



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Programa de Pós-Graduação Em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas

Tese de Doutorado

**“SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOFIBRAS DE POLICAPROLACTONA
COM ADIÇÃO DE PROGESTERONA UTILIZANDO O SOLVENTE ÁCIDO ACÉTICO
PELO MÉTODO DE ELETROFIAÇÃO”**

Autora: Cynthia Casagrande Matos

Orientadora: Profa. Dra. Marivalda de Magalhães Pereira

Março/2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Programa de Pós Graduação Em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas

Cynthia Casagrande Matos

**“SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOFIBRAS DE POLICAPROLACTONA
COM ADIÇÃO DE PROGESTERONA UTILIZANDO O SOLVENTE ÁCIDO ACÉTICO
PELO MÉTODO DE ELETROFIAÇÃO”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Área de Concentração: Ciência e Engenharia dos Materiais

Orientadora: Profa. Dra. Marivalda de Magalhães Pereira

Belo Horizonte

Escola de Engenharia da UFMG

2016

M433s

Matos, Cynthia Casagrande.

Síntese e caracterização de nanofibras de policaprolactona com adição de progesterona utilizando o solvente ácido acético pelo método de eletrofiação [manuscrito] / Cynthia Casagrande Matos . - 2016. 103 f., enc.: il.

Orientadora: Marivalda de Magalhães Pereira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.

Bibliografia: f.95-103.

1. Materiais - Teses. 2. Ciência dos materiais - Teses. 3. Progesterona - Teses. I. Pereira, Marivalda de Magalhães, 1960 -. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia. III. Título.

CDU: 620(043)

“Isso acontece porque rezo com fé”. (Nhá Chica)

“Apenas os que dialogam podem construir pontes e vínculos”. (Papa Francisco)

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho foi um dos grandes méritos e superações na minha vida. Todos os anos de projeto, desafios, convivências com colegas de diversas áreas e professores foram essenciais para o meu amadurecimento profissional, crescimento intelectual e pessoal. Sempre em minha vida quis fazer alguma etapa dos meus estudos na UFMG e agradeço com muito carinho por todos que me ajudaram a realizar este sonho. A realização desse trabalho só foi possível porque contei com a valiosa ajuda de diversas pessoas e gostaria de deixar registrada aqui minha imensa gratidão:

A Deus, por permitir mais esta conquista em minha vida, que em todo este período esteve presente com a interseção de Jesus Cristo, Nossa Senhora, Nhá Chica, todos os meus santos e santas à qual sou devota, mantendo minha saúde, força, esperança e fé;

Aos meus pais Mônica e José por todo amor, paciência, apoio e dedicação;

Aos meus irmãos Daniela e Felipe por todo amor, paciência, apoio e dedicação;

Ao meu marido Lucas por todo amor, carinho, paciência, apoio e compreensão;

Ao meu tio Alexandre, minha sogra Maria Auxiliadora, meu sogro Lúcio, todos os meus familiares e do Lucas, minhas amigas Letícia, Ruthe e Renata pelo apoio e incentivo diário;

A minha orientadora Profa. Dra. Marivalda de Magalhães Pereira pelos ensinamentos, oportunidade, compreensão e amizade. Agradeço ainda por todas as sugestões, correções com alta qualidade, aulas, revisões e conselhos que foram essenciais para a finalização deste trabalho. Meus agradecimentos são eternos;

Ao meu coorientador Prof. Dr. Rodrigo Lambert Oréfice pelos ensinamentos, apoio e por ceder o LEPCOM para o desenvolvimento do projeto;

A todos os meus colegas de trabalho e alguns que viraram amigos eternos da Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas, especialmente os mestrandos e doutorandos do LabBio e LEPCOM;

Aos amigos do Design, principalmente Fernando Silva e Márcia França pelo apoio e incentivo diário;

Aos professores do Departamento de Engenharia Metalúrgica, Materiais e Minas, que me ajudaram nesse trabalho me cedendo equipamentos para meus

experimentos, especialmente ao Prof. Dr. Herman Mansur e a Profa. Dra. Alexandra Piscitelli Mansur;

Aos funcionários do Departamento de Metalurgia, Materiais e Minas, em especial, aos funcionários Maria Aparecida Pacheco, Nelson Azevedo e Patrícia Azevedo, pela paciência e profissionalismo em me atender sempre a tempo e com muito carinho;

A Lua, pela leveza do seu olhar e carinho;

Ao apoio financeiro do CNPq.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE NOTAÇÕES.....	XIII
RESUMO	XV
ABSTRACT	XVI
1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos Específicos	20
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
3.1 Nanoestruturas e sistemas de liberação controlada	21
3.2 Polímeros biodegradáveis, bioabsorvíveis e biorreabsorvíveis.....	23
3.3 Os sistemas de liberação de fármacos biodegradáveis	26
3.4 Nanoestruturas para liberação controlada	37
4 METOLOGIA	47
4.1 Preparação da solução de PCL e ácido acético e eletrofição	47
4.2 Caracterização estrutural das amostras	49
4.3 Caracterização <i>in vitro</i> da amostra	50
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1 Análise estrutural das fibras de PCL.....	53
5.1.1 Análise Macroscópica.....	53
5.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	55
5.1.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	68
5.1.4 Difração de raios-X (DRX)	70
5.1.5 Ensaio de Citotoxicidade.....	72
5.2 Análise estrutural e <i>in vitro</i> das fibras de PCL com adição de progesterona.....	72

5.2.1 Análise Macroscópica.....	72
5.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	74
5.2.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	80
5.2.4 Difração de raios-X (DRX).....	82
5.2.5 Ensaio de absorção de água.....	83
5.2.6 Ensaio de Degradação	85
5.2.7 Ensaio de Liberação Controlada do Fármaco.....	90
6 CONCLUSÕES.....	92
7 CONTRIBUIÇÕES ORIGINAIS AO CONHECIMENTO / RELEVÂNCIA DOS RESULTADOS	93
8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	94
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: As diferentes estruturas e suas dimensões..	21
Figura 3.2: Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz poliméricas das nanoesferas.....	22
Figura 3.3: Representação da estrutura química do PCL.	26
Figura 3.4: Mecanismos de liberação do fármaco: (a) difusão a partir de um sistema reservatório; b) difusão a partir de um sistema matricial; (c) difusão controlada por erosão da matriz polimérica; (d) expansão da matriz polimérica.	27
Figura 3.5: Características temporais dos efeitos dos fármacos e suas relações com a janela terapêutica, exemplo de dose única, administração oral.....	29
Figura 3.6: Taxa de liberação do hormônio levonorgestrel do implante Capronor® de diâmetros 2,5mm e 4,0mm.....	31
Figura 3.7: Sistemas nanoestruturados, micelares e vesiculares: a) conjugados fármaco-polímero; b) conjugados proteína-polímero; c) dendrímeros; d) micelas; e) lipossomos.	34
Figura 3.8: Ilustrações com processos de eletrofiação: a) eletrofiação por bomba e com coletor cilíndrico, b) eletrofiação vertical com coletor horizontal e c) eletrofiação com coletor cilíndrico.	40
Figura 3.9: Fotografia das nanofibras saindo da agulha durante o método de eletrofiação.....	42
Figura 4.1: Representação esquemática da síntese das nanofibras.....	47
Figura 4.2: Fluxograma representando as formas de incorporação do hormônio Progesterona nas nanofibras produzidas: a) durante preparação da solução a ser utilizada na eletrofiação e b) aspensão sobre as nanofibras produzidas.	48
Figura 5.1: Fotografias das amostras obtidas a partir de soluções com concentrações a) 15% <i>m/m</i> , b) 25% <i>m/m</i> , c) 20% <i>m/m</i> , d) 20% <i>m/m</i> após ser retirada do papel alumínio e e) de 30% <i>m/m</i> . Escala: 1:2.	54
Figura 5.2: Microfotografias para as amostras obtidas a partir de soluções com concentrações: 15% <i>m/m</i> , sendo a) 15kV b) 20kV e c) 25kV; 20% <i>m/m</i> , sendo d) 15kV e) 20kV e f) 25kV; 25% <i>m/m</i> , sendo g) 15kV h) 20kV e i) 25kV e 30% <i>m/m</i> , sendo j) 15kV k) 20kV. Ampliações em 16000x.	61

Figura 5.3: Microfotografia e distribuição dos diâmetros, sendo as concentrações a) 15%/m/m, b) 20%/m/m, c) 25%/m/m e d) 30%/m/m.	62
Figura 5.4: Microfotografia para a amostra obtida de solução com concentração 20%/m/m em ampliação de 1000x.	63
Figura 5.5: Microfotografia para a amostra obtida de solução com concentração 20%/m/m ampliação de 10000x, sendo a) velocidade de injeção de 4mL/hr e b) velocidade de injeção de 7mL/hr.	64
Figura 5.6: Microfotografia para a amostra obtida de solução com concentração 20%/m/m, ampliação de 1000x, sendo a) após aumentar a temperatura em poucos graus (5°C) por tempo máximo de 5min. b) após retirar do agitador e deixada em repouso.	66
Figura 5.7: Microfotografia para a amostra obtida após permanecer em estufa, com temperatura até 60°C.	67
Figura 5.8: Espectros de FTIR para as amostras a) obtidas de soluções com concentrações diversas e b) bandas na amostra obtida de solução com concentração 20%/m/m com voltagem de 20kV.	69
Figura 5.9: Espectros de FTIR para as amostras de PCL puro e obtida de solução com concentração 20%/m/m.	70
Figura 5.10: Espectro DRX para as amostras a) solução com concentração 20%/m/m, b) PCL.	71
Figura 5.11: Viabilidade celular após 72 horas de contato das células SAOS com a amostra obtida com solução de concentração 20%/m/m.	72
Figura 5.12: Fotografia para as amostras com concentrações de progesterona de a) 9%/m/m, b) 16%/m/m, c) 23%/m/m, d) 28%/m/m, e) 33%/m/m e f) 16%/m/m após ser retirada do papel alumínio. Escala: 1:2.	73
Figura 5.13: Microfotografia para as amostras com concentrações de progesterona a) 9%/m/m, b) 16%/m/m, c) 23%/m/m, d) 28%/m/m e e) 33%/m/m. Ampliações em 16000x.	77
Figura 5.14: Microfotografia para a amostra de concentração 16%/m/m ampliação de 5000x.	78
Figura 5.15: Microfotografia para a amostra com aspensão do hormônio após a eletrofiação, sendo a) ampliação 1000x, b) fratura criogênica - ampliação de 100x e c) fratura criogênica - ampliação de 1000x.	79

Figura 5.16: Espectros FTIR para as amostras, sendo: a) diferentes concentrações de progesterona, b) concentração 16%/m/m e c) concentração 16%/m/m em comparação com PCL puro e progesterona.	82
Figura 5. 17: Difractogramas das amostras a) concentração 16%/m/m e 0%/m/m de progesterona, b) progesterona.	83
Figura 5. 18: a) gráfico da absorção das amostras de 16%/m/m progesterona no pH4 e pH7; microfotografia para as amostras, sendo b) pH4, c) pH7. Ampliação 16000x.	85
Figura 5.19: Microfotografia para as amostras após teste de degradação, sendo a) 0%/m/m progesterona com 5 semanas, b) 0%/m/m progesterona com 11 semanas, c) 16%/m/m progesterona com 5 semanas, d) 16%/m/m progesterona com 11 semanas, e) 23%/m/m progesterona com 5 semanas e e) 23%/m/m progesterona com 11 semanas.	88
Figura 5. 20: Microfotografia e distribuição dos diâmetros, sendo as concentrações a) 15%/m/m, b) 20%/m/m, c) 25%/m/m e d) 30%/m/m.	89
Figura 5.21: Gráfico da variação da massa das amostras em 5, 7 e 11 semanas.	90
Figura 5.22: Inconstância das absorbâncias x concentração das amostras.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Sistemas e mecanismos que controlam a liberação de fármacos.....	28
Tabela 3.2: Características das vias comuns de administração dos fármacos..	30
Tabela 4.1: Parâmetros que serão utilizados para a produção das nanofibras.....	49

LISTA DE NOTAÇÕES

Notação	Significado
ANVISA	Agência da Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde
C	Carbono
CEM	Concentração Eficaz Mínima
cm	Centímetro
DDS	Drug Delivery System
DIU	Dispositivo Intrauterino
EE	Hormônio Etil Estradiol
EVA	Etileno acetato de Vinila
FDA	Food and Drug Administration
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
GnRH	Gonadotrofinas
kV	Quilovolts
LEPCom	Laboratório de Polímeros e Compósitos
LH	Hormônio Luteinizante
LNG	Hormônio Levonorgestrel
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
min	Minuto
mg	Miligrama
mm	Milímetro
mol/L	Mol/Litro
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)
NICHHD	National Institute of Child Health and Human Development
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Poli(Succinato de Butileno)
PCL	Poli(ϵ -caprolactona)
PEVA	Poli(etileno-co-acetato de vinila)
PGA	Poli(ácido glicólico)
pH	Potencial Hidrogeniônico
PLA	Poli(ácido láctico)
PLGA	Poli(ácido láctico-co-glicólico)

PU	Poliuretanas
PS	Poliestireno
PVA	Polivinil Álcool
SBS	Solution Blow Spinning
SLF	Sistema de Liberação de Fármaco
SRE	Sistema Retículoendotelial
Tg	Temperatura de Transição Vítreá
TGA	Análise Termogravimétrica (<i>Thermogravimetric Analysis</i>)
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
UV/VIS	Espectroscopia no Ultravioleta Visível
w/o/w	Water in Oil in Water (Emulsão Água em Óleo em Água)
°C	Grau Celsius
%m/m	Porcentagem em Massa/Massa
%m/v	Porcentagem em Massa/Volume
µm	Micrômetro
µg	Micrograma
ε	Permissividade do Meio Circundante

RESUMO

O sistema ideal de liberação de fármacos é o que libera de forma prolongada e constante, dependendo da concentração no tecido alvo, da absorção no tecido, da farmacocinética e da proteção do fármaco quando *in situ*. Os sistemas implantáveis que foram desenvolvidos a partir do polímero policaprolactona (PCL), os contraceptivos em forma de implante, apresentam destaque nas pesquisas de novas estruturas. Diversos estudos envolvendo a incorporação de fármacos em polímeros por meio dos métodos de eletrofiação estão sendo realizados. Alguns estudos demonstraram a integridade do fármaco e a melhor dispersão dele ao longo de sistemas de nanofibras. Devido a novas possibilidades de desenvolvimento de sistemas para liberação controlada de fármacos e os poucos estudos realizados com a incorporação de hormônios femininos utilizando nanoestruturas pelo processo de eletrofiação, o objetivo deste trabalho foi a produção de um sistema de nanofibras de PCL, utilizando somente o solvente ácido acético durante todo o processo. Foram analisadas amostras obtidas dos sistemas de PCL, ácido acético e progesterona; utilizando-se diferentes parâmetros de síntese: concentração da solução (polímero e hormônio), voltagem e velocidade de injeção na eletrofiação. Na etapa 1, foram preparadas soluções com diferentes concentrações de PCL com relação ao ácido acético: 15%*m/m*, 20%*m/m*, 25%*m/m* e 30%*m/m*. O equipamento de eletrofiação foi ajustado nas velocidades de injeção 4mL/hr e 7mL/hr e as voltagens utilizadas foram 15kV, 20kV e 25kV. Na etapa 2, em que se adicionou a progesterona ao sistema, foi considerado que a amostra com melhores características morfológicas e estruturais foi a de concentração 20%*m/m* de PCL, com a velocidade de injeção de 4mL/hr e a voltagem de 20kV. As concentrações de progesterona em relação ao PCL utilizadas nesta etapa foram 9%*m/m*, 16%*m/m*, 23%*m/m*, 28%*m/m* e 33%*m/m*. Em ambas as etapas, foram produzidas amostras no formato de manta com diâmetro de 90mm e peso total de 1g. As análises das características estruturais e *in vitro* foram realizadas, para se avaliar a efetiva formação das nanofibras, os diâmetros e variação dos diâmetros das mesmas, a homogeneidade do produto coletado, a capacidade de absorção de água e a taxa de degradação das amostras. As amostras com 16%*m/m* e 23%*m/m* de progesterona foram as que apresentaram as melhores características estruturais e morfológicas.

Palavras-chave: Eletrofiação; Policaprolactona, Progesterona, Nanofibras, Ácido Acético.

ABSTRACT

The ideal drug delivery system releases in a prolonged and constant way, depending on the concentration in the target tissue, its absorption rate, pharmacokinetics and the drug's coating when in situ. Implantable systems that were developed from the polymer polycaprolactone (PCL), in the form of contraceptive implant, have received high consideration in the research of new structures. Several studies involving the incorporation of drugs into polymers by the electrospinning methods are being conducted. Some studies have demonstrated the integrity of the drug and its better dispersion throughout nanofiber systems. Due to new systems development possibilities for controlled release of drugs, and the few studies with the incorporation of female hormones using nanostructures by the electrospinning process, the purpose of this work was the production of a PCL nanofiber system using acetic acid as the only solvent throughout the process. Samples of the PCL, acetic acid and progesterone system, obtained using different synthesis parameters: solution concentration (polymer and hormone), voltage and injection rate in the electrospinning, were analyzed. In step 1 solutions were prepared with different PCL to acetic acid concentrations: 15%w/w, 20%w/w, 25%w/w and 30%w/w. The electrospinning equipment was adjusted to the injection rates of 4ml/hr and 7ml/hr and the voltages used were 15kV, 20kV and 25kV. In step 2 progesterone was added to the system. It was considered that the sample with the best structural and morphological characteristics was the 20%w/w PCL with the injection rate of 4 ml/hr and a voltage of 20kV. The progesterone to PCL concentrations used in this step were 9%w/w, 16%w/w, 23%w/w, 28%w/w and 33%w/w. In both steps samples were produced in a blanket form with a diameter of 90mm and a total weight of 1g. Structural and in vitro characteristics analysis were conducted to evaluate the effective nanofiber formation, the fiber diameters and the variation of the diameters, the homogeneity of the collected product, the water absorption capacity and the degradation rate of the samples. Samples with 16%w/w and 23%w/w of progesterone showed the best structural and morphological characteristics.

Keywords: Eletrospinning; Polycaprolactone, Progesterone, Nanofibers, Acetic Acid.

1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é um termo usado para referir-se ao estudo de manipulação da matéria numa escala atômica e molecular, ou seja, é a ciência e tecnologia que foca nas propriedades especiais dos materiais de tamanho nanométrico. O principal objetivo é criar novos materiais, novos produtos e processos a partir da capacidade moderna de ver e manipular átomos e moléculas. Como exemplo de sistemas desenvolvidos em nanoestruturas, as nanofibras de polímeros foram testadas em máscaras de cosméticos para limpeza, cicatrização e tratamentos da pele, sendo que essas máscaras de nanofibras com nanoporos permitiram acelerar a taxa de transferência dos aditivos para a pele em um processo suave e sem dor (PARK & LAKES, 1992; SCHAFFAZICK *et al.*, 2002; DÚRAN, 2003; LAVAN *et al.*, 2003; ORÉFICE *et al.*, 2006; BELINGEROVÁ *et al.*, 2009).

Entende-se como liberação controlada de fármacos os métodos e formulações, tecnologias e sistema para o transporte de um composto farmacêutico no corpo, conforme necessário para atingir o seu efeito terapêutico desejado, com o mínimo de efeitos adversos. Existem vários tipos de formulações de liberação controlada, entre elas microesferas e nanoestruturas. Os sistemas de liberação de fármacos podem ser polímeros biodegradáveis, que são decompostos no organismo e excretados pelas vias renais e biliares. Dentre os polímeros biodegradáveis constantemente investigados na área biomédica, pode-se citar o PCL (SILVA 2006; KATZUNG, 2007; BRUTON, 2012).

Segundo HAYASHI, (1994) existem estudos de que sistemas produzidos com o PCL possuem uma degradação bem mais lenta que sistemas com outros tipos de polímeros. Alguns sistemas com PCL biodegradam em períodos acima de 18 meses (DHANARAJU *et al.* 2003, 2006; WANG *et al.*, 2005; NAIRA & LAURENCINA, 2007; BEREK & GUANABARA, 2008; MELO, 2010).

Com relação às nanofibras, as aplicações biomédicas das estruturas desenvolvidas revelam características interessantes, como a degradação controlada, liberação do fármaco e diversos aspectos morfológicos a serem explorada na superfície fibrosa. Nanofibras de polímeros foram testadas em máscaras de cosméticos para limpeza, cicatrização e tratamentos da pele, sendo que essas máscaras de nanofibras com nanoporos permitiram acelerar a taxa de transferência dos aditivos para a pele em um processo suave e sem dor (PARK & LAKES, 1992; SCHAFFAZICK *et al.*, 2002;

DÚRAN, 2003; LAVAN *et al.*, 2003; ORÉFICE *et al.*, 2006; BELINGEROVÁ *et al.*, 2009).

Os sistemas poliméricos de liberação de fármacos biodegradáveis apresentam uma matriz polimérica que incorpora o fármaco e o libera de forma controlada, dependendo da concentração no tecido alvo e da absorção no tecido, da farmacocinética e da proteção do fármaco quando *in situ* (especialmente por períodos mais longos de liberação). A incorporação de fármacos em nanofibras pode ser realizada de diversas formas, sendo estas: (i) as substâncias são ligadas ou suspensas na superfície transportadora, (ii) as substâncias e o sistema em forma de nanofibras são entrelaçados entre si, (iii) a incorporação do medicamento e o material de transporte integrado num único tipo de fibras e (iv) o material de suporte é produzido em forma tubular na qual as substâncias são entrelaçadas entre ele (PORTELA, 2010; BRUTON, 2012).

Dentre os sistemas implantáveis que foram desenvolvidos a partir do PCL, os contraceptivos em forma de implante apresentam destaques nas pesquisas de novas estruturas. De acordo com MELO (2010) e BEREK & GUANABARA (2008), os implantes contraceptivos que utilizam polímeros como sistemas de liberação controlada de fármacos ainda apresentam insatisfação das pacientes devido aos efeitos colaterais, sendo a principal queixa com relação aos sangramentos irregulares e a inserção/remoção dos implantes. O implante Capronor® foi o único biodegradável e utiliza o hormônio levonorgestrel, que é uma progesterona sintética, no seu sistema, mas o produto ainda está em fase de pesquisas. (DHANARAJU *et al.*, 2003, 2006; WANG *et al.*, 2005).

Ainda há um campo a ser explorado de estudos na área de sistemas de liberação de fármaco produzidos pelos métodos de eletrofiação. Pode-se considerar uma das áreas com maior incentivo na área biomédica, a fim de explorar o aumento da eficiência da liberação do fármaco (controle das taxas de liberação), a incorporação de novos polímeros biodegradáveis (diminuição dos efeitos colaterais para o paciente) e a eliminação dos polímeros completamente do organismo por vias de excreção, evitando a formação de subprodutos. Existem pesquisas e inovações para sistemas de liberação de fármacos atualmente como, por exemplo, a produção de nanoesferas e nanofibras em que o fármaco encontra-se homoganeamente disperso ou solubilizado no interior da matriz polimérica. Alguns estudos demonstraram a integridade do fármaco e a melhor dispersão dele ao longo da fibra ou a liberação mais controlada

através de nanopartículas. Existem estudos de nanoestruturas obtidas por outros métodos com polímero PCL e outros tipos de medicamentos, como, por exemplo, o antibiótico Mefoxin®, sendo que estas pesquisas demonstram que a bioatividade do fármaco não foi alterada após o processo de obtenção das nanoestruturas (KIM & PARK, 2006; SILVA 2006; KATZUNG, 2007; MELO, 2010; BRUTON, 2012).

O método de eletrofiação oferece grande flexibilidade na seleção de materiais para aplicações de liberação do fármaco. O método pode ser estudado de diversas maneiras para incorporação do fármaco, como a disponibilização do fármaco entre as nanofibras produzidas. Existem estudos que já produzem sistemas a partir da eletrofiação, como, por exemplo, medicamentos destinados ao tratamento de câncer e antibióticos (BOGNITZKI, *et al.*, 2001; RAMAKRISHNA *et al.*, 2006; SILL & VON RECUM, 2008; AGARWAL *et al.*, 2008; COSTA, *et al.*, 2012).

Vários solventes podem ser utilizados na preparação da solução a ser usada na obtenção de nanofibras por eletrofiação com o PCL. De acordo com SCHUEREN *et al.* (2011), a proposta de utilizar uma solução de ácido acético e ácido fórmico é a opção mais utilizada, pela rapidez do processamento. Apesar disso, o uso de apenas o ácido acético não foi amplamente estudado.

Neste trabalho foi realizada a síntese e caracterização de nanofibras de PCL puro na primeira etapa e depois a síntese e caracterização de nanofibras de PCL com adição do hormônio progesterona. Explorou-se o desenvolvimento de metodologia de obtenção de nanofibras de PCL por eletrofiação usando somente ácido acético como solvente e variando os parâmetros voltagem, concentração e velocidade de injeção. Foi também investigado a incorporação o hormônio progesterona na produção das nanofibras de PCL.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Síntese e caracterização de nanofibras de policaprolactona, com e sem hormônio progesterona em sua composição, utilizando o método de eletrospinning, para a obtenção de sistema com potencial para liberação controlada de fármaco.

2.2 Objetivos Específicos

- Síntese e definição dos parâmetros apropriados para a produção de nanofibras de PCL por eletrospinning com a utilização do solvente ácido acético para preparação da amostra;
- Incorporação do fármaco progesterona nas nanofibras poliméricas e análise do comportamento das nanofibras;
- Caracterização da estrutura do sistema obtido por análise Macroscópica, FTIR, DRX e MEV;
- Avaliação da citotoxicidade das nanofibras produzidas;
- Realização de testes *in vitro* para avaliar a biodegradação das nanofibras produzidas;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Nanoestruturas e sistemas de liberação controlada

A nanotecnologia é a ciência, engenharia e manufatura de sistemas de tamanho nano ($1\text{nm} = 10^{-9}$ metros ou 1 bilionésimo de metro - Figura 3.1) que podem desempenhar funções específicas como elétricas, mecânicas, biológicas, químicas ou tarefas computacionais (PARK & LAKES, 1992; SCHAFFAZICK *et al.*, 2002; DÚRAN, 2003; LAVAN *et al.*, 2003; ORÉFICE *et al.*, 2006).

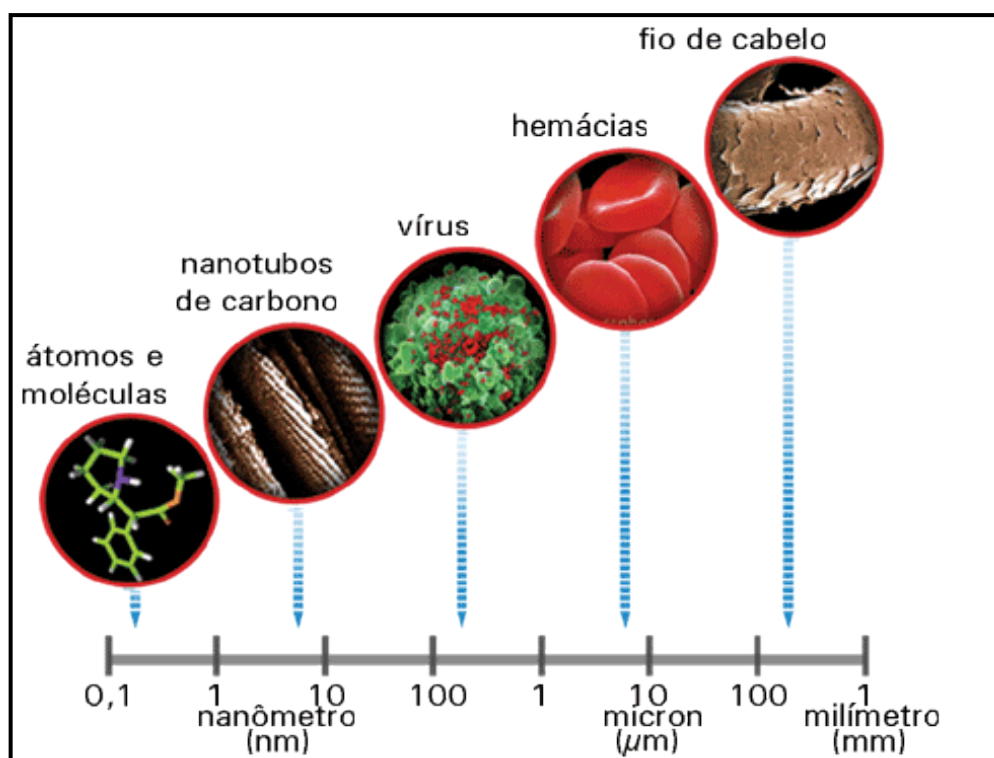


Figura 3.1: As diferentes estruturas e suas dimensões. Fonte: DÚRAN, 2003.

Com os recentes avanços na síntese de macromoléculas e as abordagens de microfabricação, a capacidade para construir nanoestruturas de diferentes formas aumentou bruscamente, apesar de que alcançar a baixa polidispersão para determinadas morfologias tem sido um desafio. Entre as nanoestruturas desenvolvidas e pesquisadas para o desenvolvimento de novos sistemas, podem-se citar as nanocápsulas e as nanofibras (INOUE *et al.*, 1989; VENKATARAMAN *et al.*, 2011).

O termo nanomateriais aplicado à liberação controlada de fármacos é amplo e refere-se a diversos tipos de estruturas diferentes, dentre eles nanoesferas e nanocápsulas. Denominam-se esferas aqueles sistemas em que o fármaco encontra-se homogeneamente disperso ou solubilizado no interior da matriz polimérica. Desta forma obtém-se um sistema monolítico, onde não é possível identificar um núcleo diferenciado. As nanocápsulas (Figura 3.2), ao contrário, constituem os chamados sistemas do tipo reservatórios, onde é possível identificar um núcleo diferenciado, que pode ser sólido ou líquido. Neste caso, a substância encontra-se envolvida por uma membrana, geralmente polimérica, isolando o núcleo do meio externo (DE AZEVEDO, 2003).

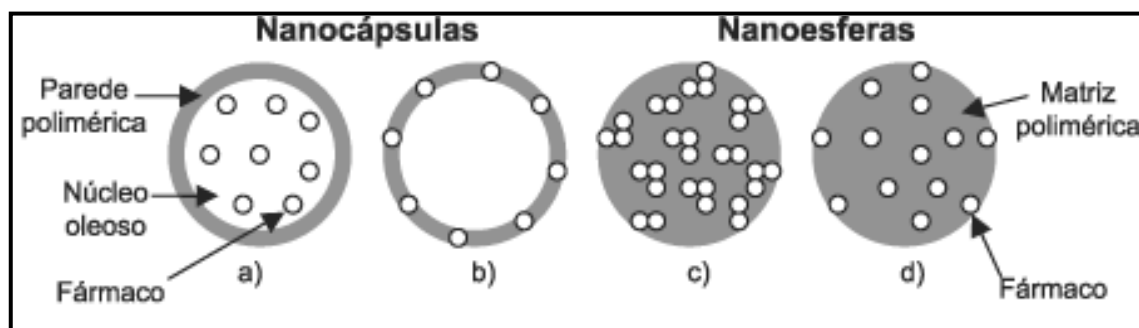


Figura 3.2: Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz poliméricas das nanoesferas. Fonte: SCHAFFAZICK *et al.*, 2002.

