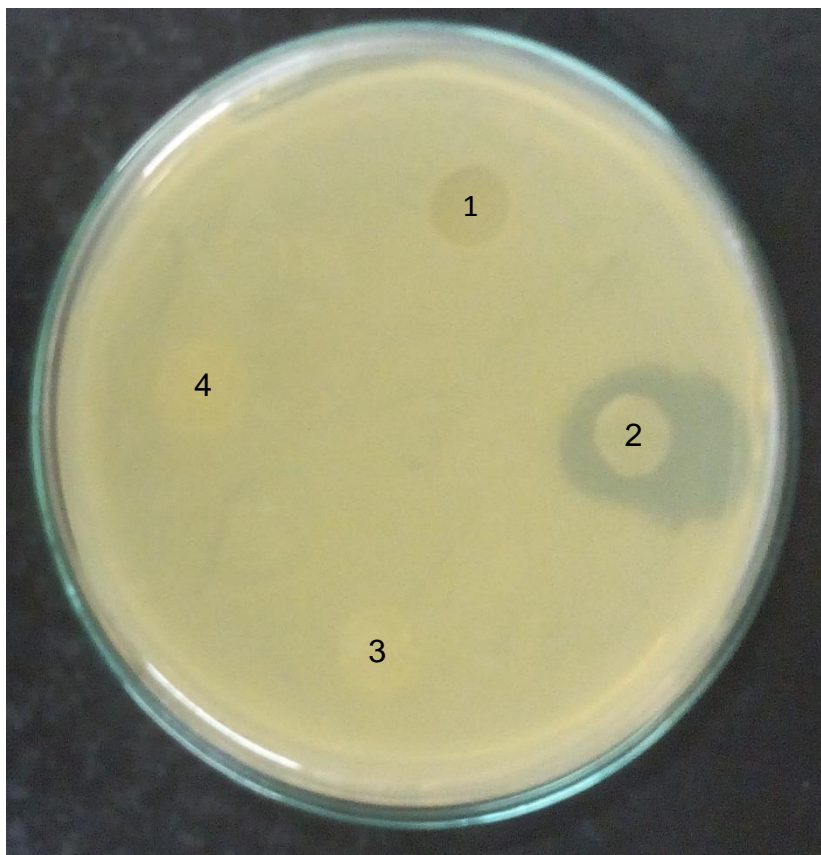


Figura 10. Atividade antimicrobiana dos filmes de *casting* de PBAT testados contra *E. coli*.

A amostra 4 foi realizada com o intuito de analisar se as etapas iniciais estavam inativando os grupos funcionais na superfície do PBAT, porém encontramos resultado negativo para a atividade antimicrobiana e percebemos que a gentamicina necessita estar livre na superfície do polímero para ter atividade antimicrobiana.

Afim de identificar os elementos químicos e avaliar possíveis mudanças no ambiente químico da superfície, análises de varredura de XPS foram realizadas para as amostras 2 e 3, representadas nas Figura 11 e 12, respectivamente. Os espectros apresentados nessas duas figuras mostram as amostras no intervalo de energia de ligação de 0 a 600 eV.

Tanto a Figura 11 quanto a Figura 12 apresentam espectros com sinais das contribuições do C 1s (286eV), (285eV)^{51,121} e do O 1s (533eV), (532eV)^{51,121} do PBAT. Os espectros de varredura também apresentam um pequeno sinal referente ao Si 2p(103eV), (102eV) e esse sinal também é encontrado em outros trabalhos como o de Kessler *et al* e Prabhakaran *et al*^{22,123}. O silício é comumente utilizado em polímeros como um aditivo de carga de reforço para melhorar propriedades físicas de tração, de compressão, de abrasão, de tenacidade, de estabilidade térmica e dimensional, entre outras¹²⁴.

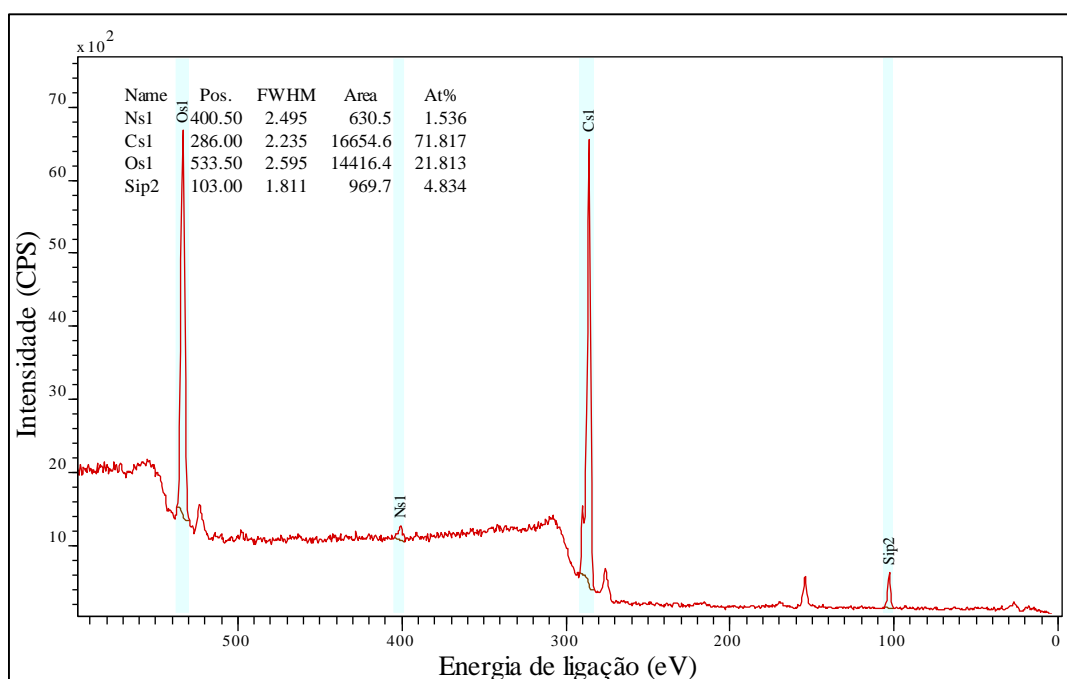


Figura 11. Espectro de varredura de XPS da amostra 2 de PBAT, preparadas por *casting*, irradiadas com UV por 90 min em presença de O₂ atmosférico.

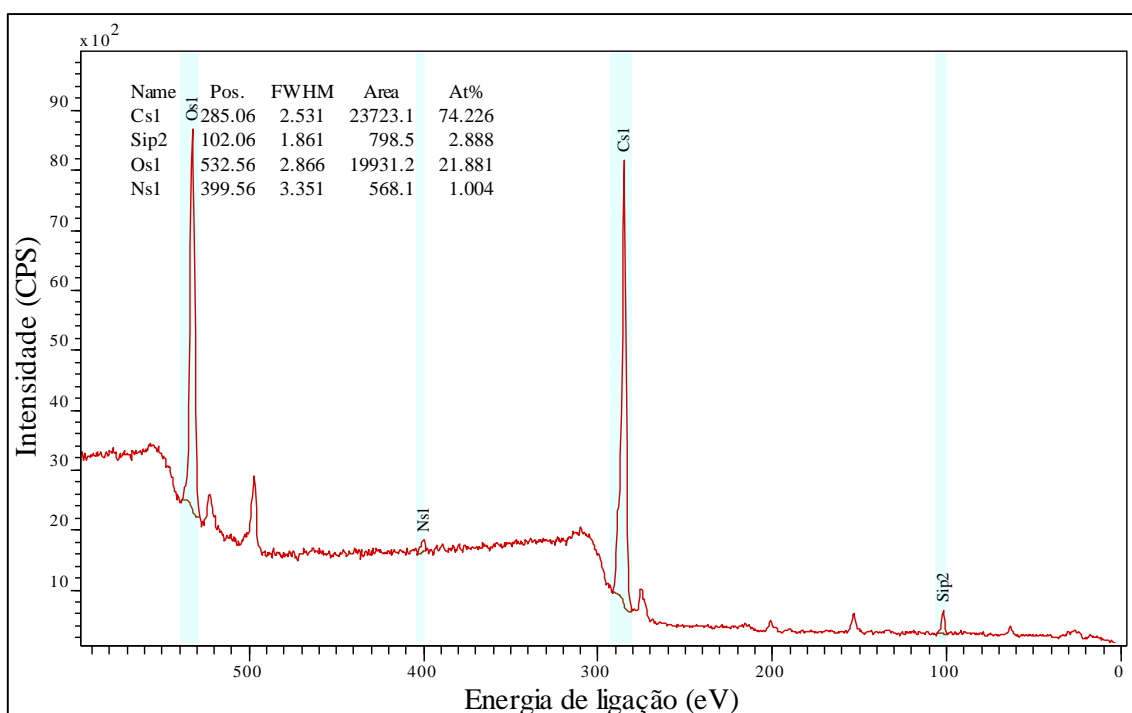


Figura 12. Espectro de varredura de XPS da amostra 3 de PBAT, preparadas por *casting*, irradiadas com UV por 90 min em presença de O₂ atmosférico.

Nos espectros das figuras 11 e 12 encontramos um pico adicional de N 1s (400eV), (399eV) devido a presença do grupo amino da gentamicina. É importante ressaltar que essa presença de nitrogênio na amostra 3 pode estar relacionado a presença de gentamicina e este resultado pode estar indicando que existe a possibilidade de ligação covalente com a superfície, no entanto a ligação não foi fundamental para ocorrer a atividade antimicrobiana.

Nesse contexto, percebemos que existe a possibilidade de ligação covalente com a superfície, no entanto a ligação não foi fundamental para ocorrer a atividade antimicrobiana. Esta abordagem foi fundamental para entendermos melhor o comportamento da gentamicina e prosseguirmos para a segunda abordagem.

5.2 SEGUNDA ABORDAGEM

Neste tópico abordaremos os resultados obtidos a partir das análises realizadas nas soluções utilizadas para a eletrofiação e nas fibras obtidas, com o intuito de avaliar as mudanças nos parâmetros das soluções e caracterizar as matrizes de PBAT e PBAT/gentamicina.

Os parâmetros da solução, tais como, viscosidade, condutividade elétrica e tensão superficial influenciam diretamente nas morfologias e na geometria das nanofibras. Estes parâmetros estão relacionados com as propriedades físico-químicas dos polímeros, dos solventes e com as interações do tipo polímero-solvente¹²⁵. Os parâmetros ambientais, temperatura, umidade e composição do ar também podem influenciar na formação e na morfologia das nanofibras¹²⁶.

A análise de condutividade elétrica das 5 diferentes amostras em função da variação da temperatura pode ser visualizada na Figura 13. As temperaturas utilizadas foram escolhidas com o intuito de simular o momento da eletrofiação, pois a solução é preparada em 45 °C, mas sua temperatura vai diminuindo devido ao ambiente externo se encontrar em uma temperatura inferior (aproximadamente 23 °C).

Foi observado um aumento na condutividade de acordo com o acréscimo da quantidade de gentamicina e esse efeito pode estar relacionado ao fato de que a adição de ácidos, bases ou sais à solução faz com que a condutividade elétrica aumente, resultando em uma maior mobilidade dos íons em solução¹⁰¹. Deve-se levar em conta também, que a gentamicina possui grupos funcionais que podem estar inserindo cargas na solução. Esse aumento na condutividade também é reportado no trabalho de Zehetmeyer¹⁰⁰ que analisou a condutividade em soluções de PBAT e PBAT/nisina, e obteve essa mudança provavelmente devido a maior concentração de nisina, que é um peptídeo, com presença de sais na sua formulação.

Por outro lado, quando avaliamos os valores de condutividade elétrica das soluções em função da temperatura, percebemos que também há um aumento da condutividade à medida que a temperatura diminui e este aumento é mais pronunciado nas amostras com maior percentual de gentamicina. Este resultado ocorreu, pois possivelmente o aumento da temperatura pode estar favorecendo a agregação do antibiótico, alterando os valores da condutividade e com temperaturas

menores encontramos valores maiores de condutividade devido ao fato da gentamicina possuir maior estabilidade em temperatura ambiente.

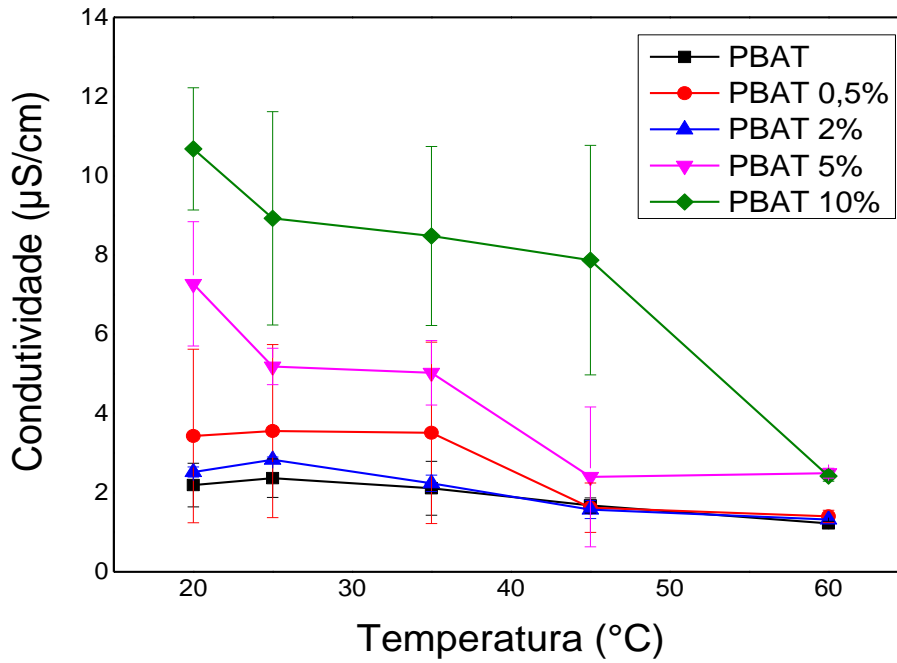


Figura 13. Valores da condutividade das soluções de PBAT e PBAT/gentamicina de acordo com a variação da temperatura.

As propriedades viscoelásticas das soluções pode ser visualizada na Figura 14. De maneira geral, pode-se observar que o perfil das curvas de viscosidade para as amostras de PBAT e PBAT/gentamicina são semelhantes e apresentam seus valores marcadamente reduzidos com o aumento da taxa de cisalhamento. Este comportamento é um perfil inerente a materiais pseudoplásticos (*shear thinning*), caracterizados pela dependência da viscosidade em função do cisalhamento¹²⁷.

Observa-se também que a amostra de PBAT 10% apresenta viscosidade levemente inferior às demais amostras em toda a faixa da taxa de cisalhamento analisada. Este comportamento deve ser decorrente do teor superior de partículas finas correspondentes à gentamicina e pode estar afetando o deslizamento das cadeias do polímero em solução, durante o cisalhamento.

