

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais
e de Minas**

Dissertação de Mestrado

**Desenvolvimento e Caracterização de Nanofibras Obtidas pela
Técnica de Eletrofiação Coaxial Visando a Liberação de
Bevacizumabe para o Tratamento de Degeneração Macular
Relacionada a Idade**

Autor: Sarah Oliveira Lamas de Souza

Orientador: Prof. Rodrigo Lambert Oréfice

Coorientadora: Sílvia Ligório Fialho

Janeiro/2016

Sarah Oliveira Lamas de Souza

**Desenvolvimento e Caracterização de Nanofibras Obtidas pela
Técnica de Eletrofiação Coaxial Visando a Liberação de
Bevacizumabe para o Tratamento de Degeneração Macular
Relacionada a Idade**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas.

Área de Concentração: Ciências e Engenharia de Materiais

Orientador: Prof. Rodrigo Lambert Oréfice

Coorientadora: Sílvia Ligório Fialho

Belo Horizonte

Universidade Federal de Minas Gerais

Escola de Engenharia

2016

S719d

Souza, Sarah Oliveira Lamas de.

Desenvolvimento e caracterização de nanofibras obtidas pela técnica de eletrofiação coaxial visando a liberação de Bevacizumabe para o tratamento de degeneração macular relacionada a idade [manuscrito] Sarah Oliveira Lamas de Souza. - 2016.

xiii, 78 f., enc.: il.

Orientador: Rodrigo Lambert Oréfice.

Coorientadora: Sílvia Ligório Fialho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.

Bibliografia: f. 68-78.

1. Engenharia metalúrgica - Teses. 2. Ciência dos materiais - Teses. 3. Retina - Doenças - Teses. I. Oréfice, Rodrigo Lambert, 1968-. II. Fialho, Sílvia Ligório. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia. IV. Título.

CDU: 669(043)

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela vida e proteção, e por me mostrar os melhores caminhos durante esta caminhada.

À minha mãe, irmãos e cunhados pelo carinho e conselhos, e por estarem sempre presentes. À minha sobrinha que ainda tão pequena tem a habilidade de fortalecer os elos dos que estão por perto e nos permitir um amor tão sincero.

Ao Arthur, que esteve comigo em todos os momentos. Pelo amor, incentivo e compreensão, que faz da minha vida um grande motivo de felicidade.

Ao Rodrigo Oréfice pela orientação, incentivo e pela confiança depositada em mim. Uma pessoa a quem muito admiro e que muitas vezes me transmitiu uma tranquilidade em que eu precisava naquele momento.

À Silvia Fialho pela disponibilidade, sugestões e por me acolher carinhosamente em seu ambiente de trabalho.

À Luísa e ao Giovanni que iniciaram o mestrado comigo, pelas conquistas e angústias compartilhadas nesse período. E juntamente com os colegas do laboratório LEPCoM Anderson, Camila, Diego, Giuliano, Marys, Matheus, Nicolas, Orlando, Túlio e Viviane, agradeço pelas contribuições técnicas e pela convivência dentro e fora do laboratório. À Eliane Ayres que considero membro da equipe, por transmitir seus conhecimentos e entusiasmos de forma que o dia a dia se torne mais agradável.

Ao Tadeu Lima, Alexandra Rodrigues, Janaina Villanova, Monique Cotrim, Maíra Moraes e Fernanda Borsagli pela amizade, pelas conversas alegres e pela disponibilidade em ajudar sempre que preciso.

À Maria Carolina Guerra, Luiz Guilherme Heneine e a Valéria Correia da FUNED pela contribuição neste trabalho e conhecimentos transmitidos.

Ao pessoal da FUNED Brenda, Samuel, Bruna, Daniele, Oliver e Marina pelas ajudas com os experimentos e convivência no laboratório.

Ao pessoal do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da UFMG Vinícius Pereira, Marcela, Vinícius Borges e Diogo pelo grande apoio no desenvolvimento deste trabalho, principalmente ao Prof. Armando Cunha Júnior por disponibilizar o seu laboratório para os nossos experimentos.

À Carolina Reis, pela empresa CELLSEQ, pela contribuição do teste de citotoxicidade no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do ICB da UFMG disponibilizado pelo Prof. Dawison Gomes e pelo Prof. Alfredo Góes.

À Ana Eliza pela convivência e pela colaboração com as análises térmicas e à Patrícia pela colaboração das imagens do MEV.

Ao Centro Brasileiro de Ciências Visuais (CBCV) por disponibilizar o Avastin® para a realização deste trabalho.

Aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação da Engenharia Metalúrgica e de Minas da UFMG, Cida e Nelson.

Agradeço a todos que de alguma forma, contribuíram na realização deste trabalho.

Sumário

Agradecimentos	iv
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tabelas.....	xi
Siglas e abreviaturas.....	xii
Resumo.....	xiv
Abstract.....	xv
Capítulo 1: Introdução.....	1
Capítulo 2: Objetivos.....	3
2.1 Objetivo Geral.....	3
2.2 Objetivos Específicos.....	3
Capítulo 3: Revisão Bibliográfica.....	4
3.1 Eletrofiação.....	4
3.1.1 Processo de Eletrofiação.....	5
3.1.2 Parâmetros da solução.....	6
3.1.3 Parâmetros do processo.....	7
3.1.4 Parâmetros ambientais.....	9
3.1.5 Eletrofiação coaxial.....	9
3.2 Aplicações na área biomédica.....	12
3.2.1 Poli(ϵ -caprolactona) - PCL.....	14
3.2.2 Gelatina.....	15
3.2.3 Poli(álcool vinílico) - PVA.....	15
3.3 Biomateriais na oftalmologia.....	16
3.3.1 Bulbo Ocular.....	17
3.3.2 Segmento posterior do bulbo do olho.....	17
3.3.3 Degeneração Macular Relacionada à idade (DMRI).....	19
3.3.4 Bevacizumabe (Avastin®).....	21
Capítulo 4: Materiais e Métodos.....	23
4.1 Processamento de nanofibras por eletrofiação com estrutura <i>core-shell</i>	23
4.2 Caracterização.....	25
4.2.1 Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	25

4.2.2	Termogravimetria (TG) e Termogravimetria Derivada (DTG)	26
4.2.3	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	26
4.2.4	Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)	26
4.3	Ensaio biológicos	26
4.3.1	Avaliação da atividade do Bevacizumabe pelo teste ELISA indireto.....	27
4.3.2	Avaliação da atividade do Bevacizumabe incorporado ao sistema biodegradável de nanofibras poliméricas utilizando-se modelo de membrana corioalantóica de embrião de galinha (CAM)	29
4.3.3	Avaliação da citotoxicidade pela redução do MTT	30
Capítulo 5: Resultados e Discussão.....		33
5.1	MEV e MET.....	33
5.2	Análise Térmica	40
5.2.1	Análise térmica das nanofibras PCL/gelatina, PVA e Coaxial.....	40
5.2.2	Análise térmica das nanofibras PCL, PVA e Coaxial com as diferentes concentrações do Bevacizumabe.....	46
5.3	Infravermelho FTIR-ATR	53
5.3.1	Espectros infravermelho das nanofibras PCL/gelatina, PVA e Coaxial.....	53
5.3.2	Espectros infravermelho das nanofibras PCL/gelatina, PVA e Coaxial com a incorporação do Bevacizumabe	56
5.4	Ensaio biológicos	57
5.4.1	Avaliação da atividade do Bevacizumabe pelo teste ELISA indireto.....	57
5.4.2	Avaliação da angiogênese utilizando o modelo Membrana Corioalantóica (CAM) de embrião de galinha.....	60
5.4.3	Avaliação da citotoxicidade pela redução do MTT.....	63
Capítulo 6: Conclusão.....		66
Capítulo 7: Sugestões para trabalhos futuros.....		67
Referências Bibliográficas		68

Lista de Figuras

Figura 3.1 - Eletrofiação coaxial, adaptado de WANG et al., 2013.	10
Figura 3.2 - Representação estrutura química da poli (ϵ -caprolactona). Fonte: Sigma-Aldrich.....	14
Figura 3.3 - Representação da estrutura química do poli (álcool vinílico). Fonte: Sigma-Aldrich.....	16
Figura 3.4 - Estruturas do bulbo do olho. Fonte Google.	17
Figura 3.5 - <i>Anatomia do olho. Fonte Angiogenesis Foundation</i>	20
Figura 3.6 - Depósitos de drusas que provocam a distorção da visão. Fonte Angiogenesis Foundation.....	20
Figura 3.7 - Crescimento anormal de vasos sanguíneos responsáveis pelo extravasamento de sangue e líquido. Fonte: Angiogenesis Foundation.	20
Figura 4.1 - Equipamento de electrospinning (INSTOR – Sistemas de Inspeção Robótica). Lab. LEPCOM.....	25
Figura 4.2 - Dispositivo coaxial. Lab. LEPCOM.....	25
Figura 4.3 - Esquema representativo do ELISA, CROWTHER, 2000.	27
Figura 4.4 - a) Abertura da casca do ovo evidenciando a membrana carioalantóica; b) Ovos selados com fita adesiva transparente na incubadora.....	30
Figura 4.5 - ARPE-19 em aumentos de 20X (A e B) e 100X (C). Fonte: VIEIRA, 2011.	31
Figura 4.6 - Esquema da placa utilizada nos testes de citotoxicidade do Bevacizumabe e nanofibras para a ARPE-19.....	32
Figura 5.1 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (20.000X) e histogramas representativos dos diâmetros das nanofibras: (a) nanofibras de PCL/gelatina; (b) nanofibras de PCL/gelatina.Bva 0,5%; (c) nanofibras de PCL.gelatina.Bva 1%; (d) nanofibras de PCL.gelatina.Bva 2%; (e) nanofibras de PCL/gelatina.Bva 4%.	35
Figura 5.2 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (20.000 X) e histogramas representativos dos diâmetros das nanofibras: a) nanofibras de PVA; b) nanofibras de PVA.Bva 0,5%; c) nanofibras de PVA.Bva 1%; d) nanofibras de PVA.Bva 2%; e) nanofibrsa de Pva.Bva 4%.	37
Figura 5.3 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (20.000 X) e histogramas representativos dos diâmetros das nanofibras. a) nanofibras Coaxial; b) nanofibras Coaxial.Bva 0,05%; c) nanofibras Coaxial.Bva 1%; d) nanofibras Coaxial.Bva 2%; e) nanofibras Coaxial.Bva 4%.	39

Figura 5.4 - Imagem da estrutura de nanofibrasCoaxial contendo CuSO_4 através de microscopia eletrônica de transmissão.....	40
Figura 5.5 - Análise da TG e DTG das nanofibras a)PCL/gelatina, b)PVA e c) coaxial.	43
Figura 5.6 - Curvas DSC para o 1º aquecimento. Comparação das nanofibras a) PCL, b) PVA e c) coaxial.....	44
Figura 5.7 - Curvas do DSC para o resfriamento. Comparação das nanofibras a) PCL, b) PVA e c) coaxial.....	45
Figura 5.8 - Curvas DSC para o segundo aquecimento. Comparação das nanofibras a) PCL, b) PVA e c) coaxial.	45
Figura 5.9 - Curvas da TG das nanofibras de PCL, PVA e Coaxial e das nanofibras PCL, PVA e coaxial contendo Bevacizumabe.	48
Figura 5.10 - Curvas de DSC para o 1º aquecimento, resfriamento e 2º aquecimento das nanofibras: (a) PCL, (b) PCL.Bva 0,5%, (c) PCL.Bva 1%, (d) PCL.Bva 2%, (e) PCL.Bva 4%.....	51
Figura 5.11 - Curvas de DSC para o 1º aquecimento, resfriamento e 2º aquecimento das nanofibras: (a) PVA, (b) PVA.Bva 0,5%, (c) PVA.Bva 1%, (d) PVA.Bva 2%, (e) PVA.Bva 4%.....	52
Figura 5.12 - Curvas de DSC para o 1º aquecimento, resfriamento e 2º aquecimento das nanofibras: (a) Coaxial, (b) Coaxial.Bva 0,5%, (c) Coaxial.Bva 1%, (d) Coaxial.Bva 2%, (e) Coaxial.Bva 4%.....	52
Figura 5.13 - Espectro FTIR-ART das nanofibras de PCL/gelatina e filme de gelatina.	54
Figura 5.14 - Espectro do FTIR-ATR das nanofibras de PVA.	54
Figura 5.15 - Comparação dos espectros de FTIR-ATR das nanofibras coaxial antes de ser lavada com TFE, após ser lavada e a nanofibras de PVA como controle.	55
Figura 5.16 - Comparação dos espectros de FTIR-ATR da nanofibra coaxial PCL/PVA antes de ser lavada, após ser lavada e a nanofibra de PCL como controle.....	56
Figura 5.17 - Espectro da solução do Bevacizumabe, e das nanofibras PCL, PVA e Coaxial contendo Bva 10%.	57
Figura 5.18 - Representação da interação anticorpo antígeno das concentrações do Bva para a curva padrão.	58
Figura 5.19 - Curva padrão do Bevacizumabe.	58
Figura 5.20 - (a) Liberação acumulada (%) da Bva na amostra PVA.Bva 4%. (b) Perfil de liberação do Bva das nanofibras em relação a amostra PVA.Bva 4%.	59

Figura 5.21 - Imagens dos vasos e respectivos pixels dos grupos: (a) PBS; (b) 250µg Bva; nanofibras: (c) Pva, (d)PVA.Bva 0,5%, (e)PVA.Bva 1%, (f)PVA.Bva 2%, (g) PVA.Bva 4%, (h)Coaxial (i) Coaxial.Bva 0,5%, (j) Coaxial.Bva 1%, (k) Coaxial.Bva 2%, (l) Coaxial.Bva 4%.....	61
Figura 5.22 - Redução dos vasos sanguíneos das amostras em relação ao controle (PBS).	62
Figura 5.23 - Viabilidade celular em 24 horas através do ensaio MTT.....	63
Figura 5.24 - Viabilidade celular em 72 horas através do ensaio MTT.....	64

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Média dos diâmetros das nanofibras PCL/gelatina, PVA e coaxial PCL/PVA nas diferentes concentrações de Bevacizumabe.....	33
Tabela 2 - Valores da temperatura de transição vítrea (Tg), temperatura de fusão (Tm), entalpia de fusão (ΔH_m), temperatura de cristalização (Tc) e entalpia de cristalização (ΔH_c) obtidos no 1º aquecimento, resfriamento e 2º aquecimento das nanofibras de PCL, PVA e coaxial((1)representa os valores do 1º aquecimento, (2) resfriamento e (3) o 2º resfriamento) via DSC.....	43
Tabela 3 - Resultados da TG e DTG das nanofibras de PCL, PVA e Coaxial e das nanofibras PCL, PVA e coaxial contendo Bevacizumabe.....	47
Tabela 4 - Valores da temperatura de transição vítrea (Tg), temperatura de fusão (Tm), entalpia de fusão (ΔH_m) e temperatura de cristalização (Tc) e entalpia de cristalização (ΔH_c) obtidos no 1º aquecimento, resfriamento e 2º aquecimento das curvas DSC das nanofibras de PCL/gelatina, PVA e coaxial e das nanofibras PCL/gelatina, PVA e coaxial contendo Bevacizumabe ((1)representa os valores do 1º aquecimento, (2) resfriamento e (3) 2º resfriamento).....	49

Siglas e abreviaturas

AMD Age-related macular degeneration

Anti-Human IgG Anticorpo utilizado no teste Elisa

ARPE Arising Retinal Pigment Epithelia- EPR, cultura de célula do epitélio pigmentado da retina

ATR Reflexão Total Atenuada

Bloom Força do gel (elasticidade mecânica do gel)

Bva Bevacizumabe

CAM membrana corioalantóica (“chorioallantoic membrane”, CAM) de ovo de galinha

Coaxial.Bva nanofibra core-shell PCL/Gelatina/PVA e Bevacizumabe

DMEM Minimal Essential Medium, meio de cultura utilizado pela maioria das células

DMRI Degeneração Macular Relacionada à Idade

DNA ou ADN Ácido desoxirribonucléico

DTG Termogravimetria Derivada

ELISA Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – Ensaio imunoenzimático

FDA Food and Drug Administration

FTIR Espectroscopia infravermelho

H₂O₂ Peróxido de Hidrogênio

H₂SO₄ Ácido Sulfúrico

K₂HPO₄ Fosfato monopotássico

kV Quilovolts

MEV Microscopia Eletrônica de Varredura

NaCl Cloreto de Sódio

Na₂CO₃ Carbonato de sódio

NaHCO₃ Bicarbonato de sódio

Na₂HPO₄ Fosfato dissódico

ng Nanograma

nm Nanômetro

µm Micrometro

PBS Solução salina tamponada com fosfato

PCL Poli(ε-caprolactona)

PCL/gelatina.Bva Poli(ϵ -caprolactona)/gelatina e Bevacizumabe

PEG Poli(etileno glicol)

PVA Poli(álcool vinílico)

PVA.Bva Poli(álcool vinílico) e Bevacizumabe

OPD Ortofenilenodiamina

SBF Soro Fetal Bovino

TFE Trifluoroetanol

TG Termogravimetria

VEGF Fator de crescimento do endotélio vascular

Resumo

A eletrofiação coaxial é reconhecida como uma técnica eficiente para a fabricação de nanofibras *core-shell* (casca-núcleo). A eletrofiação coaxial permite encapsular agentes bioativos frágeis em soluções aquosas e eliminar os efeitos prejudiciais decorrentes do contato direto dos agentes com solventes ou das condições adversas durante o processamento. A degeneração macular relacionada à idade (DMRI) atinge a região central da retina, a mácula, e é a principal causa de cegueira em indivíduos acima de 50 anos de idade. Fatores angiogênicos têm sido determinantes no processo neovascular, o que levou ao uso de fármacos antiangiogênicos, como o Bevacizumabe, no tratamento atual desta patologia. Neste trabalho, pela técnica de eletrofiação coaxial, foram produzidas nanofibras biodegradáveis *core-shell* para incorporação e liberação de Bevacizumabe. A casca das nanofibras foi constituída de policaprolactona e gelatina, enquanto poli(álcool vinílico) e Bevacizumabe foram usados na formação do núcleo das nanofibras. As nanofibras foram caracterizadas pela Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Termogravimetria (TG) e Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR). Nanofibras produzidas foram também avaliadas *in vitro* quanto à biocompatibilidade e à atividade antiangiogênica do Bevacizumabe. Os resultados obtidos comprovaram a viabilidade de produção das nanofibras casca-núcleo com PCL/gelatina como formador da casca, enquanto o núcleo das nanofibras foi formado pelo PVA. As nanofibras não apresentaram citotoxicidade às células, mesmo na presença do Bevacizumabe. Bevacizumabe manteve a sua atividade antiangiogênica quando incorporado ao sistema.

Palavras-chave: Eletrofiação coaxial, nanofibras casca-núcleo, degeneração macular relacionada à idade, Bevacizumabe.

Abstract

The coaxial electrospinning is known as an efficient technique for manufacturing core-shell nanofibers. The coaxial electrospinning allows the encapsulation of fragile bioactive agents in water solutions and eliminates the harmful effects resulting from direct contact with solvents and adverse conditions during processing. The age-related macular degeneration (AMD) affects the central retina, the macula, and is the leading cause of blindness in people over 50 years old. Angiogenic factors have been associated with the neovascular process, which led to the use of antiangiogenic drugs, such as bevacizumab as the current treatment of this pathology. In this work, the technique of coaxial electrospinning was used to produce biodegradable core-shell nanofibers for incorporation and release of bevacizumab. Poly(caprolactone) and gelatin were used to form the shell of the nanofiber, while poly(vinyl alcohol) and bevacizumab were part of the core. Nanofibers were characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM), thermogravimetry (TG) and Fourier transform infrared (FT-IR). The *in vitro* biocompatibility, antiangiogenic activity and the activity of bevacizumab were also evaluated. The obtained results proved the viability of the production of core-shell nanofibers having PCL/gelatin as the shell and PVA as the core material. The nanofibers showed no cytotoxicity to the cells, even in the presence of Bevacizumab. Bevacizumab maintained its antiangiogenic activity when incorporated into the system.

Keywords: Coaxial electrospinning, core-shell nanofibers, Age-related macular degeneration, Bevacizumab.

Capítulo 1: Introdução

A técnica de eletrofiação (ou fiação eletrostática) ganhou uma atenção considerável nas últimas décadas, principalmente pelo seu potencial de produção de materiais constituídos de nanofibras (COSTA *et al.*, 2012).

Essas nanofibras que, quando reunidas, podem dar origem a mantas e membranas apresentam características como grande área superficial específica, alta porosidade e interconectividade, tornando-as adequadas para transporte de nutrientes, comunicação celular e respostas celulares eficientes, sendo possível sua utilização em várias aplicações biomédicas (GARG e BOWLIN, 2011).

O sistema de eletrofiação possui alguns componentes principais como uma seringa com uma agulha metálica, uma bomba de seringa, uma fonte de alta tensão de alimentação e um coletor aterrado. Ao se controlar os parâmetros de processamento da eletrofiação, incluindo propriedades de soluções (viscosidade, elasticidade, condutividade e tensão superficial), condições de processamento (tensão, diâmetro da agulha, distância entre a agulha e o coletor), e do ambiente (temperatura e umidade), estruturas fibrosas podem ser fabricadas com sucesso, oferecendo excelentes perspectivas (SCHIFFMAN e SCHAUER, 2008; BHARDWAJ e KUNDU, 2010).

Eletrofiação coaxial é uma extensão inovadora da eletrofiação básica, que utiliza núcleo (DO *et al.*, 2012). Essa modificação no processo tem sido feita para melhorar a qualidade e a funcionalidade das estruturas das nanofibras resultantes (LI *et al.*, 2010).

Uma das principais motivações para o uso de eletrofiação coaxial é na liberação controlada de fármacos, já que possibilita contornar as limitações da eletrofiação comum em relação ao encapsulamento de agentes bioativos sensíveis que desempenham um papel importante na área biomédica (JIANG *et al.*, 2014).

A degeneração macular relacionada à idade (DMRI), na maioria dos casos, ocorre em indivíduos acima de 50 anos. Essa degeneração é uma doença do olho que é caracterizada pelo dano à mácula, presente na porção central da retina, que leva à uma perda progressiva da visão central (MESQUITA *et al.*, 2008). A DMRI pode ser apresentada nas formas não exsudativa (seca ou atrófica) e exsudativa (úmida) (SERRA *et al.*, 2008).

Esse bloqueio das imagens é caracterizado pelo crescimento de vasos sanguíneos na região macular. Os sintomas mais comuns da DMRI são o embaçamento e a distorção

da imagem, o que torna as atividades diárias do indivíduo prejudicadas. (PARANHOS *et al.*, 2013).

Nesse contexto, com a evolução do conhecimento da doença e o aumento da expectativa de vida, o uso da terapia antiangiogênica na DMRI tem sido eficaz devido a sua alta especificidade (GUIMARÃES e GERENUTTI, 2013). O fármaco Bevacizumabe tem sido utilizado como um desses inibidores angiogênicos (CONLEY e NAASH, 2010; GUIMARÃES e GERENUTTI, 2013).

Tratamentos atuais com injeções intraoculares contendo o Bevacizumabe podem causar eventos oculares adversos aos pacientes, como perfuração do globo ocular, hemorragias na retina ou vítreo, descolamento da retina e endoftalmite (GUIMARÃES e GERENUTTI, 2013).

Visando um tratamento mais adequado no segmento posterior do olho, em particular na mácula, este trabalho pretendeu contribuir no desenvolvimento de um futuro tratamento com implantes de nanofibras eletrofiadas compostas de diferentes polímeros e fármaco encapsulado que permitiria um maior controle da liberação da molécula ativa. Tal sistema pode aumentar a biodisponibilidade, obter uma liberação constante e prolongada, manter a concentração no local da ação dentro de níveis terapêuticos, atingir especificamente um tecido e eliminar a utilização de injeções intraoculares, além de aumentar o conforto do paciente, garantindo assim uma melhor adesão ao tratamento.

Dessa forma, neste trabalho, nanofibras poliméricas biodegradáveis foram produzidas por eletrofiação coaxial contendo o fármaco Bevacizumabe. Foi testada a hipótese de que a estrutura casca-núcleo produzida por eletrofiação coaxial poderia permitir a proteção do fármaco no núcleo da nanofibra rico em poli (álcool vinílico) e o controle de sua liberação a partir de uma casca formada por um polímero biodegradável (como o PCL) de baixa taxa de biodegradação. Além disso, a presença de um polímero natural como a gelatina (derivada do colágeno) na casca em conjunto com o polímero biodegradável poderia conferir à nanofibra maior capacidade de interação com tecidos vivos. Um dispositivo formado por mantas de nanofibras com este tipo de estrutura casca-núcleo poderia combinar a vantagem da preservação da integridade do fármaco durante o processamento com a possibilidade de sua liberação controlada e estendida. Tal dispositivo poderia eventualmente restringir os riscos e desconforto da realização das injeções intraoculares.

Capítulo 2: Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e caracterizar nanofibras com estrutura casca-núcleo pela técnica de eletrofiação coaxial visando a liberação de Bevacizumabe para o tratamento de degeneração macular relacionada à idade (DMRI).

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Preparar nanofibras de poli(álcool vinílico) contendo Bevacizumabe por eletrofiação;
- ✓ Sintetizar mantas de nanofibras com estrutura casca-núcleo pela técnica da eletrofiação coaxial. As nanofibras serão programadas e processadas de tal forma a apresentar poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e gelatina como formadores da casca, enquanto o núcleo das nanofibras será formado pelo fármaco Bevacizumabe e poli(álcool vinílico) (PVA);
- ✓ Caracterizar a estrutura e morfologia das nanofibras produzidas;
- ✓ Aplicar um método imunoenzimático para avaliar a atividade biológica do Bevacizumabe presente nas nanofibras poliméricas e sua liberação em função do tempo;
- ✓ Avaliar a atividade antiangiogênica do Bevacizumabe incorporado às nanofibras poliméricas utilizando modelo de membrana corioalantóica;
- ✓ Avaliar a citotoxicidade *in vitro* do sistema biodegradável de nanofibras poliméricas contendo Bevacizumabe.

Capítulo 3: Revisão Bibliográfica

3.1 Eletrofiação

Polímeros em filamentos e multifilamentos contínuos podem ser formados a partir de várias técnicas tradicionais como a fiacção à seco (*dry spinning*), fiacção úmida (*wet spinning*), fiacção via gel (*gel spinning*) e fiacção do fundido (*melt spinning*) (HUANG *et al.*, 2003; SATO, 2011). Com essas técnicas, as fibras obtidas possuem uma variação média em diâmetro entre 10 a 500 μm (PARK *et al.*, 2001; SATO, 2011). Por outro lado, para se produzir fibras com diâmetros médios muito menores, tem sido muito investigada a técnica de eletrofiação ou fiacção eletrostática (*electrospinning*). A eletrofiação permite produzir fibras em malhas, ou mantas ou membranas poliméricas com diâmetros variando entre 10nm a 10 μm (EICHHORN e SAMPSON, 2005).

Essas nanofibras eletrofiadas apresentam vantagens, como: alta área superficial; podem ser obtidas numa variedade de formas e tamanhos; podem possuir propriedades e funcionalidades a partir do controle sobre a composição dessas nanofibras (BHARDWAJ e KUNDU, 2010; SATO, 2011); além de poderem ser produzidas a partir de uma infinidade de polímeros (SILVA *et al.*, 2013).

O primeiro estudo de eletrofiação foi patenteado por FORMHALS (1934) descrevendo seu experimento onde a produção de filamentos poliméricos ocorre a partir da força eletrostática.

Polímeros de alta massa molar são envolvidos em estudos de eletrofiação uma vez que suas cadeias sofrem emaranhamentos (*chain entanglements*), sendo um fator importante para a formação de fibras eletrofiadas. Porém, outros trabalhos demonstraram que a alta massa molar média do polímero não é um ponto fundamental para a obtenção de fibras eletrofiadas, e sim a presença de suficientes interações intermoleculares, que proporciona um substituto para a conectividade através do emaranhamento das cadeias (SATO, 2011).

TAYLOR (1964) contribuiu para a técnica de eletrofiação com um modelo matemático conhecido até hoje como cone de Taylor, que estabelece as condições para a formação de um cone gerado pela gota de fluido sob a influência de um campo elétrico.

Para o processo de eletrofiação, são necessários três componentes essenciais: uma fonte de alta tensão, um tubo capilar com uma agulha de pequeno diâmetro e uma placa condutora aterrada (SALLES, 2013).

