

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Flávia Gontijo da Silva

**DESENVOLVIMENTO DE NANOFIBRAS DE POLICAPROLACTONA  
INCORPORADAS COM NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO PARA  
ENCAPSULAMENTO DO ETEXILATO DE DABIGATRANA**

Belo Horizonte

2019

UFMG/ICEx/DQ 1.361<sup>o</sup>  
D.740<sup>a</sup>

Flávia Gontijo da Silva

**DESENVOLVIMENTO DE NANOFIBRAS DE POLICAPROLACTONA  
INCORPORADAS COM NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO PARA  
ENCAPSULAMENTO DO ETEXILATO DE DABIGATRANA**

Dissertação apresentada ao Departamento de  
Química do Instituto de Ciências Exatas da  
Universidade Federal de Minas Gerais como  
requisito parcial para a obtenção do grau de  
Mestre em Química – Química Inorgânica.

Belo Horizonte  
2019

Ficha Catalográfica

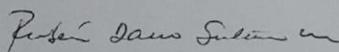
S586d Silva, Flávia Gontijo da  
2019 Desenvolvimento de nanofibras de policaprolactona  
D incorporadas com nanopartículas de óxido de zinco para  
encapsulamento do etexilato de dabigatrana  
[manuscrito] / Flávia Gontijo da Silva. 2019.  
[vi], 73 f. : il.  
Orientador: Rubén Dario Sinisterra Millan.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Minas Gerais - Departamento de Química.  
Inclui bibliografia.  
1. Química inorgânica - Teses 2. Fármacos - Teses  
3. Anticoagulantes - Teses 4. Preparações de liberação  
controlada - Teses 5. Microscopia eletrônica - Teses  
6. Nanopartículas - Teses I. Sinisterra Millan, Rubén  
Dario, Orientador II. Título.  
CDU 043.000

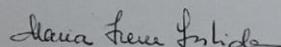
Elaborada pela Biblioteca do Departamento de Química - UFMG

**"Desenvolvimento de Nanofibras de Policaprolactona Incorporadas com Nanopartículas de Óxido de Zinco para Encapsulamento do Etxilato de Dabigatrana"**

**Flávia Gontijo da Silva**

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

  
Prof. Rubén Dario Sinisterra Millán - Orientador  
UFMG

  
Prof. Maria Irene Yoshida  
UFMG

  
Prof. Fabiano Vargas Pereira  
UFMG

Belo Horizonte, 31 de julho de 2019.

## **DEDICATÓRIA**

Aos genes estranhos da minha família, que atrapalham nossa circulação, mas inspiraram essa dissertação.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me guiado até o maravilhoso mundo da Química.

Aos meus pais por terem me educado e me ensinado os valores que me fizeram alcançar tantas conquistas. Especialmente à minha mãe, obrigada pela compreensão, pela paciência e pelo apoio não só durante o mestrado, mas em todos os anos de minha formação. Obrigada por rezar por todo equipamento estragado e experimento difícil e me ajudar a ter calma e a ser persistente.

Aos meus irmãos por serem meus maiores exemplos de esforço e dedicação. Sou muito grata a vocês por sempre terem ajudado a cuidar de mim, permitindo que eu pudesse seguir meus sonhos.

Ao Pablo por ser colega de curso e de profissão, amigo e, na reviravolta mais louca desse mestrado, namorado. Obrigada por me ajudar com a analítica, ser meu companheiro de almoço, meu parceiro de batata e me trazer paz, no mestrado e na vida.

Ao professor Rubén pela orientação nesses quatro anos, desde a graduação até o mestrado. Obrigada por ter aceitado esse desafio e confiado no meu potencial quando escolhi esse tema. Sou muito grata por tudo que aprendi e pela oportunidade de trabalhar em seu grupo.

Aos meus colegas do LEMB, em especial Alexa, Alinne, Ana Paula, Ana Délia e Isabela. Obrigada por toda a ajuda, pelas conversas e momentos ótimos.

À prof<sup>a</sup>. Esperanza pela atenção e ajuda na compreensão biológica deste trabalho.

Ao professor Ricardo pela disposição e ajuda com o UPLC.

À Marina pela ajuda e paciência com os (muitos) experimentos no UPLC, pela atenção e carinho com minhas dúvidas e pela parceria nessa reta final do mestrado.

A todos do Projeto 1000 Futuros Cientistas, em especial Janaína e Karen. Obrigada pela oportunidade de participar desse projeto incrível que, certamente, é uma das melhores experiências que vivi no DQ.

Aos amigos que a Química me trouxe, pelo companheirismo e momentos de alegria durante esses quase 8 anos de DQ, Izadora, Thaylice, Livinha, Capruni, Thérèse, Larissa, Davyston, Diego, Rubens e Jorge.

A todos os funcionários do Departamento de Química por fornecerem a infraestrutura necessária para a realização desse trabalho. Em especial ao Seu Luis e à Carla por todos os “bons dias” carinhosos.

A Kelly, Marco Túlio e Mari da Escola de Veterinária pela ajuda com o sangue de coelho.

Ao professor Rochel por continuar sendo um mentor na química e nas questões filosóficas da vida.

Aos meus amigos que estiveram comigo desde antes da minha jornada com a Química. Dadab, Bru, Aninha, Lanzinho, Poly, Zi, Mandinha, Lê, Lili e Uilly. Obrigada por sempre torcerem por mim.

À Mari, amiga querida que Liverpool me trouxe, pelo companheirismo de sempre.

À Ívina por ter me ensinado há mais de 10 anos que “Química é tudo”. Obrigada por ser professora, mentora, inspiração e, principalmente, amiga.

Ao Programa Bom Aluno por ter me oferecido a melhor formação acadêmica e pessoal possível. Obrigada por me ensinar que sonhos são possíveis e que “sonho sem ação é só sonho e ação sem sonho é só passatempo”.

To my dear Teacher, Fátima, who taught me not only English, but also how to be brave, two essential skills for the success of this work. Thank you for always believing in me.

Às agências de fomento CAPES, FAPEMIG e CNPq pelo fornecimento de recursos para a realização desse trabalho.

Nestes tempos em que a ignorância reina,  
fazer ciência é um ato de revolução.

## RESUMO

Doenças cardiovasculares são as principais causas de mortes no mundo. Os principais tratamentos para esses distúrbios envolvem o uso de implantes cardiovasculares e anticoagulantes. Neste trabalho, foi proposto um novo sistema para encapsulamento do fármaco etexilato de dabigatrana (DBG), baseado em nanofibras de policaprolactona (PCL) produzidas por eletrofiação. Além disso, nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) produzidas pelos métodos de coprecipitação e hidrotérmico foram incorporadas às nanofibras. A análise por microscopia eletrônica mostrou que ambos os métodos levaram à formação de nanopartículas de ZnO na forma wurzita com diâmetros médios variando de 33 a 48 nm e nanofibras uniaxiais com diâmetros de 225 a 350 nm. A análise térmica dos materiais evidenciou que as nanofibras são mais termicamente estáveis que o fármaco puro e os resultados de ângulo de contato mostraram que o fármaco aumenta a hidrofilia das nanofibras de PCL. Os estudos quantitativos mostraram que o processo de eletrofiação leva ao encapsulamento de cerca de 85% do DBG e que a liberação do fármaco em meio aquoso ocorre por difusão da matriz polimérica. Os testes de viabilidade celular e de hemocompatibilidade mostraram que as nanofibras contendo o DBG são não citotóxicas e não provocam a hemólise nem a coagulação do sangue.

Palavras chave: Anticoagulantes. Dabigatrana. Nanofibras. Nanopartículas de óxido de zinco. Liberação de fármacos.

## ABSTRACT

Cardiovascular diseases are the leading cause of death in the world. The main treatments for these disorders involve the use of cardiovascular implants and anticoagulants. In this work, a new system for the encapsulation of dabigatran etexilate (DBG), based on polycaprolactone nanofibers (PCL) produced by electrospinning was proposed. In addition, zinc oxide (ZnO) nanoparticles produced by the coprecipitation and hydrothermal methods were incorporated into the nanofibers. Electron microscopy showed that both methods led to the formation of ZnO nanoparticles in the Wurzite form with diameters varying from 33 to 48 nm and uniaxial nanofibers with diameters of 225 to 350 nm. Thermal analysis of the materials showed that the nanofibres are more thermally stable than the pure drug and the contact angle results showed that the drug increases the hydrophilicity of PCL nanofibers. Quantitative studies showed that the electrospinning process led to a drug loading of about 85% and that the drug release in aqueous media occurred by diffusion of the DBG from the polymer matrix. Cell viability and hemocompatibility tests indicated that the nanofibers containing the DBG are non-cytotoxic and do not cause hemolysis or blood coagulation.

**Key-words:** Anticoagulants. Dabigatran. Nanofibers. Zinc oxide nanoparticles. Drug delivery.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação simplificada da cascata de coagulação.....	19
Figura 2. Representação da conversão do mesilato de etexilato de dabigatrana em dabigatrana. ....	23
Figura 3. Representação da trombina e da ação da dabigatrana na sua inibição. ....	24
Figura 4. Ação do Idarucizumab impedindo a ação da dabigatrana.....	25
Figura 5. Esquema do processo de eletrofiação para geração de nanofibras e distribuição de forças no cone de Taylor.....	26
Figura 6. Reação simplificada da síntese da policaprolactona.....	29
Figura 7. Representação do processo de extração do princípio ativo DBG do medicamento Pradaxa. ....	34
Figura 8. Representação das montagens das sínteses por coprecipitação e hidrotérmica das nanopartículas de ZnO. ....	35
Figura 9. Representação do processo de eletrofiação utilizado no preparo de nanofibras. ....	36
Figura 10. Difractogramas de raios X das nanopartículas de ZnO obtidas pelos métodos de coprecipitação (ZnOCP) e hidrotérmico (ZnOH). ....	44
Figura 11. Espectros de absorção na região do infravermelho das nanopartículas de ZnO obtidas pelos métodos de coprecipitação (ZnOCP) e hidrotérmico (ZnOH). ....	45
Figura 12. Curvas TG das nanopartículas de ZnO obtidas pelos métodos de coprecipitação (ZnOCP) e hidrotérmico (ZnOH) em atmosfera de N <sub>2</sub> , com razão de aquecimento 10°C/min de 30°C a 700°C.....	45
Figura 13. Difractogramas de raios-X das nanopartículas de ZnO obtidas pelos métodos de coprecipitação (ZnOCP) e hidrotérmico (ZnOH) após aquecimento até 700°C em atmosfera de N <sub>2</sub> , com razão de 10°C/min. ....	46
Figura 14. Micrografias obtidas por MET nas nanopartículas ZnOH (a,b) e ZnOCP (d,e) e suas respectivas distribuições de tamanho (c,d). ....	47
Figura 15. Micrografias obtidas por MEV das nanofibras de PCL (FPCL), PCL com nanopartículas ZnOH (FZnO-H), PCL com nanopartículas ZnOCP (FZnO-C), PCL com DBG (FDBG), PCL com nanopartículas ZnOH e DBG (FZHD) e PCL com nanopartículas ZnOCP e DBG (FZCD). ....	48
Figura 16. Valores de diâmetros das nanofibras de PCL (FPCL), PCL com nanopartículas ZnOH (FZnO-H), PCL com nanopartículas ZnOCP (FZnO-C), PCL com DBG (FDBG), PCL com nanopartículas ZnOH e DBG (FZHD) e PCL com nanopartículas ZnOCP e DBG (FZCD). ....	49

Figura 17. Micrografias obtidas por MET das nanofibras FZnO-H e FZnO-C. ....	49
Figura 18. Curvas TG das nanofibras em atmosfera de N <sub>2</sub> , com razão de aquecimento 10°C/min de 30°C a 700°C. ....	51
Figura 19. Curvas DTA das nanofibras em atmosfera de N <sub>2</sub> , com razão de aquecimento 10°C/min de 30°C a 700°C. ....	51
Figura 20. Difratoogramas de raios X das nanofibras de PCL (FPCL), PCL com nanopartículas ZnOH (FZnO-H), PCL com nanopartículas ZnOCP (FZnO-C), PCL com DBG (FDBG), PCL com nanopartículas ZnOH e DBG (FZHD) e PCL com nanopartículas ZnOCP e DBG (FZCD). ....	52
Figura 21. Espectro de absorção do infravermelho do DBG na região de 4000 a 500 cm <sup>-1</sup> . ....	53
Figura 22. Espectros de absorção na região do infravermelho das nanofibras de PCL (FPCL), com ZnOH (FZnO-H), ZnOCP (FZnO-C), DBG (FDBG), nanopartículas ZnOH e DBG (FZHD) e nanopartículas ZnOCP e DBG (FZCD) na região de (a) 4000-500 cm <sup>-1</sup> e (b) 1800-500 cm <sup>-1</sup> . ....	54
Figura 23. Valores dos ângulos de contato de uma gota de água com a superfície das nanofibras 1 segundo e 1 minuto após gotejamento. ....	55
Figura 24. Ilustração da absorção de uma gota de água com a superfície das nanofibras que contêm o fármaco DBG. ....	55
Figura 25. Representação do íon pai do DBG e dos fragmentos quantificador (m/z 289) e qualificador (m/z 435). ....	56
Figura 26. Curva de calibração para quantificação do DBG com o método desenvolvido no UPLC. ....	57
Figura 27. Perfil de liberação do DBG presente nas nanofibras em PBS em escala de (a) 100% e (b) 15%. ....	59
Figura 28. Efeito do metanol na exatidão da quantificação de DBG partindo de uma solução 100% metanol e outra 100% água. ....	59
Figura 29. Perfil de liberação do DBG presente nas nanofibras em solução PBS/metanol 1:1 em escala de (a) 100% e (b) 15%. ....	60
Figura 30. Cinética de liberação do DBG a partir das nanofibras F <sub>DBG</sub> pelo modelo de Higuchi. ....	62
Figura 31. Cinética de liberação do DBG a partir das nanofibras F <sub>ZHD</sub> pelo modelo de Higuchi. ....	62
Figura 32. Ensaio de MTT com células L929 das nanofibras, do DBG e das nanopartículas de ZnO. ....	63
Figura 33. Valores de taxa de hemólise para as nanofibras. ....	64
Figura 34. Resultados do teste de anticoagulação para as nanofibras. ....	65

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades dos NAODs .....	22
Tabela 2. Códigos das nanofibras produzidas de acordo com a presença do fármaco DBG e das nanopartículas de ZnO .....	36
Tabela 3. Propriedades físico-químicas das nanopartículas de ZnO .....	43
Tabela 4. Atribuições de grupos funcionais correspondentes aos números de onda dos espectros de absorção das nanopartículas de ZnO. ....	44
Tabela 5. Resultados da Análise Térmica dos materiais.....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVC – Acidente Vascular Cerebral	OMS – Organização Mundial de Saúde
AVK – Antagonista de vitamina K	P(LLA-CL) – poli(L-lático)-co-poli(ε-caprolactona)
DBG – Etxilato de dabigatrana	PBS – Tampão Fosfato-Salino
DMEM – meio Eagle modificado por Dulbecco	PCL – Policaprolactona
DRX – Difração de Raios X	PEO – poli(oxietileno)
DTA – Análise Térmica Diferencial	PET – Terftalato de polietileno
DTG – Termogravimetria Derivada	PgP – poli(ácido lático-co-ácido glicólico)- <i>graft</i> -polietilenimina
ELS – Espalhamento de Luz Eletroforético	PLGA – poli(ácido lático – co – ácido glicólico)
EMA – Agência Europeia de Medicamentos	PU – Poliuretano
ePTFE – Politetrafluoretileno	RAP– Receptores Ativos por Protease
FDA – Food and Drug Administration	TG – Termogravimetria
FTIR-ATR – Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho por Reflectância Total Atenuada	TVP – Trombose Venosa Profunda
GRAS – Substância Geralmente Reconhecida como Segura	UPLC – Cromatografia Líquida de Ultra Desempenho
HBPM – Heparinas de Baixo Peso Molecular	
MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão	
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura	
MTT – brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio	
NAOD – Novo anticoagulante oral direto	

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
<b>3.</b>	<b>CONCEITOS GERAIS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>19</b>
3.1.	DOENÇAS CARDIOVASCULARES .....	19
3.2.	ANTICOAGULANTES .....	21
3.3.	DABIGATRANA .....	23
3.4.	NANOFIBRAS POLIMÉRICAS .....	26
3.5.	POLICAPROLACTONA .....	29
3.6.	NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO.....	31
<b>4.</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>33</b>
4.1.	MATERIAIS .....	33
4.2.	MÉTODOS .....	34
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>43</b>
5.1.	EXTRAÇÃO DO DBG .....	43
5.2.	SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE ZNO .....	43
5.3.	NANOFIBRAS.....	47
5.5.	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ETEXILATO DE DABIGATRANA NAS FIBRAS .....	57
5.6.	CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DE DO ETEXILATO DE DABIGATRANA <i>IN VITRO</i> .....	58
5.7.	TESTE DE CITOTOXICIDADE .....	63
5.8.	TESTE DE HEMÓLISE .....	64
5.9.	TESTE DE ANTICOAGULAÇÃO .....	64
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>65</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>66</b>

## 1. Introdução

Doenças cardiovasculares são distúrbios que envolvem o coração e os vasos sanguíneos. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças cardiovasculares são a principal causa de mortes no mundo, sendo responsáveis por 17.9 milhões de óbitos por ano. O enfarte agudo do miocárdio, o acidente vascular cerebral (AVC), a aneurisma da aorta e a trombose venosa são exemplos desses distúrbios. <sup>1</sup> Essas doenças estão geralmente associadas à formação indevida de coágulos. A coagulação é uma resposta natural do corpo diante do rompimento de vasos sanguíneos. Apesar de ser essencial à vida, pois evita hemorragias, quando esse processo ocorre de maneira inadequada, ele pode levar a uma produção exagerada de coágulos, cumulando em doenças cardiovasculares. <sup>2</sup>

A cirurgia de revascularização, utilizando implantes cardiovasculares, é o tratamento indicado quando as doenças envolvem o estreitamento ou a oclusão dos vasos sanguíneos. <sup>3</sup> Esses implantes são geralmente feitos de politetrafluoretileno (ePTFE), tereftalato de polietileno (PET) e poliuretano (PU). No entanto, esses materiais não são adequados para a substituição de vasos de pequeno diâmetro. <sup>4</sup> Outro problema relacionado à cirurgia de revascularização é a alta incidência de complicações pós-operatórias, envolvendo a cascata da coagulação, como trombose e estenose. <sup>5</sup> Isso gera a necessidade da administração de anticoagulantes após o procedimento.

Os anticoagulantes são os fármacos utilizados para prevenir e tratar a formação desses coágulos. O anticoagulante oral mais utilizado é a varfarina, um fármaco que interrompe a cascata de coagulação inibindo a produção de vitamina K. A forma reduzida da vitamina K é um cofator na síntese de importantes fatores de coagulação, dessa forma, quando sua produção é inibida, a formação de coágulos é evitada. <sup>6</sup> Apesar de ser um medicamento eficaz, existem diversos problemas associados ao uso da varfarina, o mais preocupante sendo o elevado índice de hemorragias. Além disso, a concentração do fármaco no plasma pode ser afetada por muitos fatores, como alimentação, peso, gênero e interações medicamentosas. Isso gera a necessidade de que os pacientes sejam constantemente monitorados, sendo imperativa a realização de exames de sangue periódicos. <sup>7</sup>

O desenvolvimento de novos anticoagulantes orais diretos (NAODs) foi estimulado, então, devido à necessidade de suprir os problemas associados ao uso da varfarina. As principais vantagens dos NAODs em relação à varfarina são seu perfil farmacocinético previsível, dosagem fixa, ação local rápida e menos interações alimentares e medicamentosas. <sup>8</sup> Esses fármacos apresentam uma eficácia de anticoagulação igual ou superior à varfarina, além de serem mais seguros em relação à hemorragia. Devido a esses benefícios,

muitos médicos já recomendam a substituição do uso da varfarina por NAODs, de modo que a demanda por esses fármacos tende a aumentar cada vez mais.<sup>9</sup>

Um dos NAODs já utilizado na prevenção de trombos é o mesilato de etexilato de dabigatrana (DBG), um inibidor direto de trombina, um dos principais agentes na coagulação sanguínea. Apesar de apresentar diversas vantagens em relação a outros anticoagulantes, a biodisponibilidade oral do etexilato de dabigatrana é muito baixa (~8%), o que faz com que as doses diárias do medicamento sejam elevadas (~300mg), aumentando o risco de hemorragia.<sup>10</sup> Sendo assim, existe a necessidade de se desenvolver sistemas que permitam o aumento da biodisponibilidade do fármaco e sua melhor e mais eficiente liberação no organismo.