Os novos sistemas coloidais¹ para liberação controlada de fármacos procuram mudar a distribuição da substância ativa, aumentando a permanência na circulação sistêmica para que se alcance maior eficácia terapêutica, com doses menores e baixa toxicidade. O potencial terapêutico desses dispositivos biodegradáveis, que encapsulam o ingrediente ativo, depende do tempo de circulação na corrente sanguínea e, principalmente, do destino *in vivo* do carregador, que deve ser direcionado a alvos específicos (DE AZEVEDO, 2003; NAIRA & LAURENCINA *et al.*, 2007).

Como exemplo de liberação de fármaco (nanoestruturas) na área médica, as nanopartículas de PCL têm mostrado resultados promissores na oftalmologia para o

¹ **Sistemas Coloidais:** são sistemas nos quais um ou mais componentes apresentam pelo menos uma de suas dimensões dentro do intervalo de 1nm a 1µm.

aumento da eficiência para a biodisponibilidade dos fármacos. No entanto, os poliésteres podem ser submetidos à hidrólise durante a armazenagem em meios aquosos e a sua degradação pode ser intensificada por micro-organismos (MASSON *et al.*, 1996).

3.2 Polímeros biodegradáveis, bioabsorvíveis e biorreabsorvíveis

As nanoestruturas estudadas são em sua maioria processadas com polímeros biodegradáveis. As denominações de polímeros biodegradáveis, bioabsorvíveis e biorreabsorvíveis iniciaram-se há 40 anos, logo depois do surgimento do conceito de biomateriais. De acordo com LEONG & LANGER (1987), todos os polímeros conhecidos podem ser considerados como “degradáveis”. No campo dos biomateriais, existe uma lista de critérios para a avaliação de um sistema biodegradável e isto inclui a biocompatibilidade e biofuncionalidade, além da eliminação do corpo (*bioassimilation*). No geral, os termos relacionados à biodegradabilidade são: degradáveis/biodegradáveis, reabsorvíveis e/ou absorvíveis. Diversos autores possuem diferentes opiniões sobre as definições, listadas a seguir:

- 1) O polímero biodegradável, segundo HAYASHI (1994) é um termo utilizado para polímeros e dispositivos sólidos que devido à degradação macromolecular sofrem dispersão *in vivo*, mas sem a eliminação dos produtos e subprodutos pelo organismo. Polímeros biodegradáveis podem ser atacados por elementos biológicos de forma que a integridade do sistema seja afetada, formando-se fragmentos ou outros subprodutos de degradação, que podem ser removidos do seu local de ação, mas não necessariamente do organismo;
- 2) O polímero bioabsorvível (BARBANTI *et al.*, 2005) é um termo utilizado para materiais poliméricos e dispositivos que podem se dissolver em fluidos corpóreos sem qualquer clivagem da cadeia macromolecular ou diminuição de massa molar, como no caso da dissolução lenta de implantes solúveis em fluidos orgânicos;
- 3) O polímero biorreabsorvível (BARBANTI *et al.*, 2005) é um termo utilizado para materiais poliméricos e dispositivos sólidos que mostram degradação por meio da diminuição de tamanho e que são reabsorvidos *in vivo*. São materiais eliminados por rotas metabólicas do organismo. Biorreabsorção é um conceito que reflete a eliminação total do material e dos subprodutos de degradação (compostos de baixa massa molar) sem efeitos colaterais residuais. A palavra "biorreabsorção" é aplicada quando a eliminação é total.

Diversos autores como MIDDLETON & TRIPTON (1998), NAIRA & LAURENCINA *et al.* (2007), TIAN *et al.* (2012) citam que um polímero bioabsorvível pode ser biorreabsorvível se suas macromoléculas são excretadas. Os materiais poliméricos biorreabsorvíveis são os compostos utilizados preferencialmente em dispositivos temporários. Ainda de acordo com BARBANTI *et al.* (2005), os bioabsorvíveis podem ser definidos como os que se degradam após a inserção do implante em produtos não tóxicos, os quais são eliminados do corpo ou metabolizados pelo organismo. Complementando, WOODRUFF & HUTMACHER (2010) afirmam que os materiais biodegradáveis são materiais poliméricos que se degradam e são eliminados na forma de macro/micro moléculas e produtos (em alguns casos) pelo organismo. Os sistemas poliméricos biodegradáveis podem ser atacados por elementos biológicos alterando a integridade do sistema. De acordo com DÚRAN (2003) podem-se citar como polímeros biodegradáveis:

- i) Polímeros naturais: colágeno, celulose e quitosana;
- ii) Polímeros naturais modificados: reticulação de gelatina utilizando-se formaldeído, a reticulação de quitosana utilizando-se glutaraldeído, levar celulose a acetato de celulose;
- iii) Polímeros sintéticos: polietileno, poli(ácido acrílico), poliésteres, entre outros.

De acordo com ORÉFICE *et al.*, (2006) os polímeros naturais são passíveis de degradação *in vivo* por hidrólise ou ataque enzimático. Os polímeros sintéticos ainda apresentam diversas desvantagens com relação aos polímeros naturais, dentre as quais incluem: fortes atividades fisiológicas, alto potencial de rejeição e dificuldade de avaliar as taxas de degradação *in vivo* por causa das diferenças nas concentrações das enzimas em diferentes partes de tecidos vivos.

Os principais grupos funcionais suscetíveis à hidrólise são os ésteres, orto-ésteres, anidridos, carbonatos, amidas, uretanas e outros. Portanto, podem sofrer biodegradação, via hidrólise química ou enzimática, os poliésteres alifáticos, as poliamidas, os poliuretanos (PU), os poli(orto ésteres), os polianidridos, os polifosfoésteres e as polifosfazonas. Os poliésteres alifáticos são os polímeros que sofrem biodegradação em meio biológico mais explorados em sistemas de liberação de fármacos. São eles: PLA, PCL e PLGA (ORÉFICE *et al.*, 2006).

A degradação química pode ocorrer na superfície ou no interior do sistema, dependendo se a velocidade da reação for maior ou menor do que a difusão do solvente de clivagem da cadeia dentro da matriz. No caso da clivagem da cadeia provocada pela água, a solubilidade das cadeias e a degradação por produtos fluidos corporais e os polímeros a hidrofóbicos são fatores críticos para a degradação com eliminação nos rins. A degradação enzimática foi normalmente limitada à superfície dos dispositivos sólidos poliméricos porque as moléculas de proteína dificilmente penetram as matrizes poliméricas sólidas. No caso das macromoléculas solúveis, a clivagem enzimática pode ocorrer tanto nas extremidades da cadeia ou aleatoriamente dentro de cadeias principais (PARK & LAKES, 1992; HAYASHI, 1994; ORÉFICE *et al.*, 2006).

A degradação de macromoléculas de copolímeros pode ser a fonte de complicações em termos de sistemas vivos, pois em macromoléculas heterogêneas a clivagem da cadeia ocorre nas ligações mais fracas da cadeia principal, afetando diversos segmentos degradáveis da cadeia que os tornam bioestáveis. Portanto, se os resíduos forem tóxicos, podem cristalizar e/ou formar partículas inflamatórias. Foi demonstrado que o produto ácido glicólico (utilizado em muitos produtos para a pele) pode afetar drasticamente o crescimento de queratinócitos², embora ele não tenha efeito sobre os fibroblastos³ (SINHA & TREHAN, 2003; KATZUNG, 2007).

A biodegradabilidade dos polímeros é constantemente explorada em sistemas de liberação de fármacos, uma vez que é altamente desejável que um sistema polimérico com um fármaco, quando introduzido no organismo, seja excretado dele depois de cumprir a sua função, sem a necessidade de intervenções para sua retirada (WOODRUFF & HUTMACHER, 2010).

Dentre os polímeros vastamente utilizados em sistemas biodegradáveis, pode-se citar o PCL em trabalhos relacionados à biomateriais de liberação de fármacos. Esse polímero (estrutura química representada na Figura 3.3) é um poliéster alifático, hidrofóbico, semicristalino, com temperatura de fusão de aproximadamente 60°C e Tg de aproximadamente -60°C. Além disso, é um polímero termoplástico, atóxico, de

² **Queratinócitos** ou **ceratinócitos**: são células diferenciadas do tecido epitelial e invaginações da epiderme para a derme (como os cabelos e unhas) de animais terrestres responsáveis pela síntese da queratina.

³ **Fibroblasto**: célula constituinte do tecido conjuntivo.

baixa viscosidade e com massa molar que pode variar entre 5000 e 90000g.mol⁻¹ (LEONG & LANGER, 1987; CALLISTER, 2012).

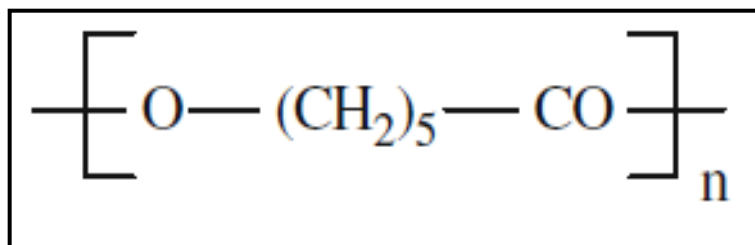


Figura 3.3: Representação da estrutura química do PCL.

De acordo com LEONG & LANGER (1987), o PCL é mais resistente à hidrólise do que outros poliésteres alifáticos, minimizando assim a perda prematura das propriedades. A biodegradação do PCL é realizada pela enzima lipase por meio da hidrólise das ligações éster. Essa enzima é capaz de degradar tanto a fase amorfa como a fase cristalina desse polímero. O PCL apresenta boa solubilidade em solventes orgânicos comuns e pode ser degradado enzimaticamente. Existem estudos em que fragmentos de massa molar de PCL são supostamente fagocitados por macrófagos e degradadas intracelularmente. O PCL degrada a uma taxa muito mais lenta do que o PLA e pode, portanto, ser utilizado para a concepção de longo prazo, em sistemas implantáveis de distribuição de fármacos que permanecem ativos por mais de um ano, além de ser um material biocompatível por ser atóxico (HAYASHI, 1994; NAIRA & LAURENCINA, 2007; WOODRUFF & HUTMACHER, 2010; KUMARI *et al.*, 2010).

3.3 Os sistemas de liberação de fármacos biodegradáveis

O desenvolvimento de sistemas de liberação de fármaco (SLF) ou *drug delivery system* (DDS) biodegradáveis de PCL e outros polímeros possui como objetivo prolongar o tempo de liberação do fármaco no organismo, sustentar sua concentração plasmática e controlar a localização temporal e espacial das moléculas *in vivo*, por meio da aplicação de princípios biológicos e químicos. As alterações cíclicas na concentração do fármaco são eliminadas e a disponibilidade biológica do fármaco é aumentada. Podem-se obter redução da toxicidade, supressão de reações adversas e diminuição do número de doses administradas, diariamente (ORÉFICE *et al.*, 2006; SILVA 2006; KATZUNG, 2007; VILLANOVA *et al.*, 2010, 2011; VIGO *et al.*, 2011; BRUTON, 2012; DA SILVA FILHO *et al.*, 2012).

Os sistemas poliméricos liberam fármacos por quatro mecanismos gerais: difusão, químicos, solventes ativados e processos magnéticos. O mecanismo mais comum é a difusão, por meio do qual o fármaco migra para a superfície exterior e, em seguida, para o corpo (LANGER, 1983).

Os diferentes mecanismos de liberação controlada por difusão estão representados na Figura 3.4, sendo eles: difusão a partir de um sistema reservatório, difusão a partir de um sistema matricial, difusão controlada por erosão da matriz polimérica e expansão da matriz polimérica (CERCENÁ, 2008).

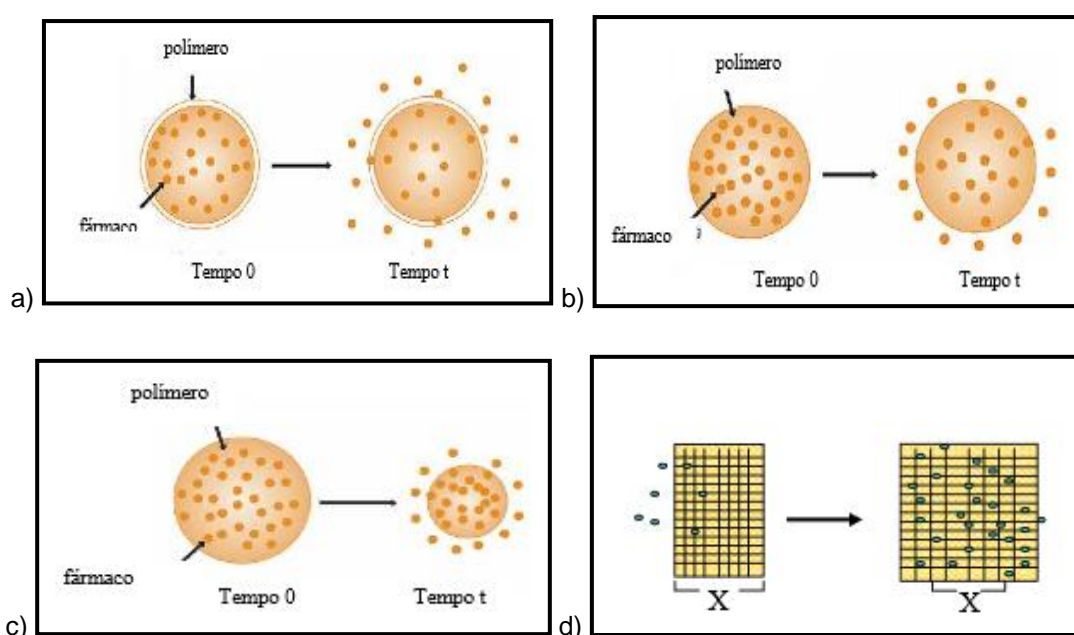


Figura 3.4: Mecanismos de liberação do fármaco: (a) difusão a partir de um sistema reservatório; (b) difusão a partir de um sistema matricial; (c) difusão controlada por erosão da matriz polimérica; (d) expansão da matriz polimérica. Fonte: CERCENÁ, 2008.

Os SLF podem ser classificados de acordo com o mecanismo que controla a liberação do agente terapêutico como mostrado na Tabela 3.1:

Tabela 3.1: Sistemas e mecanismos que controlam a liberação de fármacos. Fonte: DE AZEVEDO, 2003.

Tipo de Sistema		Mecanismo de Controle da Liberação
<i>Controlado por Difusão</i>	Sistema Reservatório	Difusão <i>através</i> de membrana ou filme poroso
	Sistema Matricial	Difusão a partir da matriz polimérica
<i>Controlado por Penetração de Água</i>	Sistema Osmótico	Transporte osmótico de água por membranas semipermeáveis
	Sistema por Expansão	Penetração de água no polímero no estado vítreo
<i>Controlado Quimicamente</i>	Sistema Monolítico	Qualquer erosão do polímero puro (erosão de superfície) ou combinação de erosão e difusão
	Sistema de Cadeia Pendente	Combinação de hidrólise de grupos pendentes e difusão de polímeros volumosos
<i>Sistemas Regulados</i>	Magnético ou Ultrassom	Aplicação externa de campo magnético ou dispositivo de ultrassom
	Químico	Uso de dessorção (liberação do agente ativo) competitiva ou reações enzimáticas

Existem dois tipos de liberação principais: no primeiro, o agente bioativo (fármaco) forma uma partícula interna (caroço) envolvida por uma barreira de difusão inerte. Esses sistemas incluem membranas, cápsulas, nanocápsulas e lipossomas. O segundo tipo é um sólido monolítico no qual o agente ativo foi disperso ou dissolvido em um polímero inerte e a difusão do fármaco é a etapa limitante, sendo a taxa de liberação dependente da escolha do polímero (DE AZEVEDO, 2003).

Os sistemas de liberação controlada mantêm a concentração do fármaco entre dois níveis por um tempo prolongado, utilizando-se de uma única dosagem. As características temporais dos efeitos dos fármacos e suas relações com a janela terapêutica (exemplo de dose única, administração oral) podem ser visualizadas na Figura 3.5, sendo a faixa terapêutica ideal aquela que mantém a sua concentração estável durante o prazo de tempo determinado pelo fabricante do fármaco (BRUTON, 2012).

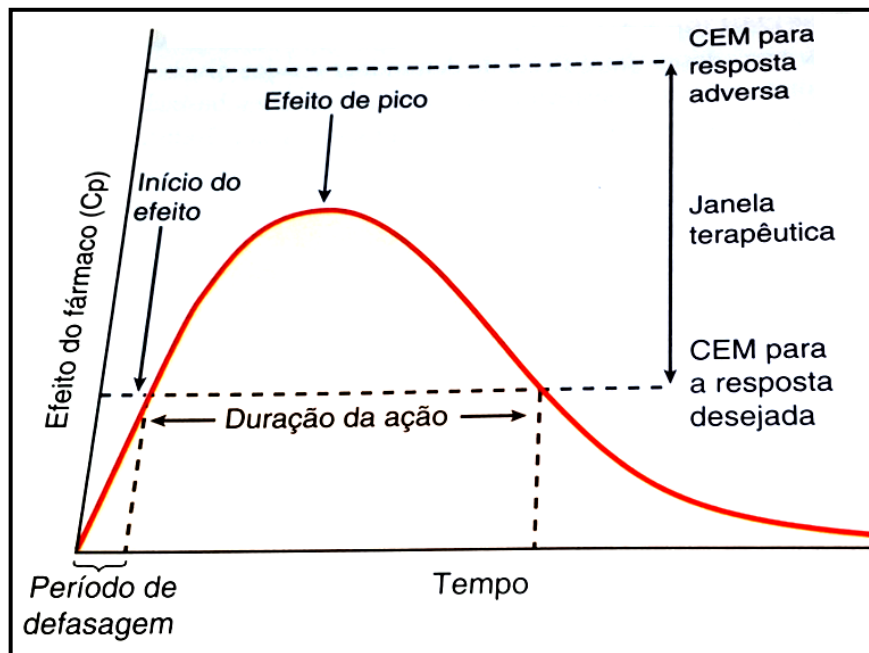


Figura 3.5: Características temporais dos efeitos dos fármacos e suas relações com a janela terapêutica, exemplo de dose única, administração oral. Fonte: BRUTON, 2012.

A administração por via subcutânea possui uma taxa constante e lenta para produzir um efeito prolongado do fármaco no organismo. A absorção na forma de *pellets*⁴ sólidos ocorre de modo lento ao longo de um período de semanas ou meses. Como exemplos, podem-se citar alguns hormônios para anticoncepcionais por dispositivos implantáveis, que podem assegurar a contracepção eficaz por três anos, em geral. Na Tabela 3.2 é possível observar as características das diversas vias comuns de administração dos fármacos: (BRUTON, 2012).

⁴ **Pellet:** pequena pílula ovoide ou em forma de bastão, contendo fármaco, implantado sobre a pele para liberação lenta de sua substância.

Tabela 3.2: Características das vias comuns de administração dos fármacos. Fonte: Adaptada de BRUTON, 2012.

Via	Padrão de Adsorção	de Utilidade Especial	Limitações e Precauções
<i>Ingestão Oral</i>	Variável, depende de diversos fatores (por exemplo, fluxo sanguíneo na superfície absorptiva)	Mais conveniente e econômica, geralmente mais segura	Depende da adesão do paciente A biodisponibilidade pode ser errática
<i>Intravenosa</i>	A absorção é evitada Os efeitos podem ser imediatos Adequada para grande volumes e substâncias irritantes, ou misturas complexas, desde que diluídas	Valiosa para uso em emergências Permite a titulação da dose Geralmente é necessária para proteínas de alta massa molar e fármacos peptídicos	Aumenta o risco de efeitos adversos Em geral, as soluções precisam ser injetadas lentamente Inadequada para soluções oleosas ou substâncias pouco solúveis
<i>Intramuscular</i>	Imediata, no caso das soluções aquosas Lenta a prolongada, no caso das preparações de depósito	Adequada para volumes moderados, veículos oleosos e algumas substâncias irritantes Adequada para a autoadministração (por exemplo, insulina)	Contraindicada durante o tratamento anticoagulante Pode interferir com a interpretação de alguns exames diagnósticos (por exemplo, creatinocinase)
<i>Subcutânea</i>	Imediata, no caso de soluções aquosas Lenta e prolongada, no caso das preparações de depósito	Adequada para algumas suspensões pouco solúveis e para instituição de implantes de liberação lenta	Inadequada para grandes volumes As substâncias irritantes podem causar dor ou necrose

Os fármacos enfrentam várias barreiras de transporte do seu local de introdução até o local de ação. As barreiras críticas incluem a rápida filtração nos rins e afastamento pelo SRE, particularmente para os fármacos que passam muito tempo na corrente sanguínea (SILVA, 2006; KATZUNG, 2007; BRUTON, 2012).

No tecido alvo, o fármaco precisa atravessar a membrana do plasma, e no interior da célula, deve se manter no ambiente áspero e ácido, dentro do qual os fármacos biomoleculares, tais como proteínas, podem ser inativados ou degradados. Estudos recentes mostram alguns aspectos particularmente promissores em que os nanomateriais como fármacos ou vacina podem auxiliar na transposição dessas barreiras, principalmente quando o sistema de liberação for por injeção ou implantes (SILVA, 2006; KATZUNG, 2007; BRUTON, 2012; HUBBELL & CHILKOTI, 2012).

Enquanto muitas abordagens para a entrega do fármaco (lipossomas, por exemplo) possuem como objetivo que o fármaco se direcione para uma determinada célula ou órgão, os sistemas de liberação controlada de fármaco são concebidos para continuamente entregar e manter a concentração do fármaco em um nível desejável no corpo (LANGER, 1983).

O sistema de liberação controlada utiliza uma injeção inicial do polímero como um controlador da velocidade do dispositivo para entregar o fármaco num padrão fixo, ou seja, pré-determinado por um período de tempo desejado. Na Figura 3.6, é possível observar, por exemplo, as taxas do hormônio levonorgestrel (utilizado como implante contraceptivo - Capronor®) com relação à injeção inicial e ao tempo de uso, sendo que, após 14 meses, o nível de levonorgestrel reduz pela metade (REEVES, 2011).

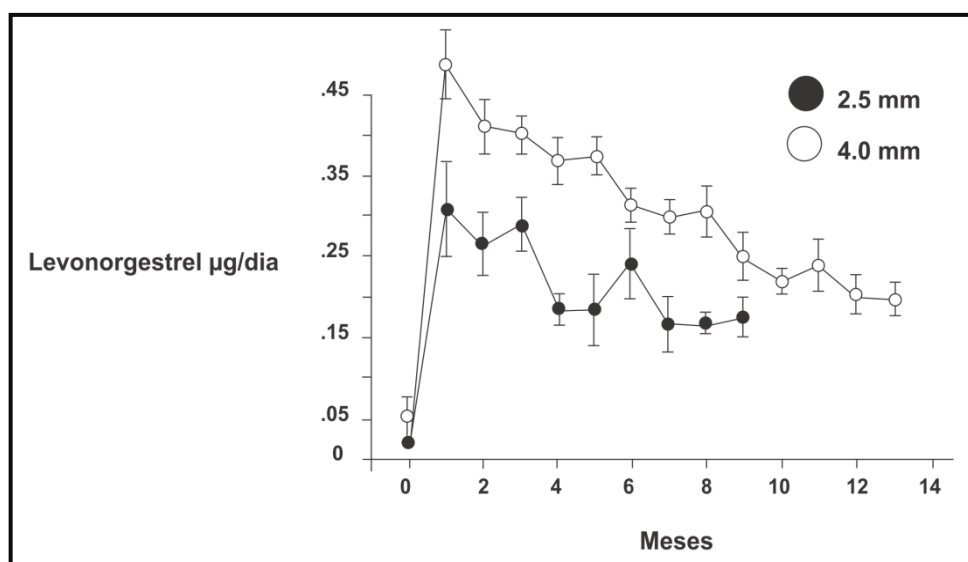


Figura 3.6: Taxa de liberação do hormônio levonorgestrel do implante Capronor® de diâmetros 2,5mm e 4,0mm. Fonte: DARNEY *et al.*, 1992.

A utilização de um sistema de distribuição de fármaco deverá resultar em uma concentração do fármaco uniforme em função do tempo com dosagens menores e, como consequência, com menos efeitos colaterais. Para que o fármaco seja absorvido pela parte desejada do corpo, vários eventos devem ocorrer. O fármaco deve ser liberado a partir do dispositivo, se difundindo a partir da superfície do dispositivo para o fluxo da corrente sanguínea e, eventualmente, transportado ao seu alvo. A velocidade da liberação inicial do fármaco foi dependente principalmente do material e tipo do dispositivo (LANGER, 1983).

Os esforços para prolongar a liberação do fármaco envolvem o uso de revestimentos, dissolvendo lentamente os complexos dos fármacos com sais ou resinas a partir da permutação iônica, suspensões, emulsões ou comprimidos. Esses sistemas prolongam o período de tempo antes da concentração do fármaco nos fluidos corporais cair abaixo do nível mínimo, mantendo desse modo a eficácia. No entanto, tais métodos que não permitem a liberação geralmente em longo prazo (mais que um dia) estão sujeitos a grandes variações nas taxas de liberação, como uma função, por exemplo, do pH do trato gastrointestinal (LANGER, 1983).

A tecnologia de liberação controlada de fármacos representa uma das fronteiras da ciência, a qual envolve diferentes aspectos multidisciplinares e pode contribuir muito para o avanço da saúde humana e animal. Os sistemas de liberação oferecem inúmeras vantagens quando comparados a outros de dosagem convencional (DÚRAN, 2003).

O objetivo no desenvolvimento de um sistema de liberação controlada é fazê-lo o mais próximo possível de um sistema ideal. O sistema ideal deve possuir as seguintes características (LANGER & PEPPAS, 1981, 2003; BRANNON-PEPPAS, 1992):

(i) geralmente exibem uma farmacocinética de ordem zero (indicando que a reação ocorre em uma velocidade constante, geralmente máxima, e não pode aumentar, mesmo com o aumento da concentração do fármaco);

(ii) ser inerte e compatível com o meio ambiente. Por conseguinte, deve ser biocompatível, não tóxico, não mutagênico, não cancerígeno, não teratogênico e não imunogênico;

(iii) ser confortável para o usuário e facilmente administrada;

(iv) possuir uma relação fármaco/polímero elevada;

(v) custo não elevado para o paciente.

Diversos modelos de sistemas foram desenvolvidos ao longo da última década com o propósito de alcançar a administração de medicamentos por via intravenosa controlada ou dirigida para tecidos específicos (GREF *et al.*, 1995).

As nanoesferas, nanocápsulas, lipossomas, micelas e outros nanoparticulados poliméricos (Figura 3.7) são frequentemente utilizados como transportadores para liberação de fármacos e agentes de diagnóstico. A modificação da superfície dessas estruturas poliméricas foi frequentemente utilizada para aumentar a longevidade e a estabilidade das nanopartículas e seus devidos fármacos na circulação sanguínea. As recentes pesquisas afirmam o uso crescente de diferentes polímeros para a modificação da superfície transportadora do fármaco. Os polímeros sintéticos e naturais protegem as partículas sólidas e suas interações com diferentes solutos. Nos últimos anos, os polímeros anfipáticos⁵ estão aumentando a sua participação no desenvolvimento de estruturas nanométricas. Esses polímeros demonstram a capacidade de serem facilmente adsorvidos⁶ sobre a superfície das partículas transportadoras devido às interações hidrofóbicas (TORCHILIN & TRUBETSKOY, 1995; VILLANOVA *et al.*, 2010, 2011).

⁵ **Moléculas anfipáticas**, ou anfifílicas, são moléculas que apresentam a característica de possuírem uma região hidrofílica (solúvel em meio aquoso), e uma região hidrofóbica (insolúvel em água, porém solúvel em lipídios e solventes orgânicos).

⁶ **Adsorção** é a adesão de moléculas de um fluido (o adsorvido) a uma superfície sólida (o adsorvente).

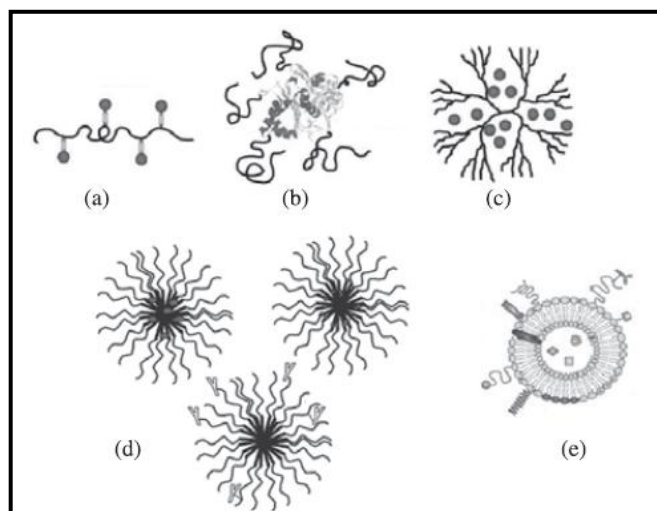


Figura 3.7: Sistemas nanoestruturados, micelares e vesiculares: a) conjugados fármaco-polímero; b) conjugados proteína-polímero; c) dendrímeros; d) micelas; e) lipossomos. Fonte: VILLANOVA *et al.*, 2010.

A maior parte dos sistemas de liberação de fármaco é detectada no organismo como corpos estranhos, através do reconhecimento pelas células fagocíticas, e rapidamente são retirados da circulação sanguínea. Essencialmente, os macrófagos localizados no SRE desempenham um papel crucial para fagocitar as partículas injetadas (GREF *et al.*, 1995).

Em alguns estudos sobre sistemas de liberação controlada da área oftalmológica, os biomateriais de testes são implantados em córneas de coelhos. Assim, a resposta do hospedeiro ao material de teste pode ser visualizada de forma não invasiva, sem cirurgia repetida do animal. Além disso, a córnea do coelho é um exemplo de teste sensível para estimulação inflamatória, pois a córnea é clara e avascular. As características inflamatórias (por exemplo: edema, infiltração de células brancas, neovascularização) podem ser facilmente discernidas (LOTTO *et al.*, 2004).

