

Guida Maria Rodrigues Carvalho

DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS
NANOFIBROSAS PARA A LIBERTAÇÃO
CONTROLADA E LOCALIZADA DE ANTIBIÓTICOS

Dissertação do Mestrado Integrado em Engenharia Química,
Apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade de Coimbra

Setembro de 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Guida Maria Rodrigues Carvalho

DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS NANOFIBROSAS PARA A LIBERTAÇÃO CONTROLADA E LOCALIZADA DE ANTIBIÓTICO

Dissertação do Mestrado Integrado em Engenharia Química, sob a orientação da Professora Doutora Maria Margarida Lopes Figueiredo e da Investigadora Pós-doc. Patrícia Manuela Almeida Coimbra
Apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Supervisores:

Professora Doutora Maria Margarida Lopes Figueiredo
Investigadora Pós-doc. Patrícia Manuela Almeida Coimbra

Coimbra
2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

*“The saddest aspect of life right now is that science gathers knowledge
faster than society gathers wisdom.”*

Isaac Asimov

AGRADECIMENTOS

A materialização deste trabalho só foi possível com o tributo de diversas pessoas, às quais me encontro profundamente agradecida.

Em primeiro quero agradecer à Professora Doutora Margarida Figueiredo, minha orientadora, pelo apoio e incentivo no desenvolvimento deste trabalho. Agradeço à Doutora Patrícia Coimbra, também minha orientadora, pela confiança, pela disponibilidade nos momentos de maior e menor dúvida e acima de tudo pelo exemplo de perseverança.

Agradeço também à Professora Doutora Teresa Gonçalves e Doutora Alexandra Abrunheiro da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, ao Engenheiro António Fonseca e Engenheiro Victor Redondo do Instituto Pedro Nunes e Doutora Rose Cordeiro do Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra pela colaboração durante o percurso deste trabalho.

Quero também agradecer aos meus amigos, aos sobrinhos (Pedro e Tiago) e afilhada pela compreensão nas minhas constantes ausências; em especial à Cristina Bento e Mariana Pires pelo companheirismo, motivação e amizade durante todo este percurso.

Aos meus pais, que mesmo nas aventuras menos assertivas, sempre me apoiaram e que serviram como pilares, exemplo de dedicação e força. Por fim ao avô Adelino, que embora não presente, por “nos” ter ensinado que nunca é tarde...

... a todos o meu muito obrigada!

RESUMO

Este trabalho teve como principal objetivo desenvolver membranas nanofibrosas de base polimérica, com dois fármacos incorporados, sulfato de gentamicina e dexametasona, utilizando a técnica de electrofiação (electrospinning). Pretende-se que estas membranas sejam utilizadas no tratamento de eventuais infeções bacterianas do tecido ósseo, que podem surgir no seguimento de uma intervenção cirúrgica ortopédica. Para tal foi necessário configurar um dispositivo polimérico que liberte os fármacos no local intervencionado por um período de cerca de quatro semanas, ou seja, um sistema de libertação controlada (SLC) implantável.

Os fármacos incorporados têm como funções combater a possível infeção bacteriana (o sulfato de gentamicina) e moderar a resposta inflamatória ao implante e simultaneamente promover e regeneração do tecido ósseo danificado (dexametasona).

Com o objetivo de atingir um longo período de libertação durante o tratamento, e tendo em conta que o dispositivo tem de ser biocompatível e biodegradável, para que não haja necessidade de remoção do mesmo após tratamento, optou-se pela utilização do polímero poli (ácido láctico) (PLA).

Tendo em conta que o sulfato de gentamicina (GS) é um fármaco hidrófilico, ou seja, ter uma grande afinidade com a água, o que leva a que se difunda rapidamente na matriz polimérica optou-se por introduzir o fármaco em nanotubos de haloisite que, em princípio, retardam a libertação do fármaco para o exterior da matriz. Estes nanotubos após carregamento com o GS foram introduzidos na solução polimérica a electrofiar.

O trabalho realizado foi dividido em duas fases: a primeira envolveu o tratamento e o carregamento do GS nos nanotubos e a caracterização dos mesmos, e a segunda direccionou-se para o estudo das fibras resultantes da electrofiação.

Antes de serem carregados com a GS, os nanotubos de haloisite foram sujeitos a um tratamento ácido, com o intuito de aumentar o tamanho do lúmen e com isso aumentar a sua capacidade de carregamento. A eficácia do tratamento foi revelada pela técnica de adsorção de azoto, que demonstrou um aumento da superfície específica e do volume de poro dos nanotubos tratados relativamente aos não tratados. A quantificação da GS carregada nos nanotubos feita por termogravimetria confirmou estes resultados, tendo-se verificado um aumento no carregamento de 17% (p/p) (nos tubos não tratados) para 25% (p/p) (nos tubos tratados).

A segunda fase do trabalho envolveu a produção e a caracterização das membranas fibrosas carregadas com os fármacos. Inicialmente, e com intuito exploratório, prepararam-se e electrofiaram-se algumas formulações, designadas de formulações preliminares. A caracterização destas membranas, nomeadamente a caracterização morfológica, revelou a presença de uma quantidade significativa de *beads* e de alguns aglomerados de haloisite não totalmente incorporados nas nanofibras. Assim, e com base nestes resultados, procederam-se a alguns ajustes no modo de preparação e composição nas formulações seguintes, tendo-se procedido igualmente ao ajuste dos parâmetros de processo da electrofiação (nomeadamente caudal de alimentação e voltagem aplicada). Estas novas formulações são designadas de formulações finais.

Com as formulações finais, testaram-se várias combinações possíveis de incorporação dos dois fármacos. Assim, e para comparação, prepararam-se membranas só com um dos fármacos incorporados: membrana com dexametasona (PLA+DEX); membrana com gentamicina na forma livre (PLA+GS). Posteriormente prepararam-se membranas com a GS imobilizada nos tubos de haloisite (PLA+HGS) e membranas com metade da GS na forma “livre” e metade da GS imobilizada nos tubos de haloisite (PLA+HGS+GS). Adicionalmente prepararam-se duas membranas com os dois fármacos incorporados em simultâneo: uma onde a gentamicina incorporada se encontra imobilizada nos nanotubos (PLA+HGS+DEX), e outra onde metade do GS se encontra na forma livre e a outra metade imobilizada nos nanotubos (PLA+HGS+GS+DEX).

As membranas produzidas foram caracterizadas por SEM, determinação do ângulo de contacto com a água, ensaios de libertação *in vitro* e testes microbiológicos.

De uma forma geral, todas as membranas resultantes das formulações finais apresentavam uma quantidade reduzida de *beads* e menos agregados de nanotubos (naquelas onde estavam presentes), o que revela que as alterações efetuadas nas formulações e nos parâmetros operacionais tiveram os efeitos desejados.

A análise morfológica das fibras permitiu também estimar o diâmetro médio destas, tendo-se obtido, para todas as formulações, fibras com diâmetros médios entre os 1,9 e 3,7 μm , o que podem ser considerados diâmetros elevados, tendo em conta os diâmetros típicos das fibras produzidas pela técnica de electrofiação.

Os testes de libertação *in vitro* foram realizados durante um período de 28 dias (4 semanas), em meio semelhante ao fluido fisiológico, com o intuito de obter os perfis de libertação dos fármacos existentes em cada uma das membranas.

Para todas as membranas, a cinética de libertação da gentamicina demonstrou ser bastante mais rápida que a cinética de libertação da dexametasona. Este resultado era esperado, tendo em conta a natureza altamente hidrófila da GS e o carácter marcadamente hidrofóbico da DEX. Nas membranas com os dois fármacos incorporados simultaneamente, verificou-se que os perfis de libertação dos dois fármacos eram alterados devido à presença do outro fármaco. Este efeito é mais evidente para os perfis da dexametasona, onde a presença do GS resulta num considerável aumento da percentagem de fármaco libertado e em cinéticas de libertação mais rápidas, comparativamente com o perfil da dexametasona a partir da membrana em que esta se encontra imobilizada sozinha (PLA+ DEX).

Contrariamente ao que se pretendia, os perfis de libertação da GS a partir das membranas PLA+GS e PLA+HGS não demonstraram ser significativamente diferentes, sendo que este resultado poderá ser parcialmente justificado pela considerável diferença de diâmetros médios entre as fibras que constituem as duas membranas.

Finalmente, os testes microbiológicos realizados com as membranas na presença da estirpe de bactérias *Staphylococcus aureus*, revelaram que todas as membranas que incorporavam GS apresentaram a capacidade de inibir a proliferação das bactérias, o que permite concluir que o processo de incorporação da GS e o processo de electrofiação não afetou as propriedades antibacterianas do antibiótico.

Palavras-chave: *Sistemas de libertação controlada, membranas fibrosas, poli (ácido láctico), electrofiação, nanotubos de haloisite, sulfato de gentamicina, dexametasona.*

ABSTRACT

This work had a main objective the development of polymeric fibrous loaded with two drugs gentamicin sulfate and dexamethasone using the electrospinning technique. It is intended that these membranes can be used in the treatment of possible bacterial bone infections, that can arise following an orthopedic surgical procedure. To achieve this, it was necessary to configure a polymeric device with the capacity to release the drugs at the injured site by a period of about four weeks, thus, an implantable controlled release system (SLC).

The drugs incorporated have the functions of fighting a possible bacterial infection (gentamicin sulfate) and moderate the inflammatory response to the implant and simultaneously promote the regeneration of the damaged bone tissue (dexamethasone).

In order to achieve a long period of drug release during therapy, and, given that the device must be biocompatible and biodegradable, so there is no need for a second surgical procedure for removing the device after the treatment, it was decided to use the polymer poly (lactic acid) (PLA).

Given that gentamicin sulfate (GS) is a hydrophilic drug, it has a great affinity with water, which leads to quickly diffuse into the polymer matrix, it was decided immobilized this drug in halloysite nanotubes that function as nanocontainers delaying the release of the drug. These nanotubes after loading with the GS were introduced into the electrospinning polymer solution.

The work was divided in two phases: the first involves the treating and the loading of the nanotubes with GS and the characterization of the same. In the second stage, deals with the production of the drug loaded electrospun membranes and its characterization.

Before being loaded with GS the halloysite nanotubes were treated with an acid solution in order to increase the lumen size and thereby increasing its loading capacity. The efficacy of this treatment was revealed by nitrogen adsorption measurements, which showed an increase in the specific surface area and in the pore volume of the treated nanotubes relative to the untreated ones. The quantification of GS loaded into the nanotubes, made by thermal-gravimetric analysis, confirmed these results, by showing an increase in the GS loading from 17% (w / w) (in the untreated nanotubes) to 25% (w / w) (in the treated nanotubes).

The second phase of the study involved the production and characterization of fibrous membranes loaded with the drugs. Initially, and with an exploratory aim, were prepared and

electrospun some formulations designated as preliminary formulations. The morphological characterization of these membranes revealed the presence of a significant amount of beads and some halloysite clusters not fully incorporated into the nanofibers. Thus, based on these results, some adjustments were made in the composition in the following formulation, as well as in its preparation procedure. Additionally, the electrospinning process parameters (such as feed rate and applied voltage) were also adjusted. These new formulations were designated as final formulations.

With the final formulations, were tested several possible combinations of incorporation of the two drugs. Thus, for comparison, some membranes were prepared with only one incorporated drug: a membrane with dexamethasone (PLA + DEX); a membrane with GS in a “free” form (PLA+ GS). Subsequently membranes were prepared with the GS immobilized with GS immobilized in the halloysite nanotubes (PLA+HGS); and a membrane with half of the incorporated GS in the "free" form and the other half immobilized in halloysite nanotubes (PLA+HGS+GS). Additionally, two membranes were prepared where the two drugs were incorporated simultaneous: one where the embedded gentamicin was immobilized in the nanotubes (PLA+HGS+DEX), and another, where half of GS was in the free form and the other half immobilized in the nanotubes (PLA+HGS +GS+DEX).

The membranes were characterized by SEM, determination of the contact angle with water, *in vitro* release tests and microbiological tests.

In general, all of the fibrous membranes resultant from the electrospinning of final formulations had a reduced amount of beads and fewer and smaller nanotubes aggregates (those in which nanotubes were present), indicating that the changes made in the formulation and operational parameters had the desired effect.

The morphological analysis of the fibrous membranes by SEM also permitted to estimate the average diameter of the fiber, having been obtained, for all formulations, fibers with average diameters between 1.9 and 3.7 μm , which can be considered high diameters, taking into account the typical diameters of fibers produced by electrospinning.

In vitro release tests were carried out over a period of 28 days (4 weeks), in an environment similar to physiological fluid, in order to obtain the release profiles of the drugs immobilized in each of the membranes.

For all membranes, the release kinetics of gentamycin demonstrated to be quite faster than the release kinetics of dexamethasone. This result was expected, given the highly

hydrophilic nature of GS and the markedly hydrophobic character of DEX. In the membranes with both drugs incorporated simultaneously, it was found that the release profiles of the two drugs were altered due to the presence of the other drug. This effect was most pronounced for DEX release profiles, where the presence of GS resulted in a considerable increase in the percentage of DEX released and in a faster release kinetics, when compared with the release profile from the membrane where DEX was immobilized alone (PLA+DEX).

Contrary to what was intended, the GS release profiles from PLA + GS membranes and PLA + HGS were not significantly different. This result could be partially explained by the significant difference in mean diameters between the fibers that constitute the two membranes.

Finally, the microbiological tests performed with membranes in the presence of the strain of *Staphylococcus aureus* revealed that all membranes that incorporated GS had the ability to inhibit the proliferation of the bacteria, which suggests that the process of GS immobilization and the process the electrospinning didn't affect the antibacterial properties of the antibiotic.