Esse processo consiste em uma aplicação de campo elétrico entre o polímero e um coletor metálico em rotação. Normalmente, esse polímero (solubilizado em um solvente apropriado, ou seja, uma solução com concentração e viscosidade adequadas) está presente em um tubo capilar (uma seringa hipodérmica com agulha) e é escoado por ação da gravidade ou pelo uso de uma bomba peristáltica através de um orifício (ALCOBIA, 2013). Um eletrodo ligado à uma fonte de alta tensão positiva é conectado nesse tubo capilar e posicionado a uma certa distância do outro eletrodo negativo fixado ao coletor aterrado. A solução é mantida inicialmente pela sua tensão superficial na extremidade do capilar na forma de gota. A superfície da gota se alonga com o aumento da tensão elétrica para formar um cone, conhecido como cone de Taylor (SILL e RECUM, 2008). Quando as forças eletrostáticas, de ação repulsiva, (BAJI *et al.*, 2010) superam a tensão superficial, de ação coesiva, um jato carregado da solução na extremidade do cone é ejetado e atraído ao coletor. Na ponta da agulha, o jato é estável, mas apresenta instabilidade a caminho do coletor. Durante essa trajetória, o solvente evapora e o polímero precipita, originando uma manta de fibras de diâmetros micro ou nanométricos (SCHUEREN *et al.*, 2010; JÚNIOR *et al.*, 2013).

Sendo assim, o processo de eletrofiação envolve um alongamento rápido do jato eletrificado e uma rápida evaporação do solvente durante o processo de eletrodeposição. As cadeias poliméricas emaranhadas sofrem uma força de cisalhamento e se consolidam rapidamente quando atingem a placa coletora. Devido à presença dos emaranhamentos das cadeias no fluido polimérico carregado, o fluido não se rompe na forma de gotículas esféricas, o que ocorre em outro tipo de processo denominado eletrospray, mas forma um jato estável quando as forças eletrostáticas repulsivas nas superfícies do fluido sobrepõem a tensão superficial (RAMAKRISHNA *et al.*, 2005).

3.1.1 Processo de Eletrofiação

O processo de eletrofiação depende de vários parâmetros, os quais desempenham um importante papel no processo de geração das nanofibras (JÚNIOR *et al.*, 2013), permitindo ajustar as dimensões e qualidades das fibras (ALCOBIA, 2013).

Os principais parâmetros da solução são: massa molar do polímero, viscosidade da solução, tensão superficial e condutividade elétrica. Os principais parâmetros do processo são: tensão aplicada, vazão da solução, temperatura, diâmetro da agulha, coletor e a distância da ponta da agulha. Os parâmetros ambientais são: umidade

relativa do ar, temperatura do ambiente e a composição da atmosfera. Modificações nos parâmetros da eletrofiação influenciam a morfologia das fibras.

3.1.2 Parâmetros da solução

Os parâmetros de solução influenciam nas morfologias e na geometria das nanofibras. Eles estão relacionados com as propriedades físico-químicas dos solventes, dos polímeros e com as interações do tipo polímero-solvente (COSTA *et al.*, 2012a-).

A escolha de um solvente ideal para cada tipo de polímero é importante para que este seja totalmente solubilizado, e seja adequado para a geração da morfologia de interesse das fibras (WANNATONG *et al.*, 2004).

Um polímero com alta massa molar é menos solúvel, gastando mais tempo para se dissolver quando comparado a um polímero com uma menor massa molar. A massa molar de um polímero também influencia diretamente a viscosidade da solução (WANNATONG *et al.*, 2004). A viscosidade da solução está associada com o grau de emaranhamentos das cadeias poliméricas do polímero em solução. Para que ocorra a formação de fibras uniformes e sem contas (grânulos ou defeitos) no processo de eletrofiação, é necessário que se tenha um valor mínimo de emaranhamento, o qual corresponde a um valor de viscosidade mínima (COSTA *et al.*, 2012a-). Um aumento na viscosidade ou concentração da solução origina fibra com diâmetro maior e mais uniforme. Quando a viscosidade da solução é muito baixa pode não haver material suficiente no jato e grau de emaranhamento adequado para que uma fibra contínua se forme. Nesse caso, tem-se a formação de micro/nano gotas (*electrospraying*). Por outro lado, se a viscosidade da solução for muito alta, a agulha pode ficar obstruída, ou então a bomba pode não ter potência suficiente para bombear uma solução muito viscosa, que inviabilizaria o processo de eletrofiação (KULKARNI *et al.*, 2010; COLLINS *et al.*, 2012).

A tensão superficial está relacionada com a formação do cone de Taylor. A tensão aplicada tem que ser alta suficiente para que as forças eletrostáticas superem a tensão superficial da gota. E, a partir dessa voltagem (voltagem crítica), o processo de fiação é iniciado (COSTA *et al.*, 2012a-).

Vários solventes podem contribuir com diferentes tensões superficiais. Quando existe uma concentração alta de moléculas de solventes livres, há uma tendência das moléculas do solvente se agregarem e adquirirem uma forma esférica devido à tensão

superficial. Já uma viscosidade elevada permite uma maior interação entre moléculas do solvente e do polímero. Sob influência das cargas, o jato polimérico sofre alongação e as moléculas dos solventes se espalham sobre o polímero emaranhado, reduzindo a possibilidade da união das moléculas do solvente sob influência da tensão superficial (BHARDWAJ e KUNDU, 2010).

A condutividade elétrica está ligada a quantidade de carga na solução. Uma maior condutividade com adição de sais nas soluções possibilita maior fluidez de carga e uma aceleração eletrostática maior, sob mesmo campo elétrico (RAMAKRISHNA *et al.*, 2005), ou seja, o tipo de polímero utilizado, solvente e a disponibilidade de sais ionizáveis determinam a condutividade elétrica na solução. O aumento da condutividade elétrica da solução diminui significativamente o diâmetro das nanofibras eletrofiadas e o número de defeitos, enquanto que a baixa condutividade da solução forma um alongamento insuficiente do jato pela força elétrica para formação de fibras uniformes e livres de grânulos (BHARDWAJ e KUNDU, 2010).

Todos esses fatores ligados à concentração dos polímeros na solução, o tipo de solvente utilizado, a condutividade e a tensão aplicada controlam o diâmetro das fibras (BAJI *et al.*, 2010).

3.1.3 Parâmetros do processo

A tensão aplicada entre a agulha contendo a solução e o coletor é facilmente ajustada e crucial na eletrofiação. Assim que a força eletrostática supera a tensão superficial da solução, a alta tensão irá induzir cargas na solução junto com o campo elétrico externo (BAJI *et al.*, 2010).

Dependendo das propriedades da solução e da distância de trabalho, os campos elétricos no processo de eletrofiação ocorrem na ordem de 1-5kV/cm. Isso significa trabalhar com tensões na ordem quilovolts, podendo variar entre 1 a 30 kV, para distâncias entre 5 a 30 cm (ALCOBIA, 2013).

Na maioria dos casos, uma tensão mais elevada provoca uma alongação da solução devido a maiores forças eletrostáticas no jato, como também um forte campo elétrico, o que implica em redução no diâmetro das fibras e uma rápida evaporação do solvente. Assim, a tensão influencia no diâmetro das fibras, mas juntamente com a concentração

da solução do polímero e a distância entre a ponta e a placa coletora (BHARDWAJ e KUNDU, 2010).

A vazão da solução determina a quantidade de solução disponível para a eletrofiação. Quando ocorre um aumento da taxa de alimentação, aumenta-se o diâmetro das fibras ou o tamanho das estruturas globulares já que há um aumento do fluxo da solução que sai da ponta da agulha (WANG *et al.*, 2004). Vazão elevada necessita de um tempo maior para vaporização do solvente para não originar fibras com defeitos (HUANG *et al.*, 2003). Para que o solvente tenha tempo suficiente para evaporar, o ideal é que o fluxo seja contínuo e a taxa de alimentação seja baixa (WANG *et al.*, 2004).

A temperatura da solução aumenta a taxa de evaporação do solvente e reduz a viscosidade na solução polimérica. Em casos onde ocorre a presença de substâncias biológicas, tais como enzimas ou proteínas adicionadas na solução eletrofiada, tais substâncias podem perder sua atividade biológica em elevadas temperaturas (DEMIR *et al.*, 2002).

O diâmetro interno da agulha tem efeito sobre o processo de eletrofiação. Quando o volume da gota na ponta da agulha é reduzido com a redução do diâmetro da agulha, a tensão superficial da gota aumenta. Para a mesma tensão fornecida, a força eletrostática deve ser maior para que se inicie o jato.

Um coletor metálico cilíndrico em rotação é muito utilizado para obtenção de nanofibras alinhadas. A tração fornecida pela velocidade da rotação do cilindro é o mecanismo que define o alinhamento dessas fibras (BAJI *et al.*, 2010). Quando o cilindro apresenta uma rotação baixa não há mecanismo de alinhamento das fibras, as quais acabam por apresentar formas aleatórias.

É necessária uma distância mínima entre a agulha e a placa coletora para que haja tempo suficiente para evaporar o solvente antes de atingir a placa coletora (SILL e RECUM, 2008), e um valor máximo para que o campo elétrico estabilize o cone de Taylor, e conseqüentemente a formação de nanofibras (COSTA *et al.*, 2012-a). Em distâncias muito próximas ou muito afastadas, pode ser observada a presença de grânulos ao invés de fibras (KULKARNI *et al.*, 2010).

3.1.4 Parâmetros ambientais

Os parâmetros ambientais, como umidade, temperatura e composição do ar também podem influenciar na formação e morfologia das nanofibras (MEDEIROS *et al.*, 2009). Por isso é interessante realizar o processo de eletrofiação em um ambiente em condições controladas.

O nível de umidade e gases atmosféricos pode afetar a taxa de evaporação de solventes à base de água. Em um ambiente rico em água, é observada a formação de uma pele com contornos bem definidos ao redor do jato eletrofiado, enquanto que em uma situação oposta, uma fina estrutura permite uma evaporação rápida do solvente (COLLINS *et al.*, 2012).

3.1.5 Eletrofiação coaxial

A grande versatilidade na técnica de eletrofiação permite obter excelentes propriedades além de vários tipos de fibras através de simples ajustes nas variáveis do processo (MEDEIROS *et al.*, 2009). Dependendo da aplicação, podem ser necessárias misturas de polímeros distintos, onde os polímeros se diferem no tempo de degradação e/ou em suas propriedades mecânicas e de superfície. Aplicações podem ainda requisitar a liberação controlada de componentes como fármacos, hormônios, proteínas ou fatores de crescimento. Essas características podem ser encontradas em fibras com morfologia coaxial com estrutura casca núcleo (*core-shell*) (ALCOBIA, 2013).

A montagem da eletrofiação coaxial é semelhante à utilizada para a eletrofiação comum. A modificação é feita através da inserção de uma agulha menor (interno) que se encaixa de forma concêntrica no interior da agulha maior (externo) para realizar a configuração coaxial, que, de forma independente, ejetam duas soluções poliméricas ao mesmo tempo (LI *et al.*, 2010; JIANG *et al.*, 2014), permitindo a combinação de propriedades de diferentes tipos de materiais, representada pela Figura 3.1.

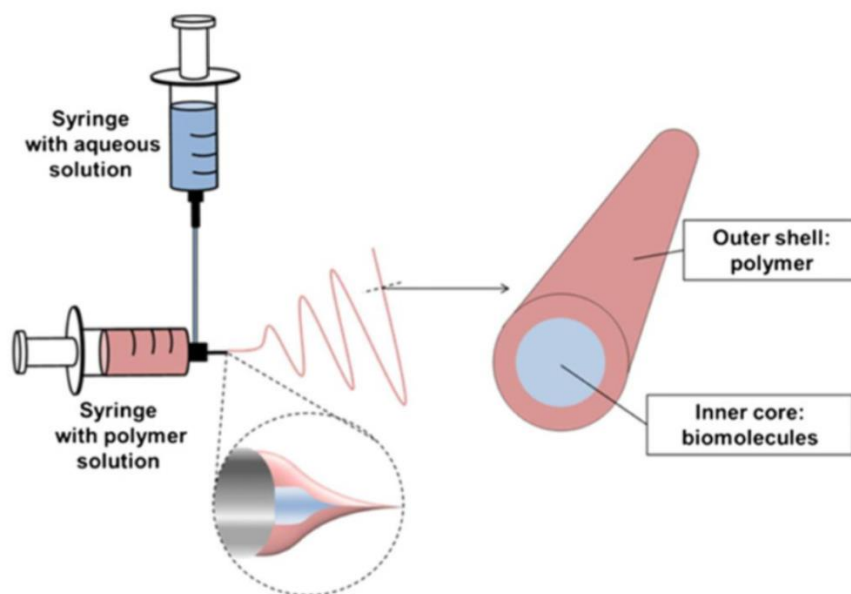


Figura 3.1 - Eletrofiação coaxial, adaptado de WANG et al., 2013.

O processamento da nanofibra coaxial ocorre quando as soluções poliméricas são carregadas pela tensão aplicada, e as cargas são acumuladas predominantemente sobre a superfície da solução que sai da agulha externa do coaxial. A gota dessa solução se alonga e se estende formando um cone devido à repulsão de cargas. As tensões geradas na solução da casca causam cisalhamento na solução do núcleo através do escoamento viscoso e contato de atrito entre as soluções, fazendo com que a solução do núcleo se deforme em forma cônica e um composto de jato coaxial se desenvolva na ponta dos cones. Espera-se que, enquanto o cone composto é estável, o núcleo incorpore uniformemente na casca para a formação de fibras de núcleo-invólucro. Antes de atingir o coletor, como acontece na eletrofiação, os solventes evaporam, e as nanofibras core-shell são formadas (GREINER *et al.*,2010; JIANG *et al.*,2014).

Alguns parâmetros que podem influenciar no processamento da nanofibra coaxial são descritos a seguir.

Em relação à viscosidade da solução, é necessário que exista uma viscosidade suficiente do material da casca sobre o material do núcleo para ultrapassar a tensão interfacial entre as duas soluções e permitir a formação do cone, possibilitando ao núcleo a estrutura de formação. E o fluido do núcleo também deve possuir uma viscosidade mínima para ser conduzido continuamente sem ruptura (LI *et al.*,2010).

Um aumento na concentração da solução da eletrofição comum aumenta o diâmetro da nanofibra devido ao aumento de material no jato da eletrofição (WANG *et al.*, 2012). Um efeito semelhante é observado na eletrofição coaxial: o aumento da concentração do núcleo aumenta tanto o núcleo quanto o diâmetro total de fibra, mantendo constante o volume da casca. E com o aumento da concentração da solução da casca, ocorre um aumento no diâmetro total da nanofibra e da casca, mantendo constante o diâmetro do núcleo (LI, 2013).

A interação entre núcleo e as soluções da casca (polímeros ou solventes) é também um parâmetro importante a ser considerado. Em primeiro lugar, o solvente em qualquer uma das soluções não deve precipitar o polímero da outra solução quando as soluções se encontram na ponta do capilar. Em segundo lugar, a tensão interfacial entre a casca e o núcleo deve ser baixa para a geração do cone de Taylor estabilizado (DÍAZ *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2010).

O tipo de solvente usado, principalmente na solução de núcleo, também pode ter efeito sobre a morfologia resultante de estrutura casca núcleo. O solvente que evapora rapidamente (por exemplo, clorofórmio, acetona, etc.), quando utilizado no núcleo cria uma camada fina na interface entre a casca e o núcleo, devido à rápida evaporação. Esta camada tende a reter o solvente interior mais lentamente devido à barreira recém-criada (LARSEN *et al.*, 2004; LI, 2013). Para evitar a formação de cones instáveis, não devem ser usados solventes de alta pressão de vapor. Os cones instáveis podem causar a formação de estruturas casca e núcleo irregulares, bem como resultar em fibras separadas das duas soluções (LI *et al.*, 2010).

Em relação a tensão aplicada, uma voltagem baixa pode causar gotejamento das duas soluções, seguido de um jato intermitente a partir da solução da casca com uma incorporação ocasional do núcleo. Uma voltagem alta pode separar os jatos da solução da casca e do núcleo, ocasionando fibras sem a formação de casca e núcleo (LI *et al.*, 2010).

A vazão está diretamente ligada às dimensões da casca e do núcleo na eletrofição coaxial. Quando a vazão do núcleo é muito baixa, uma quantidade insuficiente de solução é entregue impossibilitando a incorporação contínua do núcleo no interior da casca. Por outro lado, se a vazão do núcleo é elevada, a quantidade da solução da casca é insuficiente para reter a solução de núcleo dentro do cone. Isto faz com que o cone interno perca a sua característica, o que resulta na mistura das soluções internas e externa. Para que a solução do núcleo fique encapsulada pela solução da casca é

necessário que a vazão do núcleo seja menor ou igual à da casca (DÍAZ *et al.*,2006; LI, 2013).

No caso de aplicações biomédicas, a eletrofiação coaxial proporciona vários benefícios, já que os materiais do núcleo (*core*) podem fornecer propriedades específicas desejadas pelo tecido a ser reparado, enquanto os materiais da casca (*shell*) podem incluir propriedades adicionais, tais como biocompatibilidade ou propriedades hidrofílicas (COSTA *et al.*,2012-a).

Já para outras aplicações, pode-se ter o material do núcleo hidrofílico para facilitar o carregamento e a preservação da bioatividade de moléculas biológicas, e uma casca hidrofóbica para permitir a formação da fibra, após a evaporação do solvente orgânico volátil (SARAF *et al.*, 2009).

Esta técnica é interessante no desenvolvimento de nanofibras multifuncionais, as quais podem apresentar diferentes taxas de biodegradação em diferentes períodos de uso no corpo humano.

As características mecânicas de nanofibras, com específicas concentrações de polímeros no núcleo e na casca, produzidas por esse processo, normalmente são melhores do que aquelas produzidas somente com um polímero (COSTA *et al.*,2012-Parte I). Esta técnica pode ser utilizada para a produção de nanofibras com liberação controlada de agentes bioativos solúveis em água, tais como proteínas, enzimas e medicamentos dentro do núcleo, e, conseqüentemente o polímero da casca impede a liberação inicial acelerada do fármaco encapsulado no polímero do núcleo (MEINEL *et al.*, 2012; JIANG *et al.*, 2014). Além disso, a eletrofiação coaxial protege as moléculas bioativas no núcleo das condições adversas de eletrofiação (por exemplo, campo elétrico elevado, de solvente orgânico, etc.) que são encontradas principalmente pelo material que reveste o núcleo (TIWARI e VENKATRAMAN, 2012).

3.2 Aplicações na área biomédica

A técnica de eletrofiação é bem versátil, o que possibilita o processamento de diferentes materiais sintéticos ou naturais, com ou sem adições de substâncias biológicas como fatores de crescimento, proteínas e elementos de matriz extracelular (HUANG *et al.*, 2003; BHARDWAJ e KUNDU, 2010). Tais características permitem a produção de materiais para as mais variadas aplicações tecnológicas, como produção de biosensores, geração de energia, filtros de alta eficiência, dispositivos eletrônicos, entre

outros (COSTA *et al.*,2012- Parte II; ALCOBIA, 2013). É importante destacar o uso da eletrofição para aplicações biomédicas, como a engenharia de tecidos, liberação de drogas, curativos, imobilização de enzimas, etc.

A engenharia de tecidos ou medicina regenerativa é um campo interdisciplinar que envolve conhecimentos da medicina, biologia, engenharia e ciência dos materiais. A engenharia de tecidos faz uso de três componentes básicos (células, *scaffolds* e biomoléculas) (JANG *et al.*, 2009).

As estruturas das nanofibras eletrofiadas apresentam dimensões que se assemelham a dos componentes extracelulares do corpo humano (COSTA *et al.*,2012 b). Quando a matriz celular é destruída por doenças, ferimentos ou defeitos congênitos, o uso de *scaffolds* para regenerar uma nova matriz celular pode oferecer suporte para as células, posterior integração ao tecido ativo e proporcionar a vascularização, sem resposta imune agressiva (AGARWAL *et al.*,2008; KAI *et al.*, 2014). Os *scaffolds* podem também fornecer suporte mecânico e serem usados como meio para liberação de antibióticos ou fatores de crescimento para acelerar o crescimento do tecido ou cura ou para prevenir infecções (DASH e KONKIMALLA, 2012).

Nas aplicações de engenharia de tecidos, muitas vezes o uso de fibras eletrofiadas envolve várias considerações, incluindo a escolha do material, a orientação das fibras, porosidade, modificação da superfície e aplicação nos tecidos (KAI *et al.*, 2014). Os materiais naturais e sintéticos (biodegradáveis e não-biodegradáveis), bem como misturas de dois polímeros, podem proporcionar uma ótima combinação de propriedades mecânicas, entre outras, que são semelhantes às do tecido que se pretende substituir.

A porosidade garante uma eficiência no transporte dos nutrientes e oxigênio aos tecidos, mas não deve ser excessiva para comprometer a estabilidade mecânica dos *scaffolds* (CUNHA *et al.*, 2011).

Variando-se os parâmetros de processamento, a flexibilidade na seleção dos materiais e capacidade de controlar suas propriedades, os *scaffolds* podem ser otimizados para cada aplicação específica, até mesmo modificar as superfícies com moléculas bioativas (SILL e RECUM, 2008; KULKARNI *et al.*, 2010).

Ao escolher um material para uma aplicação de engenharia de tecidos, ele deve ser biocompatível com todos os elementos celulares. A toxicidade, assim como respostas inflamatórias e imunes devem ser minimizadas, para propiciar uma interação celular

favorável à regeneração. Além disso, os biomateriais devem ser biodegradáveis e bioreabsorvíveis para evitar inflamação prolongada (CUNHA *et al.*, 2011).

Pesquisas iniciais em biocompatibilidade com a utilização de materiais bioinertes tentam reduzir interações específicas, onde esse material elucidará poucas interações específicas com o meio envolvido, incluindo os tecidos ou fluidos circundantes extracelulares (VATANKHAH *et al.*, 2014). Por outro lado, a incorporação de materiais bioativos pode interagir com o ambiente biológico facilitando a regeneração celular (VATANKHAH *et al.*, 2014). Esses materiais bioativos podem apresentar fatores como o de crescimento celular, estimuladores de angiogênese, proteínas, gene, etc. (HERNÁNDEZ *et al.*, 2010).

A escolha de um material biodegradável permite eliminar uma segunda cirurgia para a remoção do material implantado (SILL e RECUM, 2008; ORÉFICE *et al.*, 2012).

Portanto, na engenharia de tecidos, é possível a criação de scaffolds reprodutíveis e biocompatíveis para reparação de tecidos vascular, ósseo, neural, pele, tendão/ligamentos entre outros (KULKARNI *et al.*, 2010; ORÉFICE *et al.*, 2012; KAI *et al.*, 2014).

3.2.1 Poli(ε-caprolactona) - PCL

A vasta aplicabilidade e interesse em suas propriedades fazem do poli(ε-caprolactona) uma escolha na engenharia de tecidos. O estudo do polímero sintético poli(ε-caprolactona) (PCL) começou por volta de 1930 e sua propriedade de biodegradação foi primeiramente estudada em 1973 (NATTA *et al.*, 1934; WOODRUFF e HUTMACHER, 2010).

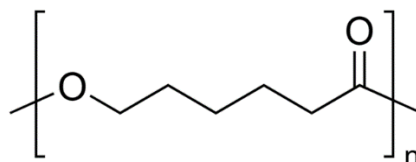


Figura 3.2 - Representação estrutura química da poli (ε-caprolactona). Fonte: Sigma-Aldrich.

O PCL é um polímero semicristalino hidrofóbico com propriedades térmicas compatíveis com a temperatura corpórea. Possui ótima biocompatibilidade entre vários polímeros, biodegradabilidade e resistência mecânica. A sua compatibilidade e degradação muito mais lenta do que outros polímeros possibilitam seu uso quando tempos prolongados de biodegradação são necessários. Essas características permitem que ele seja usado

como biomaterial na área biomédica e farmacêutica (CUNHA, 2012; DASH e KONKIMALLA, 2012), permitindo sua utilização para liberação controlada de medicamentos devido a sua alta permeabilidade à vários fármacos (MCEACHIN e LOZANO, 2012).

3.2.2 Gelatina

A gelatina é uma proteína natural derivada da hidrólise parcial do colágeno animal, presente em ossos e peles, principalmente de bovinos e suínos. Gelatinas do tipo A são obtidas por tratamento ácido e possuem uma maior quantidade de polipeptídios de baixa massa molar. Enquanto isso, as gelatinas do tipo B são as obtidas pelo tratamento alcalino, e apresentam uma maior proporção de frações de alta massa molar (SILVA *et al.*, 2011).

Como ocorre com as demais proteínas, os aminoácidos são os componentes básicos do colágeno e são ligados entre si através de ligações peptídicas, formando grandes cadeias. A gelatina é formada por 18 diferentes aminoácidos. No momento em que o colágeno é hidrolisado e transformado em proteína solúvel, tem-se a gelatina, cuja massa molar varia dependendo do grau de hidrólise. As propriedades da gelatina resultam de cadeias laterais que possui grupos carregados e sequências de aminoácidos tanto hidrofílicos quanto hidrofóbicos, permitindo que ela se ligue a superfícies de diferentes naturezas químicas. (SCHRIEBER e GAREIS, 2007).

Além do baixo custo, a gelatina possui características e propriedades tais como promover a adesão celular e proliferação, transporte de substâncias e baixa alergenicidade, baixa viscosidade em solução aquosa, odor neutro, incolor, transparência, propriedades emulsificantes e estabilizantes e, solubilidade, que possibilitam numerosas aplicações (PRESTES, 2013).

A gelatina pode ser utilizada isoladamente ou em mistura com outro polímero (sintético) biodegradável, para produzir membranas de nanofibras de tecidos, scaffolds ou dispositivos de cuidados para saúde, e outras aplicações biomédicas (SELL *et al.*, 2009).

3.2.3 Poli(álcool vinílico) - PVA

O poli(álcool vinílico) (PVA) é um polímero sintético hidrofílico e semicristalino. Devido a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, boa estabilidade química e térmica tem sido amplamente utilizada em aplicações biomédicas e na liberação controlada de fármaco. (WON *et al.*, 2012; Nirmala 2011).

O PVA apresenta uma estrutura química com grupos hidroxila laterais, que resulta da mistura do álcool vinílico e acetato de vinila. Tanto as propriedades físicas e químicas dependem do seu grau de hidrólise e massamolecular. A cristalinidade e a solubilidade do PVA em água e em outros solventes altamente polares são aumentadas dependendo do grau de hidrólise. Além do grau de hidrólise, a solubilidade do PVA em água depende do grau de polimerização e da temperatura da solução. O PVA é parcialmente hidrolisado quando o grau de hidrólise está na faixa de 87-89% e, totalmente hidrolisado, com grau de hidrólise de 98-99% (HASSAN e PEPPAS, 2000; WANG *et al.*,2004).

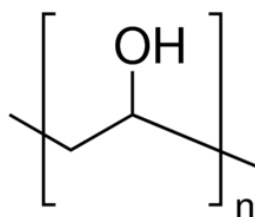


Figura 3.3 - Representação da estrutura química do poli (álcool vinílico). Fonte: Sigma-Aldrich.

Um aumento do número de hidroxilas leva à formação de ligações de hidrogênio fortes entre os grupos hidroxilas intramoleculares e intermoleculares, restringindo sua solubilização em água. Por outro lado, o aumento dos grupos acetato enfraquece as ligações intramoleculares e intermoleculares dos grupos hidroxila vizinhos, aumentando sua solubilidade (GUIRGUIS e MOSELHEY, 2012).

A solubilização do PVA com grau de hidrólise de 98,5% ou maior pode ser feita em água a 70°C, devido à alta energia associada à dissolução da fase cristalina. Após a dissolução, o PVA mantém-se em solução aquosa mesmo em temperatura ambiente (ARANHA e LUCAS, 2001; WANG *et al.*,2004).

3.3 Biomateriais na oftalmologia

O olho humano é um órgão complexo, onde diferentes estruturas interagem dinamicamente. Os biomateriais estão presentes em tratamentos oftalmológicos em traumas oculares, doenças infecciosas ou degenerativas (ORÉFICE *et al.*, 2012).

Dentre as enfermidades oftalmológicas associadas ao envelhecimento, destaca-se a Degeneração Macular Relacionada a Idade (DMRI). Para uma melhor compreensão da DMRI, é necessário o entendimento sobre anatomia ocular.

3.3.1 Bulbo Ocular

O Bulbo ocular é formado por três camadas. A córnea e a esclera formam a camada externa ou de sustentação, sendo os meios transparentes. A íris, corpo ciliar e coroide formam a camada média ou vascular, e internamente tem-se a retina (ORÉFICE et al., 2012).