Essa pequena variação na viscosidade das amostras contendo gentamicina, em relação as amostras de PBAT puro, tornou viável o processo de eletrofiação, pois pequenas mudanças visuais, na viscosidade, dificultavam ou até mesmo inviabilizavam a produção de matrizes de PBAT e PBAT/gentamicina. A viscosidade da solução está relacionada com o grau de emaranhamento das cadeias do polímero. Quando a viscosidade da solução é muito baixa, pode ocorrer *electrospraying* e partículas de polímero são formadas ao invés de fibras¹⁰¹.

Outro fator importante para a formação de fibras homogêneas, é ausência de *beads*. Veresano, A. et. al¹²⁸, analisam o efeito da viscosidade em misturas de queratina/poli (óxido de etileno) e verificaram que soluções pouco viscosas, contendo maior concentração de quitina do que de PEO, tornavam-se impossíveis de eletrofiar e formavam muitos *beads*. Entretanto, nanofibras produzidas a partir de soluções mais viscosas apresentavam diâmetros regulares e ausência de *beads*¹²⁸.

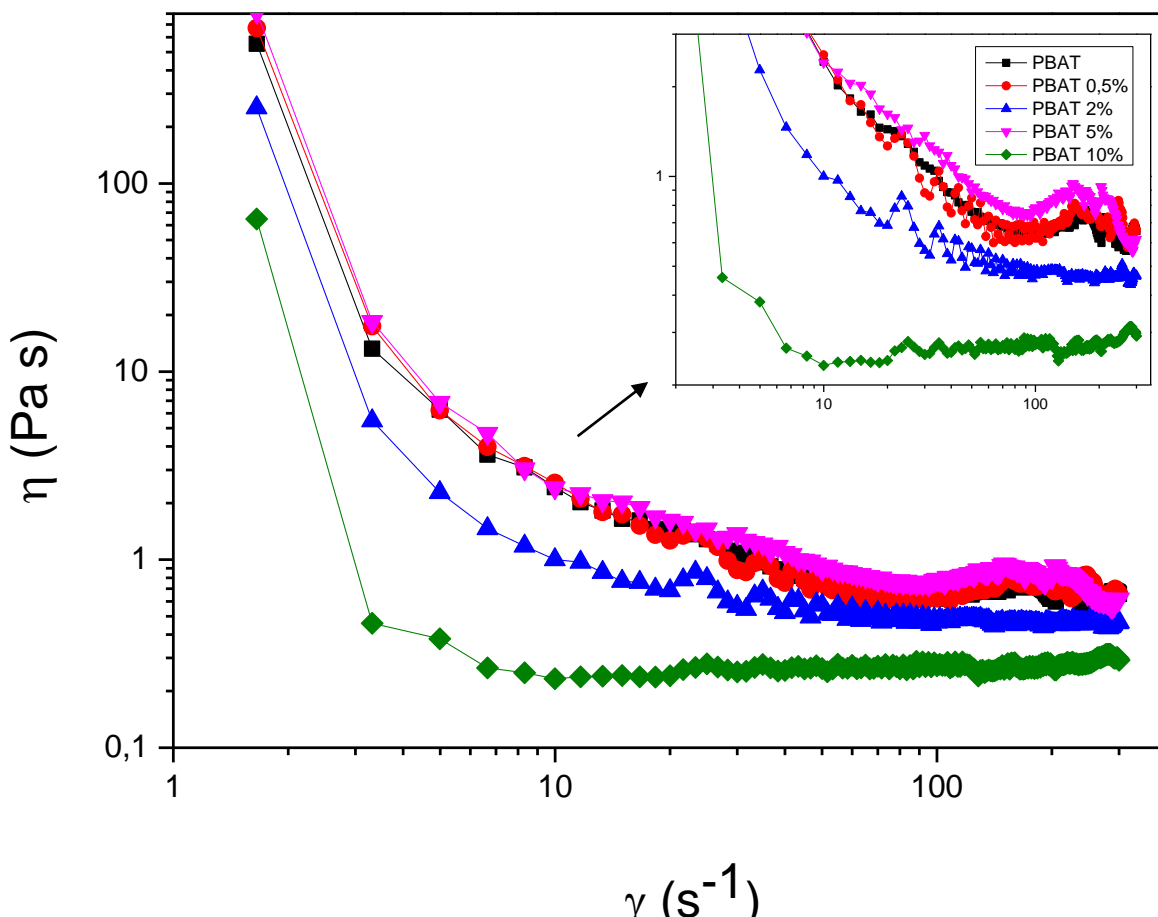


Figura 14. Curvas de viscosidade em função da taxa de cisalhamento para as soluções de PBAT e PBAT/gentamicina.

O espectro de FTIR das amostras de PBAT e PBAT/gentamicina estão apresentados na Figura 15. As fibras de PBAT/gentamicina exibiram bandas características de espectro do PBAT puro, apresentando uma banda aguda em 726 cm^{-1} , que está associada com as vibrações dos grupos metileno adjacentes ($-\text{CH}_2$) da estrutura principal do polímero. Uma banda na região de 1268 cm^{-1} atribuída ao estiramento dos grupos C-O da ligação éster. A mais intensa de todas as bandas apareceu na região de 1710 ou 1714 cm^{-1} e está associada aos grupos carbonila ($\text{C}=\text{O}$) na ligação éster^{12,129}.

Uma banda na região de 3000 cm^{-1} que corresponde ao estiramento C-H das porções aromáticas e alifáticas também foi observada. Espectros similares de FTIR foram observados após a incorporação da gentamicina à matriz do polímero, indicando a ausência de alterações químicas na estrutura do PBAT ou interações químicas com a gentamicina. Comparativamente, os resultados de FTIR para as fibras de PBAT (Figura 15 e) e para as fibras de PBAT/gentamicina (Figuras 15 a, b, c e d) estão muito semelhantes e este comportamento também é observado em outro trabalho utilizando PBAT, porém com a adição de nisina¹²⁴.

O espectro de FTIR do sulfato de gentamicina (Figura 15 f) apresenta bandas de absorção nos comprimentos de onda de $3000\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$ devido a vibração de alongamento de aminas primárias (R-NH_2) e secundárias (R_2NH), as bandas 1628 cm^{-1} , 1516 cm^{-1} e 1293 cm^{-1} referem-se as vibrações de flexão dos grupamentos de aminas (NH) I, II e III, e a banda 1044 cm^{-1} relaciona-se a deformação axial dos grupos NH e amina terciária (R_3N)^{16,130}.

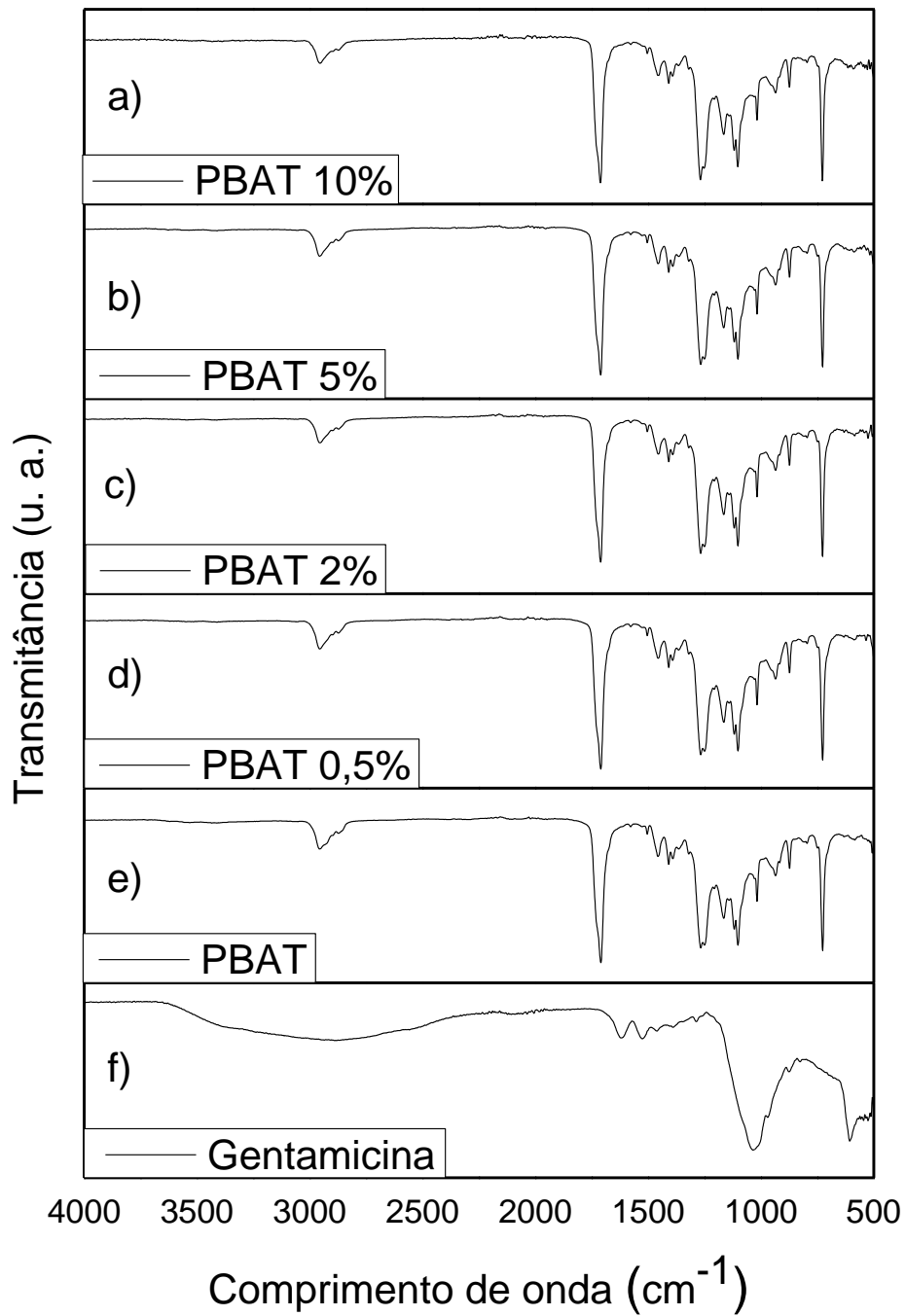


Figura 15. Espectros de FTIR para as fibras de PBAT e PBAT/gentamicina.

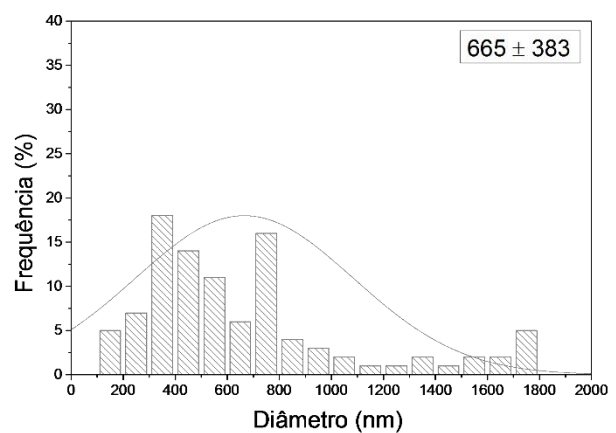
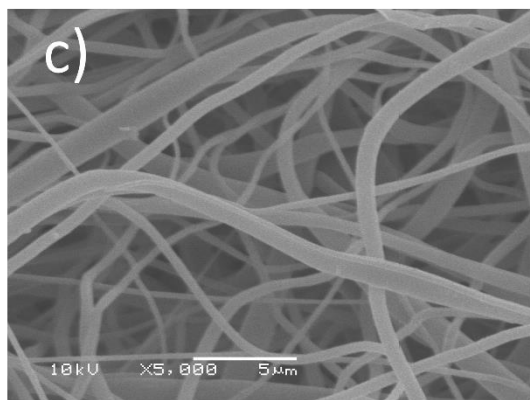
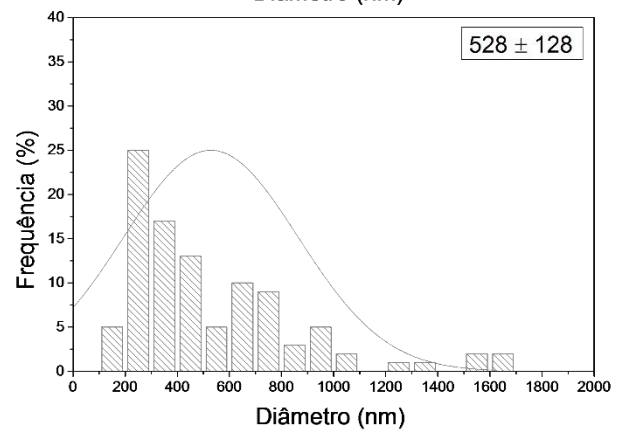
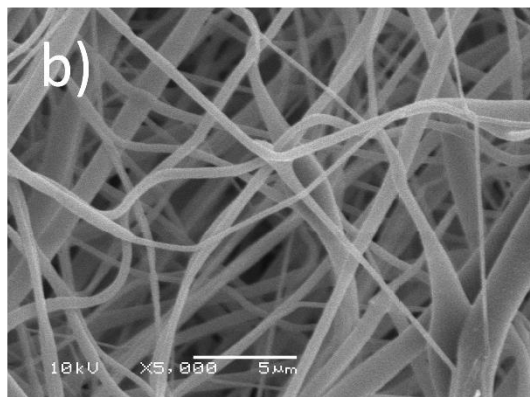
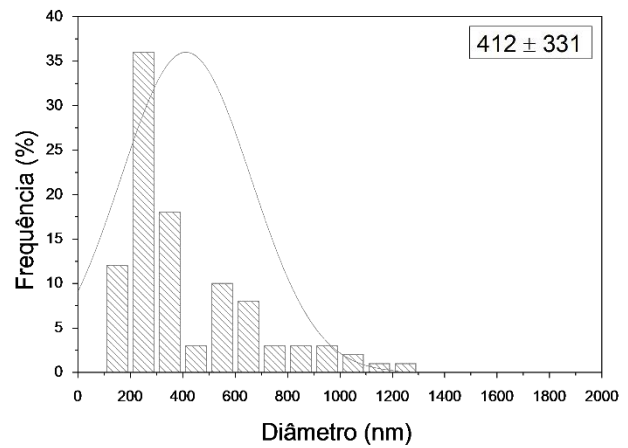
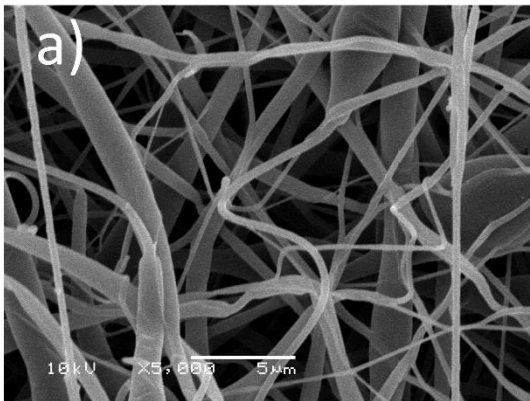
A morfologia das fibras do PBAT e PBAT/gentamicina foi obtida a partir da técnica de MEV. Suas micrografias e as suas respectivas distribuições de frequência em função do diâmetro da fibra estão apresentadas na Figura 16.