Keywords: *controlled release systems, fibrous membrane, poly (lactic acid), electrospinning, halloysite nanotube, gentamicin sulfate, dexamethasone.*

INDICE

AGRADECIMENTOS.....	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xix
ÍNDICE DE TABELAS	xxi
NOMENCLATURA E SIMBOLOS.....	xxiii
CAPÍTULO 1.....	1
1.1 MOTIVAÇÃO	1
1.2 OBJETIVOS	3
1.3 ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO.....	4
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1 SISTEMAS DE LIBERTAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS	8
2.2 SISTEMAS DE LIBERTAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS DE BASE POLIMÉRICA	9
2.3 MÉTODO DE ELECTROFIAÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE MEMBRANAS FIBROSAS COMO SLC	11
2.4 POLIÉSTERES UTILIZADOS NA PREPARAÇÃO DE NANOFIBRAS POR ELECTROFIAÇÃO	14
2.4.1 POLI (ÁCIDO LÁCTICO)	14
2.5 NANOTUBOS DE HALOSITE	16
2.6 FÁRMACOS	19
CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 MATERIAIS E REAGENTES	23
3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	24
3.2.1 TRATAMENTO DOS NANOTUBOS DE HALOSITE COM ÁCIDO SULFÚRICO	26
3.2.2 CARREGAMENTO DAS NANOPARTÍCULAS DE HALOSITE COM SULFATO DE GENTAMICINA.....	26
3.2.3 PREPARAÇÃO DAS MEMBRANAS NANOFIBROSAS DE POLI (ÁCIDO LÁCTICO) (PLA) PELA TÉCNICA DE ELECTROFIAÇÃO.....	27
3.2.4 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOTUBOS DE HALOSITE E DAS MEMBRANAS ELECTROFIADAS.....	30
3.2.5 ESTUDO DA LIBERTAÇÃO IN VITRO DOS FÁRMACOS ENVOLVIDOS	33
3.2.6 TESTES À ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA	35
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOTUBOS DE HALOSITE	37
4.1.2 ANÁLISE SEM.....	38
4.1.3 DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHOS POR DLS	38
4.1.4 ISOTÉRMICA DE ADSORÇÃO.....	39
4.1.5 COMPORTAMENTO TÉRMICO (TGA)	41

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOFIBRAS DE BASE POLIMÉRICA	44
4.2.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS MEMBRANAS NANOFIBROSAS.....	44
4.2.2 ANÁLISE DO COMPORTAMENTO HIDRÓFILICO DAS NANOFIBROSAS	50
4.2.3 ESTUDO DA LIBERTAÇÃO IN VITRO DO SULFATO DE GENTAMICINA E DA DEXAMETASONA	51
4.2.4 ANÁLISE AOS TESTES MICROBIOLÓGICOS	59
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES E PRESPECTIVAS FUTURAS	61
BIBLIOGRAFIA.....	65
ANEXOS.....	73
ANEXO I - AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE CARREGAMENTO DOS NANOTUBOS	75
ANEXO II - CURVAS DE CALIBRAÇÃO, PARA A DEXAMETASONA E SULFATO DE GENTAMICINA	76
ANEXO III – GRÁFICOS DA DISPERSÃO DE TAMANHOS DOS NANOTUBOS VS INTENSIDADE DE LUZ - DLS.....	77

Figura 2.1 - Unidade repetição do PLA	15
Figura 2.2 - Degradação do ácido láctico proveniente da hidrólise do PLA pelo ciclo de Krebs (Adaptado de Júnior e Wada, 2007).....	15
Figura 2.3 - Nanotubos de haloisite, (a) imagem SEM e (b) imagem TEM (adaptado de Qi et al,2012).....	17
Figura 2.4 - Estrutura interna e externa dos nanotubos de haloisite (adaptado de Abdullayev & Lvov, 2013)	17
Figura 2.5 - Mecanismo de carregamento de agentes ativos para o interior do lúmen dos nanotubos de haloisite (adaptado de Abdullayev e Lvov, 2013).....	18
Figura 2.6 - Molécula do Sulfato de gentamicina (adaptado de National Center for Biotechnology Information)	20
Figura 2.7 - Molécula da dexametasona (Sigma-Aldrich)	21
Figura 3.1 - Fluxograma das etapas do procedimento experimental	25
Figura 3.2 - Partículas de haloisite com sulfato de gentamicina	27
Figura 3.3 – Equipamento de electrofiação.....	28
Figura 3.4 - Formação da membrana por electrofiação.....	29
Figura 4.1 - Nanotubos de haloisite por análise SEM (ampliação 50000x e 100nm).....	38
Figura 4.2 - Gráfico das curvas isotérmicas de adsorção/dessorção de azoto.....	41
Figura 4.3 - Representação da distribuição de tamanhos dos poros.....	41
Figura 4.4 - Curva de TGA para o estudo da haloisite pura (- - -)sulfato de gentamicina,(—) haloisite, (- · -)haloisite carregada com GS.....	42
Figura 4.5 - Curva de TGA para o estudo após o tratamento da haloisite com ácido sulfúrico (- - -)sulfato de gentamicina,(—)haloisite, (- · -) haloisite carregada com GS	43
Figura 4.6 - Membrana pPLA +DEX (ampliação 250x, 20µm)	45
Figura 4.7 - Membrana pPLA + HGS+ GS (ampliação 16000x, 200nm).....	45
Figura 4.8 - Membrana pPLA+HGS+GS+ ácido oleico (ampliação 10000x, 1µm))	45
Figura 4.9 - Membrana de PLA+GS e representação do histograma distribuição de diâmetros das fibras.....	47
Figura 4.10 - Membrana de PLA+DEX e representação do histograma distribuição de diâmetros das fibras	47

Figura 4.11 - Membrana PLA+H e representação do histograma de distribuição de diâmetros das fibras.....	48
Figura 4.12 - Membrana PLA+HGS e representação do histograma de distribuição de diâmetros das fibras	48
Figura 4.13 - Membrana PLA+HGS+GS e representação do histograma de distribuição de diâmetros das fibras	48
Figura 4.14 - Membrana PLA+HGS+DEX e representação do histograma de distribuição de diâmetros das fibras	48
Figura 4.15 - Membrana de PLA+HGS+GS+DEX e representação do histograma distribuição de diâmetros das fibras	49
Figura 4.16 - Representação da distribuição da média e desvio padrão dos ângulos de contacto para as formulações.....	51
Figura 4.17 - Perfil de libertação (%) de sulfato de gentamicina e dexametasona para as membranas nas formulações preliminares durante 21 dias	53
Figura 4.18 - Perfil de libertação (%) de sulfato de gentamicina libertado ao longo de 28 dias	54
Figura 4.19 - Perfil de libertação (%) de sulfato de gentamicina libertado.....	56
Figura 4.20 - Perfil de libertação (%) da dexametasona em 28 dias	57
Figura 4.21 - Comparação do perfil de libertação (%) entre libertação dos dois fármacos sulfato de gentamicina e dexametasona para a membrana PLA+HGS+DEX.....	58
Figura 4.22 - Comparação do perfil de libertação (%) entre libertação dos dois fármacos sulfato de gentamicina e dexametasona para a membrana PLA+HGS+DEX+GS	58
Figura 4.23 - Atividade antibacteriana do GS incorporado nas nanofibras contra a estirpe de bactérias Staphylococcus aureus	60
Figura 4.24 - Atividade antibacteriana do GS incorporado nas nanofibras contra a estirpe de bactérias Staphylococcus aureus	60
Figura A II.1 - Curva de calibração para a dexametasona	76
Figura A II.2 - Curva de calibração para a Sulfato de gentamicina.....	76
Figura AIII.1 - Distribuição de tamanhos dos nanotubos de haloisite sem tratamento ácido	77
Figura AIII.2 - Distribuição de tamanhos dos nanotubos de haloisite com tratamento ácido.....	77

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 - Exemplos de alguns SLC de base polimérica para a libertação de antibióticos na área da ortopedia (Nandi et al, 2009)	11
Tabela 2.2 - Revisão de alguns polímeros utilizados em electrofiação como SLC.....	13
Tabela 2.3 - Revisão às fibras produzidas por electrofiação de poli (ácido láctico) (PLA) com características de SLC	16
Tabela 3.1 - Lista de reagentes utilizados.....	23
Tabela 3.2 - Formulações preliminares	29
Tabela 3.3 - Formulações finais.....	30
Tabela 4.1 - Tamanhos médios dos nanotubos de haloisite pura e haloisite tratada, e os respetivos índices de polidispersividade	39
Tabela 4.2 - Valores obtidos a partir das isotérmicas de adsorção de azoto	40
Tabela 4.3 - Valores obtidos através da técnica de TGA	43
Tabela 4.4 - Distribuição da média e desvio padrão (σ) dos diâmetros (nm) das fibras das formulações finais.....	50
Tabela 4.5 - Dados relativos atividade antibacteriana do sulfato de gentamicina imobilizado nas nanofibras contra a estirpe de bactérias <i>Staphylococcus aureus</i>	59

NOMENCLATURA E SIMBOLOS

BET – Teoria de Brunauer-Emmett-Teller

BJH – Método de Barret-Joyner-Helenda

CIM – Concentração inibidora mínima

DEX – Dexametasona

DLS – Dispersão de luz dinâmica

DMF – Dimetilformamida

Dp – Diâmetro de poro

GS ou GM – Sulfato de gentamicina

HÁ - Hidroxiapatite

HGS – Halosite carregada com sulfato de gentamicina

PBS – Solução salina de tampão fosfato

PCS – Espectrofotometria de correlação de fótons

Pdl – Índice de polidispersidade

PEG – poli (etileno glicol)

PHBV – poli (hidroxibutirato- co- ricinoleico-éster-anidrido)

PLA – Poli (ácido láctico)

pPLA – denominação de formulação preliminar de membranas de base polimérica com PLA

P (SA-RA) – poli(sebácico-co-ricinoleico-éster-anidrido)

SLC – Sistema de libertação controlada

TEM - Microscopia Electrónica de Transmissão

Vp – Volume de poro

σ – Desvio padrão

CAPÍTULO 1

1.1 MOTIVAÇÃO

Atualmente a redução do número de infecções pós-operatórias deve-se a tratamentos que recorrem a antibióticos. Este tratamento crucial, por exemplo, no campo da ortopedia devido às complicações inerentes à pós-cirurgia, como a osteomielite que é um processo inflamatório acompanhado pela destruição óssea. (Meani & Romanò, 2007)

Dada a sua importância tem crescido o interesse por parte da comunidade científica no desenvolvimento de formas farmacêuticas para administrar o antibiótico localmente com o intuito de complementar o tratamento com antibiótico sistémico. (Meani *et al*, 2007)

A necessidade de encontrar uma configuração que possa transportar o antibiótico ao local de infeção através de um sistema de libertação controlada e localizada (SLCs) provem das limitações do tratamento com antibiótico sistémico. Estas limitações prendem-se com: a baixa inserção de antibiótico no osso (Smilack *et al*, 1975), complicações relacionadas com o cessamento da terapêutica (Segreti *et al*, 1998), doses elevadas de fármaco que podem induzir um efeito tóxico para o organismo ou, pelo contrário, doses de antibiótico insuficientes para provocar a rutura da matriz extracelular (glicocálice) produzida pela bactéria infetante, por exemplo bactérias como a *Staphylococcus aureus* que provoca osteomielite (Nandi *et al*, 2009).

Um SLCs permite que o fármaco seja libertado na área patologicamente afetada provocando um aumento na eficácia da ação terapêutica tanto a nível do tratamento como na sua prevenção melhorando a qualidade de vida dos pacientes. (Martins *et al*, 2010) Isto é resultado da capacidade dos SLCs atingirem níveis elevados de concentração de fármaco na zona lesada sem que se atinga a toxicidade associada aos sistemas convencionais, sendo possível alcançar áreas pouco vascularizadas e por isso pouco acessíveis para o tratamento com fármaco sistémico. (Tsourvakas, 2012)

Apesar destes sistemas permitirem atingir concentrações elevadas de fármaco nos tecidos alvo, a maioria deles não consegue atingir o perfil de libertação ideal. De facto, para se atingir o efeito pretendido é necessário garantir uma concentração adequada aos tecidos afetados, várias vezes superior à concentração inibidora mínima (CIM), por um tempo apropriado. Aquando da construção de um SLC deverá atender-se a vários fatores, designadamente o

biomaterial que servirá de veículo ao fármaco, o tecido e a localização anatômica a que se destina, o fármaco empregue e a bactéria invasora (Campoccia *et al*, 2010).

Uma vez que o biomaterial vai estar presente no organismo, vai estar em contacto com fluidos biológicos que podem ter uma resposta adversa à presença de materiais estranhos ao organismo. Assim, o biomaterial deverá ser biocompatível. Os biomateriais podem ser constituídos por uma vasta gama de materiais, tais como metais, cerâmicos e polímeros, sendo os polímeros muito atrativos já que possuem uma grande diversidade de propriedades físicas e mecânicas em relação aos demais. (Ulery *et al*, 2011)

Os SLCs de base polimérica podem ser biodegradáveis ou não. Quando presentes no organismo os polímeros não biodegradáveis necessitam de intervenção cirúrgica para remoção do veículo após a libertação do fármaco. (Nandi *et al*, 2009) Nas últimas décadas os veículos biodegradáveis tem sido alvo de estudo por não haver necessidade de intervenção cirúrgica adicional, sendo essa uma das suas maiores vantagens. A sua constituição permite a sua degradação, sendo posteriormente excretados ou reabsorvidos pelo organismo. Alguns dos polímeros mais comuns são os poliésteres hidrofóbicos, tais como poli (ácido glicólico) (PGA), poli (ácido láctico) (PLA), poli (ε-caprolactona) (PCL), poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), poliuretano (PU), Poli (L-lactido-co-ε-caprolactona) [P (LLA-CL)], típicos em aplicações biomédicas. (Bhardwaj & Kundu, 2010; Campoccia *et al*, 2010; Ulery *et al*, 2011)

Como referido anteriormente, os SLCs nem sempre atingem um perfil de libertação desejado, e nas últimas décadas tem-se feito um grande esforço nesse sentido usando formulações à escala nano, designadamente nanopartículas, lipossomas, micelas poliméricas, microsferas, complexos, hidrogéis e nanofibras. Estas últimas têm merecido especial atenção devido a sua elevada área de superfície em relação ao volume (fibras com diâmetros inferiores a 1µm exibem grandes valores de área específica), o que influencia enormemente o perfil de libertação do fármaco. (Hu *et al*, 2014; Gao *et al*, 2014; Son *et al*, 2014)

Existem várias técnicas para obter as nanofibras, sendo a electrofiação a mais comum (Gao *et al*, 2014). Esta técnica permite manipular as variáveis de processamento de modo a controlar as propriedades das fibras obtidas, tais como o diâmetro, a porosidade, a morfologia que, por sua vez, possibilita a modelação do perfil de libertação do fármaco. Esta técnica permite a utilização de vários tipos de materiais bem como a adição de diferentes fármacos, possibilitando o processamento de soluções poliméricas de forma simples com boa relação custo-eficiência. Tem sido utilizada para produzir nanofibras com alta capacidade de carregamento, alta eficiência de encapsulação de fármacos, com estruturas que imitam a matriz

extracelular. Sendo por isso um método de grande potencial no fabrico de veículos para sistemas de libertação de fármacos. (Hu *et al*, 2014; Gao *et al*, 2014; Son *et al*, 2014; Pillay *et al*, 2013)

Kenawy *et al*. (2002) relatou pela primeira vez a possibilidade de fazer uso de fibras obtidas através de electrofiação para transporte de fármacos (Son *et al*, 2014). A incorporação do fármaco nas fibras dá-se normalmente em simultâneo com a formação destas, através da simples dissolução ou dispersão do fármaco na solução polimérica a electrofiar. Neste caso o fármaco fica incorporado no interior das fibras por oclusão, encontrando-se dissolvido na matriz polimérica (solução sólida) ou simplesmente na forma de pequenas partículas dispersas ao longo da matriz polimérica (dispersão sólida). (Son *et al*, 2014; Natu *et al*, 2011; Meinel *et al*, 2012)

Outra forma de incorporação de fármacos em nanofibras formadas por electrospinnig (electrofiação) que envolve a imobilização prévia do fármaco em nanopartículas (de natureza polimérica ou inorgânica) e a dispersão dessas mesmas nanopartículas na solução polimérica a electrofiar. Desta forma obtêm-se fibras compósitas, compostas de nanopartículas carregadas de fármaco dispersas no interior das fibras. Esta prática permite ajustar o potencial de libertação do fármaco, permitindo uma libertação mais prolongada e uniforme, e, por outro lado, proporciona uma melhoria nas propriedades mecânicas das fibras. Exemplos de nanopartículas inorgânicas já incorporadas em nanofibras produzidas por electrofiação e carregadas ou não com fármacos, incluem, nanopartículas de prata, imogolite, sílica mesoporosa e a haloisite. (Meinel *et al*, 2012; Yeo e Park, 2004; Xue *et al*, 2014; Wei *et al*, 2012)

1.2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver membranas nanofibras de base polimérica, com a inclusão de nanotubos de haloisite, através do método de electrospinning, para a libertação controlada e localizada de fármacos, tendo em vista a sua aplicação a pacientes da área da ortopedia para a prevenção de infeções bacterianas pós-cirúrgicas.