Uma estratégia para aumentar a biodisponibilidade e promover a liberação controlada do fármaco é o seu encapsulamento em sistemas que permitam um maior controle do tempo de liberação e da concentração das doses do fármaco, bem como um controle de seu local de atuação, visando aperfeiçoar o efeito terapêutico do princípio ativo.<sup>11</sup> Nanofibras de polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, como a policaprolactona (PCL), são indicadas para o desenvolvimento desses sistemas pela possibilidade de serem utilizadas tanto como implantes vasculares quanto como matrizes para a liberação controlada do fármaco.<sup>4</sup> Outra proposta interessante é a associação desses sistemas poliméricos com materiais inorgânicos, como o óxido de zinco (ZnO). As partículas de ZnO podem alterar as propriedades físico-químicas do sistema, melhorando a liberação do fármaco e podem auxiliar na ação fisiológica das nanofibras.<sup>12</sup>

Assim, neste trabalho relatamos um novo sistema para o encapsulamento e liberação do DBG e avaliamos seu potencial uso no tratamento de doenças cardiovasculares.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo Geral

O objetivo principal deste trabalho é a preparação de nanofibras de PCL para o encapsulamento do DBG, além da avaliação da influência da presença de nanopartículas de ZnO nas propriedades e no desempenho desse material como um sistema de liberação.

### 2.2. Objetivos específicos

- Preparar as nanopartículas de ZnO pelos métodos de coprecipitação e hidrotérmico.
- Preparar as nanofibras de PCL pelo método de eletrospinning na presença e ausência do fármaco DBG e das nanopartículas de ZnO.
- Caracterizar morfologicamente e fisico-quimicamente as nanopartículas e as nanofibras.
- Fazer o estudo cinético da liberação do DBG a partir das nanofibras poliméricas e nanofibras poliméricas incorporadas com nanopartículas de ZnO.
- Avaliar a citotoxicidade e a hemocompatibilidade das nanofibras produzidas.

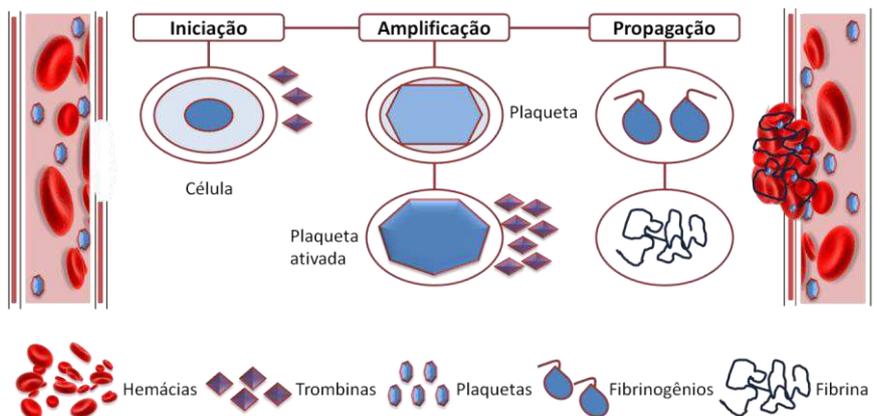
### 3. Conceitos Gerais e Revisão Bibliográfica

#### 3.1. Doenças cardiovasculares

A coagulação sanguínea é um fenômeno natural de defesa do organismo em que é formado um coágulo para impedir hemorragia. Em situações normais, o coágulo é dissolvido naturalmente pelo organismo depois que a ferida é curada. No entanto, em situações anormais, o coágulo pode se formar dentro dos vasos sanguíneos sem motivo aparente ou não se dissolver após um ferimento. A formação de coágulos, também conhecidos como trombos, pode causar enfermidades conhecidas como doenças cardiovasculares.

Quando um vaso sanguíneo sofre qualquer tipo de agressão, o organismo inicia um processo de homeostase, que evita o sangramento intenso, a partir da formação de um agregado de plaquetas ativadas, hemácias e fibrina, denominados trombos ou coágulos. A cascata de coagulação, representada na Figura 1, é um processo que envolve mais de 30 proteínas e tem como objetivo reparar o vaso.<sup>13</sup> Dessa maneira, qualquer alteração nessa resposta complexa do corpo pode formar trombos patológicos.

Figura 1. Representação simplificada da cascata de coagulação.



Fonte. Adaptado de Thrombosis Adviser<sup>14</sup>

Existem diversos fatores que podem favorecer a formação anormal de um trombo, como o sobrepeso, o uso de cigarros, o uso de hormônios contraceptivos, o repouso pós-cirúrgico e doenças hereditárias. Estudos também indicam uma propensão de gestantes e pacientes com câncer de desenvolverem uma trombose venosa (trombo na veia) que pode evoluir para uma embolia pulmonar (trombo no pulmão).<sup>15 16</sup> Sendo assim, em alguns casos, é possível prevenir a formação de coágulos, mas ainda assim existe a necessidade de tratamentos eficazes para esses distúrbios.

As terapias mais usadas no tratamento de trombos são os medicamentos trombolíticos, a trombólise dirigida por cateter, a trombectomia e os medicamentos anticoagulantes.<sup>17</sup> Os trombolíticos ou fibrinolíticos são medicamentos capazes de dissolver um coágulo e são usados principalmente no tratamento do enfarte do miocárdio e do AVC.<sup>18</sup> A trombólise dirigida por cateter também utiliza trombolíticos, que são administrados diretamente no local do coágulo via inserção cirúrgica de um cateter. Outro procedimento cirúrgico é a trombectomia, no qual o coágulo é mecanicamente removido. Finalmente, os anticoagulantes são medicamentos que interferem na cascata de coagulação e impedem a formação de novos coágulos. Dessa maneira, os anticoagulantes são os medicamentos mais indicados na prevenção de doenças cardiovasculares associadas à formação de trombos.

### 3.2. Anticoagulantes

Anticoagulantes, como já mencionado, são medicamentos capazes de impedir a formação de trombos. Eles são administrados a pacientes com elevado risco de produção de coágulos para prevenir condições graves, como derrames e enfartos.<sup>19</sup> Esses medicamentos podem ser prescritos em condições agudas, como após uma cirurgia, e em condições crônicas, como na prevenção de trombose venosa profunda (TVP) em pacientes com distúrbios de circulação.

O primeiro anticoagulante oral foi desenvolvido na década de 1940 por Karl Paul Link. O anticoagulante em questão era o dicumarol, um derivado da cumarina, extraído de feno apodrecido. Na década de 1950, a varfarina, desenvolvida pelo mesmo pesquisador, substituiu o uso do dicumarol, tornando-se o anticoagulante oral mais utilizado nos Estados Unidos e em outros países do mundo.<sup>20</sup> Esse fármaco age inibindo a carboxilação- $\gamma$  dos fatores de coagulação II, VII e IX, inibindo a enzima epóxido redutase. Como esses fatores de coagulação dependem da vitamina K, a varfarina é um anticoagulante “antagonista de vitamina K” (AVK).<sup>21</sup> Os anticoagulantes AVK são muito eficazes, mas apresentam uma janela terapêutica muito estreita e sua concentração no plasma pode variar bastante. Essa variação está relacionada ao fato de vários alimentos e medicamentos alterarem o comportamento farmacocinético e farmacodinâmico dos anticoagulantes AVK. Dessa maneira, o uso contínuo desses fármacos torna-se problemático, necessitando-se de um monitoramento periódico da coagulação e controle rigoroso da dosagem. Os principais problemas relacionados ao uso desses medicamentos são casos de hemorragia (superdosagem) e recorrência de eventos trombóticos (subdosagem).<sup>22</sup> Considerando que o uso da varfarina pode ser agudo, tratamento de dias ou semanas, ou crônico, meses ou anos, as dificuldades associadas ao seu uso levaram a pesquisas que culminaram em novos anticoagulantes.<sup>7</sup>

Os primeiros anticoagulantes, diferentes da varfarina, a serem aprovados foram as heparinas de baixo peso molecular (HBPM), inibidores indiretos do fator Xa e inibidores diretos de trombina. Esses fármacos apresentam vantagens em relação à varfarina, mas somente podem ser administrados via parenteral

(injeções) o que dificulta seu uso em tratamentos crônicos. <sup>23</sup> Mais recentemente, novos anticoagulantes orais diretos (NAODs) foram desenvolvidos e apresentam vantagens significativas, como doses fixas, ação rápida, menos interações alimentares e medicamentosas e não necessidade de constante monitoramento. Os NAODs disponíveis no mercado são a rivaroxabana, a apixabana, a edoxabana e a dabigatrana. <sup>8</sup> A Tabela 1 resume as principais propriedades desses fármacos.

**Tabela 1. Propriedades dos NAODs**

NAOD	Alvo	Interação alimentar	T <sub>máx</sub>	Biodisponibilidade oral	Aprovação FDA
Rivaroxabana	FXa	Reduz absorção	2,5-4h	>80%	2011
Apixabana	FXa	Não reportado	3h	>50%	2012
Edoxabana	FXa	Não reportado	1-5h	~62%	2015
Dabigatrana	FIIa	Reduz absorção	2h	~8%	2010

**Nota 1.** T<sub>máx</sub> - tempo para concentração máxima no plasma; **Nota 2.** FXa - fator Xa , FIIa - fator IIa (trombina);

**Nota 3.** US FDA – Food and Drug Administration

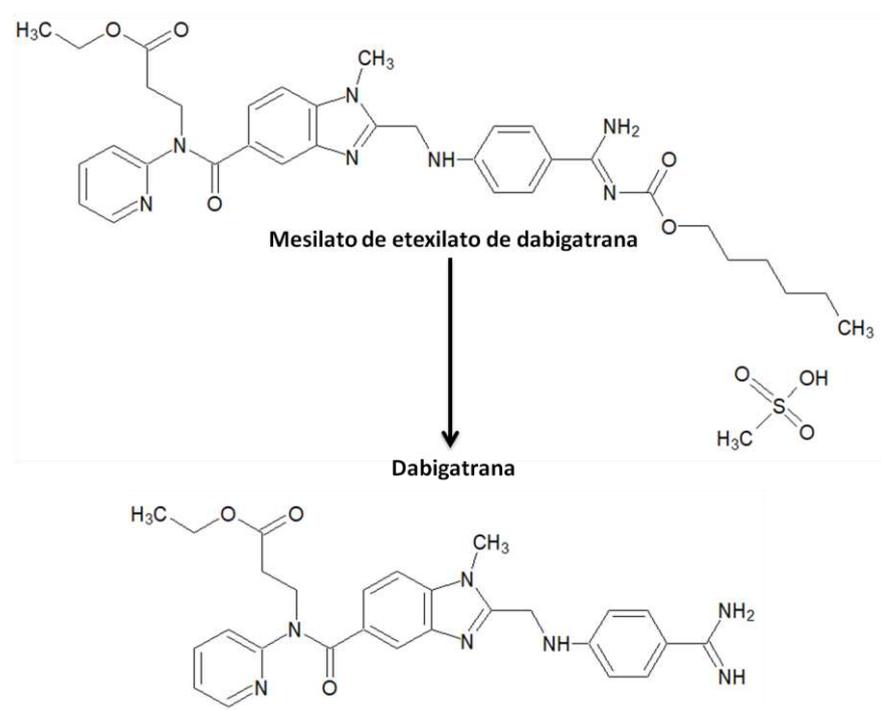
**Fonte.** Adaptado de Cohen *et al*<sup>24</sup> e Fontana *et al*<sup>8</sup>

A principal vantagem desses quatro NAODs é a redução de ocorrência de hemorragias quando comparado com a varfarina. Estudos mostram que o uso de NAODs reduziu em quase 70% a ocorrência de hemorragias intracranianas e fatais, 40% de hemorragias graves e 20% de hemorragias com relevância clínica. <sup>24</sup> Sendo assim, esses novos fármacos apresentam uma possibilidade promissora para o tratamento eficaz e seguro de doenças cardiovasculares. Novas pesquisas e testes clínicos visam aprimorar o uso desses anticoagulantes no intuito de substituir medicamentos como a varfarina, que foram a única opção durante os últimos 60 anos.<sup>20</sup> É importante destacar que cada um desses NAODs apresenta características distintas e diferentes mecanismos de ação, sendo interessante a seleção de um único fármaco para estudos aprofundados.

### 3.3. Dabigatrana

A dabigatrana foi escolhida no presente trabalho por ser o primeiro NAOD a ser comercializado, demonstrando-se mais seguro e eficaz no tratamento de fibrilação atrial e igualmente seguro e eficaz para eventos tromboembólicos venosos, quando comparado à varfarina.<sup>25; 26</sup> A polaridade da dabigatrana não permite sua administração oral e, portanto, ela é comercializada como a pró-droga mesilato de etexilato de dabigatrana (DBG), sendo Pradaxa o seu nome comercial.<sup>27</sup> No organismo, o DBG é convertido na dabigatrana, como representado na Figura 2.

**Figura 2.** Representação da conversão do mesilato de etexilato de dabigatrana em dabigatrana.

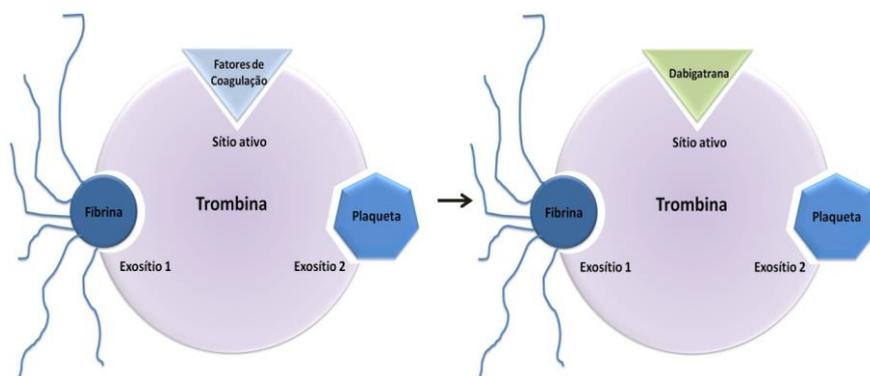


Fonte. Autora.

A dabigatrana atua na cascata de coagulação inibindo a trombina, em um mecanismo competitivo, específico, dependente da concentração e reversível. O fármaco inibe tanto a trombina livre quanto a trombina presente no coágulo,

impedindo a conversão de fibrinogênio em fibrina, uma etapa importante na formação do trombo. A Figura 3 mostra uma representação da atuação da dabigatrana. A trombina, além de ter um papel essencial na coagulação sanguínea, também induz diferentes efeitos celulares por meio de receptores ativados por protease (RAP). A ação desses sinalizadores no organismo está ligada a diversos processos, como o de inflamação e infecção, fibrose e na proliferação de células cancerosas. Dessa maneira, alguns estudos já foram feitos sobre a ação da dabigatrana em doenças não cardiovasculares, como aterosclerose, câncer e infecções com *Staphylococcus aureus*.<sup>27</sup>

**Figura 3.** Representação da trombina e da ação da dabigatrana na sua inibição.



Fonte. Adaptado de Comin *et al.*<sup>28</sup>

A reversibilidade da ação da dabigatrana é de extrema importância, pois a possibilidade de reverter o efeito de um anticoagulante está diretamente associada à sua segurança. Um paciente em constante uso de anticoagulantes está mais susceptível a hemorragias, por exemplo, um pequeno corte de papel demoraria mais a parar de sangrar para esse paciente do que para uma pessoa não anticoagulada. Sendo assim, em caso de traumas maiores é imprescindível que exista um antídoto que interrompa a ação do anticoagulante para que o paciente não tenha sangramentos intensos e, possivelmente, fatais. Entre os NAODs, a dabigatrana é o primeiro a ter um antídoto eficaz e já aprovado pela FDA e pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA), denominado idarucizumab, comercializado como Praxbind.<sup>29</sup>

**Figura 4.** Ação do Idarucizumab impedindo a ação da dabigatrana.



Fonte. Adaptado de Comin *et al.* <sup>28</sup>

A ação eficaz e segura da dabigatrana é, portanto, o que a torna um dos NAOs mais promissores na substituição da varfarina. No entanto, sua baixa biodisponibilidade oral (~8%) é uma das maiores limitações da disseminação de seu uso. Isso significa que cerca de 90% da dabigatrana ingerida é eliminada e não absorvida pelo organismo. Isso faz com que a dose do medicamento tenha que ser muito alta para manter o nível terapêutico no plasma. <sup>20</sup>

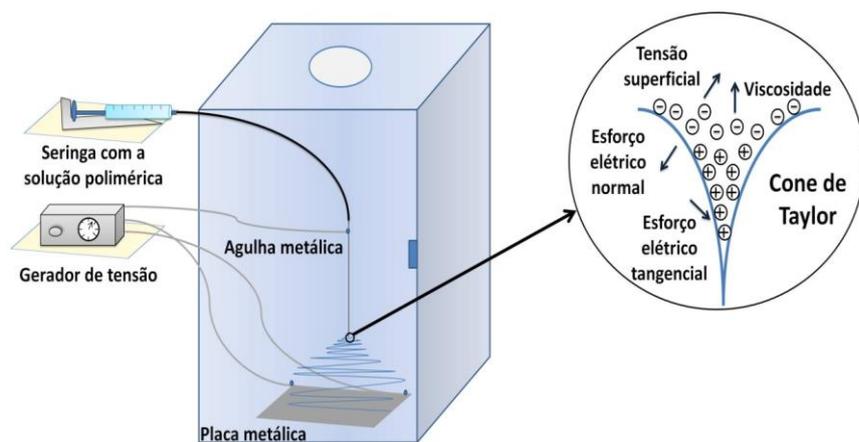
Poucos estudos foram realizados no intuito de melhorar a biodisponibilidade oral do fármaco ou criar novas formas de administração. Em 2016, Chai *et al.* publicou sobre um sistema de liberação autonanoemulsificante carregado com etxilato de dabigatrana. Quando testado em modelo animal, esse sistema apresentou um aumento significativo da biodisponibilidade oral da dabigatrana. <sup>30</sup> Em 2017, Zhang *et al.* mostrou uma abordagem diferente, publicando seu trabalho sobre um sistema de liberação sustentada do DBG a partir de uma formulação injetável. Nesse trabalho, foi desenvolvido um sistema lipídico de transição de fase *in situ* que apresentou efeito de anticoagulação por 7 dias em modelo animal. <sup>31</sup>

O potencial do uso do DBG associado à escassez de trabalhos envolvendo o fármaco mostra a necessidade de se explorar novos sistemas de encapsulamento e liberação para esse anticoagulante.

### 3.4. Nanofibras Poliméricas

Nanofibras poliméricas podem ser uma excelente matriz para o encapsulamento e a liberação de anticoagulantes como o DBG. Esses materiais são fibras ultra-finas de polímeros que apresentam características únicas, como elevada razão área superficial/volume, funcionalização superficial flexível e elevada performance mecânica.<sup>32</sup> O método mais utilizado para produzir nanofibras é a eletrospinação. Nesse método, uma solução do polímero é submetida a uma diferença de potencial elevada, que é responsável por esticar as cadeias poliméricas, formando as fibras de dimensão micro a nanométrica. Na Figura 5, pode-se observar a representação do equipamento de eletrospinação e a formação do cone de Taylor. Quando a gota de solução polimérica presente na ponta da agulha é submetida a uma diferença de potencial, cria-se um acúmulo de cargas nessa gota, gerando uma intensa repulsão eletrônica. Essas forças repulsivas são opostas à tensão superficial da solução, o que provoca o alongamento da gota, formando uma forma cônica conhecida como “cone de Taylor”. Todos os parâmetros do método, como polímero, solventes, fluxo de injeção, tensão, distância da agulha até a placa, influenciam na formação das nanofibras, além de efeitos externos, como umidade do ar e temperatura.<sup>33</sup>

**Figura 5.** Esquema do processo de eletrospinação para geração de nanofibras e distribuição de forças no cone de Taylor.