Pelo processo de eletrofiação foram obtidas fibras aleatórias e com ausência de *beads* que podemos observar na imagem de microscopia eletrônica de varredura das fibras do PBAT puro (Fig. 16a). As fibras de PBAT apresentaram uma frequência de distribuição entre 100 e 1300 nm, com um diâmetro médio de $412 \text{ nm} \pm 331 \text{ nm}$, revelando ampla polidispersão na frequência de diâmetro. Quando a gentamicina foi adicionada, o diâmetro médio das fibras das amostras de PBAT 0,5% e PBAT 2% aumentaram para 528 ± 128 e 665 ± 383 , respectivamente. Para as amostras de PBAT 5% e PBAT 10% diminuíram para 388 ± 143 e $378 \pm 82,02$, em relação ao polímero puro. Este efeito pode estar relacionado com a instabilidade do jato ejetado durante a eletrofiação^{131,132}, uma vez que jatos múltiplos podem contribuir para uma distribuição heterogênea de tamanho, além de afetar a morfologia das fibras poliméricas. Jatos múltiplos podem ser influenciados pelos parâmetros do ambiente, no momento do preparo e obtenção das fibras, tais como umidade e temperatura, os quais também desempenham um papel importante na determinação da morfologia das fibras eletrofiadas^{133,134}.

Realizamos esse estudo das distribuições de frequência em função do diâmetro da fibra, pois o diâmetro da fibra desempenha um papel muito importante nas propriedades finais da rede eletrofiada^{124,133}. Por exemplo, fibras poliméricas com 100 nm de diâmetro tem uma área superficial de aproximadamente $1000 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ e este é um motivo importante da escolha do método de obtenção das fibras, pois quanto maior a área superficial, melhor é a liberação do antibiótico.

O estudo das distribuições de frequência em função do diâmetro da fibra foi feito a partir de 100 medições de fibras em três diferentes imagens de cada amostra, sempre calibrando com a escala das micrografias. Percebe-se que para as amostras de PBAT 5 e 10% de gentamicina são encontrados tamanhos de fibras menores que 100 nanômetros e essa diminuição do diâmetro pode estar relacionada com os valores de condutividade, pois observamos que houve um aumento da condutividade com o aumento da quantidade de gentamicina adicionado a solução. No que diz respeito à condutividade, a literatura¹³⁵ reporta redução no diâmetro da fibra com o aumento da condutividade.

A diminuição do tamanho das fibras para as amostras com maior concentração de gentamicina corrobora com os resultados obtidos na análise do grau de intumescimento, pois a redução do diâmetro da fibra causou uma diminuição na macroporosidade (menor espaço entre fibras), além de aumentar a densidade de fibras. Em outras palavras, as fibras são mais finas e mais próximas umas das outras, diminuindo a absorção de água através da superfície e isso pode estar relacionado ao fato das fibras estarem mais empacotadas, possuindo pequenos espaços entre elas.



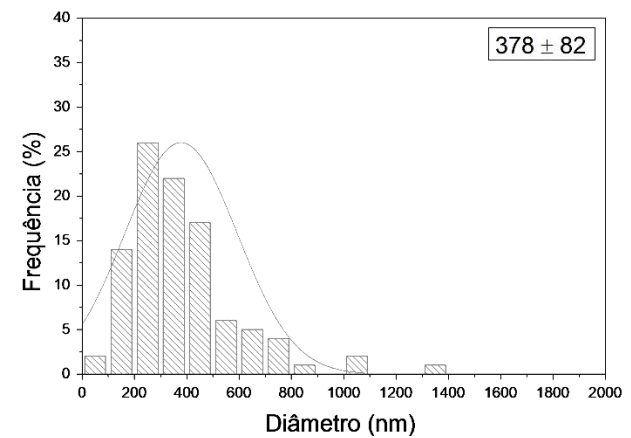
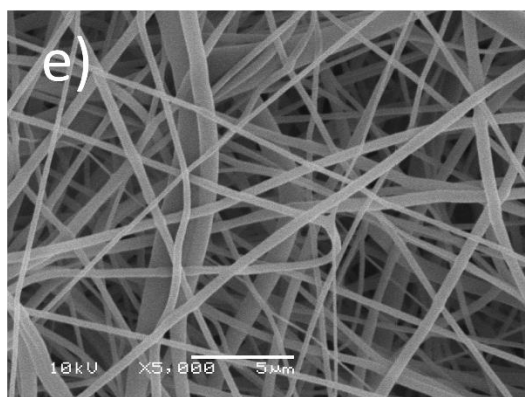
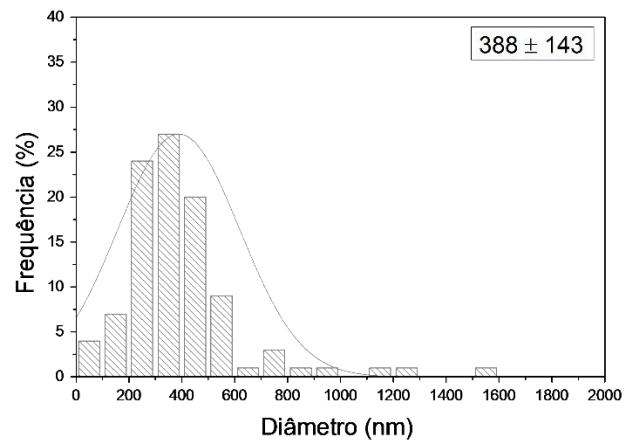
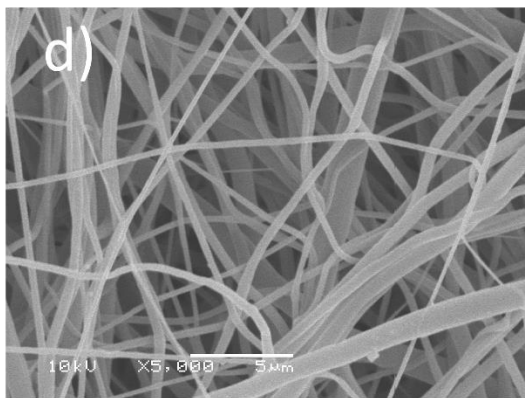


Figura 16. Imagens de microscopia eletrônica de varredura para as fibras de PBAT e PBAT/gentamicina e as respectivas distribuições de frequência em função do diâmetro das fibras: (a) PBAT, (b) PBAT 0,5%, (c) PBAT 2%, (d) PBAT 5% e (e) PBAT 10%.

O grau de intumescimento e a solubilidade são propriedades que permitem avaliar o comportamento dos filmes frente à imersão em diferentes meios. Dependendo da aplicação a que se destina, graus de solubilidade e/ou intumescimento são requeridos em maior ou menor grau¹³⁶.

A figura 17 mostra o grau de intumescimento para as fibras de PBAT e PBAT/gentamicina. As fibras compostas apenas por PBAT mostraram um grau de intumescimento máximo de 495% a 30 min e um mínimo de 414%, após 48 h. No entanto, à medida que a concentração de gentamicina aumentou nas amostras, o grau

de intumescimento diminuiu para cerca de 300%, comparando com os valores após 48 h de imersão.

Quando comparamos o grau de intumescimento e a análise do ângulo de contato das fibras de PBAT e PBAT/gentamicina (Tabela 5), percebemos que apesar do WCA diminuir de acordo com o aumento da concentração de gentamicina, notamos uma menor absorção de água.

Esse efeito também foi encontrado no estudo de Siqueira *et al*¹³⁷, utilizando a mesma técnica de produção de fibras, porém com outros materiais, o PLA, um polímero que também é hidrofóbico e a quitosana, um polissacarídeo que quando adicionado diminui o ângulo de contato das fibras. Os autores sugerem que as interações secundárias entre PLA e CS tenham ocorrido durante a dissolução do polímero, uma vez que ambos os polímeros são capazes de hidrolisar e gerar fragmentos menores de cadeia de polímero, causando assim uma maior interação entre os dois polímeros. Esses dois efeitos associados podem promover um obstáculo estérico e contribuem para a menor absorção de água¹³⁷. Levando em consideração que tanto o PBAT quanto a gentamicina são hidrolisáveis, efeitos semelhantes podem estar ocorrendo, diminuindo assim o grau de inchamento.

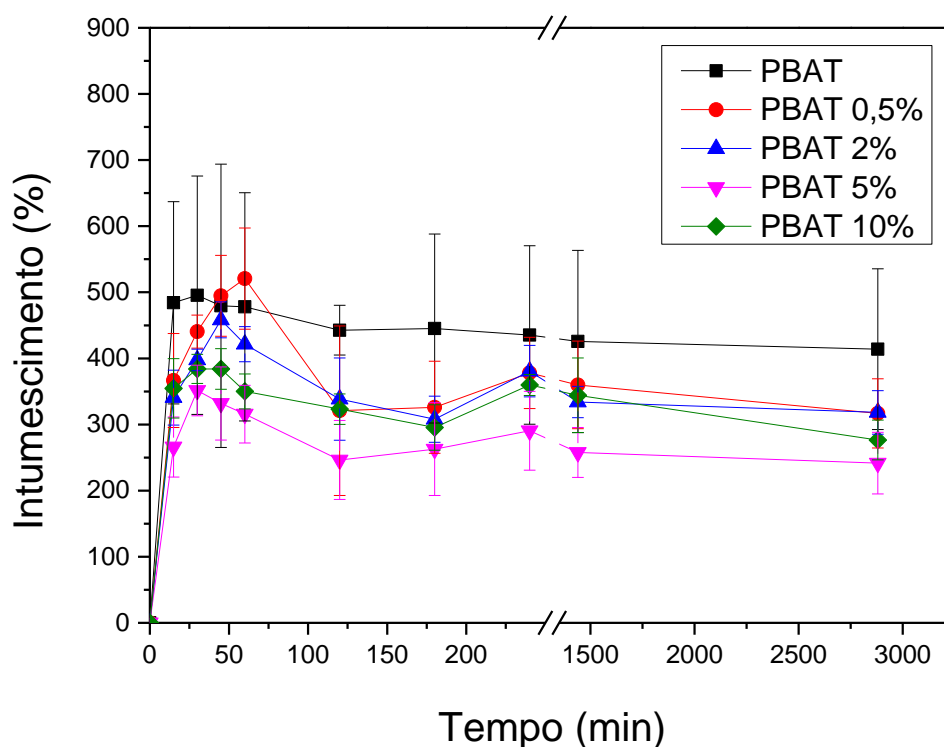


Figura 17. Perfil do grau de intumescimento das fibras de PBAT E PBAT/gentamicina em tampão PBS durante a análise de 48 horas.

Para avaliar qualquer possível modificação morfológica introduzida pela imersão em solução tamponada, realizamos a análise da Microscopia Eletrônica de Varredura das fibras de PBAT e PBAT/gentamicina que foram submetidas à imersão em tampão PBS por 48 horas.

A Figura 18, apresenta as micrografias das fibras após 48 horas de imersão em PBS e podemos perceber que houve alteração na morfologia das amostras em relação as fibras que não foram submetidas ao processo de imersão. As fibras apresentam-se aglutinadas, no entanto, apesar do processo de imersão em solução tamponada, as fibras mantiveram-se presentes, mostrando que não houve total coalescência ou desaparecimento da morfologia.

Estudos similares foram realizados^{138,139} e os resultados são interessantes para avaliar o comportamento das amostras em meio similar ao ambiente biológico. Liverani *et al*¹³⁹, investigaram possíveis alterações na morfologia de fibras eletrofiadas de PCL e quitosana em solução tamponada e ressaltam que não detectaram diferenças relevantes entre as amostras antes e após a imersão.

A técnica de microscopia eletrônica confocal foi utilizada para avaliar a dispersão da gentamicina ao longo da fibra e também para avaliar se a gentamicina marcada com 2-(5'-isotiocianato-2'-hidroxifenil) benzotiazol pode ser incorporada ou não nas fibras de PBAT. Os derivados de 2-(5'-isotiocianato-2'-hidroxifenil) benzotiazol são moléculas fluorescentes particularmente interessantes que apresentam alto deslocamento Stokes e apresentam grande estabilidade térmica e fotofísica devido a um mecanismo de transferência protônica intramolecular no estado excitado (ESIPT)^{140,141}. Investigamos a distribuição da gentamicina nas fibras de PBAT utilizando gentamicina marcada com sonda fluorescente em concentrações de 0%, 0,5% e 10%.

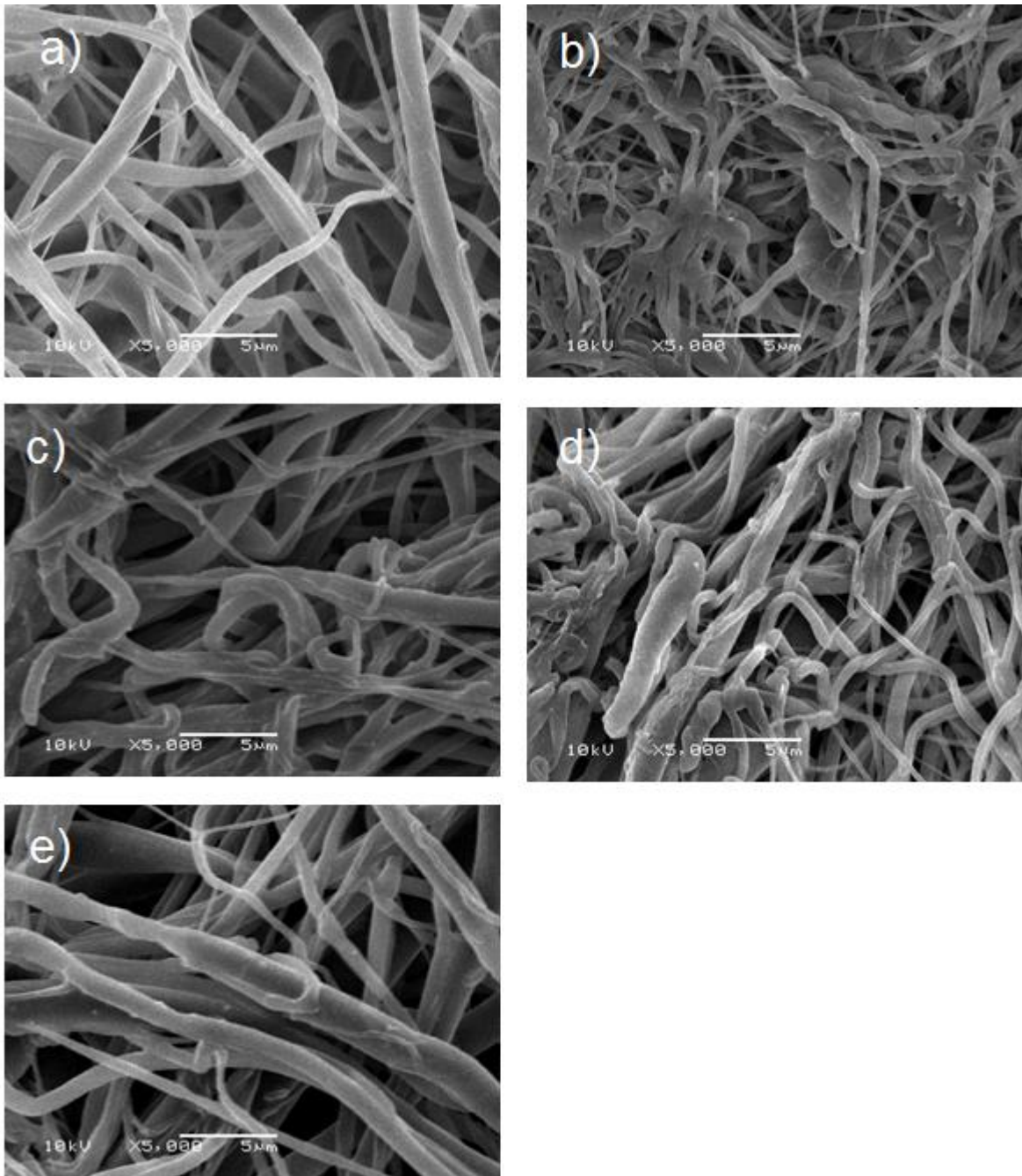


Figura 18: Imagens de microscopia eletrônica de varredura para as fibras de PBAT e PBAT/gentamicina: (a) PBAT, (b) PBAT 0,5%, (c) PBAT 2%, (d) PBAT 5% e (e) PBAT 10%, após 48 horas de imersão em PBS.