Como referido anteriormente, os polímeros biodegradáveis têm merecido maior atenção dada a grande vantagem de não ser necessário a sua remoção cirúrgica após o final da sua função, sendo por isso importante optar por um polímero biodegradável e biocompatível.

A escolha do polímero para a realização deste estudo foi baseada num grupo de polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, largamente utilizados na área da biomedicina, genericamente

denominados poli(α -hidroxi ácidos, e que inclui o poli(acido láctico) (PLA), o polímero utilizado neste trabalho.

Os fármacos selecionados para incorporar nas fibras produzidas foram: o sulfato de gentamicina, um antibiótico com ação antibacteriana numa ampla gama de bactérias Gram positivas e Gram negativas; e a dexametasona, um corticosteroide com capacidade de moderar a resposta inflamatória ao implante e promover a regeneração do tecido ósseo danificado. (Li *et al*, 2015)

A concretização do objetivo deste trabalho passa por a elaboração de: i) fibras com nanotubos carregados com sulfato de gentamicina dispersos na matriz polimérica; ii) fibras com sulfato de gentamicina disperso na matriz polimérica; iii) fibras com as duas conjugações anteriores. Inicialmente, as fibras foram sujeitas a uma análise morfológica (SEM), por forma a verificar as diferenças entre os três formatos de fibras electrofiadas. Os nanotubos de halosite tem a particularidade de serem estruturas tubulares que permitem o carregamento de fármaco, sulfato de gentamicina, no seu interior. Os resultados destes sistemas irão permitir uma melhor análise e comparação entre os perfis de libertação.

As amostras produzidas foram caracterizadas por TGA (Thermogravimetric Analysis), DLS (Dynamic Light Scattering), medição do ângulo de contacto, adsorção de azoto (para medição da área específica e microporosidade) e SEM (Scanning Electron Microscopy). As nanofibras foram posteriormente submetidas a testes *in vitro*, no sentido de obter o perfil de libertação dos fármacos, e a testes microbiológicos.

1.3 ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO

Este trabalho está organizado em cinco capítulos, que, por sua vez, se encontram divididos em subcapítulos que explicam pormenorizadamente os assuntos tratados em cada um.

No presente capítulo, Capítulo 1, são apresentadas as razões que motivaram este trabalho, bem como os objetivos que se pretendem alcançar.

O Capítulo 2 compreende a revisão bibliográfica que serve de apoio aos assuntos abordados, designadamente os que enquadram membranas nanofibrosas como veículo de fármacos.

CAPÍTULO 1

No Capítulo 3, Materiais e Métodos, são descritos os procedimentos e metodologias utilizadas para a realização dos vários tipos de membranas, assim como a preparação das nanopartículas para a incorporação do fármaco. Neste capítulo também são abordadas e descritas as técnicas utilizadas para a caracterização das nanofibras e das nanopartículas.

Os resultados obtidos para cada sistema desenvolvido são apresentados e discutidos no Capítulo 4, onde se adiantam também as respetivas conclusões.

No Capítulo 5 encontram-se resumidas as conclusões e algumas perspetivas futuras.

Como foi referido anteriormente este trabalho teve como objetivo desenvolver membranas nanofibrosas de base polimérica, com o intuito de estas se comportarem como um sistema de libertação controlada de fármacos.

As membranas tem como destino de aplicação pacientes da área da ortopedia para a prevenção e tratamento de infeções bacterianas pós-cirúrgicas.

Este capítulo inicia-se com uma breve resenha sobre uma das infeções mais comuns na cirurgia ortopédica, a osteomielite. Posteriormente apresenta-se uma breve revisão bibliográfica focada nos principais aspetos salientados neste trabalho, incluindo a descrição geral de sistema de libertação controlada (SLC), os SLC de base polimérica aplicáveis à ortopedia, a técnica de electrofiação para a produção de membranas nanofibrosas como SLC, os principais poliésteres utilizados na produção de nanofibras como SLC, e os veículos que permitem a incorporação de fármacos como incremento no efeito do tratamento desejado. Finaliza-se com uma breve descrição dos fármacos utilizados.

Osteomielite

A osteomielite é uma inflamação do tecido ósseo, provocada principalmente por bactérias como a *Staphylococcus aureus*. A entrada de microrganismos no organismo que provocam a osteomielite provêm do meio exterior, a partir de fratura exposta ou ferida profunda ou por microrganismos que circulam na corrente sanguínea proveniente de outras regiões do organismo previamente infetado.

O método convencional de tratamento envolve a administração de antibióticos por via intravenosa e/ou oral, em doses elevadas e por um longo período de tempo, já que tecido ósseo é pouco vascularizado, não permitindo uma resposta rápida na dispersão do fármaco no tecido infetado (Neut *et al*, 2009; Tsourvakas *et al*, 2012; Nandi *et al*, 2009).

Por vezes no tratamento da osteomielite é necessário intervenções cirúrgicas quando se alcança um estado crónico para remover o tecido infetado. Com a pretensão de promover uma terapêutica mais eficaz, as cirurgias podem ser acompanhadas da implementação de SLC de

antibiótico, de forma a proporcionar um tratamento com elevadas concentrações de fármaco por longos períodos de tempo na zona com patologia (Neut *et al*, 2009) e reduzir simultaneamente os riscos de toxicidade sistémica.

2.1 SISTEMAS DE LIBERTAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS

Normalmente, as formulações convencionais de entrega de fármacos resultam num aumento acentuado da concentração de fármaco no plasma sanguíneo, que podem atingir níveis potencialmente tóxicos, seguindo-se uma diminuição brusca na concentração após um período terapêutico relativamente curto. Sendo que a administração implica perdas de fármaco ao longo do percurso a efetuar até que este atinga o alvo desejado. (Freiberg & Zhu, 2004)

Um sistema de libertação controlada (SLC) é definido como sendo uma formulação ou dispositivo que permite a introdução de uma substância terapêutica no organismo humano ou animal, que proporciona maior eficiência e segurança através do controlo da taxa, do tempo, e do local onde o fármaco é libertado (Jain, 2008).

O desenvolvimento de SLC remonta à década de 1960 através da implementação de borracha de silicone por Folkman e Long em 1964 com administração de fármaco em ratinhos de laboratório, e polietileno por parte de Desai em 1965. (Freiberg & Zhu, 2004)

Os SLC tem como objetivo proporcionar o controlo da taxa na qual o fármaco é libertado e o local onde irá ser libertado, permitindo uma maior eficácia no tratamento de patologias. O facto de permitir maior controlo na exposição do fármaco ao organismo, minimiza as barreiras químicas e físicas à passagem do fármaco assentando que o fármaco seja libertado de forma progressiva e controlada, reduzindo a ação do organismo na eliminação prematura do fármaco e a exposição a zonas não afetadas pela patologia, ao direcionar o fármaco aplicado a alvos específicos e permitindo a diminuição de toxicidade. (Rodrigues, 2012; Siegel & Rathbone, 2012)

Dado que os dispositivos com características de SLC têm por fim a interação com os fluidos fisiológicos do organismo é necessário que estes possuam uma boa biocompatibilidade, para que haja uma diminuição da possibilidade de o organismo desenvolver uma resposta adversa à presença do biomaterial. Neste sentido têm-se desenvolvido vários tipos de biomateriais, como os metais, os cerâmicos, os compósitos, e os polímeros. Estes últimos são

os que mais se destacam nesta área dos SLC, devido às suas propriedades químicas, físicas e mecânicas assim como a sua versatilidade. (Ulery *et al*, 2011)

Os SLC desenvolvidos até agora encontram-se divididos em biodegradáveis e não biodegradáveis, sendo estes selecionados consoante o tipo de tratamento e necessidade de aplicação. Sendo que os não biodegradáveis quando aplicados podem implicar a necessidade da sua remoção após a ação terapêutica, isto acontece em alguns casos em que esse material apenas tem como função a libertação do fármaco o que é uma grande desvantagem. (Freiberg & Zhu, 2004; Nandi *et al*, 2009)

Na conceção de um SLC biodegradável existem vários fatores a ter conta, como: a seleção do material empregue, a sua biocompatibilidade, o seu tempo de degradação que deve coincidir com a função desejada, a interação entre o material e o fármaco a transportar e a sua interação com o meio onde vai ser aplicado. Adicionalmente estes devem exibir propriedades mecânicas adequadas ao meio a que se destinam, e a sua biodegradação deve originar subprodutos não tóxicos, sujeitos a serem metabolizados e/ou excretados prontamente.

Um dos grandes desafios encontrados aquando do desenvolvimento de um SLC é o controlo da cinética de libertação do fármaco. Uma libertação controlada deve garantir uma concentração adequada nos tecidos alvo durante um período de tempo pré-determinado.

No caso da libertação de antibiótico isto implica manter, no local afetado, uma concentração de antibiótico pelo menos superior à concentração inibitória mínima (CIM) para o microrganismo responsável pela infeção. (Campoccia *et al*, 2010; Gao *et al*, 2011)

2.2 SISTEMAS DE LIBERTAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS DE BASE POLIMÉRICA

Os polímeros biodegradáveis incluem duas categorias, os polímeros naturais (como por exemplo, a gelatina, o quitosano, o colagénio, a elastina e a fibrina), e alguns polímeros sintéticos (nos quais se incluem, entre outros, os poliésteres, os polianidridos, os poliuretanos, e os poliortoésteres). Ao contrário dos polímeros naturais que são utilizados há milhares de anos, os polímeros sintéticos só começaram a ser verdadeiramente explorados para aplicações na área biomédica a partir da década de sessenta do século passado. No incremento das propriedades individuais dos polímeros normalmente são conjugados polímeros sintéticos e naturais, melhorando o desempenho do biomaterial. (Jalil e Nixon, 1990; Ulery *et al*, 2011; Gao *et al*, 2011)

Como já se referiu um dos aspetos mais importantes nos SLC de base polimérica é a taxa de libertação do fármaco, que é em grande parte determinada pelas características dos polímeros utilizados.

Nos polímeros não biodegradáveis a libertação do fármaco é normalmente controlada por difusão, envolvendo a entrada de fluidos na matriz polimérica e a consequente dissolução e transporte do fármaco por difusão para o exterior da matriz. Por outro lado, nos polímeros biodegradáveis a libertação pode também ser determinada, para além da difusão pela degradação da matriz polimérica. (Lin & Anseth, 2013)

Um outro fator importante nos SLC é a taxa de degradação dos polímeros, visto que esta tem importância para a taxa de libertação de fármacos. A taxa de degradação é também dependente de vários fatores, tais como: pH do meio, forma e tamanho do polímero, composição e estrutura da rede polimérica, força iónica, morfologia do polímero, entre outros.

A degradação pode dar-se à superfície dos materiais poliméricos, erodíveis à superfície, ou então no interior dos materiais, erodíveis em massa. Quando se trata de um material que oferece alguma resistência à penetração de fluidos, verifica-se que apenas se dá uma hidrólise superficial sobre o material e com isto uma redução do seu tamanho ao longo do tempo, mantendo a morfologia do polímero, a esta degradação se dá o nome erodíveis à superfície. Quando a resistência à penetração de fluidos é menor, acontece hidrólise no interior da matriz polimérica, promovendo uma libertação de fármaco mais rápida e a degradação do polímero, a esta degradação se dá o nome erodíveis em massa. (Lin & Anseth, 2013; Chen *et al*, 2011)

SLC de base polimérica para o tratamento da osteomielite

Apesar dos avanços contínuos nas áreas da cirurgia e farmacêutica, o tratamento de infeções ósseas continua a ser um desafio que envolve especialistas de diferentes áreas; o recurso a SLC para o tratamento de infeções é uma terapêutica recente, que permite alcançar elevados níveis de concentração de antibiótico no local infetado sem riscos de toxicidade sistémica.

O SLC de base polimérica não biodegradável, mais utilizados na área da ortopedia consiste em grânulos de poli (metacrilato de metilo) (PMMA) carregados com gentamicina para o tratamento da osteomielite. Estes são normalmente utilizados no tratamento da osteomielite

crônica ou quando o risco de infecção é muito elevado, sendo necessária a sua remoção cirúrgica após a liberação do fármaco. (Nandi *et al*, 2009)

Para além dos grânulos de PMMA com gentamicina, muitos outros SCL de antibióticos de base polimérica têm sido desenvolvidos, especificamente para o combate à osteomielite.

Na Tabela 2.1 encontram-se alguns dos polímeros não biodegradáveis e biodegradáveis utilizados como SLC na área da ortopedia.

Tabela 2.1- Exemplos de alguns SLC de base polimérica para a liberação de antibióticos na área da ortopedia (Nandi *et al*, 2009)

	Sistema de liberação controlada (SLC)	Antibiótico aplicado	Referência
Polímeros não biodegradáveis	Cimento acrílico	Oxacilina	Marks K. <i>et al</i> 1976
		Cefazolina	Marks K. <i>et al</i> 1976
		Gentamicina	Rissing J., 1997
	Cimento BIS-GMA/TEGDMA	<i>Cefalexina</i>	Otsuka M. <i>et al</i> , 1997
	PMMA (grânulos)	Gentamicina	Montali A., 2006
Vancomicina		Zelken J. <i>et al</i> , 2007	
Polímeros biodegradáveis	Nano-HA-PHBV/PEG-GM microsferas	Gentamicina	Wang Y. <i>et al</i> , 2006
	Quitosano	Vancomicina	Cevher E. <i>et al</i> , 2006
	Gel injetável (P(SA-RA))	Gentamicina	Krasko M. <i>et al</i> , 2007
	Poli (D,L- ácido láctico-co-glicólico)	Gentamicina	Virto M. <i>et al</i> , 2007
	Poli (D,L- ácido láctico-co-glicólico) microsferas	Ciprofloxacina	Kanellakopoulou K. <i>et al</i> , 2008
	Gel de fibrina (BMMSCS)	Vancomicina	Hou T. <i>et al</i> , 2008

2.3 MÉTODO DE ELECTROFIAÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE MEMBRANAS FIBROSAS COMO SLC

Atualmente existem vários SLC de fármacos em desenvolvimento no sentido de melhorar o efeito terapêutico e reduzir a toxicidade da dosagem convencional. O controlo do perfil de liberação e a eficácia de uma terapêutica tem-se baseado na aplicação de formulações em nano

escala, tais como lipossomas, micelas, vesículas, nanopartículas, microcápsulas, nanofibras entre outros.