O bulbo do olho é formado por estruturas que compõem os segmentos anterior e posterior do olho. O segmento anterior é delimitado anteriormente pela córnea e posteriormente pelo cristalino. É dividido pela íris e preenchido pelo humor aquoso. O segmento posterior compreende os 2/3 posteriores do olho, delimitado anteriormente pelo cristalino e envolvendo o corpo vítreo, retina, coroide, nervo óptico (NAIK *et al.*, 2009; RIORDAN-EVA e CUNNINGHAM, 2011). Parte do segmento anterior (exceto parte revestida pela córnea) e posterior é revestida pela esclera (ORÉFICE et al., 2012).

Além dessas estruturas, existem os anexos do bulbo do olho, os quais são formados pelas pálpebras, conjuntiva e sistema nasolacrimal.

Neste trabalho dar-se-á ênfase apenas no segmento posterior do bulbo do olho.

3.3.2 Segmento posterior do bulbo do olho

As estruturas que formam o olho estão ilustradas na Figura 3.4

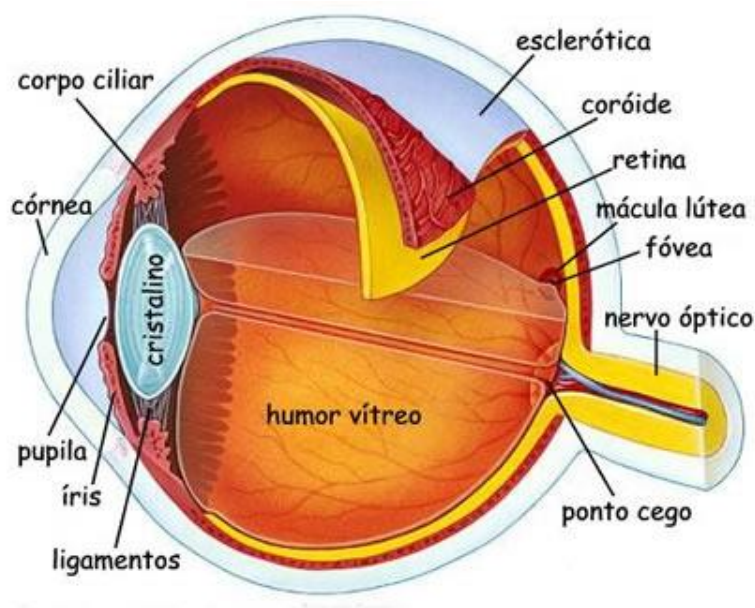


Figura 3.4 - Estruturas do bulbo do olho. Fonte Google.

A esclera (ou esclerótica) é a camada opaca mais externa do segmento posterior. É também conhecida como branco do olho. Juntamente com a córnea, sua função, além de proteger e manter a pressão intraocular, é manter a forma e o volume ocular. Através de uma área posterior desta estrutura, as fibras do nervo óptico atravessam a esclera (WATSON e YOUNG, 2004; RIORDAN-EVA e CUNNINGHAM, 2011).

A coroide é encontrada firmemente ligada à esclera na região do nervo óptico, onde as artérias ciliares posteriores e os nervos ciliares penetram no olho. Ela é mais espessa na região posterior e se torna gradualmente mais fina ao se aproximar da região anterior. A coroide é a responsável pelo suporte sanguíneo da retina uma vez que fornece nutrientes para as células da retina. Ela é altamente vascularizada e contém uma camada vascular com vasos sanguíneos grandes (coriocapilar) e uma camada capilar. A retina e a coroide são separadas pela membrana de Bruch (ORÉFICE et al., 2012)

A retina é uma membrana fina, flexível e sensível que reveste a superfície interna da parte posterior do globo ocular. As camadas externas são as mais próximas da coroide e as mais internas estão mais próximas do corpo vítreo (ORÉFICE et al., 2012).

A retina diferencia-se em duas partes: a retina neurosensorial e o epitélio pigmentado. A retina neurosensorial é formada por uma camada fotossensível de cones e bastonetes e suas conexões neurais. Através do nervo óptico, a luz é absorvida e convertida em impulsos elétricos nervosos. Os cones são as células fotorreceptoras responsáveis pela visão colorida. Os bastonetes são os fotorreceptores que proporcionam a visão no escuro (RIORDAN-EVA e CUNNINGHAM, 2011; PARANHOS et al., 2013).

No polo posterior da retina encontra-se a mácula, região responsável pela visão de alta resolução. Ela transmite ao cérebro 90% da informação visual. A fóvea, localizada na região central da mácula, contém as células fotorreceptoras sendo responsável pela maior capacidade visual do olho (MESQUITA *et al.*, 2008; QUEIROZ *et al.*, 2010).

A retina recebe seu fornecimento de sangue da camada coriocapilar da coroide (supre o terço externo da retina e a fóvea) e das ramificações da artéria central da retina (suprem os 2/3 internos) (RIORDAN-EVA e CUNNINGHAM, 2011).

O corpo vítreo, ou humor vítreo, é uma estrutura transparente e viscoelástica constituída de 99% por água, fibras de colágeno e de ácido hialurônico, que promove coesão e dá uma consistência gelatinosa ao meio. Ocupa toda a cavidade posterior ao cristalino, espaço vítreo, exercendo a função de amortecimento do globo ocular. Sua superfície

externa, a membrana hialoide, adere firmemente à retina em certos pontos, particularmente no nervo óptico, tornando os locais propícios à maior tração e consequente descolamento da retina (RIORDAN-EVA e CUNNINGHAM, 2011).

3.3.3 Degeneração Macular Relacionada à idade (DMRI)

A degeneração macular relacionada à idade (DMRI) ou maculopatia relacionada à idade é uma patologia cada vez mais frequente, devido ao envelhecimento geral da população, e vem assumindo a dimensão de um verdadeiro problema de saúde pública (GUIMARÃES e GERENUTTI, 2013).

A DMRI afeta um ou ambos os olhos, embora o desenvolvimento de DMRI em um olho pode aumentar o risco da doença surgir no segundo olho. Ela não causa dor, por isso, pode ser imperceptível até que produza alterações na visão. Quando a DMRI afeta um olho, ela geralmente se mantém indetectada pelo fato do cérebro usar a informação do segundo olho para compensar qualquer perda de visão no primeiro olho. Essa degeneração pode causar a perda da visão central e até mesmo atingir a cegueira, acometendo indivíduos com mais de 50 anos (PARANHOS *et al.*, 2013).

Essa degeneração tem seu desenvolvimento considerável com o envelhecimento, mas outros fatores de risco vêm sendo investigados, como a predisposição genética, hipertensão arterial, etnia, dieta não balanceada associada à obesidade, e até mesmo aos fatores ambientais como os relacionados à exposição aos raios ultravioletas e ao tabagismo (NEHEMY, 2006; TORRES *et al.*, 2009).

A DMRI é caracterizada por alterações degenerativas envolvendo a parte externa da retina, epitélio pigmentar da retina (EPR) e a membrana de Bruch. Ela apresenta-se sob duas formas clínicas distintas: uma forma “não exsudativa” ou atrófica ou seca, e uma forma exsudativa ou neovascular ou úmida (QUEIROZ *et al.*, 2010).

Na forma seca de DMRI, as células do epitélio pigmentar ficam menos eficientes em suas funções com o avançar da idade. Sendo assim, a retina não recebe mais alimentação adequada e acumula resíduos, o que leva a depósitos amarelos denominados drusas amorfas, esquematizadas nas Figura 3.5 e Figura 3.6. A medida que o número de drusas e o tamanho delas aumentam, lentamente as células da membrana pigmentar da retina se degeneram, ocasionando a perda da visão central (PARANHOS *et al.*, 2013), na maioria dos casos sem o comprometimento significativo da função visual.

A forma exsudativa de DMRI é responsável por 90% dos casos de perda visual grave em pessoas idosas (PARANHOS et al., 2013). Essa forma ocorre quando a integridade da membrana de Bruch é afetada. Sendo assim neovasos (vasos sanguíneos imaturos) da coróide se desenvolvem e crescem entre as células do epitélio pigmentado da retina (EPR) e as células fotorreceptoras na retina central, formando uma membrana neovascular coróide (YAMADA et al., 2010), representadas na Figura 3.7. Esses vasos sanguíneos frágeis possibilitam vazamentos e hemorragias, levando ao edema, que compromete a integridade da retina, mácula e fóvea, prejudicando a função visual. O resultado final gera uma cicatriz fibrosa densa que pode atingir toda a área macular (NEHEMY,2006; YAMADA *et al.*, 2010).

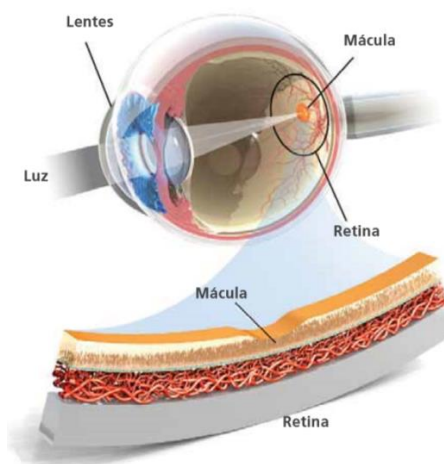


Figura 3.5 - Anatomia do olho. Fonte Angiogenesis Foundation.

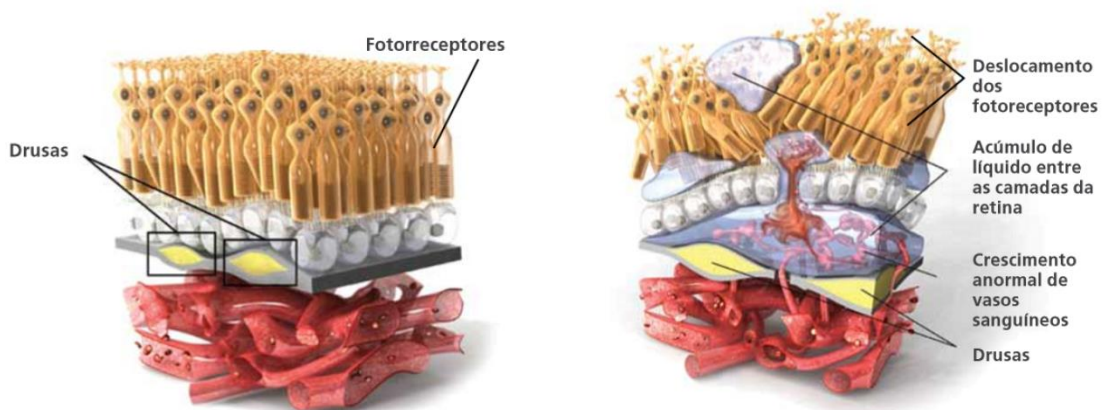


Figura 3.6 - Depósitos de drusas que provocam a distorção da visão. Fonte Angiogenesis Foundation.

Figura 3.7 - Crescimento anormal de vasos sanguíneos responsáveis pelo extravasamento de sangue e líquido. Fonte: Angiogenesis Foundation.

Indivíduos com DMRI geralmente são assintomáticos no início da doença. O sintoma inicial é a diminuição da sensibilidade ao contraste devido ao comprometimento macular, levando a impressão da falta de luz para ler ou escrever. Podem perceber o embaçamento da visão central, a distorção da imagem, linhas tortas, aparecimento de manchas escuras ou esbranquiçadas (escotomas) na visão de um ou de ambos os olhos (FLETCHER *et al.*, 2008; PARANHOS *et al.*, 2013). Devido à DMRI, atividades básicas como ler, escrever, dirigir, cozinhar ou reconhecer faces das pessoas ficam prejudicadas, evoluindo muitas vezes para a cegueira (CONLEY e NAASH, 2010).

3.3.4 Bevacizumabe (Avastin®)

Na busca por substâncias que poderiam atuar na terapia pró e antiangiogênica para o tratamento da forma neovascular úmida da DMRI, os inibidores da angiogênese são uma classe de medicamentos mais utilizada que visa bloquear a proliferação de novos vasos sanguíneos (MESQUITA *et al.*, 2008)

Em dezembro de 2004, a *Food and Drug Administration* (2004), (FDA) dos Estados Unidos aprovou o uso do Bevacizumabe, mas no Brasil foi aprovado apenas para tratamentos de câncer (ZOU *et al.*, 2011).

Em 2011, foi encaminhado à ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) pela Câmara Técnica de Oftalmologia do Conselho Federal de Medicina (CFM), um parecer técnico solicitando autorização para o tratamento com Bevacizumabe de pacientes portadores de Degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI) (COSTA, 2011)

Bevacizumabe é pensado ser tão seguro quanto o ranibizumabe (Lucentis®, Genetech), um medicamento de prescrição aprovada para o tratamento de DMRI exsudativa (KERNT *et al.*, 2007). Tem sido cada vez mais utilizado em muitos países como um tratamento *off-label* eficaz para a forma úmida da degeneração macular relacionada à idade (LI *et al.*, 2012).

O Bevacizumabe é um anticorpo monoclonal humanizado, produzido por tecnologia de DNA recombinante em um sistema de expressão em célula de mamífero, de ovário de Hamster Chinês, em um meio nutriente contendo o antibiótico gentamicina e é purificado por um processo que inclui a inativação viral específica e etapas de remoção (Food e Drug Administration, 2004). Esse anticorpo é constituído por 214 aminoácidos (GOMES *et al.*, 2012).

O mecanismo de ação do Bevacizumabe está ligado ao fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF, um dos principais agentes que estimulam a formação de novos vasos). Ele inibe a ligação do VEGF aos seus receptores na superfície das células endoteliais diminuindo a vascularização (RODRIGUES *et al.*, 2009).

Sendo assim, devido ao seu efeito inibidor da angiogênese, além da aplicação do Bevacizumabe no tratamento de vários tipos de câncer, o fármaco vem sendo utilizado também em doenças degenerativas oftalmológicas decorrentes da angiogênese excessiva como na Degeneração Macular Relacionada à Idade (GOMES *et al.*, 2012). O Bevacizumabe tem sido empregado no tratamento dessa doença por meio de injeções intravítreas diretamente no olho (GUIMARÃES e GERENUTTI, 2013). Repetidas injeções intraoculares podem causar sérias complicações, tais como hemorragia intraocular, descolamento de retina, endoftamite, catarata, entre outras (GAUDANA *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2009), além de proporcionar um enorme desconforto ao paciente. Além disso, a semivida intravítrea de 1,25 mg Bevacizumabe injetado é de aproximadamente apenas 3 dias (LI *et al.*, 2012).

Capítulo 4: Materiais e Métodos

4.1 Processamento de nanofibras por eletrofiação com estrutura *core-shell*

Material Utilizado:

PCL de massa molar 80.000 a 90.000g/mol (Sigma Aldrich); 2,2,2- Trifluoroetanol (Sigma Aldrich); Ácido Acético 99% (Sigma Aldrich); Gelatina (couro de porco) massa molar 90-110g/mol (Sigma Aldrich); PVA 98-99% hidrolisado, massa molar 146.000-186.000 g/mol (Sigma Aldrich); Avastin® (Bevacizumabe 25mg/mL); Sulfato de cobre (CuSO₄).

PBS pH 7,4 (1L água deionizada, 8g NaCl, 0,2g KCl, 1,44g Na₂HPO₄, 0,24g K₂HPO₄); Tampão carbonato pH 9,6 (1L água destilada, 1,59g Na₂CO₃, 2,93g NaHCO₃); Tampão de bloqueio (3g albumina, 100mL PBS); Solução reveladora (5mg de OPD (Ortofenilenodiamina) e, 15,5mL tampão citrato); Anti-Human IgG (Fc specific) (Sigma Aldrich).

Solução de formaldeído a 10% em água (Sigma Aldrich); DMEM-F12 (Sigma Aldrich), soro fetal Bovino (Sigma Aldrich), célula ARPE-19.

Preparo das soluções:

O PCL e a gelatina foram dissolvidos em 2,2,2- trifluoroetanol (6% em massa de PCL e 6% em massa de gelatina) separadamente, com auxílio de um agitador magnético durante 3 horas, à temperatura ambiente. Foi preparada uma mistura com as soluções de PCL e gelatina na concentração de 60:40 e acrescentando-se 1 ml da solução de 0,2% de ácido acético em TFE.

O PVA (15% em massa) foi dissolvido em água deionizada em um Banho Dubinoff Microprocessado a 90° C, durante 2 horas. O Bevacizumabe foi adicionado à solução de PVA nas seguintes quantidades: 1,25mg, 2,5mg; 5mg; 10mg (equivalente à 0,05mL, 0,1mL, 0,2mL, 0,4mL da solução à 25mg/ml) de tal maneira a gerar nanofibras contendo 0,5%, 1%, 2% e 4% em massa de Bevacizumabe em PVA, respectivamente.

O CuSO₄ (10% em massa) foi dissolvido em solução aquosa de PVA com auxílio de um agitador magnético.

Processamento:

O processo de eletrofiação foi realizado com o auxílio do equipamento de electrospinning, (INSTOR – Sistemas de Inspeção Robótica) (Figura 4.1), instalado no Laboratório de Engenharia de Polímeros e Compósitos (LEPCom) da UFMG. O processamento das nanofibras de PCL e PVA foi realizado da forma descrita a seguir.

A solução de PCL/gelatina foi adicionada em uma seringa de vidro de 5mL (Arti Glass, CE, Italy) com agulha metálica sem bisel (21G 1) (agulha hipodérmica para irrigação, Konnen) e acoplada ao dispositivo electrospinning o qual possui um sistema para pressionamento da seringa com velocidade regulável (sistema de ejeção), permitindo regular a vazão da solução polimérica. A vazão utilizada foi de 4,2 mL/h e uma tensão de +25/0kV foi aplicada entre a agulha e o disco coletor. As nanofibras foram coletadas sobre uma folha de alumínio envolta em um disco coletor giratório automatizado de 8 cm de diâmetro. O disco coletor foi posicionado a uma distância de 15,5cm da ponta da agulha. O aparelho permaneceu ligado e as nanofibras foram processadas até o consumo de toda a solução da seringa. Além da nanofibra de PCL/gelatina pura, foram processadas nanofibras de PCL/gelatina para cada concentração do Bevacizumabe (PCL/gelatina.Bva). As nanofibras foram colocadas em uma placa petri e armazenadas sob refrigeração. O mesmo procedimento foi executado com a solução de PVA, alterando-se apenas a seringa, que foi substituída por uma de 3mL e a vazão para 1,7mL/h.

O processamento da estrutura *core-shell* foi realizado da seguinte maneira: a solução de PCL/gelatina (casca) foi transferida para uma seringa de vidro de 5mL (Arti Glass, CE, Italy) e a solução de PVA (núcleo) foi transferida para uma seringa de vidro de 3ml (Arti Glass, CE, Italy). Cada seringa foi acoplada em um dispositivo coaxial (Figura 4.2), onde a solução foi ejetada por uma agulha metálica, a qual possui um sistema para pressionamento da seringa com velocidade regulável (sistema de ejeção), possibilitando regular a vazão da solução polimérica. Foram utilizadas agulhas com diâmetros internos e externos de 0,8mm e 1,0 mm, respectivamente. A vazão utilizada foi de 4,2 mL/h para a solução da casca e 1,7 mL/h para solução do núcleo. A voltagem de +25/0kV foi aplicada entre o dispositivo coaxial e o disco coletor. O dispositivo foi posicionado a uma distância de 15,5cm da ponta da agulha. O aparelho permaneceu ligado e as nanofibras processadas até o consumo total das soluções das seringas. Foram preparadas também nanofibras *core-shell* para cada concentração do Bevacizumabe (Coaxial.Bva). As nanofibras foram colocadas em placa petri e armazenadas sob refrigeração.

Para a caracterização por microscopia eletrônica de transmissão, foi processada a nanofibra *core-shell* com adição do CuSO_4 na solução de PVA. A nanofibra foi coletada diretamente em um grid Holey Carbon de 300 mesh por 10 minutos.



Figura 4.1 - Equipamento de electrospinning (INSTOR – Sistemas de Inspeção Robótica). Lab. LEPCoM.



Figura 4.2 - Dispositivo coaxial. Lab. LEPCoM.

4.2 Caracterização

4.2.1 Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para a obtenção das imagens por microscopia eletrônica de varredura, as amostras de nanofibras PCL/gelatina, PVA e Coaxial e PCL/gelatina.Bva, PVA.Bva e Coaxial.Bva com as diferentes concentrações de Bevacizumabe foram recortadas nas dimensões de 1cmx1cm e metalizadas com ouro. Para a obtenção das imagens, foi utilizado o aparelho de Microscopia Eletrônica de Varredura (FEI, INSPECT S50) e Metalizadora (SPI Suplies – Sputter coater) do laboratório de Microscopia Eletrônica (LAB MEV) da UFMG.

Os diâmetros das nanofibras foram medidos utilizando o software ImageJ, através da medida de 100 fibras de cada uma das imagens obtidas pelo MEV.

Para a produção das imagens por microscopia eletrônica de transmissão foi utilizado o Microscópio Eletrônico de Transmissão Tecnai G2-20 - SuperTwin FEI - 200 kV do Centro de Microscopia da UFMG.

4.2.2 Termogravimetria (TG) e Termogravimetria Derivada (DTG)

As curvas TG das nanofibras PCL/gelatina, PVA e Coaxial e PCL/gelatina.Bva, PVA.Bva e Coaxial.Bva foram obtidas sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 30ml/min e uma taxa de aquecimento de 20°C/min, no intervalo de 20°C à 700°C.

As curvas TG foram obtidas utilizando o equipamento EXSTAR TG/DTA 7200 do laboratório LEPCoM da UFMG. O software OriginPro 8.0 foi utilizado para a plotagem e análise dos gráficos de TG e DTG.

4.2.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Curvas DSC das nanofibras PCL/gelatina, PVA e Coaxial e PCL/gelatina.Bva, PVA.Bva e Coaxial.Bva foram obtidas sob atmosfera de nitrogênio, aquecimento de 30 a 250°C, resfriamento até - 50°C, e reaquecimento até 250°C com taxa de 10°C/min.

O comportamento térmico dos sistemas foi avaliado utilizando o equipamento EXSTAR DSC 7020. O software OriginPro 8.0 foi utilizado para a plotagem e análise dos gráficos.

4.2.4 Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)

O espectrofotômetro Thermo Scientific modelo Nicolet6700 do laboratório LEPCoM da UFMG foi utilizado para a coleta dos espectros de infravermelho com transformada de Fourier. Os espectros foram obtidos através da técnica ATR (Reflexão Total Atenuada) para as amostras de nanofibras de PCL/gelatina, PVA e Coaxial com as diferentes concentrações de Bevacizumabe, com 16 varreduras e resolução de 4cm⁻¹.

O software OriginPro 8.0 foi utilizado para a plotagem e análise dos espectros.

4.3 Ensaio biológicos

O teste ELISA foi realizado no Departamento de Desenvolvimento Tecnológico Farmacêutico na Fundação Ezequiel Dias (FUNED). A avaliação da atividade antiangiogênica foi realizada no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Farmácia da UFMG. E o teste de citotoxicidade foi realizado em parceria com a Carolina Reis da

empresa CELLSEQ, no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

4.3.1 Avaliação da atividade do Bevacizumabe pelo teste ELISA indireto

O ensaio imunoenzimático ELISA é utilizado para a detecção e/ou quantificação de anticorpos que se ligam a seu antígeno em referência a um padrão. As etapas do ELISA indireto estão resumidas na Figura 4.3.

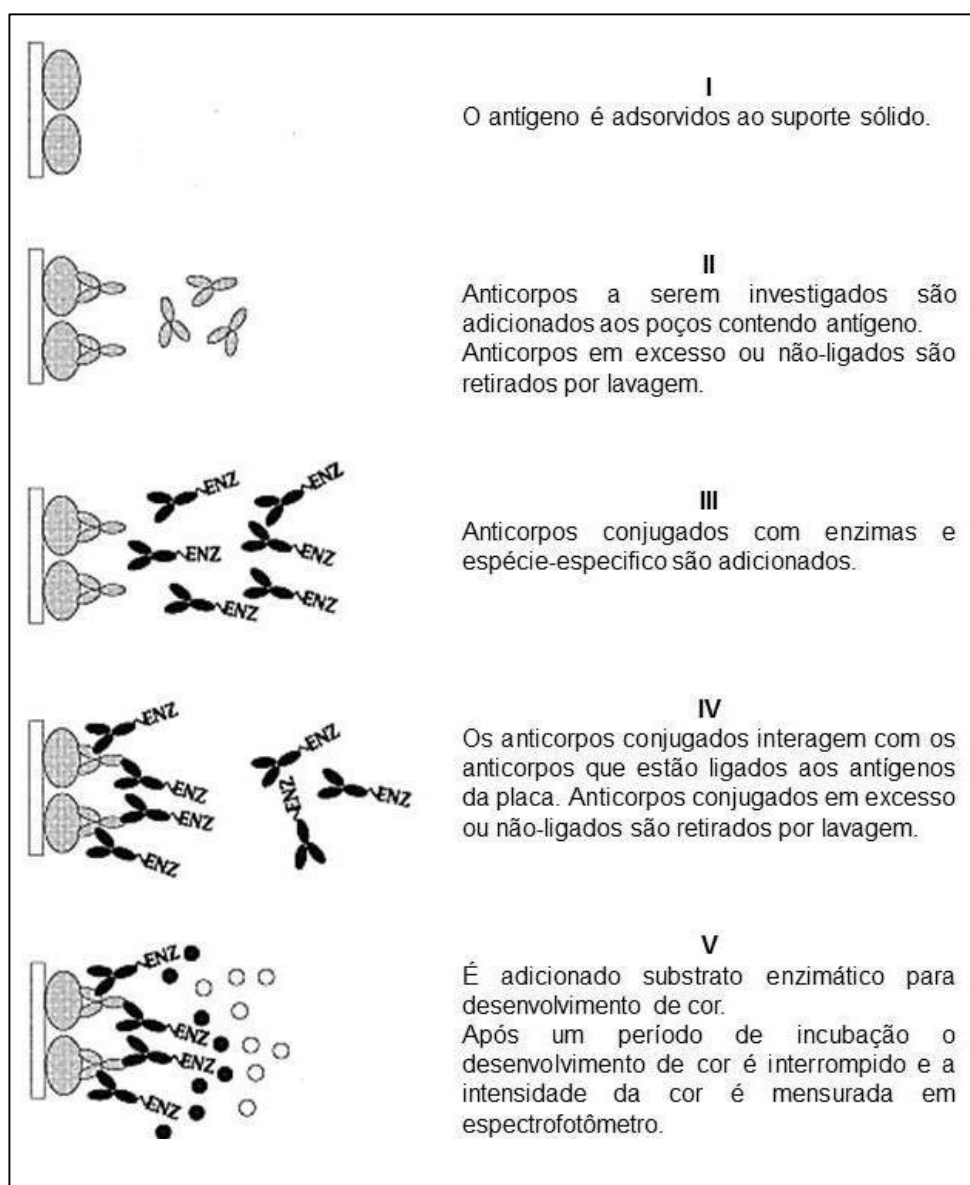


Figura 4.3 - Esquema representativo do ELISA, CROWTHER, 2000.

Preparo das amostras das nanofibras e concentrações do Bevacizumabe para o ensaio ELISA:

Foram cortadas e pesadas 5 amostras, de 8x8mm, de cada manta de nanofibra de PVA, PVA.Bva 2%, PVA.Bva 4%, Coaxial, Coaxial.Bva 2% e Coaxial.Bva 4%.

Cada amostra PVA.Bva 2% e Coaxial 2% possivelmente apresentaram uma média de 0,0458mg do Bevacizumabe. E cada amostra PVA.Bva 4% e Coaxial 4% possivelmente uma média 0,0914mg do Bevacizumabe. A previsão dessas médias foi feita a partir da quantidade de Bevacizumabe incluída no processamento das amostras e a suposição de um grau de encapsulamento de 100%. As amostras foram colocadas individualmente em tubos de eppendorf juntamente com 2000 μ L de PBS. Os tubos eppendorf foram identificados e colocados em um Environ Shaker a 37°C a 50 RPM por 21 dias. As amostras foram coletadas nas primeiras 12 e 24 horas e, após isso, a cada 48 horas até finalizar os 21 dias. As amostras foram refrigeradas e posteriormente utilizadas apenas 1000 μ L de cada mostra para o ensaio ELISA.

Para a curva padrão, foram utilizadas as seguintes concentrações do Bevacizumabe: 1,56 μ g/mL; 0,78 μ g/mL; 0,39 μ g/mL; 0,195 μ g/mL; 0,098 μ g/mL; 0,049 μ g/mL; 0,024 μ g/mL.

O ensaio ELISA envolveu as seguintes fases: sensibilização, bloqueio (BSA), aplicação do conjugado, revelação, parada e leitura.