Os sistemas de liberação de fármaco de contraceptivos são utilizados para evitar a gravidez. Os métodos contraceptivos são classificados em cinco grupos: métodos comportamentais (tabelinha, temperatura basal, muco cervical e coito interrompido), métodos de barreira, dispositivo intrauterino, contracepção hormonal e contracepção cirúrgica (ligadura tubária e vasectomia). Os métodos de barreira possuem como mecanismo de ação a interposição de uma barreira mecânica ou química que impeça a ascensão de espermatozoides da vagina para o útero. São considerados métodos de barreira: preservativo masculino, preservativo feminino, diafragma, capuz cervical,

espermicida e esponja. Os dispositivos intrauterinos consistem em artefatos de polietileno, EVA, entre outros polímeros. Os dispositivos podem ser medicados com cobre ou progesterona. Dentre os dispositivos, podem-se citar: DIU de cobre e DIU hormonal com levonorgestrel (Mirena®) (DA SILVA FILHO *et al.*, 2012).

Os contraceptivos hormonais são constituídos de um estrogênio e uma progesterona (progestogênio) sintéticos, sendo que eventualmente o progestogênio isolado é utilizado. São confeccionados em formulações oral, vaginal, transdérmica, injetável e na forma de implantes. Dentre os modelos de contraceptivos hormonais, podem-se citar: pílula, minipílula, injetáveis mensais e trimestrais, adesivos transdérmicos, anel vaginal de silicone contendo etilestradiol e etonogestrel e implantes intradérmicos (PERALTA, *et al.*, 1995; DA SILVA FILHO *et al.*, 2012).

Nos últimos trinta anos muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de se desenvolver novos sistemas de liberação como alternativas à via oral. Ao se evitar esta via, haveria um benefício de se contornar a primeira passagem hepática, com a vantagem adicional de se proporcionar uma liberação mais constante dos esteroides, além de possibilitar o desenvolvimento de dispositivos que permitam a liberação lenta e mais prolongada do princípio ativo. Existem outros benefícios como, por exemplo, redução dos eventuais esquecimentos por parte da paciente, assim como as desistências, aumentando a diversidade de alternativas hoje disponíveis para a escolha (BEREK & GUANABARA, 2008; D'ARCANGUES & VOGELSONG, 2009; MELO, 2010).

A partir dos estudos em torno de novos modelos de contraceptivos hormonais que atendessem a demanda universal, diversos polímeros, biodegradáveis e não biodegradáveis, foram desenvolvidos para sistemas implantáveis. Os biodegradáveis mais utilizados são o PLA, o PCL e o PLGA. Já o PEVA, o PVA, os derivados da celulose, o silicone e polímeros acrílicos são materiais não biodegradáveis, cuja principal desvantagem é a necessidade de remoção posterior (ORÉFICE *et al.*, 2006).

O conceito básico de anticoncepção por implantes é que, mantendo-se uma liberação constante de um progestagênio, pode-se obter contracepção com doses diárias muito menores do que com a administração do mesmo esteroide por via oral ou injetável. Dentre as opções desenvolvidas para implantes contraceptivos, destacam-se: Norplant®, Norplant-II® ou Jadelle®, Sinoplant®, Uniplant®, Elmetrin®, Implanon®,

Nexplanon® e Capronor I, II e III®, sendo o último citado o único biodegradável (MELO, 2010; BEREK & GUANABARA, 2008).

Atualmente, todos os implantes intradérmicos para uso clínico utilizam progestógenos. O uso de contraceptivos derivados de somente estrogênio elevariam as taxas para a incidência de câncer de mama (em maiores taxas que os hormônios derivados de progestógenos). Devido a esse fato, os dois hormônios são frequentemente utilizados como combinados em contraceptivos com dosagens maiores para progestógenos e menores para estrogênios, prevenindo contra outros tipos de cânceres, como de ovário, do endométrio e do colo-retal. A desvantagem da utilização dos contraceptivos de somente progestógenos é a ausência da menstruação na maior parte dos casos, diferente das opções combinadas (estrogênio/progestógenos), que mantêm a menstruação durante o período de uso (BEREK & GUANABARA, 2008; MELO, 2010).

Atualmente, apenas três implantes estão autorizados a serem comercializados pelo *FDA*, dentre eles, o Norplant® (utilizado por 60 milhões de usuárias e disponível em 60 países), o Jadelle® ou Norplant II (disponível em 11 países) e o Implanon® (utilizado por 2,5 milhões de usuárias e disponível em mais de 40 países). O Uniplant®, Nesterone® e o Capronor®, este último o único biodegradável ainda não foram autorizados pelo *FDA* ou ainda estão em fase de desenvolvimento e/ou estudo. No Brasil, somente está liberado para uso pela ANVISA, o contraceptivo Implanon® (ASSOCIATION OF REPRODUCTIVE HEALTH PROFESSIONALS, 2013).

Os contraceptivos hormonais orais contendo apenas progestogênios (minipílula e implantes) promovem ciclos ovulatórios em 40% dos casos e, eventualmente, há maturação do folículo ovariano. O estrógeno utilizado atualmente nos contraceptivos hormonais é o etinilestradiol. Os progestágenos podem ser derivados da progesterona (17-hidroxiprogesterona), da testosterona (19-nortestosterona) ou da espironolactona. No caso da progesterona, diversos implantes e injetáveis utilizam como derivados o acetato de medroxiprogesterona, acetato de megestrol e acetofenido de di-hidroxiprogesterona. Para os derivados da testosterona, podem-se citar os estranos (noretisterona, noretinodrel, entre outros), os gonanos e o levonorgestrel, sendo o último o principal fármaco utilizado em implantes (PERALTA *et al.*, 1995; DA SILVA FILHO *et al.*, 2012).

Os progestágenos são esteroides que podem ser sintéticos ou naturais. A progesterona ($C_{21}H_{30}O_2$) é o único progestágeno natural. Os progestágenos sintéticos

tentam mimetizar o efeito da progesterona, e são chamados de progestinas. Cada progestina apresenta diferentes propriedades farmacológicas, dependendo da molécula da qual foi originada, usualmente testosterona e progesterona. Pequenas mudanças estruturais nas moléculas originais levam a diferenças consideráveis na atividade de cada uma das progestinas (KATZUNG, 2007; VIGO *et al.*, 2011; BRUTON, 2012; LEIMANN *et al.*, 2015).

3.4 Nanoestruturas para liberação controlada

Existem diversos métodos de preparação de nanopartículas e nanoesferas para sistemas de liberação controlada na área médica a partir de polímeros, sendo os mais conhecidos os métodos: de polimerização em emulsão, de polimerização interfacial e de precipitação do polímero pré-formado. Nesses processos, problemas de estabilidade química do polímero ou das demais matérias-primas, incluindo o fármaco, podem ocorrer. A consequência de uma estabilidade físico-química limitada, em função do tempo, constitui um obstáculo para a aplicabilidade industrial das suspensões aquosas de nanopartículas. A sublimação (liofilização) tem sido bastante utilizada para a desidratação de sistemas coloidais, principalmente lipossomas e nanocápsulas, empregando-se um crioprotetor ou lioprotetor, geralmente um carboidrato, para evitar a agregação das partículas durante o congelamento das suspensões. Neste sentido, o interesse pelo desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas de nanopartículas é um ponto de convergência das pesquisas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2002).

Diversos autores têm estudado transportadores coloidais na área oftalmológica, a fim de melhorar a biodisponibilidade de fármacos oculares. Os fármacos pilocarpina, sulfato de amicacina, indometacina, betaxolol e carteolol associado com nanoesferas ou nanocápsulas poliméricas têm mostrado resultados promissores. A estabilidade da poli(ϵ -caprolactona) em nanoestruturas são estudadas por apenas alguns autores. A influência de tensoativos, da temperatura, do pH e do diâmetro médio da partícula também são analisados para a fabricação das estruturas (MASSON *et al.*, 1996, 1997).

Em um estudo de SCHAFFAZICK *et al.* (2002), o fármaco diclofenaco foi associado a nanocápsulas e a nanoesferas, preparadas pelo método de nanoprecipitação, utilizando PCL ou Eudragit S90® como polímeros. Foi verificada uma diminuição do

pH e do teor de diclofenaco em função do tempo de armazenamento nas nanoestruturas.

Em sistemas contraceptivos, a aplicação de hormônios como o levonorgestrel apresentou eficácia em microesferas de poli(ϵ -caprolactona). Em um estudo de DHANARAJU *et al.* (2003, 2006) e WANG *et al.* (2005), os hormônios levonorgestrel e etinil estradiol foram encapsulados em microesferas de poli(ϵ -caprolactona) utilizando um método duplo de emulsão w/o/w (YANG *et al.*, 2000). As microesferas preparadas foram lisas e esféricas, com um tamanho médio de 8-25 μ m. Em testes realizados *in vitro*, o perfil de liberação das microesferas mostrou inicialmente uma tendência para o aumento na primeira semana, e depois disso a liberação foi mantida estável. No final da sétima semana, nas amostras contendo levonorgestrel e estrogênio de microesferas de PCL, houve uma diminuição entre 30-40% do perfil de liberação. Um estudo *in vitro* da degradação demonstra que na 20^a semana as microesferas ainda liberavam o fármaco e mantinham sua integridade da superfície, mas com uma diminuição gradativa do percentual de liberação.

De acordo com DHANARAJU *et al.* (2003, 2006), as microesferas de PCL produzidas em um estudo demonstraram uma liberação *in vivo* com perfil trifásico com um efeito de explosão inicial, devido à liberação do esteroide absorvido na superfície das microesferas; uma segunda fase de liberação sustentada devido à difusão a partir de esteroides nos poros ou nos canais formados na matriz do polímero, e a terceira fase de biodegradação do polímero.

Segundo WANG *et al.* (2005), o exame histológico com microesferas de PCL injetado via intramuscular em músculo da coxa de um rato demonstraram uma reação inflamatória mínima. Um método denominado emulsificação-evaporação do solvente foi uma técnica conveniente e eficaz para incorporar fármacos solúveis ou insolúveis em água para microesferas de polímero. Os fármacos menos solúveis apresentaram maior afinidade com PCL, devido a sua hidrofobicidade.

Atualmente, os estudos de sistemas de liberação de fármaco para humanos do polímero PCL incorporando o hormônio levonorgestrel ou progesterona se restringe a sistemas de microesferas. OLIVEIRA *et al.* (2013) desenvolveram um sistema de nanofibras de PLA e hormônio progesterona pelo método de fiação por sopro em solução (SBS), sendo que os resultados do estudo confirmaram a miscibilidade da

progesterona e do polímero. Este método apresentou grande potencial para utilização de SLF para animais de gado, no caso.

O método de eletrofiação oferece grande flexibilidade na produção de materiais para sistemas de liberação do fármaco. A fabricação de sistemas na área médica possui um vasto e recente campo de pesquisa por métodos de eletrofiação. Em alguns modelos de equipamento, é possível trabalhar na produção de nanofibras e nanocápsulas no mesmo equipamento, sendo possível ajustar os espaços internos e as configurações para a obtenção de diversos produtos (AGARWAL *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2014; COSTA, *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2015).

Na técnica de eletrofiação, um campo elétrico gera uma tensão na solução carregada na saída do capilar (ou seringa, no caso), que atua como um dos eletrodos. O jato é expelido em formato específico chamado de cone de Taylor⁷, ocasionando a deformação das “contas⁸”. Ou seja, a tensão superficial no cone é vencida impulsionando o fluido em direção do alvo aterrado. O solvente é perdido por evaporação e o polímero solidifica ao sair da agulha e depositar até o alvo (uma manta é coletada do coletor), ocorrendo um movimento de instabilidade aerodinâmica chamado de chicoteamento (*whipping*). A eletrofiação também pode ser utilizada na função coaxial, com duas soluções diferentes auxiliando no processo das nanofibras. A Figura 3.8 representa alguns dos modelos de eletrofiação no mercado (FERREIRA *et al.*, 2014; FORMHALS, 1934; SILL & VON RECUM, 2008; AGARWAL *et al.*, 2008; PORTELA, 2010; SCHUEREN *et al.*, 2011).

⁷ **Cone de Taylor:** distorção do menisco de um líquido em um capilar na presença de um campo elétrico.

⁸ Do inglês *beads*

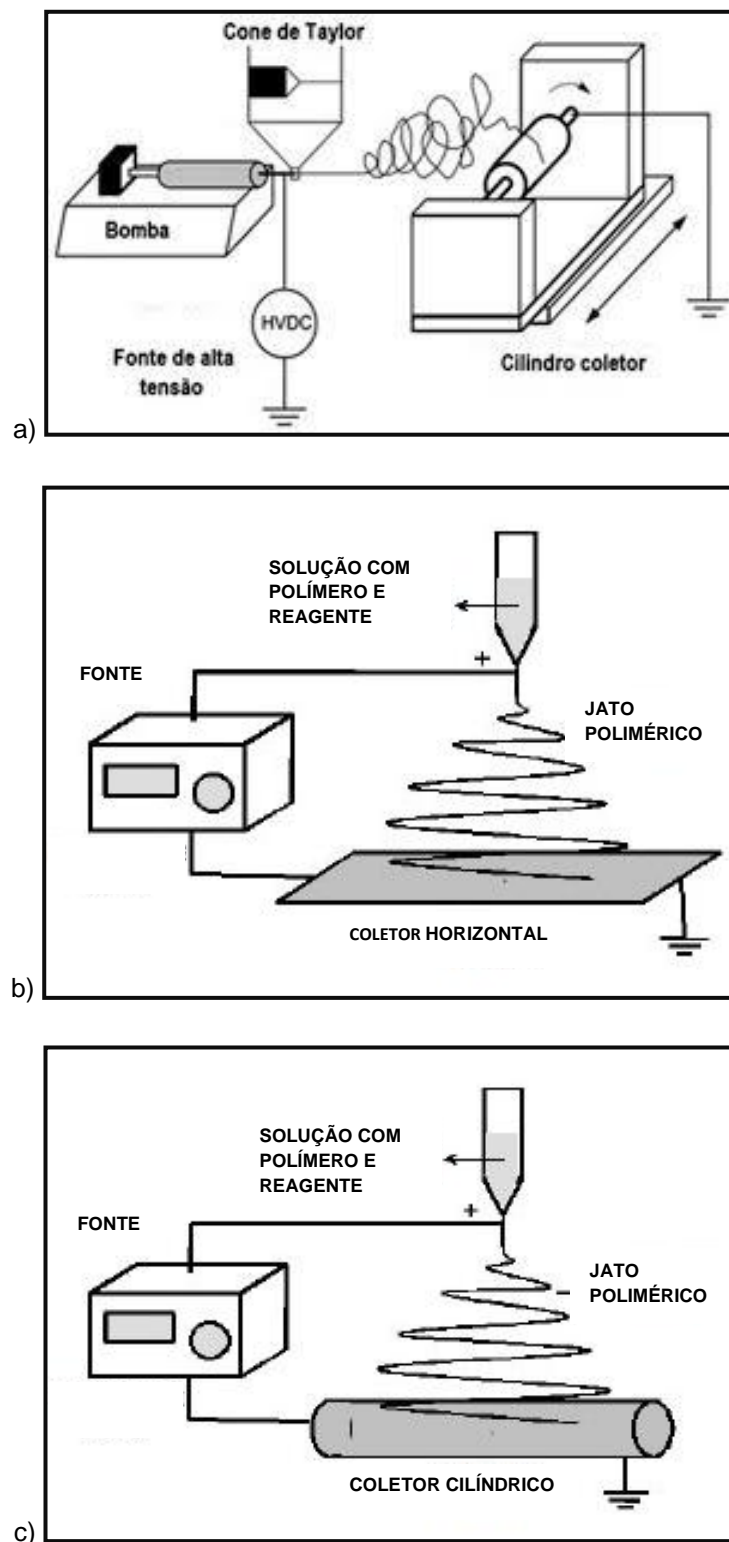


Figura 3.8: Ilustrações com processos de eletrofiação: a) eletrofiação por bomba e com coletor cilíndrico, b) eletrofiação vertical com coletor horizontal e c) eletrofiação com coletor cilíndrico.

Fonte: BIZARRIA *et al.*, 2014.

A eletrofiação e a eletropulverização são dois métodos muito semelhantes que diferem principalmente na estrutura dos materiais produzidos. Os produtos finais de eletrofiação são as nanofibras, enquanto no caso da eletropulverização são corpos esféricos - nanopartículas depositadas sobre o material de suporte. Na eletropulverização a concentração é suficientemente baixa para desestabilizar o jato carregado que em seguida reparte em pequenas gotículas esféricas que se solidificam durante o percurso e se depositam no coletor. Nesse caso, o filme formado consiste em pequenas gotículas em vez de fibras. O método de eletropulverização pode ser explorado de diversas maneiras para incorporação do fármaco, dentre eles o revestimento com polímero antes ou após o processo ou o encapsulamento do fármaco pelo método coaxial (dois polímeros, formando a casca e o núcleo), para a produção de nanocápsulas. Ambos os métodos são defendidos por diversos pesquisadores, pois, provavelmente, os solventes são evaporados no processo e não estão presentes no produto final. Devido a esta possibilidade de biocompatibilidade, estudos indicam estes tipos de processos em diversos tipos de liberação de fármacos, dentre eles antibióticos e medicamentos anticâncer (BOGNITZKI, *et al.*, 2001; RAMAKRISHNA *et al.*, 2006; SILL & VON RECUM, 2008; AGARWAL *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2010; DOERGENS, *et al.*, 2015; HAIDER, *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2015).

Durante os processos de eletrofiação, os monitoramentos das condições tendem a evitar as variações dos diâmetros das nanoestruturas, da distribuição, da eficiência de encapsulamento, da viscosidade, da condutividade elétrica e liberação do fármaco *in vitro*. Devem ser observados constantemente a voltagem, a distância do coletor a ponta da agulha, o calibre da agulha, a taxa de fluxo, o tipo de polímero e do fármaco, o solvente e a razão orgânico/aquosa. Na Figura 3.9 é possível observar as nanofibras saindo da agulha a partir da eletrofiação (BOCK *et al.*, 2010; SCHUEREN *et al.*, 2011; DOERGENS, *et al.*, 2015; HAIDER, *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2015).



Figura 3.9: Fotografia das nanofibras saindo da agulha durante o método de eletrospinning.

Atualmente existem diversos estudos de incorporação de tipos de fármacos em polímeros biodegradáveis ou não biodegradáveis a partir da técnica de eletrospinning. Em um estudo envolvendo um sistema de PLA, PLGA e PCL incorporado do medicamento Captopril®, testes de FTIR indicaram que existiu uma ligação de hidrogênio entre as moléculas do fármaco e os polímeros após a eletrospinning (ZHANG *et al.*, 2012).

Em um estudo de KIM & PARK (2006), examinou-se a liberação controlada de um antibiótico hidrofílico (Mefoxin®) por processo de eletrospinning envolvendo os polímeros PLGA e PLA. KIM & PARK (2006) misturaram o polímero e o antibiótico antes da eletrospinning e apesar de alterações morfológicas da fibra, a estrutura do Mefoxin® permaneceu inalterada, demonstrando que o antibiótico manteve a sua bioatividade.

Em outro estudo recente, nanofibras de levofloxacina com quitosana e PCL foram preparadas utilizando a eletrospinning coaxial para liberação controlada do antibiótico. O sistema produzido exibiu características morfológicas satisfatórias, confirmando que as nanofibras impregnadas com levofloxacina podem ser utilizadas para a liberação de antibióticos depois de operações cirúrgicas (PARK, *et al.*, 2012).

Os hormônios sexuais como, por exemplo, β -estradiol e outros fármacos hormonais também têm sido encapsulados com a utilização da técnica de eletropulverização. O β -estradiol é um fármaco contraceptivo hipocolesterolêmico de baixa massa molar que já foi encapsulada em nanopartículas de PCL (ENAYATI *et al.*, 2010).

Os sistemas de liberação controlada na área de implantes contraceptivos representam um desenvolvimento relativamente novo. Os estudos demonstram a importância da preparação de sistemas de liberação de fármaco por meio de outros métodos, como a eletrofiação, para a manutenção da dose terapêutica em níveis seguros, a diminuição dos picos e valores plasmáticos, além de conferir proteção e economia de fármaco, sem acometer efeitos colaterais no usuário, sendo esses os maiores problemas encontrados nos sistemas atuais de liberação de fármaco com levonorgestrel (KREUTER, 2001; SILL & VON RECUM, 2008; AGARWAL *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2015).

Os parâmetros de controle de processo como a tensão superficial, massa molar do polímero, concentração, viscosidade, volatilidade e condutividade e as características do solvente possuem uma importante influência no processo de eletrofiação e na morfologia das nanofibras e nanocápsulas obtidas (BOGNITZKI, *et al.*, 2001; RAMAKRISHNA *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2015).

Para ocorrer a formação das nanofibras, é necessária a presença de um solvente com alta pressão de vapor. Os sistemas que utilizam água como solvente também funcionam. Contudo, se a pressão de vapor não for suficientemente alta, pode haver a formação excessiva de “contas”, parecendo o formato de bolhas, sendo essas gotículas presas nas fibras (BOGNITZKI, *et al.*, 2001; RAMAKRISHNA *et al.*, 2006; SCHUEREN *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2015).

No caso da eletrofiação, a tensão superficial desempenha um papel importante na formação de “contas” ao longo da extensão da fibra. A viscosidade da solução e suas propriedades elétricas determinam a extensão do alongamento do jato fibroso que por sua vez tem influência sobre o diâmetro das fibras resultantes. Contudo, os efeitos das propriedades da solução são difíceis de isolar, uma vez que a alteração de um parâmetro pode afetar as outras propriedades da solução. Por exemplo, a variação da concentração afetará a tensão. São necessários solventes orgânicos para dissolver os polímeros. Alguns solventes utilizados são: acetona, clorofórmio, metanol, etanol, ácido acético, ácido fórmico, acetonitrila, 1,2 dicloroetano, e N,N dimetilformamida, os

quais podem ser utilizados sozinhos ou em combinação (BOGNITZKI, *et al.*, 2001; HSU & SHIVKUMAR, 2004; RAMAKRISHNA *et al.*, 2006; PORTELA, 2010; BOCK *et al.*, 2010).

A propriedade da solução depende não só da natureza do fluido, mas também do meio envolvente e da temperatura do fluido. Em geral, a tensão superficial diminui com a temperatura, já que as forças de coesão diminuem ao aumentar a agitação térmica. A influência do meio exterior foi compreendida, já que as moléculas do meio exercem ações contrárias sobre as moléculas situadas na superfície do líquido. Além disso, uma elevada tensão superficial da solução inibe o processo de eletrofiação, quer devido à instabilidade do jato ou à pulverização de micro gotas direcionadas ao coletor (BOGNITZKI, *et al.*, 2001; RAMAKRISHNA *et al.*, 2006; PORTELA, 2010; SOUZA *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2015).

A influência da massa molar nas estruturas produzidas pela eletrofiação também deve ser investigada. Os resultados provam que a massa molar de um polímero tem efeito significativo nas propriedades reológicas (viscosidade e elasticidade da solução. A concentração do polímero influencia tanto a viscosidade como a tensão superficial da solução, sendo esses parâmetros muito importantes no processo. Em uma solução muito diluída, a fibra de polímero irá dividir-se em gotas antes de alcançar o coletor, devido aos efeitos da tensão superficial. No entanto, se a solução for muito concentrada, as fibras não serão formadas devido à elevada viscosidade, dificultando o controle do fluxo da solução (BOGNITZKI, *et al.*, 2001; RAMAKRISHNA *et al.*, 2006; PORTELA, 2010; SOUZA *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2015).

A variação da concentração da solução (dentro de um intervalo) tem consequências na morfologia das fibras. Para baixa concentração revela fibras irregulares, com superfícies onduladas e grandes variações de diâmetro ao longo de uma única fibra (WANG *et al.*, 2009;).

O fluxo da solução determina a quantidade de solução disponível para a eletrofiação. Em geral, o aumento do fluxo da solução favorece o aumento do diâmetro da fibra, muito embora exista um limite do diâmetro para o sucessivo aumento do fluxo. Fluxos elevados também podem originar fibras com “contas”, devido à elevada quantidade de solvente que deve evaporar antes de alcançar o coletor. A temperatura da solução possui o duplo efeito de aumentar a taxa de evaporação do solvente e reduzir a viscosidade da solução. Nos casos em que as substâncias biológicas, como enzimas e

proteínas são adicionadas à solução para eletrofiação, o uso de elevada temperatura pode causar a eliminação da funcionalidade da substância. A posição da agulha em uma montagem de eletrofiação é utilizada em diferentes perspectivas para sustentar a solução e ajustar a montagem em função das características da solução polimérica, sendo que o fluido polimérico cai por ação da gravidade. O diâmetro interno da agulha influencia o volume do material submetido ao campo elétrico. A redução no diâmetro interno da agulha constitui uma forma de reduzir o diâmetro das nanofibras. A distância entre a extremidade da agulha e o coletor tem sido estudada por diversos autores com o objetivo de controlar as propriedades das fibras, dado que a distância tem influência na intensidade do campo elétrico e no tempo de voo das fibras. Em alguns casos, as variações da distância não interferem no diâmetro das fibras. No entanto, quando a agulha se encontra muito próxima do coletor, podem ser observados formatos de “contas” na constituição das nanofibras (BOGNITZKI, *et al.*, 2001; RAMAKRISHNA *et al.*, 2006; PORTELA, 2010; SOUZA *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2015).

A temperatura no espaço de processamento interfere diretamente na evaporação do solvente e na viscosidade do fluido. O diâmetro médio das nanofibras é alterado em consequência do efeito da temperatura sobre esses dois parâmetros. A umidade relativa do ar no ambiente de processamento constitui outro parâmetro de controle do processo. Em umidades elevadas (acima de 70%) foi notória a condensação da água na superfície das fibras, quando processadas em temperatura ambiente. Como resultado, verifica-se a influência direta na morfologia das fibras, em especial nos polímeros dissolvidos em solventes voláteis. Uma grande área superficial leva a uma rápida liberação uma vez que as partículas são mais facilmente penetradas por fluidos. O tamanho por si só não controla o perfil de liberação, mas está relacionado com a seleção polímero/fármaco/solvente e com os parâmetros de processamento que são utilizados em cada caso. Portanto, o tamanho e resultado de outras variáveis que possuem um efeito interdependente necessitam ser apropriadamente correlacionados para controlar a cinética de liberação (BOGNITZKI, *et al.*, 2001; RAMAKRISHNA *et al.*, 2006; PORTELA, 2010; BOCK *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2015).

O objetivo deste estudo foi sintetizar o polímero PCL com o solvente ácido acético para o processamento de nanofibras pelo método de eletrofiação e a incorporação do hormônio progesterona no processo de produção. O hormônio levonorgestrel é bastante utilizado em várias pesquisas, mas devido ao seu alto custo o hormônio foi

substituído pela progesterona sintética (menor custo) para o processamento das nanofibras. Os dois são progesteronas e servem ao propósito de investigar a incorporação do hormônio do sistema desenvolvido, uma vez que a eficácia do medicamento não era um fator importante no decorrer dos testes. Diversas referências utilizam dois solventes, o ácido acético e o ácido fórmico, para a produção das nanofibras, como por exemplo, os estudos realizados por SCHUEREN *et al.* (2011). Com a proposta de diminuir os efeitos de toxicidade durante o processo de obtenção das nanofibras e nas amostras após o processo, neste trabalho foram realizados estudos com uso do solvente ácido acético com alterações de parâmetros para melhorar a qualidade das nanofibras. Os principais parâmetros estudados foram variações nas concentrações do polímero com relação ao solvente, velocidade de injeção do polímero e na voltagem do equipamento de eletrospinação.

4 METOLOGIA

4.1 Preparação da solução de PCL e ácido acético e eletrofiação

Na primeira etapa do estudo, foram utilizados o ácido acético glacial 99% (Sigma-Aldrich Chemical) e PCL foi o de massa molar 80.000 a 90.000g.mol⁻¹ (Sigma-Aldrich Chemical). Na segunda etapa do estudo, além dos materiais anterior, foi utilizado o hormônio Progesterona Sintético 99% (Sigma-Aldrich Chemical). Foram utilizados o agitador magnético para a preparação da solução e o equipamento de eletrofiação fabricado pela INSTOR (Porto Alegre, Brasil) com fonte de alimentação de alta tensão (Gamma High Voltage Research, USA) para a obtenção de nanofibras. Para obtenção de algumas amostras foram alteradas as temperaturas de preparação da solução ou de secagem das amostras obtidas, para posterior análise sobre o efeito nas nanofibras. Em uma amostra foi utilizado a temperatura de 5°C durante a agitação da solução e, em outra amostra, após a eletrofiação, foi utilizado a temperatura de 60°C para secagem da amostra. Na Figura 4.1 é representado esquematicamente todo o processo de obtenção das amostras de nanofibras com PCL puro.

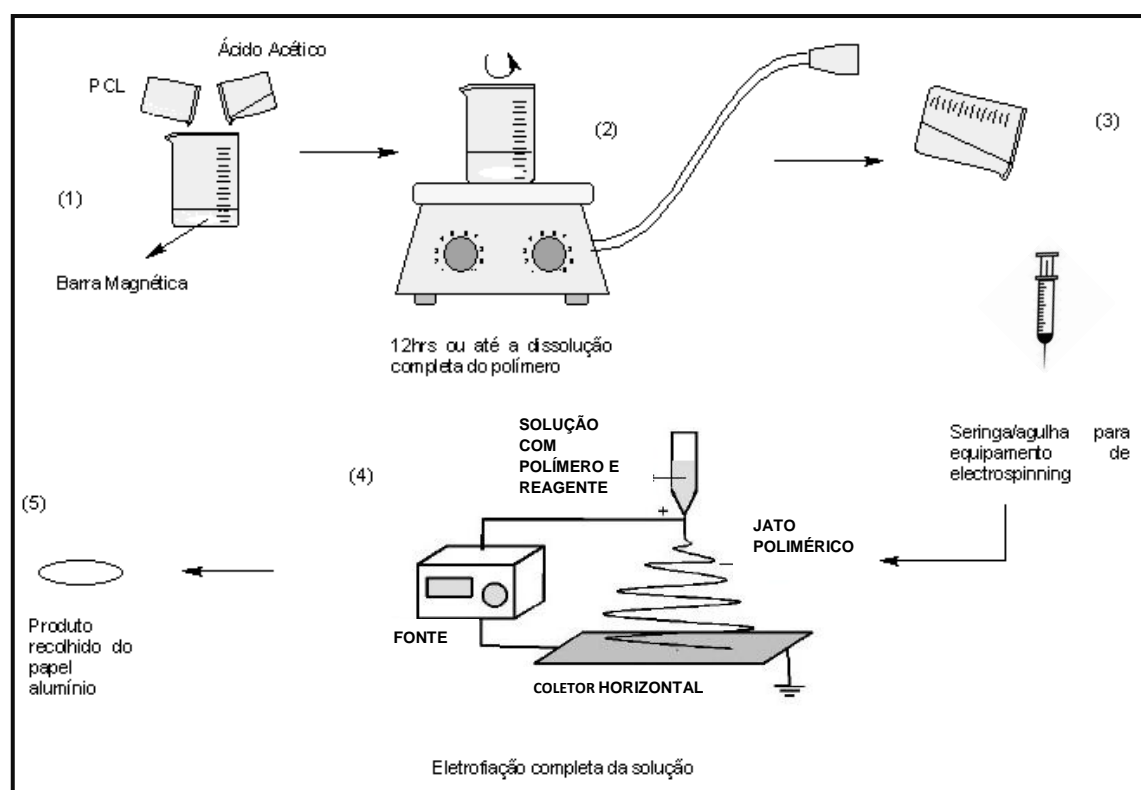


Figura 4.1: Representação esquemática da síntese das nanofibras.