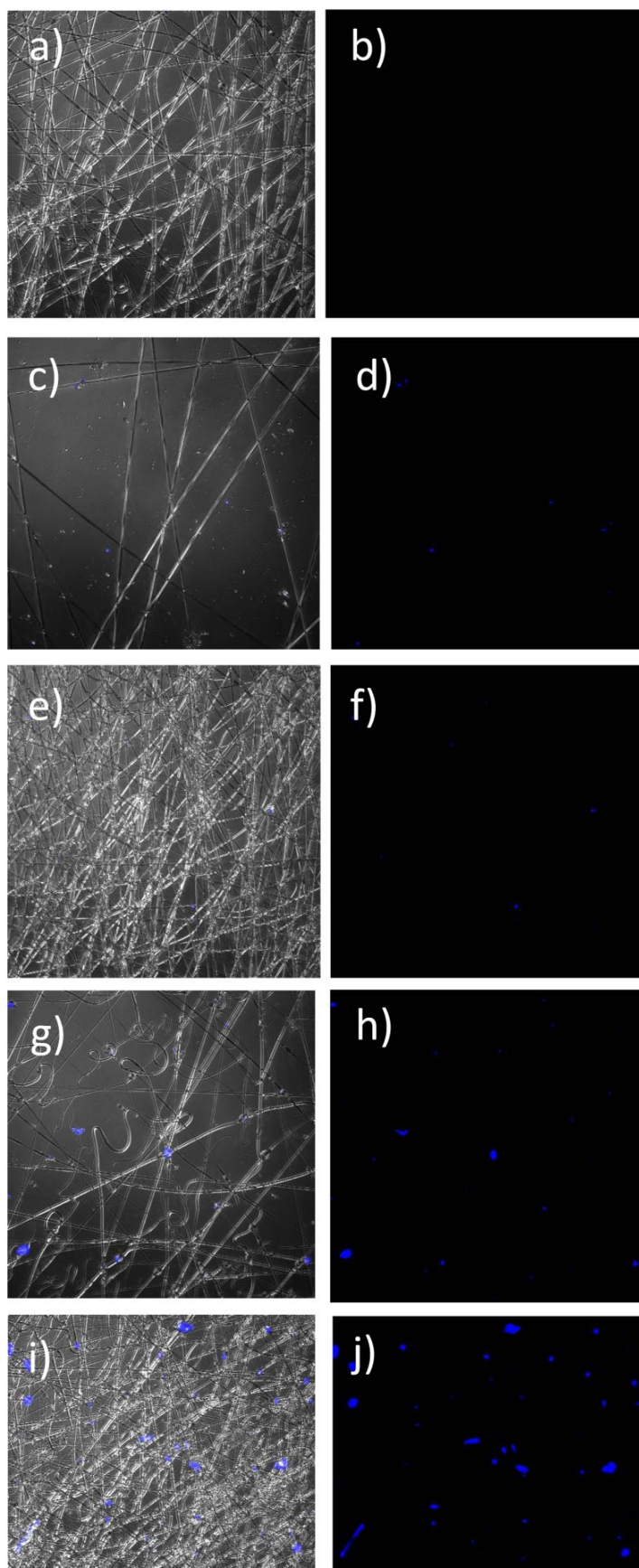


Figura 19. Imagens de microscopia eletrônica confocal das fibras de PBAT e PBAT/gentamicina: (a, b) PBAT puro, (c, d, e, f) 0,5% e (g, h, i, j) 10% de gentamicina.

As imagens da gentamicina marcada ao longo das fibras de PBAT são apresentadas na Figura 19. Em geral, fibras sem *beads* e/ou ramificações puderam ser identificadas nestas amostras. Deste modo, a imagem à esquerda (Fig. 19c) apresenta a morfologia da fibra e a localização da gentamicina, e a imagem à direita (Fig. 19d) indica a localização do sinal fluorescente (sinal azul) nas imagens digitalizadas. Por outro lado, a (Fig. 19a) apresenta a morfologia das fibras do PBAT puro e ilustra que as fibras de PBAT puro (sem gentamicina) não apresentam sinal de fluorescência (Fig. 19b).

A microscopia eletrônica confocal indica que o sinal de fluorescência aparece ao longo da fibra individual e também em pontos onde não encontramos fibras, sugerindo que a gentamicina pode ter sido incorporada nas fibras, mas também estar dispersa na matriz tridimensional (Fig. 19e, i). Além disso, quanto maior a concentração de gentamicina, mais partículas fluorescentes são visíveis ao longo da fibra (Fig. 19f, j).

A literatura também reporta a utilização da Microscopia Confocal como ferramenta para distinguir diferentes fases e para avaliar a dispersão de agentes antimicrobianos ao longo das amostras, sendo que apenas uma fase apresenta fluorescência¹⁴².

A partir do DSC investigamos o efeito da adição da gentamicina na matriz do PBAT e o comportamento de cristalização das fibras de PBAT/gentamicina. Os resultados estão apresentados na Tabela 3 e as curvas típicas de DSC estão apresentadas na Figura 20.

A adição de gentamicina às soluções de PBAT não apresentou uma grande diferença nos picos de cristalização das fibras de PBAT/gentamicina (Fig. 20a). As fibras de PBAT puro apresentaram temperatura de cristalização (T_c) de 90,9°C. O PBAT é um polímero com uma estrutura semicristalina que geralmente cristaliza acima da temperatura de transição vítrea, uma vez que abaixo da temperatura de transição vítrea não há mobilidade molecular suficiente para ocorrer a interação das cadeias do polímero¹⁸.

As temperaturas de transição vítrea (T_g) das fibras de PBAT apresentaram pequena variação após a adição da gentamicina. O PBAT puro apresentou T_g de -25,7°C, e os valores para as fibras de PBAT/gentamicina permaneceu entre -25,7°C e -26,6°C. A temperatura de fusão (T_m) do PBAT puro foi de 128,4°C (Figura 20b), e

este valor permaneceu muito próximo para todas as formulações das fibras (Tabela 4). Resultados semelhantes foram encontrados por Shiet *al.*¹⁴³ que reportaram temperatura de fusão para o PBAT de 121°C.

Tabela 3. Resultados de DSC para as fibras de PBAT e PBAT/gentamicina.

Amostras	T_g(°C)	T_m (°C)	T_c (°C)	ΔH_m (J/g)	X_c (%)
PBAT	-25,7	128,4	90,9	17,5	15,4
PBAT 0,5%	-25,7	128,9	89,8	16,1	14,1
PBAT 2%	-26,1	129,7	87,8	14,6	12,8
PBAT 5%	-26,6	130,7	94,6	10,9	9,6
PBAT 10%	-26,6	130,3	94	10,2	8,9

O percentual de cristalinidade (X_c) para as fibras de PBAT foi de 15,4%, enquanto que as fibras com 10% de gentamicina apresentaram X_c de 8,9% (Tabela 3). A presença de alguns aditivos, tais como antimicrobianos, pode reduzir o espaço disponível para o crescimento do cristal, reduzindo assim a cristalinidade¹⁴³. Em outras palavras, a gentamicina possivelmente impediu a difusão das cadeias do PBAT e contribuiu para as mudanças na cristalinidade do polímero. Um outro fator que deve ser levado em consideração é a voltagem aplicada para a obtenção das fibras, uma vez que a cristalinidade pode diminuir à medida que a tensão aumenta. Como a distância entre a agulha e o coletor é curta, as cadeias poliméricas não tem tempo suficiente para se organizar, reduzindo a cristalinidade. O efeito do processo de eletrofiação na estrutura da fibra tem sido reportado em estudos anteriores¹⁴⁴, e esse fenômeno está provavelmente relacionado com as modificações estruturais que resultam a partir da alta voltagem utilizada durante o processo de eletrofiação. A cristalinidade da nanofibra é também afetada pelo campo eletrostático e o tempo de cristalização durante o percurso do jato^{101,145}.

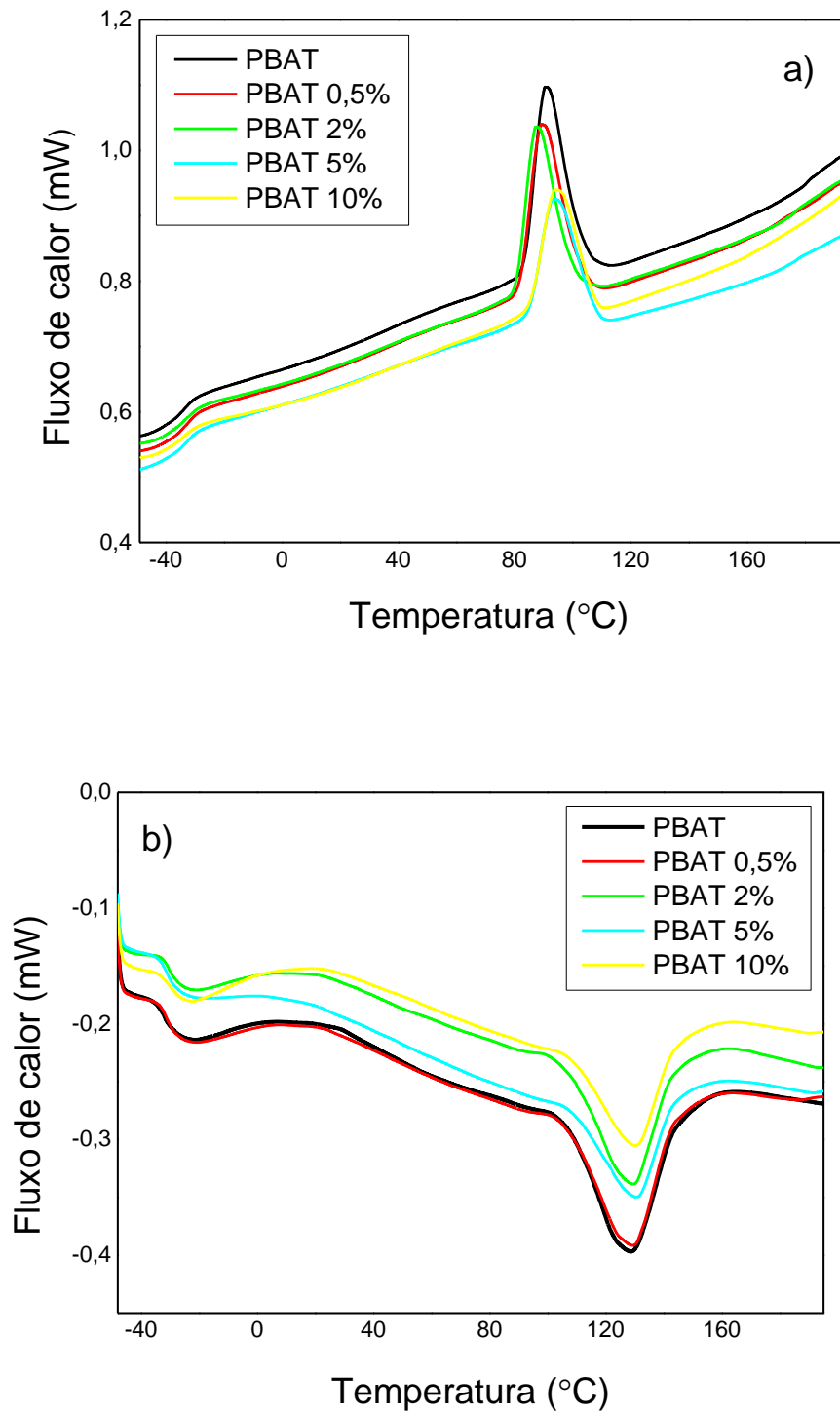


Figura 20. Termogramas de DSC para as fibras de PBAT e para as fibras de PBAT/gentamicina: (a) ciclo do 1º resfriamento e (b) ciclo do 2º aquecimento.

A influência da adição de sulfato gentamicina em hidrogéis de poli (acrilamida-co-ácido acrílico) também foi estudada pela técnica de DSC por A. Thakur et al¹⁴⁶. Este estudo apresenta os termogramas do sulfato de gentamicina puro, dos polímeros puros e dos hidrogéis com o fármaco e mostra que o sulfato de gentamicina modificou as temperaturas de fusão e cristalização dos polímeros puros, sugerindo uma forte interação entre o polímero e o fármaco. Diferente deste caso, no presente estudo não visualizamos uma grande alteração nas temperaturas encontradas nos processos endotérmicos e exotérmicos, ou seja, houve pouca influência da gentamicina na matriz do PBAT.

A caracterização das propriedades hidrofílicas/hidrofóbicas de um material é essencial para uma compreensão profunda de suas potenciais aplicações. Quando as aplicações são no campo biomédico, como na engenharia de tecidos, é considerado extremamente importante o uso de um material com boa molhabilidade/hidrofiliidade¹⁰. A análise WCA é uma técnica simples e confiável sobre a molhabilidade do material analisado. Ela mede o quanto uma gota de água se espalha sobre a superfície do material, obtendo então informações sobre a hidrofobicidade ou hidrofiliidade do material¹⁴⁷. As propriedades químicas da matriz da fibra podem ser avaliadas através da medida da hidrofobicidade das diferentes formulações das fibras¹⁴⁸, e além disso, a natureza hidrofílica ou hidrofóbica do substrato tem um impacto direto na forma de como ele é utilizado¹⁰¹. A molhabilidade da superfície que inclui as propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas, é considerado como um fator crucial para a determinação das respostas biológicas, tais como adsorção das proteínas, adesão/ativação de plaquetas, adesão bacteriana e células, e a adesão ou liberação de aditivos antimicrobianos¹⁴⁹. Assim, a fim de avaliar os efeitos das propriedades de superfície das fibras eletrofiadas, medidas de ângulo de contato da água (WCA) foram realizadas, e a imagem da gota de água na superfície das fibras de PBAT puro pode ser visualizada na Figura 21.