Sensibilização (primeiro dia):

Foram aplicados 100 μ L do tampão de sensibilização (tampão carbonato pH 9,6) em cada poço das microplacas, exceto nos poços onde foi aplicado o ponto 1 da curva analítica. Nos poços do primeiro ponto da curva analítica, adicionou-se 200 μ L da solução de Bevacizumabe de 1,56 μ g/mL. Realizou-se a diluição seriada dos pontos da curva (a 50%) a partir do ponto 1, retirando 100 μ L do ponto 1 e transferindo para o ponto 2 e assim sucessivamente até o último ponto, atingindo-se as concentrações citadas anteriormente. Foram desprezados 100 μ L do último ponto da curva.

Nos poços das amostras das nanofibras, foram adicionados 100 μ L coletados de cada amostra. A homogeneização das amostras no poço foi realizada com a pipeta ao pipetar e retornar com o conteúdo para o poço. As placas foram tampadas com papel toalha ou alumínio e deixadas na geladeira overnight.

Bloqueio (segundo dia):

Foi desprezado o conteúdo das placas, as quais foram lavadas, utilizando-se a lavadora de placas. A programação desta foi ajustada com 200 μ L de tampão salina fosfato de

lavagem para cada poço em 3 ciclos de lavagem. Foi retirado o excesso que ficou na placa e aplicou-se 100 µL de BSA 3% em PBS 0,1M em cada poço. As placas tampadas foram incubadas a 37° C durante 1 hora.

Aplicação do Conjugado

A placa foi retirada da estufa e todo conteúdo foi desprezado. As placas foram lavadas novamente utilizando-se a lavadora de placas com 200 µl de tampão salina fosfato de lavagem para cada poço, em 3 ciclos de lavagem. Foi aplicado, em cada poço, 100µL do conjugado Anti-Human IgG diluído em tampão de bloqueio (1:60.000). As placas foram incubadas a 37° C, novamente, durante 30 minutos.

Revelação

O conteúdo foi desprezado novamente e lavado utilizando-se a lavadora de placas. Foram acrescentados 100 µl de uma solução de OPD (ortofenilenodiamina) preparada em tampão citrato-fosfato, acrescentado de 15 µL de H₂O₂, em cada poço. As placas foram novamente incubadas a 37° C durante 30 minutos.

Parada e leitura

A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de H₂SO₄ em cada poço. Os resultados foram obtidos com base na leitura da densidade ótica (D.O.) em espectrofotômetro com filtro de 492 nm.

4.3.2 Avaliação da atividade do Bevacizumabe incorporado ao sistema biodegradável de nanofibras poliméricas utilizando-se modelo de membrana corioalantóica de embrião de galinha (CAM)

Ovos embrionados da espécie Gallus domesticus e da linhagem Ross foram adquiridos junto à empresa Rivelli, localizada no município de Mateus Leme-MG.

Os ovos das aves fertilizados foram incubados a temperatura de 37°C e 60% de umidade relativa do ar, utilizando-se uma chocadeira do tipo incubadora automática digital (Premium Ecológica). No 3º dia de incubação, a casca dos ovos foi removida ao redor da câmara de ar, evidenciando a membrana interna da casca, que foi retirada cuidadosamente, expondo a membrana corioalantóica. Os ovos foram selados com fita adesiva transparente e mantidos na posição vertical na incubadora (Figura 4.4). No 5º dia, as amostras foram aplicadas e, imediatamente, foram colocados discos de celulose de tamanho padronizado sobre a CAM.

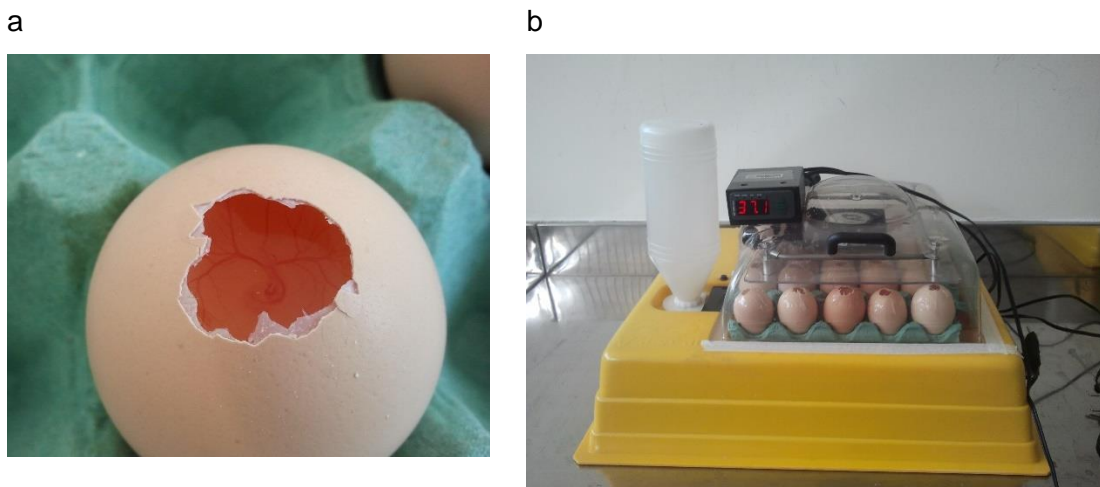


Figura 4.4 - a) Abertura da casca do ovo evidenciando a membrana carioalantóica; b) Ovos selados com fita adesiva transparente na incubadora.

Ovos embrionados foram aleatoriamente divididos em três grupos (n=14 para cada grupo): controle negativo (10 µl de tampão PBS, pH 7,4), controle positivo (10 µl de solução comercial de Bevacizumabe para quantidade equivalente a 250µg de Bevacizumabe/mL) e o amostras experimentais (amostras 8x8mm de nanofibras de PVA e Coaxial, e amostras 8x8mm de nanofibras de PVA e Coaxial com 0,5%, 1%, 2% e 4% de Bevacizumabe).

No 7º dia de incubação, foi realizada a extração das CAMs após prévia fixação com solução de formaldeído a 10% por 10 minutos. As CAMs foram fotografadas com uma câmera digital Moticam 2300 Q715CVD-2300-0-0 (Motic) acoplada a um estereomicroscópio Q766P/L/ZL (Motic). As imagens foram capturadas pelo software Images Plus 2.0 (Motic) com um aumento padronizado de 20X. As imagens obtidas foram processadas com o auxílio do programa ImageJ.

A resposta foi mensurada em função da área (pixels) relativa aos vasos sanguíneos em relação ao grupo controle negativo (CN), que foi fixado em 100% para o cálculo da redução dos vasos sanguíneos. Os resultados foram expressos como percentual de vasos sanguíneos (média). Foi realizada, pelo programa Prism 5.04, a análise estatística (ANOVA One-Way) dos dados obtidos, onde $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4.3.3 Avaliação da citotoxicidade pela redução do MTT

Para avaliar a citotoxicidade das nanofibras de PCL/gelatina, PCL/gelatina.Bva 4%, PVA, PVA.Bva 4%, Coaxial e Coaxial.Bva 4% sobre a linhagem celular ARPE-19,

células epiteliais pigmentadas da retina humana,(Figura 4.5), foi utilizado um método colorimétrico sensível, descrito por MOSMANN (1983), que mensura a viabilidade e proliferação celular.

Este ensaio baseia-se na capacidade de enzimas desidrogenases, presentes nas mitocôndrias de células viáveis, em converter o sal de tetrazólio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio bromide (MTT), solúvel em água, no cristal de formazan, produto insolúvel em água. A quantidade de formazan produzida é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Os cristais de formazan são solubilizados e a densidade ótica é quantificada pelo espectrofotômetro a 595 nm.

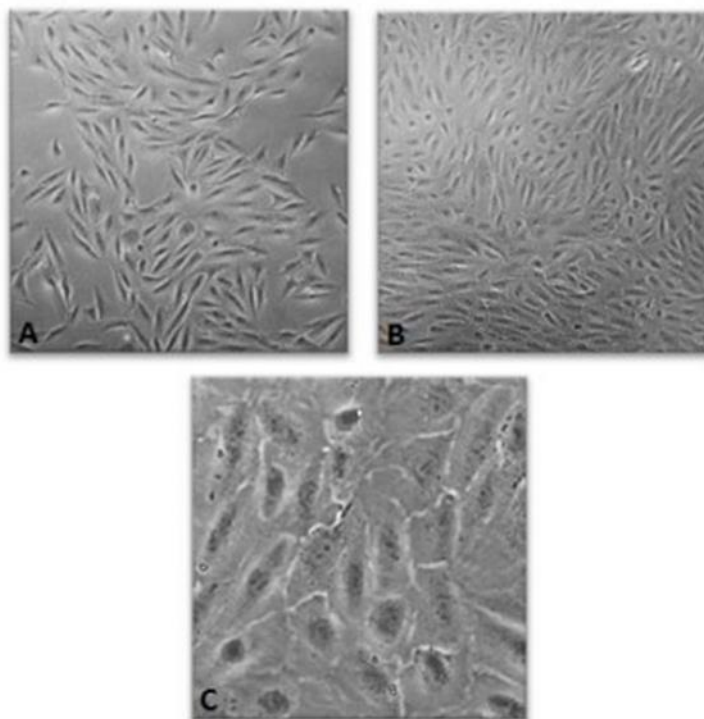


Figura 4.5 - ARPE-19 em aumentos de 20X (A e B) e 100X (C). Fonte: VIEIRA, 2011.

A ARPE-19 foi cultivada em meio DMEM-F12 suplementados com 10% de soro fetal bovino (SBF). As células foram semeadas em placas de poliestireno de 96 poços na densidade de 1×10^4 células/poço em um volume de 100 μ L/poço de meio suplementado com 10% de SBF e incubadas a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 horas, o meio de cultura foi retirado e então foram adicionadas mantas de nanofibras de 4mmx4mm, e 100 μ l de cada solução crescente de Bva (100, 178, 320, 560, 1000, 1780 μ g/mL) em cada poço com meio de cultura. Outros meios também foram submetidos ao mesmo procedimento: células ARPE-19 mais o meio DMEM F12, utilizado como controle negativo; meio DMEM

F12, utilizado como branco; e o meio DMEM F12 e ARPE-19 com o DMSO, utilizado como controle positivo. As células foram, então, incubadas por 24 e 72 horas.

Ao final desse tempo, o meio foi removido, assim como as nanofibras, e adicionou-se 85 µL de MTT (5 mg/mL) e 105 µL de meio DMEM-F12 suplementado com SBF. Após 2 horas de incubação, os cristais de formazan precipitados foram solubilizados por adição de 55µL dodecilsulfato de sódio (SDS) contendo 10% de HCl. A densidade óptica foi medida a 595 nm usando um leitor de microplacas, pelo Espectrofotômetro Anthos 2010, após 18 horas. O desenho das placas está representado na Figura 4.6.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C+ DMSO	Meio+ ARPE	PCL	PCL Bva	PVA	PVA Bva	Coaxial	Coaxial Bva	Bva 100 µg	Bva 180 µg	Bva 320 µg	Bva 560 µg
B	C+ DMSO	Meio+ ARPE	PCL	PCL Bva	PVA	PVA Bva	Coaxial	Coaxial Bva	Bva 100 µg	Bva 180 µg	Bva 320 µg	Bva 560 µg
C	C+ DMSO	Meio+ ARPE	PCL	PCL Bva	PVA	PVA Bva	Coaxial	Coaxial Bva	Bva 100 µg	Bva 180 µg	Bva 320 µg	Bva 560 µg
D												
E	Bva 1000 µg	Bva 1780 µg	Meio									
F	Bva 1000 µg	Bva 1780 µg	Meio									
G	Bva 1000 µg	Bva 1780 µg	Meio									
H												

Figura 4.6 - Esquema da placa utilizada nos testes de citotoxicidade do Bevacizumabe e nanofibras para a ARPE-19.

Todos poços foram semeados com as células ARPE na densidade 1×10^4 células/poço e após 24h foram adicionadas as soluções contendo a Bva em concentrações crescentes, assim como as nanofibras, com e sem a Bva.

Os dados foram expressos como percentagem de viabilidade celular em comparação com o controle (média \pm desvio padrão). Os dados foram avaliados pelo programa Prism 5.04 por meio da análise de variância (ANOVA Two-way). $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Pelo menos três experimentos independentes foram realizados para cada concentração.

Capítulo 5: Resultados e Discussão

5.1 MEV e MET

As Figura 5.1, Figura 5.2 e Figura 5.3 mostram as imagens do MEV e a distribuição dos diâmetros presentes nas nanofibras de PCL/gelatina, PVA e Coaxial, e PCL/gelatina.Bva, PVA.Bva e Coaxial.Bva.

As imagens mostraram que os três grupos apresentaram fibras bem formadas, aleatoriamente distribuídas e sem beads, ou contas. Produzir fibras livres de defeitos e sem falhas depende da regulação da tensão superficial e taxa de evaporação do solvente, permitindo assim a interação entre polímero e solvente (GONÇALVES *et al.*, 2015).

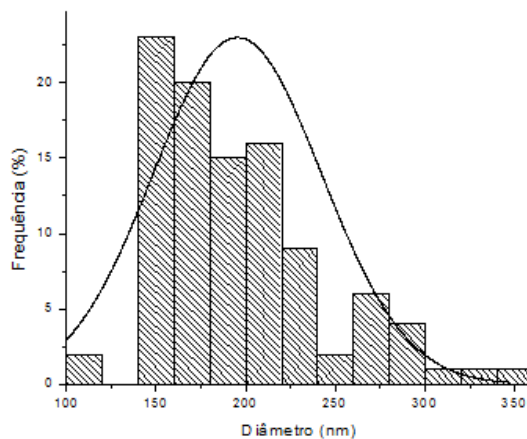
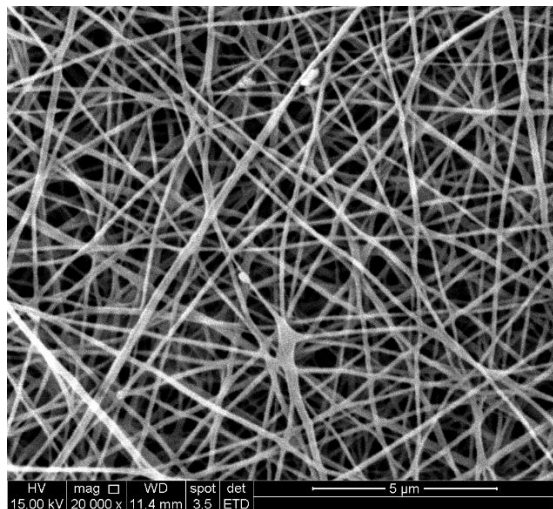
As fibras de PCL/gelatina com o Bva apresentaram diâmetros na faixa entre 50 a 450nm. As fibras de PVA apresentaram uma faixa maior entre 100 a 800nm. E os diâmetros das fibras coaxial apresentaram uma faixa entre 50 e 600nm.

A presença do Bva nas diferentes concentrações nas nanofibras não gerou grande diferença nos diâmetros das nanofibras, uma vez que a média dos diâmetros variou pouco entre elas (Tabela 1).

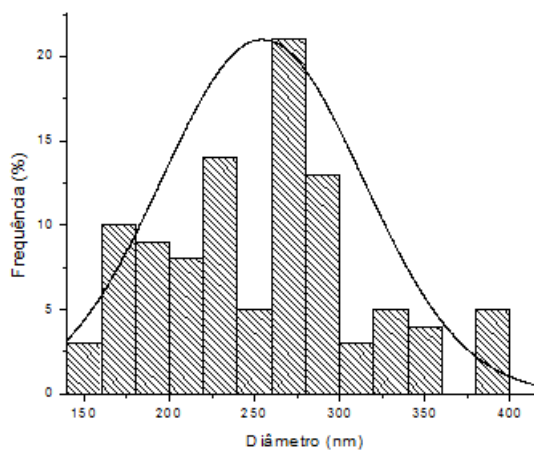
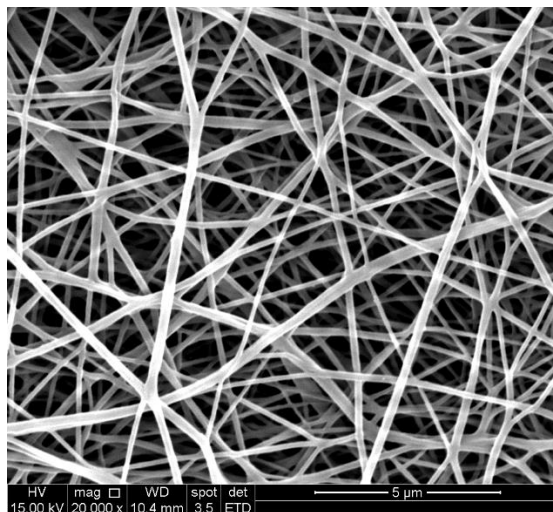
Tabela 1 - Média dos diâmetros das nanofibras PCL/gelatina, PVA e coaxial PCL/PVA nas diferentes concentrações de Bevacizumabe.

Média dos diâmetros das nanofibras (nm)			
	PCL	PVA	Coaxial
nanofibra sem Bva	195±47	473±194	190±40
Bva 0,5%	255±59	299±69	224±44
Bva 1%	248±57	326±104	244±60
Bva 2%	198±44	313±109	272±86
Bva 4%	175±38	311±90	255±87

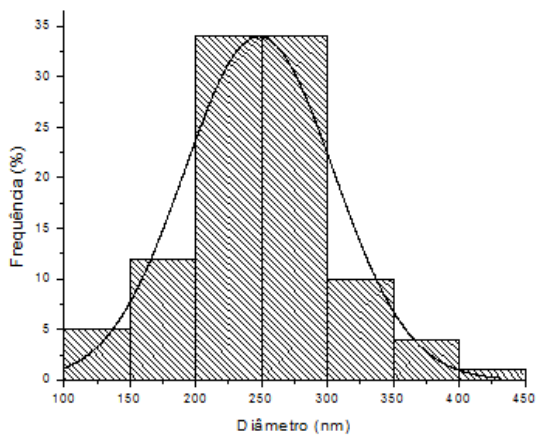
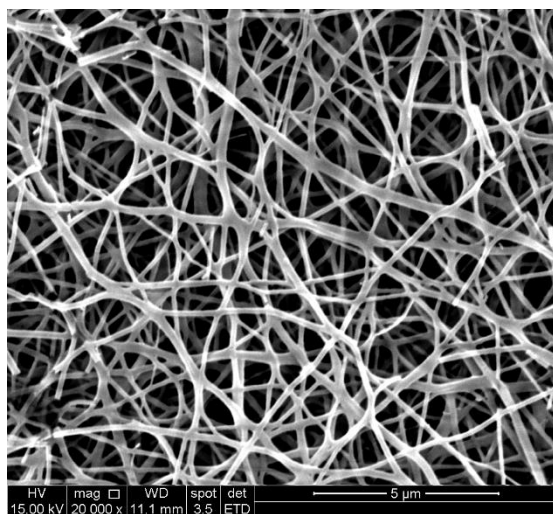
a



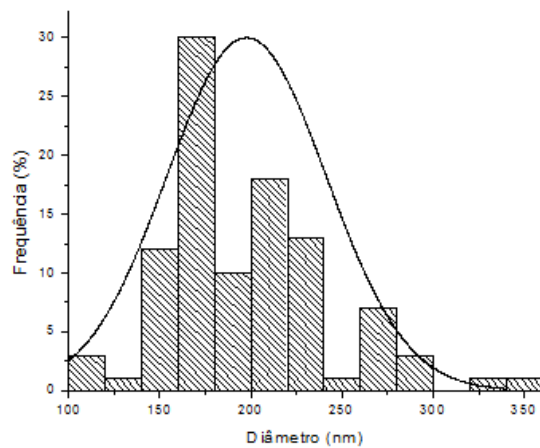
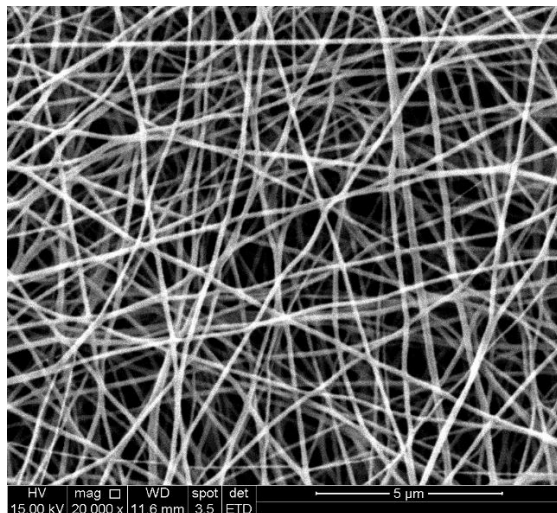
b



c



d



e

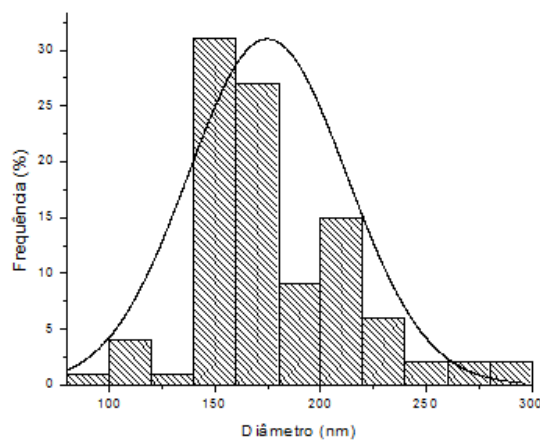
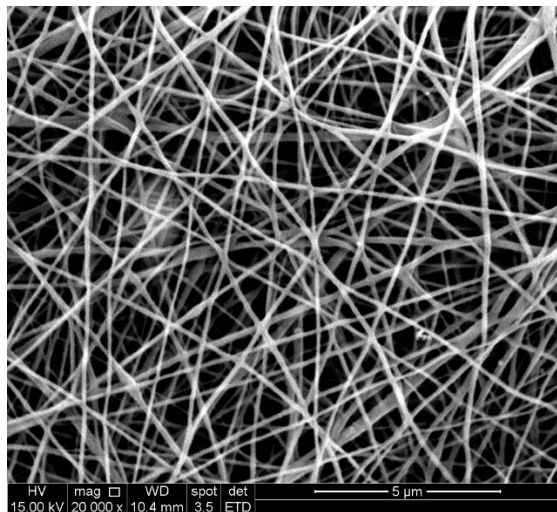
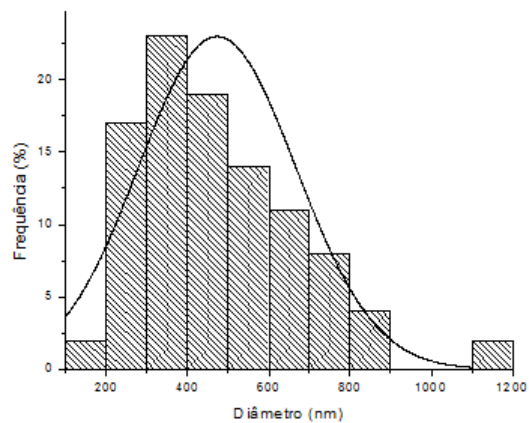
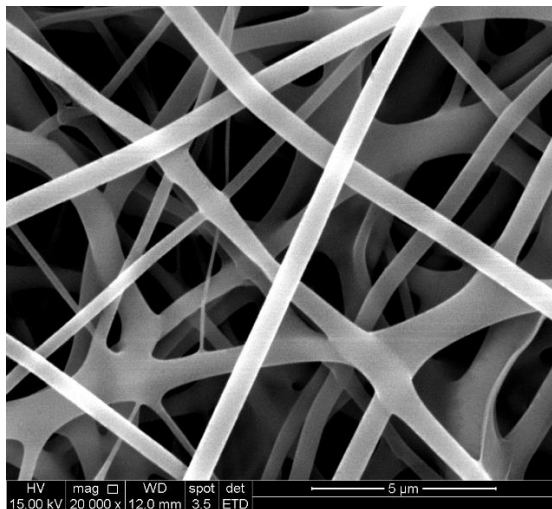
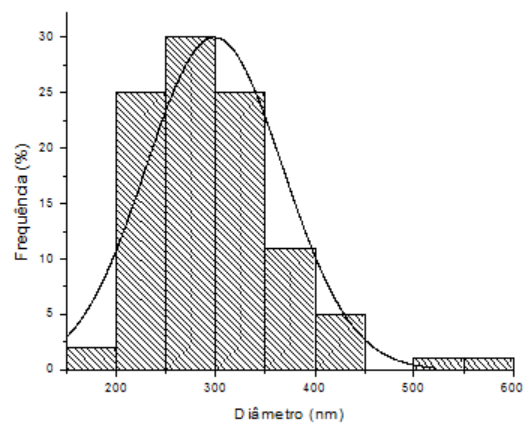
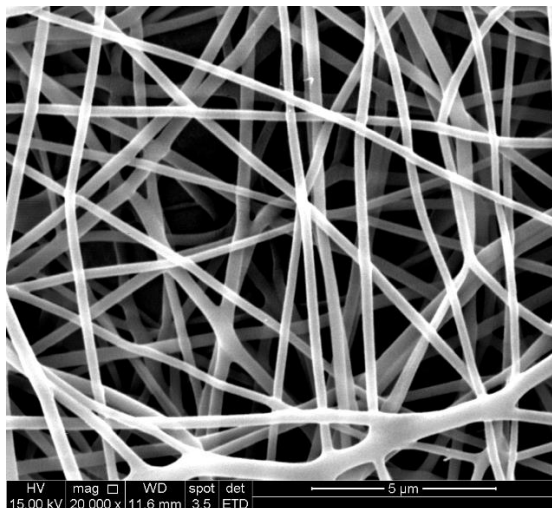


Figura 5.1 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (20.000X) e histogramas representativos dos diâmetros das nanofibras: (a) nanofibras de PCL/gelatina; (b) nanofibras de PCL/gelatina.Bva 0,5%; (c) nanofibras de PCL.gelatina.Bva 1%; (d) nanofibras de PCL.gelatina.Bva 2%; (e) nanofibras de PCL/gelatina.Bva 4%.