Na Figura 4.2a foi ilustrada a preparação da solução com a adição da progesterona antes da agitação da solução, sendo esta etapa realizada posteriormente à análise dos resultados da eletrofiação do PCL puro. Na Figura 4.2b foi representado esquematicamente o processo de obtenção das amostras com a adição da progesterona após o processo de eletrofiação, com a aspersão do hormônio progesterona na amostra produzida, sendo essa uma alternativa proposta para avaliar se a estrutura da nanofibra seria mantida com essa forma de adição do hormônio.

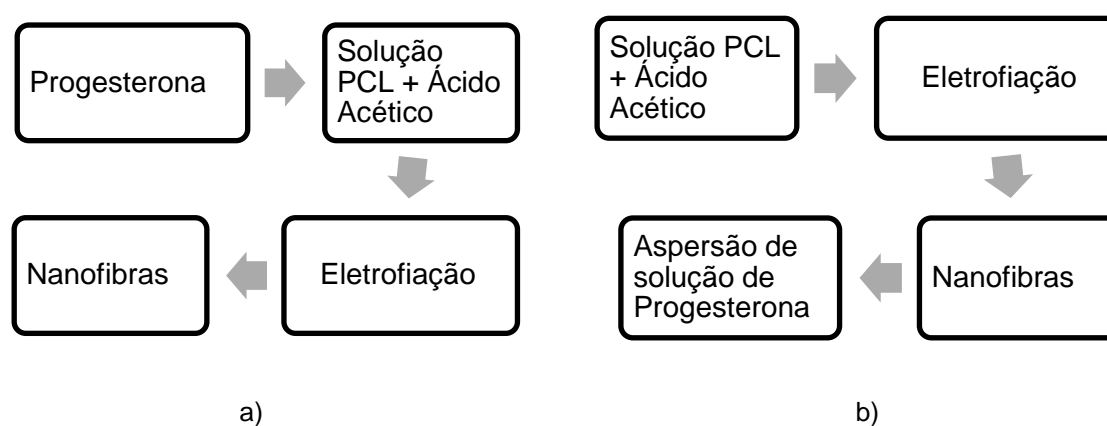


Figura 4.2: Fluxograma representando as formas de incorporação do hormônio Progesterona nas nanofibras produzidas: a) durante preparação da solução a ser utilizada na eletrofiação e b) aspersão sobre as nanofibras produzidas.

As concentrações, velocidades de injeção e voltagens utilizadas tiveram como base o estudo realizado por SCHUEREN (2011) com ácido acético e ácido fórmico, e as revisões de RAMAKRISHNA *et al.* (2006), AGARWAL *et al.*, (2008), BHARDWAJ & KUNDU (2010), PORTELA (2010), SCHUEREN *et al.* (2011), COSTA *et al.* (2012), PARK *et al.* (2012), KAI *et al.* (2014). Na etapa 1, foram preparadas soluções de diferentes concentrações de PCL com relação ao ácido acético de 15%*m/m*, 20%*m/m*, 25%*m/m* e 30%*m/m*. As diversas proporções de PCL foram agitadas com o ácido acético durante 12hrs ou até a dissolução completa do polímero, em temperatura ambiente (entre 20°C-22°C). Após, foi realizado o processamento da solução no equipamento de eletrofiação. Da solução anteriormente preparada, 5mL foram colocados em uma seringa com agulha de 25mm x 0,8mm. O coletor utilizado na eletrofiação foi o horizontal. No equipamento, primeiramente foi colocado um papel alumínio no coletor para a deposição das nanofibras sendo retirado após o processo. O equipamento de eletrofiação foi ajustado nas velocidades de injeção 4mL/hr e 7mL/hr. As voltagens utilizadas foram 15kV, 20kV e 25kV. Na etapa 2, em que se

adicionou a progesterona ao sistema, foi considerado que a amostra com melhores características morfológicas e estruturais foi a de concentração 20%*m/m* de PCL, com a velocidade de injeção de 4mL/hr e a voltagem de 20kV. A partir destes parâmetros, objetivou-se neste estudo sintetizar PCL com o solvente ácido acético, adicionando o hormônio progesterona para o processamento de nanofibras antes do processo de eletrofição. As concentrações de Progesterona em relação ao PCL utilizadas nesta etapa foram 9%*m/m*, 16%*m/m*, 23%*m/m*, 28%*m/m* e 33%*m/m*, considerando que o ácido acético é evaporado no processo de eletrofição, portanto, as concentrações estão baseadas nas quantidades de progesterona e do PCL, apenas. Foi realizada uma aspersão de uma solução de progesterona para análise do comportamento da nanofibra após o processo de eletrofição. A escolha das concentrações de progesterona foi baseada nos sistemas de implantes contraceptivos atuais e nos estudos de DHANARAJU *et al.* (2003, 2006). Em ambas as etapas, foram produzidas amostras no formato de manta com diâmetro de 90mm e peso total de 1g. Na Tabela 4.1, pode-se observar os parâmetros que foram mantidos na produção das amostras.

Tabela 4.1: Parâmetros que foram utilizados para a produção das nanofibras.

Parâmetros	
Temperatura ambiente	20°C-22°C
Tempo médio de eletrofição	4hrs
Umidade Relativa do ar	55% - 59% (Controle a partir da utilização de Desumidificador de Ar)
Tipo de Coletor	Coletor horizontal 90mm
Quantidade de solução em cada seringa	5,0ml
Distância do bico ejetor até o coletor	150mm
Velocidade do coletor	1000rpm-1500rpm

4.2 Caracterização estrutural das amostras

Análise Macroscópica

As amostras foram analisadas macroscopicamente levando-se em consideração a produção de um produto no coletor, seu aspecto com relação à opacidade ou translucidez e se era possível ou não de ser retirada do papel alumínio.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise morfológica dos filmes foi realizada em um microscópio eletrônico de varredura (MEV) da marca JEOL modelo JSM 35C sob aumentos de 1000x, 10000x a 16000x.

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

A técnica de FTIR foi utilizada para caracterizar os grupos funcionais presentes nas amostras em estudo. Foi utilizado o equipamento Nicolet 6700, da Thermo Scientific para realização das análises. Os espectros foram coletados pela técnica ATR (Reflexão Total Atenuada) na faixa do infravermelho médio, foram feitas 64 varreduras entre 650 e 4000cm^{-1} , com resolução de 4cm^{-1} e intervalos de 2cm^{-1} e as curvas foram normalizadas.

Difração de raios-X (DRX)

A análise por DRX das nanofibras obtidas foi realizada em equipamento SHIMADZU XRD 7000 que se procedeu variando de $3,00^\circ$ a $90,00^\circ$, com passo de $0,06$. A partir das áreas do difratograma foram identificadas as frações cristalina (A_C) e amorfa (A_A).

Ensaio de Absorção de Água

Para o do ensaio de absorção de água, a amostra produzida pela eletrofiliação foi pesada, transferida para um Erlenmeyer onde receberam adição de um volume 50mL de solução de PBS com pH4 e pH7 (Hanna Instruments Brasil). As amostras ficaram, então, expostas as soluções durante 120 minutos e a absorção de água foi medida em intervalos regulares (30, 60, 90 e 120 minutos) à temperatura ambiente (entre 20°C - 22°C). Após esse tempo, as amostras foram retiradas da vidraria e adequadamente pesadas.

4.3 Caracterização *in vitro* da amostra

Ensaio de Citotoxicidade

As amostras de nanofibras produzidas com solução com concentração de 20%*m/m* foram colocadas em lamínulas de vidro 0,17mm de espessura (Fisherbrand/Microscope Cover Glass). Essas mantas foram esterilizadas com lâmpada Ultra Violeta (U.V) por trinta minutos de cada lado da lamínula. Após esse

período as lamínulas com as mantas foram colocadas em placas de 24 wells. Foram colocados 500µL de meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium/ GIBCO, N.Y, USA) em cada poço e foram semeadas 1×10^5 células CHO-K1 (células da linhagem de ovário de hamster chinês). As células foram mantidas por 8 horas com meio DMEM sem soro em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. Esse procedimento foi realizado para as células serem normalizadas em relação ao crescimento e proliferação celular. Após esse período o meio foi aspirado e trocado por DMEM com 10% de soro fetal bovino. Foram utilizados como controle positivo PBS (2X) e como controle negativo lamínulas de vidro de 0,17mm de espessura. Após 48 horas todo o meio foi aspirado e foram colocados 210µL de meio de cultura com soro em cada poço. Foram acrescentados 170µL de MTT (5mg/mL; Sigma-Aldrich, USA) em cada poço e as placas incubadas por 4 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida foram colocados 210µL de solução de isopropanol/4%HCL. Após 10 minutos foram retirados 100µL de cada poço e transferidos para placa plana de 96 poços e a quantificação foi feita em espectrofotômetro (ADAP 1.6, Anthos Labtec Instruments) com filtro de 595nm. Os experimentos foram realizados com n=3 e os dados analisados com a ajuda do programa PRISM (Test One-way- Anova Bonferroni/GraphPad, San Diego, CA) (ROGERO *et al.*, 2003; CARVALHO, 2013; ISO 10993-5).

Ensaio de Degradação

A variação da massa (medida em balança analítica) é comumente utilizada na caracterização da degradação de polímeros biodegradáveis. A degradação *in vitro* foi realizada com a imersão do material em solução de PBS com o pH7,4 (considerando como base o pH do plasma/circulação sanguínea, entre 7,35 a 7,45). O ensaio foi realizado com base nos estudos realizados por BARBANTI *et al.* (2008) e de acordo com a norma ASTM F1635-04a. O acondicionamento das amostras foi realizado em tubos Falcon esterilizados de 50mL mantidos em banho a 37°C ± 0,5°C, com o volume de 30mL de PBS. Os períodos utilizados foram de 5, 7 e 11 semanas para amostras obtidas de solução com concentração 20%*m/m* de PCL e amostras contendo concentrações 16%*m/m* e 23%*m/m* de progesterona, que foram selecionadas com melhores resultados após analisadas por MEV. Foi realizada a medição da massa por balança analítica da amostra após ela ser secada em um dessecador à vácuo, e em seguida, a analisadas por MEV para avaliar a morfologia delas.

Ensaio de Liberação Controlada do Fármaco

A partir das metodologias utilizadas por LEONG & LANGER (1987), LANGER & PEPPAS (2003), SUN *et al.* (2006) WANG *et al.* (2005, 2009), ZHANG *et al.* (2012) e LEIMANN *et al.* (2015), foi proposto o ensaio de liberação do fármaco progesterona. Nos estudos mencionados, a curva de calibração era realizada com a progesterona em meio ácido. Neste trabalho foi proposto o estudo de degradação e levantamento da curva de calibração em meio levemente alcalino, sendo no caso o pH7,4 (considerando como base o pH do plasma, entre 7,35 a 7,45), pois o pH ácido descaracterizou as nanofibras produzidas no ensaio de absorção de água. Os filmes simples foram colocados em 30 mL de solução PBS, de forma a recobrir toda a membrana. Os tubos Falcon esterilizados de 50mL foram mantidos fechados e vedados em banho a $37^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Foram analisadas amostras para cada tempo e concentração, em triplicata. Os filmes foram retirados em tempos diferentes, sendo esses 24hrs, 48hrs, 5 semanas, 7 semanas e 11 semanas, sendo os tempos considerados baseados nos estudos referenciados acima. A concentração do fármaco nas amostras é mensurada por intermédio de espectrofotometria na região do UV-Vis, sendo o comprimento de onda para análise da progesterona de 247nm (LEIMANN *et al.*, 2015).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise estrutural das fibras de PCL

5.1.1 Análise Macroscópica

As amostras foram analisadas primeiramente macroscopicamente, conforme ilustrado na Figura 5.1. Não houve diferença macroscópica das amostras com relação à variação da velocidade de injeção e voltagem. Na amostra obtida com solução de concentração 15%*m/m*, a cobertura do papel alumínio está bem superficial, e para a maior parte das amostras não foi possível retirá-las do papel alumínio para posteriores análises. As amostras obtidas com solução de concentração 20%*m/m* e 25%*m/m* estão bem opacas. As amostras obtidas com solução de concentração 20%*m/m* foram aquelas que apresentaram melhores características morfológicas, sendo que em todas foi possível um aproveitamento de no mínimo 90% ao retirar as amostras do papel alumínio. As amostras obtidas com solução de concentração 30%*m/m* apresentaram-se muito densas e criaram um aspecto de filme e com pouca opacidade.

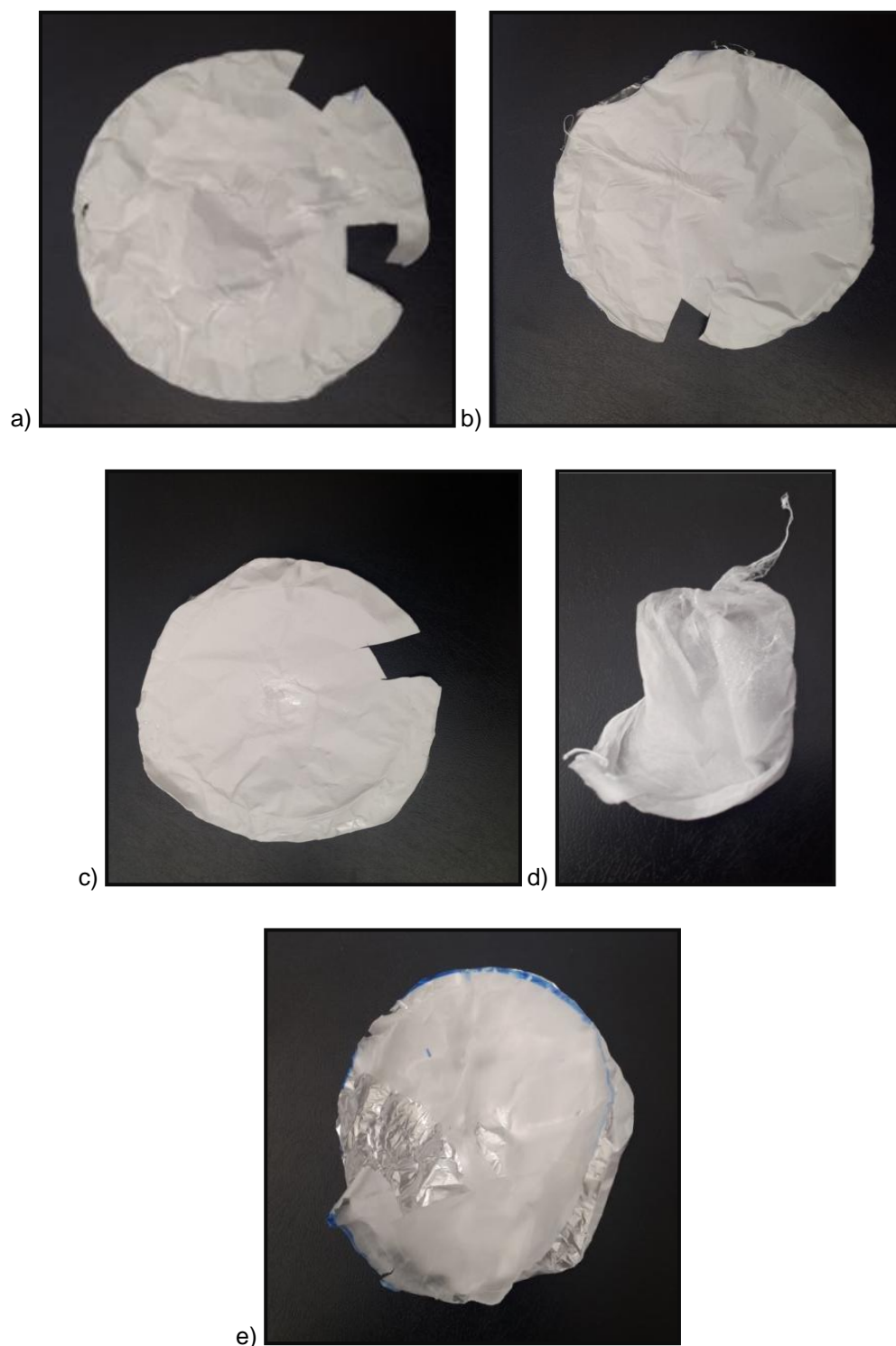
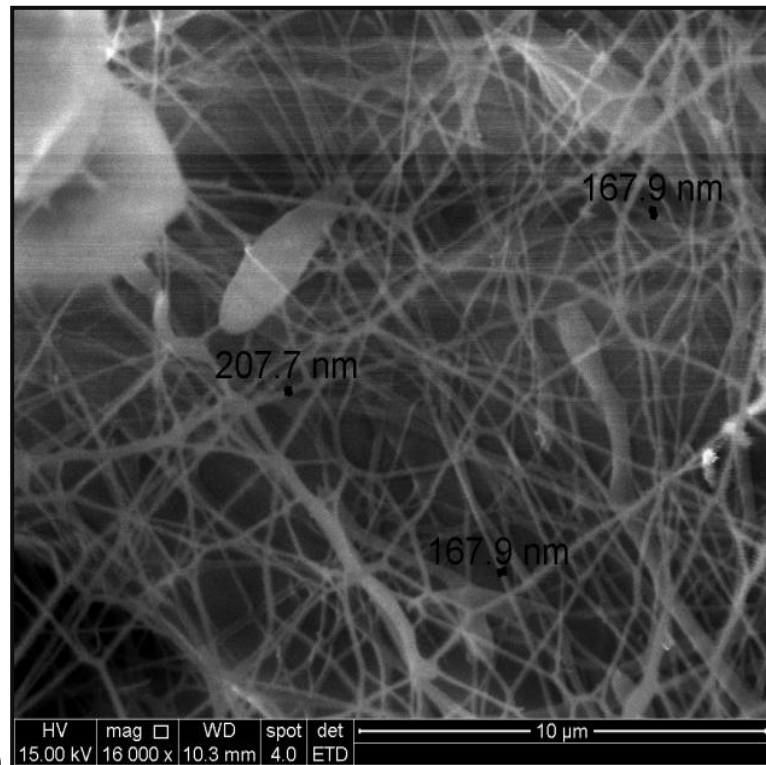


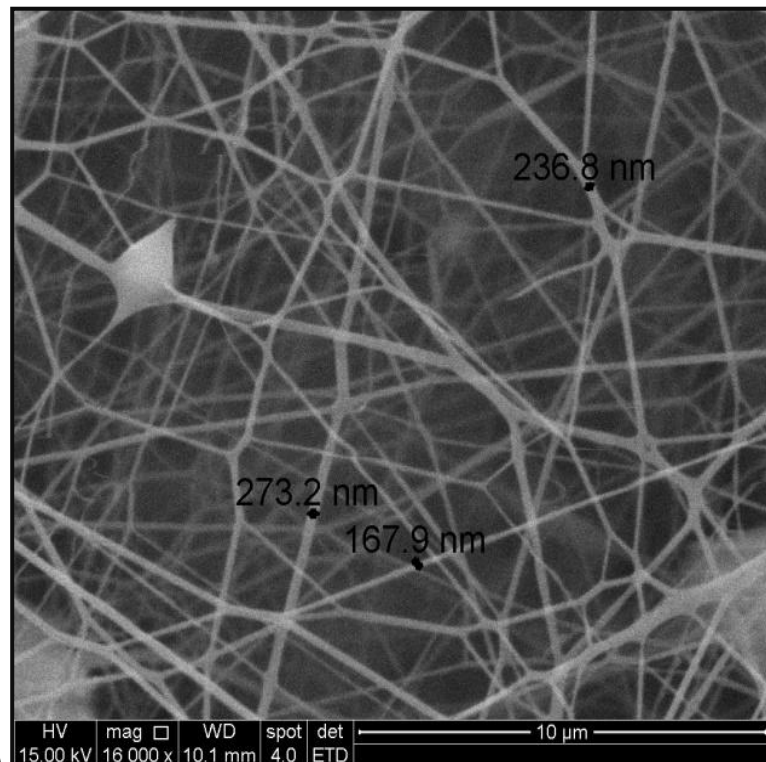
Figura 5.1: Fotografias das amostras obtidas a partir de soluções com concentrações a) 15% m/m , b) 25% m/m , c) 20% m/m , d) 20% m/m após ser retirada do papel alumínio e e) de 30% m/m . Escala: 1:2.

5.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

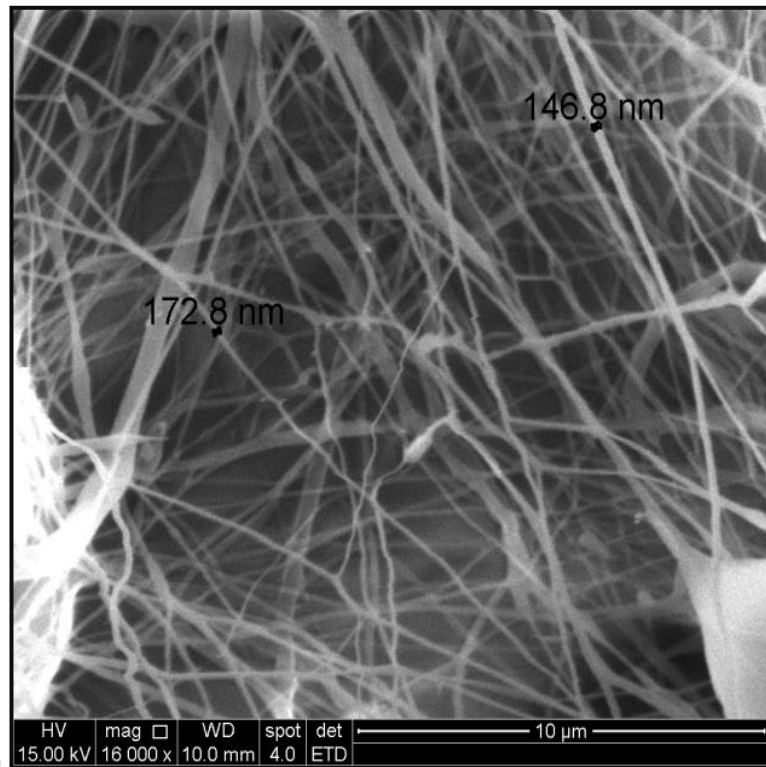
A Figura 5.2 representa a microfotografia de MEV das nanofibras obtidas pela eletrofiação a partir de soluções de diferentes concentrações e para diferentes voltagens. BHARDWAJ & KUNDU (2010) e SCHUEREN *et al.*, (2011) sugerem que o aumento da voltagem diminui o diâmetro das nanofibras, devido a maior razão de produto saindo da seringa. Pode-se observar que na concentração de 15%/m, as nanofibras possuem um menor diâmetro, mas são muito espaçadas, com áreas de maior quantidade de material com formato de “contas”, e não conseguem formar uma manta no papel alumínio. Essas condições podem ser consideradas inviáveis, pois não se consegue retirar a manta do papel alumínio para posteriores análises (no MEV, as amostras foram analisadas com o papel alumínio). A viscosidade da solução está fortemente relacionada com a concentração da solução. De acordo com BHARDWAJ & KUNDU (2010) e SCHUEREN *et al.*, (2011), deve haver uma concentração adequada para a solução utilizada na seringa da eletrofiação, porque “contas” são formadas com baixas concentrações, ao invés de fibras. Na concentração de 30%/m, pode-se observar microfibras com diâmetros maiores, sendo que diferente das outras amostras, a de 25kV não foi obtida pois a solução estava com alta viscosidade, ocasionando entupimento e posterior quebra da seringa, mesmo utilizando uma agulha de calibre maior. As amostras obtidas a partir da solução com concentração de 20%/m e 25%/m foram as que apresentaram diâmetros menores com relação à distribuição de nanofibras. O que se observa foi um menor diâmetro nas concentrações de 20%/m, sendo que o aumento da voltagem também contribuiu para a diminuição do diâmetro, além da quase ausência de “contas”. Portanto, de acordo com os parâmetros analisados, a amostra obtida com solução de concentração 20%/m e 20kV apresentou melhor resultado pela análise do MEV.



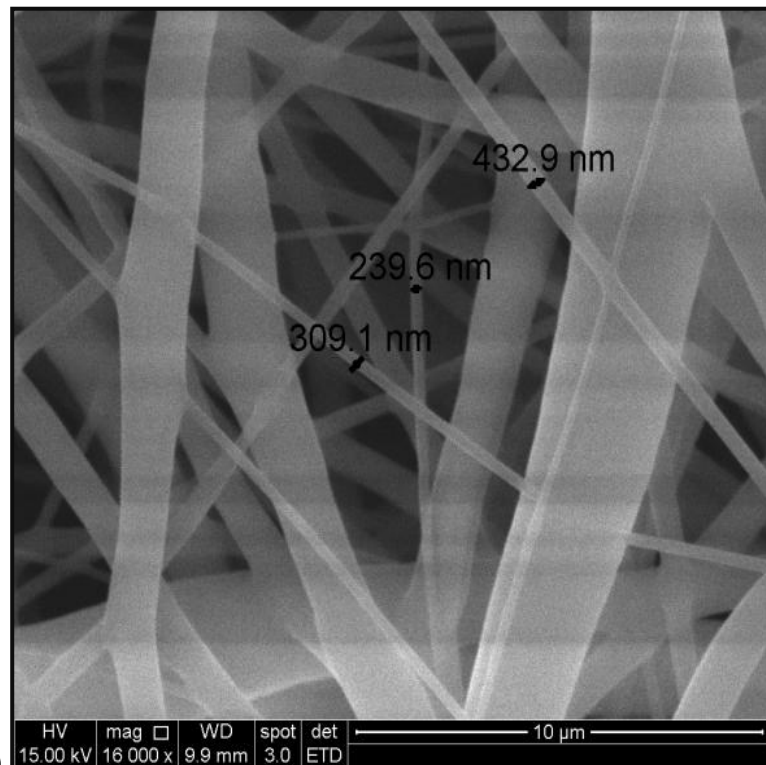
a)



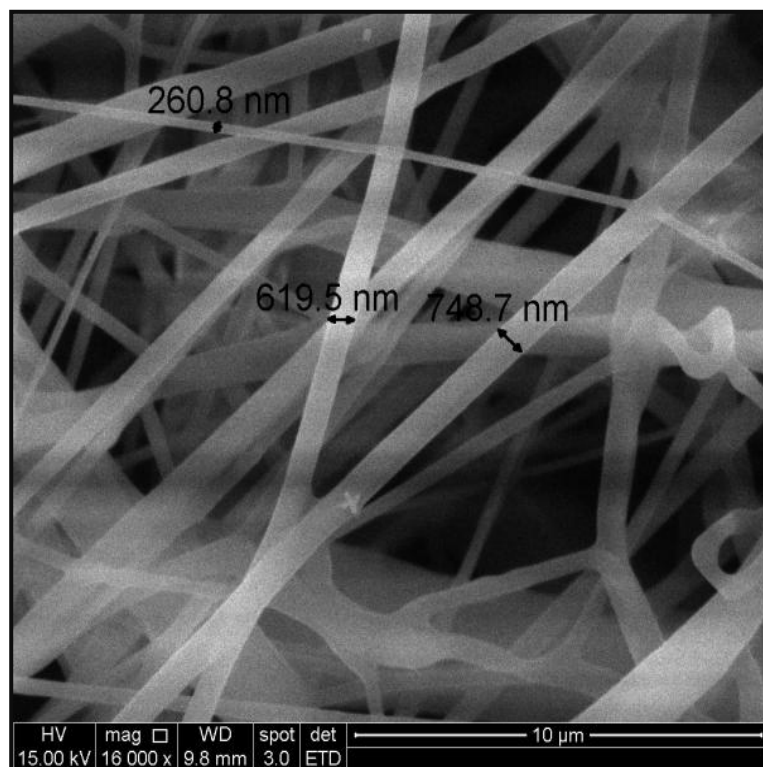
b)



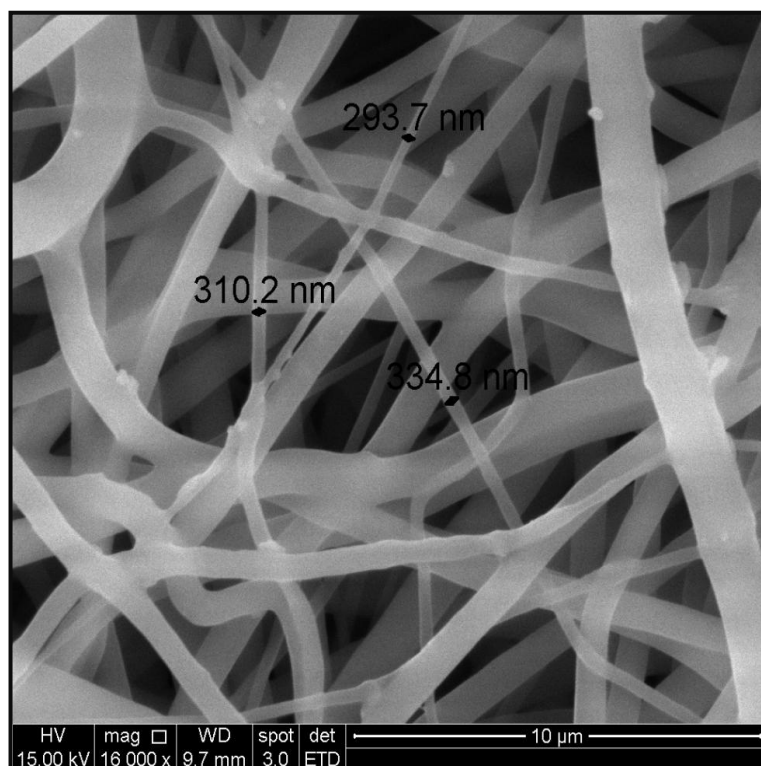
c)