Tabela 4. Resultados de WCA para as fibras de PBAT e PBAT/gentamicina.

Amostra	WCA (°)
PBAT	127 ± 1
PBAT 0,5%	120 ± 2
PBAT 2%	116 ± 12
PBAT 5%	101 ± 9
PBAT 10%	108 ± 6

A superfície de fibras que são mais ou menos hidrofóbicas podem estar atribuídas ao efeito combinado da morfologia nanoestrutural e enrugada, e as quais formam redes tridimensionais¹⁵⁰. Materiais hidrofílicos apresentam pequeno ângulo de contato (espalhamento de água em toda a superfície) enquanto materiais hidrofóbicos apresentam um alto ângulo de contato (contato mínimo entre a gota de água e a superfície)^{101,149}.

As fibras de PBAT puro apresentaram ângulo de contato com a gota de água de 127 ± 1 indicando uma superfície hidrofóbica. A Figura 4 mostra o formato da gota em contato com a superfície e este resultado pode também corresponder aproximadamente aos resultados experimentais encontrados na literatura^{10,151}. Apenas para as amostras de PBAT e PBAT 0,5% as gotas mantiveram-se estáveis em um ponto da superfície, já para as amostra PBAT 2, 5 e 10% não houve estabilização das gotas, pois as mesmas foram rapidamente absorvidas, assim a imagem foi congelada logo após a deposição da gota afim de obter os valores dos ângulos iniciais. Os valores iniciais encontrados foram de 116 ± 12; 101 ± 9 e 108 ± 6 para PBAT 2, 5 e 10% respectivamente.

A presença da gentamicina, uma molécula solúvel em água, afetou significativamente o grau de molhabilidade da superfície das fibras, uma vez que as amostras com maior percentual de gentamicina obtiveram caráter hidrofílico e isto pode estar acontecendo devido as interações entre os grupos polares da gentamicina que estão disponíveis na superfície as fibras e são capazes de interagir com as moléculas de água via ligação de hidrogênio¹⁵².

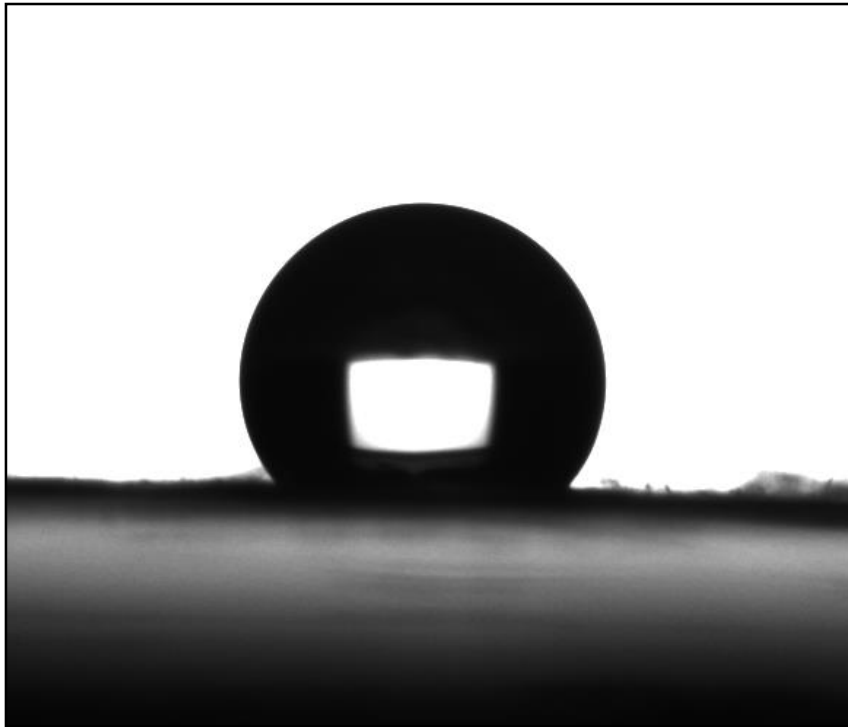


Figura 21. Fotografia da gota de água na superfície da fibras de PBAT para determinação do WCA.

Com o intuito de estudar as características da superfície das fibras quanto a sua rugosidade, as amostras foram analisadas por perfilometria óptica e os valores da rugosidade média quadrática estão apresentados na Tabela 5. O valor de rugosidade média quadrática encontrado para a amostra de PBAT puro foi de $6 \pm 1 \mu\text{m}$ e a literatura também encontrou valores de rugosidade média quadrática muito próximos para amostras de fibras de PBAT puro eletrofiadas, sendo eles 6 ± 1^{151} e 7 ± 0^{110} , demonstrando a reprodutibilidade que a técnica e a análise proporcionam para estes materiais.

Em relação as fibras de PBAT puro que apresentaram valores de rugosidade média quadrática de $6,7 \pm 1,4 \mu\text{m}$, as amostras de PBAT 0,5% e 2% demonstraram um aumento para valores de 7 ± 0 e $8 \pm 3 \mu\text{m}$, respectivamente. Porém analisando as amostras de PBAT 5% E 10% visualizamos uma diminuição para valores de 3 ± 0 e $5 \pm 1 \mu\text{m}$. Este comportamento pode também ser observado nos perfis de superfície nas imagens 3-D (Figura 22).

Estes resultados podem estar relacionados com a morfologia adquirida e analisada a partir do MEV, pois quando avaliamos a frequência de distribuição das micrografias de cada amostra em função de seu diâmetro médio, percebemos um aumento do diâmetro médio das amostras de PBAT 0,5% e 2% e uma diminuição do diâmetro médio das amostras PBAT 5% e 10%, encontrando até mesmo fibras com tamanhos nanométricos. Essa diferença de diâmetros modifica a morfologia da superfície das fibras e pode estar interferindo nos valores de rugosidade média quadrática encontrados.

Tabela 5. Valores de rugosidade expressas como RMS (μm) das fibras de PBAT e PBAT/gentamicina.

Amostra	RMS (μm)
PBAT	6 ± 1
PBAT 0,5%	7 ± 0
PBAT 2%	8 ± 3
PBAT 5%	3 ± 0
PBAT 10%	5 ± 1

Muitos estudos comparam valores de rugosidade com as medidas de ângulo de contato, e mostram a dependência dos valores encontrados entre as técnicas, seja a variação devido a adição de cargas ou devido a tratamentos superficiais^{110,151,153,154}. A modificação no grau de molhabilidade das fibras de PBAT e PBAT/gentamicina também pode estar relacionado com a variação da rugosidade das matrizes obtidas, bem como as condições ambientais no momento da eletrofiliação, pois para obter fibras lisas e homogêneas, as condições ambientais do local de trabalho devem ser cuidadosamente monitoradas. Outrossim, a solução da amostra para o eletrofiliação deve ser cuidadosamente monitorada também, visto que a alteração de algumas propriedades tais como a viscosidade, concentração, condutividade e tensão superficial podem ter um efeito direto nas propriedades finais da fibra^{134,155}.

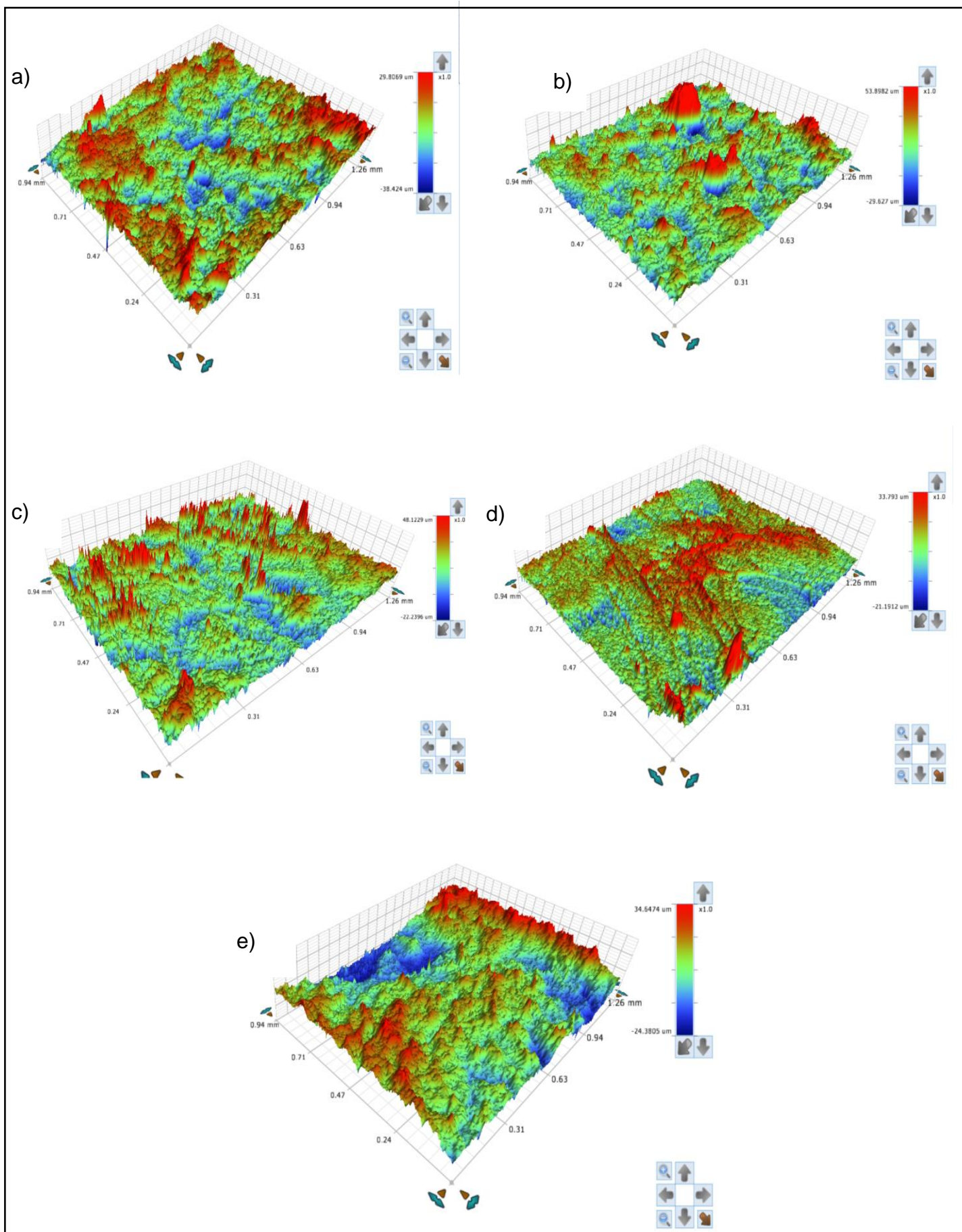


Figura 22. Imagens de perfilometria das superfícies das fibras de PBAT e PBAT/gentamicina: a) PBAT, b) 0,5%, c) 2%, d) 5%, e) 10% de gentamicina.

A ação antimicrobiana das fibras desenvolvidas foi avaliada contra a bactéria gram-negativa *Escherichia coli* (abreviada como *E. coli*) que faz parte de um grupo grande e diverso de bactérias. Embora a maioria das cepas de *E. coli* sejam inofensivas, outras podem causar doenças. Alguns tipos de *E. coli* podem causar diarreia, enquanto outros causam infecções do trato urinário, doenças respiratórias, pneumonia e outras doenças¹⁵⁶.

A incorporação da gentamicina em diferentes concentrações nas soluções de PBAT resultou em fibras com atividade antimicrobianas a qual pode ser verificada através dos halos de inibição contra a bactéria indicadora *E. coli*. Os resultados representativos da atividade antimicrobiana das fibras de PBAT e PBAT/gentamicina estão apresentados na Figura 23.

Maiores zonas de inibição foram observadas nas fibras à medida que a concentração de gentamicina aumentou na matriz de PBAT. Como esperado, as fibras de PBAT puro (sem gentamicina) não apresentaram atividade antimicrobiana, ou seja, nenhum halo de inibição ao redor do filme pôde ser identificado, sugerindo que a *E. coli* cresceu em toda a região e ao redor deste filme. Estes resultados indicaram que a gentamicina foi eficientemente liberada a partir das fibras de PBAT/gentamicina e apresentou atividade antimicrobiana contra a bactéria Gram-negativa em concentrações crescentes.

A literatura reporta a análise da atividade de fibras de PLGA com gentamicina e vancomicina contra as bactérias *E. coli* e *S aureus*, respectivamente, e percebem que a atividade dos antibióticos permanece elevada após o processo de eletrofiação, atestando que a eletrofiação pode ser um método adequado para a preparação de membranas de liberação de fármacos¹⁷.

Outro estudo¹⁵⁷ que utilizou PLA como base para gerar fibras ultrafinas com gentamicina encapsulada, também investigou sua eficácia antimicrobiana contra a bactéria *E. coli*. Os resultados indicaram que as fibras de PLA puro não apresentaram atividade e as fibras que continham gentamicina demonstraram eficácia contra a *E. coli*, comprovando que as fibras com o fármaco podem ser utilizadas como plataformas avançadas de entregas de antimicrobianos.

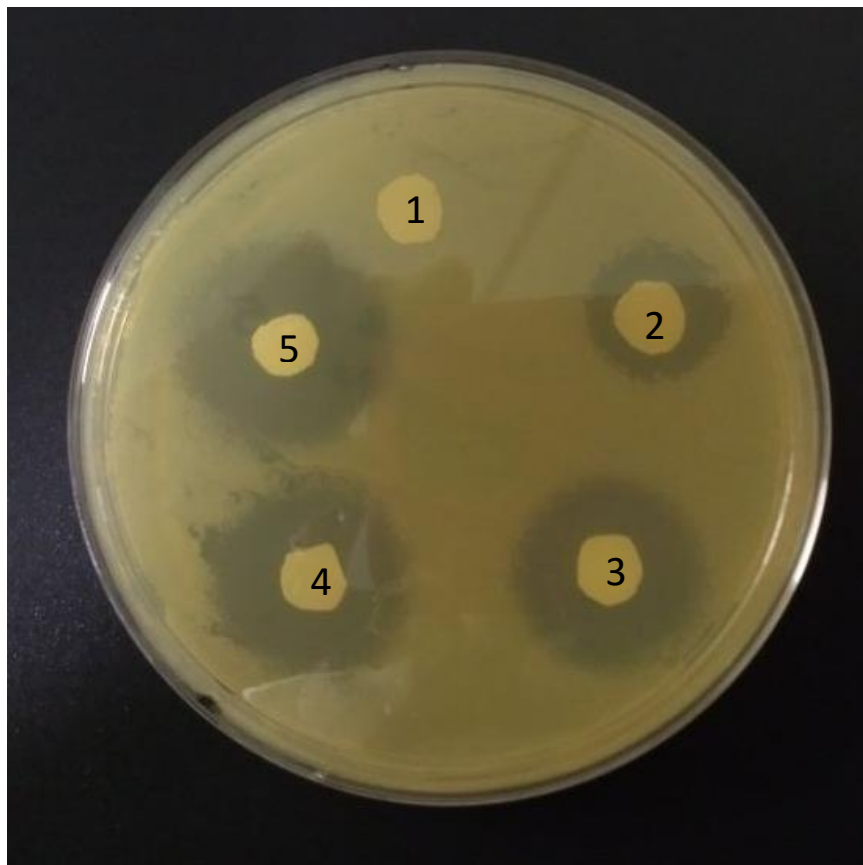


Figura 23. Atividade antimicrobiana do filme das fibras de PBAT e das fibras de PBAT/gentamicina testados contra *E. coli*. Os números indicam as amostras 1)PBAT; 2)PBAT0,5%; 3)PBAT 2%; 4)PBAT 5%; 5)PBAT 10%.