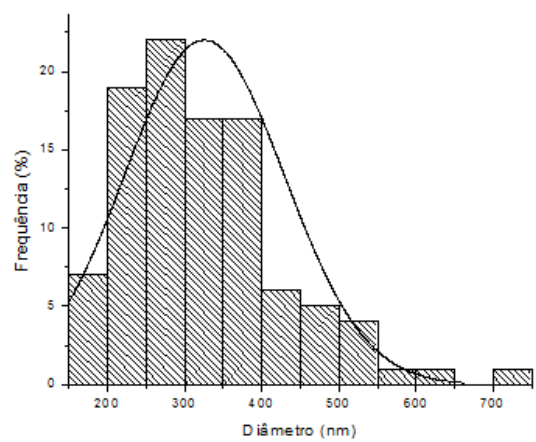
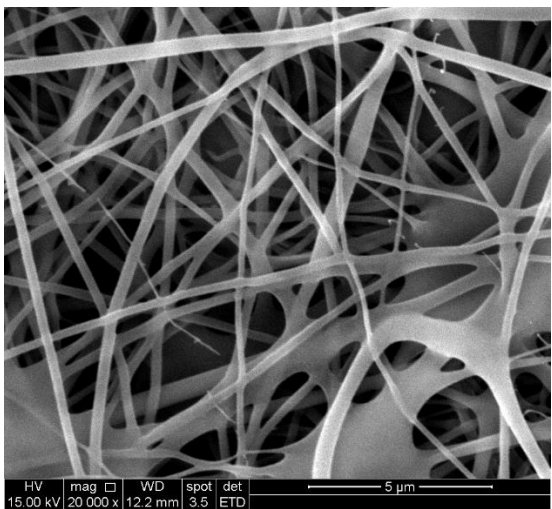
a



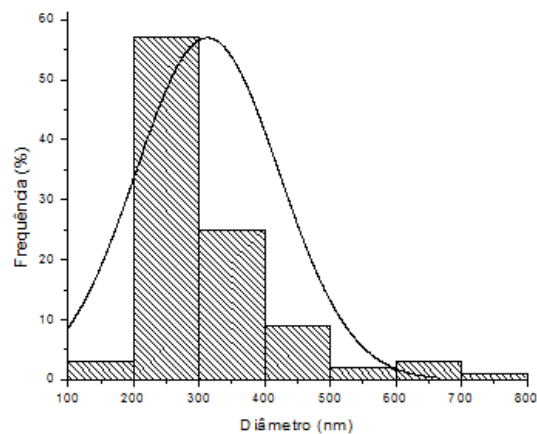
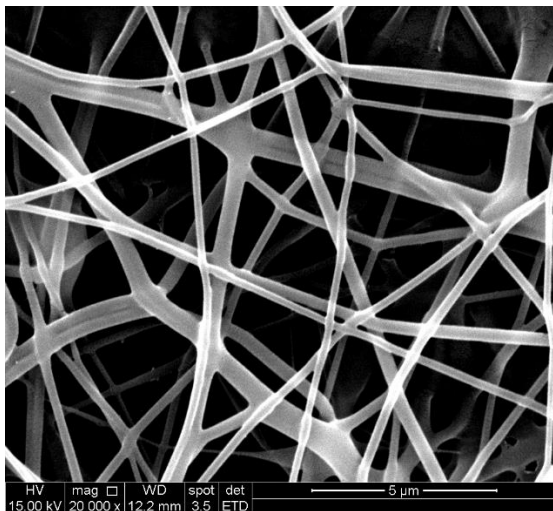
b



c



d



e

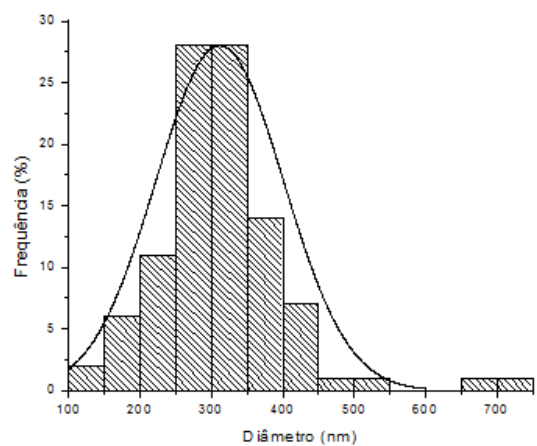
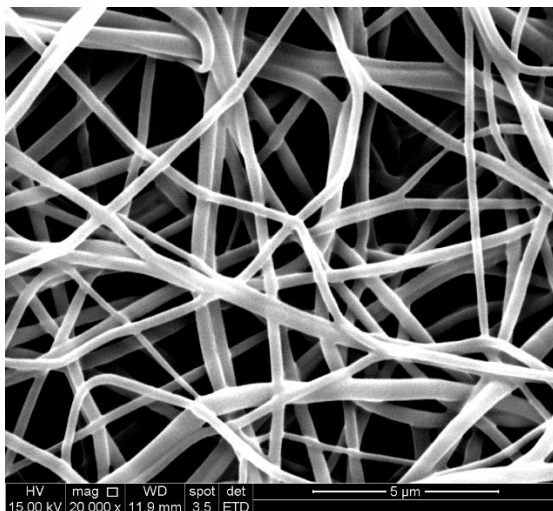
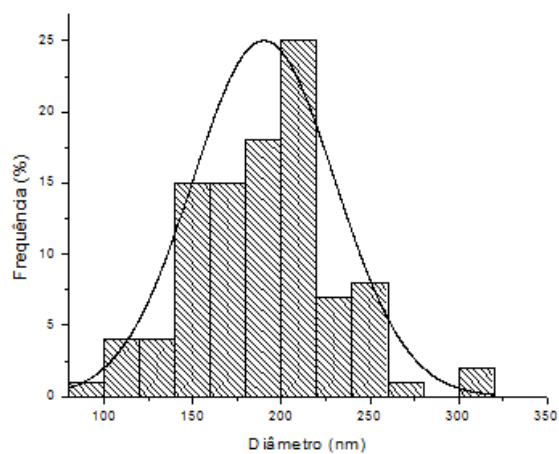
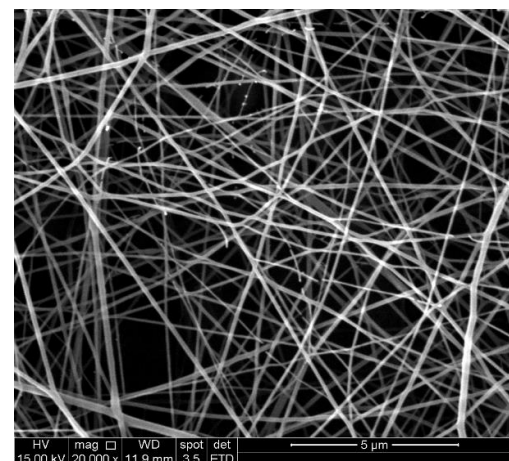
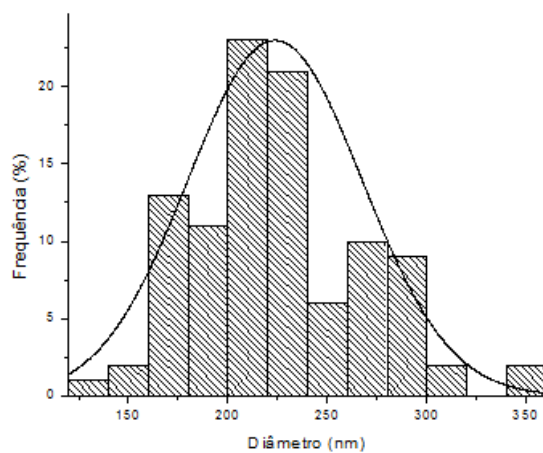
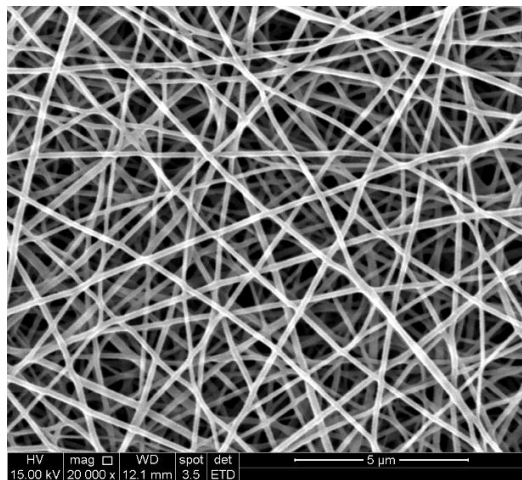


Figura 5.2 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (20.000 X) e histogramas representativos dos diâmetros das nanofibras: a) nanofibras de PVA; b) nanofibras de PVA.Bva 0,5%; c) nanofibras de PVA.Bva 1%; d) nanofibras de PVA.Bva 2%; e) nanofibras de Pva.Bva 4%.

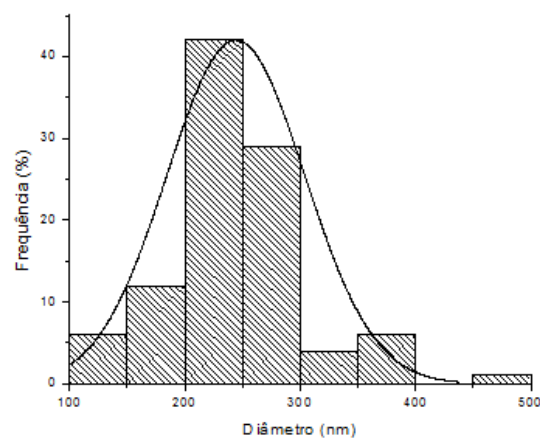
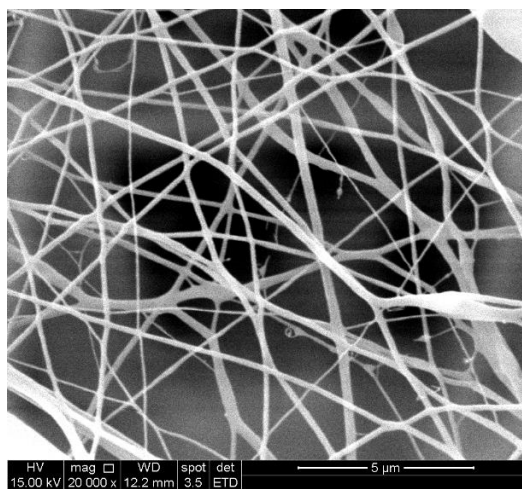
a



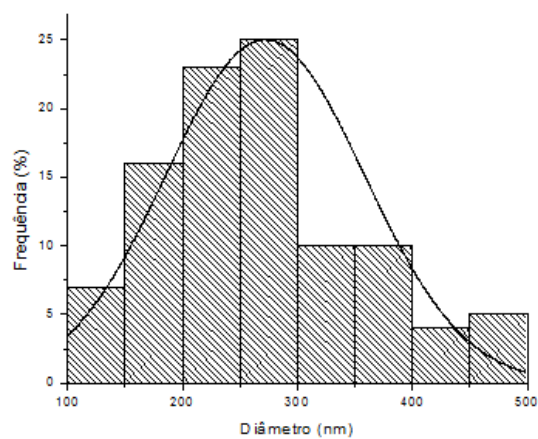
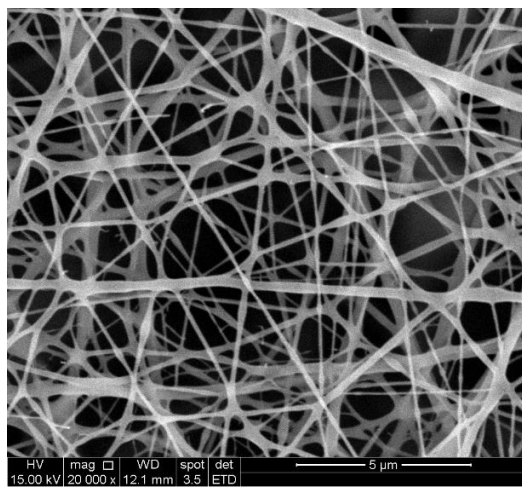
b



c



d



e

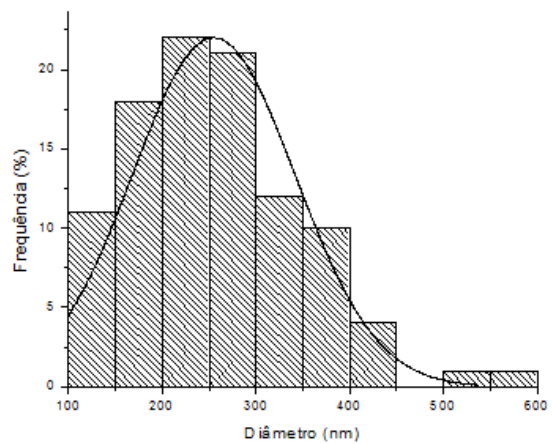
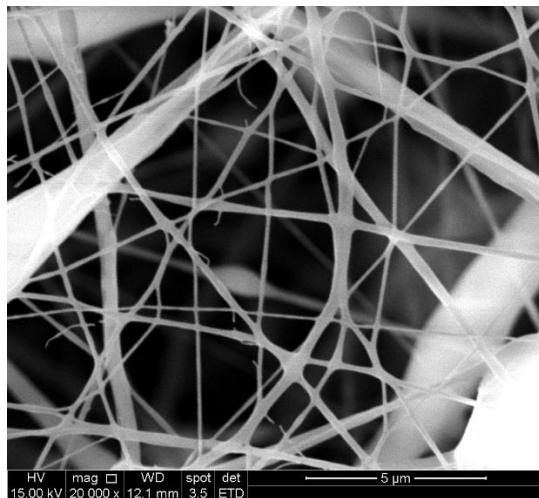


Figura 5.3 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (20.000 X) e histogramas representativos dos diâmetros das nanofibras. a) nanofibras Coaxial; b) nanofibras Coaxial.Bva 0,05%; c) nanofibras Coaxial.Bva 1%; d) nanofibras Coaxial.Bva 2%; e) nanofibras Coaxial.Bva 4%.

A imagem de microscopia eletrônica de transmissão, Figura 5.4, exibiu camada dupla devido aos diferentes pesos moleculares dos materiais presentes (WON *et.al*, 2012). Essa imagem da nanofibra coaxial foi possível, , devido a diferença de peso molecular entre a casca (PCL/gelatina) e núcleo (PVA) possibilitando sua distinção, após acrescentar o CuSO_4 ao núcleo.

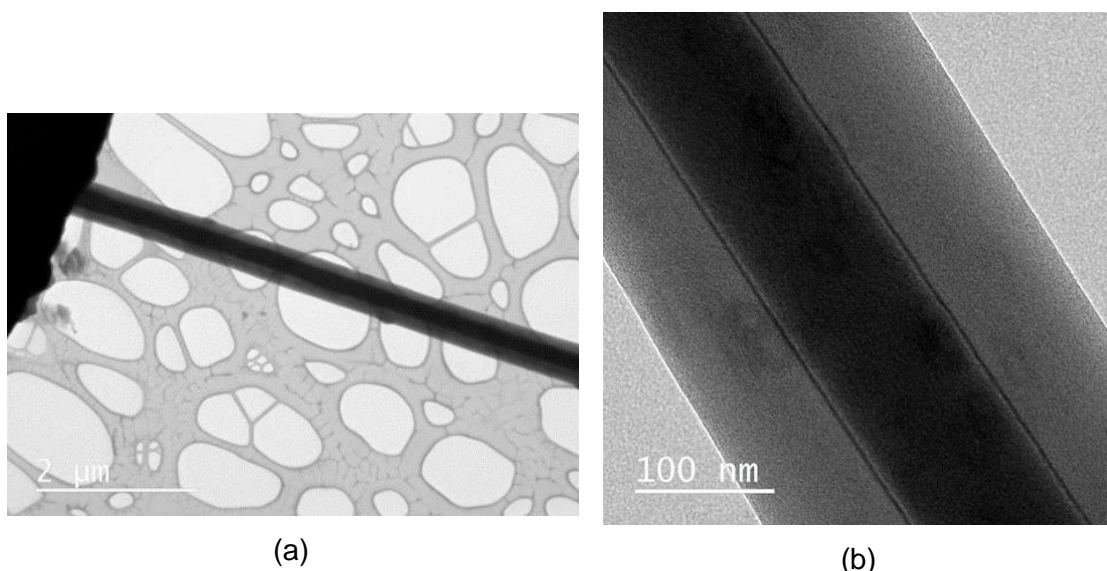


Figura 5.4 - Imagem da estrutura de nanofibras coaxial contendo CuSO_4 através de microscopia eletrônica de transmissão.

5.2 Análise Térmica

5.2.1 Análise térmica das nanofibras PCL/gelatina, PVA e Coaxial

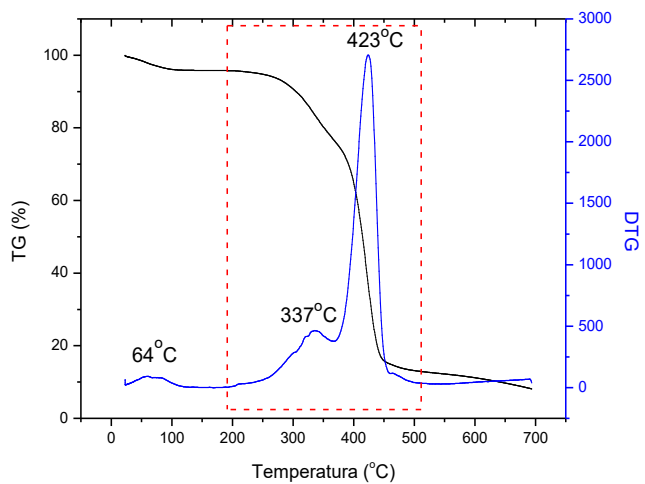
As curvas TG e DTG (primeira derivada das curvas TG) das nanofibras PCL/gelatina, PVA e Coaxial PCL/PVA permitiram a determinação das temperaturas de ocorrência de regimes de perdas de massa. Nas curvas de DSC, foram avaliados os valores de temperatura de fusão (T_m), temperatura de cristalização (T_c) e temperatura de transição vítrea (T_g) dos polímeros, além da entalpia de fusão (ΔH_m) e entalpia de cristalização (ΔH_c).

As curvas da TG e DTG para a nanofibra de PCL/gelatina, Figura 5.5.a., apresentaram, na primeira etapa na faixa de 22°C a 112°C , um pico de temperatura máxima a 64°C , apresentando perda de massa de aproximadamente 4%, associada à evaporação da água fisicamente adsorvida na rede polimérica. A segunda etapa, na faixa de 195°C a 362°C , apresentou um pico centrado em 337°C correspondendo a uma perda de massa de aproximadamente 19%. Uma terceira etapa, na faixa de 373°C a 505°C , com pico centrado em 423°C , apresentou perda de massa de aproximadamente 67%, atribuída à

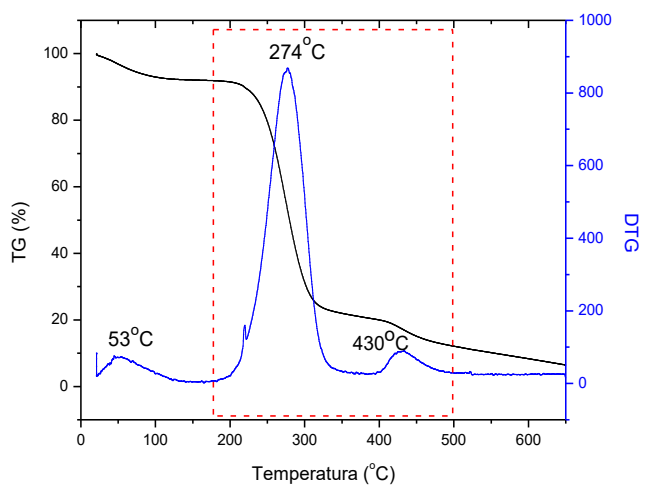
degradação térmica da cadeia polimérica. A segunda etapa está associada à degradação da gelatina presente nas nanofibras de PCL/gelatina, e a terceira etapa associada à degradação do PCL. PORTO (2007) encontrou uma temperatura máxima em 350°C e 62,2% de perda de massa associado à degradação da proteína em filmes de gelatina. CASARIN (2010) encontrou um início da faixa próximo aos 390°C com 98% de perda de massa associado a degradação do PCL. AGUDELE (2015) encontrou uma temperatura máxima de degradação em 320°C associada à perda de massa da gelatina, e em 405° C associado ao PCL, em uma nanofibra de PCL/gelatina 60:40.

As curvas TG e DTG para as nanofibras de PVA, Figura 5.5.b, apresentaram uma primeira etapa de degradação na faixa de 23°C a 119°C (pico de temperatura máxima a 53°C), com perda de massa de aproximadamente 7%, associada à evaporação da água/solventes. Uma segunda etapa na faixa de 182°C à 347°C apresentou um pico de degradação máxima centrado em 274°C, correspondendo a uma perda de massa de aproximadamente 70%, atribuída à fragmentação da cadeia do PVA e eliminação de moléculas menores (SCHREUDER *et.al*, 2002). Tais valores se mostram consistentes ao encontrado por PARPARITA *et al.*,2012 e WON *et al.*, 2012. Uma terceira etapa de degradação na faixa de 391°C a 495°C, e com pico centrado em 430°C, apresentou perda de massa de aproximadamente 14%, a qual pode ser atribuída à degradação dos fragmentos restantes da molécula (MELO, 2012).

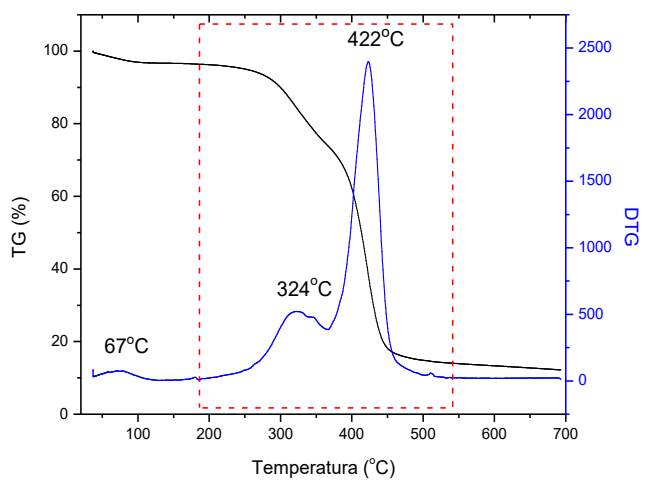
As curvas da TG e DTG para a nanofibra coaxial, Figura 5.5.c, apresentou uma primeira etapa de degradação, na faixa de 38°C a 117°C (pico de temperatura máxima a 67°C), apresentando perda de massa de aproximadamente 3% associada à evaporação da água fisicamente adsorvida na rede polimérica. A segunda etapa, na faixa de 189°C à 363°C, apresentou um pico centrado em 324°C correspondendo a uma perda de massa de aproximadamente 22%. A perda de massa nesta etapa pode ser atribuída à degradação da gelatina e degradação parcial do PVA. Uma terceira etapa, na faixa de 367°C a 534°C, com pico centrado em 422°C, apresentou perda de massa de aproximadamente 62%, atribuída à degradação térmica do PCL e PVA na mesma faixa de temperatura.



(a)



(b)



(c)

Figura 5.5 - Análise da TG e DTG das nanofibras a)PCL/gelatina, b)PVA e c) coaxial.

As curvas DSC das nanofibras de PCL/gelatina, PVA e coaxial apresentaram características de polímeros semicristalinos, com picos de fusão durante o aquecimento, temperatura de transição vítrea e picos de cristalização no resfriamento (CASARIN, 2010). Na Tabela 2 estão listados os valores obtidos pelas curvas do DSC das várias transições observadas no primeiro aquecimento, resfriamento e segundo aquecimento.

Tabela 2 - Valores da temperatura de transição vítrea (Tg), temperatura de fusão (Tm), entalpia de fusão (ΔH_m), temperatura de cristalização (Tc) e entalpia de cristalização (ΔH_c) obtidos no 1º aquecimento, resfriamento e 2º aquecimento das nanofibras de PCL, PVA e coaxial((1)representa os valores do 1º aquecimento, (2) resfriamento e (3) o 2º resfriamento) via DSC.

Amostras	PCL					PVA				
	Tg(°C)	Tm(°C)	ΔH_m (mJ/mg)	Tc(°C)	ΔH_c (mJ/mg)	Tg(°C)	Tm(°C)	ΔH_m (mJ/mg)	Tc(°C)	ΔH_c (mJ/mg)
PCL	(1)	-	50,7	46,9	-	-	-	-	-	-
	(2)	-	-	-	10,5	-28,6	-	-	-	-
	(3)	-	47,4	32,3	-	-	-	-	-	-
PVA	(1)	-	-	-	-	-	219,7	47,3	-	-
	(2)	-	-	-	-	-	71	-	186,8	-57
	(3)	-	-	-	-	-	71,2	223,6	52,5	-
Coaxial	(1)	-	47,4	18,5	-	-	222,8	19,2	-	-
	(2)	-	-	-	12,4	-15,4	67	-	181,5	-19,7
	(3)	-	46	15,4	-	-	85	219,8	23,0	-

No primeiro aquecimento, Figura 5.6.a, a curva DSC da nanofibra de PCL/gelatina apresentou uma acentuada banda endotérmica associada ao processo de fusão do PCL com uma temperatura de 50°C e uma entalpia de 49,9 mJ/mg (que estão de acordo com AGUDELO,2015). Há um segundo evento endotérmica relacionada com o início da degradação térmica da gelatina, presente na nanofibra de PCL, que ocorre em torno de 180°C.

A curva DSC do PVA relativa ao primeiro aquecimento, Figura 5.6.b, apresentou eventos endotérmicos relacionados à perda de água (semelhante ao verificado na análise TG) com temperatura aproximada aos 120°C. Pode-se notar a temperatura de transição vítrea do PVA em torno de 75°C.

A curva DSC relativa ao primeiro aquecimento das nanofibras coaxiais, Figura 5.6.c, apresentou evento de fusão relacionado ao PCL à 47°C com entalpia de 18,5 mJ/mg. Além disso, eventos associados com a eliminação de voláteis (125°C) e de fusão do PVA também são notados. Estes resultados reforçam as informações reveladas por MET e comprovam a presença de PVA nas nanofibras coaxiais. A razão entre as entalpias de fusão dos polímeros nas nanofibras puras e as entalpias de fusão dos mesmos polímeros nas nanofibras coaxiais se mostra próxima da composição programada para as mantas, ou seja, 50/50 em massa de PVA/PCL.

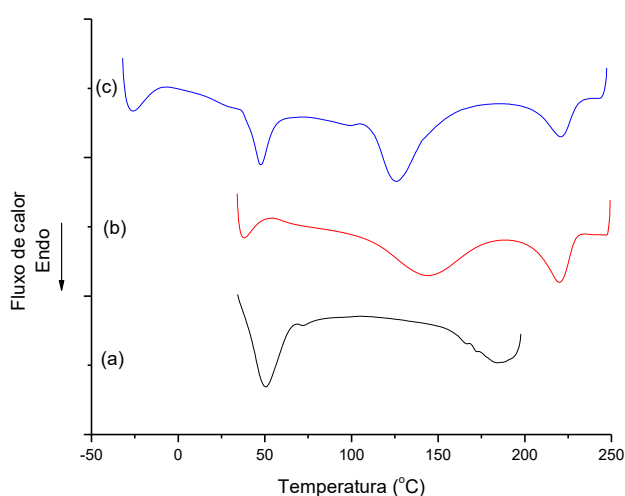


Figura 5.6 - Curvas DSC para o 1º aquecimento. Comparação das nanofibras a) PCL, b) PVA e c) coaxial.

No resfriamento, Figura 5.7.a, curva relativa às nanofibras de PCL/gelatina apresentou uma liberação de calor de cristalização a 10,5°C com entalpia de -28,6 mJ/mg, valor que está de acordo com o reportado por OLIVEIRA *et al.*, 2013. As nanofibras de PVA apresentaram cristalização à 186°C com entalpia de -57mJ/mg, similar ao reportado por HASSAN e PEPPAS, 2000. A nanofibra coaxial PC/PVA apresentou cristalização à 181°C com entalpia de -19,7mJ/mg referente ao PVA e cristalização à 12°C com entalpia de -15,5mJ/mg referente ao PCL.

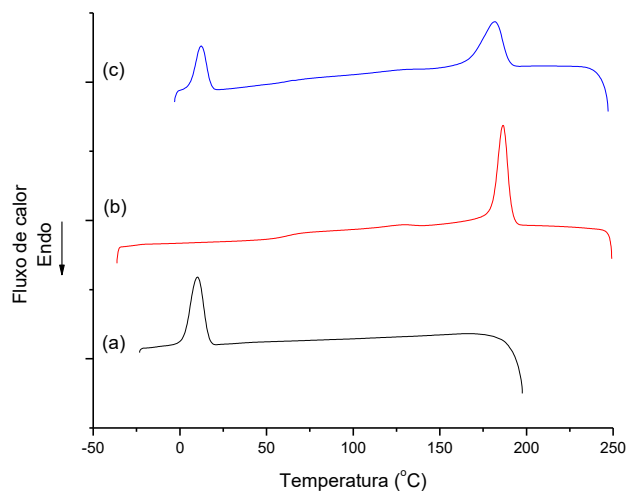


Figura 5.7 - Curvas do DSC para o resfriamento. Comparação das nanofibras a) PCL, b) PVA e c) coaxial. No segundo aquecimento, Figura 5.8, as curvas DSC relativas a nanofibras de PCL e PVA apresentaram fusão do PCL e PVA em temperaturas aproximadas de 47°C e 223°C e entalpias de fusão de 32,3mJ/mg e 52,5mJ/mg, respectivamente (VOGELSANGERA *et al.*, 2003; ANDRADE *et.al.*, 2015). A nanofibra coaxial PCL/PVA apresentou dois eventos de fusão, um em 46°C com entalpia de 15,4mJ/mg referente ao PCL, e um outro em 219°C com entalpia de 23mJ/mg referente ao PVA. Não há eventos relativos à eliminação de voláteis, já que estes foram eliminados na primeira corrida.

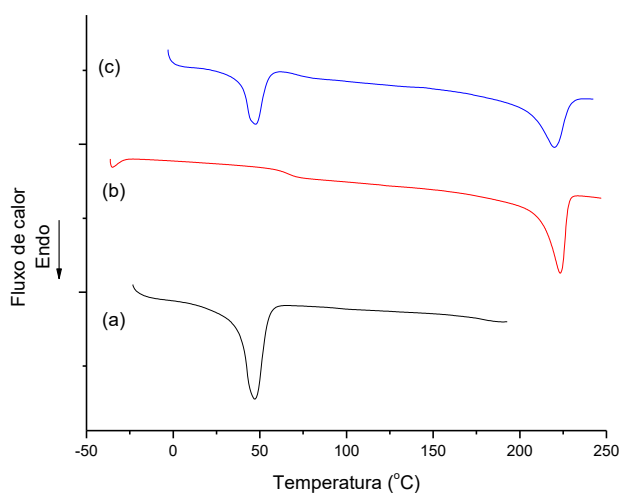


Figura 5.8 - Curvas DSC para o segundo aquecimento. Comparação das nanofibras a) PCL, b) PVA e c) coaxial.

5.2.2 Análise térmica das nanofibras PCL, PVA e Coaxial com as diferentes concentrações do Bevacizumabe.

Na Tabela 3 estão listadas as temperaturas dos principais eventos encontrados na TG e DTG das nanofibras PCL, PVA e Coaxial, e das mesmas contendo 0,5%, 1%, 2% e 4% do Bevacizumabe.