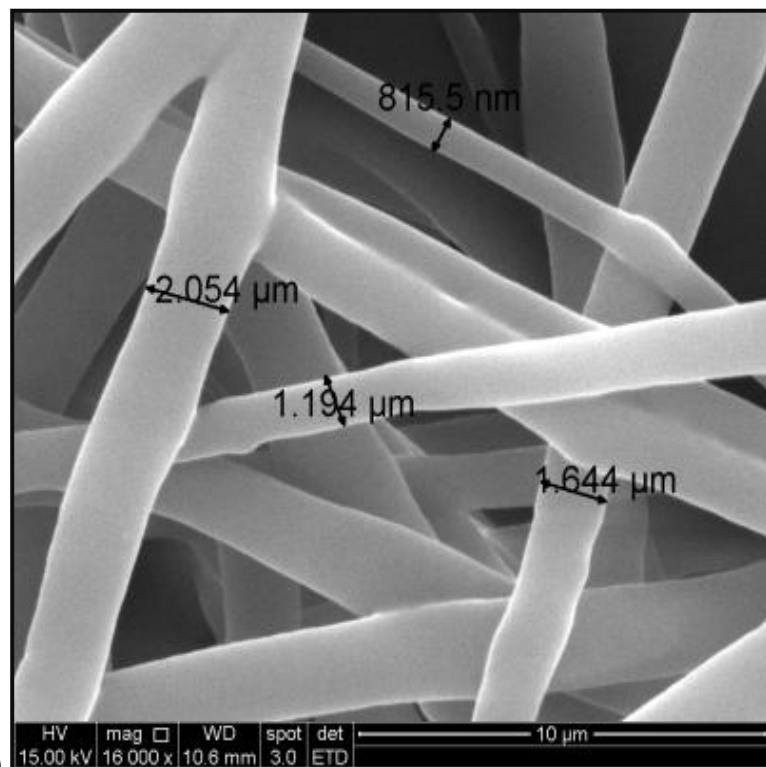
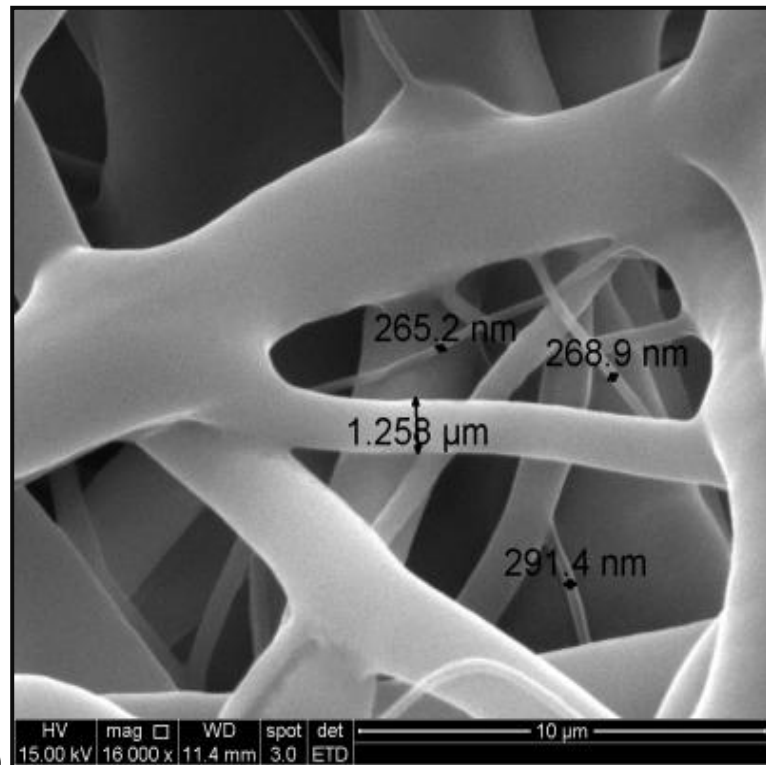
d)

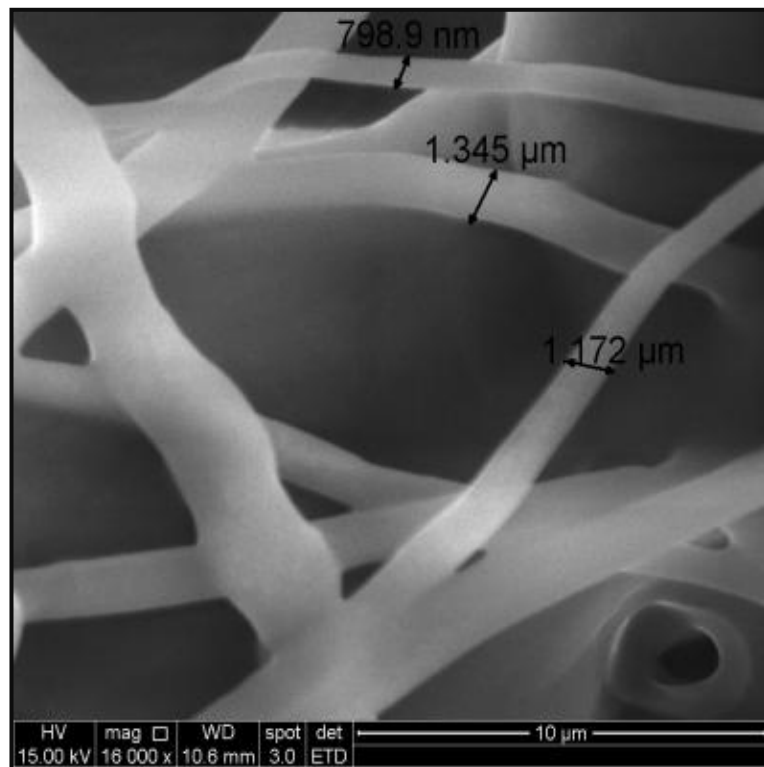


e)

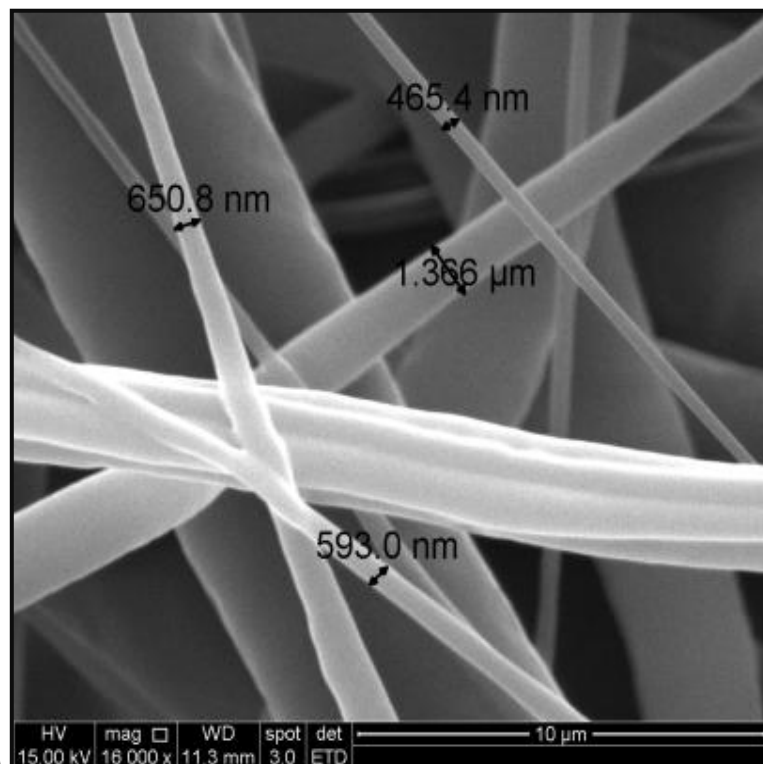


f)





i)



j)

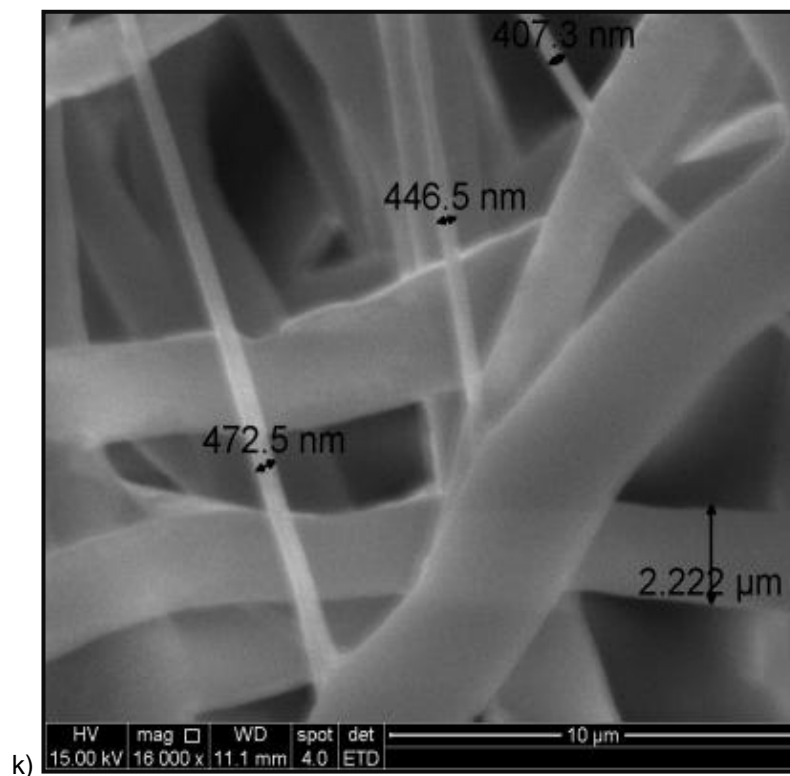


Figura 5.2: Microfotografias para as amostras obtidas a partir de soluções com concentrações: 15%*m/m*, sendo a)15kV b) 20kV e c) 25kV; 20%*m/m*, sendo d)15kV e) 20kV e f) 25kV; 25%*m/m*, sendo g)15kV h) 20kV e i) 25kV e 30%*m/m*, sendo j)15kV k) 20kV. Ampliações em 16000x.

A partir das microfotografias realizadas anteriormente, foram realizadas as ampliações em 1000x das amostras com voltagem de 20kV nas concentrações de 15%*m/m*, 20%*m/m*, 25%*m/m* e 30%*m/m* para medição dos diâmetros das nanofibras (Figura 5.3). As médias encontradas dos diâmetros das nanofibras obtidas a partir de soluções com concentrações de 15%*m/m*, 20%*m/m*, 25%*m/m* e 30%*m/m* foram, respectivamente: 270,25nm, 372,66nm, 520,49nm e 558,82nm. Portanto, observa-se que as nanofibras obtidas a partir de soluções com concentração de 25%*m/m* e 30%*m/m* apresentam uma média maior de diâmetros.

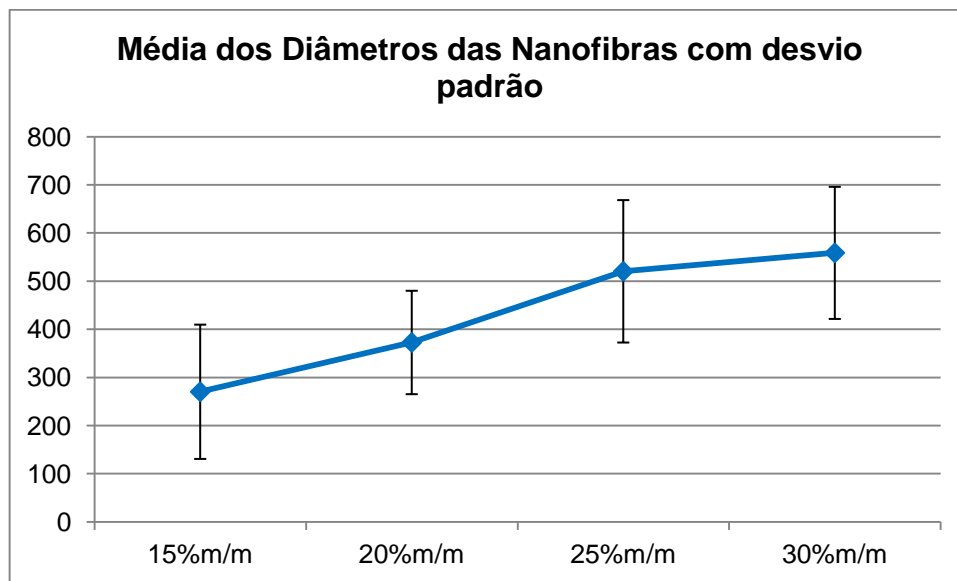


Figura 5.3: Média dos diâmetros das nanofibras obtidas a partir de soluções com concentrações de 15% m/m , 20% m/m , 25% m/m e 30% m/m .

A Figura 5.4 representa a amostra obtida a partir de solução com concentração 20% m/m e 20kV em ampliação 1000x, em que pode-se observar a distribuição das nanofibras por toda a área da amostra e pouca presença de “contas”. As áreas com maior espessura são ocasionadas pelos jatos iniciais ao ligar e ajustar a voltagem do equipamento de eletrofiação.

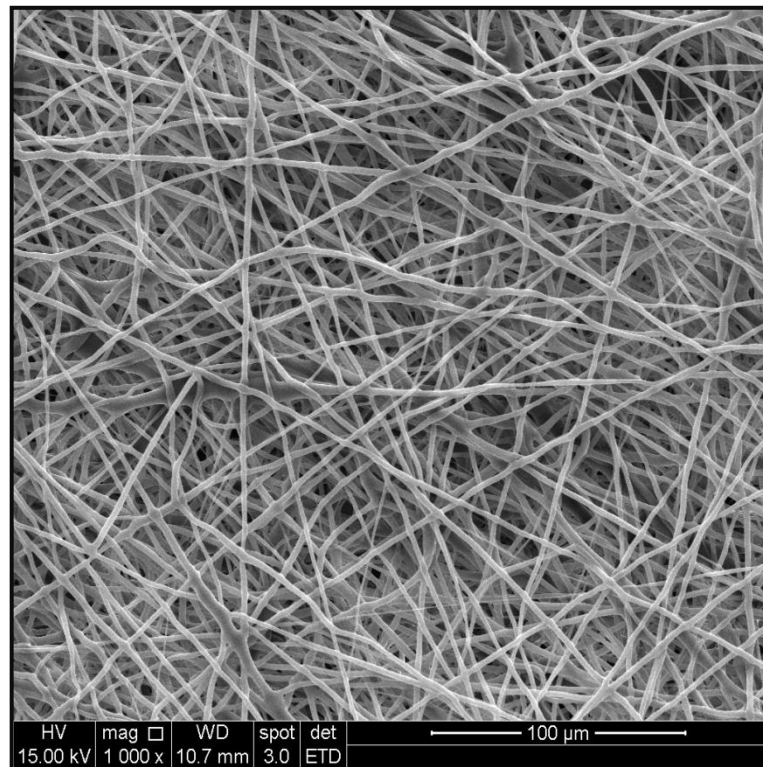


Figura 5.4: Microfotografia para a amostra obtida a partir de solução com concentração 20% m/m em ampliação de 1000x.

A Figura 5.5 representa as amostras obtidas a partir de solução com concentração 20% m/m e voltagem de 20kV em duas velocidades de injeção: 4mL/hr e 7mL/hr em ampliação de 10000x. Pode-se observar que o aumento da velocidade de injeção aumenta os diâmetros e diminui a concentração das nanofibras. Conforme observado por BHARDWAJ & KUNDU (2010) e SCHUEREN *et al.* (2011), o aumento da velocidade de injeção deposita mais rapidamente e com mais concentração o material no coletor.

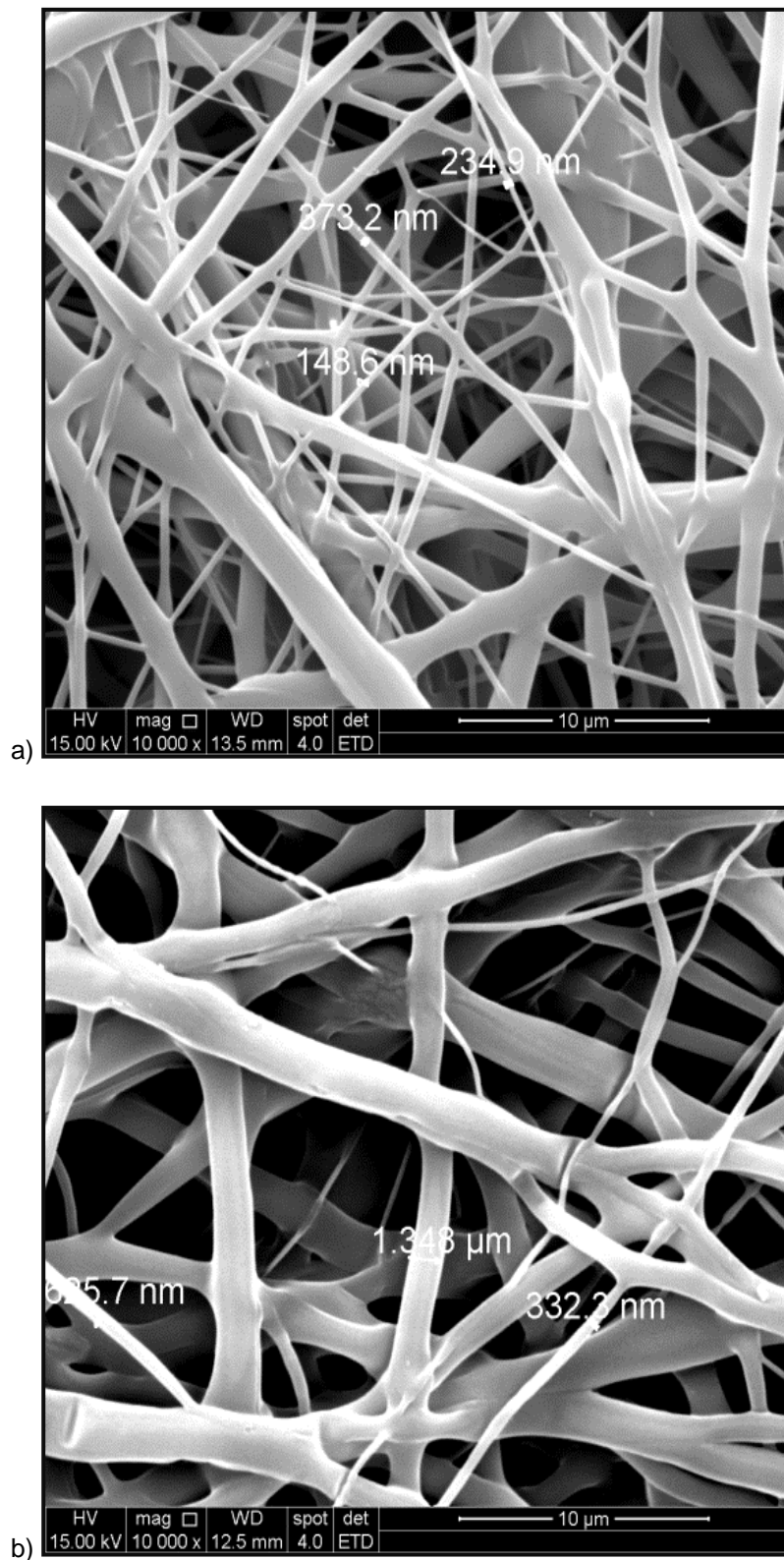


Figura 5.5: Microfotografia para a amostra obtida a partir de solução com concentração 20% m/m ampliação de 10000x, sendo a) velocidade de injeção de 4 mL/hr e b) velocidade de injeção de 7 mL/hr .

Em todas as amostras em que foi aumentada a temperatura em 5°C durante o processo de agitação da solução não houve formação de nanofibras após o processo de eletrofiação. Algumas soluções também foram descartadas, pois quando retiradas do agitador e guardadas por muito tempo, endureciam, e mesmo após o retorno ao agitador não formavam nanofibras na eletrofiação. Ambas as amostras apresentam bolhas em toda a região e desestruturação das nanofibras. As duas situações foram representadas na Figura 5.6.

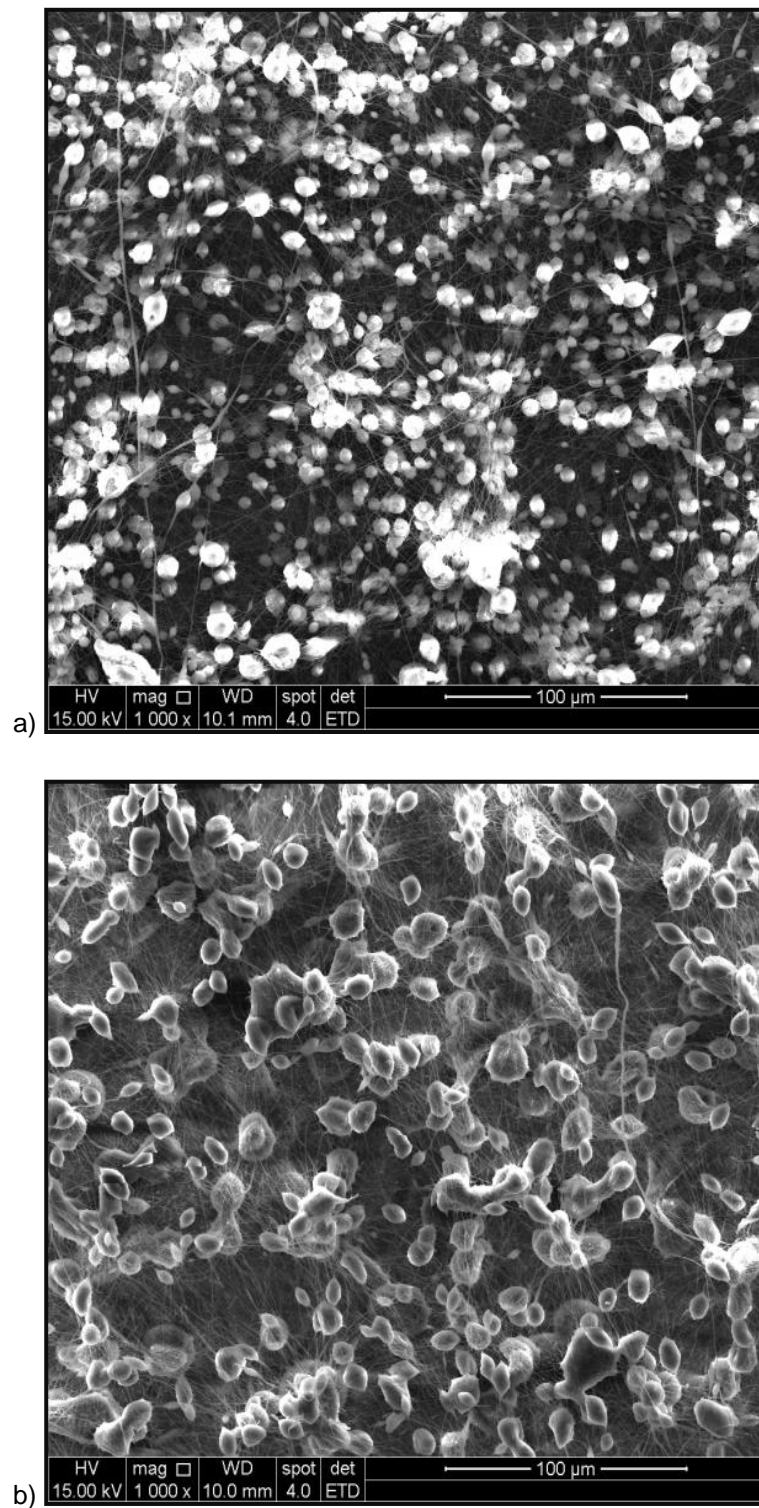


Figura 5.6: Microfotografia para a amostra obtida a partir de solução com concentração 20%*m/m*, ampliação de 1000x, sendo a) após aumentar a temperatura em 5°C por tempo máximo de 5min durante a agitação da solução. b) após retirar do agitador e deixada em repouso.

Foi realizado um teste para verificar se colocar a amostra em estufa após o processamento das nanofibras alteraria a sua estrutura. Para tal, foi utilizada uma amostra obtida a partir de solução com concentração de 20%*m/m* e voltagem de 20Kv e estufa na temperatura de até 60°C. O que se pode observar na Figura 5.7 é a perda total da amostra, devido à desestruturação das nanofibras, uma vez que o próprio PCL se funde a 60°C. Portanto, para a secagem das amostras, o uso da estufa foi descartado.

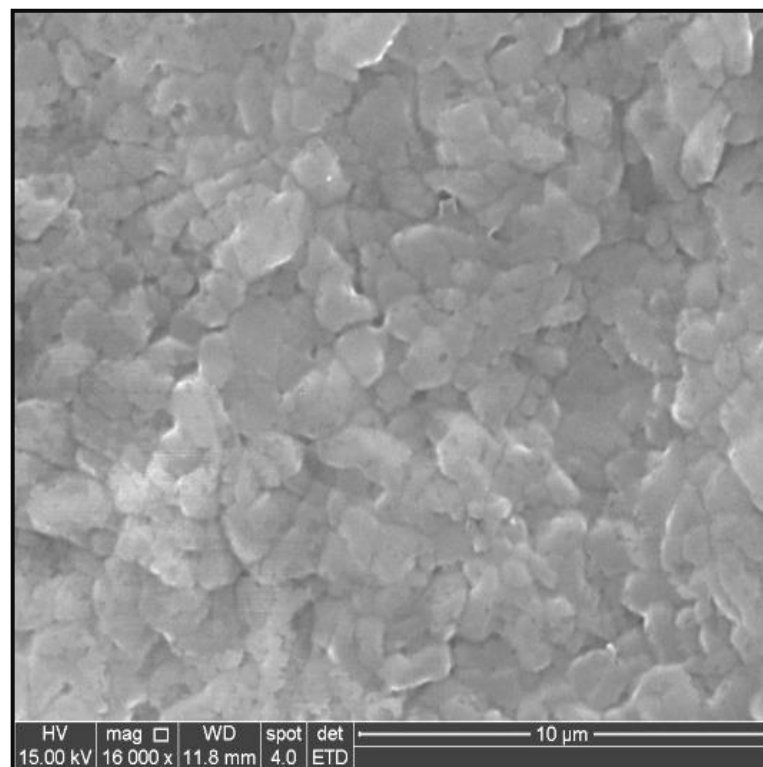


Figura 5.7: Microfotografia para a amostra obtida após permanecer em estufa, com temperatura de 60°C.

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

A análise de FTIR foi realizada para a caracterização das nanofibras de PCL/Ácido Acético. A Figura 5.8 mostra os espectros FTIR para as amostras em diferentes concentrações de PCL/Ácido Acético, sendo elas 15%*m/m*, 20%*m/m*, 25%*m/m*, 30%*m/m* e voltagens de 15kV, 20kV, 25kV. As diferentes concentrações e voltagens não tiveram alterações consideráveis no FTIR. As bandas representadas são típicas de PCL, conforme estudo observado por POLINI *et al.* (2011). Observam-se as bandas: 722cm^{-1} (C-H, vibração de aromático, com dobramento fora do plano), 971cm^{-1} (CH=CH), 1072cm^{-1} (C-O, ácido carboxílicos), 1175cm^{-1} (C-H, alceno com dobramento fora do plano), 1264cm^{-1} (C-H, alceno com dobramento fora do plano), 1722cm^{-1} (C-O, ácido carboxílicos) e 2950cm^{-1} (H—C=O, aldeído).

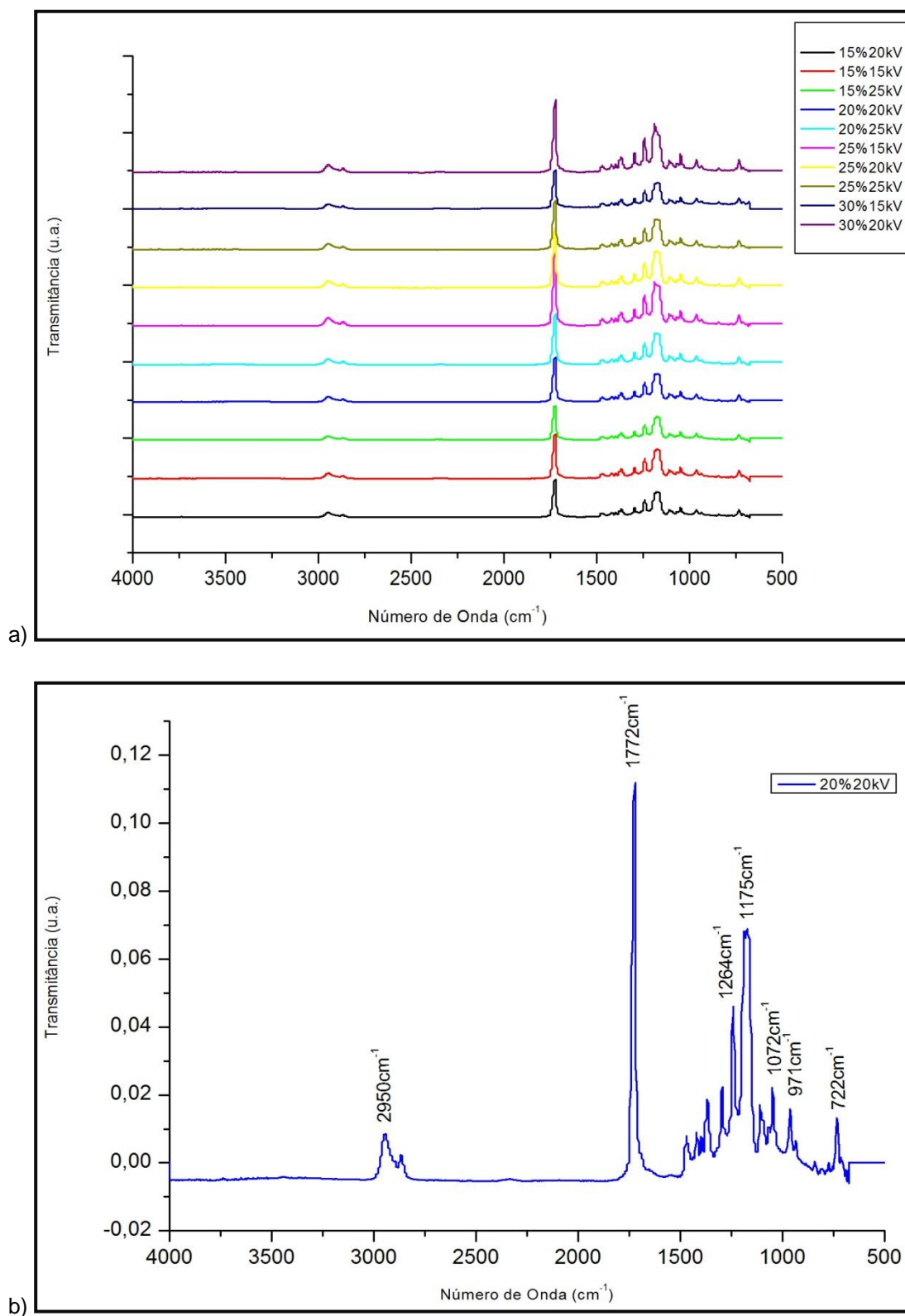


Figura 5.8: Espectros de FTIR para as amostras a) obtidas de soluções com concentrações e voltagens diversas e b) bandas na amostra obtida a partir de solução com concentração 20%*m/m* com voltagem de 20kV.

Foi gerado o gráfico do FTIR da amostra obtida de solução com concentração 20%*m/m* em comparação a amostra de PCL puro (Figura 5.9). É possível observar que as bandas do PCL e da amostra de 20%*m/m* são muito similares, exceto por algumas bandas do PCL puro que possuem picos de transmitância mais elevados (bandas de aproximadamente 1070 cm^{-1} e 1750 cm^{-1}). Pode-se considerar que isso provavelmente indica eliminação do ácido acético durante o processo de eletrofiação.