Fonte. Autora

Os principais tecidos do corpo humano (epitelial, conjuntivo, nervoso e muscular) apresentam fibras em escala micro ou nanométrica. Sendo assim, nanofibras poliméricas se assemelham a estruturas fisiológicas e, por isso, apresentam diversas possibilidades de aplicações biomédicas. Dentre essas aplicações, encontram-se a engenharia de tecidos, a liberação de fármacos e curativos.<sup>34</sup> Na engenharia de tecidos, as nanofibras são usadas como matriz (*scaffold*) já que conseguem mimetizar estruturas e funções biológicas. Suporte mecânico, propriedades superficiais favoráveis e biocompatibilidade são algumas das propriedades das nanofibras que as tornam atrativas para a engenharia de tecidos. Essas mesmas propriedades também fazem com que esses materiais sejam capazes de encapsular fármacos, podendo ser usados como sistemas de liberação controlada e/ou sustentada de diversos medicamentos. Já no uso de nanofibras como curativos, as principais propriedades envolvidas são suas estruturas porosas e flexíveis que podem ser bioabsorvidas pelo organismo.<sup>34; 35</sup>

Em relação à anticoagulantes, o uso de nanofibras é bastante versátil. Primeiramente, considerando que na engenharia de tecidos a fibra é inserida cirurgicamente e que processos cirúrgicos aumentam o risco de formação de trombos, seria interessante a presença de um anticoagulante na fibra. Dessa maneira, independente da função desse material no corpo, as complicações relacionadas a coágulos no seu uso seriam diminuídas ou evitadas. A mesma ideia se aplica no uso de nanofibras como curativos e suturas. Após um trauma com possibilidade de formação de coágulos, nanofibras contendo anticoagulantes poderiam ser utilizadas. Além disso, uma aplicação direta seria o uso de nanofibras como sistemas de liberação de anticoagulantes, no caso do tratamento de distúrbios cardiovasculares e prevenção de eventos tromboembólicos.

A busca por trabalhos envolvendo nanofibras e anticoagulantes na base do Web of Science resultou em cerca de 20 artigos, sendo o fármaco em questão a heparina. Um desses trabalhos foi desenvolvido por Bae *et al* mostra nanofibras poliméricas com moléculas de heparina imobilizadas na superfície, visando um efeito antitrombótico em suturas vasculares. Os polímeros utilizados foram o poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), o poli(oxietileno)

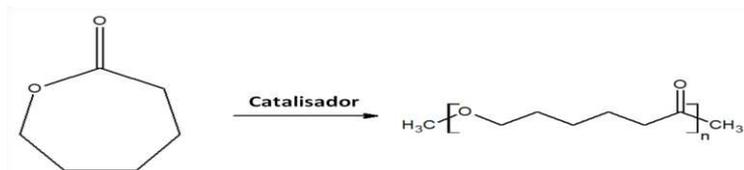
(PEO) e o copolímero poli(ácido lático-co-ácido glicólico)-*graft*-polietilenimina (PgP). Os resultados de tempo de liberação e tempo de coagulação foram promissores.<sup>5</sup> O trabalho de Zhai *et al.*, por sua vez, promoveu o encapsulamento da heparina em nanofibras de poli(L-lático)-co-poli( $\epsilon$ -caprolactona) (P(LLA-CL)) com liberação sustentada de cerca de duas semanas. Os resultados mostraram que o material tem potencial para ser usado em implantes cardiovasculares no reparo de vasos sanguíneos.<sup>36</sup> Um outro trabalho bastante interessante, por Janjic *et al.*, mostrou o uso de nanofibras de acetato de celulose incorporadas com heparina para recobrir estentes. Estentes são próteses expansíveis geralmente usadas no reparo ou reconstrução de artérias.<sup>37</sup>

Os trabalhos citados são exemplos das possíveis aplicações de nanofibras carregadas com um fármaco anticoagulante. No entanto, é evidente que a formação de nanofibras com NAODs, como o DBG, ainda não foi explorada pela comunidade científica. Isso significa que existem diversas possibilidades de novos sistemas de encapsulamento/liberação de NAODs e nanofibras. É importante, então, conhecer sobre os polímeros utilizados na produção de nanofibras para aplicações biomédicas e seus usos no tratamento de doenças cardiovasculares.

### 3.5. Policaprolactona

A policaprolactona (PCL) é um dos polímeros mais utilizados na formulação de biomateriais. O poliéster hidrofóbico e semicristalino é obtido a partir da polimerização da  $\epsilon$ -caprolactona, como mostrado na Figura 6. No corpo humano, o PCL é degradado por hidrólise, o que o torna biodegradável. O fato de o polímero ser hidrofóbico faz com que essa degradação seja lenta (2-5 anos), possibilitando seu uso em aplicações que exigem longos períodos de degradação. <sup>38; 39</sup>

**Figura 6.** Reação simplificada da síntese da policaprolactona.



Fonte. Autora

A boa solubilidade do PCL em diversos solventes orgânicos e a possibilidade de interação/encapsulamento de diferentes fármacos levaram ao uso desse polímero em sistemas de liberação, sendo aprovado pelo FDA e utilizado clinicamente desde a década de 1980. Na primeira década do século 21, no entanto, com a ascensão da engenharia de tecidos, o interesse pelo PCL se desviou para a produção de nanofibras. <sup>40</sup>

Uma das vantagens das nanofibras de PCL é que existem diversas possibilidades de modificação do material para adequar suas propriedades ao seu uso intencionado. Encapsulamento de extensa variedade de fármacos, modificação da superfície, acoplamento com outros polímeros e formação de compósitos com partículas inorgânicas são exemplos da versatilidade das nanofibras de PCL. No estado da arte, encontram-se trabalhos com diversas aplicações desses nanomateriais, não somente na engenharia de tecidos, mas também na produção de sistemas de liberação controlada de fármacos e curativos. <sup>41</sup> Em relação às doenças cardiovasculares, já existem alguns estudos que mostram o grande potencial das nanofibras de PCL, principalmente no seu uso como implantes.

Alguns trabalhos produziram e testaram fibras de PCL como implantes cardiovasculares, já que essas nanofibras apresentam um diâmetro adequado e são bioativas e não tóxicas para células endoteliais (interior dos vasos sanguíneos) e células musculares lisas (presente na parede de diversos órgãos). Yalcin *et al.*, produziu implantes tubulares de nanofibras de PCL, mostrando sua semelhança com estruturas vasculares e provando sua biocompatibilidade *in vitro*.<sup>4</sup> Em um estudo similar, Al Rez *et al.* produziu micro e nanofibras de PCL em diferentes condições, propondo seu uso na substituição de tecidos vasculares. Esse estudo também mostrou a adesão e integração celular na matriz polimérica, fatores essenciais em seu uso como implante.<sup>42</sup> Além disso, os trabalhos de Valence *et al.*,<sup>43</sup> Wang *et al.*,<sup>44</sup> Pektok *et al.*,<sup>45</sup> e Nottelet *et al.*<sup>46</sup> fizeram estudos *in vivo* de nanofibras de PCL como implantes vasculares, mostrando um efeito adequado de desobstrução dos vasos em longo prazo.

O uso de fibras de PCL para encapsulamento de fármacos com potenciais aplicações cardiovasculares também foi estudado. Rychter *et al.*, desenvolveu microfibras de PCL como um sistema de liberação do cilostazol. Esse fármaco inibe a agregação plaquetária, sendo indicado no tratamento de doença vascular periférica e na prevenção de AVCs.<sup>47</sup> Outro estudo que propôs o uso de nanofibras de PCL tanto como implantes quanto como sistemas de liberação foi o de Innocente *et al.* Nesse trabalho, foram produzidas próteses de nanofibras de PCL incorporadas com paclitaxel, um fármaco capaz de evitar o estreitamento dos vasos sanguíneos após a inserção de implantes. O estudo mostrou que o nanossistema foi capaz de gerar a liberação sustentada e lenta do fármaco e os experimentos *in vivo* indicaram o possível uso clínico desses implantes no futuro.<sup>48</sup> Esses trabalhos mostram a multifuncionalidade de fibras de PCL no tratamento de doenças cardiovasculares.

Além de seu uso individual ou incorporado com fármacos, também é possível explorar a adição de nanopartículas inorgânicas a nanofibras de PCL. A formação desses compósitos pode levar a uma melhora na eficiência do sistema ou a novas possibilidades de aplicação.

### 3.6. Nanopartículas de óxido de zinco

Nanopartículas de ZnO são reconhecidas pela comunidade científica pelas suas importantes aplicações biomédicas. Consideradas pelo FDA como Substância Geralmente Reconhecida como Segura (GRAS), as nanopartículas de ZnO apresentam propriedades antimicrobianas, anticancerosas e também podem ser utilizadas como sistemas de liberação de fármacos.<sup>49</sup>

As propriedades como tamanho, morfologia e características superficiais estão diretamente relacionadas ao método de síntese dessas nanopartículas. Existem diversos métodos para o preparo das nanopartículas de ZnO, uma revisão extensa feita por Kołodziejczak-Radzimska e Jesionowski cita mais de dez métodos de síntese e discute os mais utilizados.<sup>50</sup> Um dos métodos mais comuns é o de coprecipitação, no qual uma solução aquosa de um sal de zinco e uma solução básica, normalmente hidróxido de sódio ou amônia, são utilizadas como precursoras. Nesse método, a solução salina de zinco é mantida aquecida e sobre agitação enquanto a solução básica é adicionada gota a gota ao sistema. Na primeira fase do processo, é formado o hidróxido de zinco que posteriormente é convertido nas nanopartículas de ZnO. O precipitado formado é filtrado e levado à secagem. Concentração das soluções, temperatura de reação e temperatura de secagem são alguns dos parâmetros que influenciam nas propriedades das partículas produzidas.<sup>51</sup>

A síntese hidrotérmica, por sua vez, pode ser realizada com as mesmas soluções do método de coprecipitação. No entanto, nesse caso a reação ocorre em uma temperatura superior à temperatura de ebulição do solvente e a uma pressão maior que uma atmosfera (1 atm). A síntese geralmente ocorre em autoclaves que mantêm os parâmetros de reação controlados, sendo uma importante vantagem para a produção em larga escala de nanopartículas de ZnO.<sup>52</sup> Na formação de compósitos de nanofibras poliméricas com nanopartículas de ZnO, o método de síntese e, conseqüentemente, as propriedades das nanopartículas podem influenciar nas aplicações biomédicas do material.

No estado da arte, não foram encontrados trabalhos específicos sobre o uso de nanofibras contendo nanopartículas de ZnO para o tratamento de doenças

cardiovasculares. No entanto, alguns trabalhos demonstram o potencial uso desses materiais na engenharia de tecidos. Augustine *et al*, por exemplo, produziu nanofibras de PCL incorporadas com nanopartículas de ZnO com propriedades antibacterianas e de adesão celular. Em diferentes artigos, os autores investigaram o potencial uso dessas fibras em implantes, especialmente para regeneração dérmica.<sup>53; 54; 55; 56</sup> Esses trabalhos sugerem a possível aplicação dessas nanofibras na engenharia de tecidos. Assim o presente trabalho é uma contribuição para o estado da arte na área.

## 4. Parte experimental

### 4.1. Materiais

#### **Nitrato de zinco hexahidratado**

Fórmula molecular:  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Massa molar:  $297,49 \text{ g mol}^{-1}$

Fabricante: VETEC Brasil

#### **Acetato de zinco dihidratado**

Fórmula molecular:

$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Massa molar:  $219,50 \text{ g mol}^{-1}$

Fabricante: VETEC Brasil

#### **Hidróxido de sódio**

Fórmula molecular:  $\text{NaOH}$

Massa molar:  $39,99 \text{ g mol}^{-1}$

Fabricante: VETEC Brasil.

#### **Citrato de Sódio**

Fórmula molecular:

$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Massa molar:  $294,00 \text{ g mol}^{-1}$

Fabricante: Synth

#### **Mesilato de Etexilato de Dabigatrana**

Fórmula molecular:  $\text{C}_{35}\text{H}_{45}\text{N}_7\text{O}_8\text{S}$

Massa molar:  $723,84 \text{ g mol}^{-1}$

Fabricante: Adooq Bioscience

#### **Policaprolactona**

Fórmula molecular:  $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_2)_n$

Massa molar:  $43000\text{-}5000 \text{ Da}$

Fabricante: Polysciences

#### **Diclorometano**

Fórmula molecular:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$

Massa molar:  $84,93 \text{ g mol}^{-1}$

Fabricante: Synth

#### **Metanol**

Fórmula molar:  $\text{CH}_3\text{OH}$

Massa molecular:  $32,04 \text{ g mol}^{-1}$

Fabricante: Neon

## 4.2. Métodos

### 4.2.1. Extração do mesilato de etexilato de dabigatrana da formulação de Pradaxa

O DBG foi extraído pelo método líquido-líquido<sup>57</sup> da formulação comercial Pradaxa. A solubilidade do princípio ativo em solução de HCl e metanol <sup>58</sup> foi utilizada para a extração e separação dos excipientes <sup>59</sup>.

O conteúdo de 10 cápsulas de Pradaxa, cerca de 10 g, foi transferido a um almofariz e macerado. Em seguida, 50 mL de solução de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> foram adicionados ao pó e colocado sob agitação. Após uma hora, a mistura foi filtrada, o sólido descartado e o filtrado reservado. A esse filtrado foi adicionada gota a gota uma solução de NaOH 1 mol L<sup>-1</sup>, observando formação de precipitado. Essa segunda mistura foi novamente filtrada e o precipitado foi seco a 70°C. Após secagem, o precipitado foi solubilizado em metanol e deixado em agitação. Finalmente, o líquido foi centrifugado e seco em condições ambientes para obtenção do sólido final.

**Figura 7.** Representação do processo de extração do princípio ativo DBG do medicamento Pradaxa.



Fonte. Autora

### 4.2.2. Síntese do ZnO

#### CO-PRECIPITAÇÃO, ZnO<sub>CP</sub>

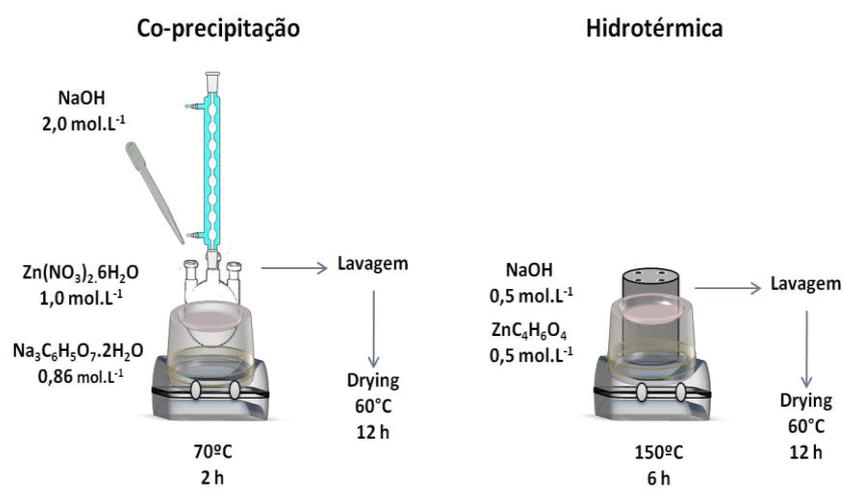
A síntese das nanopartículas de ZnO por co-precipitação foi realizada segundo metodologia previamente definida pelo grupo de pesquisa<sup>52</sup>. Resumidamente, uma solução de NaOH 2,0 mol L<sup>-1</sup> foi gotejada à uma solução de

$\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$   $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  contendo  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . A mistura foi mantida a  $70^\circ\text{C}$  por 2 horas com agitação magnética. Após o tempo de reação, o sólido obtido foi lavado por três vezes com água deionizada, utilizando uma ultracentrifuga ( $12000 \text{ rpm}$ ,  $10 \text{ min}$ ). Em seguida, o produto foi seco em estufa à vácuo a  $60^\circ\text{C}$  por 12 horas.

#### HIDROTÉRMICA, $\text{ZnO}_h$

A síntese hidrotérmica das nanopartículas de  $\text{ZnO}$  também foi realizada segundo metodologia previamente definida pelo grupo de pesquisa<sup>52</sup>. Nesse processo, soluções de  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  de  $\text{ZnC}_4\text{H}_6\text{O}_4$  e  $\text{NaOH}$  foram adicionadas a um recipiente de teflon, que foi colocado em uma autoclave. A autoclave foi mantida em banho de silicone a  $150^\circ\text{C}$  por 6 horas. Após o tempo de reação, o sólido obtido foi lavado por três vezes com água deionizada, utilizando uma ultracentrifuga ( $12000 \text{ rpm}$ ,  $10 \text{ min}$ ). Em seguida, o produto foi seco em estufa à vácuo a  $60^\circ\text{C}$  por 12 horas.

**Figura 8.** Representação das montagens das sínteses por coprecipitação e hidrotérmica das nanopartículas de  $\text{ZnO}$ .



#### 4.2.3. Preparo das nanofibras

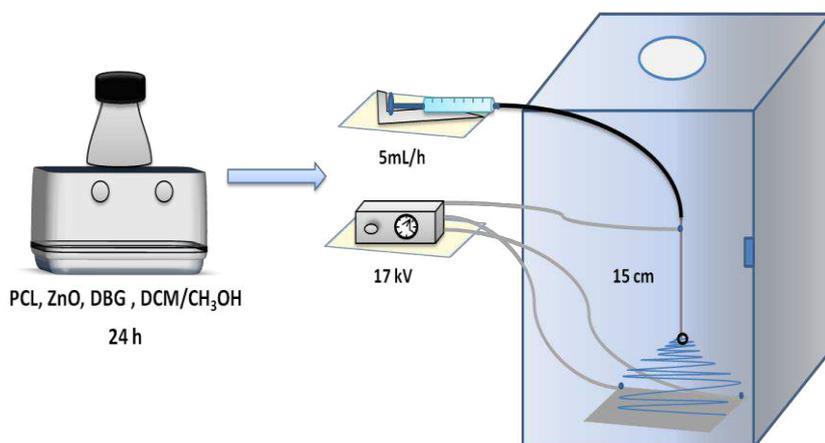
As nanofibras foram preparadas pelo método de eletrospinning<sup>60</sup>. Soluções de 8% m/v de PCL foram preparadas em uma mistura de diclorometano e metanol 1:1 e deixadas sob agitação por 24 horas. Os parâmetros foram padronizados para todas as fibras: fluxo de injeção da solução polimérica 5 mL/h, distância da agulha à placa 15 cm e tensão 17 kV. As fibras preparadas estão descritas na Tabela 1.

Comentado [RS1]: É 18 ou 17 kV, na Figura está diferente

**Tabela 2.** Códigos das nanofibras produzidas de acordo com a presença do fármaco DBG e das nanopartículas de ZnO

Fibra - Código	DBG	ZnO <sub>CP</sub>	ZnO <sub>H</sub>
F <sub>PCL</sub>	-	-	-
F <sub>ZnO-C</sub>	-	64 mg	-
F <sub>ZnO-H</sub>	-	-	64 mg
F <sub>DBG</sub>	15 mg	-	-
F <sub>ZCD</sub>	15 mg	64 mg	-
F <sub>ZHD</sub>	15 mg	-	64 mg

**Figura 9.** Representação do processo de eletrospinning utilizado no preparo de nanofibras.



Fonte. Autora

#### 4.2.4. Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV

As micrografias das nanofibras foram obtidas pelo microscópio eletrônico de varredura Quanta™ 3D FEG FEI com voltagem de aceleração de 20 kV do Centro de Microscopia da UFMG. Antes de se obter as imagens, todas as amostras foram revestidas com uma camada de carbono de espessura de 5 nm. As análises dos diâmetros médios das nanofibras obtidas foram determinadas a partir de 100 medições em 3 micrografias diferentes usando o ImageJ software de análise de imagem.

#### 4.2.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão

As micrografias das nanofibras e das nanopartículas de ZnO foram obtidas pelo microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-12 - SpiritBiotwin FEI com voltagem de aceleração de 120 kV do Centro de Microscopia da UFMG. Para a análise das fibras contendo nanopartículas, o processo de eletrofiliação foi feito sobre um porta amostra single tilt. Para a análise de nanopartículas de ZnO, foi preparada uma suspensão do sólido em etanol filtrado, que ficou em ultrassom por cinco minutos antes de ser depositada no porta amostras.