Na Figura 5.9, são apresentadas as curvas TG dos três grupos contendo as concentrações do Bva. Foi observado que, para cada grupo, a decomposição do PCL, PVA e Bva começou na mesma faixa de temperatura. Gomes (2011) encontrou, para a amostra de Bevacizumabe liofilizado, uma perda de massa na temperatura entre 248,06°C e 311,61 °C de 27,04% atribuída à decomposição parcial do fármaco, e uma segunda perda de massa de 14,49 % entre 311,61 °C e 373,66°C. Estas etapas de degradação não foram detectadas claramente nas curvas TG das nanofibras com Bva, devido, provavelmente, à baixa concentração do Bva nas nanofibras.

Tabela 3 - Resultados da TG e DTG das nanofibras de PCL, PVA e Coaxial e das nanofibras PCL, PVA e coaxial contendo Bevacizumabe.

Amostra	1a Etapa			2a Etapa			3a Etapa			4a Etapa		
	Temp. de Perda de Água (°C)	Temp. Máxima (°C)	Perda de Água %	Temp. de Decomposição (°C)	Temp. Máxima (°C)	Decomposição %	Temp. de Decomposição (°C)	Temp. Máxima (°C)	Decomposição %	Temp. de Decomposição (°C)	Temp. Máxima (°C)	Decomposição %
PCL	22-112	64	3,94	195-362	337	19,88	373-505	423	67,23	-	-	-
PCL.Bva 0,5%	22-108	63	3,32	212-363	328	19,20	369-507	426	65,74	-	-	-
PCL.Bva 1%	24-108	63	3,47	218-360	331	19,36	367-482	422	67,32	-	-	-
PCL.Bva 2%	22-109	63	4,05	195-363	324	20,62	369-483	420	65,04	-	-	-
PCL.Bva 4%	25-112	70	4,64	198-361	320	22,82	368-486	422	60,59	-	-	-
PVA	23-119	53	7,18	182-347	274	70,67	391-495	430	14,56	-	-	-
PVA.Bva 0,05%	24-118	63	7,78	182-369	270	70,10	383-465	433	22,23	-	-	-
PVA.Bva 1%	22-122	57	6,59	181-367	281	69,45	383-496	434	14,70	-	-	-
PVA.Bva 2%	21-96	49	6,75	180-380	276	67,88	481-472	427	13,06	-	-	-
PVA.Bva 4%	20-110	51	6,93	181-386	298	64,91	392-498	432	14,06	-	-	-
Coaxial	38-117	67	3	189-363	324	22,30	367-534	422	62,8	-	-	-
Coaxial. Bva 0,5%	24-113	61	5,12	191-362	330	22,30	369-514	415	57,3	515-689	689	9,98
Coaxial. Bva 1%	24-115	68	5,36	216-360	331	24,40	363-443	401	51,09	445-518	451	12,12
Coaxial. Bva 2%	22-132	63	6,51	218-360	343	76,17	363-502	411	-	536-687	584	15,5
Coaxial. Bva 4%	22-115	63	5,30	212-362	331	27,29	365-518	410	57,94	-	-	-

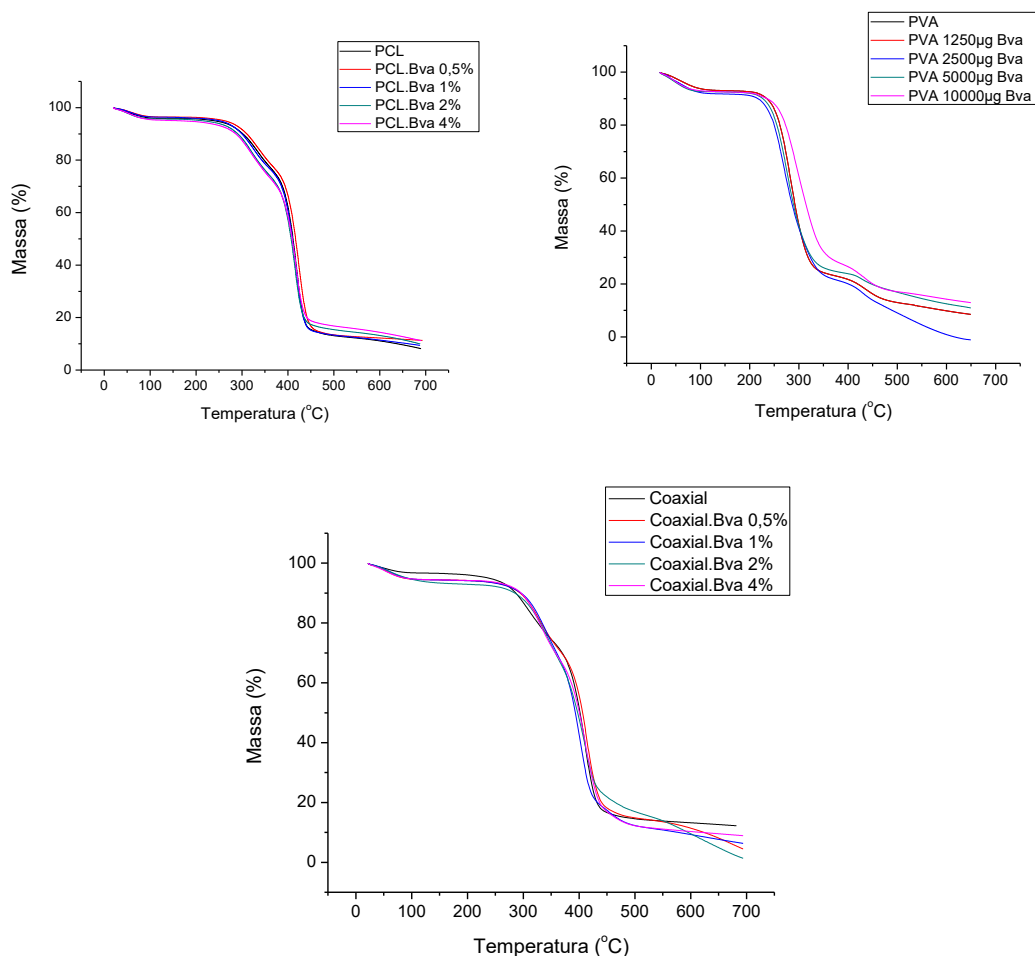


Figura 5.9 - Curvas da TG das nanofibras de PCL, PVA e Coaxial e das nanofibras PCL, PVA e coaxial contendo Bevacizumabe.

Na Tabela 4 e nas Figura 5.10, Figura 5.11 e Figura 5.12 são listados e representados os valores obtidos pelas curvas DSC no primeiro aquecimento, resfriamento e segundo aquecimento para as nanofibras PCL, PVA e coaxial e as mesmas contendo 0,5%, 1%, 2% e 4% do bevacizumabe. Não foi observada uma diferença significativa nos valores encontrados de temperatura e entalpia de eventos térmicos entre as nanofibras sem o Bva e as nanofibras com o Bva, provavelmente devido a baixa concentração de Bva nas nanofibras. Também não foi observado nenhum evento térmico específico para o Bevacizumabe. Gomes 2012 encontrou nas curvas DSC do Bevacizumabe liofilizado um fenômeno endotérmico em 145,63°C atribuído à fusão do fármaco, não sendo apresentada perda de massa na curva TG a essa temperatura. WANG 2000 relatou a dificuldade em identificar a T_g das proteínas em formulações, e TIAN *et al.*, 2006 a dificuldade de se identificar as transições de proteínas como o Bevacizumabe.

Tabela 4 - Valores da temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão (T_m), entalpia de fusão (ΔH_m) e temperatura de cristalização (T_c) e entalpia de cristalização (ΔH_c) obtidos no 1º aquecimento, resfriamento e 2º aquecimento das curvas DSC das nanofibras de PCL/gelatina, PVA e coaxial e das nanofibras PCL/gelatina, PVA e coaxial contendo Bevacizumabe ((1) representa os valores do 1º aquecimento, (2) resfriamento e (3) 2º resfriamento).

Amostras	PCL					PVA				
	$T_g(^{\circ}C)$	$T_m(^{\circ}C)$	$\Delta H_m(mJ/mg)$	$T_c(^{\circ}C)$	$\Delta H_c(mJ/mg)$	$T_g(^{\circ}C)$	$T_m(^{\circ}C)$	$\Delta H_m(mJ/mg)$	$T_c(^{\circ}C)$	$\Delta H_c(mJ/mg)$
PCL	(1)	-	50,7	46,9	-	-	-	-	-	-
	(2)	-	-	-	10,5	-28,6	-	-	-	-
	(3)	-	47,4	32,3	-	-	-	-	-	-
PCL.Bva 0,05%	(1)	-	49,4	22,4	-	-	-	-	-	-
	(2)	-	-	-	10,3	-26,1	-	-	-	-
	(3)	-	49,3	26,9	-	-	-	-	-	-
PCL.Bva 1%	(1)	-	49,7	33,7	-	-	-	-	-	-
	(2)	-	-	-	9,6	-28,9	-	-	-	-
	(3)	-	47,8	29,4	-	-	-	-	-	-
PCL.Bva 2%	(1)	-	49,8	30,2	-	-	-	-	-	-
	(2)	-	-	-	9,2	-24,8	-	-	-	-
	(3)	-	48,6	26,3	-	-	-	-	-	-
PCL.Bva 4%	(1)	-	50,8	31,1	-	-	-	-	-	-
	(2)	-	-	-	8,8	-25,7	-	-	-	-
	(3)	-	50,5	25,7	-	-	-	-	-	-
PVA	(1)	-	-	-	-	-	219,7	47,3	-	-
	(2)	-	-	-	-	-	71	-	186,8	-57
	(3)	-	-	-	-	-	223,6	52,5	-	-
PVA.Bva 0,05%	(1)	-	-	-	-	-	218,1	42,7	-	-
	(2)	-	-	-	-	-	73,5	-	189,4	-53,3
	(3)	-	-	-	-	-	71,3	225,3	50,3	-
PVA.Bva 1%	(1)	-	-	-	-	-	215,8	30,8	-	-
	(2)	-	-	-	-	-	70,7	-	186,2	-52,5
	(3)	-	-	-	-	-	69,4	222,9	51,0	-
PVA.Bva 2%	(1)	-	-	-	-	-	215,9	39,2	-	-
	(2)	-	-	-	-	-	70,5	-	184,4	-48,5
	(3)	-	-	-	-	-	70,8	221,3	47,8	-
PVA.Bva 4%	(1)	-	-	-	-	-	216,16	36,4	-	-
	(2)	-	-	-	-	-	75,2	-	181,6	-56,1
	(3)	-	-	-	-	-	73,3	218,3	50,7	-
Coaxial	(1)	-	47,4	18,5	-	-	222,8	19,2	-	-

	(2)	-	-	-	12,4	-15,4	67	-	-	181,5	-19,7
	(3)	-	46	15,4	-	-	-	219,8	23,0	-	-
Coaxial.Bva 0,05%	(1)	-	48	31,9	-	-	-	220,6	14,7	-	-
	(2)	-	-	-	11,5	-19,8	73,4	-	-	182,7	-15,9
	(3)	-	46,7	20,5	-	-	-	219,9	16,7	-	-
Coaxial.Bva 1%	(1)	-	48,4	20,7	-	-	-	217,9	13,2	-	-
	(2)	-	-	-	12,1	-12,1	66,9	-	-	177,5	-28,7
	(3)	-	46,9	11,2	-	-	-	219,9	30,6	-	-
Coaxial.Bva 2%	(1)	-	47,7	23,9	-	-	-	220,6	15,8	-	-
	(2)	-	-	-	12,6	-16,8	73	-	-	181,4	-16,9
	(3)	-	47,4	18,8	-	-	-	219,9	18,7	-	-
Coaxial.Bva 4%	(1)	-	47,8	23,6	-	-	-	218,1	15,4	-	-
	(2)	-	-	-	12,9	-15,1	72,4	-	-	178,8	-19,4
	(3)	-	46,8	15,7	-	-	-	218,7	21	-	-

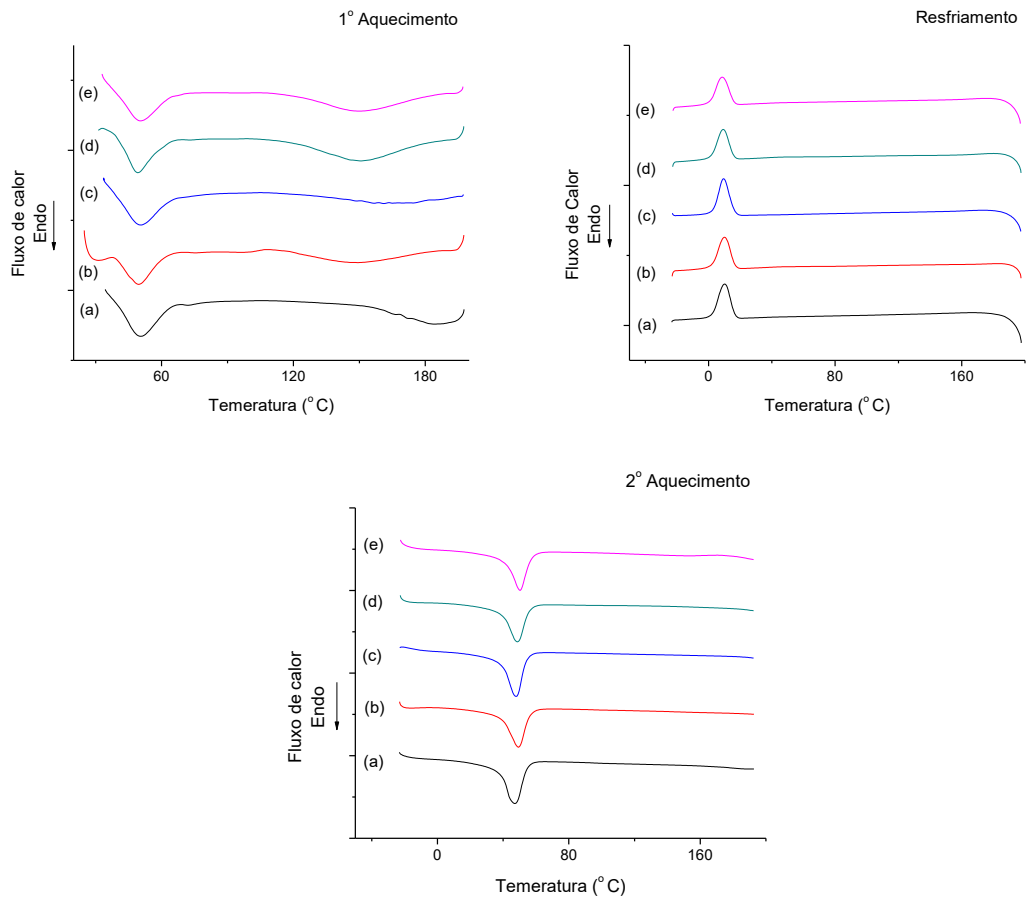
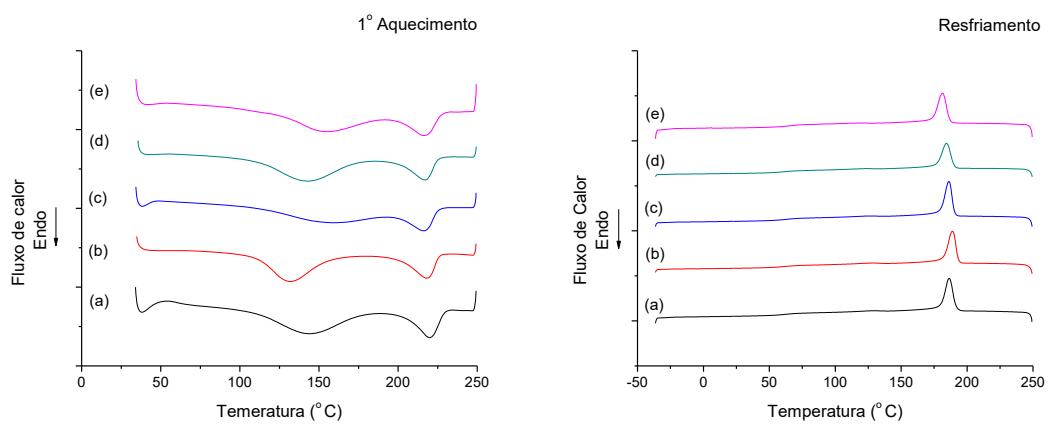


Figura 5.10 - Curvas de DSC para o 1º aquecimento, resfriamento e 2º aquecimento das nanofibras: (a) PCL, (b) PCL.Bva 0,5%, (c) PCL.Bva 1%, (d) PCL.Bva 2%, (e) PCL.Bva 4%.



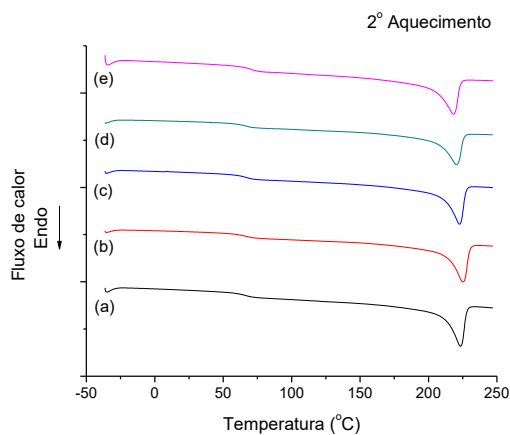


Figura 5.11 - Curvas de DSC para o 1° aquecimento, resfriamento e 2° aquecimento das nanofibras: (a) PVA, (b) PVA.Bva 0,5%, (c) PVA.Bva 1%, (d) PVA.Bva 2%, (e) PVA.Bva 4%.

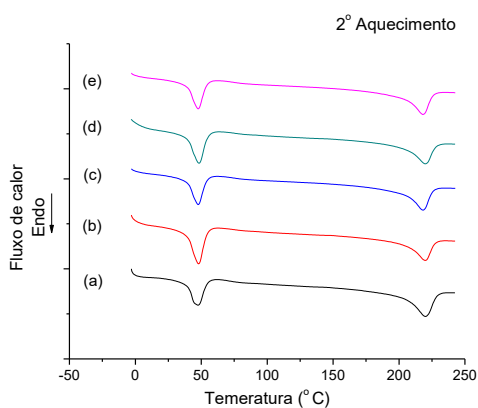
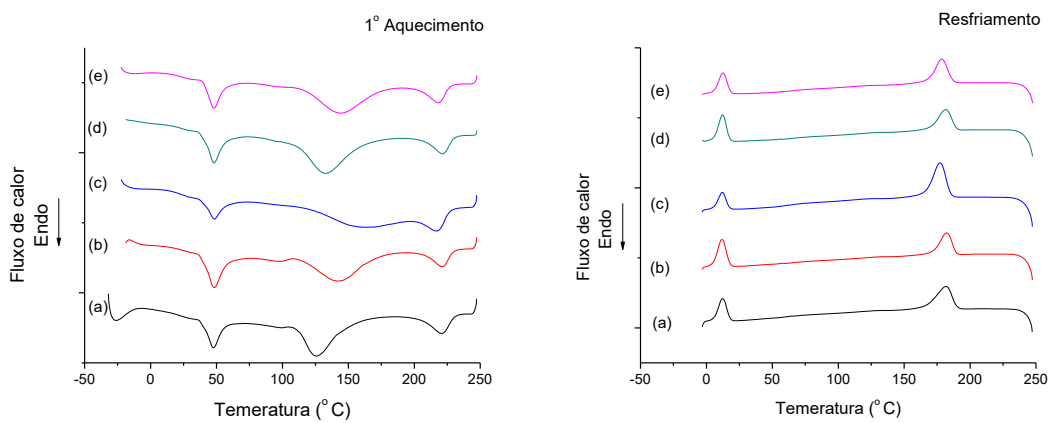


Figura 5.12 - Curvas de DSC para o 1° aquecimento, resfriamento e 2° aquecimento das nanofibras: (a) Coaxial, (b) Coaxial.Bva 0,5%, (c) Coaxial.Bva 1%, (d) Coaxial.Bva 2%, (e) Coaxial.Bva 4%.

5.3 Infravermelho FTIR-ATR

5.3.1 Espectros infravermelho das nanofibras PCL/gelatina, PVA e Coaxial

A Figura 5.13 ilustra os espectros de infravermelho para o polímero PCL. Foram observadas duas bandas em 2943cm^{-1} e 2862cm^{-1} atribuídas às deformações axiais simétricas e assimétricas, respectivamente, do grupo CH_2 . Uma intensa banda em 1724cm^{-1} , atribuída ao sinal de deformação axial de carbonila ($\text{C}=\text{O}$) do grupo éster, também foi observada. Uma banda em 1246cm^{-1} , atribuída ao estiramento assimétrico $\text{C}-\text{O}-\text{C}$, e uma banda em 1168cm^{-1} , atribuída ao estiramento simétrico $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ também podem ser notadas no espectro. (MOTIWALLA *et al.*, 2013; SWAIN *et al.*, 2015).

Além dessas bandas, foi observada a banda 3288cm^{-1} atribuída à vibração do grupo amina $\text{N}-\text{H}$ relacionada a gelatina presente na nanofibra de PCL. Segundo (DASH e KONKIMALLA, 2012), o grupo $\text{N}-\text{H}$ ocorre em um intervalo entre $3400-3440\text{cm}^{-1}$, mas é deslocada para frequências mais baixas, aproximando de 3300cm^{-1} quando o grupo $\text{N}-\text{H}$ dos peptídeos está envolvido em ligação de hidrogênio. Bandas em 1642cm^{-1} do grupo Amida I e 1530cm^{-1} do grupo Amida II (LU *et al.*, 2011, AGUDELO, 2015) relativos à gelatina também estão presentes no espectro das nanofibras PCL/gelatina e comprovam a presença deste componente no sistema.

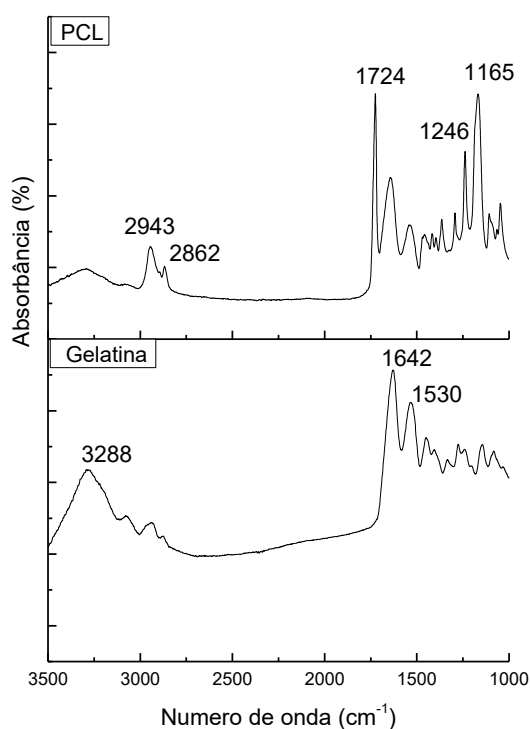


Figura 5.13 - Espectro FTIR-ART das nanofibras de PCL/gelatina e filme de gelatina.

O espectro do PVA, apresentado na Figura 5.14, mostrou uma banda entre as regiões 3600-3200 cm^{-1} que corresponde à vibração de estiramento do grupo OH. Há ainda, no espectro do PVA, uma banda de absorção em 2950 cm^{-1} relacionada ao estiramento assimétrico do grupo $-\text{CH}_2$, uma banda em 2902 cm^{-1} relacionada ao estiramento C-H e 1425 relacionada a CH_2 . Além dessas, uma banda de absorção em 1096 cm^{-1} , devido ao estiramento C-O-C (ISLAM e YEUM, 2013; TURAGA *et al.*, 2014), também pode ser observada.

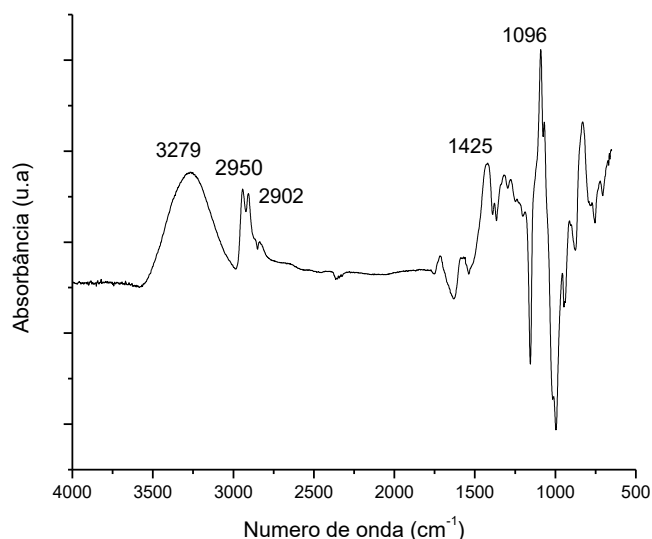


Figura 5.14 - Espectro do FTIR-ATR das nanofibras de PVA.

Para comprovar a presença do PCL e PVA na nanofibra coaxial, foi feita a dissolução da nanofibra coaxial e comparada com a nanofibra de PVA, sendo definida como o controle. Foi observado nos espectros apresentados na Figura 5.15 que, após lavar a nanofibra coaxial PCL/PVA com o TFE, ocorreu a dissolução e remoção do PCL, comprovada pela ausência das suas bandas 1724 cm^{-1} , 1642 cm^{-1} e 1530 cm^{-1} , (SWAIN *et al.*, 2015). A presença residual das bandas 1425 cm^{-1} e 1092 cm^{-1} (ISLAM e YEUM, 2013), características do PVA, indicam apenas a sua presença quando comparado ao controle PVA.

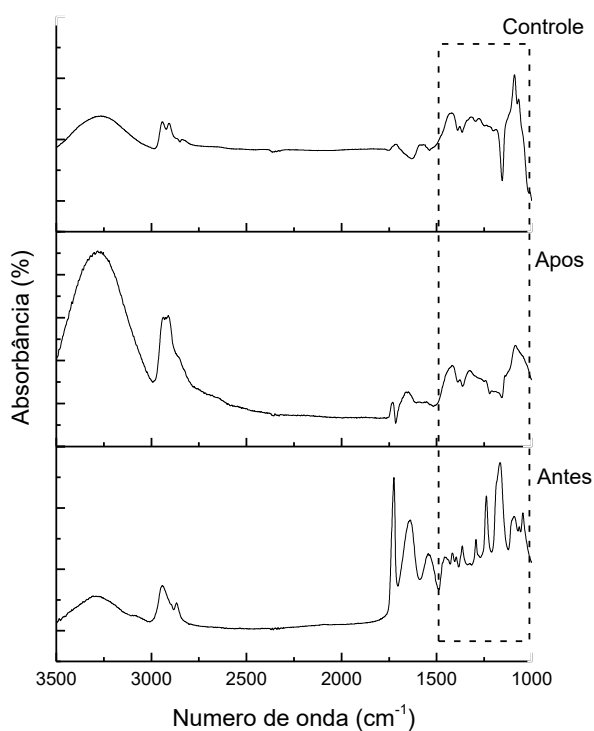


Figura 5.15 - Comparação dos espectros de FTIR-ATR das nanofibras coaxial antes de ser lavada com TFE, após ser lavada e a nanofibras de PVA como controle.

Após se lavar as nanofibras coaxial PCL/PVA com DMSO ocorreu a dissolução do PVA. Foi observada, pela Figura 5.16, a presença da banda 1724 cm^{-1} (SWAIN *et al.*, 2015) características do PCL, indicando a sua presença residual quando comparada ao controle PCL. Assim sendo, confirma-se mais uma vez a presença dos dois polímeros na nanofibra coaxial. As bandas características da gelatina não foram observadas após a dissolução.

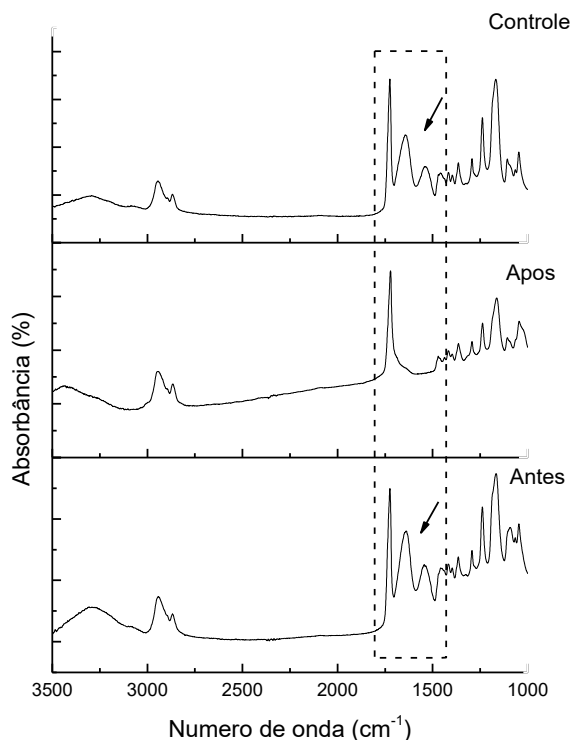


Figura 5.16 - Comparação dos espectros de FTIR-ATR da nanofibra coaxial PCL/PVA antes de ser lavada, após ser lavada e a nanofibra de PCL como controle.