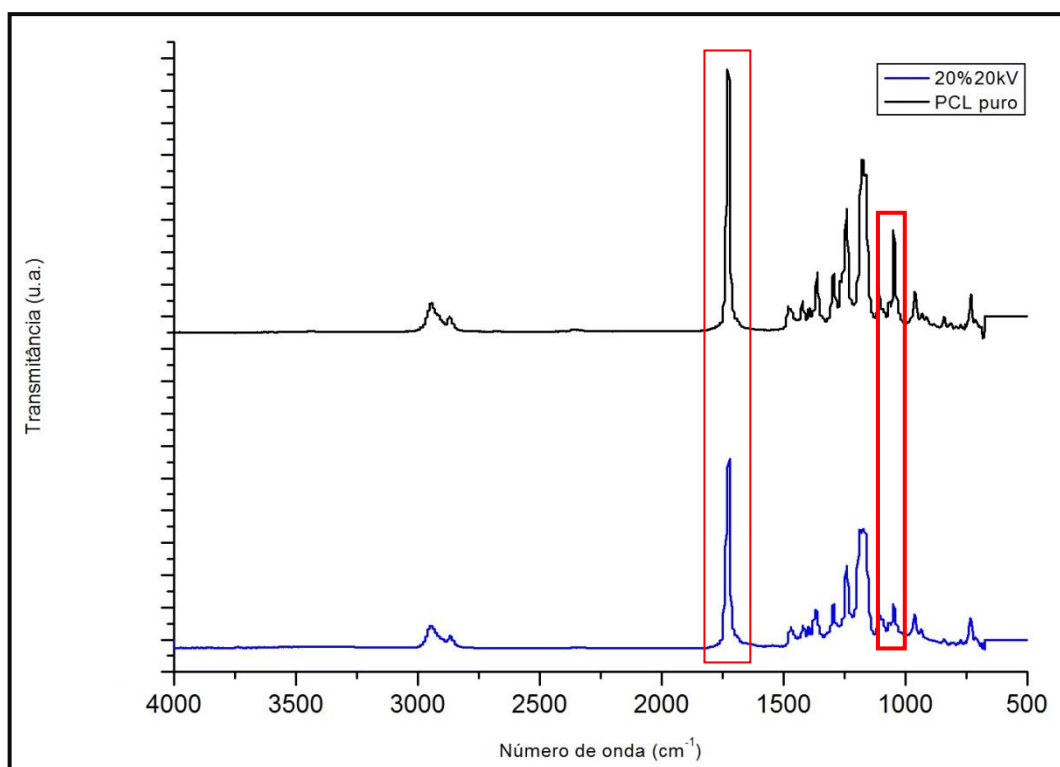


Figura 5.9: Espectros de FTIR para as amostras de PCL puro e obtida a partir de solução com concentração 20%*m/m*.

5.1.4 Difração de raios-X (DRX)

O difratograma da amostra obtida de solução com concentração 20%*m/m* está representado na Figura 5.10a onde foram observados 2 picos característicos: o primeiro de alta intensidade em 20,5° e outro de menor intensidade em 24° caracterizando a fase cristalina da amostra com cristalinidade estimada de 92%. Foi realizado o espectro de DRX do PCL (Figura 5.10b) e os picos característicos foram 21,30° e outro de menor intensidade de 23,60°, caracterizando a fase cristalina da amostra com cristalinidade estimada de 96%. Esses resultados indicam que, provavelmente, não houve alteração significativa da cristalinidade do PCL após o processo de eletrofiação.

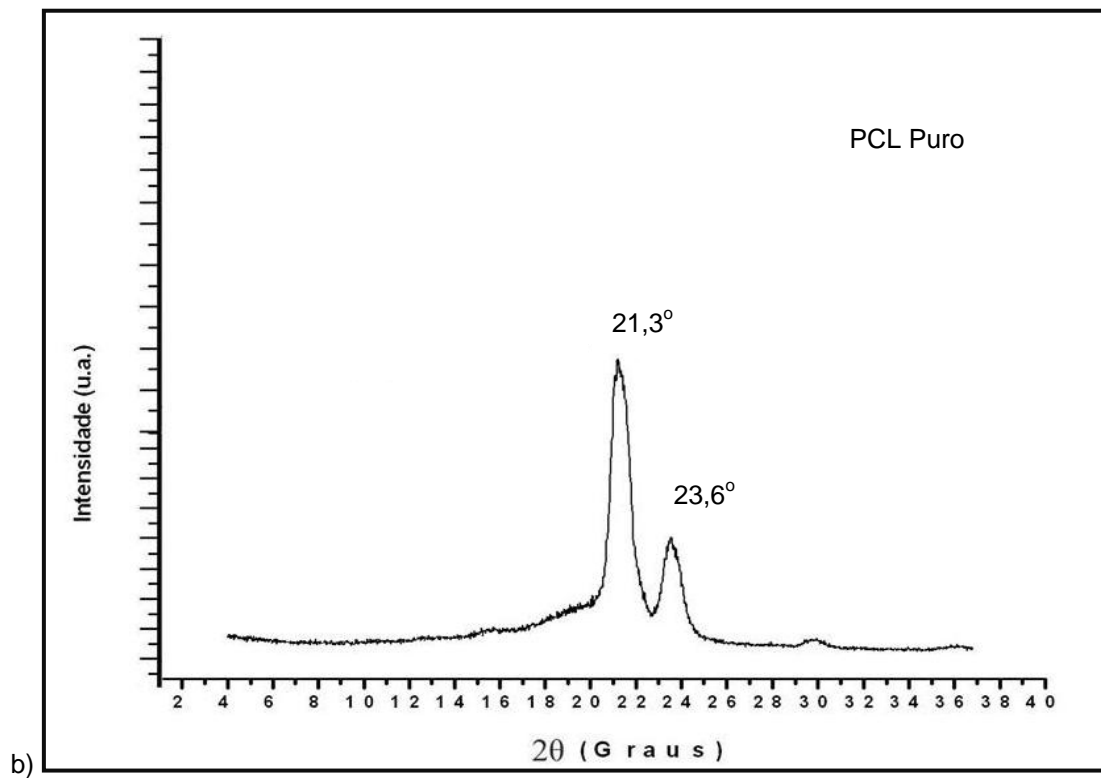
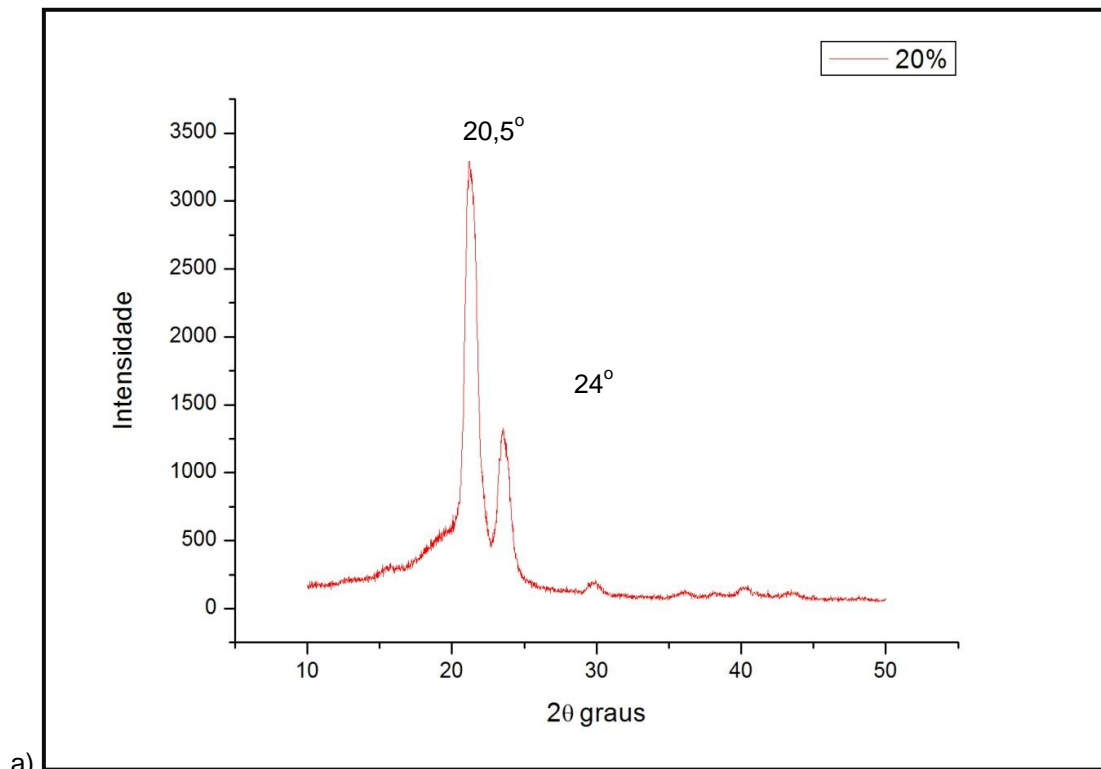


Figura 5.10: Espectro DRX para as amostras a) solução com concentração 20%*m/m*, b) PCL.

5.1.5 Ensaio de Citotoxicidade

A atividade mitocondrial de células SAOS foi avaliada por MTT. Este ensaio foi especificamente usado para avaliar a toxicidade do material por meio da análise de viabilidade celular. A Figura 5.11 mostra os resultados do ensaio de MTT depois de 72 horas de contato das células com as nanofibras produzidas. Depois de três dias de contato com a nanofibras de PCL, as células SAOS não mostraram nenhuma diferença significativa na viabilidade celular quando comparado com a condição de controle. Estes resultados indicam que a amostra não é citotóxica.

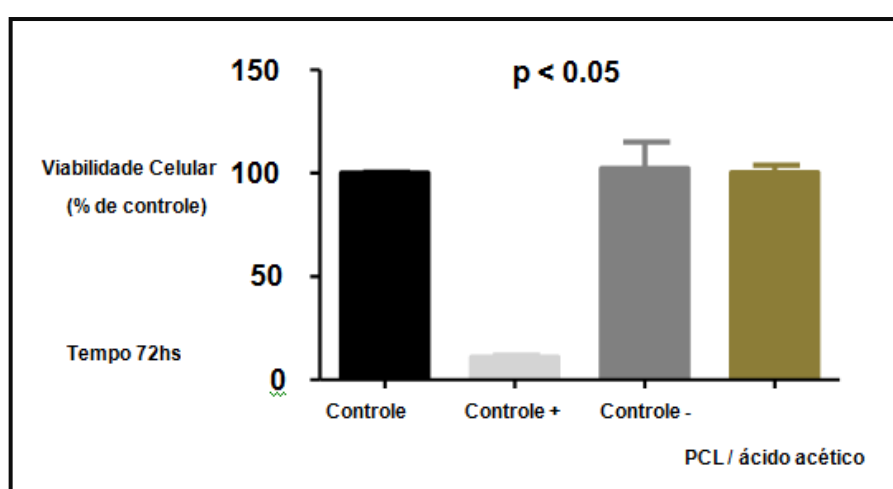


Figura 5.11: Viabilidade celular após 72 horas de contato das células SAOS com a amostra obtida com solução a partir de concentração 20% m/m.

5.2 Análise estrutural e in vitro das fibras de PCL com adição de progesterona

5.2.1 Análise Macroscópica

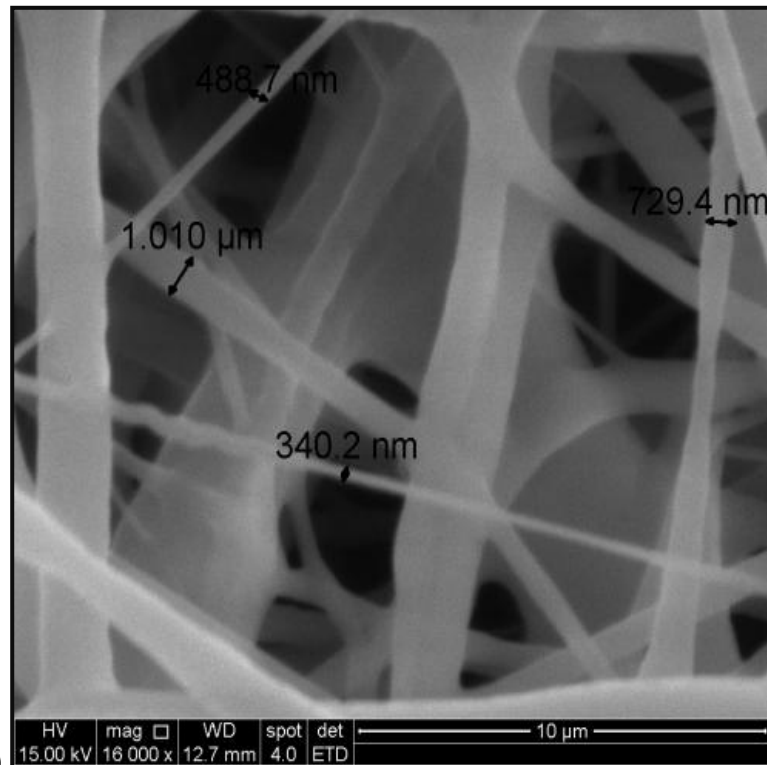
As amostras de PCL/progesterona foram analisadas primeiramente macroscopicamente, conforme ilustrado na Figura 5.12. Na amostra obtida com solução de concentração de progesterona de 9% m/m, a cobertura do papel alumínio está bem superficial (é possível observar que o material não cobre o papel alumínio na sua totalidade), e para a maior parte das amostras não foi possível retirar o papel alumínio para posteriores análises (no MEV, as amostras foram analisadas com o papel alumínio). As amostras de 28% m/m e 33% m/m ficaram muito densas e criaram um aspecto de filme e pouca opacidade. As amostras de 16% m/m e 23% m/m, estão bem opacas e apresentaram melhores resultados, sendo que em todas foi possível um aproveitamento de no mínimo 90% ao retirar as amostras do papel alumínio.



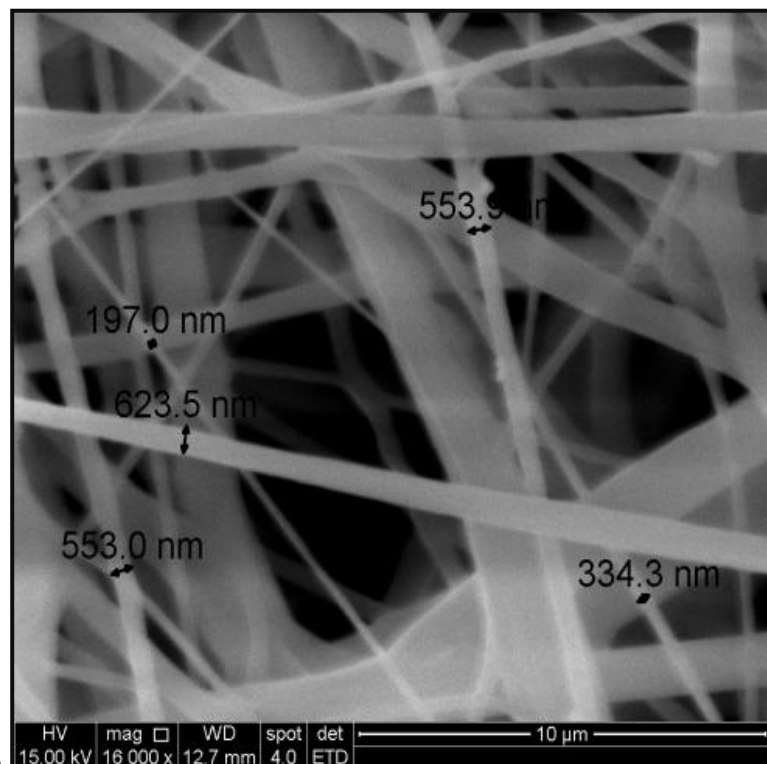
Figura 5.12: Fotografia para as amostras com concentrações de progesterona de a) 9% m/m , b) 16% m/m , c) 23% m/m , d) 28% m/m , e) 33% m/m e f) 16% m/m após ser retirada do papel alumínio. Escala: 1:2.

5.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

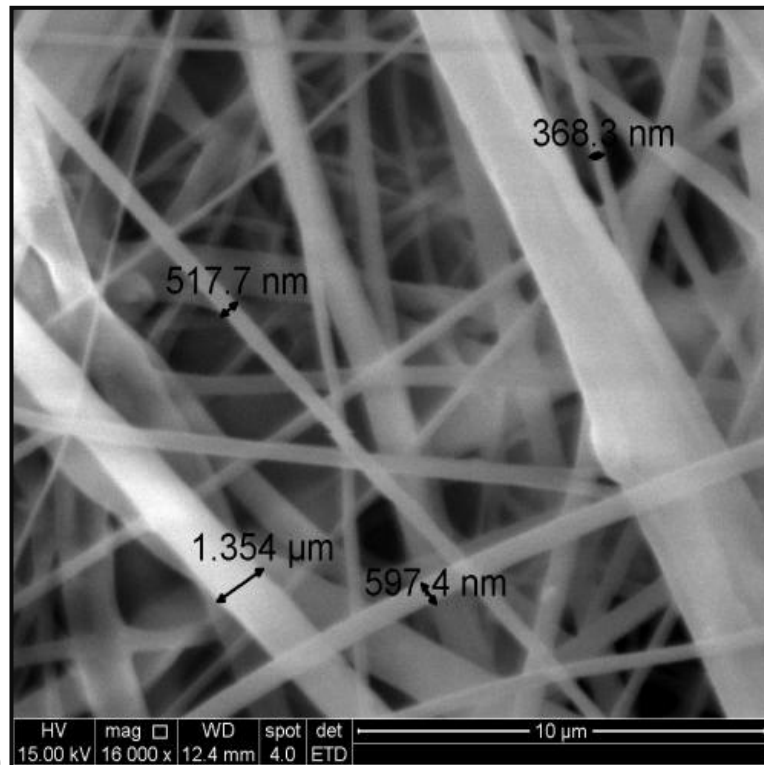
A Figura 5.13 representa a microfotografia de MEV das nanofibras obtidas pela eletrofiação. Pode-se observar que na concentração de progesterona 9%*m/m*, as nanofibras possuem maior diâmetro e estão espaçadas e não conseguem formar uma manta no papel alumínio. As amostras com concentração de 33%*m/m* foram descartadas, pois apresentaram desestruturação das nanofibras (conforme observado na análise macroscópica, elas haviam formado um filme) e a solução estava com grande viscosidade, ocasionando entupimento e posterior quebra da seringa, mesmo utilizando uma agulha de calibre maior. Na concentração de 16%*m/m*, 23%*m/m* e 28%*m/m*, pode-se observar nanofibras e microfibras conforme as medições realizadas. As amostras com concentrações de 16%*m/m* e 23%*m/m* foram selecionadas para futuras análises, pois apresentaram melhores resultados, como deposição das nanofibras em todo o coletor e diâmetros nanométricos, além da distribuição das nanofibras na amostra.



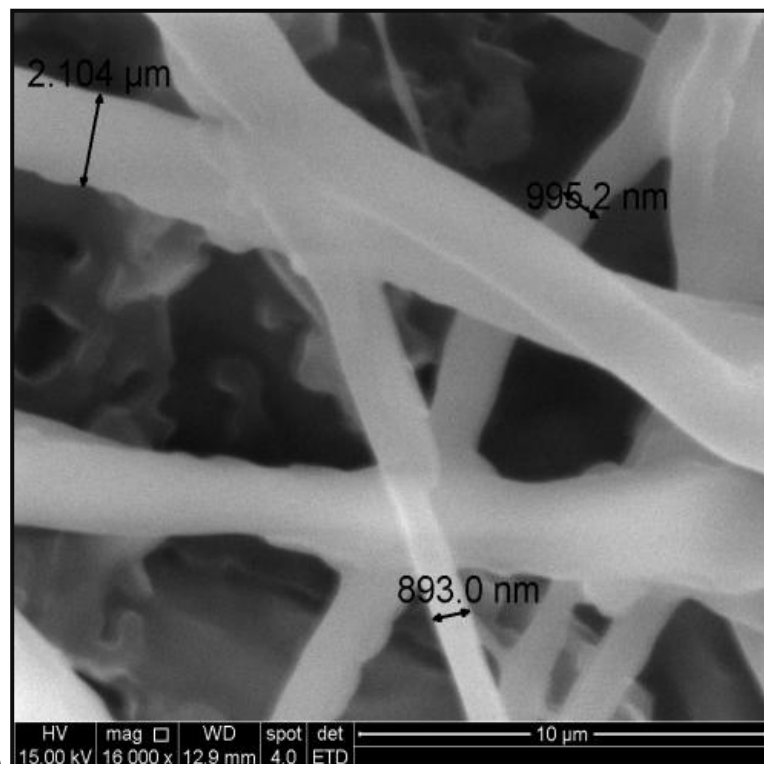
a)



b)



c)



d)

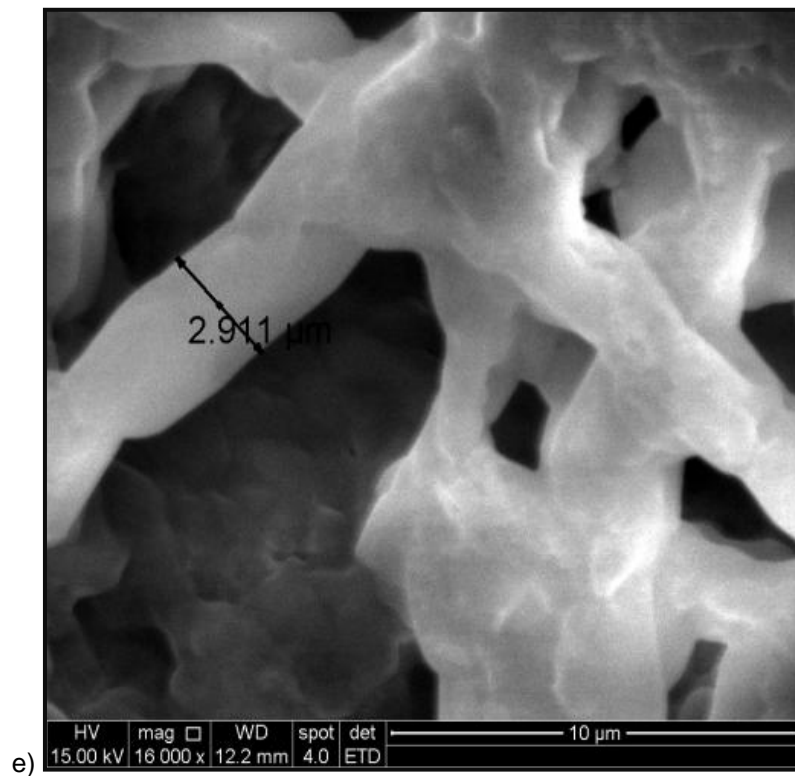


Figura 5.13: Microfotografia para as amostras com concentrações de progesterona a) 9% m/m, b) 16% m/m, c) 23% m/m, d) 28% m/m e e) 33% m/m. Ampliações em 16000x.

A Figura 5.14 representa a amostra com concentração de 16% m/m e 20kV em ampliação 5000x, em que pode-se observar alguns pontos que, provavelmente, seriam partes do hormônio nas áreas das nanofibras.

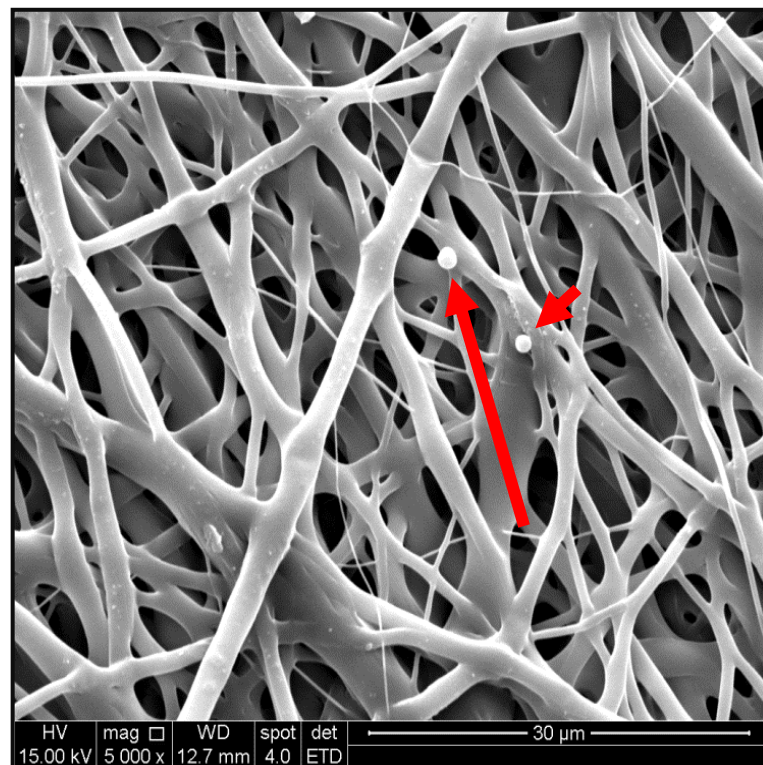


Figura 5.14: Microfotografia para a amostra de concentração 16% m/mm ampliação de 5000x.

Foi realizado o MEV da amostra com aspersão do hormônio após o processo de eletrofiação. As nanofibras observadas na Figura 5.15a (ampliação de 1000x) aglomeraram após a aspersão e perderam as suas características estruturais. Após a quebra da amostra (fratura criogênica), foi realizado o MEV novamente (Figura 5.15b - ampliação de 100x, Figura 5.15c - ampliação de 1000x) e observa-se que na parte transversal a amostra perde suas características estruturais com uma aglomeração da área. Mesmo ainda tendo nanofibras visíveis, provavelmente estas áreas não tiveram contato na aspersão.

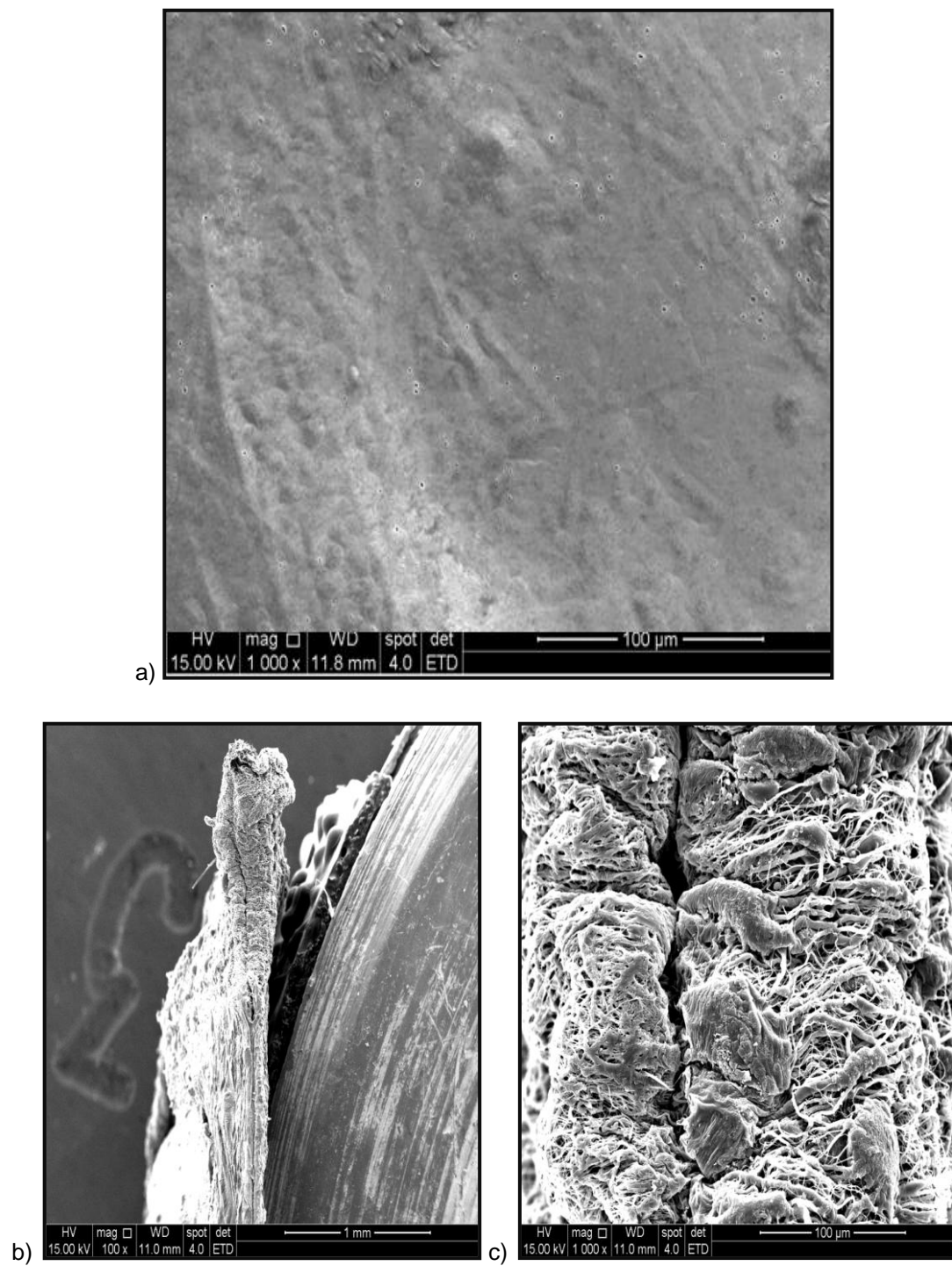
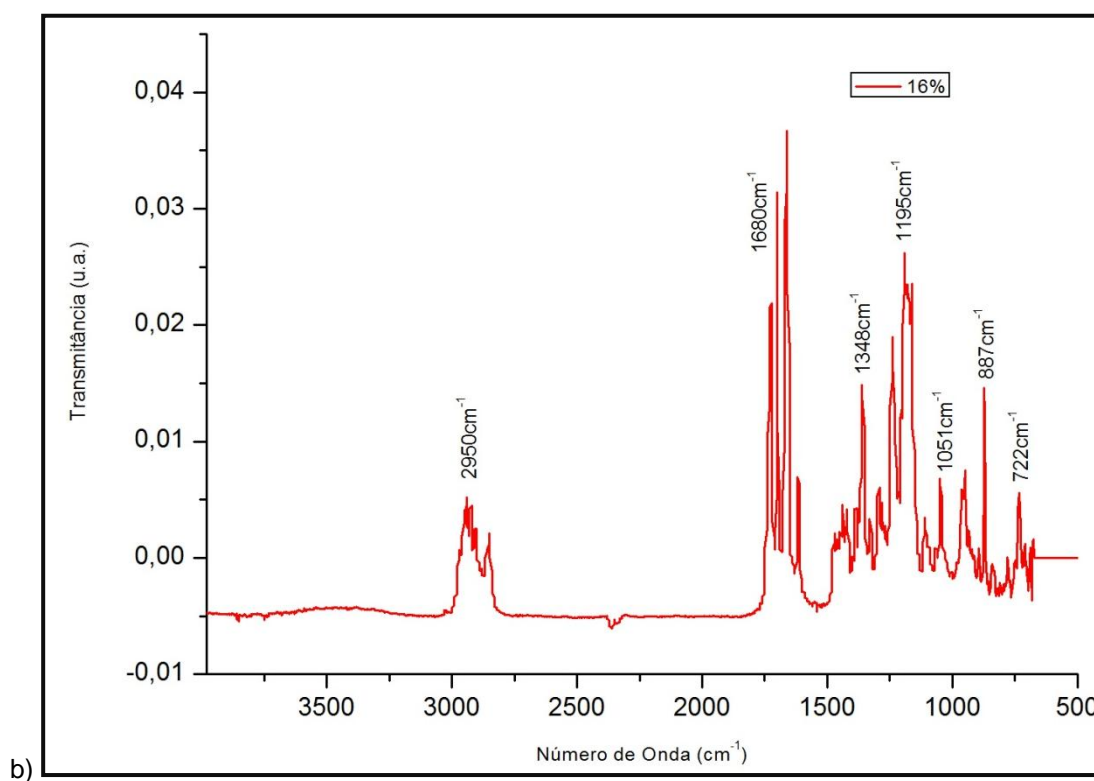
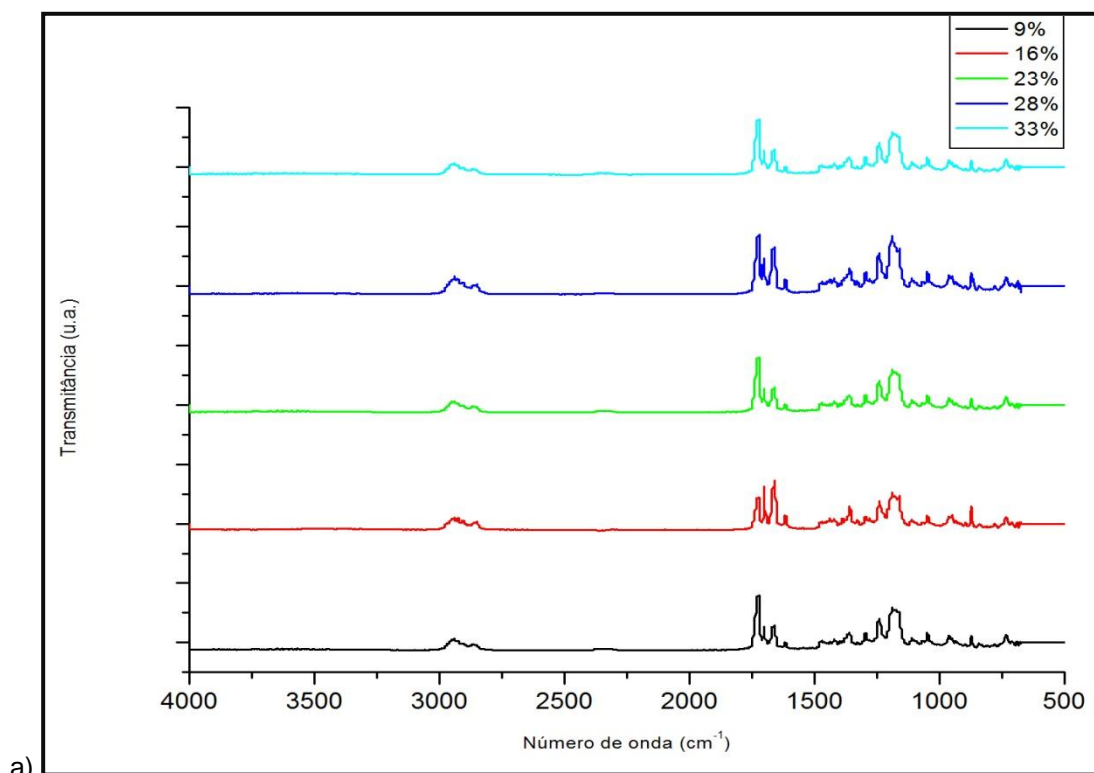