#### 4.2.6. Termogravimetria (TG/DTG) e análise térmica diferencial (DTA)

As curvas TG/DTG e DTA foram obtidas simultaneamente em equipamento de módulo termogravimétrico simultâneo TG/DTA Q600, (TA Instruments), sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> com vazão aproximada de 100 mL min<sup>-1</sup>, empregando cadinho de alumina e aquecimento de 30 °C a 700 °C a uma razão de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup>. Os dados obtidos foram tratados no programa OriginPro 7.0, OriginLab Corporation.

#### 4.2.7. Difractometria de Raios X (DRX)

Os difratogramas de raios-X foram obtidos no equipamento SHIMADZU modelo XRD-7000 X-ray Diffractometer do Departamento de Química da UFMG, utilizando um monocromador de cobre e radiação  $\text{CuK}\alpha = 1,54051$ , em ângulos de  $2\theta$  variando de 10 a 70 graus e velocidade de varredura de  $2\theta \text{ min}^{-1}$ . Os dados obtidos foram tratados utilizando o programa OriginPro 7.0, OriginLab Corporation.

#### 4.2.8. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho por Reflectância Total Atenuada (ATR-FTIR)

Os valores de absorção na região de  $4000\text{-}650 \text{ cm}^{-1}$  foram registrados em espectrofotômetro Perkin Elmer modelo Frontier do Departamento de Química da UFMG. Os dados foram tratados pelo programa ACD/SpecManager 6.0, ACDLabs e os espectros foram posteriormente gerados utilizando o programa OriginPro 7.0, OriginLab Corporation.

#### 4.2.9. Ângulo de Contato

A molhabilidade das nanofibras foi avaliada via medida do ângulo de contato utilizando o equipamento Phoenix Mini (SEO) e o software Surfaceware<sup>9</sup>. Uma gota de água deionizada foi colocada sobre a fibra e o ângulo de contato da gota com a superfície foi medido 1 segundo e 1 minuto após gotejamento. A medida foi realizada em três diferentes pontos das nanofibras.

#### 4.2.10. Espalhamento de Luz Eletroforético (ELS)

A técnica de ELS foi utilizada para medir o potencial zeta das nanopartículas de ZnO em suspensão. Foram preparadas dispersões em água deionizada com concentração de  $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ . As medidas foram realizadas no equipamento Zetasizer ZS Nanoseries, Malvern instruments, usando cubetas de poliestireno (DTS 0112).

#### 4.2.11. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

O método para quantificação do DBG foi desenvolvido em um sistema de cromatografia líquida de ultra desempenho UPLC® Aquity H-Class (Waters), com detecção por espectrômetro de massas Xevo TQD (Waters) do tipo triplo quadrupolo com ionização por eletronebulização. Os dados foram adquiridos pelo programa computacional Mass Lynx versão 4.1.

A corrida cromatográfica foi realizada em uma coluna Acquity UHPLC® HSS C18 (50 x 2,1mm; 1,8  $\mu\text{m}$ ) com um filtro de linha de 0,2  $\mu\text{m}$ . A eluição foi realizada com (A) água deionizada com 0,1% de ácido fórmico e (B) metanol com 0,1% de ácido fórmico no modo gradiente. O gradiente utilizado foi: 0-0,2min, 60% (A); 0,2 -0,4 min, 60-5% (A); 0,4-0,7 min, 5% (A); 0,71-2,00 min, 60% (A). A vazão da fase móvel foi de 0,400 mL  $\text{min}^{-1}$  e a temperatura da coluna foi mantida a 45°C e do amostrador 25°C. O volume de injeção foi de 1,0  $\mu\text{L}$ .

A fonte de ionização empregada foi a de eletronebulização no modo positivo. A temperatura de dessolvatação foi de 450 °C com uma vazão de 650 L  $\text{h}^{-1}$  de  $\text{N}_2$ . A temperatura de bloco foi mantida em 150 °C, a vazão de  $\text{N}_2$  do cone de 40 L. $\text{h}^{-1}$  e a voltagem do capilar de 3,3 kV. O modo de aquisição dos dados foi o de monitoramento de reações múltiplas (MRM). A energia do cone foi de 10 V, sendo a energia de colisão para formação do íon quantificador (289,7 m/z) de 30 V e para o íon qualificador (435 m/z) de 33 V.

#### 4.2.12. Curva de calibração

Soluções de concentrações fixas variando de 1 a 100 ppm de padrão de DBG em metanol foram preparadas através de diluições sucessivas de uma solução estoque. A quantificação do fármaco em cada solução foi feita utilizando o método desenvolvido no UPLC previamente descrito e os dados foram tratados para obtenção da curva analítica com coeficiente linear R de ~0,99.

#### 4.2.13. Efeito do metanol no sinal analítico

Soluções de DBG de uma concentração fixa foram preparadas a partir de soluções estoque de DBG em água e em metanol, contendo diferentes proporções de metanol (0 a 100%). A concentração de DBG foi analisada por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com método previamente estabelecido no UPLC.

#### 4.2.14. Determinação da concentração de DBG nas nanofibras

Amostras de cerca de 1 cm<sup>2</sup> foram pesadas em triplicata (em torno de 5 mg) e transferidas para tubos de ensaio contendo 5 mL de diclorometano. Após dissolução imediata das fibras, uma alíquota de 100 µL foi transferida para 900 µL de metanol. A concentração de DBG foi analisada por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com método previamente estabelecido no UPLC. Os dados obtidos foram tratados, levando à determinação da concentração média de DBG em micrograma de DBG por miligrama de fibra.

#### 4.2.15. Cinética de liberação de DBG *in vitro*

Os estudos de cinética de liberação *in vitro* do DBG a partir de fibras poliméricas a base de PCL foram efetuados em uma incubadora de bancada Contemp modelo Q120A3, a 37 °C e 100 rpm. Amostras de cerca de 2 cm<sup>2</sup> foram pesadas em triplicata (em torno de 10 mg) e transferidas para potes de acrílico contendo 1 mL de solução tampão (PBS pH = 7,2). Alíquotas de 1,0 mL foram coletadas a cada 15 minutos na primeira hora; a cada hora nas primeiras 7 horas e em seguida a cada 24 horas até o final do experimento. Após cada coleta foi realizada a reposição do meio com adição de 1,0 mL de tampão. 500 µL de cada alíquota foram transferidos para vials contendo 500 µL de metanol. O DBG foi quantificado em cada alíquota por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com método previamente estabelecido no UPLC.

A fim de analisar o efeito do metanol na liberação, o mesmo procedimento foi realizado, substituindo a solução tampão por uma solução 1:1 de PBS e metanol.

#### 4.2.16. Teste de Citotoxicidade

Células de fibroblastos murinos L929 foram compradas da American Type Culture Collection, ATCC, CRL-2592™ USA. As células foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% FBS, 2 mM de l-glutamina, 25 mM de HEPES e 1% de antibióticos (0,1 mg mL<sup>-1</sup> de estreptomicina e 100 U mL<sup>-1</sup> de penicilina). A cultura foi mantida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> em atmosfera úmida. Após alcançar confluência, as células foram transferidas para uma placa de 96 poços em uma concentração de cerca de 1x10<sup>5</sup> células/poço. Após 24 horas, as fibras, uma solução do fármaco e suspensões das nanopartículas foram adicionadas aos respectivos poços e mantidas em contato com as células por 24 e 48 horas.

A citotoxicidade dos materiais foi avaliada nas células L929 utilizando o ensaio de MTT <sup>61</sup> com tempo de incubação de 24 e 48 horas. Resumidamente, os materiais foram removidos das placas e cada poço foi lavado com PBS após o tempo de incubação. Em seguida, 10 µL de solução de MTT 5 mg.mL<sup>-1</sup> foram adicionados a cada poço e, 4 horas depois, foi adicionado SDS (10% em HCL 0,01M) para solubilização dos sais de formazan. Finalmente, a absorbância de cada poço em 570 nm foi medida em um espectrofotômetro *Thermo Scientific Multiskan Spectrum* MCC/340. Os dados foram obtidos em média e desvio padrão de seis replicatas.

#### 4.2.17. Testes de Hemocompatibilidade

Os testes de hemocompatibilidade foram realizados com sangue de coelhos da raça Nova Zelândia, cordialmente doado pela Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

### Teste de Hemólise

O teste de hemólise foi realizado segundo metodologia descrita previamente por Zhang *et al.*<sup>62</sup>. Hemácias foram obtidas centrifugando o sangue (2000 rpm por 10 min) e lavando o precipitado 5 vezes com PBS. As hemácias foram diluídas em PBS (0,1% v/v) e posteriormente 200 µL dessa solução e 1,8 mL de PBS foram adicionados aos poços a uma placa de 24 poços. Em cada respectivo poço havia um fragmento de fibra de cerca de 1 cm<sup>2</sup>, para controle positivo foram adicionados 200 µL da solução de hemácias em 1,8 mL de água deionizada e 1,8 mL de PBS como controle negativo. A placa foi mantida a 37°C por 1 hora. Após o devido tempo, as suspensões de cada poço foram transferidas para tubos de 2,0 mL e centrifugadas (6000 rpm por 3 min). A absorbância em 540 nm do sobrenadante (hemoglobina) foi registrada em um espectrofotômetro *Thermo Scientific Multiskan Spectrum MCC/340*. O percentual de hemólise foi calculado pela seguinte equação:

$$HP (\%) = \frac{A_A - A_-}{A_+ - A_-} \times 100$$

Sendo A<sub>A</sub> a absorbância da amostra, A<sub>-</sub> a absorbância do controle negativo e A<sub>+</sub> a absorbância do controle positivo. Os dados foram obtidos em média e desvio padrão de triplicatas.

### Teste de Anticoagulação

O teste de anticoagulação foi realizado segundo metodologia descrita previamente por Zhang *et al.*<sup>62</sup> ligeiramente modificada. Inicialmente, seções de fibras de cerca de 1 cm<sup>2</sup> foram colocadas em triplicata em poços de placas de 6 poços. Em seguida, 20 µL de sangue fresco foram gotejados em cada fibra e diretamente no poço para controle. Posteriormente, 10 µL de solução de CaCl<sub>2</sub> (0,2 mol L<sup>-1</sup>) foram adicionados à cada gota de sangue. As placas foram mantidas a 37°C por 30 e 60 min respectivamente. Após cada tempo, 5 mL de água deionizada foram adicionados a cada poço e a placa foi incubada por mais 5 min a 37°C. Finalmente, a concentração de hemoglobina em cada poço foi medida por registro da absorbância em 540 nm, utilizando um espectrofotômetro *Thermo Scientific Multiskan Spectrum MCC/340*.

**Comentado [RS2]:** Flávia eles tem algum protocolo aprovado pelo comitê de ética?

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1. Extração do DBG

O processo de extração do princípio ativo da formulação Pradaxa levou a um sólido amarelo. A quantificação via cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas mostrou que o produto obtido apresenta  $(91,54 \pm 1,36)$  % de pureza. Assim, o princípio ativo extraído foi utilizado no preparo dos materiais desenvolvidos neste trabalho.

### 5.2. Síntese das nanopartículas de ZnO

As nanopartículas de ZnO sintetizadas pelos métodos de coprecipitação e hidrotérmico foram caracterizadas por métodos físico-químicos para determinação e comparação de suas propriedades. A Tabela 3 mostra uma compilação dessas propriedades.

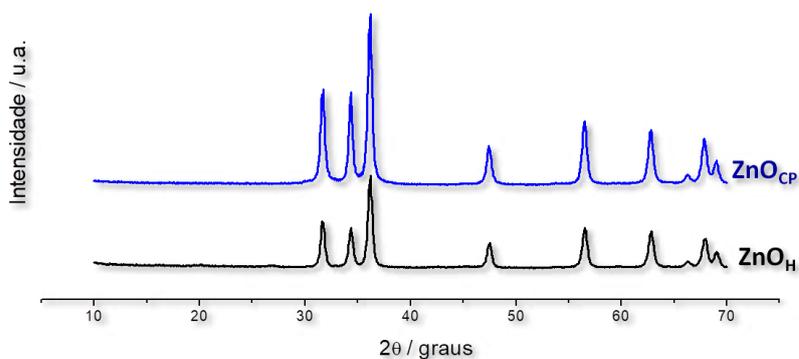
Tabela 3. Propriedades físico-químicas das nanopartículas de ZnO

Método	Fase	T <sub>5%</sub> / °C	Δm / %	Tamanho / nm	Morfologia	P.Z. / mV
Coprecipitação	Wurzita	207,56	4,91	33,5 ± 10,6	Bastonete	- 49,5 ± 1,5
Hidrotérmico	Wurzita	353,06	16,59	48,1 ± 16,3	Poliedro	- 34,3 ± 1,4

**Nota.** T<sub>5%</sub> - Valores de temperatura inicial de decomposição; Δm - Perda de massa sob aquecimento em atmosfera de N<sub>2</sub>; P.Z. - Potencial Zeta

Os difratogramas de raios X das nanopartículas, Figura 10, são bastante similares e apresentam picos de difração em 31.6°, 34.3°, 36.1°, 47.4°, 56.5°, 62.7°, 66.2°, 67.8° e 68.9°, que indicam a formação de ZnO puro na forma wurzita (JCPDS 36- 1451), a mais estável em condições ambientes. Nessa forma, o ZnO possui célula unitária hexagonal e um arranjo espacial tetraédrico.<sup>63</sup> Os picos de difração intensos e bem definidos indicam a formação de materiais cristalinos e o alargamento dos picos indica a presença de cristais nanoestruturados.<sup>64</sup>

**Figura 10.** Difratogramas de raios X das nanopartículas de ZnO obtidas pelos métodos de coprecipitação ( $ZnO_{CP}$ ) e hidrotérmico ( $ZnO_H$ ).

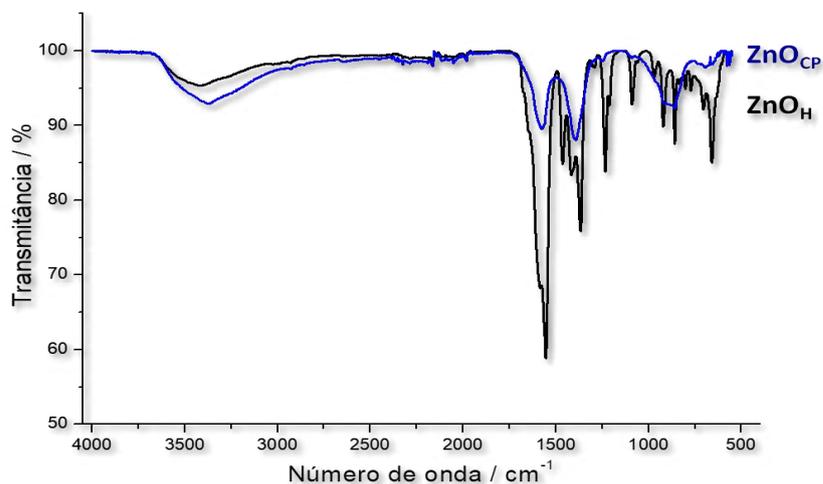


Os espectros de absorção na região do infravermelho das nanopartículas estão apresentados na Figura 11. As bandas fracas e largas na região de  $3400\text{ cm}^{-1}$ , presente em ambos os espectros, pode ser associada ao estiramento da ligação O-H de grupos hidroxila e moléculas de água presentes na superfície dos cristais.<sup>65</sup> As bandas em torno de  $1560\text{ cm}^{-1}$  podem ser atribuídas ao  $CO_2$  atmosférico adsorvido às nanopartículas. As bandas na região de  $1370\text{ cm}^{-1}$  podem estar associadas ao estiramento simétrico de grupos carboxila presentes na estrutura cristalina.<sup>66</sup> A presença de óxido de zinco é confirmada a partir das bandas em  $893\text{ cm}^{-1}$  ( $ZnO_{CP}$ ) e  $859\text{ cm}^{-1}$  ( $ZnO_H$ ), características do estiramento da ligação Zn-O.<sup>67</sup> O fato de o espectro de absorção das partículas  $ZnO_H$  apresentar bandas mais estreitas e definidas indica que o método hidrotérmico leva a um sólido mais cristalino que o método de coprecipitação.

**Tabela 4.** Atribuições de grupos funcionais correspondentes aos números de onda dos espectros de absorção das nanopartículas de ZnO.

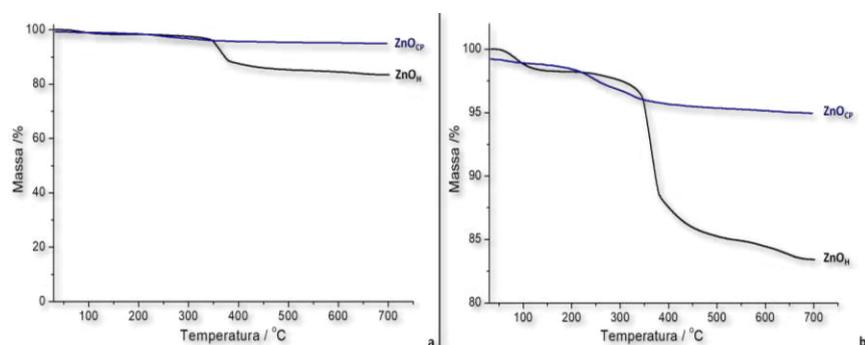
$ZnO_{CP}$		$ZnO_H$	
Número de onda / $cm^{-1}$	Grupo funcional	Número de onda / $cm^{-1}$	Grupo funcional
3386	O-H	3431	O-H
1574	C=O	1554	C=O
1392	C=O	1367	C=O
893	Zn-O	1233	C=O
		921	Zn-O
		859	Zn-O
		659	Zn-O

**Figura 11.** Espectros de absorção na região do infravermelho das nanopartículas de ZnO obtidas pelos métodos de coprecipitação ( $ZnO_{CP}$ ) e hidrotérmico ( $ZnO_H$ ).



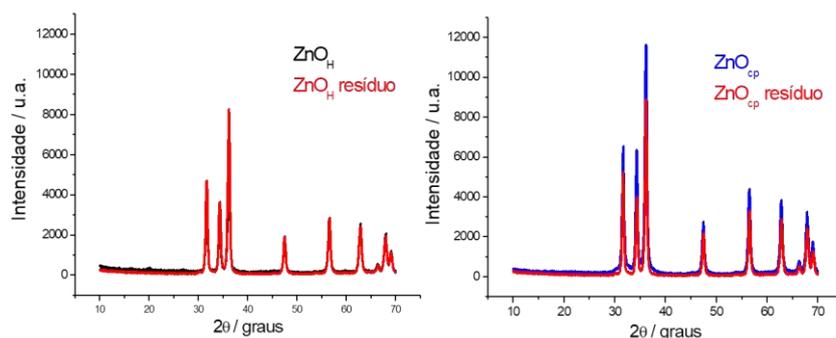
A análise térmica dos materiais, Figura 12, mostrou que as nanopartículas  $ZnO_{CP}$  são termicamente estáveis entre 30°C e 700°C, apresentando perda de massa de aproximadamente 5% entre 200°C e 400°C referente à perda de água adsorvida na superfície das nanopartículas.<sup>68</sup> Já a curva termogravimétrica das nanopartículas  $ZnO_H$  mostrou dois eventos térmicos na mesma faixa de temperatura e uma perda de massa total de quase 17%. O primeiro evento (64-132°C) pode ser relacionado à perda de água e o segundo evento (300-450°C) à decomposição de  $Zn(OH)_2$  residual.<sup>69</sup>

**Figura 12.** Curvas TG das nanopartículas de ZnO obtidas pelos métodos de coprecipitação ( $ZnO_{CP}$ ) e hidrotérmico ( $ZnO_H$ ) em atmosfera de  $N_2$ , com razão de aquecimento  $10^\circ C \text{ min}^{-1}$  de 30°C a 700°C. Perda de massa na faixa de 0 a 100% (a) e na faixa de 80 a 100% (b).