5.3.2 Espectros infravermelho das nanofibras PCL/gelatina, PVA e Coaxial com a incorporação do Bevacizumabe

Os espectros infravermelho das nanofibras PCL/gelatina, PVA e Coaxial contendo 0,5%, 1%, 2% e 4% do Bva apresentaram as mesmas bandas específicas de cada polímero já citadas no tópico anterior, não havendo diferença dos espectros com as quatro concentrações do Bva. A Figura 5.17 apresenta os espectros das nanofibras com BVA 4%, sendo estes comparados com o espectro do Beva obtido a partir da secagem de uma solução contendo o fármaco.

No espectro do Bevacizumabe foi observada uma banda em 3278cm^{-1} atribuída aos grupos N-H presentes na estrutura do fármaco. Essa banda da amina em se tratando de anticorpo é considerada complexa (KONG e YU, 2007), e se confunde com outras relacionadas com água e amina encontradas na gelatina e PVA.

A banda encontrada em 1636cm^{-1} , atribuída a amida I, é característica do Bevacizumabe (PAUL *et al.*, 2012, FERREIRA, 2014), mas nos espectros das nanofibras ela não se destaca uma vez que a região das bandas amida I ($1700\text{-}1600$

cm^{-1}) coincide com bandas de absorção presentes na gelatina, PCL e PVA (KONG e YU, 2007). Além disso, deve-se ressaltar que a baixa concentração do fármaco nas nanofibras dificulta a identificação das suas bandas de absorção.

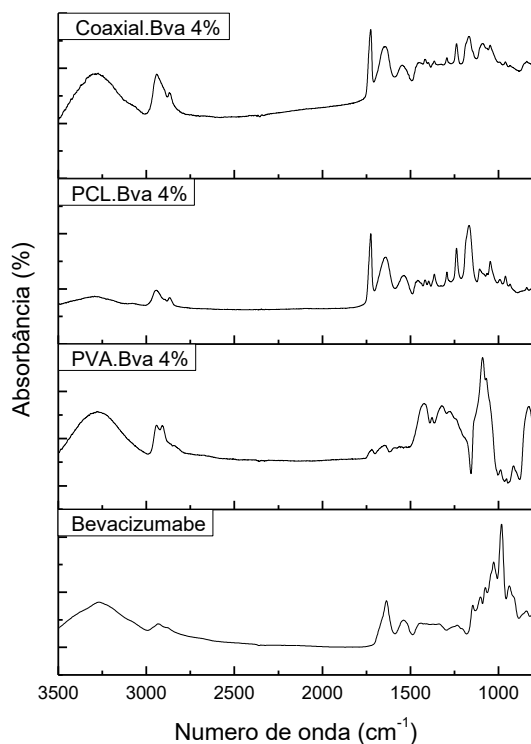


Figura 5.17 - Espectro da solução do Bevacizumabe, e das nanofibras PCL, PVA e Coaxial contendo Bva 10%.

5.4 Ensaios biológicos

5.4.1 Avaliação da atividade do Bevacizumabe pelo teste ELISA indireto

Com o intuito de se quantificar o Bevacizumabe nas nanofibras de PVA.Bva a 2 e 4% e Coaxial.Bva contendo também 2 e 4% de Bva, foi desenvolvido um ensaio imunoenzimático baseado na interação do anticorpo (Anti-Human IgG) com seu antígeno, onde foi definida uma curva padrão para o Bevacizumabe e posteriormente as concentrações do Bva liberado das nanofibras. Na Figura 5.18, a solução amarela em cada poço representa onde ocorreu a interação anticorpo-antígeno do Bva após adicionar a solução reveladora.

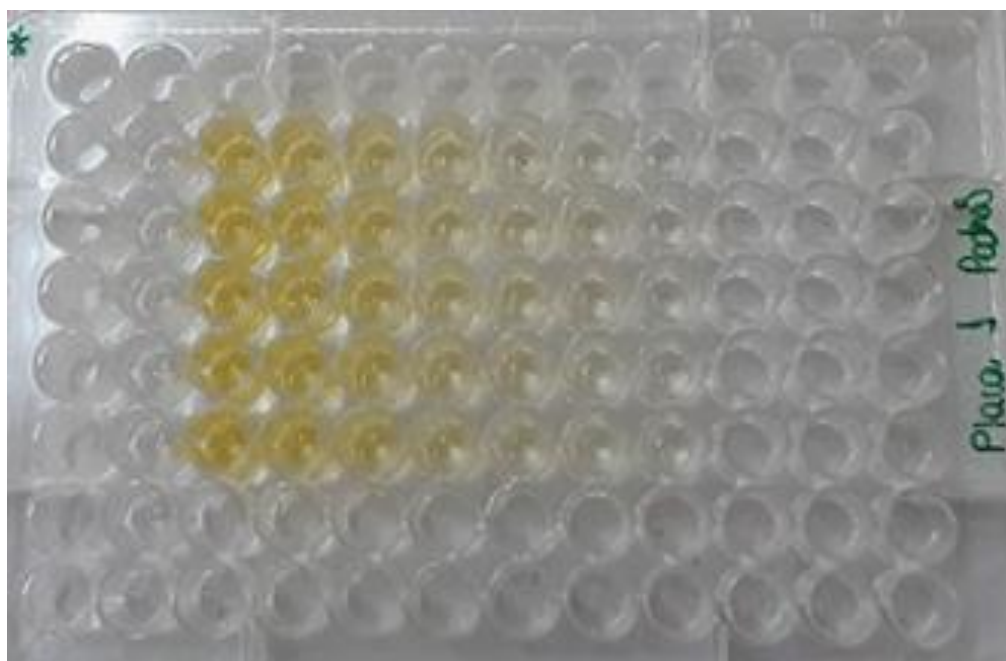


Figura 5.18 - Representação da interação anticorpo antígeno das concentrações do Bva para a curva padrão.

Para a determinação da linearidade do método, a curva padrão foi construída a partir dos valores obtidos nas corridas de seis diferentes concentrações do Bva (0,78 μ g/ml; 0,39 μ g/ml; 0,195 μ g/ml; 0,098 μ g/ml; 0,049 μ g/ml; 0,024 μ g/ml). A curva obtida, assim como o coeficiente de correlação linear e a equação da reta são apresentados na Figura 5.19.

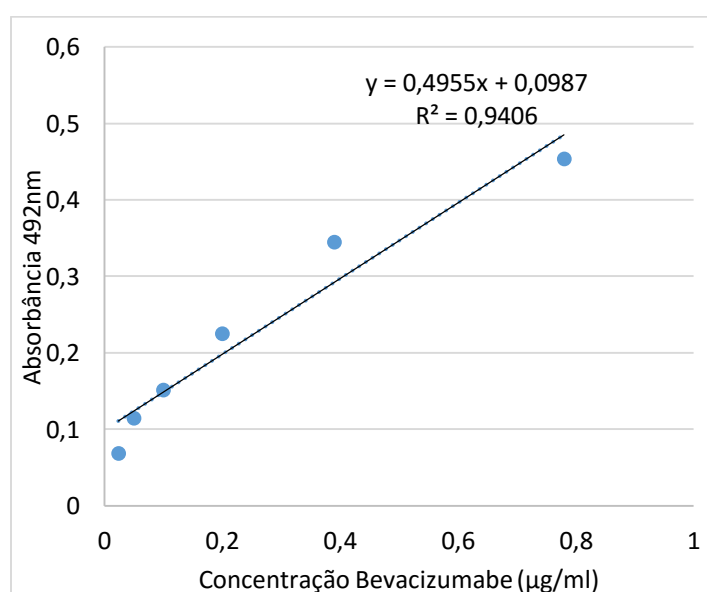
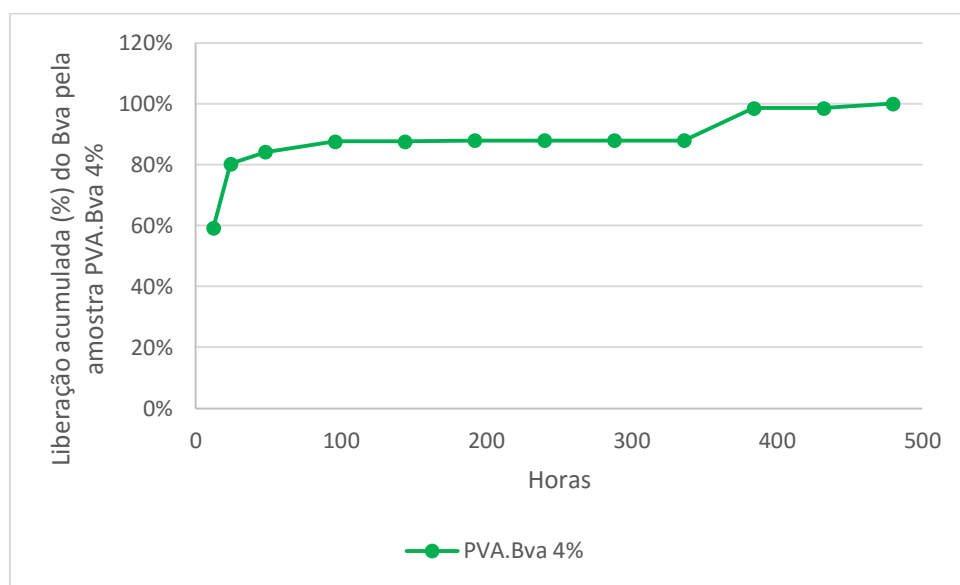
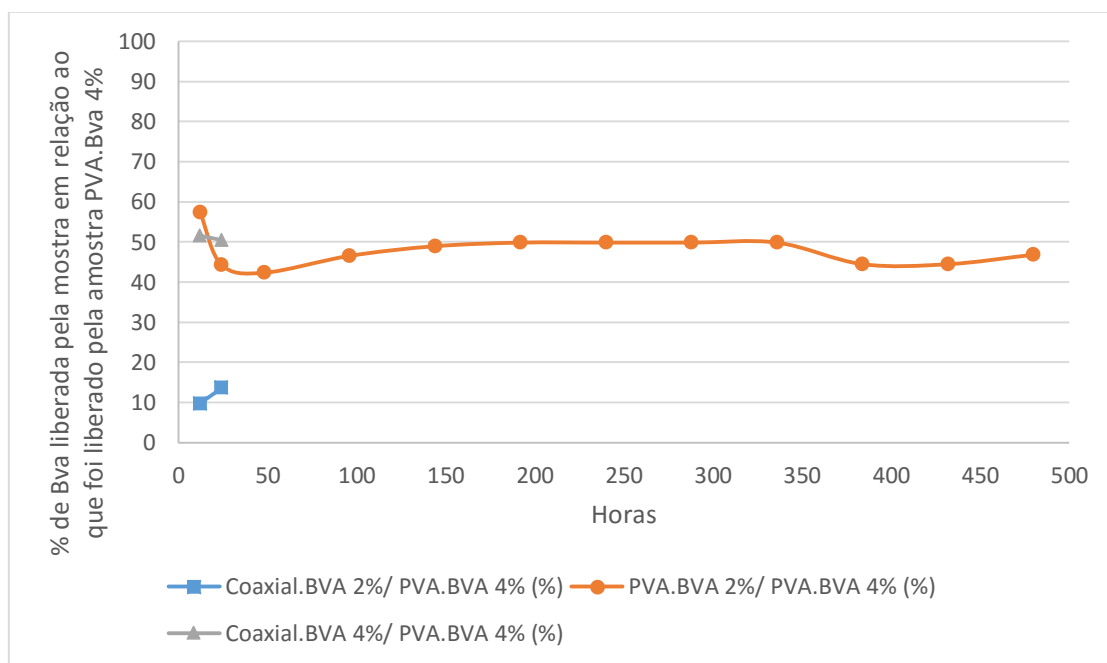


Figura 5.19 - Curva padrão do Bevacizumabe.

Para fins de demonstração do perfil de liberação encontrado nas nanofibras de PVA.Bva 2% e 4%, e das nanofibras Coaxial.Bva 2% e 4%, Figura 5.20, a amostra PVA.Bva 4% foi adotada como referência para valor máximo de 100% liberação de fármaco, uma vez que essa amostra apresentou uma maior quantidade de Bva liberado.



(a)



(b)

Figura 5.20 - (a) Liberação acumulada (%) da Bva na amostra PVA.Bva 4%. (b) Perfil de liberação do Bva das nanofibras em relação a amostra PVA.Bva 4%.

A Figura 5.20-a mostra que aproximadamente 60% da liberação do fármaco ocorreu nas primeiras 12 horas do ensaio. O restante do fármaco foi liberado de maneira lenta e regular até o final dos 21 dias de teste (em média, a manta de PVA 4% de 8mm x 8mm liberou 0,1 μg de Bva por dia após as primeiras 50 horas de ensaios). Como referência, em um tratamento comum de DMRI, injeta-se 1,25mg de Bva a cada três meses (equivalente a 13 μg /dia) no olho afetado.

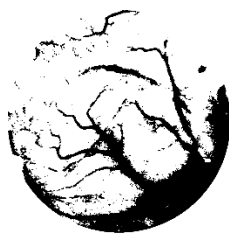
A Figura 5.20-b compara o comportamento em relação à liberação do Bva da amostra PVA.Bva 4% com as amostras PVA.Bva 2% e Coaxial.Bva 4%. Percebe-se que o padrão de liberação da manta de PVA com 2% de Bva é o mesmo que o da manta de PVA com 4% de Bva (ou seja, liberação rápida no início e lenta a partir das primeiras 50 horas). Além disso, pode-se notar que o valor liberado da manta com 2% de Bva é aproximadamente 50% daquele da manta com 4% de Bva, o que confirma a expectativa em relação ao efeito da concentração de Bva na manta na quantidade liberada (a quantidade de Bva na manta 2% é a metade daquela na manta com 4%). Quanto à comparação com a manta Coaxial 2%, pode-se observar que os valores liberados são bem menores que aqueles liberados pelas mantas de PVA (as quantidades liberadas a partir do terceiro dia de ensaios são tão pequenas que não foram capazes de serem quantificadas pelo método usado). Este resultado confirma a hipótese que a casca de PCL/gelatina reduz a taxa de liberação do fármaco concentrado no núcleo de PVA. Vale mencionar que o PVA é um polímero que apresenta grande afinidade com água, o que leva a ele apresentar grande expansão em meio aquoso que acelera a liberação das moléculas incorporadas.

5.4.2 Avaliação da angiogênese utilizando o modelo Membrana Corioalantóica (CAM) de embrião de galinha

A Figura 5.21 ilustra os vasos das membranas dos grupos PBS, solução comercial de Bevacizumabe e das nanofibras, e suas respectivas imagens em pixels, onde foram contabilizados a redução dos vasos.



(a.1)



(a.2)



(b.1)



(b.2)

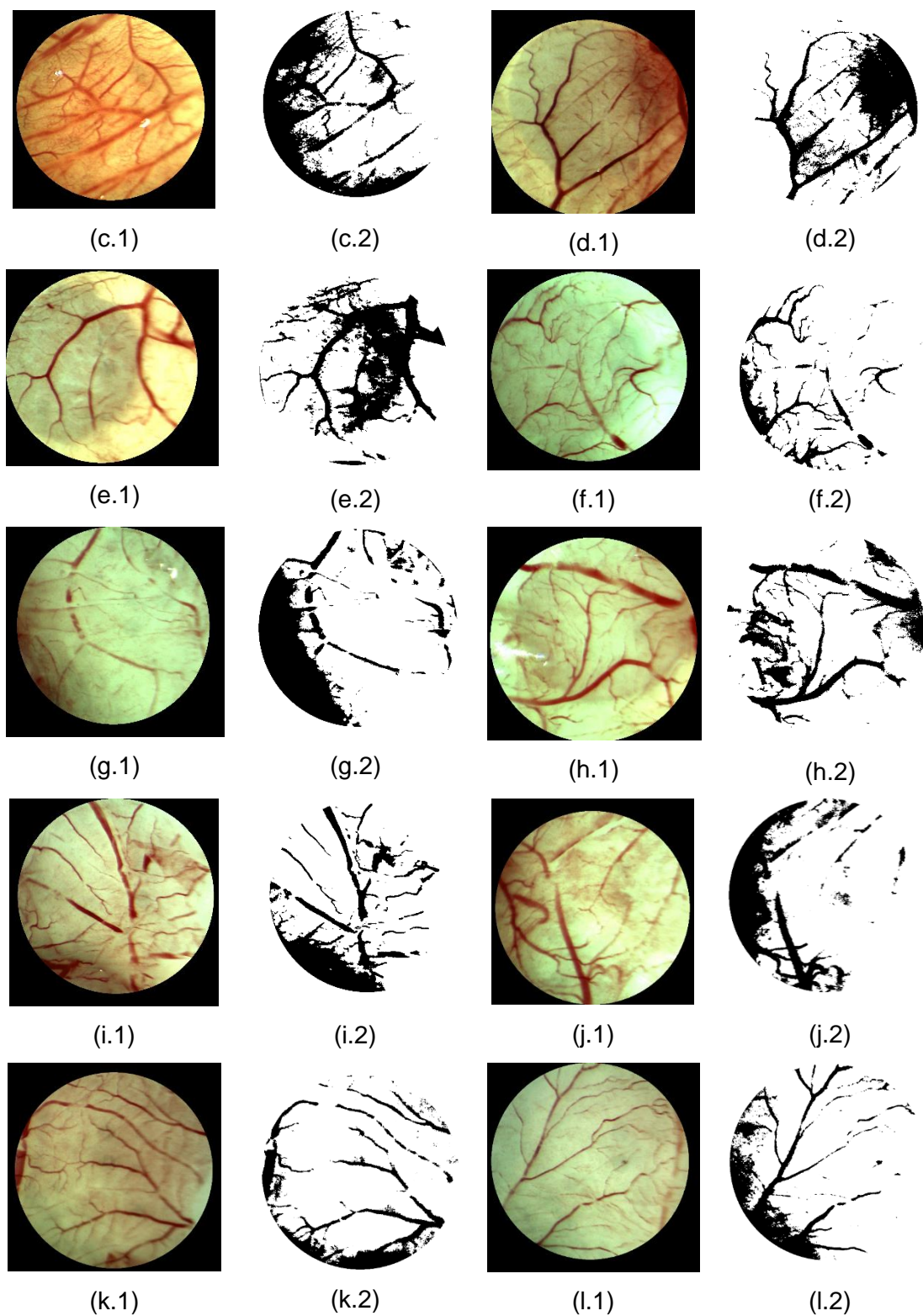


Figura 5.21 - Imagens dos vasos e respectivos pixels dos grupos: (a) PBS; (b) 250 μ g Bva; nanofibras: (c) Pva, (d)PVA.Bva 0,5%, (e)PVA.Bva 1%, (f)PVA.Bva 2%, (g) PVA.Bva 4%, (h)Coaxial (i) Coaxial.Bva 0,5%, (j) Coaxial.Bva 1%, (k) Coaxial.Bva 2%, (l) Coaxial.Bva 4%.

A Figura 5.22 apresenta os resultados obtidos da redução dos vasos após a aplicação dos grupos nos ovos de galinha.

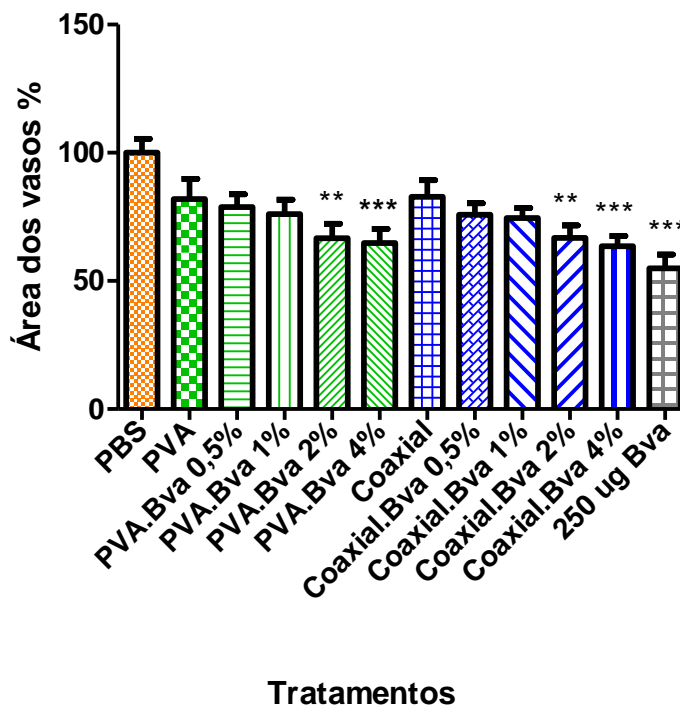


Figura 5.22 - Redução dos vasos sanguíneos das amostras em relação ao controle (PBS).

Foi observada uma redução significativa ($p < 0,05$) dos vasos no grupo contendo 250 μ g do Bevacizumabe, como também das nanofibras de PVA.Bva 2% e 4% e Coaxial.Bva 2% e 4% em relação ao grupo controle (PBS). NOWAK-SLIWINSKA *et al.*, (2012) utilizaram diferentes doses de Bevacizumabe e observaram que a redução da angiogênese na CAM é proporcional à concentração aplicada de Bevacizumabe. Não houve diferença estatisticamente significativa na resposta obtida entre as nanofibras de PVA.Bva 0,5% e 1% e coaxial. Bva 0,5% e 1% em relação ao controle (PBS).

Além disso, após a aplicação das nanofibras sobre a membrana corioalantóica, o aspecto da CAM não foi alterado, não foi observada neovascularização ou resposta inflamatória, indicando que tanto as nanofibras sem o Bva quanto as nanofibras contendo o Bva não apresentaram sinais de toxicidade nas membranas avaliadas.

5.4.3 Avaliação da citotoxicidade pela redução do MTT

Os resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA Two- way) onde $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. O experimento foi realizado em triplicata biológica e experimental e as medidas foram realizadas após 24 e 72 horas (Figura 5.23 e Figura 5.24).

Ressaltando, os poços com o Bva foram preenchidos com 10, 17.8, 32, 56, 100 e 178 μ g do Bva, e as amostras, 4x4mm, das nanofibras PCL.Bva 4%, Pva.Bva 4% e coaxial.Bva 4% possuíam aproximadamente 23 μ g do Bva.

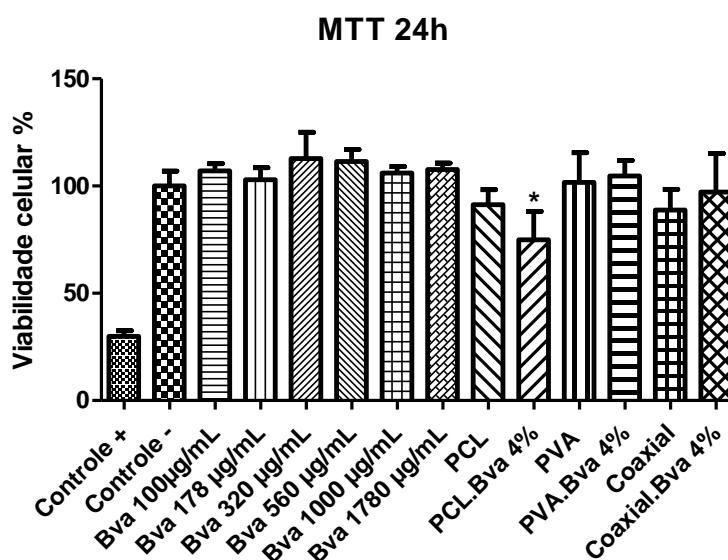


Figura 5.23 - Viabilidade celular em 24 horas através do ensaio MTT.

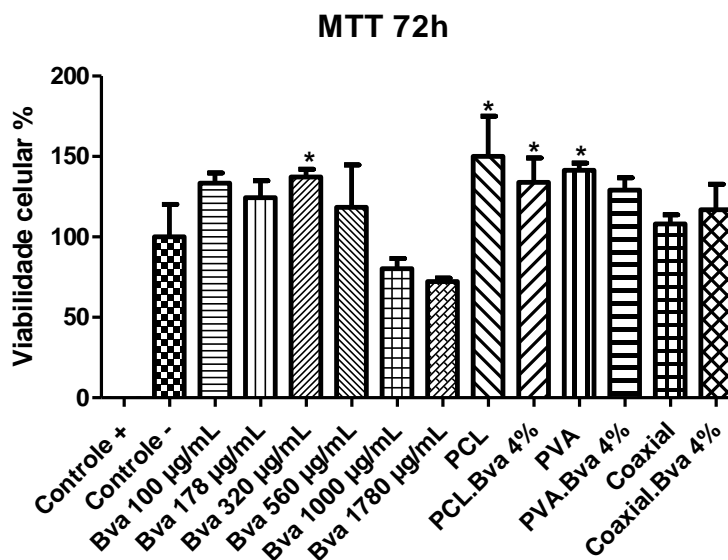


Figura 5.24 - Viabilidade celular em 72 horas através do ensaio MTT.

No intervalo de 24 horas, os resultados mostraram que o grupo controle negativo e os grupos contendo a solução do Bevacizumabe, nas diversas concentrações, não apresentaram redução na viabilidade celular. KREMPEL,2015 evidenciou que o Bva nas concentrações de 250 e 500µg/mL não foi tóxico para as células. As nanofibras de PCL, PVA, Coaxial e as nanofibras de PVA e Coaxial contendo Bva apresentaram uma pequena redução da viabilidade celular, mas não apresentaram efeito citotóxico significativo ($P < 0,05$) comparado ao controle negativo. A nanofibra de PCL contendo o Bva apresentou uma redução significativa em relação ao controle negativa. Essa citotoxicidade pode ser um artefato de manuseio da amostra durante o procedimento, uma vez que não foi observada citotoxicidade em nenhuma amostra contendo solução de Bva, e a quantidade de Bva presente na nanofibra se enquadra no intervalo dessas concentrações, e na nanofibra de PCL. Além disso, no intervalo de 72 horas, não foi observada essa redução de viabilidade celular.

No intervalo de 72 horas, os resultados mostraram uma redução da viabilidade celular do grupo contendo 1000 e 1780µg/mL de Bva, mas não sendo significativo quando comparado ao controle negativo. SPITZER *et al.*, 2006 não encontraram citotoxicidade nas células ARPE nas concentrações de Bevacizumabe até 800 µg/mL, mas uma redução moderada com a concentração 2500 µg/mL após as 24horas. As nanofibras não apresentaram redução da viabilidade celular quando comparadas ao grupo controle, não apresentando nenhum efeito tóxico.

O grupo contendo Bva e algumas nanofibras apresentaram proliferação celular (SOUTO *et al.*,2011), sendo significativo ($P < 0,05$) para o grupo contendo Bva 320 $\mu\text{g/mL}$, nanofibras PCL, PCL.Bva 4% e nanofibras de PVA quando comparado ao grupo controle negativo. A presença da gelatina na nanofibra de PCL melhora a superfície da nanofibra quanto a hidrofília facilitando a interação da célula com o meio e favorecendo a sua proliferação. (SAFAEIJAVAN *et al.*, 2014)

Capítulo 6: Conclusão

A técnica de electrospinning se mostrou uma ferramenta adequada para a obtenção de fibras poliméricas com diâmetros nanométricos e aspecto homogêneo. Esta técnica permitiu também a formação de nanofibras com estrutura *core-shell*: PCL/gelatina como formador da casca, enquanto o núcleo foi formado pelo PVA contendo o fármaco.

As imagens de MEV não demonstraram grandes diferenças morfológicas entre as nanofibras de PCL/gelatina e PVA quando comparadas as nanofibras coaxial. E as diversas nanofibras conservaram a mesma morfologia com a presença do Bevacizumabe.

Resultados de FTIR e análises térmicas indicaram a presença dos dois polímeros (PVA e PCL) e gelatina nas nanofibras obtidas por eletrospinning coaxial. Os espectros de infravermelho não variaram com a presença do Bevacizumabe, como também o comportamento térmico.

Através do ensaio imunoenzimático ELISA, foi revelada a presença do Bevacizumabe nas nanofibras de PVA e Coaxial PCL/PVA de 2% e 4% sobre o conjugado Anti-Human IgG (Fc specific). Foi possível perceber uma liberação mais lenta do Bevacizumabe da nanofibra coaxial quando comparada com a nanofibra de PVA.