Figura 5.15: Microfotografia para a amostra com aspersão do hormônio após a eletrofiação, sendo a) ampliação 1000x, b) fratura criogênica - ampliação de 100x e c) fratura criogênica - ampliação de 1000x

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

A análise de FTIR foi realizada para a caracterização das nanofibras com a adição da progesterona. A Figura 5.16a mostra os espectros FTIR para as amostras de diferentes concentrações de progesterona e a Figura 5.16b representa as bandas ilustradas para a amostra de 16%*m/m* de progesterona. Foram observadas diferentes concentrações de progesterona e as bandas se encontram muito próximas, portanto, provavelmente, não houveram alterações consideráveis no FTIR. Observam-se as bandas de: 887 cm^{-1} (C-H, vibração de aromático, com dobramento fora do plano), 1064 cm^{-1} (C-O, ácido carboxílicos), 1195 cm^{-1} (C-O, ácido carboxílicos), 1348 cm^{-1} (C-H, alceno com dobramento fora do plano), 1668 cm^{-1} (C=C, alceno) e 2950 cm^{-1} (H—C=O, aldeído). As bandas são típicas de PCL, conforme observados por POLINI *et al.* (2011). Também foram observadas as bandas típicas de progesterona (887 cm^{-1} C-H, vibração de aromático com dobramento fora do plano e 1668 cm^{-1} , C=O, amida) conforme discutido por LEIMANN *et al.* (2015). Na figura 5.16c está representado os espectros do PCL, da progesterona e da amostra de 16%*m/m*. É possível observar que as bandas do PCL, da progesterona e da amostra de 16%*m/m* são muito similares, exceto por algumas bandas do PCL puro que possuem picos de transmitância mais elevados (bandas de aproximadamente 770 cm^{-1} , 1070 cm^{-1} , 1750 cm^{-1} e 2950 cm^{-1}). Estes resultados indicam a provável eliminação do ácido acético durante o processo de eletrofiação, e confirmam a incorporação de progesterona nas nanofibras de PCL.



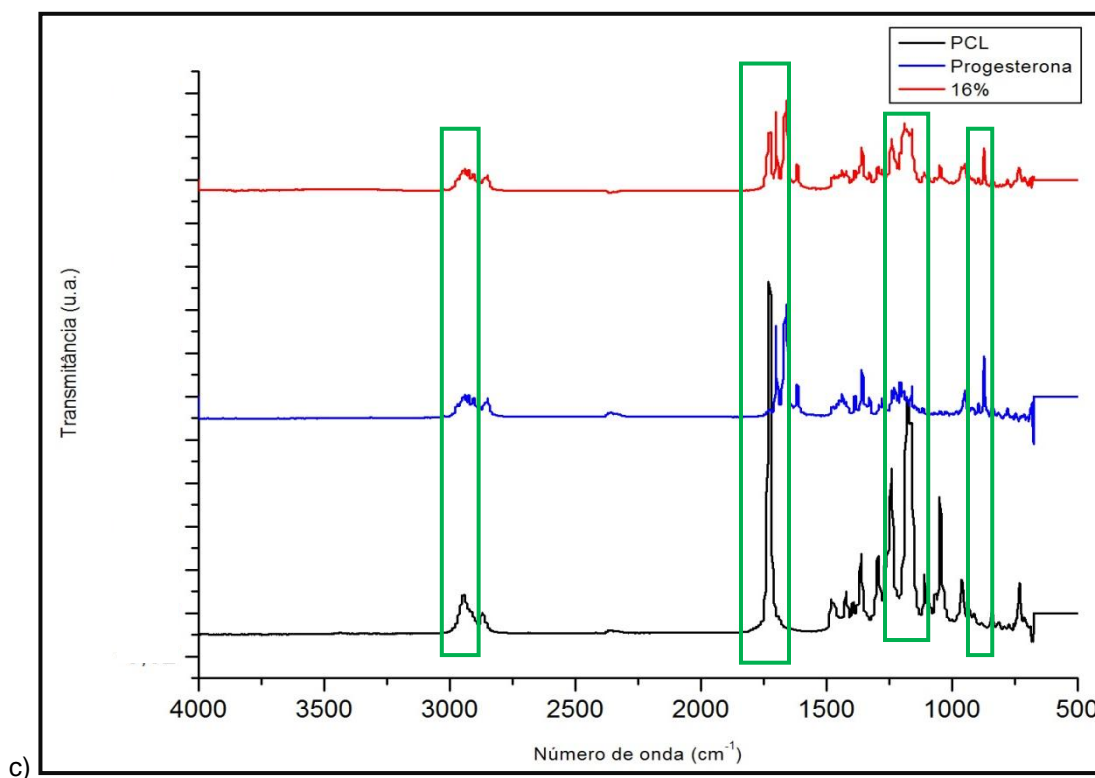


Figura 5.16: Espectros FTIR para as amostras, sendo: a) diferentes concentrações de progesterona, b) concentração 16%*m/m* e c) concentração 16%*m/m* em comparação com PCL puro e progesterona.

5.2.4 Difração de raios-X (DRX)

Os difratogramas para as amostras de concentração 16%*m/m* de progesterona e amostra obtida de solução com concentração 0%*m/m* (PCL puro) foram representados na Figura 5.17 onde foram observados 2 picos característicos em ambas as amostras: o primeiro de alta intensidade em 20,5° e outro de menor intensidade em 24°, caracterizando a fase cristalina da amostra com cristalinidade estimada de 87% (16%*m/m*) e 96% (0%*m/m*). Em 22° aproximadamente a amostra de 16%*m/m* apresenta um pico diferenciado. Foi realizado o difratograma para amostra de progesterona onde foram observados 2 picos característicos: o primeiro de alta intensidade em 16,9° e outro de menor intensidade em 18,2°. Esses resultados indicam que, provavelmente, não houve alteração significativa da cristalinidade do PCL a inserção do hormônio progesterona na produção das nanofibras.

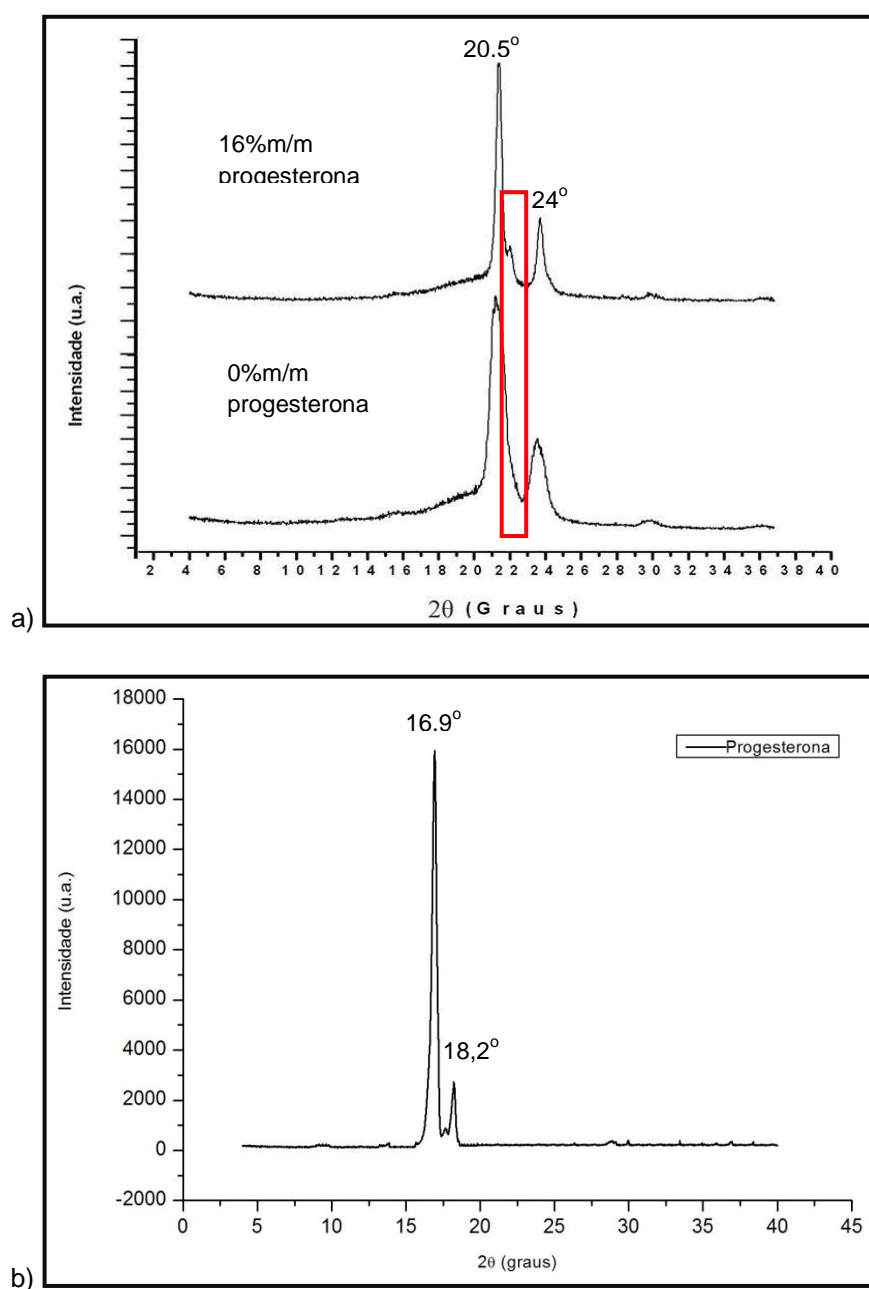


Figura 5. 17: Difratomogramas das amostras a) concentração 16%*m/m* e 0%*m/m* de progesterona, b) progesterona.

5.2.5 Ensaio de absorção de água

A Figura 5.18a representa as curvas relativas ao ensaio de absorção de água da amostra de concentração 16%*m/m* progesterona em solução de PBS com pH4 e pH7. Foi possível observar por meio dos gráficos que até 60min, ambas as amostra possuem comportamento semelhante com o aumento de absorção. A partir de 60min, a amostra com solução de PBS com pH4 inicia uma diminuição da absorção e a com

solução de PBS com pH7 continua com o aumento da absorção. Isso provavelmente ocorre devido ao relaxamento das nanofibras em solução de PBS com pH4 após 60min. Foi realizada análise por MEV das amostras que foram testadas no meio ácido e no meio neutro, após elas secarem a temperatura ambiente (entre 20°C-22°C). Nas Figuras 5.18b observa-se uma modificação estrutural decorrente da degradação das nanofibras, após 120min nas amostras em meio ácido e conseqüentemente, as nanofibras perdem suas características originais. Na Figura 5.18c, observa-se que a amostra testada em pH neutro por 120min mantém as suas características estruturais, apresentando nanofibras espaçadas.

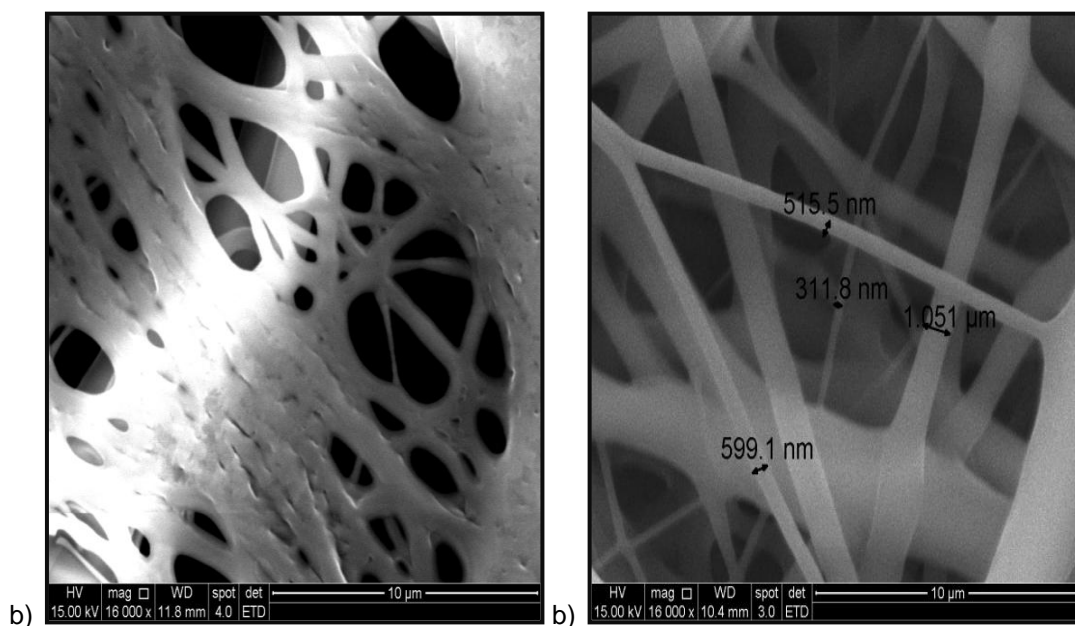
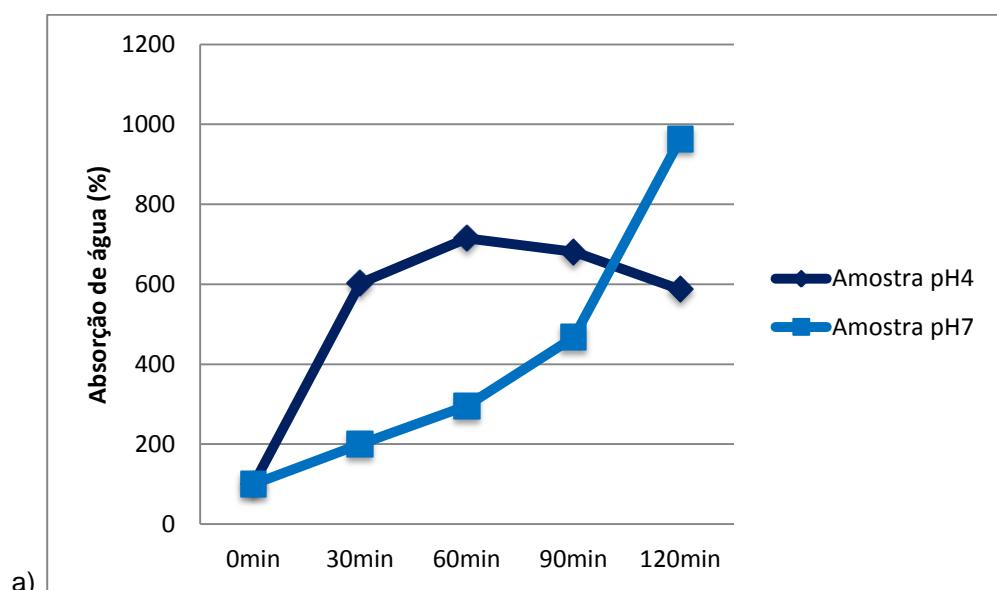


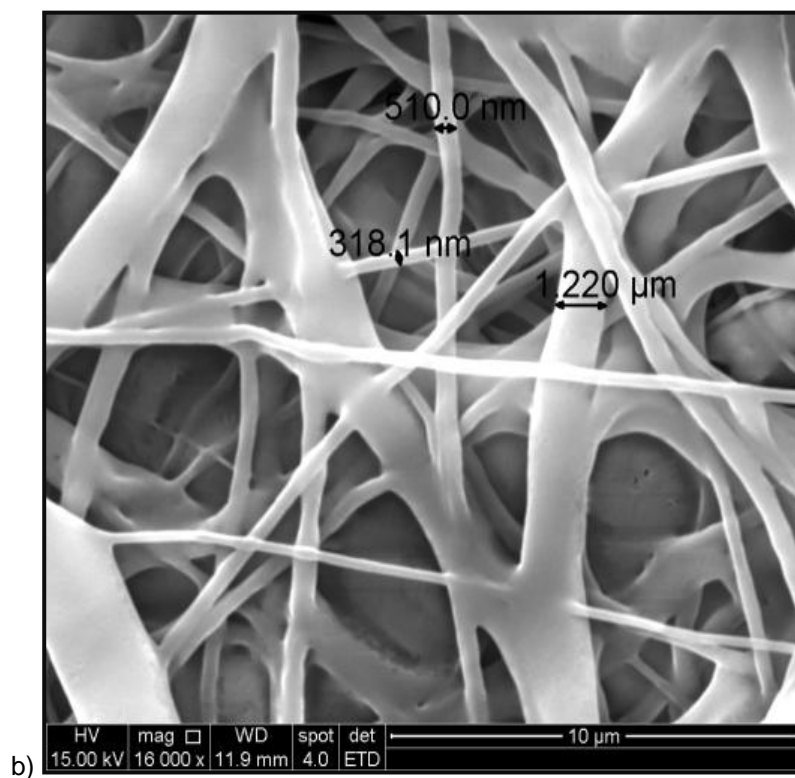
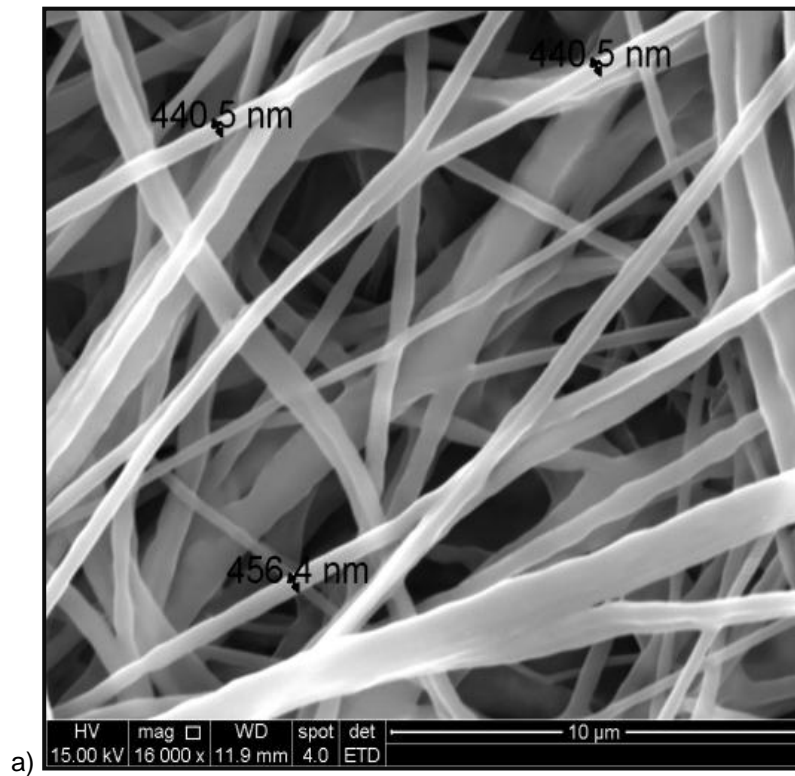
Figura 5.18: a) Gráfico da absorção de água das amostras de 16% m/m progesterona em pH4 e pH7; microfotografia das amostras após imersão em PBS por 120min em: b) pH4 e c) pH7.

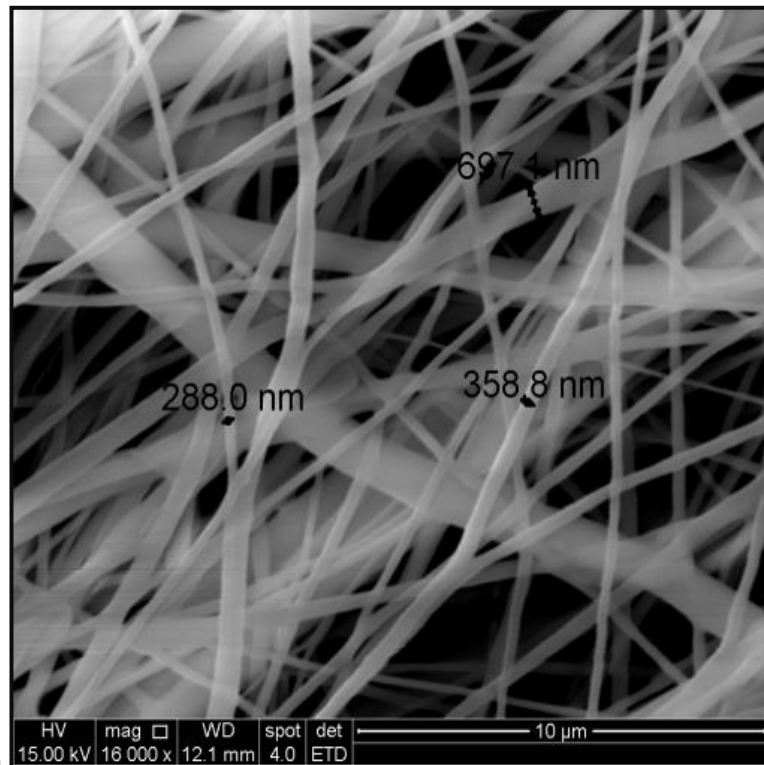
Ampliação 16000x.

5.2.6 Ensaio de Degradação

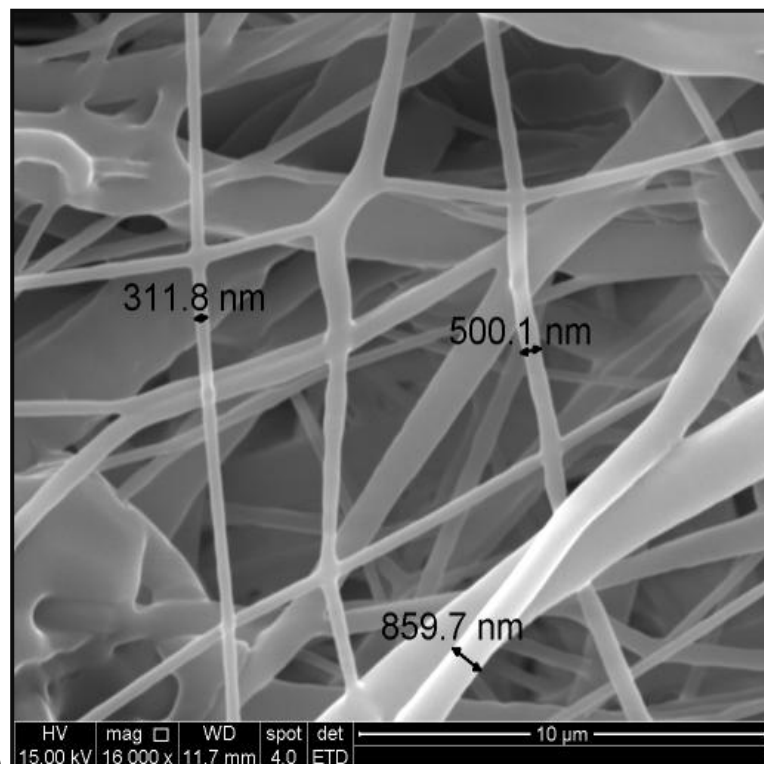
Na Figura 5.19, foram representadas as microfotografias das amostras com concentração 0% m/m (PCL puro), 16% m/m e 23% m/m progesterona. As amostras foram imersas em solução de PBS com pH7,4, por 5, 7 e 11. Nas microfotografias de 7 semanas, não foi possível diferenciar as características estruturais, portanto foram apenas representadas as microfotografias de 5 e 11 semanas. Foi possível observar que as

nanofibras aumentaram o diâmetro, mas este aumento não alterou as características iniciais delas.





c)



d)

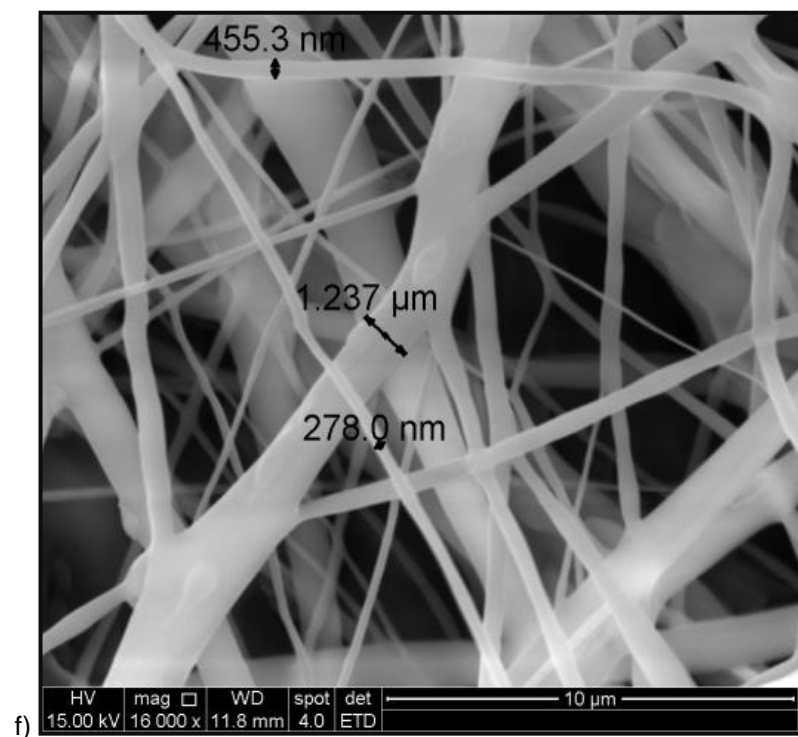
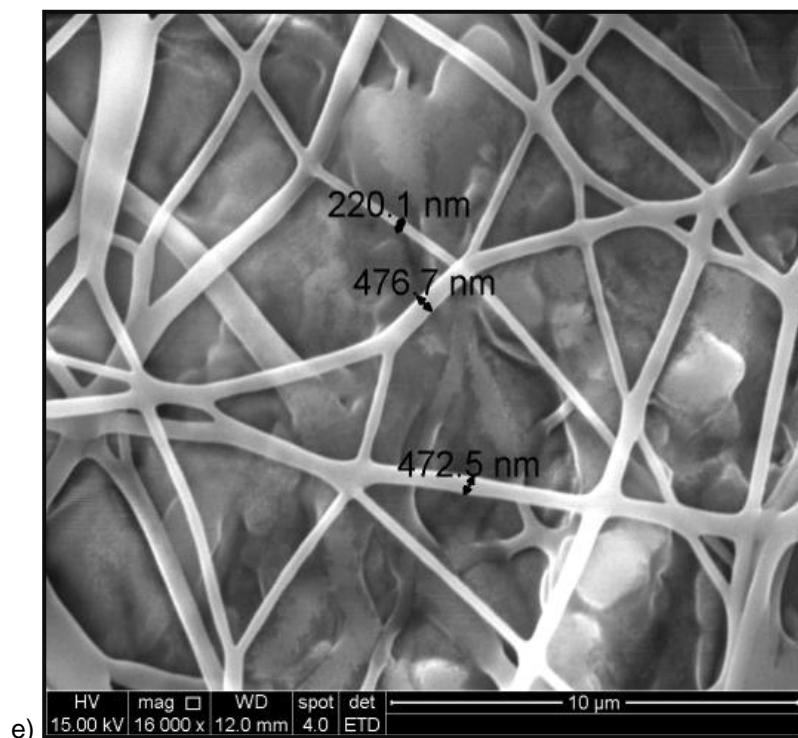


Figura 5.19: Microfotografia para as amostras após teste de degradação, sendo a) 0%/m/m progesterona com 5 semanas, b) 0%/m/m progesterona com 11 semanas, c) 16%/m/m progesterona com 5 semanas, d) 16%/m/m progesterona com 11 semanas, e) 23%/m/m progesterona com 5 semanas e e) 23%/m/m progesterona com 11 semanas.