A fim de confirmar a estabilidade térmica das nanopartículas, as mesmas foram submetidas a aquecimento em um forno de calcinação, simulando as condições da análise térmica. Os nanomateriais foram então caracterizados novamente pela técnica de difração de raios X, os difratogramas estão representados na Figura 13. É possível observar que mesmo após aquecimento até 700°C as nanopartículas não perdem suas estruturas cristalinas características. Isso corrobora que as perdas de massa detectadas na curva TG são referentes aos resíduos presentes nas amostras e não à decomposição das nanopartículas.<sup>70</sup>

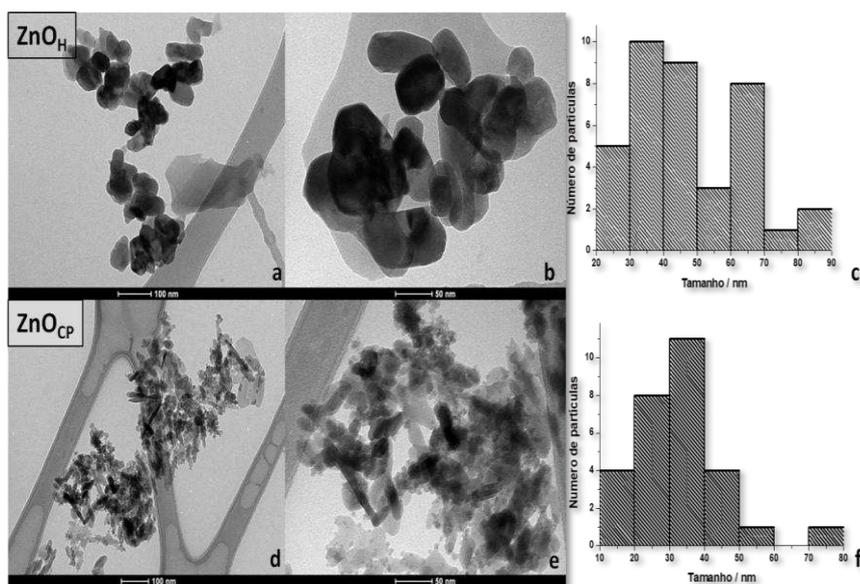
**Figura 13.** Difratogramas de raios X das nanopartículas de ZnO obtidas pelos métodos de coprecipitação ( $\text{ZnO}_{\text{CP}}$ ) e hidrotérmico ( $\text{ZnO}_{\text{H}}$ ) após aquecimento até 700°C em atmosfera de  $\text{N}_2$ , com razão de 10°C/min.



As micrografias obtidas por MET mostraram que os dois métodos levam à partículas de tamanho médio entre 30-40 nm, não superando 90 nm. Além disso, a partir das micrografias foi possível identificar que a principal diferença entre as nanopartículas de ZnO obtidas é a morfologia. As nanopartículas  $\text{ZnO}_{\text{CP}}$  apresentam morfologia de bastonete, enquanto as  $\text{ZnO}_{\text{H}}$  aproximam-se de poliedros. Nanopartículas de ZnO são um dos materiais com maior variedade morfológica conhecidos, sendo a diferença na morfologia resultante das diferentes condições de síntese, como temperatura, pressão e reagentes precursores.<sup>71</sup> Os valores de potencial zeta para  $\text{ZnO}_{\text{CP}}$  ( $-49,5 \pm 1,5$  mV) e para  $\text{ZnO}_{\text{H}}$  ( $-34,3 \pm 1,4$  mV) podem ser usados para entender e prever a formação de aglomerados. Valores menores que -30 mV indicam que as partículas vão se unir por interações de van der Waals fracas (aglomerados) e

não ligações químicas fortes (agregados).<sup>72</sup> O valor negativo está associado à presença de cargas negativas na superfície das nanopartículas, como hidroxilas e carboxilas.

**Figura 14.** Micrografias obtidas por MET nas nanopartículas ZnO<sub>H</sub> (a,b) e ZnO<sub>CP</sub> (d,e) e suas respectivas distribuições de tamanho (c,d).



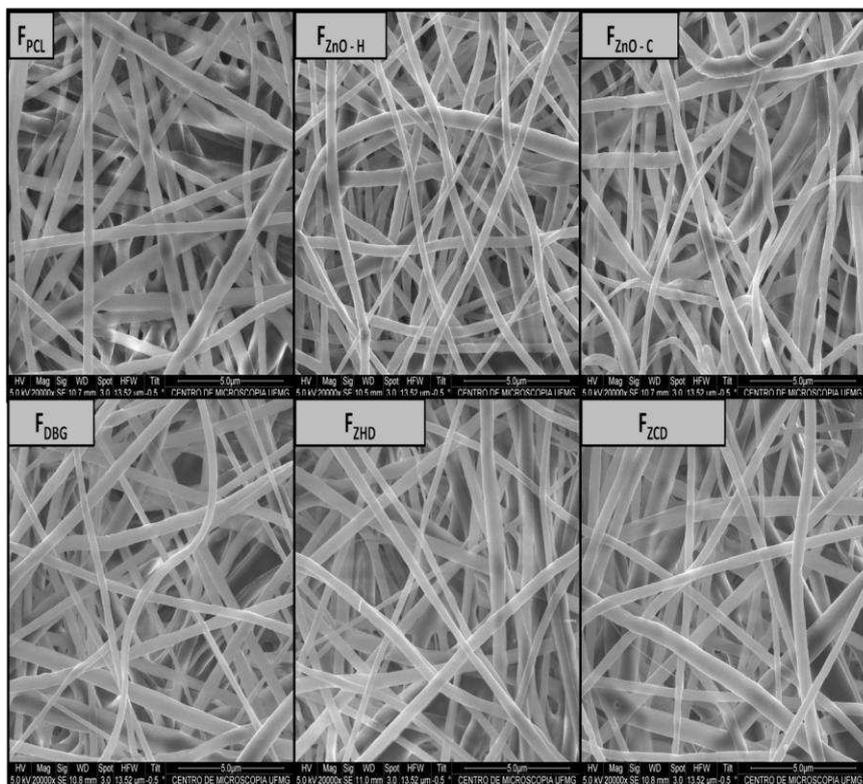
### 5.3. Nanofibras

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

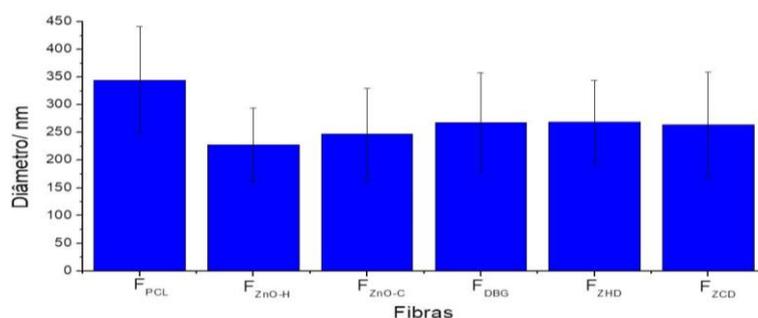
A morfologia e o tamanho das nanofibras preparadas foram analisados por MEV. Na Figura 15, é possível observar que todas as fibras são uniaxiais, com ausência de *beads* (gotas ou aglomerados de polímero) e distribuídas de forma aleatória. A similaridade morfológica das fibras é esperada já que todas foram preparadas com os mesmos parâmetros de eletrospinação. Dessa maneira, a diferença nos diâmetros das nanofibras, mostrada na Figura 16, provavelmente resulta da presença das nanopartículas de ZnO e do fármaco.<sup>73</sup> As fibras de PCL puro apresentam diâmetro médio de cerca de 350 nm, enquanto as fibras contendo ZnO e DBG apresentam diâmetros médios entre 225 e 275 nm. A redução no diâmetro pode ser explicada por um aumento na condutividade da

solução polimérica devido à presença de partículas carregadas. O aumento de forças repulsivas reduz a tensão superficial da solução, levando a um estreitamento do jato e, conseqüentemente, a fibras de menor diâmetro. <sup>74</sup> O mesmo efeito já foi previamente reportado no preparo de fibras de PCL com outras nanopartículas metálicas. <sup>75; 76</sup> A importância do diâmetro das nanofibras está associada à sua área superficial. Um menor diâmetro equivale a uma maior área superficial, o que facilita a aderência celular e propicia o uso desses materiais em aplicações biomédicas. <sup>77</sup>

**Figura 15.** Micrografias obtidas por MEV das nanofibras de PCL ( $F_{PCL}$ ), PCL com nanopartículas  $ZnO_H$  ( $F_{ZnO-H}$ ), PCL com nanopartículas  $ZnO_{CP}$  ( $F_{ZnO-C}$ ), PCL com DBG ( $F_{DBG}$ ), PCL com nanopartículas  $ZnO_H$  e DBG ( $F_{ZHD}$ ) e PCL com nanopartículas  $ZnO_{CP}$  e DBG ( $F_{ZCD}$ ).



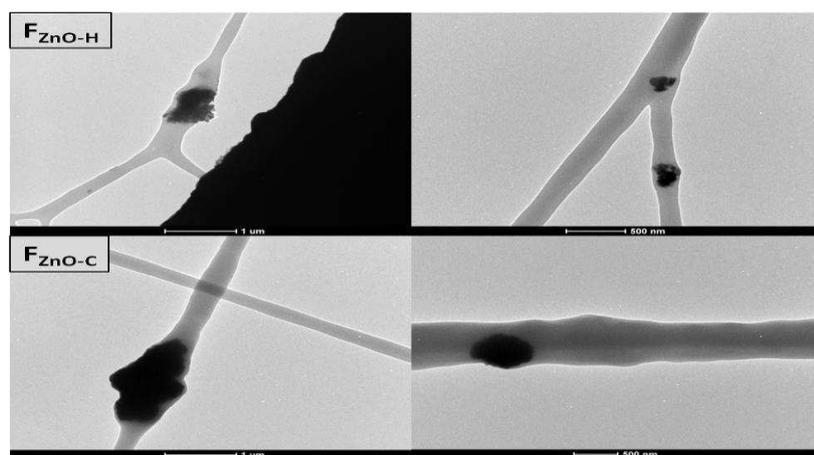
**Figura 16.** Valores de diâmetros das nanofibras de PCL ( $F_{PCL}$ ), PCL com nanopartículas  $ZnO_H$  ( $F_{ZnO-H}$ ), PCL com nanopartículas  $ZnO_{CP}$  ( $F_{ZnO-C}$ ), PCL com DBG ( $F_{DBG}$ ), PCL com nanopartículas  $ZnO_H$  e DBG ( $F_{ZHD}$ ) e PCL com nanopartículas  $ZnO_{CP}$  e DBG ( $F_{ZCD}$ ).



### 5.3.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As micrografias obtidas por MET confirmam a presença das nanopartículas de ZnO dentro das nanofibras. Na Figura 17, é possível identificar que as nanopartículas  $ZnO_H$  e  $ZnO_{CP}$  encontram-se aglomeradas dentro das fibras poliméricas. As micrografias mostram que as nanopartículas foram devidamente encapsuladas e não estão presentes na superfície das nanofibras. Dessa forma, as nanopartículas podem ser lentamente liberadas no organismo, possibilitando o uso dessas fibras como sistemas de liberação de nanopartículas de ZnO.<sup>78</sup>

**Figura 17.** Micrografias obtidas por MET das nanofibras  $F_{ZnO-H}$  e  $F_{ZnO-C}$ .



### 5.3.3. Análise Térmica

As curvas termogravimétricas das nanofibras, Figura 18, mostram um evento único de perda de massa na faixa de aproximadamente 300 °C - 450 °C. Este evento corresponde à degradação via pirólise do PCL, com a decomposição do poliéster em compostos voláteis.<sup>79; 80</sup>

Os dados de degradação térmica das amostras estão resumidos na Tabela 5. A temperatura *onset* ( $T_{onset}$ ) foi usada como parâmetro para comparar a estabilidade térmica dos materiais. A decomposição térmica da DBG começa em torno de 60 °C, como relatado na literatura.<sup>81</sup>

As nanofibras de PCL são mais termicamente estáveis do que sua forma em pó, como observado. É possível inferir que isto é uma consequência de interações intermoleculares intensificadas entre as cadeias poliméricas na forma de fibra. A presença de nanopartículas de ZnO, no entanto, diminuiu a estabilidade térmica das nanofibras de PCL, indicando que as nanopartículas aceleraram o processo de degradação do PCL. De acordo com alguns estudos, os agregados de nanopartículas dificultam o processo de nucleação, o que leva à formação de cristais de PCL lamelares mais finos, que são mais facilmente degradados.<sup>56</sup>

A fibra termicamente mais estável foi a que continha apenas o fármaco, provavelmente devido a interações intermoleculares entre as cadeias poliméricas e o DBG.<sup>82</sup> Esse resultado é importante, pois a interação polímero-fármaco tem grande influência na liberação do medicamento no organismo. No caso do PCL e do DBG, as interações hidrofóbicas podem evitar o fenômeno de liberação imediata (*burst effect*), em que o fármaco é totalmente ou quase totalmente liberado nas primeiras oito horas de degradação da matriz de encapsulamento.<sup>83</sup>

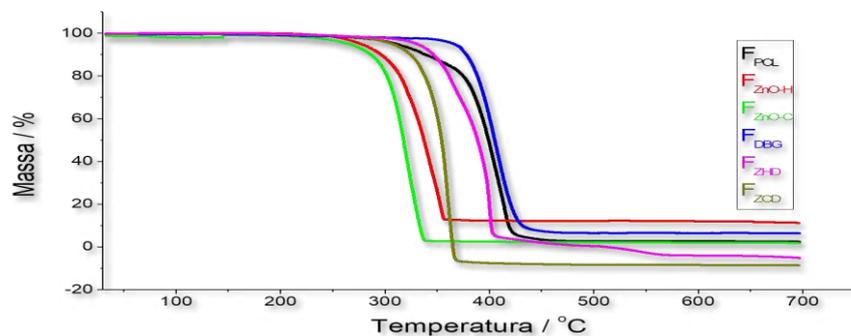
A Figura 19 mostra as curvas DTA das nanofibras, nas quais é possível observar que não há variação significativa na temperatura de fusão do polímero. Esse resultado indica que não a presença do fármaco e das nanopartículas não altera significativamente a estrutura do PCL.

**Tabela 5.** Resultados da Análise Térmica dos materiais

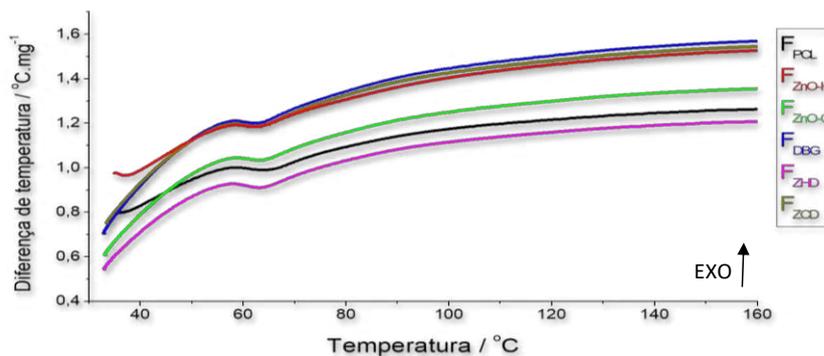
Amostras	$T_{onset} / ^\circ C$	$T_{max} / ^\circ C$	$T_f / ^\circ C$	Perda de massa / %
DBG	64,36	275,33	556,44	96,50
PCL	366,95	407,82	443,56	97,43
<b>Fibras</b>				
F <sub>PCL</sub>	377,14	412,93	451,93	97,05
F <sub>ZnO-H</sub>	313,76	350,98	355,23	87,47
F <sub>ZnO-C</sub>	334,94	319,60	338,30	97,84
F <sub>DBG</sub>	382,45	406,22	455,29	93,86
F <sub>ZHD</sub>	351,70	399,35	407,82	95,43
F <sub>ZCD</sub>	345,47	360,35	363,39	96,04

**Nota:** Valores de temperatura *onset* ( $T_{onset}$ ), pico máximo de decomposição ( $T_{max}$ ), final de decomposição ( $T_f$ ) e **Perda de massa** das amostra sob aquecimento em atmosfera de  $N_2$

**Figura 18.** Curvas TG das nanofibras em atmosfera de  $N_2$ , com razão de aquecimento  $10^\circ C/min$  de  $30^\circ C$  a  $700^\circ C$ .



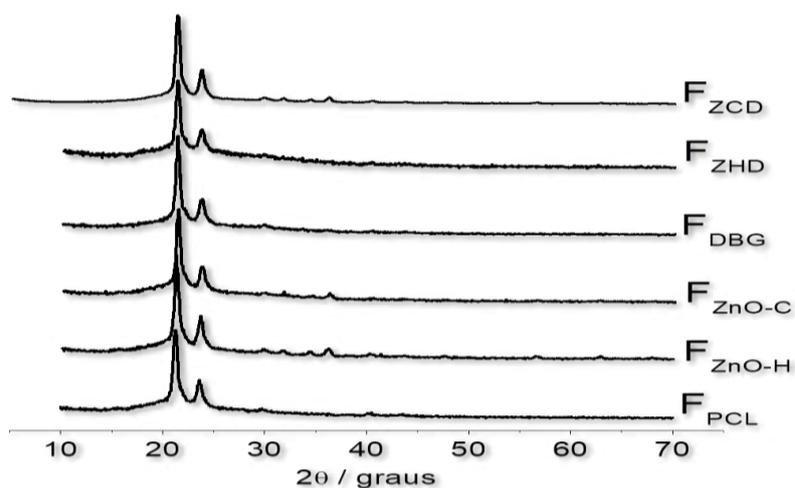
**Figura 19.** Curvas DTA das nanofibras em atmosfera de  $N_2$ , com razão de aquecimento  $10^\circ C/min$  de  $30^\circ C$  a  $700^\circ C$ .



#### 5.3.4. Difractometria de raios X (DRX)

Na Figura 20 estão apresentados os difratogramas DRX das nanofibras  $F_{PCL}$ ,  $F_{ZnO-H}$ ,  $F_{ZnO-C}$ ,  $F_{DBG}$ ,  $F_{ZHD}$  e  $F_{ZCD}$ . A análise por DRX de todas as nanofibras evidenciou dois picos de difração intensos em  $21,3^\circ$  e  $23,7^\circ$ , correspondentes à estrutura cristalina ortorrômbica do PCL.<sup>84</sup> Os picos de difração referentes às nanopartículas de ZnO podem ser identificados nos difratogramas com baixa intensidade nas fibras que contém as nanopartículas, indicando o encapsulamento das mesmas. Somente os picos de maior intensidade do ZnO são discretamente notáveis, devido ao baixo teor de nanopartículas nas fibras (8% m/m).<sup>85</sup>

**Figura 20.** Difratogramas de raios X das nanofibras de PCL ( $F_{PCL}$ ), PCL com nanopartículas  $ZnO_H$  ( $F_{ZnO-H}$ ), PCL com nanopartículas  $ZnO_{CP}$  ( $F_{ZnO-C}$ ), PCL com DBG ( $F_{DBG}$ ), PCL com nanopartículas  $ZnO_H$  e DBG ( $F_{ZHD}$ ) e PCL com nanopartículas  $ZnO_{CP}$  e DBG ( $F_{ZCD}$ ).