As nanofibras tornaram-se nos últimos tempos um material de grande interesse. Devido à alta capacidade e facilidade de incorporação de componentes funcionais, altas porosidades, grandes áreas de superfície, tornando-as candidatas ideais para aplicações engenharia de tecidos. (Hu *et al*, 2014; Son *et al*, 2014).

Apesar de existirem várias técnicas para produzir fibras, tais como, a separação de fases, *self-assembly*, desenho mecânico, entre outras, a técnica de electrofiação tem despertado um grande interesse nas últimas décadas. A electrofiação é uma técnica de produção de fibras, simples, de baixo custo, e permite a utilização de uma vasta gama de polímeros naturais e sintéticos, assim como a sua mistura, incluindo proteínas e ácidos nucleicos, bem como a encapsulação de fármacos nas fibras electrofiadas. As fibras resultantes da electrofiação encontram-se em uma faixa nano e micrométrica. (Fang & Reneker, 1997; Bhardwaj & Kundu, 2009) Os fármacos são facilmente incorporados no interior das fibras ou na sua superfície, e o processo de incorporação pode ser realizado antes ou após a electrofiação. Na Tabela 2.2 encontram-se alguns exemplos de polímeros sujeitos a electrofiação com características de SLC. (Meinel *et al*, 2012)

Na técnica de electrofiação, as fibras são geradas através da aplicação de forças electrostáticas a uma solução polimérica. Esta solução polimérica serve como fonte de alimentação a uma agulha que se encontra sujeita a uma fonte de alta tensão; a gota de polímero pendente na agulha é deformada dando origem à projecção de uma fibra contínua que vai ser depositada num coletor que se encontra no lado oposto à agulha e com polaridade oposta. (Pillay *et al*, 2013; Gao *et al*, 2014; Hu *et al*, 2014; Zang e Yu, 2014).

A técnica de electrofiação é gerida por diversos parâmetros: parâmetros de solução (viscosidade, condutividade, peso molecular, tensão superficial); parâmetros de processo (campo elétrico, distância entre coletor e agulha, caudal) e parâmetros ambientais (humidade e temperatura); sendo que estes afetam diretamente a morfologia e diâmetro das fibras (Bhardwaj & Kundu, 2009; Natu *et al* 2011; Gao *et al* 2014; Meinel *et al*, 2012; Goh *et al*, 2013; Pillay *et al*, 2013). Na Tabela 2.2 encontram-se alguns dos polímeros usados em electrofiação para SLC.

As características finais das fibras, são dependentes dos vários parâmetros de processamento, sendo por isso necessário a otimização destes para que se possa atingir o objetivo final desejado sendo esta a sua maior desvantagem. (Pillay *et al*, 2013)

Tabela 2.2- Revisão de alguns polímeros utilizados em electrofiação como SLC

Polímero	Moléculas carregadas / aplicação	Referências
PLLA	Entrega dupla de fármaco	Thakur <i>et al</i> , 2008
PDLLA	BSA	Yang <i>et al</i> 2008
PLLACL	Libertação dupla da rodamina B e albumina em soro bovino (BSA)	Yan <i>et al</i> , 2009
PEG-PLA	Libertação dupla de paclitaxel (PTX) e cloridrato de doxorubicina (DOX)	Xu <i>et al</i> , 2009
(PEI)	DNA de plasmídeo	Saraf <i>et al</i> , 2010
PCL	Albumina de soro de bovino	Ji <i>et al</i> , 2010
PLCL	Controle da liberação de múltiplos fármacos	Okuda <i>et al</i> , 2010
PLGA/gelatina	Proteína (fenbufen)	Meng <i>et al</i> , 2011
PLGA	Entrega de fármaco oral	Park <i>et al</i> , 2011
PVP	Entrega da droga de dissolução rápida	Quan <i>et al</i> , 2011
PLLA	Microesferas de quitosano carregadas e encapsuladas em nanofibras	Xu <i>et al</i> ,2011
PCL	Libertação controlada de fármacos utilizando polímero hidrofóbico	Yohe <i>et al</i> , 2012
PLGA	Anestésico local, a bupivacaína	Weldon <i>et al</i> , 2012
PLLACL/colagénio	Proteína morfogenética óssea e dexametasona	Su <i>et al</i> , 2012
PCL	Lipossoma carregado com enzima, incorporado em fibras	Mickova <i>et al</i> , 2012
PLLA	Doxorrubicina	Zeng <i>et al</i> , 2005
PLGA	Paclitaxel	Ranganath e Wang, 2008
PLLA	Citocromo C	Maretschek <i>et al</i> , 2008
PCL/PLA	Tetracycline	Zahedi <i>et al</i> , 2011
PCL	SiRNA	Cao <i>et al</i> , 2010
PCL	Dexametasona	Martins <i>et al</i> , 2010
PLGA	Ácido fusídico Rifampicina	Gilchrist <i>et al</i> , 2012
PLGA PLGA/Gelatina	FBF (Fenbufen)	Meng <i>et al</i> , 2011

2.4 POLIÉSTERES UTILIZADOS NA PREPARAÇÃO DE NANOFIBRAS POR ELECTROFIAÇÃO

Um dos grupos de polímeros biodegradáveis mais recorrentes nos estudos realizados para o desenvolvimento de SLC é o grupo de poliésteres, especialmente para a libertação de antibióticos. Os poliésteres são materiais que apresentam biocompatibilidade, dada à sua degradação *in vivo*, e por isso de grande interesse para aplicações biomédicas. Os poliésteres são polímeros que sofrem degradação progressiva no meio fisiológico sendo reabsorvidos pelo organismo.

Este têm como vantagem o controlo da cinética de libertação do antibiótico, que pode ser manipulado através da composição do copolímero, da cristalinidade do polímero e do peso molecular polímero, outra vantagem é o facto dos materiais deste grupo serem altamente compatíveis com uma grande variedade de antibióticos. (Tsourvakas, 2012; Hu *et al*, 2014; Nandi *et al*,2009)

De seguida é citado as principais características do poliéster poli (ácido láctico) (PLA) utilizado no âmbito deste trabalho.

2.4.1 POLI (ÁCIDO LÁCTICO)

O poli (ácido láctico) é sintetizado a partir do ácido láctico, Figura 2.1, sendo esta uma molécula quiral. Com duas formas óticas ativas L e D. A polimerização da mistura racémica dos dois ((D,L) - ácido láctico) resulta em polímeros amorfos, enquanto a polimerização dos monómeros L-ácido láctico ou D-ácido láctico leva a formação de polímeros semi-cristalinos.

O poli (ácido láctico) (PLA) pertence ao grupo dos poli (α - hidroxí ácido). Os polímeros pertencentes a este grupo apresentam uma boa biocompatibilidade e são reabsorvíveis pelo organismo, sendo os produtos da sua degradação eliminados por vias metabólicas. Dada as suas características mecânicas, resistência à tração e módulo de tensão, o PLA, é considerado um bom material para suportes destinados à fixação em dispositivos ortopédicos. (Júnior e Wada, 2007; Jahno, 2005; Oliveira, 2008)

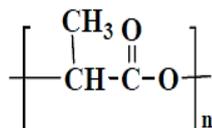


Figura 2.1 - Unidade repetição do PLA

A taxa de degradação depende do grau de cristalinidade do polímero e também da porosidade da matriz; no processo de degradação do PLA, erodível em massa, o polímero é quebrado em unidades menores por hidrólise, os produtos originados deste processo químico vão ser eliminados do organismo por via metabólica, através do ciclo de Krebs, Figura 2.2. (Júnior & Wada, 2007)

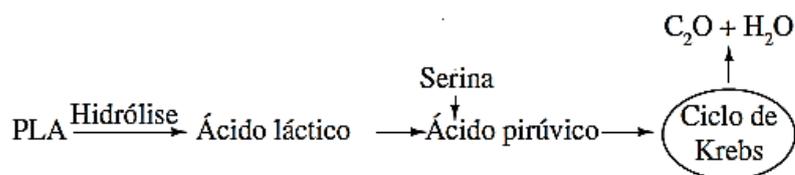


Figura 2.2 - Degradação do ácido láctico proveniente da hidrólise do PLA pelo ciclo de Krebs (Adaptado de Júnior e Wada, 2007)

Há que salientar que a taxa de libertação de fármaco para os polímeros biodegradáveis depende da matriz transportadora e da dissolução do fármaco pelos poros da matriz, sendo que a libertação do fármaco pode ocorrer durante a fase de degradação da matriz do polímero. (Nandi *et al*, 2009; McLaren, 2004)

Na Tabela 2.3 são apresentados alguns sistemas de libertação controlada formulados com o polímero PLA e algumas das características das fibras obtidas por electrofiação, como o diâmetro de fibra e libertação de fármaco por um período de tempo.

Tabela 2.3- Revisão às fibras produzidas por electrofiação de poli (ácido láctico) (PLA) com características de SLC

Formulação	Fármaco	Diâmetro das fibras	Libertação de fármaco (%)	Referência bibliográfica
PDLLA	<i>Lisozima</i>	570 ± 110 (nm)	47% (em 12 h)	Yang <i>et al</i> , 2007
PLA	<i>Cloridrato de</i>	741 ± 42 (nm)	30%	Zaheni <i>et al</i> , 2011
PLA/PCL	<i>Tetraciclina</i>	1708 ± 73 (nm)	70%	
PLA	<i>Gentamicina</i>	1106 ± 182 (nm)	33% (em 50h)	Torres-Giner <i>et al</i> , 2011
PLA /colagénio		168± 53 (nm)	98% (em 50h)	
PLA-colagénio- PLA		561± 39 (nm)	59% (em 50h)	
PLLA	Dexametasona	1,8 ± 0,4 (µm)	25% (20-40min)	Vacanti <i>et al</i> , 2012
PLA	Triclosano	560 ± 150 (nm)	--	Kayaci <i>et al</i> , 2013

Como já referido o perfil de libertação de fármacos pode ser ajustada com a aplicação de dispositivos em nano escala; a inclusão de dispositivos portadores de agentes ativos em fibras electrofiadas é uma abordagem promissora para a obtenção de um potencial de libertação prolongado. (Xue *et al*, 2014) Em seguida é apresentada uma breve elucidação de um dispositivo suscetível á incorporação de fármaco, funcionando como veículo de entrega sustentada de fármacos, os nanotubos de haloisite.

2.5 NANOTUBOS DE HALOISITE

A haloisite é uma argila do tipo alumino-silicato proveniente de depósitos naturais. A nível químico é muito similar ao caulino e a nível estrutural é do tipo tubular oco. Para além das estruturas tubulares também se encontra, na natureza, em forma de lamela, em esfera entre outros, mas o mais comum é a forma tubular.

Estes nanotubos ocos são constituídos por camadas sobrepostas, Figura 2.3, onde a camada externa é formada por estrutura tetraédrica de sílica e a interna por estrutura octaédrica de alumina, Figura e 2.4. (Nicolini *et al*, 2009; Levis & Deasy, 2002)

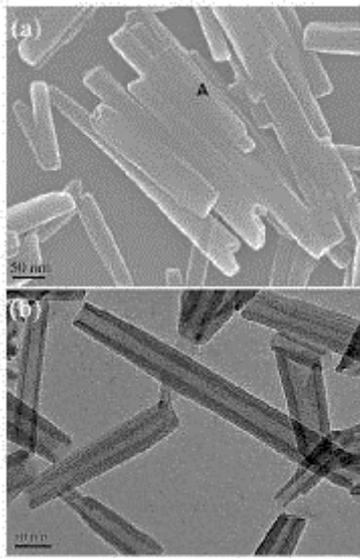


Figura 2.3 - Nanotubos de haloisite, (a) imagem SEM e (b) imagem TEM (adaptado de Qi *et al*,2012)

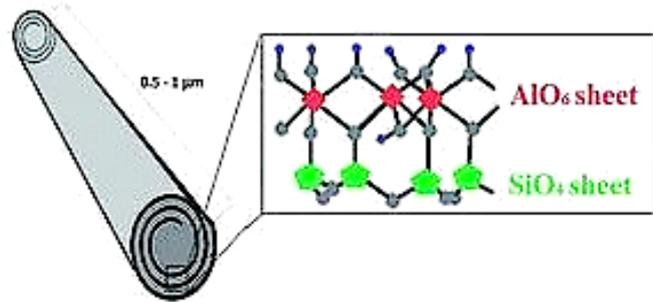


Figura 2.4 – Estrutura interna e externa dos nanotubos de haloisite (adaptado de Abdullayev & Lvov, 2013)

A sua dimensão encontra-se a uma escala nano, dependendo do depósito de haloisite no meio ambiente, de diâmetro exterior entre os 50-100nm e de diâmetro interno entre os 10-20nm. A haloisite não é um material biodegradável, e ao longo do tempo os nanotubos, quando presentes no organismo, podem ser libertados para o tecido circundante, teste realizados à citotoxicidade dos nanotubos verificaram que apesar de não ser biodegradáveis, até uma concentração de 0,1mg/ml (ou 1011partículas/g) estes não apresentam qualquer perigo de toxicidade, o que indica que a haloisite exibe um elevado grau de biocompatibilidade relativamente a outros tipos de estruturas, como os nanotubos de carbono. Dado o tamanho dos nanotubos ser menor que 2mm isto permite que a sua remoção possa ser realizada por macrófagos, mas não pode ser injetado na corrente sanguínea por não ser biodegradável. (Abdullayev & Lvov, 2013; Qi *et al*,2010)

Na área biomédica, os nanotubos de haloisite têm sido investigados para várias aplicações, incluindo o isolamento de células cancerígenas, na fabricação de implantes ósseos, agentes de enchimento na área dentária, e como SLC. (Abdullayev & Lvov, 2013)

Estes nanotubos têm a capacidade de incorporar, no interior do lúmen, agentes químicos como moléculas bioativas (DNA, proteínas, fármacos), tendo por isso uma função de

nanotransportador. A encapsulação de fármacos em recipientes a uma nanoescala apresenta um potencial para uma libertação prolongada, de forma uniforme, apresentando melhor eficiência na entrega sustentada de fármacos em comparação com outros dispositivos do tipo cápsula, como a sílica mesoporosa, nanopartículas e microcápsulas de polímero, devido à difusão do fármaco ocorrer apenas numa dimensão, enquanto nas capsulas esféricas a difusão ocorre a 3-D. (Xue *et al*,2014; Wei *et al*, 2012)

Os nanotubos de haloisite têm como estratégia no aprisionamento dos agentes ativos diferentes formas de adsorção, a adsorção tanto se dá nas camadas externas como nas internas dos tubos, a adsorção vai ser depende da carga de superfície presente em cada uma das camadas, e esta carga de superfície vai variar com o pH do meio. A equação de Laplace estima que a pressão capilar, para um lúmen de 15nm, seja cerca de 180atm em meio aquoso, o que demonstra que existe um grande potencial de capilaridade para retenção de fluidos. O carregamento dos nanotubos de haloisite é realizado através da aplicação de vácuo, permitindo uma incorporação de fármaco mais rápida, Figura 2.5. (Abdullayev & Lvov, 2012)

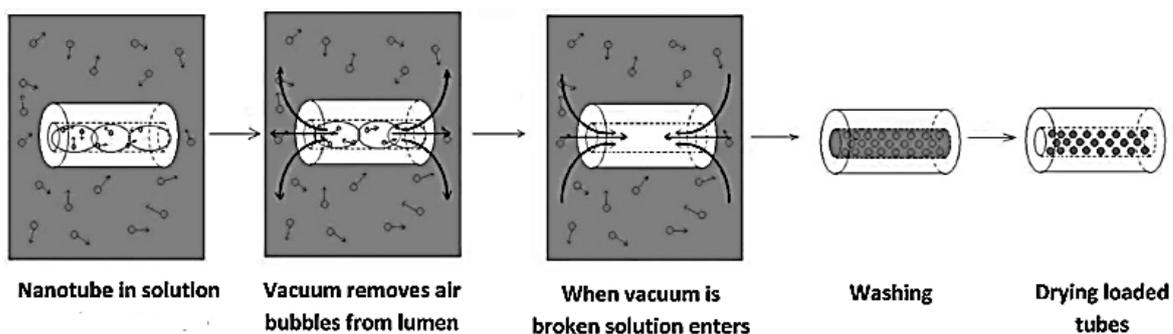


Figura 2.5 – Mecanismo de carregamento de agentes ativos para o interior do lúmen dos nanotubos de haloisite (adaptado de Abdullayev e Lvov, 2013)

É recorrente combinar SLC de base polimérica com outros veículos de transporte de fármaco, prática existente na formulação de nanofibras por electrofiação, esta combinação permite um incremento na eficácia de entrega e controlo da libertação do fármaco, dado que o polímero vai envolver os nanotubos criando uma pequena barreira à saída dos agentes ativos.