Através da técnica de microdiluição em caldo foi possível determinar a concentração inibitória mínima (CIM). A Tabela 6 apresenta as concentrações inibitórias mínimas (CIM's) das fibras de PBAT e PBAT/gentamicina. As CIM's variaram entre 0,100 e 1,056 $\mu\text{g/mL}$ frente ao microrganismo testado. Os dados são comparados com o controle positivo (CP) que possui o meio de cultura, a bactéria *E. coli*, mas não foi colocada a amostra e com o controle negativo (CN) que não possui bactéria e nem amostra, somente o meio de cultura.

Observa-se que as fibras de PBAT/gentamicina apresentaram atividade antibacteriana contra a *E. coli*, pois inibiram o seu crescimento quando comparado com o PBAT puro que apresentou CIM de 1,056 $\mu\text{g/mL}$, muito próximo do controle positivo que é de 1,451 $\mu\text{g/mL}$.

Os métodos de diluição em caldo ou ágar são igualmente aceitáveis para medir quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano contra um determinado isolado bacteriano¹⁵⁸. Este método é denominado “microdiluição”, porque envolve o uso de pequenos volumes de caldo colocados em placas de plástico estéreis, próprias para microdiluição, que possuem poços de fundo redondo ou cônico. Cada placa deverá incluir um poço de controle de crescimento e um poço negativo (não inoculado)¹⁵⁹.

A quantidade de crescimento nos poços contendo o antibiótico deve ser comparada com a quantidade de crescimento nos poços de controle de crescimento (sem antibiótico) usada em cada conjunto de testes ao determinar os pontos finais de crescimento. Para que o teste seja considerado válido, é necessário que haja crescimento (≥ 2 mm turbidez definitiva) no poço de controle positivo¹⁵⁹.

Tabela 6. Atividade antimicrobiana do filme das fibras de PBAT e das fibras de PBAT/gentamicina testados contra *E. coli*.

Amostras	CIM ($\mu\text{g/mL}$)
PBAT	1,056
PBAT 0,5%	0,195
PBAT 2%	0,112
PBAT 5%	0,113
PBAT 10%	0,100
<u>CP</u>	<u>1,451</u>
<u>CN</u>	<u>0,000</u>

A citotoxicidade das diferentes amostras de PBAT e PBAT/gentamicina foi avaliada pelo método de análise de azul de Tripán em células C6. Os resultados mostraram que o PBAT, sozinho ou com gentamicina, induz uma diminuição da viabilidade celular, no entanto, essas reduções não são estatisticamente significativas

(Figura 24). De acordo com o padrão ISO 10993-5, as amostras são consideradas citotóxicas quando a redução da viabilidade celular é maior do que 30%.

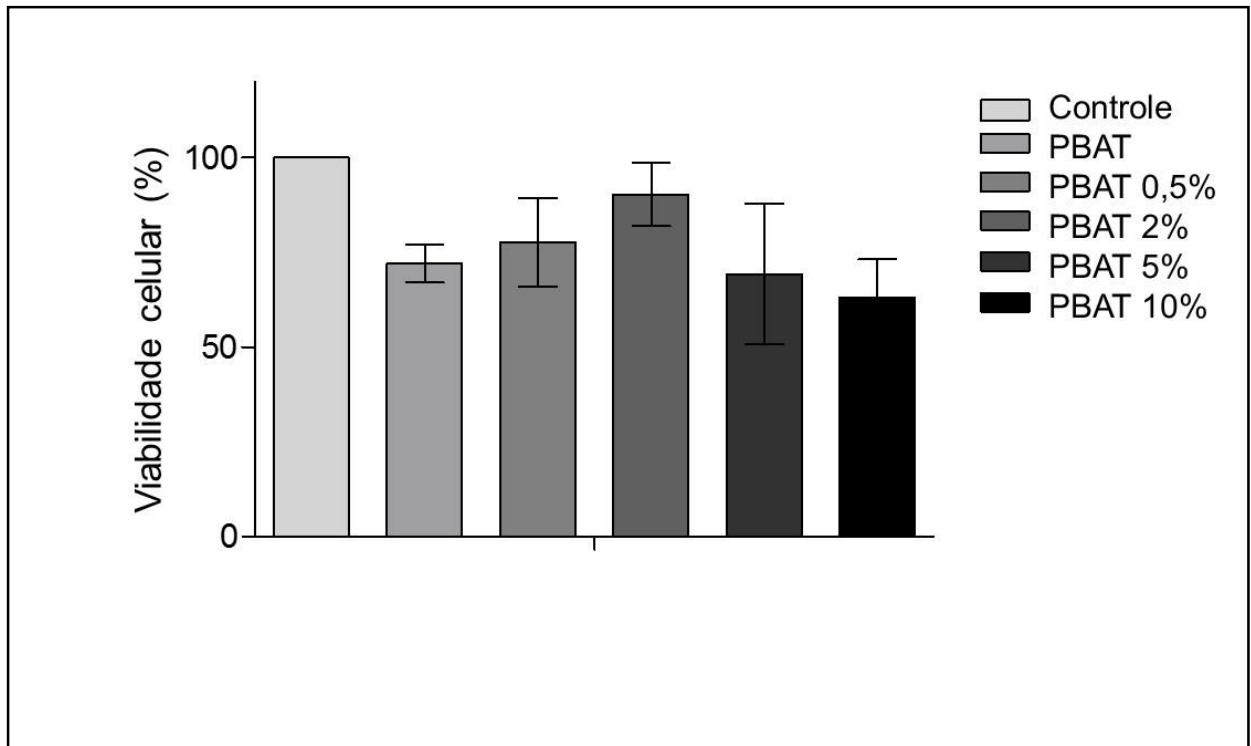


Figura 24. Os resultados são expressos como porcentagem média em células tratadas em comparação com controle \pm desvio padrão da média de quatro experimentos independentes.

Sabe-se que a citotoxicidade de um biomaterial é afetada por vários fatores como sua topologia de superfície, hidrofiliabilidade, entre outros⁸. Uma alteração na morfologia celular pode ser observada nas amostras PBAT e PBAT/gentamicina, o que pode explicar a diminuição da viabilidade celular (Figura 25).

A viabilidade celular de fibras de PBAT também foi investigada por Rodrigues et al¹⁰, e os resultados demonstraram que as amostras são viáveis para aplicações biomédicas, uma vez que nenhum efeito citotóxico foi observado.

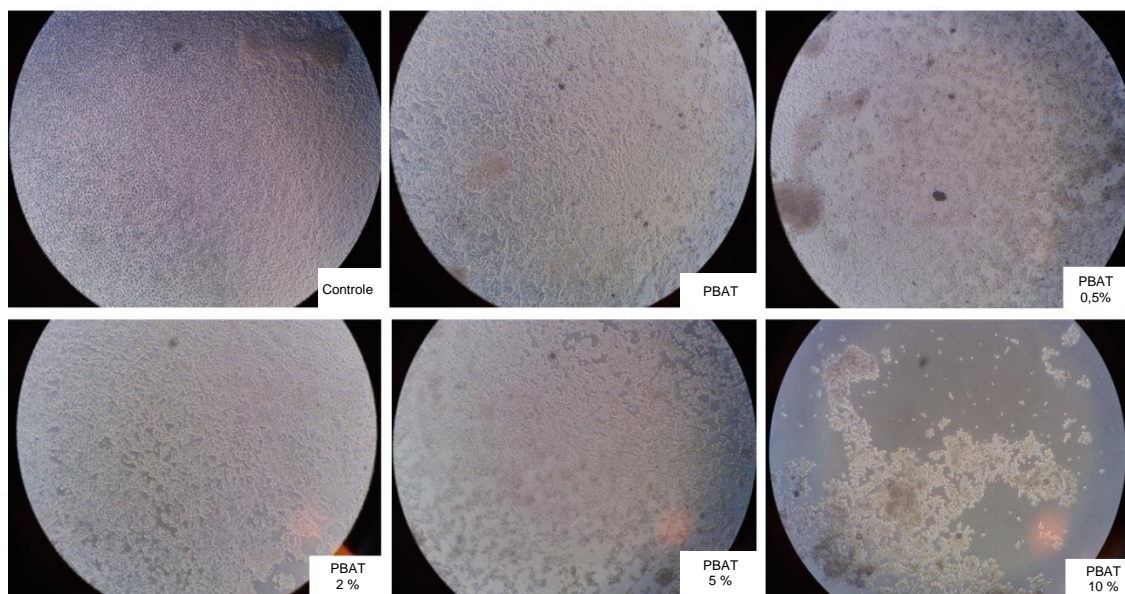


Figura 25. Fotografia morfológica das culturas celulares após 24 horas de exposição à extração, 100x.

Outro estudo⁷⁸ analisou a influência da presença de gentamicina, vancomicina e lidocaína na viabilidade celular de fibras de PLGA/colágeno e os resultados sugeriram viabilidade celular inferior no grupo de membranas nanofibras contendo fármaco sem comparação com o grupo controle. Isso pode ser devido ao fato de que os antimicrobianos liberados das nanofibras prejudicam o tecido viável e atrasam o processo de cicatrização. O crescimento celular e a proliferação diminuíram.

A partir deste ensaio de citotoxicidade foi possível perceber que a combinação de PBAT com gentamicina diminui a viabilidade celular em relação ao controle, porém cabe ressaltar que todas matrizes produzidas neste estudo não foram consideradas citotóxicas.

Nesse contexto, a produção de nanofibras de PBAT e PBAT/gentamicina é viável e resulta em níveis adequados de viabilidade celular, o que permite uma ampla gama de aplicações biomédicas para esses materiais.

6 CONCLUSÕES

Foi possível obter filmes por *casting* com o polímero biodegradável PBAT e os resultados indicam que a funcionalização superficial do polímero através da metodologia de modificação superficial escolhida foi realizada com sucesso.

A partir da atividade antimicrobiana, percebemos que a gentamicina necessita estar livre para ter efeito antimicrobiano. Os resultados de XPS indicam que existe a possibilidade de ligação covalente da gentamicina com a superfície do PBAT, no entanto a ligação não foi fundamental para ocorrer a atividade antimicrobiana. A primeira abordagem foi fundamental para entendermos melhor o comportamento da gentamicina e prosseguirmos para a segunda abordagem.

Na segunda abordagem, fibras de PBAT e PBAT/gentamicina foram produzidas a partir do método de eletrospiação. A presença da gentamicina modificou a morfologia das amostras diminuindo o diâmetro das fibras para tamanhos nanométricos e esta modificação pode estar relacionada com o aumento da condutividade promovida pelas cargas presentes na gentamicina. A presença da gentamicina foi comprovada pela microscopia eletrônica confocal, sugerindo que a gentamicina foi incorporada nas fibras, mas também ficou dispersa na matriz tridimensional.

A presença da gentamicina, afetou significativamente o grau de molhabilidade da superfície das fibras, uma vez que as amostras com maior percentual de gentamicina obtiveram caráter hidrofílico.

As nanofibras de PBAT/gentamicina apresentaram atividade antimicrobiana contra cepas de *E. coli*, demonstrado pelos halos de inibição. Esta investigação demonstrou uma abordagem de combinação viável para a produção de nanofibras de PBAT e gentamicina com níveis adequados de viabilidade celular, o que permite uma ampla gama de aplicações biomédicas para esses materiais.

O biomaterial desenvolvido a partir de PBAT e gentamicina apresenta potencial como curativo contendo fármaco antimicrobiano para ser aplicado na prevenção de infecções bacterianas durante seu uso.

7 REFERÊNCIAS

1. Zander, N. E. Hierarchically structured electrospun fibers. *Polymers (Basel)*. **5**, 19–44 (2013).
2. Warden, G. D., Saffle, J. R. & Kravitz, M. A two-stage technique for excision and grafting of burn wounds. *J. Trauma* **22**, 98–103 (1982).
3. Mi, F.-L. *et al.* Control of wound infections using a bilayer chitosan wound dressing with sustainable antibiotic delivery. *J. Biomed. Mater. Res.* **59**, 438–49 (2002).
4. Elsner, J. J. & Zilberman, M. Antibiotic-eluting bioresorbable composite fibers for wound healing applications: microstructure, drug delivery and mechanical properties. *Acta Biomater.* **5**, 2872–83 (2009).
5. Teo, E. Y. *et al.* Polycaprolactone-based fused deposition modeled mesh for delivery of antibacterial agents to infected wounds. *Biomaterials* **32**, 279–287 (2011).
6. Elsner, J. J. *et al.* Novel biodegradable composite wound dressings with controlled release of antibiotics: Results in a guinea pig burn model. *Burns* **37**, 896–904 (2011).
7. Allen Jr, L. V., Popovich, N. G. & Ansel, H. C. *Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos*. (Artmed, 2013).
8. Ingavle, G. C. & Leach, J. K. Advancements in electrospinning of polymeric nanofibrous scaffolds for tissue engineering. *Tissue Eng. Part B. Rev.* **20**, 277–93 (2014).
9. Khorshidi, S. *et al.* A review of key challenges of electrospun scaffolds for tissue-engineering applications. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **10**, 715–738 (2016).
10. Rodrigues, B. V. M. *et al.* Influence of low contents of superhydrophilic MWCNT on the properties and cell viability of electrospun poly (butylene adipate-co-terephthalate) fibers. *Mater. Sci. Eng. C* **59**, 782–791 (2016).
11. Zhou, H., Lawrence, J. G. & Bhaduri, S. B. Fabrication aspects of PLA-

- CaP/PLGA-CaP composites for orthopedic applications: A review. *Acta Biomater.* **8**, 1999–2016 (2012).
12. Ribeiro Neto, W. A. *et al.* Poly (butylene adipate-co-terephthalate)/hydroxyapatite composite structures for bone tissue recovery. *Polym. Degrad. Stab.* **120**, 61–69 (2015).
 13. Zilberman, M. & Elsner, J. Antibiotic-eluting medical devices for various applications. *J. Control. Release* **130**, 202–215 (2008).
 14. Fukushima, K., Wu, M. H., Bocchini, S., Rasyida, A. & Yang, M. C. PBAT based nanocomposites for medical and industrial applications. *Mater. Sci. Eng. C* **32**, 1331–1351 (2012).
 15. Long Jiang, Michael P. Wolcott, and & Zhang*, J. Study of Biodegradable Polylactide/Poly(butylene adipate-co-terephthalate) Blends. (2005). doi:10.1021/BM050581Q
 16. Dwivedi, C., Pandey, H., Pandey, A. C. & Ramteke, P. W. Fabrication and assessment of gentamicin loaded electrospun nanofibrous scaffolds as a quick wound healing dressing material. *Curr. Nanosci.* **11**, 222–228 (2015).
 17. Chen, D. W. *et al.* Sustainable release of vancomycin, gentamicin and lidocaine from novel electrospun sandwich-structured PLGA/collagen nanofibrous membranes. *Int. J. Pharm.* **430**, 335–341 (2012).
 18. Bastarrachea, L. *et al.* Biodegradable poly(Butylene adipate-co-terephthalate) films incorporated with nisin: Characterization and effectiveness against *Listeria innocua*. *J. Food Sci.* **75**, E215–E224 (2010).
 19. Bastarrachea, L., Dhawan, S., Sablani, S. S. & Powers, J. Release kinetics of nisin from biodegradable poly(butylene adipate-co-terephthalate) films into water. *J. Food Eng.* **100**, 93–101 (2010).
 20. Zehetmeyer, G., Maris, S., Meira, M., Severo, F. & Adriano, R. Biodegradable and antimicrobial films based on poly(butylene adipate- co -terephthalate) electrospun fibers. (2016). doi:10.1007/s00289-016-1896-8
 21. Williams, D. F. *Definitions in Biomaterials Progress in Biomedical Engineering.* (1987).