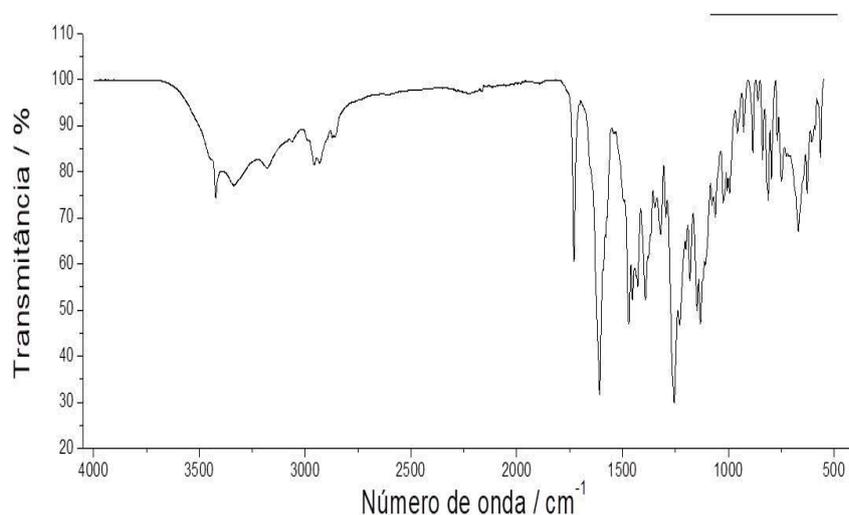
#### 5.3.5. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho por Reflectância Total Atenuada (ATR-FTIR)

Nas Figuras 21 e 22 estão apresentados os espectros de absorção na região do infravermelho por reflectância total atenuada do DBG e das nanofibras produzidas, respectivamente. Analisando, o espectro de absorção do DBG está

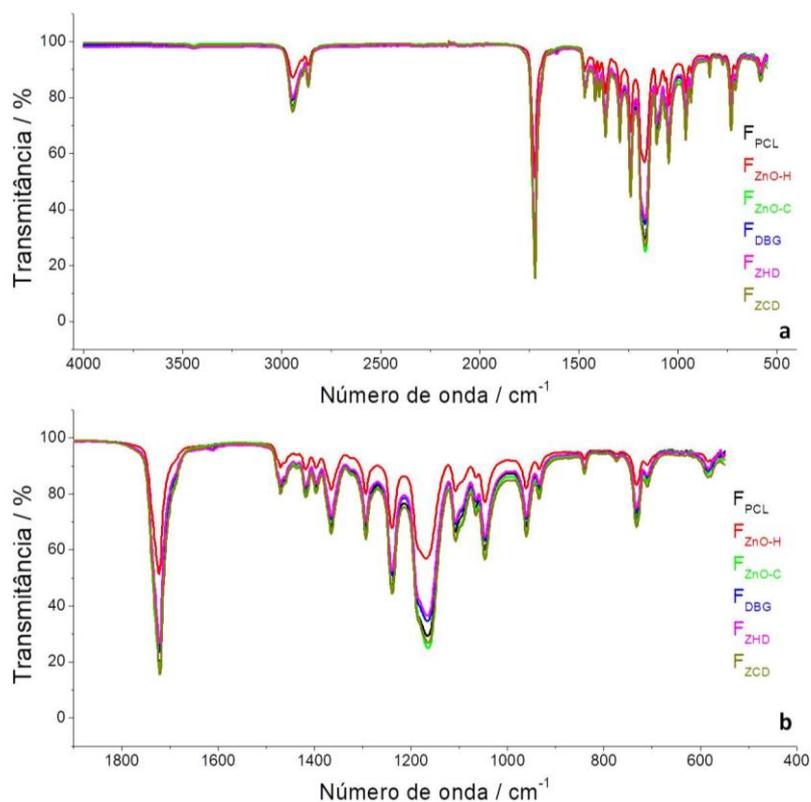
de acordo com a literatura. As principais bandas de absorção correspondem ao estiramento de ligações N-H ( $3422\text{ cm}^{-1}$ ), estiramento de ligações C-H em aromáticos ( $2958\text{ cm}^{-1}$ ), estiramento de ligações C=O ( $1729\text{ cm}^{-1}$ ), estiramento de ligações C=N ( $1608\text{ cm}^{-1}$ ) e estiramento de ligações C=C em aromáticos ( $1580\text{ cm}^{-1}$ ).<sup>86; 87</sup> O espectro de absorção de todas as fibras equivale ao espectro de absorção do PCL. As bandas em  $2945\text{ cm}^{-1}$  e  $2867\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas ao estiramento da ligação C-H do hidrocarboneto do PCL. A banda intensa e estreita em  $1722\text{ cm}^{-1}$  está associada ao estiramento das ligações C=O dos grupos carbonila do polímero. A banda em  $1294\text{ cm}^{-1}$  refere-se ao estiramento de ligações C=O e C=C características da fase cristalina.  $1239\text{ cm}^{-1}$  e  $1165\text{ cm}^{-1}$  são o estiramento ssimétrico e assimétrico de C-O-C, respectivamente.<sup>88; 89</sup>

É esperado que os espectros de todas as fibras apresentem somente as bandas referentes ao polímero, pois tanto o fármaco quanto as nanopartículas estão encapsulados e não presentes na superfície. Além disso, a proporção fármaco-partícula/ PCL é baixa.<sup>90</sup>

**Figura 21.** Espectro de absorção do infravermelho do DBG na região de  $4000$  a  $500\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 22.** Espectros de absorção na região do infravermelho das nanofibras de PCL ( $F_{PCL}$ ), com  $ZnO_H$  ( $F_{ZnO-H}$ ),  $ZnO_{CP}$  ( $F_{ZnO-C}$ ), DBG ( $F_{DBG}$ ), nanopartículas  $ZnO_H$  e DBG ( $F_{ZHD}$ ) e nanopartículas  $ZnO_{CP}$  e DBG ( $F_{ZCD}$ ) na região de (a) 4000-500  $cm^{-1}$  e (b) 1800-500  $cm^{-1}$ .



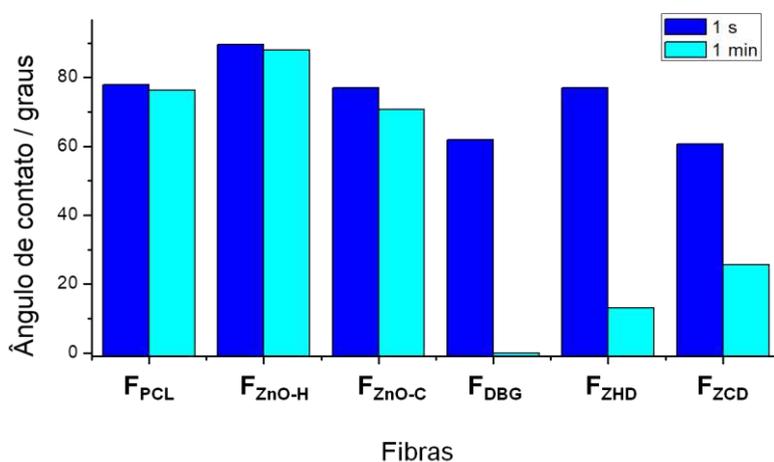
### 5.3.6. Ângulo de contato

A medida do ângulo de contato de uma gota de água com a superfície das nanofibras indica a molhabilidade do material, permitindo analisar a hidrofília relativa da superfície das nanofibras. Uma gota de água em superfícies hidrofílicas tende a se espalhar e em superfícies hidrofóbicas, tende a manter sua forma esférica. Dessa maneira, quanto maior o ângulo de contato, mais hidrofóbica é a superfície.<sup>91</sup>

Na Figura 23, estão representados os valores dos ângulos de contato de gotas de água com a superfície das nanofibras após 1 segundo e 1 minuto de contato. A fibra de PCL apresenta ângulo de contato em torno de 77° que não

varia significativamente com o tempo de 1 minuto. Observa-se que a presença das nanopartículas de ZnO aumenta o ângulo de contato, e por outro lado a presença do fármaco diminui. Esse efeito, previamente observado na literatura, ocorre devido à hidrofobicidade das nanopartículas de ZnO.<sup>56; 92</sup> A presença do fármaco nas nanofibras, por sua vez, provoca um efeito oposto ao das nanopartículas de ZnO. Quando uma gota de água entra em contato com as fibras contendo o DBG, ela é rapidamente absorvida, este efeito está representado na Figura 24. O aumento da hidrofilia das fibras está relacionado à interação do DBG com a água, que é relativamente mais intensa do que a interação do PCL e das nanopartículas de ZnO. Este resultado é importante, pois mostra que as fibras que encapsulam o fármaco não são muito hidrofóbicas. Consequentemente, é provável que esses materiais apresentem uma adesão celular eficiente, melhorando sua biocompatibilidade e possibilitando o uso dessas fibras como implantes e sistemas de liberação.<sup>93</sup>

**Figura 23.** Valores dos ângulos de contato de uma gota de água com a superfície das nanofibras 1 segundo e 1 minuto após gotejamento.



**Figura 24.** Ilustração da absorção de uma gota de água com a superfície das nanofibras que contêm o fármaco DBG.



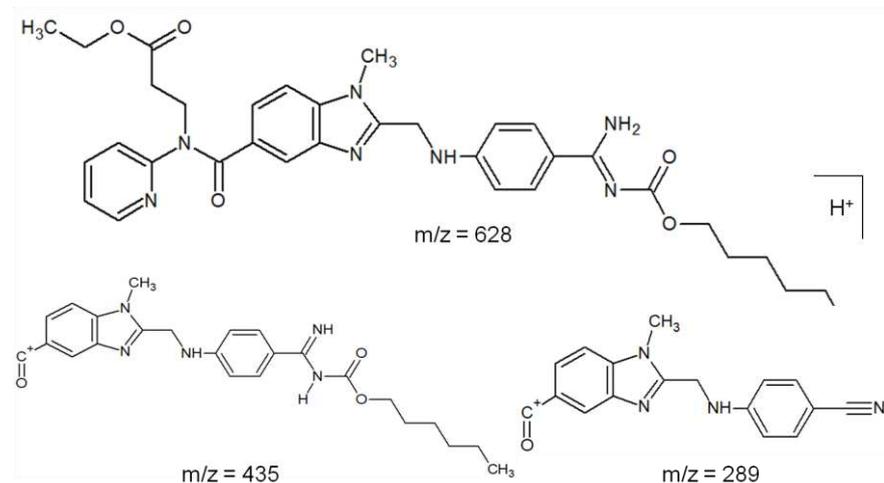
A caracterização físico-química mostrou que não existem diferenças significativas entre as nanofibras com as nanopartículas de ZnO obtidas pelos métodos de coprecipitação e hidrotérmica. Dessa maneira, os próximos experimentos foram realizados somente com as nanofibras/nanopartículas ZnO<sub>H</sub>, pois o método hidrotérmico seria o mais indicado para uma produção em larga escala.

#### 5.4. Método de quantificação do etexilato de dabigatrana

O método para quantificação do DBG foi desenvolvido com a técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, seguindo trabalhos descritos na literatura.<sup>94; 95</sup>

Os fragmentos analisados estão representados na Figura 25. O pico mais intenso, referente ao fragmento  $m/z = 289$ , foi utilizado para a quantificação do fármaco, enquanto o pico de menor intensidade,  $m/z = 435$ , foi utilizado para confirmação do composto de origem (ion qualificador).<sup>86; 96</sup>

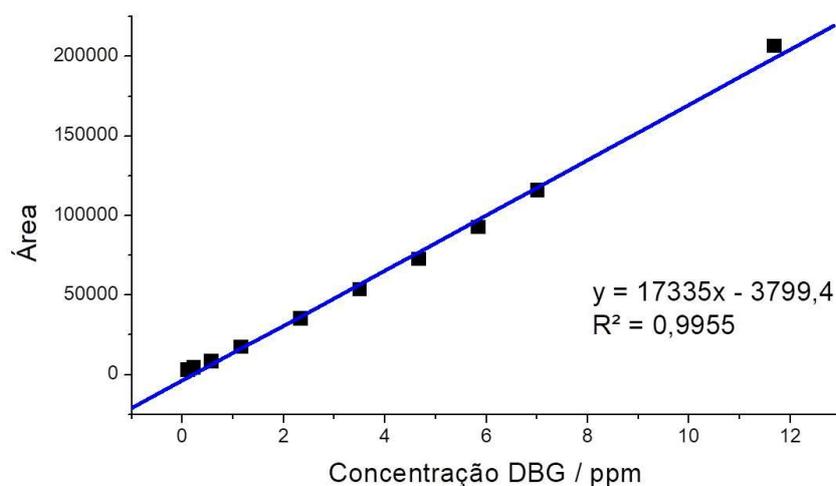
**Figura 25.** Representação do íon pai do DBG e dos fragmentos quantificador ( $m/z = 289$ ) e qualificador ( $m/z = 435$ ).



Fonte. Autora

O método foi utilizado para gerar uma curva de calibração, Figura 26, a partir de soluções de concentrações conhecidas de um padrão de DBG em metanol. A equação da reta foi utilizada para calcular a concentração do fármaco nos testes seguintes.

**Figura 26.** Curva de calibração para quantificação do DBG com o método desenvolvido no UPLC.



##### 5.5. Determinação da concentração de etexilato de dabigatrana nas fibras

As fibras  $F_{DBG}$  e  $F_{ZHD}$  foram dissolvidas em diclorometano e a quantidade de fármaco encapsulado foi calculada. O valor é representado em relação à massa de DBG adicionada à solução polimérica. Os resultados mostram que tanto a fibra contendo somente o fármaco quanto a fibra que apresenta as nanopartículas de ZnO, possuem uma boa eficácia de encapsulamento,  $F_{DBG} = (87,9 \pm 5,4) \%$  e  $F_{ZHD} = (84,9 \pm 5,9) \%$ . Esses valores próximos são esperados, já que os diâmetros internos das fibras são similares. O valor elevado de carregamento do fármaco (*drug loading*) das nanofibras está associado à sua elevada razão área superficial/volume, indicando novamente seu uso em aplicações biomédicas.<sup>97</sup>

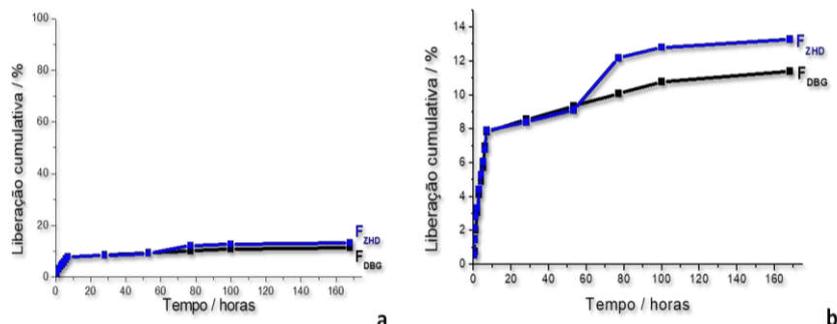
## 5.6. Cinética de liberação do etexilato de dabigatrana *in vitro*

O estudo da taxa de liberação do fármaco dos nanomateriais preparados é importante para avaliar suas possíveis aplicações. A liberação do fármaco da sua matriz pode ser classificada em liberação imediata e liberação modificada. Na primeira, a liberação ocorre imediatamente após a administração do medicamento. Já a segunda se divide em duas classes: liberação retardada e liberação sustentada. Na liberação retardada, o fármaco é liberado certo período após a administração e na liberação sustentada, a liberação é prolongada, geralmente em doses menores. Além disso, a liberação modificada também pode envolver a liberação direcionada, na qual o fármaco é administrado diretamente no local de ação ou o sistema apresenta propriedades físico-químicas que direcionam o agente ativo para seu alvo.<sup>98</sup>

Usualmente, utiliza-se uma solução tampão de PBS para se estudar a cinética de liberação. Os resultados desse estudo feito para as nanofibras contendo o DBG com e sem as nanopartículas de ZnO estão representados na Figura 27. A curva de calibração indica que menos de 15% do fármaco é liberado em cerca de 160 horas de experimento. Observam-se também duas regiões cinéticas de liberação, a primeira nas 8 horas iniciais com uma taxa de liberação mais rápida e a segunda, nas horas seguintes, com uma velocidade mais baixa de liberação.

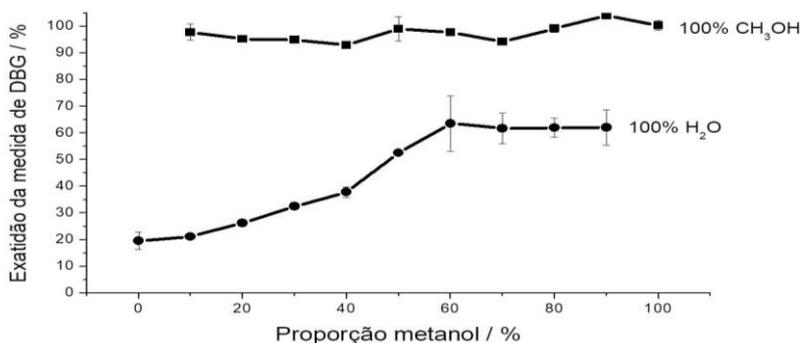
O experimento foi interrompido após 168 horas (7 dias), pois a concentração do fármaco liberado já se encontrava no limite de detecção do método. As fibras foram então dissolvidas em diclorometano e o DBG residual foi quantificado. Foi determinado que a fibra  $F_{DBG}$  ainda continha  $(81,0 \pm 7,9) \%$  do fármaco e a fibra  $F_{ZHD}$   $(71,0 \pm 7,9) \%$ . Esses valores elevados são indício de que a liberação do DBG em um meio puramente aquoso não é favorecida, o que pode ser explicado pela baixa solubilidade do fármaco em água.

**Figura 27.** Perfil de liberação do DBG presente nas nanofibras em PBS em escala de (a) 100% e (b) 15%.



A fim de estudar melhor o quanto a questão da solubilidade influencia na liberação, o sinal analítico referente ao DBG na presença de misturas com diferentes proporções de metanol e PBS foi avaliado. Todas as soluções utilizadas para gerar o gráfico da Figura 28 apresentam a mesma concentração de DBG, no entanto, é possível observar variações significativas na exatidão da medida. Quando o fármaco é inicialmente dissolvido em metanol e posteriormente misturado com PBS, a medida é bastante exata. Entretanto, quando o fármaco é inicialmente dissolvido em PBS, é evidente que o valor de concentração medido é bem diferente do valor real. Quanto maior a presença de metanol na mistura, mais exata fica a medida, sendo que o mais próximo que se alcança é cerca de 60% do valor real. Esses resultados mostram que a quantificação do DBG pelo método utilizado está diretamente à sua solubilização.

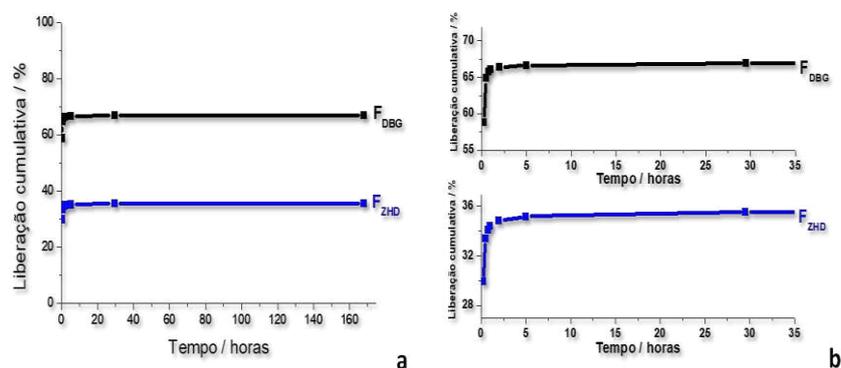
**Figura 28.** Efeito do metanol na exatidão da quantificação de DBG partindo de uma solução 100% metanol e outra 100% água.



No caso da liberação, o fármaco se encontra em uma matriz hidrofóbica imersa em um meio aquoso. Dessa forma, dois fatores influenciam no baixo teor de liberação. O primeiro é a solubilidade, como demonstrado. O DBG que sai da fibra não se dissolve completamente no PBS e mesmo com a adição de metanol a essa solução, a medida não é 100% exata. O segundo, que também explica o elevado resíduo de fármaco nas fibras, são as interações hidrofóbicas entre o DBG e o polímero. As interações DBG -PCL são mais favoráveis que as interações DBG - água, dessa forma existe uma tendência de o fármaco permanecer na fibra e em sua superfície, já que não é dissolvido pelo meio.

Assim, com o intuito de mostrar esse efeito do metanol na liberação, o experimento foi repetido imergindo as fibras em uma solução de PBS e metanol 1:1. Os resultados apresentados na Figura 29, mostram que na primeira hora já se atinge um limite de liberação, cerca de 65% para F<sub>DBG</sub> e 35% para F<sub>ZHD</sub>. Isso indica que o fármaco é liberado mais rapidamente em um meio em que é solúvel como discutido anteriormente. Esses resultados estão de acordo com o trabalho de Zhang *et al.*, no qual o efeito de diferentes proporções de etanol no meio de liberação foi avaliado.<sup>31</sup> No caso da fibra que contém as nanopartículas de ZnO, percebeu-se, no entanto, que a quantidade de fármaco liberado não foi tão alta. Esse efeito pode ser resultado de uma interação entre o fármaco e as nanopartículas, que costumam apresentar propriedades adsorventes devido às suas elevadas áreas superficiais.

**Figura 29.** Perfil de liberação do DBG presente nas nanofibras em solução PBS/metanol 1:1 em escala de (a) 100% e (b) 15%.