A viabilidade celular não foi reduzida na presença do Bevacizumabe e nas nanofibras com e sem o Bevacizumabe, sugerindo que as nanofibras não apresentaram citotoxicidade.

Estudos empregando o modelo da CAM sugeriram que o Bevacizumabe manteve a sua atividade antiangiogênica quando incorporado nas nanofibras.

Capítulo 7: Sugestões para trabalhos futuros

O foco desse trabalho foi o desenvolvimento de um sistema de liberação controlada contendo Bevacizumabe para tratamento da DMRI.

Como perspectiva pretende-se melhorar o sistema em relação ao tempo de liberação do fármaco, apesar de também ser interessante uma concentração mais elevada do Bevacizumabe. Em seguida aprimorar com estudos de liberação in vivo, inserindo um implante na retina revestido com essa nanofibra, permitindo veicular diferentes tipos de fármaco.

Referências Bibliográficas

AGARWAL S, WENDORFF JH, GREINER A. *Use of electrospinning technique for biomedical applications*. Polymer, Elsevier, v.49, n.26, p5603-5621, dez. 2008.

AGUDELO RR. *Preparação E Caracterização de Matrizes De Liberação Controlada De Doxíciclina À Base De Nanofibras De Policaprolactona E Gelatina Carreadas Com Nanopartículas De Hidroxiapatita*. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais, 2015, 88p. (Dissertação, Mestrado em Química Inorgânica).

ALCOBIA DS. *Produção de Nanofibras Alinhadas de Polímeros Biodegradáveis Para Crescimento e Regeneração de Células Neurais*. São Paulo: Universidade de São Paulo Instituto de química, 2013. 128p (Dissertação, mestrado em Química Orgânica).

ANDERSON OA, BAINBRIDG JWB, SHIMA DT. *Delivery of anti-angiogenic molecular therapies for retinal disease*. Drug Discovery Today, Elsevier, v.15, n.7-8, p272-282, abril 2010.

ARANHA IB, LUCAS EF. *Poli (Álcool Vinílico) Modificado com Cadeias Hidrocarbônicas: Avaliação do Balanço Hidrófilo/Lipófilo*. Polímeros, v.11, n.4, p174-181, 2001.

BAJI A, MAI YW, WONG SC, ABTAHI M, CHEN P. *Electrospinning of polymer nanofibers: Effects on oriented morphology, structures and tensile properties*. Composites Science and Technology, Elsevier, v.70, n.5, p703-718, maio 2010.

BHARDWAJ N, KUNDU SC. *Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique*. Biotechnology Advances, Elsevier, v.28, n.3, p325-347, jan. 2010.

CAMPOS A, MARCONATO JC, FRANCHETTI SMM. *Biodegradation of Blend Films PVA/PVC, PVA/PCL in Soil and Soil with Landfill Leachate*. Brazilian Archives Of Biology And Technology, v.54, n.6, p1367-1378, dez. 2011.

CASARIN SA. *Blendas de PHBV e PCL Para Uso Em Dispositivos em Osteossíntese*. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2010, 187p (Tese, Doutorado em Ciências e Engenharia de Materiais).

CHEN YH, WU PC, SHIEA J, LO LH, WU YC, KUO HK. *Evaluation of the Sterility, Stability, and Efficacy of Bevacizumab Stored in Multiple-Dose Vials for 6 Months*. Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics, v.25, n.1, p65-70, fev. 2009.

COLLINS G, FEDERICI J, IMURA Y, LUIZ H. CATALANI LH. *Charge generation, charge transport, and residual charge in the electrospinning of polymers: A review of issues and complications*. Journal of Applied Physics, Melville, v.111, n.4, p719-724, fev. 2012.

CONLEY SM, NAASH MI. *Nanoparticles for retinal gene therapy*. Progress in Retinal and Eye Research, Elsevier, v.29, n.5, p376-397, set. 2010.

COSTA, VP. Câmara Técnica de Oftalmologia do CFM defende regularização do uso de bevacizumabe no tratamento da DMRI. Jornal Oftalmológico Jota Zero, Medicamentos, p41, Out.2011.

COSTA RGF, OLIVEIRA JE, PAULA GF, PICCIANI PHS, MEDEIROS ES, RIBEIRO C, MATTOSO LHC. *Eletrofição de Polímeros em Solução. a: Fundamentação Teórica*. Polímeros, Artigo Técnico Científico, v.22, n2, p170-177, 2012.

COSTA RGF, OLIVEIRA JE, PAULA GF, PICCIANI PHS, MEDEIROS ES, RIBEIRO C, MATTOSO LHC. *Eletrofição de Polímeros em Solução. a: Aplicações e Perspectivas*. Polímeros, Artigo Técnico Científico, v.22, n2, p178-185, 2012.

CROWTHER, J., The ELISA Guidebook; Methods In Molecular Biology. Second. Humana Press, ed., 2000.149p.

CUNHA TF. *Aplicação do Poli (ϵ - Caprolactona) com Estrutura Estrelada Para Obtenção de Microesferas Biorreabsorvíveis*. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2012. 91p (Dissertação, Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear).

CUNHA C, PANSERI S, ANTONINI S. *Emerging Nanotechnology Approaches in Tissue Engineering for Peripheral Nerve Regeneration*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, Elsevier, v.7, n.1, p50-59, fev. 2011.

DASH TK, KONKIMALLA VB. *Poly- ϵ -caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review*. Journal of Controlled Release, Elsevier, v.158, n.1, p15-33, fev. 2012.

DEMIR MM, YILGOR I, YILGOR E, ERMAN B. *Electrospinning of polyurethane fibers*. Polymer, Elsevier, v.43, n.11 p3303-3309, maio 2002.

DÍAZ JE, BARRERO A, MÁRQUEZ M, LOSCERTALES IG. *Controlled Encapsulation of Hydrophobic Liquids in Hydrophilic Polymer Nanofibers by Co-electrospinning*. *Advanced Functional Materials*, v.16, n.16, p2110-2116, out.2006.

DO CV, NGUYEN TTT, PARK JS. *Fabrication of Polyethylene Glycol/Polyvinylidene Fluoride Core/Shell Nanofibers Via Melt Electrospinning and Their Characteristics*. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, Elsevier, v. 104, p131-139, set. 2012.

EICHHORN SJ, SAMPSON WW. *Sampson Statistical Geometry of Pores and Statistics of Porous Nanofibrous Assemblies*. *Journal of the Royal Society Interface*, n.2, p309-318, maio 2005.

FERREIRA AER. *Desenvolvimento De Sistema Biodegradável Contendo Bevacizumabe Para Inibição Da Neovascularização Da Córnea*. Belo Horizonte: Universidade Federal de Belo Horizonte, 2014. 122p. (Tese, doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas).

FLETCHER EC, LADE RJ, ADEWOYIN T, CHONG NV. *Computerized Model Of Cost-Utility Analysis For Treatment Of Age- Related Macular Degeneration*. *Ophthalmology*, Elsevier, v.115, n.12, p 2192-2198, dez. 2008.

FOOD E DRUG ADMINISTRATION, Department of Health & Human Service. AVASTIN™ Rockville2004, 9p, fev 2004.

FORMHALS A. *Process And Apparatus For Preparing Artificial Threads*. US 1975504 A. 5 dez. 1930; 2 out.1934. 7p.

FRANZ S, RAMMELT S, SCHARNWEBER D, SIMON JC. *Immune Responses To Implants – A Review Of The Implications For The Design Of Immunomodulatory Biomaterials*. *Biomaterials*, Elsevier, v.32, n. 28, p6692-6709, out. 2011.

GARG K, BOWLIN GL. *Electrospinning Jets And Nanofibrous Structures*. *Biomechanics*, v.5, n.1, 13403, março 2011.

GAUDANA R, JWALA J, BODDU SH, MITRA AK. *Recent Perspectives In Ocular Drug Delivery*. *Pharmaceutical Research*, v.26, n.5, p1197-1216, maio 2009.

GOMES ECL, JÚNIOR ASC. *Development And Validation Of An Analytical Method For Quantitation Of The Drug Bevacizumab By High Performance Liquid Chromatography*. *Quim. Nova*, v.35, n.3, p608-611, 2012.

GONÇALVES RP, SILVA FFF, PICCIANI PHS, DIAS ML. *Morphology and Thermal Properties of Core-Shell PVA/PLA Ultrafine Fibers Produced by Coaxial Electrospinning*. Materials Sciences and Applications, v.6, p189-199, fev.2015.

GREINER A, WENDORFF JH, YARIN AL, ZUSSMAN E. *Biohybrid Nanosystems With Polymer Nanofibers And Nanotubes*. Appl Microbiol Biotechnol., v.71, n.4, p387-393, jun.2010

GUIMARÃES HC; GERENUTTI M. *Alternativas Terapêuticas Para O Tratamento Da Degeneração Macular Relacionada À Idade: Um Desafio Para A Saúde Pública*. Rev. de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v.35, n.4, p459-468, 2013.

GUIRGUIS OW, MOSELHEY MTH. *Thermal And Structural Studies Of Poly (Vinyl Alcohol) And Hydroxypropyl Cellulose Blends*. Natural Science, v.4, n.1, p57-67, 2012.

HANTASH J, JOAQUIM T. *The development and validation of an ultra-sensitive double antigen ELISA method for the determination of bevacizumab (Avastin®) in human serum*. Tandem Labs, Laboratory Corporation of America® Holdings, 7p, 2014.

HASSAN CM, PEPPAS NA. *Structure And Applications Of Poly (Vinyl Alcohol) Hydrogels Produced By Conventional Crosslinking Or By Freezing/Thawing Methods*. Advances in Polymer Science, Springer-Verlag Berlin Heidelberg v.153, p38-65, 2000.

HERNÁNDEZ RM, ORIVE G, MURUA A, PEDRAZ JL. *Microcapsules And Microcarriers For In Situ Cell Delivery*. Advanced Drug Delivery Reviews, Elsevier, v.62, n.7-8, p711-730, jun.2010.

HUANG ZM, ZHANG YZ, KOTAKI M, RAMAKRISHNA S. *A Review On Polymer Nanofibers By Electrospinning And Their Applications In Nanocomposites*. Composites Science and Technology, Elsevier, v.63, n.15, p2223-2253, nov. 2003.

ISLAM MDS, YEUM JH. *Electrospun Pullulan/Poly (Vinyl Alcohol)/Silver Hybrid Nanofibers: Preparation And Property Characterization For Antibacterial Activity*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, Elsevier, v.436, p279– 286, jul.2013.

JANG JH, CASTANO O, KIM HW. *Electrospun Materials As Potential Platforms For Bone Tissue Engineering*. Advanced Drug Delivery Reviews, Elsevier, v.61, n.12, p1065-1083, out. 2009.

JIANG H, WANG L, ZHU K. *Coaxial Electrospinning For Encapsulation And Controlled Release Of Fragile Water-Soluble Bioactive Agentes*. Journal of Controlled Release, Elsevier, nov 2014.

JÚNIOR JA, ÁVILA AF, TRIPLETT MH. *Caracterização Morfológica de Nanomembranas de Poliamida-66 Dopadas com Grafeno Obtidas por Electrospinning*. Polímeros, Artigo Técnico Científico, v.23, n.1, p74-81, 2013.

KAI D, LIOW SS, LOH XJ. *Biodegradable Polymers For Electrospinning: Towards Biomedical Applications*. Materials Science and Engineering: C, Elsevier, 12p, 2014.

KERNT M, NEUBAUER AS, KAMPIK A. *Intravitreal Bevacizumab (Avastin) Treatment Is Safe In Terms Of Intraocular And Blood Pressure*. Acta Ophthalmol Scand, v.85, n.1, p119-120, 2007.

KONG J, YU S. *Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures*. Acta Biochimica Biophysica Sinica, v.39, p549-559, abril 2007.

KREMPEL PG. *Análise imunocitoquímica e de expressão gênica de efeitos do bevacizumabe em explantes de ratos lister e em linhagem celular de glia de Muller humana*. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2015, 139p. Tese (Doutorado em Ciências).

KULKARNI A, BAMBOLE VA, MAHANWAR PA. *Electrospinning of Polymers, Their Modeling and Applications*. Polymer-Plastics Technology and Engineering, v.49, n.5, p427-441, abril 2010.

LARSEN G, SPRETZ R, VELARDE-ORTIZ R. *Use of Coaxial Gas Jackets to Stabilize Taylor Cones of Volatile Solutions and to Induce Particle-to-Fiber Transitions*. Advanced Materials, v.12, n.2, p166-169, jan.2004.

LI F, HURLEY B, LIU Y, LEONARD B, GRIFFITH M. *Controlled Release of Bevacizumab Through Nanospheres for Extended Treatment of Age-Related Macular Degeneration* The Open Ophthalmology Journal, v. 6, p54-58, 2012.

LI F, ZHAO Y, SONG Y. *Core-Shell Nanofibers: Nano Channel and Capsule by Coaxial Electrospinning*. Nanofibers, Ashok Kumar, Intech, 438p, fev. 2010.

LI Y. *Electrospinning of Core-shell Collagen Nanofibers*. The University of Western Ontario, 2013. 126p. (Master of Engineering Science).

LU A, ZHU J, ZHANG G, SUN G. *Gelatin Nanofibers Fabricated By Extruding Immiscible Polymer Solution Blend And Their Application In Tissue Engineering*. Journal Of Materials Chemistry, v.21, p8674-18680, 2011.

LU S, ANSETH KS. *Release Behavior of High Molecular Weight Solutes from Poly (ethylene glycol) - Based Degradable Networks*. Macromolecules, v.33 n.7, p2509-2515, mar. 2000.

MCEACHIN Z, LOZANO K. *Production and Characterization of Polycaprolactone Nanofibers via Forcespinning™ Technology*. Journal of Applied Polymer Science, v.126, p473-479, abril 2012.

MEDEIROS ES, GLENN GM, KLAMCZYNSKI AP, ORTS WJ, MATTOSO LHC. *Solution Blow Spinning: A New Method to Produce Micro- and Nanofibers from Polymer Solutions*. Journal of Applied Polymer Science, p2322-2330, abril 2009.

MEINEL AJ, GERMERSHAUS O, LUHMANN T, MERKLE HP, MEINEL L. *Electrospun matrices for localized drug delivery: Current technologies and selected biomedical applications*. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics, v.81, n.1, p1-13, 2012.

MELO EJMVCF. *Preparação de Nanofibras de Compósitos Poliméricos por Eletrofiação e sua Caracterização*. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2012. 125p. (Dissertação, Mestrado em Química).

MESQUITA *et al.* *Inibidores Da Angiogênese Para O Tratamento Da Degeneração Macular Relacionada À Idade*. Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde. Ano III, n.6, dez. 2008.

MOSMANN T. *Rapid Colorimetric Assay For Cellular Growth And Survival: Application To Proliferation And Cytotoxicity Assays*. Journal of Immunological Methods, Elsevier, v.65, n.1-2, p55-63, dez. 1983.

MOTIWALLA MJ, PUNYARTHI PP, MEHTA MK, D'SOUZA JS, KELKAR-MANE V. *Studies on degradation efficiency of polycaprolactone by a naturally-occurring bacterium*. Journal of Environmental Biology, v.34, p43-49, jan. 2013.

NAIK R, MUKHOPADHYAY A, GANGULI M. *Gene Delivery To The Retina: Focus On Non- Viral Approaches*. Drug Discovery Today, Elsevier, v.14, n.5-6, p306-315, mar. 2009.

NATTA VFJ, HILL JW, CAROTHERS WH. *Studies of Polymerization And Ring Formation. XXIII. ϵ -Caprolactone And Its Polymers*. Journal of the American Chemical Society, Elsevier, v.56, n.2, p455-457, fev.1934.

NEHEMY MB. *Degeneração Macular Relacionada À Idade: Novas Perspectivas*. Arq. Brasileiro de Oftalmologia, v. 69, n. 6, p955-958, 2006.

OLIVEIRA JE, MATTOSO LHC, ORTS WJ, MEDEIROS ES. *Structural and Morphological Characterization of Micro and Nanofibers Produced by Electrospinning and Solution Blow Spinning: A Comparative Study*. Hindawi Publishing Corporation, 15p, abr.2013.

ORÉFICE RL, PEREIRA MM, MANSUR HS. *Biomateriais; Fundamentos e Aplicações*. 1.ed., 1. reimpr. Rio de Janeiro: Cultura Médica: Guanabara Koogan, 2012. 538p.

PARANHOS FRL, COSTA RA, MEIRELLES R, SIMÕES R. *Guidelines in focus: Age-Related Macular degeneration*. Rev. da Associação Médica Brasileira, Elsevier, v.59, n.2, p106-111, 2013.

PARK JS, PARK JW, RUCKENSTEIN E. *Thermal And Dynamic Mechanical Analysis Of PVA/MC Blend Hydrogels*. Polymer, Elsevier, v.42, n.9, p4271-4280, abril 2001.

PARPARITA E, CHEABURU CN, VASILE C. *Morphological, Thermal And Rheological Characterization Of Polyvinyl Alcohol/Chitosan Blends*. Cellulose Chemistry And Technology, v.46, n. 9-10, p571-581, 2012.

PARRA DF, RODRIGUES JAFR, LUGÃO AB. *Biodegradable Polymeric Films Of PHB From Burkholderia Saccaria In Presence Of Polyetenoglycol*. Pakistan Journal of Biological Sciences, v.8, n.7, p1041, 2005.

PAUL M, VIEILLARD V, ROUMI E, CAUVIN A, DESPIAU MC, LAURENT M, ASTIER A. *Long-Term Stability Of Bevacizumab Repackaged In 1ml Polypropylene Syringes For Intravitreal Administration*. Annales pharmaceutiques françaises, v.70, n.3, p.139-54, 2012.

PORTO LC. *Filmes Formados Por Gelatina E Poli(Acrilamida-Co-Ácido Acrílico): Efeito Da Composição, Do Plastificante E Agente Reticulante Nas Propriedades Térmicas, Mecânicas E Absorção De Água*. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2007. 95p. (Dissertação, Mestrado em Química).

PRESTES RC. *Colágeno e Seus Derivados: Características e Aplicações em Produtos Cárneos*. UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde, v.15, n.1, p65-74, 2013.

QUEIROZ JM, QUEIROZ JR JM, QUEIROZ FJC. *Degeneração Macular Relacionada À Idade: Considerações Histopatológicas*. Rev. Bras. Oftalmol. v.69, n.6, p400-406, nov. 2010.

RAMAKRISHNA S, FUJIHARA K, TEO WE, LIM TC, MA Z. *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers*. Singapore: Word Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.: Copyrigh: jun. 2005, 396p.

RIORDAN-EVA P, CUNNINGHAM ET. *Vaughan & Asbury's General Ophthalmology*. 18.ed., McGraw-Hill Professional: Lange Clinical Medicine, 2011. 504p.

RODRIGUES EB, FARAH ME, MAIA M, PENHA FM, REGATIERI C, MELO GB, PINHEIRO MM, ZANETTI CR. *Therapeutic Monoclonal Antibodies In Ophthalmology*. Progress in Retinal and Eye Research, Elsevier, v.28, n.2, p117–144, mar. 2009.

SALLES THC. *Eletrofição de Nanofibras de Blendas de Gelatina/PVP (POLI (Vinil Pirrolidona) a Partir de Soluções de Água e Ácido Acético*. Campinas: Universidade Estadual de Campinas Faculdade de Engenharia Mecânica, 2013. 66p (Dissertação, Mestrado em Engenharia Mecânica).

SARAF A, LOZIER G, HAESSLEIN A, KASPER FK, RAPHAEL RM, BAGGETT LS, MIKOS AG. *Fabrication of nonwoven coaxial fiber meshes by electrospinning*. Tissue Engineering, v.15, n.3, p333-344, set. 2009.

SATO JAP. *Fabricação e Caracterização de Sistemas Poliméricos Nanoestruturados Obtidos por Meio do Uso da Técnica De Eletrofição*. Santo André: Universidade Federal do ABC, 2011. 109p. (Dissertação, Mestrado em Nanociências e Materiais Avançados).

SCHIFFMAN JD, SCHAUER CL. *A Review: Electrospinning of Biopolymer Nanofibers and their Applications*. Polymer Reviews, v.48, n.2, p317-352, maio 2008.

SCHRIEBER R, GAREIS H. *Gelatine Handbook: Theory and Industrial Practice*. Weinheim: Wiley-vch, 334 p, 2007.

SCHREUDER GHL, GIBSON PW, SENEAL K, SENNETT M, WALKER J, YEOMANS W. *Protective Textile Materials Based On Electrospun Nanofibers*. Journal of Advanced Materials, v.34, n.3, p44-45, Jul. 2002.

SCHUEREN LV, MOLLET T, CEYLAN O, CLERCK K. *The Development of Polyamide 6.6 Nanofibres With A Ph-Sensitive Function By Electrospinning*. European Polymer Journal, Elsevier, v.46, n.9, p2229-2239, dez. 2010.

SELL SA, MCCLURE MJ, GARG K, WOLFE PS, BOWLIN GL. *Electrospinning Of Collagen/Biopolymers For Regenerative Medicine And Cardiovascular Tissue Engineering*. Advanced Drug Delivery Reviews, v.61, n.12, p1007-1019, 2009.

SERRA D, ANGELUCCI R, SUGANO D, SAMPAIO PR, REHDER JR. *Análise Epidemiológica dos Pacientes Acometidos por Degeneração Macular Relacionada À Idade, Atendidos no Setor de Retina da Faculdade de Medicina do ABC*. Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde, v.33, n.1, p20-23, mar.2008.

SILL TJ, RECUM HA. *Electrospinning: Applications In Drug Delivery And Tissue Engineering*. Biomaterials, Elsevier, v.29, n.13, p1989-2006, maio 2008.

SILVA RSG, BANDEIRA SF, PETRY FC, PINTO L A A. *Extração De Gelatina A Partir Das Peles De Cabeças De Carpa Comum*. Ciência Rural, v.41, n.5, p904-909, mai. 2011.

SILVA AB, SANTOS JPF, BRETAS RES. 12º CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS (12ºCBPOL), 2013, Florianópolis, SC. *Sistemas Poliméricos Nanoestruturados Baseados em Mantas de Nanofibras Condutoras*. 2013. 4p.

SINAPIS CI, ROUTSIAS JG, SINAPIS AI, SINAPIS DI, AGROGIANNIS GD, PANTOPOULOU A, THEOCHARIS SE, BALTATZIS S, PATSOURIS E, PERREA D. *Pharmacokinetics of intravitreal bevacizumab (Avastin®) in rabbits*. Clinical Ophthalmology, v.5, p697–704, maio 2011.

SOUTO AC, MARICATO JT, DENAPOLI PMA, SALLUM JMF, HAN SW. *Comparison of anti-angiogenic effect in vitro between ranibizumab and bevacizumab*. Arq Bras Oftalmol., v.74, n.5, p338-342, 2011.

SPITZER MS, WALLENFELS-THILO B, SIERRA A, YOERUEK E, PETERS S, HENKEFAHLE S, BARTZ-SCHMIDT KU, SZURMAN P. *Antiproliferative and cytotoxic properties of bevacizumab on different ocular cells*. Jornal Ophthalmol, v.90, p1316-1321, 2006.

STEVENS MP. *Polymer Chemistry: An Introduction*. Oxford University Press, p551, 1999.

SUN J, HONG Z, YANG L, TANG Z, CHEN X, JING X. *Study On Crystalline Morphology Of Poly (L-Lactide) - Poly (Ethylene Glycol) Diblock Copolymer*. Polymer, Elsevier, v. 45, n.17, p 5969–5977, ago. 2004.

SWAIN PK, DAS M, NAYAK PL. *Biodegradation Studies of Chitosan-Polycaprolactone (PCL) Nanocomposite In Soil Burial Test*. Middle-East Journal of Scientific Research, v.23, n.2, p253-258, 2015.

TAYLOR G. *Disintegration of Water Drops in an Electric Field*. Poceedings of the Royal Society of London, Series A, Mathematical and Physical Sciences, v.280, n.1382, p383-397, jul. 1964.

TIAN F, SANE S, RYTTING JH. *Calorimetric investigation of protein/amino acid interactions in the solid state*. International Journal Of Pharmaceutics, Elsevier, v.310, n. 1-2, p175–186, mar. 2006.

TIWARI SK, VENKATRAMAN SS. *Importance of Viscosity Parameters In Electrospinning: Of Monolithic And Core–Shell Fibers*. Materials Science and Engineering: C, Elsevier, v. 32, n. 5, p1037-1042, julho 2012.

TORRES RJA, MAIA M, MUCCIOLI C, WINTER G, SOUZA GK, PASQUALOTTO LR, LUCHINI A, PRÉCOMA DB. *Fatores Modificáveis De Degeneração Macular Relacionada A Idade*. Arq. Brasileiro de Oftalmologia, v.72, n.3, p406-412, 2009.

TURAGA U, SINGH V, BEHRENS R, KORZENIEWSKI C, JINKA S, SMITH E,† KENDALL RJ, RAMKUMAR S. *Breathability of Standalone Poly (vinyl alcohol) Nanofiber Webs*. Industrial e Engineering Chemistry Research, v.53, p6951–6958, abril, 2014.

VATANKHAH E, PRABHAKARAN MP, JIN G, MOBARAKEH LG, RAMAKRISHNA S. *Development of nanofibrous cellulose acetate/gelatin skin substitutes for variety wound treatment applications*.v.28, n.6, p909-930, fev. 2014.

VOGELSANGERA N, FORMOLOA MC, PEZZINA APT, SCHNEIDERA ALDS, FURLANA SA, BERNARDOA HP, PEZZINB SH, PIRESC ATN, DUEKD EADR. *Blendas Biodegradáveis de Poli (3-Hidroxibutirato)/Poli (ε-Caprolactona):Obtenção e Estudo da Miscibilidade*. Materials Research, v.6, n.3, p359-265, 2003.

WANG HF, JIA HZ, CHENG SX, FENG J, ZHANG XZ, ZHUO RX. *PEG-Stabilized Micellar System with Positively Charged Polyester Core for Fast pH-Responsive Drug Release*. Pharmaceutical Research, v.29, n.6, p1582-1594, jun.2012.

WANG M, JIN HJ, KAPLAN DL, RUTLEDGE GC. *Mechanical Properties of Electrospun Silk Fibers*. *Macromolecules*, v. 37, n.18, p6856-6864, jun. 2004.

WANG W. *Lyophilization And Development Of Solid Protein Pharmaceuticals*. *International Journal of Pharmaceutics, Elsevier*, v.203, n.1-2, p1-60, ago. 2000.

WANG T, TURHAN M, GUNASEKARAN S. *Selected Properties Of Ph-Sensitive, Biodegradable Chitosan-Poly (Vinyl Alcohol) Hydrogel*. *Polymer Internacional*, v.53, p911-918, maio 2004.

WANG X, DING B, LI B. *Biomimetic Electrospun Nanofibrous Structures For Tissue Engineering*. *Materials Today*, v.16, n.6, p229-241, junho 2013.

WANNATONG L, SIRIVAT A, SUPAPHOL P. *Effects of Solvents on Electrospun Polymeric fibers: Preliminary Study On Polystyrene*. *Polymer International*, v.53, p1851-1859, jun. 2004.

WATSON PG, YOUNG RD. *Scleral Structure, Organisation and Disease. A review*. *Experimental Eye Research, Elsevier*, v.78, n.3, p609-623, mar. 2004.

WON JJ, NIRMALA R, NAVAMATHAVAN R, KIM HY. *Electrospun Core-Shell Nanofibers From Homogeneous Solution Of Poly (Vinyl Alcohol)/Bovine Serum Albumin*. *International Journal of Biological Macromolecules, Elsevier*, v.50, p1292-1298, abr. 2012.

WOODRUFF MA, HUTMACHER DW. *The Return of A Forgotten Polymer - Polycaprolactone In The 21st Century*. *Progress in Polymer Science, Elsevier*, v.35, n.10, p1217-1256, out. 2010.

YAMADA Y, MIYAMURA N, SUZUMA K, KITAOKA T. *Long- Term Follow-Up of Full Macular Translocation For Choroidal Neovascularization*. *American Journal of Ophthalmology, Elsevier*, v.149, n.3, p453-457, mar. 2010.

ZONARI, A.A.C. *Avaliação Da Adesão, Proliferação e Diferenciação Endotelial de Células-Tronco Humanas Cultivadas em Nanofibras de Polihidroxibutirato*. Belo Horizonte: Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG, 2010. 100p (Dissertação mestrado).

ZOU L, LAI H; ZHOU Q, XIAO F. *Lasting Controversy on Ranibizumab and Bevacizumab*. *Theranostics*, v.1, n.1, p395-402, 2011.