A adição dos nanotubos de haloisite promove a hidrofília nas fibras poliméricas, permitindo a entrada de fluidos e um aumento da taxa de degradação das fibras de polímero.

Numa tentativa de aumentar a capacidade retenção de fármacos e outros competentes no interior do lúmen dos nanotubos é aplicável um tratamento ácido, permitido que o ácido provoque um aumento do diâmetro interno. Isto acontece através da reação do ácido com os grupos Al-OH da camada interna dos nanotubos de haloisite, desta reação há a formação de moléculas de água e iões de Al^{3+} , e a saída destes compostos deixa para trás um lúmen que sofreu uma “escavação” e por isso com maior área.

O processo de alteração de superfície dos nanotubos é possível em ambas as camadas, interna e externa. (Xue *et al*, 2014; Abdullayev & Lvov, 2013)

2.6 FÁRMACOS

Sulfato de Gentamicina

A gentamicina é um antibiótico do grupo dos aminoglicosídeos e apresenta um amplo espectro de ação, Figura 2.6. Provém de um fungo do solo, *Micromonospora purpura*, isolada por Weinstains *et al* em 1963. É amplamente empreguem em tratamentos de infeções graves que envolvem bactérias aeróbicas Gram negativas e Gram positivas. (Weinstein *et al*)

Este antibiótico é normalmente comercializado na forma de sulfato de gentamicina, sendo nesta forma um composto altamente hidrófilico, com uma solubilidade em meio aquoso superior a 1g/ml. (Delfosse *et al*, 2011; Tan *et al*, 2009)

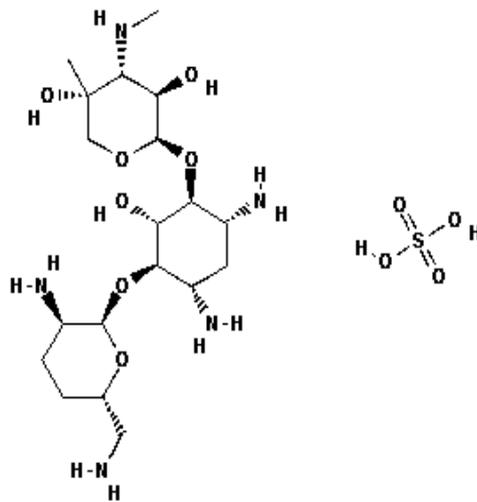


Figura 2.6 - Molécula do Sulfato de gentamicina (adaptado de National Center for Biotechnology Information)

Dexametasona

A dexametasona, cuja estrutura química encontra-se representada na Figura 2.7, é um derivado sintético da hidrocortisona glucocorticoide. Tem propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras, ou seja, bloqueia uma resposta do sistema de imunológico. É um composto hidrofóbico e a sua solubilidade é de 0,089mg/ml em meio aquoso. (Yalkowsky *et al*, 2003)

É empregue no tratamento de artrite, asma, inflamações oculares, bem como na prevenção de reações imunitárias indesejáveis.

Alguns estudos relacionados com a área da ortopedia mencionam a ação da dexametasona como promotor da estimulação da proliferação de células estaminais mesenquimais e com isso promove a diferenciação para linhagem osteogénica *in vitro*, isto é, a dexametasona permite atuar como agente promotor da regeneração do tecido ósseo danificado.

Enquanto isso, proporciona uma diminuição da resposta inflamatória por parte do organismo. (Li *et al*, 2015; Martins *et al*, 2010; Su *et al*, 2012; Vacanti *et al*, 2012; Li *et al*, 2013)

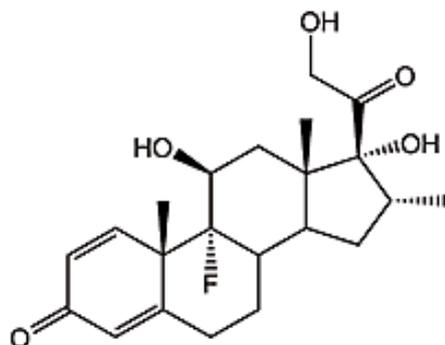


Figura 2.7 - Molécula da dexametasona (Sigma-Aldrich)

Neste capítulo é descrita a metodologia experimental seguida no presente estudo, iniciando-se pela referência aos reagentes utilizados para a elaboração dos SLCs e aos procedimentos adotados na sua preparação, bem como as técnicas utilizadas para a caracterização dos nanotubos e das nanofibras obtidas.

3.1 MATERIAIS E REAGENTES

Na Tabela 3.1 encontram-se descritos os reagentes, solventes e fármacos envolvidos no trabalho experimental.

Tabela 3.1- Lista de reagentes utilizados

Reagente	Estrutura química	CAS	Distribuidor	Informação adicional
Poli (ácido láctico) PLA	$-(O - CO - CH(CH_3))_n-$	33135-50-1	NatureWorks 2002D	-
Clorofórmio	CHCl ₃	67-66-3	Fisher ®	-
Dimetilformamida (DMF)	C ₃ H ₇ NO	68-12-2	Acros Organics	-
Sulfato de gentamicina	C ₂₁ H ₄₃ N ₅ O ₇	1405-41-0	TCI	-
Dexametasona	C ₂₂ H ₂₉ FO ₅	50-02-2	Alfa Aesar ®	98% pureza
Haloisite	Al ₂ Si ₂ O ₅ (OH) ₄ · 2H ₂ O	1332587	SigmaAldrich ®	30-70 nm × 1-3µm
Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄	7664-93-9		96% pureza
Metanol	CH ₄ O	67-56-1	Fisher ®	-
Mercaptoetanol	C ₂ H ₆ OS	60-24-2	SigmaAldrich ®	-
Isopropanol	C ₃ H ₈ O	67-63-0		-
<i>O-ftalaldeído</i>	C ₆ H ₆ C ₂ (OH) ₂	643 - 79 - 8	Alfa Aesar ®	98% pureza
Borato de sódio	Na ₂ B ₄ O ₇	1303-96-4	JMGS	-
Dihidrogenofosfato de potássio	KH ₂ PO ₄	7778-77-0	Panreac	-
Hidrogenofosfato disódico	Na ₂ HPO ₄	7782-85-6	Fluka	99%pureza
Cloreto de potássio	KCl	7447-40-7	SigmaAldrich ®	-
Cloreto de sódio	NaCl	7647-14-5	Panreac	-

3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Na tentativa de obter um perfil de libertação de fármaco mais lento, procedeu-se, na maioria das formulações poliméricas, à adição de nanotubos de haloisita impregnados com sulfato de gentamicina.

Os nanotubos foram caracterizados por DLS (*Dynamic Light Scattering*), SEM (*Microscopia Eletrônica de Varrimento*) para analisar a distribuição de tamanhos e morfologia dos nanotubos, adsorção de azoto para a determinação da superfície específica e do volume e tamanhos dos poros dos nanotubos, e termogravimetria (TGA) para a determinação da quantidade de fármaco incorporado nos nanotubos.

No sentido de manipular e adequar o perfil de libertação das membranas electrofiadas produziram-se varias membranas com diferentes formulações. As primeiras formulações investigadas, designadas por formulações preliminares, foram realizadas com o intuito exploratório, de forma a entender a influência de certos parâmetros na morfologia das fibras e nos perfis de libertação obtidos. Com base nestes resultados, estabeleceram-se os parâmetros a utilizar nas restantes formulações, designadas por formulações finais.

Nas formulações desenvolvidas utilizaram-se três formas diferentes de incorporar o antibiótico: i) através da dispersão dos nanotubos carregados com sulfato de gentamicina na solução polimérica a electrofiar; ii) com o sulfato de gentamicina simplesmente disperso na solução polimérica; e iii) conjugando as duas formas anteriores, ou seja, adicionando à solução polimérica sulfato de gentamicina imobilizado nos nanotubos e sulfato de gentamicina “livre”.

Quanto à dexametasona, dada a sua boa solubilidade na mistura de solventes orgânicos utilizada, esta foi sempre incorporada na formulação polimérica.

As soluções poliméricas ou suspensões foram electrofiadas, dando origem a membranas fibrosas com os fármacos incorporados. Após esta etapa procedeu-se a ensaios de libertação *in vitro* das diferentes membranas, durante um período de quatro semanas, de forma a obter os perfis de libertação dos fármacos nesse período de tempo, utilizando a fotoespectrofotometria UV/VIS para quantificar os fármacos libertados.

As nanofibras também foram alvo de caracterização por SEM, pela técnica dos ângulos de contacto com água com o intuito de verificar a hidrofiliabilidade das fibras, e, por fim, foram submetidas a testes microbiológicos no sentido de verificar a atividade antibacteriana do antibiótico.

A Figura 3.1 esquematiza as várias etapas do procedimento experimental, descritas detalhadamente nas secções que se seguem.

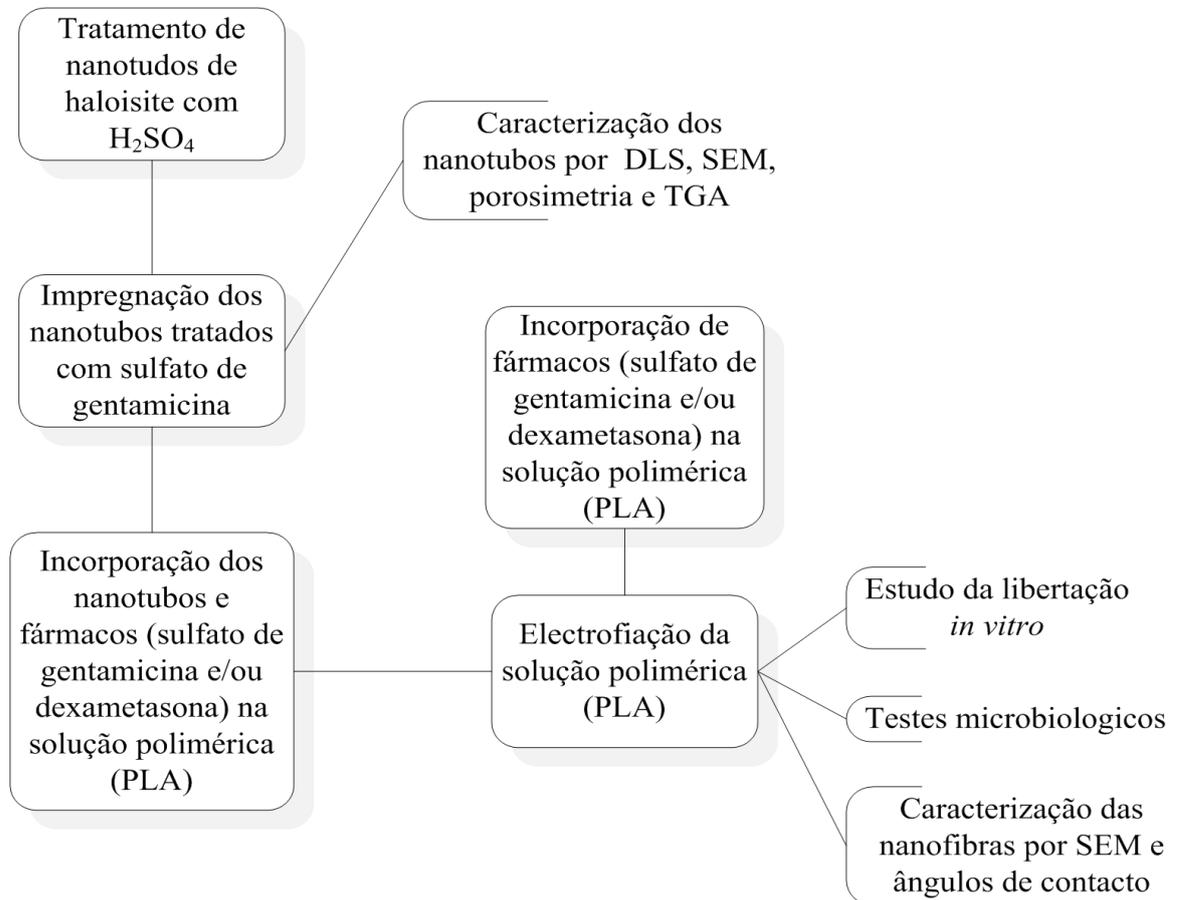


Figura 3.1 - Fluxograma das etapas do procedimento experimental

3.2.1 TRATAMENTO DOS NANOTUBOS DE HALOISITE COM ÁCIDO SULFÚRICO

Como já foi referido as paredes dos nanotubos são formadas por uma dupla camada, interior e exterior, de composição química diferente em que a camada exterior é constituída por grupos (Si-O-Si) e a camada interna por grupos óxido alumínio (Qui *et al*, 2010; Wei *et al*, 2012; Kamble *et al*, 2012).