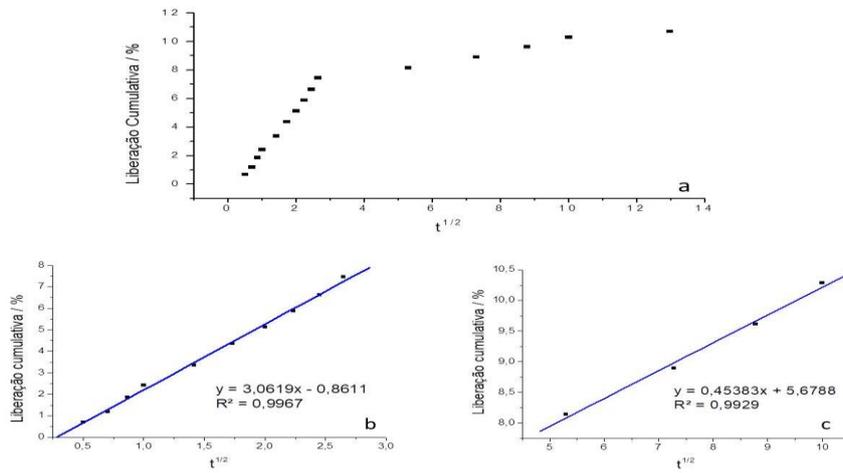
Estes experimentos, além de envolverem um estudo cinético, também permitem uma avaliação de como a liberação do fármaco aconteceria no meio fisiológico. No corpo humano, as nanofibras se encontrariam em um ambiente majoritariamente aquoso, no qual a biodegradação do polímero aconteceria gradualmente. No caso do PCL, esse processo poderia levar até dois anos, o que possibilitaria a liberação sustentada do DBG.<sup>99</sup> Além disso, os dados do estudo da cinética de liberação associados a modelos matemáticos podem ser usados para prever o mecanismo de liberação do fármaco. No caso de nanofibras de PCL, a liberação pode acontecer, majoritariamente, por dois mecanismos: (i) difusão através da matriz polimérica para o tecido e (ii) erosão e biodegradação das camadas superficiais da fibra.<sup>100</sup>

O modelo matemático que melhor descreve a liberação de fármacos de nanofibras de PCL, segundo a literatura, é o modelo de Higuchi.<sup>101; 102</sup> Esse modelo é baseado no princípio de Fickian, no qual a liberação acontece via difusão do fármaco a partir da entrada de líquido na matriz sólida ou semi-sólida.<sup>103</sup> Dessa forma, os dados da cinética de liberação das fibras foram tratados segundo à equação de Higuchi (equação 1), onde  $Q_t$  é a quantidade de fármaco liberada no tempo  $t$  e  $K_H$  é a constante de liberação de Higuchi.

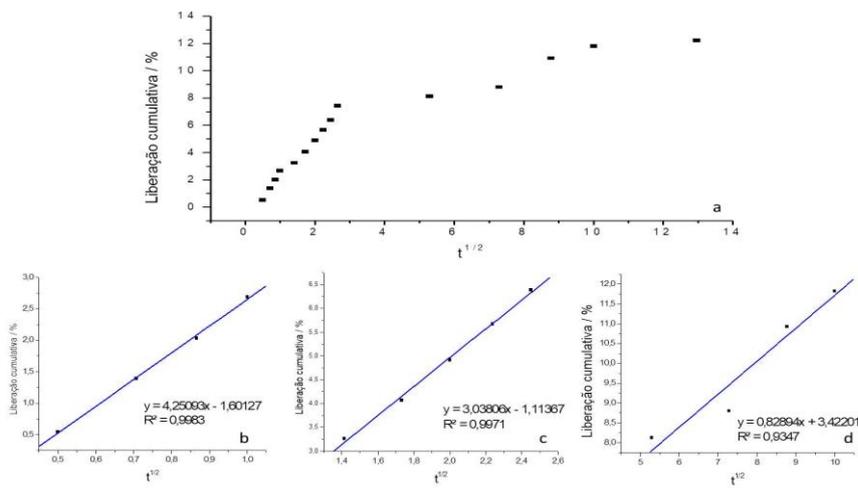
$$Q_t = K_H t^{1/2}$$

As Figuras 30 e 31 mostram as curvas de liberação ajustadas ao modelo de Higuchi para as fibras  $F_{DBG}$  e  $F_{ZHD}$ , respectivamente. É evidente a presença de dois estágios de liberação para a fibra contendo somente o DBG, sendo o primeiro com uma inclinação mais acentuada e, portanto, uma difusão mais rápida do fármaco. Já a fibra que contém também as nanopartículas apresenta três regiões distinguíveis de liberação. A primeira e a segunda são próximas em termos de inclinação e demonstram uma liberação bem mais rápida que a terceira. Apesar de similares, os valores das inclinações dos dois tipos de fibra indicam que a presença das nanopartículas de ZnO aceleram levemente a difusão do DBG da matriz.

**Figura 30.** Cinética de liberação do DBG a partir das nanofibras  $F_{DBG}$  pelo modelo de Higuchi (a) com os ajustes para a primeira (a) e a segunda (b) regiões cinéticas de liberação.



**Figura 31.** Cinética de liberação do DBG a partir das nanofibras  $F_{ZHD}$  pelo modelo de Higuchi (a) com os ajustes para a primeira (a), a segunda (b) e a terceira (c) regiões cinéticas de liberação.

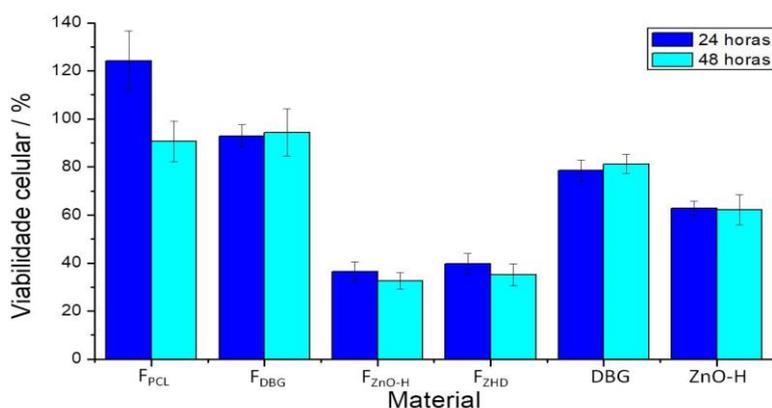


### 5.7. Teste de citotoxicidade

O ensaio de MTT está associado ao metabolismo celular, sendo utilizado para avaliar a viabilidade celular, a proliferação de células e a citotoxicidade de fármacos e outros materiais.<sup>104</sup> De acordo com a viabilidade celular, os materiais podem ser classificados como não citotóxicos (> 90%), levemente citotóxicos (60-90%), moderadamente citotóxicos (30-59%) e altamente citotóxicos (<30%).<sup>105</sup> Na Figura 32, encontram-se os resultados de viabilidade celular para as nanofibras, as nanopartículas de ZnO e o fármaco puro. Observa-se que as fibras  $F_{PCL}$  e  $F_{DBG}$  podem ser consideradas não citotóxicas. O DBG puro apresenta-se levemente citotóxico, o que pode estar associado ao uso de metanol no preparo da solução usada no experimento. As nanopartículas de ZnO e as fibras que as contêm mostraram-se levemente e moderadamente citotóxicas, respectivamente. A citotoxicidade associada às nanopartículas de ZnO está diretamente ligada à concentração das nanopartículas. A concentração estimada de ZnO no disco de fibra utilizado é de cerca de 50  $\mu\text{g}/\text{disco}$ , que é a mesma concentração da suspensão de nanopartículas utilizada. Segundo à literatura, essa concentração deveria ser no máximo 10  $\mu\text{g}/\text{disco}$  para apresentar um resultado não citotóxico.<sup>106</sup> Estima-se que a citotoxicidade das nanofibras contendo as nanopartículas é superior, devido à presença de aglomerados de ZnO.

**Comentado [RS3]:** Flávia esse teste de citotoxicidade com metanol não faz sentido. Quando se tem substâncias hidrofóbicas o teste seria feito com DMSO, essa seria a boa prática; Porém a essa altura não nada a fazer, mas não faz muito sentido esse resultado. Deve estar preparada para as críticas da banca examinadora.

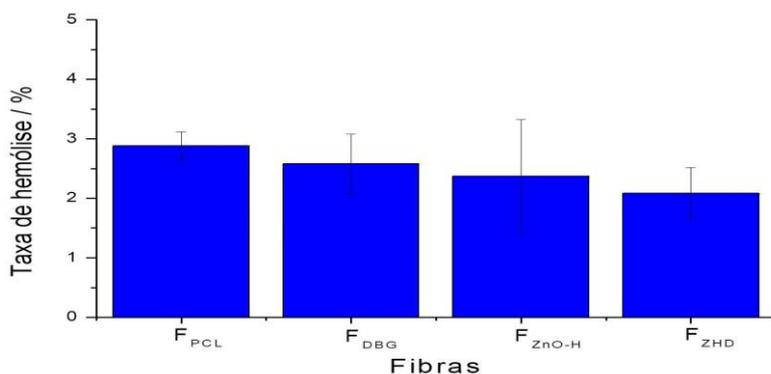
**Figura 32.** Ensaio de MTT com células L929 das nanofibras, do DBG e das nanopartículas de ZnO.



### 5.8. Teste de hemólise

O teste de hemólise permite avaliar a biocompatibilidade dos materiais com as células sanguíneas. Esta análise é importante, pois os nanomateriais produzidos entrariam em contato com o sangue no meio fisiológico.<sup>107</sup> Segundo o método utilizado, uma taxa de hemólise inferior a 5% indica que o material é não tóxico para o sangue. Na Figura 33, observa-se que todas as nanofibras analisadas podem ser consideradas biocompatíveis com as células sanguíneas. Este resultado torna bastante promissor o uso desses nanomateriais em aplicações biomédicas.

**Figura 33.** Valores de taxa de hemólise para as nanofibras.



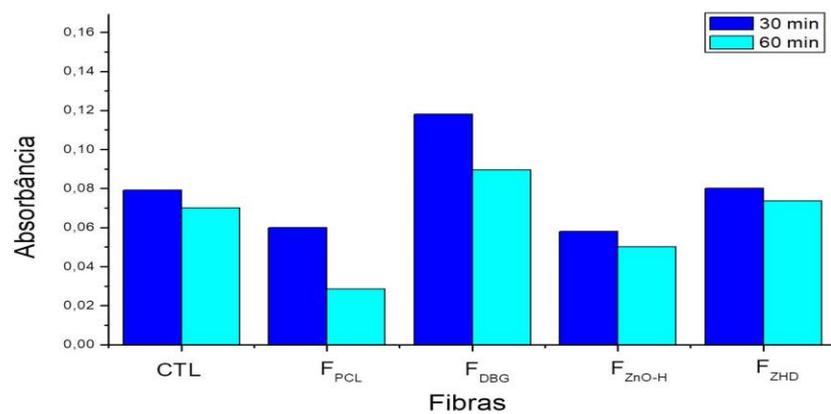
### 5.9. Teste de anticoagulação

O teste de anticoagulação também é importante para avaliar a hemocompatibilidade dos nanomateriais. É de extrema importância que, quando um fármaco e/ou dispositivo entra em contato com o sangue, não se desencadeie um processo de coagulação.<sup>62</sup> No caso das nanofibras produzidas, esse teste é ainda mais relevante, já que estas encapsulam um fármaco anticoagulante DBG.

O gráfico da Figura 34 deve ser interpretado da seguinte forma: quanto maior a absorvância, em relação ao grupo controle, menos evidente é a formação de coágulo e, portanto, melhor é a atividade anticoagulante do material. Dessa maneira, tem-se que as fibras que não contêm o DBG apresentam maior coagulação e que as fibras que contêm o fármaco apresentam efeito

coagulante. Esses resultados, novamente, indicam o potencial uso desses materiais em aplicações biomédicas.

**Figura 34.** Resultados do teste de anticoagulação para as nanofibras.



## 6. Conclusão

Os métodos de coprecipitação e hidrotérmico foram eficazes na produção de nanopartículas de ZnO, com tamanhos médios inferiores a 50 nm. Sendo o método hidrotérmico o que gerou nanopartículas com morfologia mais uniforme.

O processo de eletrofiação foi satisfatório na produção de fibras uniaxiais, com diâmetros médios variando de 225 a 350 nm. A presença das nanopartículas de ZnO e do fármaco DBG levou a uma ligeira redução do diâmetro das nanofibras de PCL.

O trabalho provou o encapsulamento eficiente do fármaco nas nanofibras (*drug loading* > 80%), sendo a liberação via difusão do DBG em meio aquoso lenta e similar tanto para a fibra contendo somente o fármaco quanto para a fibra com nanopartículas de ZnO.

O estudo de citotoxicidade mostrou que a fibra com DBG foi não citotóxica e que a presença das nanopartículas de ZnO causou uma citotoxicidade moderada. E os estudos de hemocompatibilidade mostraram que todas as fibras não provocam hemólise e que as fibras contendo o DBG apresentam um efeito anticoagulante.

Esse trabalho, portanto, mostrou que nanofibras de PCL podem ser sistemas eficientes para o encapsulamento e liberação do anticoagulante DBG.

## 7. Referências

- 1 WHO. **Cardiovascular disease**. 2019. Disponível em: < [https://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/en/](https://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/) >. Acesso em: 14/06/2019.
- 2 HOFFBRAND , A. V.; MOSS, P. A. H. **Essential Haematology**. 6<sup>th</sup>. Wiley-Blackwell, 2011. 468
- 3 PASHNEH-TALA, S.; MACNEIL, S.; CLAEYSENS, F. The Tissue-Engineered Vascular Graft-Past, Present, and Future. **Tissue Engineering Part B-Reviews**, v. 22, n. 1, p. 68-100, Feb 2016. ISSN 1937-3368. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000377212200006 >.
- 4 YALCIN, I. et al. Design of Polycaprolactone Vascular Grafts. **Journal of Industrial Textiles**, v. 45, n. 5, p. 813-833, Mar 2016. ISSN 1528-0837. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000372174900012 >.
- 5 BAE, S. et al. Heparin-Eluting Electrospun Nanofiber Yarns for Antithrombotic Vascular Sutures. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 10, n. 10, p. 8426-8435, Mar 2018. ISSN 1944-8244. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000427910800006 >.
- 6 BANK, D. Warfarin. 2019. Disponível em: < <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00682> >.
- 7 HARTER, K.; LEVINE, M.; HENDERSON, S. O. Anticoagulation Drug Therapy: A Review. **Western Journal of Emergency Medicine**, v. 16, n. 1, p. 11-17, Jan 2015. ISSN 1936-900X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000373109200003 >.
- 8 FONTANA, P.; GOLDBERGER, S. Z.; BOUNAMEAUX, H. Direct oral anticoagulants in the treatment and long-term prevention of venous thrombo-embolism. **European Heart Journal**, v. 35, n. 28, p. 1836-1843, Jul 2014. ISSN 0195-668X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000340068200008 >.
- 9 GABRIELA CESARMAN-MAUS AND GUILLERMO, J. R.-A. News in the Indications of Direct Oral Anticoagulants According to the American College of Chest Physicians 2016 Guidelines. **Current Drug Metabolism**, v. 18, n. 7, p. 651-656, 2017. ISSN 1389-2002/1875-5453. Disponível em: < <http://www.eurekaselect.com/node/151598/article> >.
- 10 VAN RYN, J. et al. Dabigatran etexilate - a novel, reversible, oral direct thrombin inhibitor: Interpretation of coagulation assays and reversal of anticoagulant activity. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 103, n. 6, p. 1116-1127, Jun 2010. ISSN 0340-6245. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000279000000002 >.
- 11 HILLERY, A. M.; LLOYD, A. W.; SWARBRICK, J. **Drug Delivery and Targeting for Pharmacists and Pharmaceutical Scientists**. 2001. ISBN 0-203-34655-6.
- 12 ULUBAYRAM, K. et al. Nanofibers Based Antibacterial Drug Design, Delivery and Applications. **Current Pharmaceutical Design**, v. 21, n. 15, p. 1930-1943, 2015. ISSN 1381-6128. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000352848500003 >.
- 13 PALTA, S.; SAROA, R.; PALTA, A. Overview of the coagulation system. **Indian J Anaesth**, v. 58, n. 5, p. 515-23, Sep 2014. ISSN 0019-5049 (Print) 0019-5049.
- 14 PROFESSIONALS, T. A. F. H. The Coagulation Cascade. 2019. Disponível em: < <https://www.thrombosisadviser.com/a-cascata-da-coagulacao/> >.
- 15 COMEGLIO, P. et al. Blood clotting activation during normal pregnancy. **Thrombosis Research**, v. 84, n. 3, p. 199-202, Nov 1996. ISSN 0049-3848. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996VP82900006 >.
- 16 FAIZ, A. S. et al. Characteristics and Risk Factors of Cancer Associated Venous Thromboembolism. **Thrombosis Research**, v. 136, n. 3, p. 535-541, Sep 2015. ISSN 0049-3848. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000365799900008 >.
- 17 OF, A. S.; HEMATOLOGY. Blod Clots. 2017. Disponível em: < <http://www.hematology.org/Patients/Clots/> >. Acesso em: 16/11/2017.

- 18 **Uso de trombolíticos e alternativas terapêuticas no paciente grave. J. bras. pneumol.** 36: 35-38 p. 2010.
- 19 NHS. Anticoagulant Medicines. 2018. Disponível em: < <https://www.nhs.uk/conditions/anticoagulants/> >.
- 20 AHRENS, I.; LIP, G. Y. H.; PETER, K. New oral anticoagulant drugs in cardiovascular disease. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 104, n. 1, p. 49-60, Jul 2010. ISSN 0340-6245. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000280298300009 >.
- 21 WHITLON, D., JASUTTIE, JW. **Mechanism of coumarin action: significance of vitamin K epoxide reductase inhibition.** *Biochemistry*: 1371–1377 p. 1978.
- 22 STEFFEL, J.; BRAUNWALD, E. Novel oral anticoagulants: focus on stroke prevention and treatment of venous thrombo-embolism. **European Heart Journal**, v. 32, n. 16, p. 1968-U34, Aug 2011. ISSN 0195-668X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000294070300010 >.
- 23 GARCIA, D.; LIBBY, E.; CROWTHER, M. A. The new oral anticoagulants. **Blood**, v. 115, n. 1, p. 15-20, Jan 2010. ISSN 0006-4971.
- 24 COHEN, A. T. et al. The Novel Oral Anticoagulants for Acute Venous Thromboembolism: Is Warfarin Dead? **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 38, n. 1, p. 29-39, Feb 2017. ISSN 1069-3424. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000393014900005 >.
- 25 RUFF, C. T. et al. Comparison of the efficacy and safety of new oral anticoagulants with warfarin in patients with atrial fibrillation: a meta-analysis of randomised trials. **Lancet**, v. 383, n. 9921, p. 955-962, Mar 2014. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000333520700026 >.
- 26 SCHULMAN, S. et al. Dabigatran versus Warfarin in the Treatment of Acute Venous Thromboembolism. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 24, p. 2342-2352, Dec 2009. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000272547600008 >.
- 27 VAN RYN, J. et al. The discovery of dabigatran etexilate. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4, 2013. ISSN 1663-9812. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000347011700012 >.
- 28 COMIN, J.; KALLMES, D. F. Dabigatran (Pradaxa). **American Journal of Neuroradiology**, v. 33, n. 3, p. 426-428, 2012. Disponível em: < <http://www.ajnr.org/content/ajnr/33/3/426.full.pdf> >.
- 29 PROIETTI, M.; BORIANI, G. Use of idarucizumab in reversing dabigatran anticoagulant effect: a critical appraisal. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 14, p. 1483-1488, 2018. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000442631100002 >.
- 30 CHAI, F. J. et al. A solid self-nanoemulsifying system of the BCS class IIb drug dabigatran etexilate to improve oral bioavailability. **Nanomedicine**, v. 11, n. 14, p. 1801-1816, Jul 2016. ISSN 1743-5889. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000379759100004 >.
- 31 ZHANG, X. M. et al. An injectable in situ lipid phase transition system for sustained delivery of dabigatran etexilate with low burst release. **Rsc Advances**, v. 7, n. 89, p. 56594-56601, 2017. ISSN 2046-2069. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000418373300053 >.
- 32 HUANG, Z. M. et al. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. **Composites Science and Technology**, v. 63, n. 15, p. 2223-2253, Nov 2003. ISSN 0266-3538. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000185304300010 >.
- 33 EATEMADI, A. et al. Nanofiber: Synthesis and biomedical applications. **Artificial Cells Nanomedicine and Biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 111-121, Jan 2016. ISSN 2169-1401. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000368022400015 >.