22. Patel, N. & Gohil, P. A review on biomaterials: scope, applications & human anatomy significance. *Int. J. Emerg. Technol. Adv. Eng.* **2(4)**, 91–101 (2012).
23. Orefice, Rodrigo Lambert Pereira, M. de M. & Mansur, H. S. *Biomateriais - Fundamentos e Aplicações.* (2005).
24. Resende, R. R. *et al.* Scale / Topography of Substrates Surface Resembling Extracellular Matrix for Tissue Engineering. **10**, 1157–1193 (2014).
25. Mikes, A. G. *et al.* poly(glycolic acid) bonded fiber structures for cell attachment and transplantation. **27**, 183–189 (1993).
26. Byrom, D. *Biomaterials: Novel Materials from Biological Sources.* (1991).
27. Seal, B. L., Otero, T. C. & Panitch, A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. **34**, 147–230 (2001).
28. VALLET-REGÍ, M. Introduction to the World of Biomaterials. *Jor. Span. Roy. Chem* (1997).
29. Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J. & Lemons, J. E. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine.* (2013).
30. Wong, J. Y., Bronzino, J. D. & Peterson, D. R. *Biomaterials: principles and Practices.* (2012).
31. Park, J. & Lakes, R. S. *Biomaterials: an introduction.* (2007).
32. Chanda, M. *Introduction to polymer science and chemistry: a problem-solving approach.* (2013).
33. Angelova, N. & Hunkeler, D. Rationalizing the design of polymeric biomaterials. *Trends Biotechnol.* **17**, 409–421 (1999).
34. Nair, L. S. & Laurencin, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science (Oxford)* **32**, 762–798 (2007).
35. Tian, H., Tang, Z., Zhuang, X., Chen, X. & Jing, X. Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application. *Prog. Polym. Sci.* **37**, 237–280 (2012).
36. Singh, N., Bridges, A. W., García, A. J. & Lyon, L. A. Covalent tethering of functional microgel films onto poly(ethylene terephthalate) surfaces. *Biomacromolecules* **8**, 3271–3275 (2007).

37. Maia, M., Klein, E. S., Monje, T. V. & Pagliosa, C. Reconstrução da estrutura facial por biomateriais: revisão de literatura. *Rev. Bras. Cir. Plástica* **25**, 566–572 (2010).
38. Aparecida, A. H., Guastaldi, A. C. & Fook, M. V. L. Desenvolvimento e caracterização de suportes porosos de polietileno de ultra alto peso molecular (PEUAPM) para utilização como biomaterial para reposição e regeneração óssea. *Polímeros* **18**, 277–280 (2008).
39. Rezwan, K., Chen, Q. Z., Blaker, J. J. & Boccaccini, A. R. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **27**, 3413–3431 (2006).
40. Ikada, Y. Challenges in tissue engineering. *J. R. Soc. Interface* **3**, 589–601 (2006).
41. Gunatillake, P. A. & Adhikari, R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur. Cell. Mater.* **5**, 1–16; discussion 16 (2003).
42. Yu, T. & Li, Y. Influence of poly(butylenes adipate-co-terephthalate) on the properties of the biodegradable composites based on ramie/poly(lactic acid). *Compos. Part A Appl. Sci. Manuf.* **58**, 24–29 (2014).
43. Fukushima, K., Rasyida, A. & Yang, M. C. Characterization, degradation and biocompatibility of PBAT based nanocomposites. *Appl. Clay Sci.* **80–81**, 291–298 (2013).
44. Kim, J. H., Lee, J. C. & Kim, G. H. Study on poly(butylene adipate-co-terephthalate)/starch composites with polymeric methylenediphenyl diisocyanate. *J. Appl. Polym. Sci.* **132**, 1–7 (2015).
45. Guo, G. *et al.* Structure and property of biodegradable soy protein isolate/PBAT blends. *Ind. Crops Prod.* **74**, 731–736 (2015).
46. Shi, X. Q., Ito, H. & Kikutani, T. Characterization on mixed-crystal structure and properties of poly(butylene adipate-co-terephthalate) biodegradable fibers. *Polymer (Guildf)*. **46**, 11442–11450 (2005).
47. Zhou, X., Mohanty, A. & Misra, M. A New Biodegradable Injection Moulded Bioplastic from Modified Soy Meal and Poly (butylene adipate-co-terephthalate): Effect of Plasticizer and Denaturant. *J. Polym. Environ.* **21**, 615–622 (2013).

48. Bikiaris, D. N. Nanocomposites of aliphatic polyesters: An overview of the effect of different nanofillers on enzymatic hydrolysis and biodegradation of polyesters. *Polymer Degradation and Stability* **98**, 1908–1928 (2013).
49. Ojeda, T. F. M. Biodegradabilidade de materiais poliméricos. (Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo., 2008).
50. Yang, F. & Qiu, Z. Preparation, crystallization, and properties of biodegradable poly(butylene adipate-co-terephthalate)/organomodified montmorillonite nanocomposites. *J. Appl. Polym. Sci.* **119**, 1426–1434 (2011).
51. Jao, W. C. *et al.* Effect of immobilization of polysaccharides on the biocompatibility of poly(butylene adipate-co-terephthalate) films. *Polym. Adv. Technol.* **21**, 543–553 (2010).
52. Goes, A. M. *et al.* Viabilidade celular de nanofibras de polímeros biodegradáveis e seus nanocompósitos com argila montmorillonita. *Polímeros* **22**, 34–41 (2012).
53. Chivrac, F., Kadlecová, Z., Pollet, E. & Avérous, L. Aromatic Copolyester-based Nano-biocomposites: Elaboration, Structural Characterization and Properties. *J. Polym. Environ.* **14**, 393–401 (2006).
54. Chen, J.-H., Chen, C.-C. & Yang, M.-C. Characterization of Nanocomposites of Poly(butylene adipate-co-terephthalate) blending with Organoclay. *J. Polym. Res.* **18**, 2151–2159 (2011).
55. Muthuraj, R., Misra, M. & Mohanty, A. K. Hydrolytic degradation of biodegradable polyesters under simulated environmental conditions. *J. Appl. Polym. Sci.* **132**, 1–13 (2015).
56. Yeh, J. T. *et al.* Compatible and crystallization properties of poly(lactic acid)/poly(butylene adipate-co-terephthalate) blends. *J. Appl. Polym. Sci.* **116**, 680–687 (2010).
57. Pollet, E., Delcourt, C., Alexandre, M. & Dubois, P. Transesterification catalysts to improve clay exfoliation in synthetic biodegradable polyester nanocomposites. *Eur. Polym. J.* **42**, 1330–1341 (2006).
58. Touchaleaume, F. *et al.* Performance and environmental impact of biodegradable polymers as agricultural mulching films. *Chemosphere* **144**, 433–

- 439 (2016).
59. Weng, Y. X. *et al.* Biodegradation behavior of poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT), poly(lactic acid) (PLA), and their blend under soil conditions. *Polym. Test.* **32**, 918–926 (2013).
 60. Li, G., Shankar, S., Rhim, J. W. & Oh, B. Y. Effects of preparation method on properties of poly(butylene adipate-co-terephthalate) films. *Food Sci. Biotechnol.* **24**, 1679–1685 (2015).
 61. Feng, S. *et al.* Crystallization and creep of the graphite nanosheets based poly(butylene adipate-co-terephthalate) biocomposites. *Thermochim. Acta* **587**, 72–80 (2014).
 62. Bizerra, A. & Silva, V. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA: Mecanismos e aplicações. *Rev. Saúde e Meio Ambient.* **3**, 1–12 (2016).
 63. Hugo, W. B. A brief history of heat and chemical preservation and disinfection. *J. Appl. Bacteriol.* **71**, 9–18 (1991).
 64. Saga, T. & Yamaguchi, K. History of antimicrobial agents and resistant bacteria. *Japan Medical Association Journal* **52**, 103–108 (2009).
 65. Özdemir, G., Limoncu, M. H. & Yapar, S. The antibacterial effect of heavy metal and cetylpridinium-exchanged montmorillonites. *Appl. Clay Sci.* **48**, 319–323 (2010).
 66. Antunes, A., Pereira Jr., N. (Pereira J. & Ebole, M. de F. *Gestão em biotecnologia*. (E-papers, 2006).
 67. Finberg, R. W. *et al.* The Importance of Bactericidal Drugs: Future Directions in Infectious Disease. *Clin. Infect. Dis.* **39**, 1314–1320 (2004).
 68. Li, B., Yu, S., Hwang, J. Y. & Shi, S. Antibacterial Vermiculite Nano -Material. *J. Miner. Mater. Charact. Eng.* **1**, 61–68 (2002).
 69. Rosenkrantz, B. E., Greco, J. R., Hoogerheide, J. G. & Oden, E. M. Gentamicin Sulfate. *Anal. Profiles Drug Subst. Excipients* **9**, 295–340 (1981).
 70. O'Neil, M. *The Merck Index, An Encyclopedia Of Chemicals, Drugs and Biologicals*. (Merck, 2006).
 71. Korzybski, T., Kowszyk-Gindifer, Z. & Kuryłowicz, W. *Antibiotic: origin, nature*

- and properties.* (2013).
72. United States Pharmacopeial. *The United States Pharmacopeia : USP 29 : the National Formulary : NF 24 : by authority of the United States Pharmacopeial Convention, Inc., meeting at Washington, D.C., March 9-13, 2005.* (United States Pharmacopeial Convention, 2005).
 73. Oliveira, J. F. P., Cipullo, J. P. & Burdmann, E. A. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. *Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.* **21**, 444–452 (2006).
 74. Almeida, E. V. S. & Wagner, R. Análise da concentração de gentamicina comercializada nas farmácias de Curitiba-PR. *Saúde* **2**, (2014).
 75. Amsterdam, D. *Antibiotics in laboratory medicine.* (Wolters Kluwer , 2015).
 76. Wisher, D. Martindale: The Complete Drug Reference. 37th ed. *J. Med. Libr. Assoc.* **100**, 75–76 (2012).
 77. Fernandes, F. P. *et al.* Sistemas de liberação tópica: síntese, caracterização e estudos antimicrobianos. in *ANAIS ... Congresso Brasileiro de Polímeros, v.10, 2009, Foz do Iguaçu, PR.* (2009).
 78. Chen, D. W. *et al.* Sustainable release of vancomycin, gentamicin and lidocaine from novel electrospun sandwich-structured PLGA/collagen nanofibrous membranes. *Int. J. Pharm.* **430**, 335–341 (2012).
 79. Li, G., Shankar, S., Rhim, J.-W. & Oh, B.-Y. Effects of preparation method on properties of poly(butylene adipate-co-terephthalate) films. *Food Sci. Biotechnol.* **24**, 1679–1685 (2015).
 80. Wang, L.-F., Rhim, J.-W. & Hong, S.-I. Preparation of poly(lactide)/poly(butylene adipate-co-terephthalate) blend films using a solvent casting method and their food packaging application. *LWT - Food Sci. Technol.* **68**, 454–461 (2016).
 81. Mohanty, S. & Nayak, S. K. Starch based biodegradable PBAT nanocomposites: Effect of starch modification on mechanical, thermal, morphological and biodegradability behavior. *Int. J. Plast. Technol.* **13**, 163–185 (2009).
 82. Zheng, J., Zhang, H., Zhao, Z. & Han, C. C. Construction of hierarchical structures by electrospinning or electrospraying. *Polymer (Guildf).* **53**, 546–554 (2012).

83. Wang, C., Fang, C. Y. & Wang, C. Y. Electrospun poly(butylene terephthalate) fibers: Entanglement density effect on fiber diameter and fiber nucleating ability towards isotactic polypropylene. *Polym. (United Kingdom)* **72**, 21–29 (2015).
84. Huang, Z. M., Zhang, Y. Z., Kotaki, M. & Ramakrishna, S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Compos. Sci. Technol.* **63**, 2223–2253 (2003).
85. Thavasi, V., Singh, G. & Ramakrishna, S. Electrospun nanofibers in energy and environmental applications. *Energy Environ. Sci.* **1**, 205 (2008).
86. Ghorani, B. & Tucker, N. Fundamentals of electrospinning as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology. *Food Hydrocolloids* **51**, 227–240 (2015).
87. Guerrini, L. M., Branciforti, M. C., Bretas, R. E. S. & Oliveira, M. P. de. Eletrofiação do poli (álcool vinílico) via solução aquosa. *Polímeros* **16**, 286–293 (2006).
88. Prasanna, J. *et al.* Effect of Process Parameters on Poly(butylene adipate co-terephthalate) Nanofibers Development by Electrospinning Technique. *Adv. Mater. Res.* **894**, 360–363 (2014).
89. Agarwal, S., Greiner, A. & Wendorff, J. H. Functional materials by electrospinning of polymers. *Prog. Polym. Sci.* **38**, 963–991 (2013).
90. Shin, H. U., Li, Y., Paynter, A., Nartetamrongsutt, K. & Chase, G. G. Vertical rod method for electrospinning polymer fibers. *Polym. (United Kingdom)* **65**, 26–33 (2015).
91. Luo, C. J., Stoyanov, S. D., Stride, E., Pelan, E. & Edirisinghe, M. Electrospinning versus fibre production methods: from specifics to technological convergence. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 4708 (2012).
92. Tao, D. *et al.* Chain orientation in poly(glycolic acid)/halloysite nanotube hybrid electrospun fibers. *Polym. (United Kingdom)* **60**, 284–291 (2015).
93. Torres-Giner, S., Gimenez, E. & Lagaron, J. M. Characterization of the morphology and thermal properties of Zein Prolamine nanostructures obtained by electrospinning. *Food Hydrocoll.* **22**, 601–614 (2008).