Antes de proceder ao carregamento dos nanotubos com sulfato de gentamicina, estes foram submetidos a um tratamento com ácido sulfúrico com o objetivo de provocar o aumento do diâmetro do lúmen dos nanotubos, sem danificar a camada exterior, e com isso aumentar a capacidade de carregamento.

No tratamento foram adicionadas 2 gramas de haloisite a 50ml de ácido sulfúrico (1M), e a suspensão foi deixada sobre agitação durante 72 horas à temperatura ambiente. Após este tempo, a suspensão foi centrifugada para separar as partículas do sobrenadante. Adicionou-se de seguida água destilada às partículas e ajustou-se o pH para aproximadamente 6-7 com NaOH. Procedeu-se a vários ciclos de centrifugação e lavagem com água destilada. Finalmente as partículas foram congeladas e liofilizadas (Zhang *et al*, 2012; Wei *et al*, 2012).

3.2.2 CARREGAMENTO DAS NANOPARTÍCULAS DE HALOISITE COM SULFATO DE GENTAMICINA

O procedimento adotado para o carregamento dos nanotubos de haloisite com sulfato de gentamicina baseou-se no descrito por Wei *et al*, 2012. Para tal dissolveu-se 500 mg de sulfato de gentamicina em 5 ml de água ultrapura, e dispersou-se 500 mg de haloisite tratada nesta solução, Figura 3.2.

A dispersão foi então mergulhada num banho de ultra-sons durante um período de 30 minutos para promover a dispersão dos nanotubos na solução aquosa, após esta ação a dispersão ficou sob agitação magnética durante algumas horas.

De seguida a dispersão foi submetida a vários ciclos de vácuo com a duração de 30 minutos de forma a promover a incorporação do sulfato de gentamicina no interior dos nanotubos de haloisite. Por fim a solução foi centrifugada para separar os nanotubos do sobrenadante e os nanotubos foram depois secos em estufa de vácuo à temperatura ambiente.



Figura 3.2 - Partículas de haloisite com sulfato de gentamicina incorporado

3.2.3 PREPARAÇÃO DAS MEMBRANAS NANOFIBROSAS DE POLI (ÁCIDO LÁCTICO) (PLA) PELA TÉCNICA DE ELECTROFIAÇÃO

Nas Tabelas 3.2 e 3.3 encontra-se resumida a composição das formulações preliminares e finais que foram electrofiadas, bem como os parâmetros utilizados no processo de electrofiação.

O procedimento seguido na preparação das formulações foi idêntico para as formulações preliminares e finais. Envolveram os seguintes passos: à mistura de solventes, clorofórmio e DMF, foi adicionada a haloisite carregada com sulfato de gentamicina (HGS) (previamente moída, para diminuir o tamanho dos agregados de nanotubos); a suspensão foi então sujeita a vários ciclos de agitação magnética e a banho de ultra-sons, para promover a dispersão e desagregação dos nanotubos; de seguida foram adicionados o(s) fármaco(s), e a mistura voltou novamente a ser submetida a um ciclo de agitação e ultra-sons.

Por fim, foi adicionado o PLA à mistura e esta deixada a agitar até o polímero estar completamente solubilizado. Para as formulações sem haloisite, o procedimento foi realizado de forma semelhante, Tabela 3.3.

A produção de membranas poliméricas a partir da electrofiação das formulações preparadas foi realizada na instalação de electrofiação retratada na Figura 3.3. Este processo envolveu o carregamento da formulação em uma seringa de plástico e a fixação desta a uma bomba de seringa, que permite a dispersão de um caudal constante.

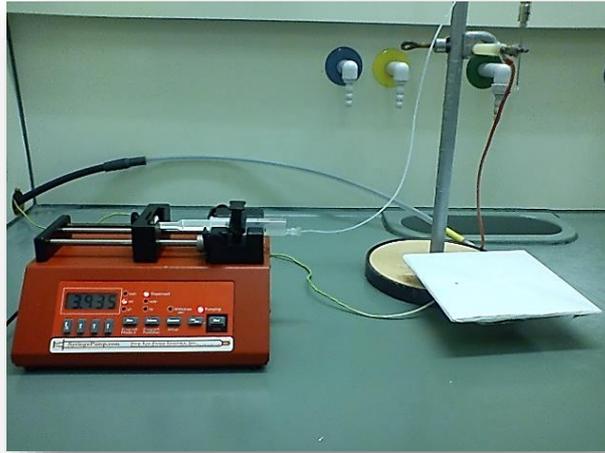


Figura 3.3- Equipamento de electrofiação

Este caudal alimenta a agulha da seringa que se encontra em contacto com uma fonte de alta tensão (ausente da figura). O campo electrostático gerado leva à deformação da gota de polímero, esta deformação origina o cone de Taylor.

O cone de Taylor proporciona um jato de fibras de polímero que é acelerado e esticado na direção de um coletor de polaridade oposta revestido com uma folha de papel alumínio., formando as nanofibras poliméricas que se depositam na folha de alumínio, que por sua vez forma eventualmente uma membrana. (Bhardwaj & Kundu, 2009; Natu *et al*, 2011; Meinel *et al*, 2012; Pillay *et al* 2013; Gao *et al*, 2014; Hu *et al*, 2014; Zang e Yu, 2014).

Na Figura 3.4 encontra-se ilustrado o processo de formação da estrutura das membranas por electrofiação.

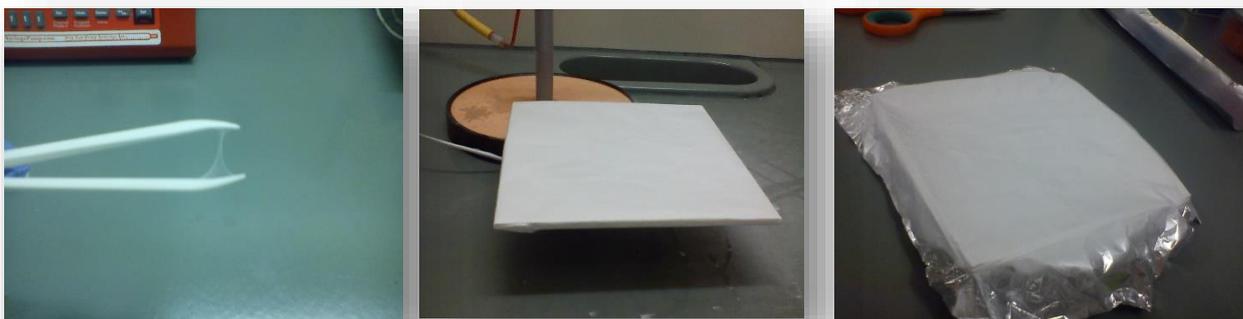


Figura 3.4 - Formação da membrana por electrofiação

Tabela 3.2 – Formulações preliminares

		Denominação das membranas			
		pPLA + GS	pPLA + DEX	pPLA + HGS	pPLA + HGS + ácido oleico [■]
Solventes	Clorofórmio: DMF	Razão 3:1 (volume total de 14ml)			
	Poli (ácido láctico) (PLA)	1grama (Concentração ≈ 7 p/v)			
	Haloisite carregada sulfato de gentamicina (HGS) * #	-	-	12,5%	12,5%
	Sulfato de gentamicina (GS) *	2,5%	-	2,5%	2,5%
	Dexametasona (DEX) *	-	2,5%	-	-
	Ácido oleico *	-	-	-	7,32%
Condições de electrofiação	Caudal (ml/h)	5	4	4	5
	Voltagem (kv)	16	15	16	16
	Distância coletor e agulha (cm)	15	15	15	15

* Relativamente à massa de polímero; # Correspondente a uma percentagem de GS de 2.5% relativamente à massa de polímero; [■] ácido oleico adicionado como dispersante para os nanotubos de haloisite

Tabela 3.3 - Formulações finais

		Denominação das membranas						PLA+ H
		PLA+GS	PLA+DEX	PLA+HGS	PLA+HGS +GS	PLA+HGS +DEX	PLA+HGS +GS+DEX	
Solventes	Clorofórmio: DMF	Razão 3:1 (volume total de 10ml)						
	Poli (ácido lático) (PLA)	10% (p/v) (Concentração = 10% p/v)						
	Haloisite carregada sulfato de gentamicina (HGS) *	-	-	10%	10%	10%	10%	10% (sem carga de GS)
	Sulfato de gentamicina (GS) *	2,5%	-	-	2,5%	-	2,5%	-
	Dexametasona (DEX) *	-	2,5%	-	-	2,5%	2,5%	-
Condições de electrofição	Caudal (ml/h)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
	Voltagem (kv)	10	12	11	12	11	12	14
	Distância coletor e agulha (cm)	18	18	18	18	18	18	18

* Relativamente à massa de polímero; # Correspondente a uma percentagem de GS de 2.5% relativamente à massa de polímero

3.2.4 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOTUBOS DE HALOISITE E DAS MEMBRANAS ELECTROFIADAS

Quantificação do carregamento dos nanotubos de haloisite com sulfato de gentamicina

A quantidade de gentamicina (GS) carregada nos nanotubos de haloisite foi determinada por termogravimetria.

A análise termo gravimétrica (TGA) é utilizada para caracterizar uma ampla variedade de materiais, medindo a taxa de alteração de massa de uma amostra em função da temperatura ou tempo numa atmosfera controlada. As medições são utilizadas para determinar a estabilidade térmica e/ou oxidativa dos materiais (Juarez *et al*, 2013).

A perda de massa do sulfato de gentamicina, haloisite e haloisite carregada com sulfato de gentamicina, entre a temperatura ambiente e o 1200°C e a uma taxa de aquecimento

10°C/minutos, foi registada utilizando um aparelho de análise térmica simultânea (*TA Instruments SDT Q600*). Estas amostras foram mantidas em ambiente isolado para que possam manter as características e não haver influência nos resultados obtidos. Os termogramas obtidos foram analisados com o *software* TA Universal Analysis V4.2 E TA, e os valores de perda de massa das amostras foram utilizados para calcular a % de GS (p/p) carregada nos nanotubos.

Distribuição de tamanhos dos nanotubos de haloisite carregadas com sulfato de gentamicina por DLS

A análise da distribuição de tamanhos foi realizada através da técnica DLS (*Dynamic Light Scattering*), também conhecida ou espectroscopia de correlação de fótons (PCS). Esta técnica tem como base a análise da variação de intensidade da luz dispersa pelas partículas, a um ângulo fixo, em função do tempo. As partículas, em constante movimento mercê dos movimentos brownianos, dão origem a uma distribuição de luz em função do tempo, a qual é analisada por um correlacionador, resultando numa função de decaimento, de cujo declive se consegue retirar um coeficiente de difusão. Este coeficiente está relacionado (através da Eq. de Stokes- Einstein) com o tamanho das partículas. Para a realização da análise dispersou-se a amostra em meio líquido, água, sendo a leitura realizada pelo equipamento Malvern Zetasizer Nano.

Análise dos nanotubos de haloisite recorrendo à tecnologia SEM (Microscopia Eletrônica de Varrimento)

Pretende-se com esta técnica comparar visualmente as partículas de haloisite sem tratamento com as partículas após o tratamento com ácido sulfúrico e as partículas tratadas com o ácido sulfúrico após o carregamento com fármaco, sulfato de gentamicina. Este estudo foi realizado no Instituto Pedro Nunes (IPN) em Coimbra.

A microscopia eletrônica de varrimento tem como princípio de funcionamento a incidência de um feixe de elétrons na superfície das membranas, este feixe varre parte da superfície das membranas previamente “revestidas” com material condutor. Esta incidência provoca a emissão de elétrons secundários da superfície das membranas para um coletor e

detetor de sinal eletrónico que origina uma imagem com profundidade. Esta imagem é que vai permitir analisar a morfologia das nanopartículas.

Determinação do tamanho de poros através do método de adsorção de azoto

A superfície específica e a distribuição do tamanho de poros dos nanotubos de haloisite pura, tratados com ácido sulfúrico, e tratados com ácido sulfúrico e carregados com gentamicina foram avaliados a partir das isotérmicas de adsorção/dessorção de azoto; medidas em um aparelho de análise de superfícies ASAP-2000, da Micromeritics.

A partir das curvas de adsorção/dessorção foi calculada a superfície específica dos nanotubos, com base na teoria Brunauer-Emmett-Teller (BET), e a distribuição de tamanhos dos poros foi obtida com base no ramo da isotérmica de dessorção, utilizando o método de Barret-Joyner-Halenda (BJH).

Análise das fibras electrofiadas recorrendo à tecnologia (SEM)

As imagens obtidas por esta técnica, microscopia eletrónica de varrimento, foram também utilizadas para a determinação da distribuição de diâmetros das fibras nas diferentes imagens, utilizando o *software* de análise de imagem *ImageJ*. Para cada membrana, mediu-se o diâmetro de cerca de 100 fibras de forma a obter uma distribuição de tamanhos e um diâmetro médio.

Análise do comportamento hidrófilico das membranas por medição dos ângulos de contacto com água

O valor do ângulo de contacto entre uma gota de água e a superfície de um material é um parâmetro que permite avaliar de hidrofiliidade e/ou molhabilidade dos materiais. Neste trabalho os ângulos de contacto entre as fibras e uma gota de água foram determinadas num goniómetro com análise de imagem (OCA 20, Data Physics). Para cada membrana realizaram-se cerca de 5 a 7 medições de ângulo de contacto, sendo o ângulo de contacto final obtido através da média desses valores.

3.2.5 ESTUDO DA LIBERTAÇÃO *IN VITRO* DOS FÁRMACOS ENVOLVIDOS

Com o intuito de se determinar o perfil de libertação dos fármacos, dexametasona e sulfato de gentamicina, foram realizados testes de libertação *in vitro* para cada uma das membranas obtidas nas formulações preliminares e finais. Por isso, as membranas foram cortadas em tiras de 7X2 cm (massa entre 50 e 80mg) e colocadas em pequenos frascos com volume de 2,5ml ou 5ml de solução salina de tampão fosfato (PBS; pH= 7.4).

Os frascos com as membranas e o PBS foram colocados numa estufa a uma temperatura de 37°C e, em tempos pré-determinados, o meio de libertação foi totalmente removido e substituído por um equivalente de PBS fresco, sendo as amostras recolhidas armazenadas num frigorífico até serem analisadas. Este ensaio decorreu durante um período de 28dias.

Este procedimento foi realizado em triplicado para as membranas obtidas a partir das formulações finais. A solução salina de tampão fosfato (PBS) foi preparada com a junção de KCl (0,2g), NaCl (8,006g), Na₂HPO₄ (1,273g), KH₂PO₄ (0,318g) com um pH de 7,4.

No final dos ensaios, a quantidade de fármaco libertado em cada uma das amostras recolhidas foi determinada, por espectrofotometria de UV-visível, no final do período de libertação (28 dias).

Durante os testes *in vitro* nem todo o fármaco presente nas membranas é libertado para o meio. Como tal é necessário quantificar o fármaco presente nas membranas após o final do ensaio. Para isso, depois da recolha da última amostra de libertação, as amostras foram dissolvidas em 1ml de clorofórmio. De seguida adicionou-se 2,5 ml de PBS e agitou-se vigorosamente, para promover o contacto entre a fase orgânica e a fase aquosa e desta forma extrair o fármaco não libertado.