- <sup>34</sup> SHARMA, J. et al. Multifunctional Nanofibers towards Active Biomedical Therapeutics. **Polymers**, v. 7, n. 2, p. 186-219, Feb 2015. ISSN 2073-4360. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000350216800002 >.
- <sup>35</sup> ASGHARI, F. et al. Biodegradable and biocompatible polymers for tissue engineering application: a review. **Artificial Cells Nanomedicine and Biotechnology**, v. 45, n. 2, p. 185-192, 2017. ISSN 2169-1401. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000394596500001 >.
- <sup>36</sup> ZHAI, W. et al. Coaxial electrospinning of P(LLA-CL)/heparin biodegradable polymer nanofibers: potential vascular graft for substitution of femoral artery. **Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials**, v. 107, n. 3, p. 471-478, Apr 2019. ISSN 1552-4973. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000461683400001 >.
- <sup>37</sup> JANJIC, M. et al. Surface modification of endovascular stents with rosuvastatin and heparin-loaded biodegradable nanofibers by electrospinning. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 6343-6355, 2017. ISSN 1178-2013. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000408522000001 >.
- <sup>38</sup> WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer- Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**, v. 35, n. 10, p. 1217-1256, Oct 2010. ISSN 0079-6700. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000283909500002 >.
- <sup>39</sup> CAMERON , R. E.; MOGHADDAM , A. K. 5 - Synthetic bioresorbable polymers. **Woodhead Publishing Series in Biomaterials**, p. 96 - 118, 2012. ISSN 978-1-84569-929-1. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781845699291500052> >.
- <sup>40</sup> CIPITRIA, A. et al. Design, fabrication and characterization of PCL electrospun scaffolds-a review. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 26, p. 9419-9453, 2011. ISSN 0959-9428. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000291878100003 >.
- <sup>41</sup> SUWANTONG, O. Biomedical applications of electrospun polycaprolactone fiber mats. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 27, n. 10, p. 1264-1273, Oct 2016. ISSN 1042-7147. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000384645800001 >.
- <sup>42</sup> AL REZ, M. F. et al. Fabrication and Characterization of Polycaprolactone Micro and Nanofibers for Vascular Tissue Replacement. **Science of Advanced Materials**, v. 7, n. 4, p. 599-605, Apr 2015. ISSN 1947-2935. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000349140800001 >.
- <sup>43</sup> DE VALENCE, S. et al. Long term performance of polycaprolactone vascular grafts in a rat abdominal aorta replacement model. **Biomaterials**, v. 33, n. 1, p. 38-47, Jan 2012. ISSN 0142-9612. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000297399700005 >.
- <sup>44</sup> WANG, Z. H. et al. The effect of thick fibers and large pores of electrospun poly(epsilon-caprolactone) vascular grafts on macrophage polarization and arterial regeneration. **Biomaterials**, v. 35, n. 22, p. 5700-5710, Jul 2014. ISSN 0142-9612. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000336694700007 >.
- <sup>45</sup> PEKTOK, E. et al. Degradation and Healing Characteristics of Small-Diameter Poly(epsilon-Caprolactone) Vascular Grafts in the Rat Systemic Arterial Circulation. **Circulation**, v. 118, n. 24, p. 2563-2570, Dec 2008. ISSN 0009-7322. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000261512400012 >.
- <sup>46</sup> NOTTELET, B. et al. Factorial design optimization and in vivo feasibility of poly(epsilon-caprolactone)-micro- and nanofiber-based small diameter vascular grafts. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 89A, n. 4, p. 865-875, Jun 2009. ISSN 1549-3296. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000265985200003 >.
- <sup>47</sup> RYCHTER, M. et al. Cilostazol-Loaded Poly(epsilon-Caprolactone) Electrospun Drug Delivery System for Cardiovascular Applications. **Pharmaceutical Research**, v. 35, n. 2, p. 20, Feb 2018. ISSN 0724-8741. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000424317700010 >.

- 48 INNOCENTE, F. et al. Paclitaxel-Eluting Biodegradable Synthetic Vascular Prostheses A Step Towards Reduction of Neointima Formation? **Circulation**, v. 120, n. 11, p. S37-S45, Sep 2009. ISSN 0009-7322. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000269773000006 > .
- 49 MISHRA, P. K. et al. Zinc oxide nanoparticles: a promising nanomaterial for biomedical applications. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 12, p. 1825-1834, Dec 2017. ISSN 1359-6446. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000418627100010 > .
- 50 KOŁODZIEJCZAK-RADZIMSKA, A.; JESIONOWSKI, T. Zinc Oxide-From Synthesis to Application: A Review. **Materials**, v. 7, n. 4, p. 2833-2881, Apr 2014. ISSN 1996-1944. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000336091400023 > .
- 51 SABIR, S.; ARSHAD, M.; CHAUDHARI, S. K. Zinc Oxide Nanoparticles for Revolutionizing Agriculture: Synthesis and Applications. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 8, 2014. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1155/2014/925494 > .
- 52 SUAREZ, D. **Preparação e Caracterização de Matrizes Nanoparticuladas na Base de Óxido de Zinco e Polímeros Biodegradáveis para a Liberação Controlada de Antimicrobianos**. 2017. 106 (Doutorado). Química, Universidade Federal de Minas Gerais
- 53 AUGUSTINE, R. et al. Investigation of angiogenesis and its mechanism using zinc oxide nanoparticle-loaded electrospun tissue engineering scaffolds. **Rsc Advances**, v. 4, n. 93, p. 51528-51536, 2014. ISSN 2046-2069. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000344387400062 > .
- 54 \_\_\_\_\_. Electrospun polycaprolactone/ZnO nanocomposite membranes as biomaterials with antibacterial and cell adhesion properties. **Journal of Polymer Research**, v. 21, n. 3, Feb 2014. ISSN 1022-9760. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000331723500001 > .
- 55 \_\_\_\_\_. Electrospun polycaprolactone membranes incorporated with ZnO nanoparticles as skin substitutes with enhanced fibroblast proliferation and wound healing. **Rsc Advances**, v. 4, n. 47, p. 24777-24785, 2014. ISSN 2046-2069. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000338042800047 > .
- 56 AUGUSTINE, R.; KALARIKKAL, N.; THOMAS, S. Effect of zinc oxide nanoparticles on the in vitro degradation of electrospun polycaprolactone membranes in simulated body fluid. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 65, n. 1, p. 28-37, 2016. ISSN 0091-4037. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000362723600004 > .
- 57 NICKERSON, B. **Sample Preparation of Pharmaceutical Dosage Forms**. 1. New York: Springer US, 2011. 397 ISBN 978-1-4419-9631-2.
- 58 XIAO, Y. et al. Measurement and prediction of dabigatran etexilate mesylate Form II solubility in mono-solvents and mixed solvents. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 103, p. 44-50, Dec 2016. ISSN 0021-9614. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000384056300006 > .
- 59 LTD, B. I. C. **PRADAXA, Product Monograph** 2019.
- 60 PINZON-GARCIA, A. D. et al. Efficient cutaneous wound healing using bixin-loaded PCL nanofibers in diabetic mice. **Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials**, v. 105, n. 7, p. 1938-1949, Oct 2017. ISSN 1552-4973. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000409231400022 > .
- 61 MORGAN, D. M. L. Tetrazolium (MTT) Assay for Cellular Viability and Activity. In: MORGAN, D. M. L. (Ed.). **Polyamine Protocols**. Totowa, NJ: Humana Press, 1998. p.179-184. ISBN 978-1-59259-565-5.
- 62 ZHANG, L. Q. et al. Electrospun PEGylated PLGA nanofibers for drug encapsulation and release. **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications**, v. 91, p. 255-262, Oct 2018. ISSN 0928-4931. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000442192000026 > .

- <sup>63</sup> MOHAMMAD, V.; AHMAD, U.; YOON-BONG, H. **Metal Oxide Nanostructures and Their Applications - ZnO Nanoparticles: Growth, Properties, and Applications**. American Scientific Publisher, 2010. 3500 ISBN 1-58883-170-1.
- <sup>64</sup> BINDU, P.; THOMAS, S. Estimation of lattice strain in ZnO nanoparticles: X-ray peak profile analysis. **Journal of Theoretical and Applied Physics**, v. 8, n. 4, p. 123-134, December 01 2014. ISSN 2251-7235. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s40094-014-0141-9> >.
- <sup>65</sup> NOEI, H. et al. The identification of hydroxyl groups on ZnO nanoparticles by infrared spectroscopy. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 10, n. 47, p. 7092-7097, 2008. ISSN 1463-9076. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000261741900005 >.
- <sup>66</sup> GETIE, S. et al. Synthesis and Characterizations of Zinc Oxide Nanoparticles for Antibacterial Applications. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, 2017.
- <sup>67</sup> BODKE, M. R.; PURUSHOTHAM, Y.; DOLE, B. N. Comparative study on zinc oxide nanocrystals synthesized by two precipitation methods. **Cerâmica**, v. 64, p. 91-96, 2018. ISSN 0366-6913. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0366-69132018000100091&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0366-69132018000100091&nrm=iso) >.
- <sup>68</sup> VAEZI, M. R.; SADRNEZHAAD, S. K. Nanopowder synthesis of zinc oxide via solochemical processing. **Materials & Design**, v. 28, n. 2, p. 515-519, 2007. ISSN 0261-3069. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000242859100018 >.
- <sup>69</sup> MOHARRAM, A. H. et al. Direct Precipitation and Characterization of ZnO Nanoparticles. **Journal of Nanomaterials**, 2014. ISSN 1687-4110. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000331321000001 >.
- <sup>70</sup> KAYANI, Z. N.; SALEEMI, F.; BATOOL, I. Effect of calcination temperature on the properties of ZnO nanoparticles. **Applied Physics a-Materials Science & Processing**, v. 119, n. 2, p. 713-720, May 2015. ISSN 0947-8396. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000355236200041 >.
- <sup>71</sup> PARIHAR, V.; RAJA, M.; PAULOSE, R. A BRIEF REVIEW OF STRUCTURAL, ELECTRICAL AND ELECTROCHEMICAL PROPERTIES OF ZINC OXIDE NANOPARTICLES. **Reviews on Advanced Materials Science**, v. 53, n. 2, p. 119-130, 2018. ISSN 1606-5131. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000431755100001 >.
- <sup>72</sup> SENTHILKUMAR, N. et al. Synthesis of ZnO nanoparticles using leaf extract of *Tectona grandis* (L.) and their anti-bacterial, anti-arthritic, anti-oxidant and in vitro cytotoxicity activities. **New Journal of Chemistry**, v. 41, n. 18, p. 10347-10356, Sep 2017. ISSN 1144-0546. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000411767400086 >.
- <sup>73</sup> KOLBUK, D. et al. The Effect of Selected Electrospinning Parameters on Molecular Structure of Polycaprolactone Nanofibers. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 64, n. 7, p. 365-377, 2015. ISSN 0091-4037. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000351434300004 >.
- <sup>74</sup> ANGAMMANA, C. J.; JAYARAM, S. H. Analysis of the Effects of Solution Conductivity on Electrospinning Process and Fiber Morphology. **Ieee Transactions on Industry Applications**, v. 47, n. 3, p. 1109-1117, May-Jun 2011. ISSN 0093-9994. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000290733800005 >.
- <sup>75</sup> LOPEZ-ESPARZA, J. et al. Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles in Polycaprolactone Nanofibers against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 55, n. 49, p. 12532-12538, Dec 2016. ISSN 0888-5885. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000389963100004 >.
- <sup>76</sup> KAMARUZAMAN, N. A. et al. **Effects on Diameter and Morphology of Polycaprolactone Nanofibers Infused with Various Concentrations of Selenium Nanoparticles**. 3rd Advanced Materials Conference (AMC). Langkawi, MALAYSIA. Nov 28-29, 2016. p.

- 77 ZAFAR, M. et al. Potential of Electrospun Nanofibers for Biomedical and Dental Applications. **Materials**, v. 9, n. 2, Feb 2016. ISSN 1996-1944. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000371828100016 >.
- 78 RODRIGUEZ-TOBIAS, H. et al. Novel antibacterial electrospun mats based on poly(d,l-lactide) nanofibers and zinc oxide nanoparticles. **Journal of Materials Science**, v. 49, n. 24, p. 8373-8385, Dec 2014. ISSN 0022-2461. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000342453000017 >.
- 79 PERSENAIRE, O. et al. Mechanisms and kinetics of thermal degradation of poly(epsilon-caprolactone). **Biomacromolecules**, v. 2, n. 1, p. 288-294, Spr 2001. ISSN 1525-7797. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000168755800039 >.
- 80 ARRAIZA, A. L. et al. Rheological behavior and modeling of thermal degradation of poly(epsilon-caprolactone) and poly(L-lactide). **International Polymer Processing**, v. 22, n. 5, p. 389-394, Nov 2007. ISSN 0930-777X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000250851800003 >.
- 81 BARTRA SANMARTÍ, M. B., (ES), ESPINOSA FERRER, ROSA MARIA (BARBERÀ DEL VALLÈS, ES), LUPON ROSES, MARIA DEL PILAR (BARCELONA, ES), WINTER, STEPHEN BENEDICT DAVID (SANTA COLOMA DE CERVELLÓ, ES), DONNICI GARCIA, SILVIA (BARCELONA, ES),. **Solid forms of dabigatran etexilate mesylate and processes for their preparation**. United States: ESTEVE QUÍMICA, S.A. (Barcelona, ES), 2015.
- 82 SHENG, L. B. et al. Electrospun Cellulose Nanocrystals/Polycaprolactone Nanocomposite Fiber Mats. **Journal of Macromolecular Science Part B-Physics**, v. 53, n. 5, p. 820-828, May 2014. ISSN 0022-2348. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000335840300006 >.
- 83 TARAFDER, S.; NANSEN, K.; BOSE, S. Lovastatin release from polycaprolactone coated beta-tricalcium phosphate: effects of pH, concentration and drug-polymer interactions. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 33, n. 6, p. 3121-3128, 2013. ISSN 1873-0191 0928-4931. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23706191> >.Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3767773/> >.
- 84 WANG, X. F. et al. Crystalline Morphology of Electrospun Poly(epsilon-caprolactone) (PCL) Nanofibers. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 52, n. 13, p. 4939-4949, Apr 2013. ISSN 0888-5885. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000317259000029 >.
- 85 RAMÍREZ-CEDILLO, E. et al. Electrospun Polycaprolactone Fibrous Membranes Containing Ag, TiO<sub>2</sub> and Na<sub>2</sub>Ti<sub>6</sub>O(13) Particles for Potential Use in Bone Regeneration. **Membranes**, v. 9, n. 1, p. 12, 2019. ISSN 2077-0375. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30634630> >.Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6359384/> >.
- 86 NAGADEEP, J.; KAMARAJ, P.; ARTHANAREESWARI, M. Gradient RP-HPLC method for the determination of potential impurities in dabigatran etexilate in bulk drug and capsule formulations. **Arabian Journal of Chemistry**, 2015. ISSN 1878-5352. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535215002920> >.
- 87 SHANKAR, P. et al. Scientific cofomer screening, preparation and evaluation of Dabigatran Etexilate Mesylate Cocrystal. **Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 4, p. 810-820, 2018.
- 88 MONTEIRO, M. S. D. S. B.; TAVARES, M. I. B. The Development and Characterization of Polycaprolactone and Titanium Dioxide Hybrids. **Advances in Nanoparticles**, v. 7, p. 11-27, 2018. ISSN 2169-0529.
- 89 ELZEIN, T. et al. FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 273, n. 2, p. 381-387, May 2004. ISSN 0021-9797. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000220999000006 >.

- <sup>90</sup> REYES-LOPEZ, S. Y.; CORNEJO-MONROY, D.; GONZALEZ-GARCIA, G. A Novel Route for the Preparation of Gold Nanoparticles in Polycaprolactone Nanofibers. **Journal of Nanomaterials**, 2015. ISSN 1687-4110. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000355114400001 >.
- <sup>91</sup> HEZI-YAMIT, A. et al. Impact of polymer hydrophilicity on biocompatibility: Implication for DES polymer design. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 90A, n. 1, p. 133-141, Jul 2009. ISSN 1549-3296. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000266648700013 >.
- <sup>92</sup> KHAN, M. Q. et al. Preparation and characterizations of multifunctional PVA/ZnO nanofibers composite membranes for surgical gown application. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 8, n. 1, p. 1328-1334, 2019. ISSN 22387854. Disponível em: < http://www.jmrt.com.br/en-preparation-characterizations-multifunctional-pva-zno-nanofibers-articulo-S2238785418303272 >.
- <sup>93</sup> LIU, W. et al. Effects of plasma treatment to nanofibers on initial cell adhesion and cell morphology. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 113, p. 101-106, Jan 2014. ISSN 0927-7765. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000331670200013 >.
- <sup>94</sup> BERNARDI, R. M.; FROELICH, P. E.; BERGOLD, A. M. Development and Validation of a Stability-Indicating Liquid Chromatography Method for the Determination of Dabigatran Etxilate in Capsules. **Journal of Aoac International**, v. 96, n. 1, p. 37-41, Jan-Feb 2013. ISSN 1060-3271. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000315254300008 >.
- <sup>95</sup> EL ZAHER, A. A. et al. Development and Validation of Chromatographic Methods for the Quantification of Dabigatran Etxilate Mesylate in the Presence of Its Risky Degradation Products. **Jpc-Journal of Planar Chromatography-Modern Tlc**, v. 31, n. 6, p. 461-468, Dec 2018. ISSN 0933-4173. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000450609300007 >.
- <sup>96</sup> KUHN, J. et al. UPLC-MRM Mass Spectrometry Method for Measurement of the Coagulation Inhibitors Dabigatran and Rivaroxaban in Human Plasma and Its Comparison with Functional Assays. **Plos One**, v. 10, n. 12, Dec 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000367092600088 >.
- <sup>97</sup> TORRES-MARTINEZ, E. J. et al. A Summary of Electrospun Nanofibers as Drug Delivery System: Drugs Loaded and Biopolymers Used as Matrices. **Current Drug Delivery**, v. 15, n. 10, p. 1360-1374, 2018. ISSN 1567-2018. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000450647300001 >.
- <sup>98</sup> SHARGEL, L.; YU, A.; WU-PONG, S. **Modified-Release Drug Products**. In: (Ed.). **Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics**. Sixth. United States: McGraw-Hill Education, 2012. cap. 17, p.832. ISBN 007160393X.
- <sup>99</sup> AL-ENIZI, A. M.; ZAGHO, M. M.; ELZATAHRY, A. A. Polymer-Based Electrospun Nanofibers for Biomedical Applications. **Nanomaterials**, v. 8, n. 4, Apr 2018. ISSN 2079-4991. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000434889100080 >.
- <sup>100</sup> ANDRADY, A. L. **Science and Technology of Polymer Nanofibers**. New Jersey (US): John Wiley & Sons, Inc., 2008. ISBN 9780470229842.
- <sup>101</sup> PISANI, S. et al. Release Profile of Gentamicin Sulfate from Polylactide-co-Polycaprolactone Electrospun Nanofiber Matrices. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 4, Apr 2019. ISSN 1999-4923. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000467301400016 >.
- <sup>102</sup> DIAS, A. M. et al. Polycaprolactone nanofibers loaded oxytetracycline hydrochloride and zinc oxide for treatment of periodontal disease. **Materials Science and Engineering: C**, v. 103, p. 109798, 2019. ISSN 0928-4931. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493118319015 >.
- <sup>103</sup> HIGUCHI, T. MECHANISM OF SUSTAINED-ACTION MEDICATION - THEORETICAL ANALYSIS OF RATE OF RELEASE OF SOLID DRUGS DISPERSED IN SOLID MATRICES. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 12, p. 1145-8, 1963. ISSN 0022-3549. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A19636553B00007 >.

- <sup>104</sup> HEAH, K. G. et al. A Review on Di Methyl Thiazoldiphenyl-Tetrazoliumbromide (MTT) Assay in Cell Viability. **Research Journal of Applied Sciences**, v. 12, p. 372-378, 2017.
- <sup>105</sup> BASAK, V. et al. Evaluation of cytotoxicity and gelatinases activity in 3T3 fibroblast cell by root repair materials. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 30, n. 5, p. 984-990, Oct 2016. ISSN 1310-2818. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000384537200022 >.
- <sup>106</sup> YANG, H. et al. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. **Journal of Applied Toxicology**, v. 29, n. 1, p. 69-78, Jan 2009. ISSN 0260-437X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000262271000010 >.
- <sup>107</sup> JEONG, H. et al. In vitro blood cell viability profiling of polymers used in molecular assembly. **Scientific Reports**, v. 7, Aug 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000408448600018 >.