94. Costa, R. G. F. *et al.* Eletrofiação de Polímeros em Solução. Parte I: Fundamentação Teórica. *Polímeros* **22**, 170–177 (2012).
95. Baqeri, M. *et al.* Influence of processing conditions on polymorphic behavior, crystallinity, and morphology of electrospun poly(VInylidene fluoride) nanofibers. *J. Appl. Polym. Sci.* **132**, n/a-n/a (2015).
96. Wei, Q. Functional nanofibers and their applications. *Woodhead Publ.* **53**, 427 (2012).
97. Brandelli, A. & Taylor, T. M. in *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality* 229–257 (Elsevier, 2014). doi:10.1016/B978-1-78242-034-7.00011-6
98. Wang, X., Yue, T. & Lee, T. ching. Development of Pleurocidin-poly(vinyl alcohol) electrospun antimicrobial nanofibers to retain antimicrobial activity in food system application. *Food Control* **54**, 150–157 (2015).
99. Ramakrishna, S., Fujihara, K., Teo, W.-E., Lim, T.-C. & Ma, Z. *An Introduction to Electrospinning And Nanofibers.* (WORLD SCIENTIFIC, 2005). doi:10.1142/5894
100. Gislene, Z. Desenvolvimento e caracterização de embalagens ativas compostas de PBAT com incorporação de nisina. (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2016).
101. Frenot, A. & Chronakis, I. S. Polymer nanofibers assembled by electrospinning. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* **8**, 64–75 (2003).
102. Rutledge, G. C. & Fridrikh, S. V. Formation of fibers by electrospinning. *Advanced Drug Delivery Reviews* **59**, 1384–1391 (2007).
103. Rutledge, G. C. & Fridrikh, S. V. Formation of fibers by electrospinning. *Advanced Drug Delivery Reviews* **59**, 1384–1391 (2007).
104. Fong, H., Chun, I. & Reneker, D. H. Beaded nanofibers formed during electrospinning. in *Polymer* **40**, 4585–4592 (Elsevier, 1999).
105. Han, J. *Innovations in Food Packaging, 1st Edition.* (Elsevier Academic, 2005).
106. Beglou, M. J. & Haghi, A. K. Electrospun biodegradable and biocompatible natural nanofibers: a detailed review. *Cellul. Chem. Technol.* **42**, 441–462

- (2008).
107. WU, J.-C. & LORENZ, H. P. Electrospinning of biomaterials and their applications in tissue engineering. *Nano Life* **2**, 1230010 (2012).
 108. Chan, C.-M. *Polymer Surface Modification and Characterization*. (Carl Hanser Verlag: Estados Unidos, 1994).
 109. Zhang, S. *et al.* Gelatin nanofibrous membrane fabricated by electrospinning of aqueous gelatin solution for guided tissue regeneration. (2008). doi:10.1002/jbm.a.32136
 110. Belmonte, K. G. Modificação superficial de polímeros fotoinduzida por radiação UV, VUV E EUV. (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2015).
 111. Kijchavengkul, T. *et al.* Atmospheric and soil degradation of aliphatic e aromatic polyester fi lms. **95**, 99–107 (2010).
 112. Kijchavengkul, T., ã, R. A. & Rubino, M. ARTICLE IN PRESS POLYMER Measuring gel content of aromatic polyesters using FTIR spectrophotometry and DSC. **27**, 55–60 (2008).
 113. Kijchavengkul, T. *et al.* Biodegradation and hydrolysis rate of aliphatic aromatic polyester. *Polym. Degrad. Stab.* **95**, 2641–2647 (2010).
 114. Pavia, Donald L. Lampman, Gary M. Kriz, George S. Vyvyan, J. R. *Introdução à espectroscopia*. (2010).
 115. Application Note AN 79, Attenuated Total Reflection (ATR) – a versatile tool for FT-IR spectroscopy,. Available at: www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF Docs/OpticalSpectroscopy/FT-IR/ALPHA/AN/AN79_ATR-Basics_EN.pdf. (Accessed: 14th July 2017)
 116. Weng, Y. *et al.* Biodegradation behavior of poly (butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT), poly (lactic acid) (PLA), and their blend under soil conditions. *Polym. Test.* **32**, 918–926 (2013).
 117. Al-itry, R., Lamnawar, K. & Maazouz, A. Improvement of thermal stability , rheological and mechanical properties of PLA , PBAT and their blends by reactive extrusion with functionalized epoxy. *Polym. Degrad. Stab.* **97**, 1898–1914 (2012).

118. Li, G., Shankar, S., Rhim, J. W. & Oh, B. Y. Effects of preparation method on properties of poly(butylene adipate-co-terephthalate) films. *Food Sci. Biotechnol.* **24**, 1679–1685 (2015).
119. Kijchavengkul, T., Auras, R., Rubino, M., Ngouajio, M. & Fernandez, R. T. Assessment of aliphatic – aromatic copolyester biodegradable mulch films . Part I: Field study. **71**, 942–953 (2008).
120. Venkatesan, R. & Rajeswari, N. ZnO / PBAT nanocomposite films : Investigation on the mechanical and biological activity for food packaging. (2017). doi:10.1002/pat.3847
121. Raquez, J. M., Nabar, Y., Narayan, R. & Dubois, P. Novel High-Performance Talc / Poly [(butylene adipate) - co -terephthalate] Hybrid Materials. 310–320 doi:10.1002/mame.200700352
122. Kessler, F. *et al.* Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology Biodegradation improvement of poly (3-hydroxy-butyrate) films by entomopathogenic fungi and UV-assisted surface functionalization. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **130**, 57–67 (2014).
123. Prabhakaran, M. P. *et al.* Novel scaffold design with multi-grooved PLA fibers. doi:10.1088/1748-6041/6/4/045001
124. No Title. Available at: http://www.ufrgs.br/lapol/processamento/l_31.html. (Accessed: 20th July 2017)
125. Subbiah, T., Bhat, G. S., Tock, R. W., Parameswaran, S. & Ramkumar, S. S. Electrospinning of nanofibers. *J. Appl. Polym. Sci.* **96**, 557–569 (2005).
126. Thompson, C. J., Chase, G. G., Yarin, A. L. & Reneker, D. H. Effects of parameters on nanofiber diameter determined from electrospinning model. *Polymer (Guildf).* **48**, 6913–6922 (2007).
127. Gomes de Castro, A. *Reologia e Suas Aplicações Industriais.* (2001).
128. Varesano, A., Aluigi, A., Vineis, C. & Tonin, C. Study on the shear viscosity behavior of keratin/PEO blends for nanofibre electrospinning. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **46**, 1193–1201 (2008).
129. de Castro, J. G. *et al.* Designing a novel nanocomposite for bone tissue

- engineering using electrospun conductive PBAT/polypyrrole as a scaffold to direct nanohydroxyapatite electrodeposition. *RSC Adv.* **6**, 32615–32623 (2016).
130. Gemeinder, J. L. P. Desenvolvimento e avaliação de um sistema de liberação sustentada de gentamicina em biomembranas de látex natural. (Universidade Estadual Paulista, 2016).
131. Sencadas, V. *et al.* Determination of the parameters affecting electrospun chitosan fiber size distribution and morphology. *Carbohydr. Polym.* **87**, 1295–1301 (2012).
132. Ye, P., Xu, Z. K., Wu, J., Innocent, C. & Seta, P. Nanofibrous poly(acrylonitrile-co-maleic acid) membranes functionalized with gelatin and chitosan for lipase immobilization. *Biomaterials* **27**, 4169–4176 (2006).
133. Costa, R. G. F. *et al.* Eletrofiação de Polímeros em Solução. Parte I: Fundamentação Teórica. **22**, 170–177 (2012).
134. Brandelli, A. & Taylor, T. M. *Nanostructured and nanoencapsulated natural antimicrobials for use in food products. Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality* (Elsevier Ltd, 2015). doi:10.1016/B978-1-78242-034-7.00011-6
135. Jin, W.-J., Jeon, H. J., Kim, J. H. & Youk, J. H. A study on the preparation of poly(vinyl alcohol) nanofibers containing silver nanoparticles. *Synth. Met.* **157**, 454–459 (2007).
136. Almutawah, A., Barker, S. A. & Belton, P. S. Hydration of gluten: A dielectric, calorimetric, and fourier transform infrared study. *Biomacromolecules* **8**, 1601–1606 (2007).
137. Siqueira, Nataly Machado, Garcia, Ketlin C., Bussamara Roberta , Both, Fernanda S. ,Vainstein, M. H. & Soares, R. M. D. Poly (lactic acid)/chitosan fiber mats: Investigation of effects of the support on lipase immobilization. *Int. J. Biol. Macromol.* **72**, 998–1004 (2015).
138. Electrospun biodegradable elastic polyurethane scaffolds with dipyrindamole release for small diameter vascular grafts. *Acta Biomater.* **10**, 4618–4628 (2014).
139. Liverani, L. *et al.* Incorporation of bioactive glass nanoparticles in electrospun PCL/chitosan fibers by using benign solvents. *Bioact. Mater.* 1–9 (2017).

doi:10.1016/j.bioactmat.2017.05.003

140. Ã, F. S. R., Leusin, F. P., Campo, L. F. & Ã, V. S. Excited state intramolecular proton transfer in amino 2- (2 0 -hydroxyphenyl) benzazole derivatives : Effects of the solvent and the amino group position. **126**, 728–734 (2007).
141. Rodembusch, F. S., Leusin, P. & Medina, C. fluorescent protein probes. (2005).
142. Brahatheeswaran, D. *et al.* Hybrid fluorescent curcumin loaded zein electrospun nanofibrous scaffold for biomedical applications. *Biomed. Mater.* **7**, 45001 (2012).
143. Shi, X. Q., Ito, H. & Kikutani, T. Characterization on mixed-crystal structure and properties of poly (butylene adipate- co -terephthalate) biodegradable fibers. **46**, 11442–11450 (2005).
144. Rojas, O. J., Montero, G. A., Habibi, Y., Carolina, N. & Carolina, N. Electrospun Nanocomposites from Polystyrene Loaded with Cellulose Nanowhiskers. (2009). doi:10.1002/app
145. Ghorani, B. & Tucker, N. Fundamentals of Electrospinning as a Novel Delivery Vehicle for Bioactive Compounds in Food Nanotechnology. *Food Hydrocoll.* (2015). doi:10.1016/j.foodhyd.2015.05.024
146. Thakur, a, Wanchoo, R. K. & Singh, P. Hydrogels of Poly (acrylamide- co - acrylic acid) : In-vitro Study on Release of Gentamicin Sulfate. *Chem. Biochem. Eng. Q.* **25**, 471–482 (2012).
147. Yuan, Y. & Lee, T. R. Contact Angle and Wetting Properties. *Surf. Sci. Tech.* 3–34 (2013).
148. Luo, C. J., Stoyanov, S. D., Stride, E., Pelan, E. & Edirisinghe, M. Chem Soc Rev Electrospinning versus fibre production methods : from specifics to technological convergence. 4708–4735 (2012). doi:10.1039/c2cs35083a
149. Tan, L., Gan, L., Hu, J., Zhu, Y. & Han, J. Functional shape memory composite nanofibers with graphene oxide filler. *Compos. PART A* (2015). doi:10.1016/j.compositesa.2015.04.015
150. Ke, P., Jiao, X., Ge, X., Xiao, W. & Yu, B. From macro to micro : structural biomimetic materials by electrospinning. *RSC Adv.* **4**, 39704–39724 (2014).

151. Zehetmeyer, G. *et al.* Biodegradable and antimicrobial films based on poly(butylene adipate-co-terephthalate) electrospun fibers. *Polym. Bull.* **74**, 3243–3268 (2017).
152. Díez-Pascual, A. M. & Díez-Vicente, A. L. Antimicrobial and sustainable food packaging based on poly(butylene adipate-co-terephthalate) and electrospun chitosan nanofibers. *RSC Adv.* **5**, 93095–93107 (2015).
153. Prasad, T., Shabeena, E. A., Vinod, D., Kumary, T. V. & Anil Kumar, P. R. Characterization and in vitro evaluation of electrospun chitosan/polycaprolactone blend fibrous mat for skin tissue engineering. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **26**, 28 (2015).
154. Chagas, G. R. & Weibel, D. E. UV-induced switchable wettability between superhydrophobic and superhydrophilic polypropylene surfaces with an improvement of adhesion properties. *Polym. Bull.* **74**, 1965–1978 (2017).
155. Agarwal, S., Greiner, A. & Wendorff, J. H. Functional materials by electrospinning of polymers. *Prog. Polym. Sci.* **38**, 963–991 (2013).
156. CDC National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases. Available at: <https://www.cdc.gov/ecoli/index.html>. (Accessed: 1st January 2017)
157. Torres-Giner, S., Martínez-Abad, A., Gimeno-Alcañiz, J. V., Ocio, M. J. & Lagaron, J. M. Controlled Delivery of Gentamicin Antibiotic from Bioactive Electrospun Polylactide-Based Ultrathin Fibers. *Adv. Eng. Mater.* **14**, B112–B122 (2012).
158. Doern, G. V & Tubert, T. A. In vitro activities of 39 antimicrobial agents for *Branhamella catarrhalis* and comparison of results with different quantitative susceptibility test methods. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**, 259–261 (1988).
159. Alves, E. G. *et al.* Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. *Quim. Nova* **31**, 1224–1229 (2008).
160. 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).
161. Thomé, I. P. S. *et al.* Bactericidal low density polyethylene (LDPE) urinary catheters: Microbiological characterization and effectiveness. *Mater. Sci. Eng. C*

- 32**, 263–268 (2012).
162. Gupta, B., Anjum, N., Gulrez, S. K. H. & Singh, H. Development of antimicrobial polypropylene sutures by graft copolymerization. II. Evaluation of physical properties, drug release, and antimicrobial activity. *J. Appl. Polym. Sci.* **103**, 3534–3538 (2007).
 163. Halm, J. A., de Wall, L. L., Steyerberg, E. W., Jeekel, J. & Lange, J. F. Intraperitoneal Polypropylene Mesh Hernia Repair Complicates Subsequent Abdominal Surgery. *World J. Surg.* **31**, 423–429 (2007).
 164. Jacchetti, E., Tonazzini, I., Meucci, S., Beltram, F. & Cecchini, M. Microstructured polydimethylsiloxane membranes for peripheral nerve regeneration. *Microelectron. Eng.* **124**, 26–29 (2014).
 165. Bengani, L. C. & Chauhan, A. Extended delivery of an anionic drug by contact lens loaded with a cationic surfactant. *Biomaterials* **34**, 2814–2821 (2013).
 166. Chiellini, F., Ferri, M., Morelli, A., Dipaola, L. & Latini, G. Perspectives on alternatives to phthalate plasticized poly(vinyl chloride) in medical devices applications. *Prog. Polym. Sci.* **38**, 1067–1088 (2013).
 167. Nogueira, N., Conde, O., Miñones, M., Trillo, J. M. & Miñones, J. Characterization of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (PHEMA) contact lens using the Langmuir monolayer technique. *J. Colloid Interface Sci.* **385**, 202–210 (2012).