As amostras foram então centrifugadas, para separar as fases, e a fase aquosa recolhida. O processo de extração foi repetido por três vezes, sendo a quantificação do fármaco extraído realizada por espectrofotometria de UV-visível.

Quantificação da dexametasona e gentamicina presente nos ensaios de libertação e sobrenadante

A quantidade de sulfato de gentamicina e dexametasona presente nas amostras recolhidas nos ensaios de libertação, bem como a extraída no final dos ensaios foram igualmente determinadas por espectrofotometria UV/VIS.

Antes de iniciar o processo de espectrofotometria UV-visível é necessário criar soluções padrão de dexametasona em solução PBS em uma gama de concentrações de 2µg/ml e 30µg/ml de dexametasona. Estas soluções padrão permitem, através da leitura da absorvância num comprimento de onda de 242nm, criar uma curva de calibração que irá ser utilizada para o cálculo da quantificação da dexametasona. (Friedeich et al, 2009).

O sulfato de gentamicina é um composto que não absorve luz ultravioleta nem luz visível, sendo por isso necessário recorrer a um método indireto para realizar as leituras da absorvância. Um dos métodos possíveis e mais eficazes é a utilização de agentes de derivação como o O-ftaldaldaído que reage com os grupos amino presentes nas moléculas do sulfato de gentamicina, originando um derivado que absorve na região da luz visível.

Assim, procedeu-se à derivatização do sulfato de gentamicina presente nas amostras com o-ftaldaldaído antes de elas serem analisadas. Para isso seguiu-se o procedimento experimental desenvolvido por Cabanillas et al, 2000. Primeiro preparou-se uma solução de O-ftaldaldaído (reagente OPA) através da dissolução deste composto em uma solução constituída por borato de sódio, metanol e 2-mercaptoetanol.

Para proceder à leitura das absorvâncias por espectrofotometria *de* UV-visível foi colocado em cada célula, e em partes iguais (800 microlitros), o reagente O-ftalaldeído, o isopropanol e a amostra a analisar. Esta mistura foi então agitada vigorosamente em um agitador de vortéx durante alguns segundos e deixada a reagir durante cerca de 30 minutos, altura em que a absorvância da mistura foi lida a um comprimento de onda de 332nm, comprimento onde complexo de O-ftalaldeído-gentamicina absorve o máximo de luz (Cabanillas *et al*, 2000).

As leituras de absorvância de cada uma das amostras obtidas ao longo das quatro semanas, para cada um dos fármacos e dos sobrenadantes foram realizadas no equipamento Jasco V550, no final do período de libertação.

3.2.6 TESTES À ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA

A atividade antibacteriana do sulfato de gentamicina imobilizado nas nanofibras contra a estirpe de bactérias *Staphylococcus aureus* foi avaliada através de um teste de difusão em agar. Para isso as membranas foram cortadas em amostras circulares com 7 mm de diâmetro (com um peso de 4 -6 mg). Resumidamente, uma suspensão de bactérias com uma certa concentração foi espalhada sobre um filme de agar depositado num disco de Petri e as amostras foram colocadas sobre o filme inoculado.

As placas foram incubadas numa estufa a 35°C durante 24 h, altura em que se observaram e mediram os halos de inibição desenvolvidos ao redor das diferentes amostras.

Como controlos utilizou-se uma amostra de uma membrana com haloisite mas sem gentamicina (controlo negativo).

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo encontra-se dividido em duas partes. A primeira engloba os dados resultantes da caracterização morfológica e estrutural dos nanotubos de haloisite, incluindo a análise visual da estrutura dos nanotubos de haloisite por SEM. Após o tratamento com ácido, a que parte dos nanotubos foram sujeitos, foi necessário avaliar a influência deste tratamento no carregamento com antibiótico; para tal foram feitas as seguintes determinações: i) análise do diâmetro hidrodinâmico dos nanotubos; ii) análise da superfície específica, volume de poros e diâmetro de poros dos nanotubos; iii) análise de TGA por forma a analisar o efeito do tratamento ácido na capacidade de carregamento dos nanotubos.

A segunda parte deste capítulo integra os dados conseguidos para fibras obtidas por electrofiação. De salientar que estas fibras se podem encontrar em três formas distintas como foi referido no Capítulo 3. Inicialmente, as fibras foram sujeitas a uma análise morfológica (SEM), por forma a verificar as diferenças entre os três formatos de fibras electrofiadas.

Os estudos que envolvem as fibras electrofiadas focaram os seguintes aspetos: i) estudo da hidrofiliabilidade/hidrofobicidade das fibras, permitindo avaliar que tipo de interação vai existir entre as fibras e o meio a que vai ser exposto, o que, por sua vez, vai influenciar a difusão dos fármacos para o exterior das fibras; ii) estudo da libertação de fármacos ao longo do tempo, através de testes *in vitro*, que vão permitir a análise do perfil de libertação dos fármacos a partir dos quais se verifica se o tratamento é eficaz, e, por fim, iii) testes microbiológicos, que indicam se a conjugação polímero/haloisite/fármaco durante o processo de electrofiação altera as propriedades do antibiótico, e consequentemente, afeta a eficácia do tratamento.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOTUBOS DE HALOISITE

O tratamento das nanopartículas de haloisite com ácido sulfúrico teve, como já foi referido, o objetivo de provocar o aumento do diâmetro do lúmen dos nanotubos. A adição de ácido sulfúrico aos nanotubos de haloisite provoca uma interação entre os grupos (Al-OH) e os iões de hidrogénio, alterando fisicamente a superfície do lúmen provocando o seu aumento, logo elevando a área específica. (Zhang et al, 2012)

A caracterização realizada aos nanotubos vai permitir tirar conclusões acerca do tratamento ácido a que foram submetidos. Para tal, os nanotubos de haloisite foram analisados sem tratamento e após tratamento; além disso e para cada caso, foram analisadas amostras com e sem incorporação de sulfato de gentamicina.

4.1.2 ANÁLISE SEM

Pretendeu-se com a análise de SEM averiguar a morfologia das partículas de haloisite, Figura 4.1, tendo-se verificado que estas apresentam vários formatos desde estruturas tubulares, esferas e fragmentos de haloisite em aglomerados de haloisite. A análise da figura permite ainda concluir que os nanotubos têm comprimentos que variam sensivelmente 200 e 500nm.

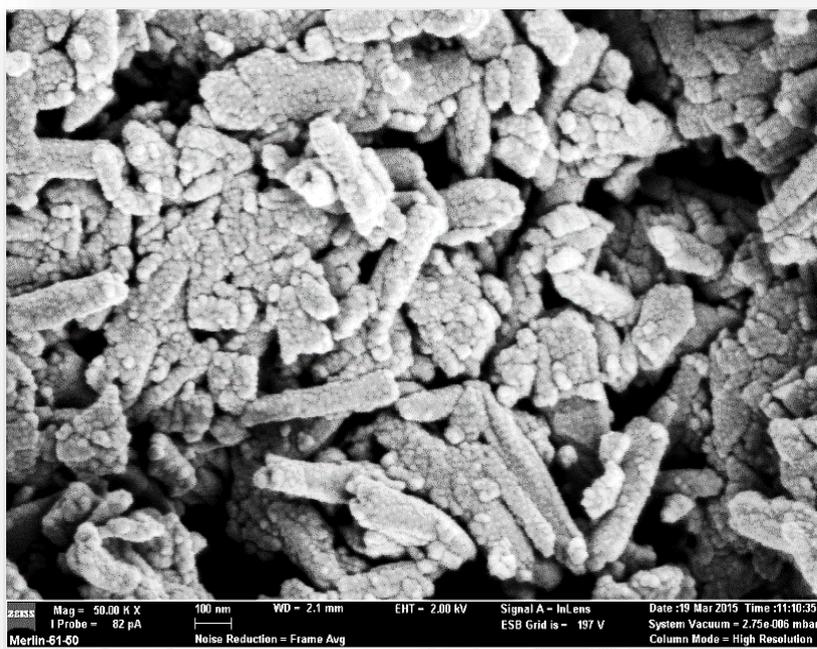


Figura 4.1 - Nanotubos de haloisite por análise SEM (ampliação 50000x e 100nm)

4.1.3 DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHOS POR DLS

Este estudo permite a análise do tamanho dos nanotubos por uma técnica de dispersão laser. Os resultados são expressos em termos de diâmetros hidrodinâmicos (correspondentes à difusão das partículas na suspensão). De salientar que não existem, para partículas

manométricas, técnicas de rotina adequadas para partículas tubulares como são os nanotubos de haloisite. Como tal, os “diâmetros” obtidos por DLS devem ser encarados com alguma precaução.

Os dados que constam da Tabela 4.1 são referentes às partículas de haloisite pura e de haloisite tratada com ácido, e incluem o diâmetro médio e o valor do índice de polidispersividade (Pdl), que dá uma ideia da largura da distribuição de tamanhos, bem como o desvio padrão (σ) para as três medições sucessivas.

Tabela 4.1 - Tamanhos médios dos nanotubos de haloisite pura e haloisite tratada, e os respetivos índices de polidispersividade

	Tamanho (d.nm) $\pm \sigma$	Pdl $\pm \sigma$
Haloisite pura	375 \pm 7,8	0,362 \pm 0,027
Haloisite tratada	247 \pm 4,2	0,273 \pm 0,019

Através dos dados obtidos é possível detetar uma diferença nos tamanhos dos dois tipos de haloisite, correspondendo a não tratada aos maiores valores. Esta diferença pode estar relacionada com os aglomerados presentes na dispersão (ver Figura 4.1 e AnexoIII), sendo que o tratamento possa ter facilitado a desaglomeração, permitindo leituras mais baixas para o diâmetro hidrodinâmico.

4.1.4 ISOTÉRMICA DE ADSORÇÃO

A adsorção física de moléculas de azoto à superfície dos nanotubos de haloisite, permitiu não só determinar a área superfície específica dos nanotubos (S (m^2/g)), como também ter uma estimativa do volume de poros (V_p (cm^3/g)) e respetivo diâmetro (D_p (nm)). Estes resultados encontram-se na Tabela 4.2, e na Figuras 4.2 e 4.3. Como referido, a análise foi feita no equipamento ASAP da Micromeritics, cujo *software* permite o cálculo da superfície específica por BET, e do volume e tamanho de poros pelo método de BJH, recorrendo às curvas isotérmicas de adsorção/dessorção. Estas determinações foram realizadas nas amostras de haloisite sem e com tratamento bem como nas amostras após incorporação de gentamicina.

Tabela 4.2 – Valores obtidos a partir das isotérmicas de adsorção de azoto

Amostra	S (m²/g)	V_p (cm³/g) *	D_p (nm)
Haloisite pura (Hal)	51	0,157	12,3
Haloisite tratada (Hal-T)	68	0,207	12,9
Haloisite tratada com gentamicina incorporada (Hal-T-GENT)	9	0,052	33,4

* A medição do volume de poros é realizada entre 1,7nm e 300nm.

A partir dos dados da Tabela 4.2, é possível constatar que para a haloisite pura, como esperado, a área específica é menor que a da haloisite após o tratamento com ácido sulfúrico, dado que o ácido proporcionou um desgaste ao lúmen dos nanotubos, aumentando consequentemente a sua área superficial.

Por sua vez, a haloisite tratada e carregada com gentamicina apresenta um valor de área de superfície específica muito menor (9 m²/g), o que é compatível com o facto dos poros da haloisite se encontram preenchidos com as moléculas de gentamicina, resultando numa área disponível menor. As mesmas conclusões se podem retirar relativamente ao volume de poros (V_p).

Por outro lado, o estudo do diâmetro de poro para a haloisite tratada e carregada com sulfato de gentamicina apresenta um valor bastante mais elevado o determinado para as amostras não carregadas de fármaco (33,4 nm). Este resultado está coerente com a maior área superficial e resulta provavelmente da porosidade entre as partículas/aglomerados.

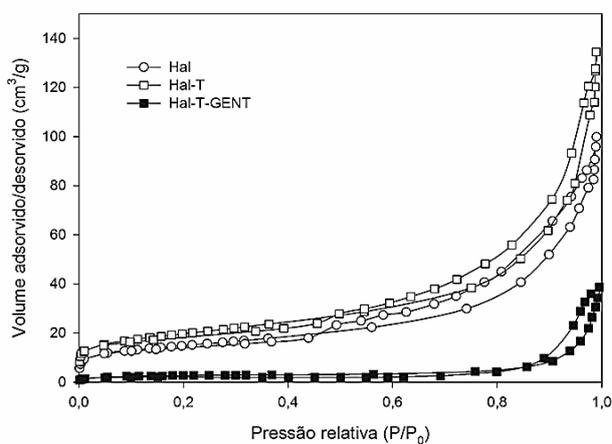


Figura 4.2- Gráfico das curvas isotérmicas de adsorção/dessorção de azoto

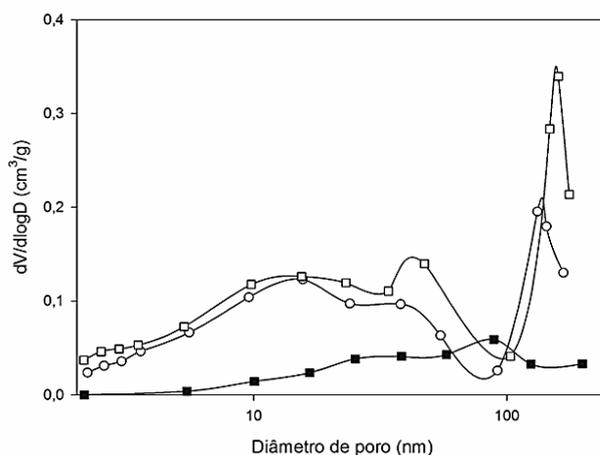


Figura 4.3- Representação da distribuição de tamanhos dos poros

A Figura 4.2 ilustra as isotérmicas de adsorção/dessorção e a Figura 4.3 as correspondentes distribuições de tamanhos de poros dos nanotubos de haloisite.

4.1.5 COMPORTAMENTO TÉRMICO (TGA)

Para o estudo da eficácia do carregamento dos nanotubos de haloisite com sulfato de gentamicina recorreu-se á técnica de TGA. Foram analisadas quatro amostras de sulfato de gentamicina, de haloisite pura, de haloisite pura carregada com sulfato de gentamicina (Figura 4.4) e de haloisite tratada com ácido sulfúrico e carregada com sulfato de gentamicina (Figura 4.5).

Relativamente ao sulfato de gentamicina, é possível observar na Figura 4.4 e 4.5 o perfil da perda de massa em função da temperatura. Este é caracterizado por dois degraus de perda de massa. O primeiro, que ocorre sensivelmente entre o 50°C e os 150°C, corresponde à evaporação da água presente no sulfato de gentamicina. A perda de massa é de cerca de 10%, o que se encontra de acordo com as especificações do fornecedor do antibiótico.