A partir das microfotografias realizadas anteriormente, foram realizadas as ampliações em 1000x das amostras com voltagem de 20kV nas concentrações de 0%*m/m* (PCL puro) com 11 semanas, 16%*m/m* com 11 semanas e e) 23%*m/m* com 11 semanas para medição dos diâmetros das nanofibras (Figura 5.20). As médias encontradas dos diâmetros das nanofibras obtidas com concentrações de 0%*m/m*, 16%*m/m* e 23%*m/m* de progesterona foram, respectivamente: 561,63nm, 665,40nm e 799,79nm. Portanto, observa-se que as nanofibras tiveram um aumento dos diâmetros em comparação as nanofibras sem progesterona.

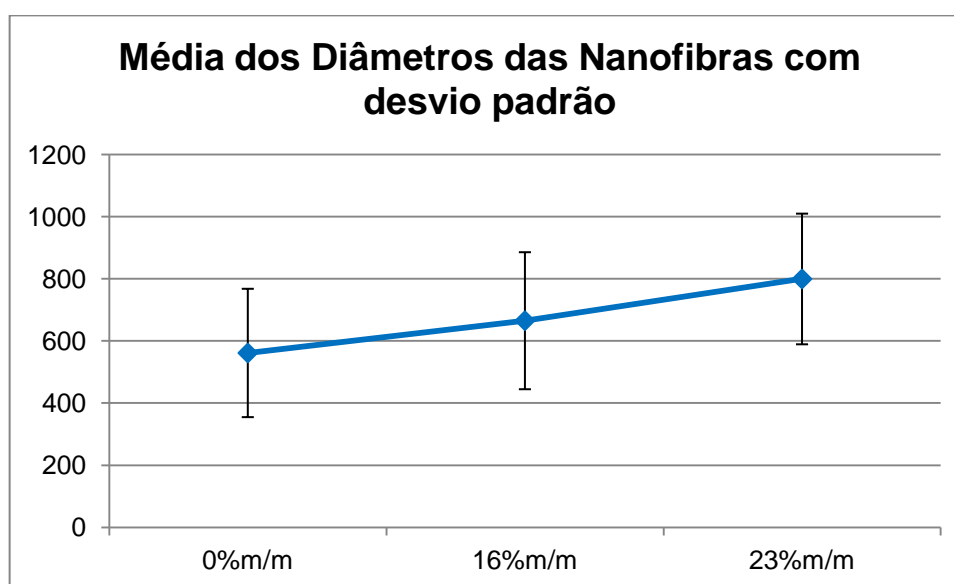


Figura 5. 20: Média dos diâmetros das nanofibras com concentrações de 0%*m/m*, 16%*m/m* e 23%*m/m* de progesterona.

De acordo com BARBANTI *et al.* (2005, 2008), a variação da massa é comumente utilizada na caracterização da degradação de polímeros biodegradáveis. BARBANTI *et al.* (2006) realizou um ensaio de degradação somente em meio alcalino com pH 12, 13 e 13,7 e a partir dos seus resultados da taxa de variação da massa em função do pH, foi extrapolado os resultados para o pH 7,4, fornecendo uma estimativa da degradação em meio fisiológico. Em seu estudo, as amostras de PCL durante o processo de degradação mostraram-se mais estáveis que amostras de outros polímeros. Portanto, foi proposto o ensaio de degradação com todas as amostras iniciando com a massa de 0,1g, em triplicata e em solução de PBS com pH 7,4. Elas foram secadas após os intervalos de degradação em dessecador à vácuo. As variações das massas medidas por balança analítica foram observadas na Figura 5.21. Assim, como no estudo do autor citado, pode-se observar uma possível perda constante da taxa de massa do

PCL com o tempo, sendo que as amostras com o hormônio progesterona tiveram uma perda levemente maior do que a amostra sem progesterona, provavelmente devido à massa também do hormônio que é liberada no meio ligeiramente alcalino. A perda de massa observada no período de 11 semanas variou aproximadamente de 10% para a amostra com 0% m/m progesterona, 15% para a amostra de 16% m/m progesterona e 20% para a amostra para a amostra de 23% m/m progesterona. Os resultados foram coerentes com o estudo realizado por BARBANTI *et al.* (2006), sendo que a perda de massa, provavelmente, ocorre em taxa constante.

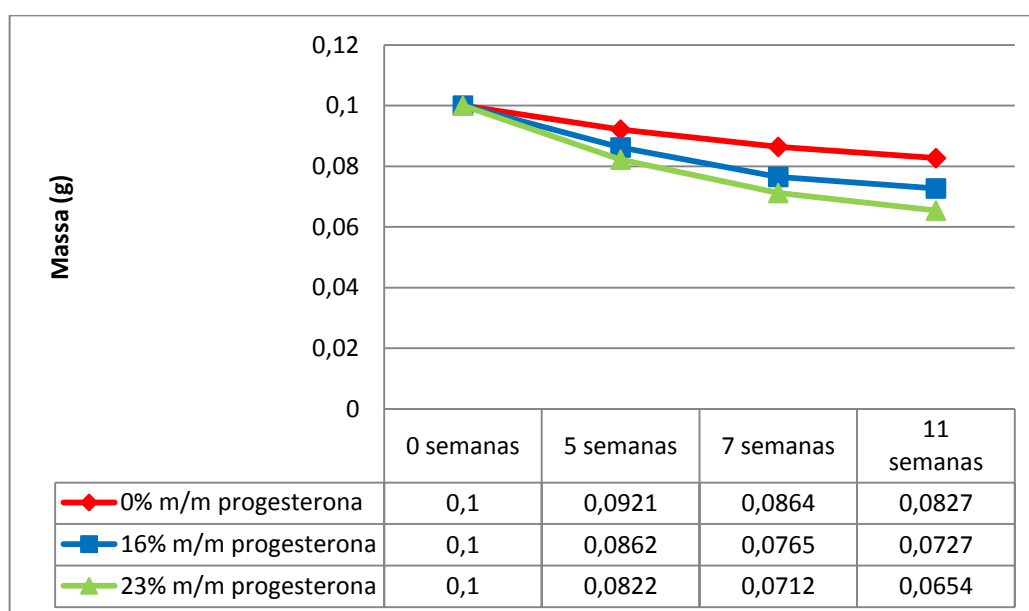


Figura 5.21: Gráfico da variação da massa das amostras em 5, 7 e 11 semanas.

5.2.7 Ensaio de Liberação Controlada do Fármaco

Durante a elaboração da curva de calibração, foi percebido que a progesterona não era solúvel em solução de PBS com pH7,4. A amostra para a curva de calibração foi agitada por uma semana e continuou com diversas áreas precipitadas. A amostra não foi solubilizada e a área em que foram retiradas as alíquotas possuíam mais ou menos precipitado. Ao realizar a análise por UV-VIS, as amostras demonstravam absorvâncias inconstantes sendo incoerente definir uma curva de calibração a partir dos resultados obtidos. Para tentar solucionar o problema, foi feita uma diluição da amostra. Mesmo assim, as amostras continuaram demonstrando inconstância das absorvâncias, como demonstra a Figura 5.22.

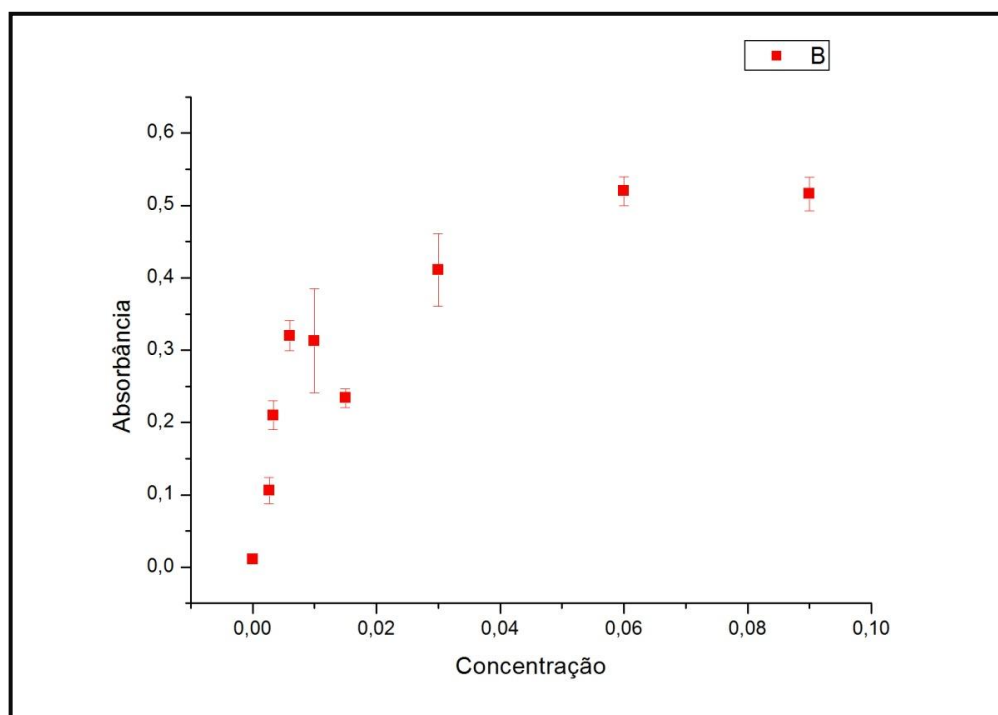


Figura 5.22: Inconstância das absorbâncias x concentração das amostras.

Sugere-se que o ensaio de liberação controlada por fármaco por UV-VIS não é o melhor método para a avaliação do sistema proposto, de nanofibras produzidas por eletrofiação e propõe-se que provavelmente melhores resultados *in vitro* serão obtidos por outros métodos disponíveis, como sugestão, o sistema de células de difusão vertical tipo *Franz*⁹.

⁹ **Modelo vertical proposto por Franz (1975):** em um sistema de células de difusão bicompartimentais utilizam tanto membrana sintética quanto tecido cutâneo (pele humana ou animal), separando um compartimento doador de um compartimento receptor, para conhecer o comportamento de cedência ou biofarmacêutico de uma formulação, no que diz respeito à penetração e/ou permeação do fármaco. Fonte: STORPIRTIS *et al.*, 2009.

6 CONCLUSÕES

O estudo foi dividido em duas etapas, sendo a primeira a síntese e caracterização de nanofibras utilizando o solvente ácido acético e o polímero PCL e a segunda a síntese e caracterização das nanofibras de PCL com adição do hormônio progesterona. Na primeira etapa, as amostras produzidas com concentração de 20%*m/m* de PCL apresentaram melhores características morfológicas e estruturais. As alterações nas velocidades de injeção e nas voltagens modificam os diâmetros das nanofibras. Após as análises de FTIR e DRX é possível concluir que, provavelmente, o ácido acético evapora durante o processo de eletrospinning, sendo que as bandas e os espectros observados foram típicos do polímero PCL. O ensaio de citotoxicidade resultou que a amostra não é citotóxica. Na segunda etapa, as amostras com concentrações de 16 e 23%*m/m* de progesterona apresentaram melhores características morfológicas e estruturais. A amostra em que foi aspergido o hormônio após o processo de eletrospinning foi descartada devido à perda da morfologia dela, observada por MEV. No ensaio de absorção foi possível observar que as nanofibras perdem completamente suas características após a imersão em pH ácido. No ensaio de degradação foi possível observar que as características das nanofibras foram mantidas mesmo após 11 semanas com as mesmas imersas em solução de PBS com pH 7,4 com perda de massa na faixa de 10% a 20%.

7 CONTRIBUIÇÕES ORIGINAIS AO CONHECIMENTO / RELEVÂNCIA DOS RESULTADOS

Os estudos de liberação controlada de fármaco tiveram um aumento relevante nos últimos anos devido principalmente o melhor aproveitamento da distribuição do fármaco no organismo e eficiência no tratamento. Alguns sistemas, como implantes contraceptivos, possuem grande adesão nos países desenvolvidos, pois eles foram utilizados por vários anos com a dosagem controlada e evitando a gravidez não planejada nas usuárias. Os implantes atuais do mercado foram feitos em polímeros não biodegradáveis, sendo que o profissional realiza a inserção e remoção do implante, após o período previsto de uso. A maior parte das usuárias desiste de continuar com o produto, pois além do incomodo presente durante a inserção e remoção, há também desconforto durante o uso, além de que a quantidade de hormônio liberada ainda ocasiona alguns efeitos colaterais, como a ausência de menstruação. Isto indica claramente uma necessidade de novos métodos eficazes envolvendo este tipo de liberação controlada de fármaco. Neste trabalho foi sintetizado um novo sistema com potencial para liberação controlada de fármaco. Foram produzidas nanofibras de PCL com adição do hormônio progesterona, obtidas pelo método de eletrofiação. O solvente utilizado foi apenas o ácido acético em todo o processo, diminuindo o contato com substâncias tóxicas durante o processo e limitando ainda mais a probabilidade de toxicidade nas amostras finais.

8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Realização do método de difusão vertical de *Franz* para ensaios *in vitro* de liberação e permeação cutânea;

Realização do teste de degradação com o período de 6 meses a 18 meses;

Realização da síntese de amostras de nanopartículas e nanoesferas utilizando somente o solvente ácido acético;

Realização de mais estudos para melhorar as condições de síntese do sistema de eletrofiação, para obter amostras com diâmetros menores, com menos “contas” e menor tempo de preparo da solução.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF REPRODUCTIVE HEALTH PROFESSIONALS. <<http://www.arhp.org/publications-and-resources/clinical-proceedings>> Acessado em 20/02/2013.

SOUTHERN RESEARCH INSTITUTE. <<http://www.southernresearch.org>> Acessado em 20/02/2013.

AGARWAL, S.; WENDORFF, J. H.; GREINER, A. Use of eletrofiação technique for biomedical applications, *Polymer*, p5603s-5621s, 2008.

AMERICAN STANDARD TESTING AND MATERIAL ASTM F1635-04a. *Standard Test Method for in vitro Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants*. New York, 2004, 5p.

BARBANTI S. H., ZAVAGLIA, C. A. C., DUEK, E. A. R. Bioresorbable polymers in tissue engineering, *Polímeros*, v.15, p13s-21s, 2005.

BARBANTI S. H., ZAVAGLIA, C. A. C., DUEK, E. A. R. Degradação acelerada de suportes de PCL e PLGA em meio alcalino, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v.16, n.2, p141s-148s, 2006.

BARBANTI S. H., ZAVAGLIA, C. A. C., DUEK, E. A. R. Effect of salt leaching on PCL and PLGA(50/50) resorbable scaffolds, *Materials Research*, v.11, p75s-80s, 2008.

BELINGEROVÁ, T., Inorganic nanofibers from the Czech Republic will replace objectionable nanoparticles in the cosmetics industry. *Kertak Nanotechnology*, Praga República Tcheca, 02 Dezembro 2009.

BEREK, J. S., GUANABARA, K. *Tratado de Ginecologia*. 14a edição. Editora Guanabara Koogan (Grupo GEN), Rio de Janeiro, 2008, 392p.

BHARDWAJ N., KUNDU S. Eletrofiação: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*, v.38, p325s-p347s, 2010.

BIZARRIA, M. T. M., D'ÁVILA, M. A., MEI, L. H. I. Non-woven nanofiber chitosan/PEO membranes obtained by eletrofiação, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.31, p57s-68s, 2014.

BOCK, N.; WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W.; DARGAVILLE, T. R. *Eletropulverização, a reproducible method for production of polymeric microspheres for biomedical applications*, *Polymers*, v.3, p131s-149s, 2010.

BOGNITZKI, M., CZADO, W., FRESE, T., SCHAPER, A., HELLWIG, M., STEINHART, M., GREINER, A., WENDORFF, J. *Nanostructured fibers via eletrofiação*. *Advanced Materials*, v.13, n.1, p70s-72s, 2001.

BRANNON-PEPPAS, L. Design and mathematical analysis of controlled release from microsphere-containing polymeric implants *Journal of Controlled Release*, v.20, p201s-208s, 1992.

BRUTON, L. L. *As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman*. 12a edição. Editora AMGH, Porto Alegre, 2012, 2079p.

CALLISTER, W. D., *Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução*. 8a edição. Editora LTC, São Paulo, 2012, 844p.

CARVALHO, S. M. de. *Análise do Comportamento de Cementoblastos de Ratos em Contato com o Produto Iônico da Dissolução de Vidros Bioativos*. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2013, 154p. (Tese, Doutorado em Engenharia Metalúrgica, Materiais e Minas).

CERCENÁ, R. *Liberção de fármacos modelo a partir de Filmes de acetato de celulose/poli(caprolactona triol)*. Florianópolis: Universidade Federal De Santa Catarina, 2008. 110p. (Dissertação, Mestrado em Química)

COSTA, L. M. M.; BRETAS, R. E. S.; GREGORIO, R. Effect of Solution Concentration on the Electrospray/Eletrofiação Transition and on the Crystalline Phase of PVDF, *Materials Sciences and Applications*, v.1, p247s-252s, 2010.

COSTA, R., OLIVEIRA, J., DE PAULA, G., PICCIANI, P., MEDEIROS, E., RIBEIRO, C., MATTOSO, L. Eletrofiação de polímeros em solução. Parte I: fundamentação teórica. *Polímeros*, v.22, n.2, p170s-177s, 2012.

DA SILVA FILHO, A. L., DE AGUIAR, R. A. L. P, DE MELO, V. H. *Manual de ginecologia e obstetrícia – SOGIMIG*. 5a edição. Editora COOPMED EDITORA MÉDICA, Belo Horizonte, 2012. 1308p.

D'ARCANGUES, C., VOGELSONG, K. Future methods of fertility regulation. Department of Reproductive Health and Research. *Training Course In Sexual And Reproductive Health Research*, 2009, Geneva/Suíça: World Health Organization, 2009.

DARNEY P. D., KLAISLE C. M., MONROE S. E., COOK C. E., PHILLIPS N. R., SCHINDLER A. Evaluation of a 1-year levonorgestrel-releasing contraceptive implant: side effects, release rates, and biodegradability, *Fertil Steril*, v.58, n.1, p137s-43s, 1992.

DE AZEVEDO, M. M.- *Nanoesferas e a liberação controlada de fármacos*. Campinas: Universidade Federal de Campinas (UNICAMP), 2003. 115p. (Monografia, Graduação em Química)

DHANARAJU, M. D., VEMA, K., JAYAKUMAR, R., VAMSADHARA, C. Preparation and characterization of injectable microspheres of contraceptive hormones, *International Journal of Pharmaceutics*, v.268, p23s–29s, 2003.

DHANARAJU, M. D., VEMA, K., JAYAKUMAR, R., VAMSADHARA, C. GOPINATH, D., AHMED, M. R. Characterization of polymeric poly(ϵ -caprolactone) injectable implant delivery system for the controlled delivery of contraceptive steroids *The Journal of Biomedical Materials Research A*, v.72, n.1, p63s-72s, 2006.

DOERGENS, A.; ROETHER, J. A.; DIPPOLD, D.; BOCCACCINI, A. R.; SCHUBERT, D. W. Identifying key processing parameters for the electrospinning of aligned polymer nanofibers. *Materials Letters*, v.140, n.1, p99s–102s, 2015.

DÚRAN, N. The Brazilian Network of Nanobiotechnology. 2ND MEETING OF NANOBIOTEC, 2, 2003, São Paulo: *Rede Nacional de Nanobiotecnologia*, 2003, p1s-20s.

ENAYATI, M., AHMAD, Z., STRIDE, E., EDIRISINGHE, M. Size mapping of electric field-assisted production of polycaprolactone particles, *Journal of the Royal Society*, v.7, n.4, p393s-402s, 2010.

FERREIRA, J. L.; GOMES, S.; HENRIQUES, C.; BORGES, J. P.; SILVA, J. C. Electrospinning Polycaprolactone Dissolved in Glacial Acetic Acid: Fiber Production, Nonwoven Characterization, and In Vitro Evaluation. *Journal of Applied Polymer Science*, v.131, n.22, 2014.

FORMHALS, A. *Process and apparatus for preparing artificial threads*. 1.975.504. 02 Out. 1934; *United States Patent*.

GRAF, R., DOMBB A., QUELLED P., BLUNK T., MILLERD, R. H., VERBAVATZ, J. M., LANGERF, R. The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.16, p215s-233s, 1995.

HAIDER, A., HAIDER, S., KANG, I. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arabian Journal of Chemistry*. Available online, 2015.

HAYASHI, T. Biodegradable Polymers For Biomedical Uses. *Progress in Polymer Science at Science Direct*, v.19, p663s-702s, 1994.

HSU, C., SHIVKUMAR, S. N,N-Dimethylformamide Additions to the Solution for the Eletrofiação of Poly(ϵ -caprolactone) Nanofibers. *Macromolecular Materials and Engineering*, v.289, p334s–340s, 2004.

HUBBELL, J. A., CHILKOTI, A. Perspective Chemistry Nanomaterials for Drug Delivery *Science*, v.337, n.6092, p303s-305s, 2012.

INOUE, K.; MACHIDA, Y.; SANAN, T. & NAGAI, T. News drugs administrations routes. *Drug Design and Delivery*, v.4, p55s-66s, 1989.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION ISO 10993-5. *Biological Evaluation of Medical Devices Part 5: Tests for Cytotoxicity: in vitro methods*, Genebra/Suíça, 1999, 52p.

KAI, D., LIOWA, S., JUN, X. Biodegradable polymers for eletrofiação: Towards biomedical applications. *Materials Science and Engineering*, v.45, p659s–p670s, 2014.

KATZUNG, B. G. *Farmacologia Básica e Clínica*. 10a Edição. Editora Lange, São Paulo, 2007, 1008p.

KREUTER, J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.47, p65s-81s, 2001.

KIM, T. G., PARK, T.G. Biomimicking extracellular matrix: cell adhesive RGD peptide modified electrospun poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) nanofiber mesh. *Tissue Engineering*, v.12, n.2, p221s-233s, 2006.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.75, p1s-18s, 2010.

LANGER, R., PEPPAS, N. Present and future applications of Biomaterials in controlled drug delivery systems, *Biomaterials*, v.2, p201s-214s, 1981.

LANGER, R. Implantable Controlled Release Systems, *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 21, p35s-51s, 1983.

LANGER, R., PEPPAS, N. Advances in biomaterials, drug delivery, and bionanotechnology, *AIChE Journal*, v.49, p2990s-3006s, 2003.

LAVAN, D. A., MCGUIRE, T., LANGER, R. Small-scale systems for *in vivo* drug delivery, *Nature Biotechnology*, v.21, n.10, p1184s-1191s, 2003.

LEIMANN, F., BIZ, M., KAUFMANN, K., MAIA, W., HONÇALVES, O., CARDOZO FILHO, L., SAYER, C., ARAÚJO, P. Characterization of progesterone loaded biodegradable blend polymeric nanoparticles, *Ciência Rural*, v.45, p2082s-2088s, 2015.

LEONG, K. W., LANGER, R. Polymeric controlled drug delivery *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.1, p199s-233s, 1987.

LOTTO N. T., CALIL M. R., GUEDES C. G. F., ROSA D. S. The effect of temperature on the biodegradation test, *Materials Science and Engineering C*, v.24, p659s-662s, 2004.

MASSON V., MAURIN, F., DEVISSAGUET, J. P., FESSI, H. Stability of poly (ϵ -caprolacton) nanospheres in sterile aqueous, *International Journal of Pharmaceutics*, v.139, p113s-123s, 1996.

MASSON V., MAURIN, F., DEVISSAGUET, J. P., FESSI, H. Influence of sterilization processes on poly(ϵ -caprolactone) nanospheres, *Biomaterials*, v.18, n.4, p327s-335s, 1997.

MELO, N. R. *Anticoncepção: Manual de Orientação Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia*. Editora Febrasgo, São Paulo, 2010. 115p.

MIDDLETON, J. C., TRIPTON, A. J. Synthetic Biodegradable Polymers as Medical Devices. *Medical Plastics and Biomaterials Magazine*, 1998.

NAIRA, L. S., LAURENCINA, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials *Progress in Polymer Science*, v.32, p762s–798s, 2007.

OLIVEIRA, J. E., MEDEIROS, E. S., CARDOZO, L., VOLL, F., MADUREIRA, E. H., MATTOSO, L. H. C., ASSIS, O. B. G. *Development of poly(lactic acid) nanostructured membranes for the controlled delivery of progesterone to livestock animals*. v33, p844s-849s, 2013.

ORÉFICE, R. L., PEREIRA, M. M., MANSUR, H. S. *Biomateriais: Fundamentos e Aplicações*. 1a edição. Editora Cultura Médica, Rio de Janeiro, 2006, 552p.

PARK, H., YOO, H., HWANG, T., PARK, T., PAIK, D., CHOI, S., KIM, J. H. Fabrication of levofloxacin-loaded nanofibrous scaffolds using coaxial eletrofiação, *Journal of Pharmaceutical Investigation*, v42, p89s–93s, 2012.

PARK, J., LAKES, R. *Biomaterials: an introduction*. 2a edição. Editora Plenum Press, New York, 1992. 394p.

PERALTA, O., DIAZ, S., CROXATTO, H. Subdermal Contraceptive Implants, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. v.53, n.1, p223s-226s, 1995.

POLINI, A., PISIGNANO, D., PARODI, M., QUARTO, R., SCAGLIONE, S. Osteoinduction of human mesenchymal stem cells by bioactive composite scaffolds without supplemental osteogenic growth factors. *PLoS One.*; v.6, n.10, e26211, 2011.

PORTELA, P. M. D. *Montagem e Automatização de um Sistema de Eletrofiação*. Braga/Portugal: Universidade do Minho, 2010. 120p. (Dissertação, Mestrado em Engenharia Eletrônica Industrial e Computadores)

RAMAKRISHNA S., FUJIHARA, K., TEO, W., LIM, T., MA, Z. *An introduction to electrospinnig and nanofibers*. 1a edição. Editora World Scientific Publishing Company, Singapore, 2006, 396p.

REEVES, M. Biodegradable implants. *Woman Care Global*, 2011, São Diego/Estados Unidos, 31 outubro 2011.

ROGERO, S. O., LUGÃO, A. B., IKEDA, T. I., CRUZ, A. S. Teste *in vitro* de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias, *Materials Research*, v.6, n.3, p317s-320s, 2003.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; FREITAS, L. L., GUTERRES, S. S. Caracterização e Estudo de Estabilidade de Suspensões de Nanocápsulas e de Nanoesferas Poliméricas Contendo Diclofenaco. *Acta Farmaceutica Bonaerense*. v.21, n.2, p99s-106s, 2002.

SCHUEREN, L. V. D., SCHOENMAKER, B., KALAOGLU, O. I., CLERCK, K. An alternative solvent system for the steady state eletrofiação of polycaprolactone *European Polymer Journal*, v.47, p1256s–1263s, 2011.

SILL, T. J.; VON RECUM, H. A. Eletrofiação: applications in drug delivery and tissue engineering, *Biomaterials*, v.29, pp.1989-2006, 2008.

SILVA, P. *Farmacologia*. 7a edição, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2006. 1398p.

SILVA, G. R.; LIMA, T. H.; ORÉFICE, R. L.; FERNANDES-CUNHA, G. M.; SILVA-CUNHA, A.; ZHAO, M.; BEHAR-COHEN, F. In vitro and in vivo ocular biocompatibility of electrospun poly(e-caprolactone) nanofibers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.20, p9s-19s, 2015.

SINHA, V. R.; TREHAN, A. Biodegradable microspheres for protein delivery. *Journal of Controlled Release*, v.90, n.3, p261s-280s, 2003.

SOUZA, M. A.; OLIVEIRA, J. E.; MEDEIROS, E. S.; GLENN, G. M.; MATTOSO, L.H. C. Controlled Release of Linalool Using Nanofibrous Membranes of Poly(lactic acid) Obtained by Electrospinning and Solution Blow Spinning: A Comparative Study. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v.15, n.8, p5628s-5636s, 2015.

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAI, M.N. *Ciências Farmacêuticas: Biofarmacotécnica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. 321p.

321p. SUN, H., MEI, L., CUI, S., WANG, P. The *in vivo* degradation, absorption and excretion of PCL-based implant, *Biomaterials*, v.27, p1735s–1740s, 2006.

TIAN, H., TANG, Z., ZHUANG, X., CHEN, X., JING, X. Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application, *Progress in Polymer Science*, v.37, p237s– 280s, 2012.

TORCHILIN, V. P. e. TRUBETSKOY, V. S. Which polymers can make nanoparticulate drug carriers long-circulating?, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.16, p141s-155s, 1995.

VENKATARAMAN, S., HEDRICK, J. L., ONG, Z. Y., YANG, C., RACHEL, P. L., HAMMOND, P. T., YANG, Y. Y. The effects of polymeric nanostructure shape on drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.63, p1228s–1246s, 2011.

VIGO, F., LUBIANCA, J., CORLETA, H. Progestágenos: farmacologia e uso clínico, *Femina*, v. 39, p128s-138s, 2011.

VILLANOVA, J. C. O.; OREFICE, L. R.; CUNHA, A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v.20, n.1, p51s-64s, 2010.

VILLANOVA, J. C. O. *Desenvolvimento e caracterização de copolímeros obtidos a partir de monômeros acrílicos e metacrílicos visando a aplicação como excipientes farmacêuticos para preparação de matrizes inertes por compressão direta*. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2011. 274p. (Tese, Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Minas)

WANG, S. H., ZHANG L. C., LIN F., SA X. Y., ZUO J. B., SHAO Q. X., CHEN G. S., ZENG S. Controlled release of levonorgestrel from biodegradable poly(d,l-lactide-co-glycolide) microspheres: *In vitro* and *in vivo* studies, *International Journal of Pharmaceutics*, v.301, p217s–225s, 2005.

WANG, X., WANG, Y., WEI, K., ZHAO, N., ZHANG, S., CHEN, J. Drug distribution within poly(ϵ -caprolactone) microspheres and *in vitro* release, *Journal of Materials Processing Technology*, v.209, p348s-354s, 2009.

WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W.; The return of a forgotten polymerpolycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science*, v.35, p1217s-1256s, 2010.

YANG, Y. Y.; CHUNG, T. S.; BAY, X. L.; CHAN, W. K.; Effect of preparation conditions on morphology and release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion method. *Chemical Engineering Science*, v.55, p2223s-2236s, 2000.

ZHANG, H., LOU, S., WILLIAMS, G. R., BRANFORD-WHITE, C., NIE, H., QUAN, J., ZHU, L. M. A systematic study of captopril-loaded polyester fiber mats prepared by Eletrofiação, *International Journal of Pharmaceutics*, v.439, p100s-108s, 2012.