O segundo grande passo de perda de massa observa-se entre os 250°C e 350°C e é atribuído à degradação do antibiótico. A partir dos 350°C observa-se uma perda gradual de massa gradual até os 1200°C, temperatura a que se finalizou a análise.

A essa temperatura, a percentagem de massa residual de GS é de cerca de 28%. Esta massa provém provavelmente de componentes inorgânicos presentes no fármaco provenientes do seu processo de fabrico e também dada a atmosfera inerte em que este teste é realizado.

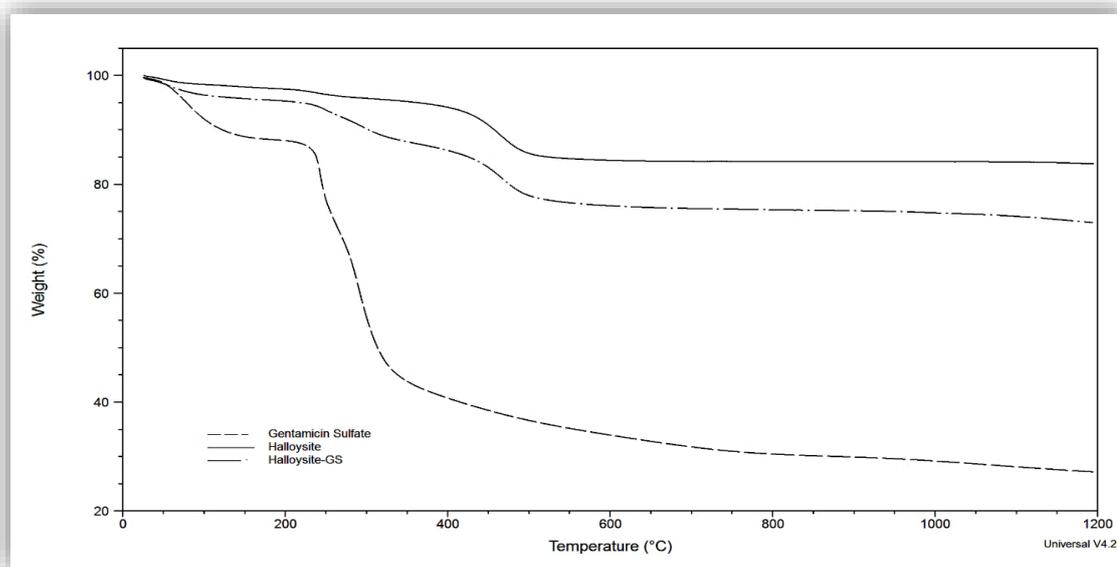


Figura 4.4 - Curva de TGA para o estudo da haloisite pura (---) sulfato de gentamicina, (—) haloisite, (- · -) haloisite carregada com GS

Tanto para a haloisite pura (Figura 4.4) como para a haloisite tratada com ácido sulfúrico (Figura 4.5), há uma ligeira perda de massa até aproximadamente 250°C atribuída à eliminação das moléculas de água presentes na estrutura química dos nanotubos, dadas às interações intermoleculares. Observa-se ainda, nos dois casos, um degrau de perda de massa a cerca de 450°C com uma amplitude de aproximadamente 15%, que, segundo a literatura, corresponde à desidroxilação dos aluminosilicatos (Cheng *et al*, 2010).

Os nanotubos de haloisite carregados com gentamicina (Figura 4.4) e os nanotubos tratados com ácido sulfúrico carregado com gentamicina (Figura 4.5) têm também um perfil de perda de massa idêntico, sendo que este perfil combina os diferentes passos de perda de massa atribuídos à GS e à Haloisite.

A perda de massa da Haloisite carregada com GS atingiu aproximadamente os 25%, $T \approx 400^\circ\text{C}$, na Figura 4.4, dadas as características anteriormente referidas para cada um dos componentes.

Com base na alteração da percentagem de massa é possível quantificar o fármaco no interior dos nanotubos. Esta quantificação foi realizada a partir da análise dos gráficos das Figuras 4.4 e 4.5 e o recurso a balanços de massa, Tabela 4.3 e Anexo I.

Tabela 4.3 - Valores obtidos através da técnica de TGA

	Sulfato de gentamicina	Haloisite pura sem GS	Haloisite pura com GS	Haloisite tratada sem GS	Haloisite tratada com GS
Cinzas restantes (%)	28	85	75	86	72
Carregamento com GS (%)	--	--	17,5	--	25

Relativamente à curva de haloisite pura com sulfato de gentamicina incorporado, (Figura 4.4), a percentagem de sulfato de gentamicina incorporado foi de 17,5%. Para os nanotubos de

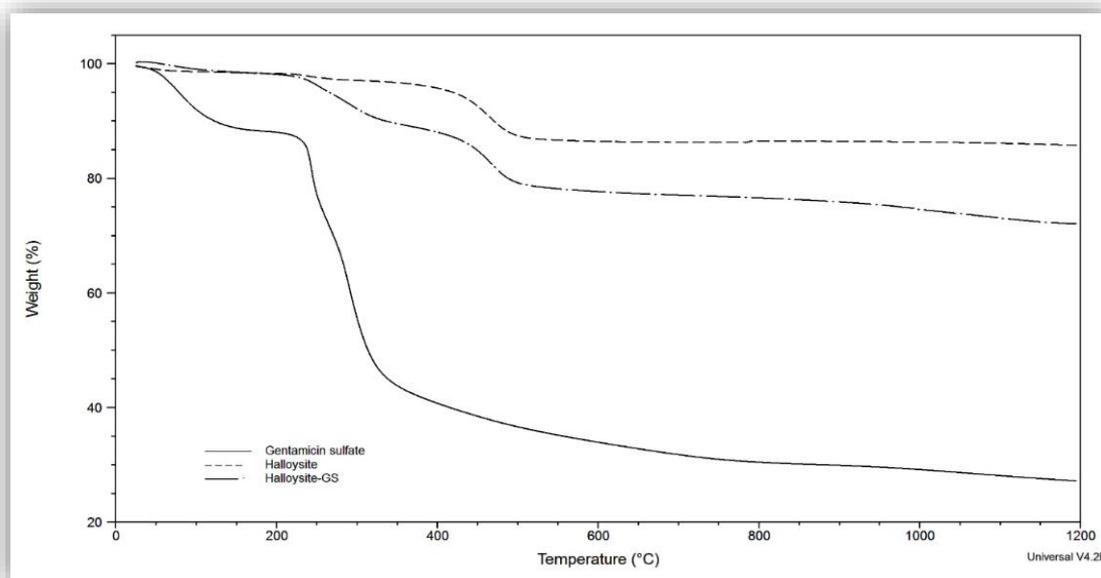


Figura 4.5 - Curva de TGA para o estudo após o tratamento da haloisite com ácido sulfúrico (—) sulfato de gentamicina, (- - -) haloisite, (- · -) haloisite carregada com GS)

haloisite tratada (Figura 4.5) o valor de sulfato de gentamicina incorporado foi de aproximadamente 25%, Tabela 4.3.

Após o tratamento há um aumento na percentagem de GS integrado nos nanotubos, o que indica que o tratamento permitiu o aumento da capacidade de carregamento do GS nos nanotubos, como se pretendia. Sendo sustentado pela análise dos valores de derivados das isotérmicas de adsorção relativos ao volume dos poros dos nanotubos.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOFIBRAS DE BASE POLIMÉRICA

Como já referido a técnica de electrofiação é um método simples para produzir fibras ultrafinas, numa gama de diâmetros que se encontra entre o micro e nanómetros, através da aplicação um forte campo eléctrico na solução polimérica. Estas fibras podem funcionar como sistema de libertação controlada de fármaco, detendo características como a grande capacidade de reter fármacos e outros componentes, a par da possibilidade controlar a morfologia das fibras, obtendo elevada área superficial e bio mimetismo. (Hu *et al*, 2014)

4.2.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS MEMBRANAS NANOFIBROSAS

Como referido anteriormente a realização das formulações preliminares teve como intuito adequar as condições de electrofiação e da solução polimérica ao objetivo pretendido. A visualização das imagens SEM permitem perceber se as fibras obtidas têm uma morfologia adequada.

Formulações preliminares

Na Figura 4.6 apresenta-se uma imagem de SEM ilustrativa da morfologia das fibras obtidas com as formulações preliminares. Como se pode observar, distribuído por entre as fibras encontra-se uma quantidade significativa de aglomerados de polímero, designados por *beads*. Estas estruturas formam-se devido a vários fatores, entre os quais a utilização de uma concentração de polímero demasiado baixa, um caudal de alimentação do electrospinning muito elevado, ou a aplicação de uma voltagem inadequada.

Assim, e com base nestes resultados, aquando da preparação e electrofiação das formulações finais estes parâmetros foram ajustados. Nomeadamente aumentou-se a concentração de polímero das soluções poliméricas e reduziu-se o caudal, Tabela 3.5 e 3.6. Embora uma parte dos nanotubos se encontre individualmente incorporados ao longo das fibras, observam-se grandes aglomerados de nanotubos, como ilustra a Figura 4.7.

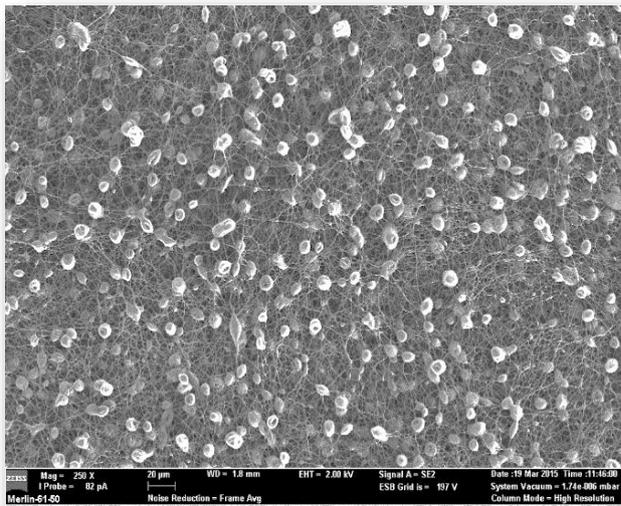


Figura 4.6- Membrana pPLA +DEX (ampliação 250x, 20µm)

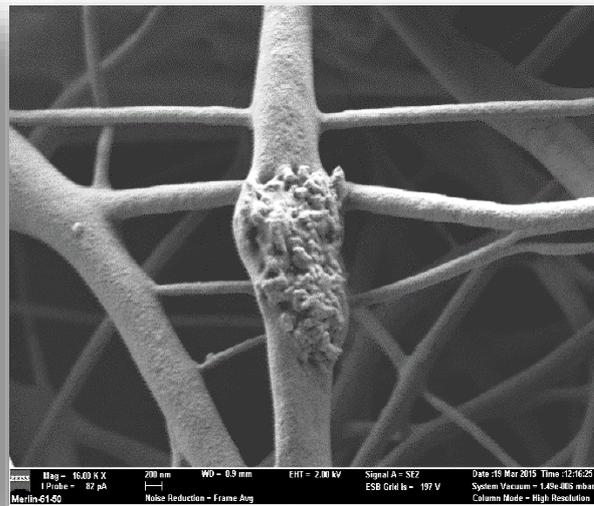


Figura 4.7 – Membrana pPLA + HGS+ GS (ampliação 16000x, 200nm)

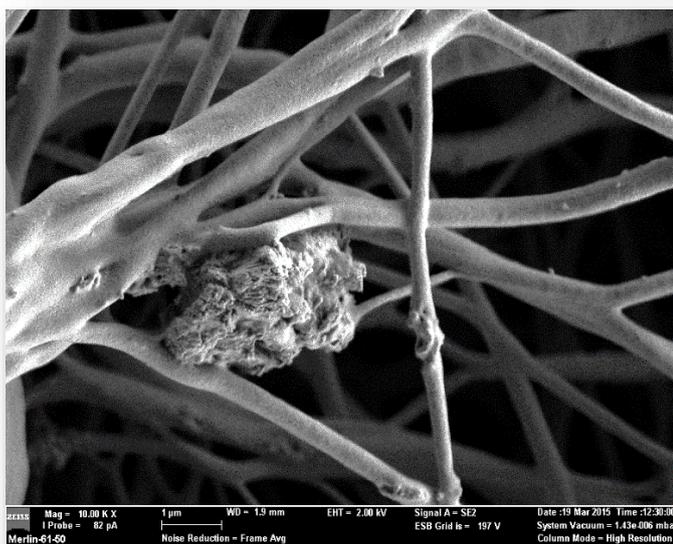


Figura 4.8 - Membrana pPLA+HGS+GS+ ácido oleico (ampliação 10000x, 1µm)

Numa tentativa de melhorar a dispersão dos nanotubos nas soluções poliméricas, e dessa forma obter uma distribuição mais uniforme ao longo das fibras, preparou-se uma formulação com a presença de ácido oleico, um composto normalmente utilizado para dispersar nanopartículas. (Ruckh et al, 2012).

Na Figura 4.8 pode-se observar um pormenor das fibras resultantes desta formulação, evidenciando ainda a presença de grandes aglomerados de nanotubos, não se tendo observado alterações significativas na dispersão dos nanotubos ao longo das fibras comparativamente com as restantes formulações.

Assim optou-se por não incorporar este composto nas formulações finais, tendo-se procedido a outras medidas para tentar reduzir o grau de agregação dos nanotubos. Nomeadamente procedeu-se à moagem num almofariz dos pós de haloisite carregados com GS antes destes serem utilizados e alterou-se o modo de preparação das misturas poliméricas, alterando a ordem de adição dos vários componentes. Em que inicialmente adicionou-se aos solventes o polímero, a haloisite, o fármaco, nas formulações finais optou-se por adicionar aos solventes a haloisite e o fármaco e após um período de agitação adicionou-se, por fim, o polímero, esta alteração permitiu que o numero de beads reduziu-se substancialmente, assim como a presença de aglomerados de nanotubos.

Formulações finais

As imagens de SEM subsequentes são referentes às formulações finais e nelas consta histogramas da distribuição de diâmetros as fibras, avaliados através do *software ImageJ*; o valor médio de diâmetro e o seu desvio padrão encontram se na Tabela 4.4.

De uma forma geral todas as formulações finais originaram fibras contínuas com poucos beads, o que indica que as alterações efetuadas (aumento da concentração de polímero e diminuição do caudal) surtiram efeito desejado. Nas Figuras 4.9 e 4.10 pode-se comparar a morfologia das fibras de PLA com sulfato de gentamicina “livre” (PLA + GS) com a morfologia das fibras de PLA com dexametasona (PLA+DEX), que correspondem às fibras que não têm haloisite.

Como se pode ver, ambas as membranas apresentam fibras com uma distribuição de diâmetros alargada, sendo que o diâmetro médio das fibras PLA+GS à volta de 3700 nm é claramente maior que o diâmetro médio das fibras PLA+DEX, que anda à volta dos 1800 nm (Tabela 4.4).

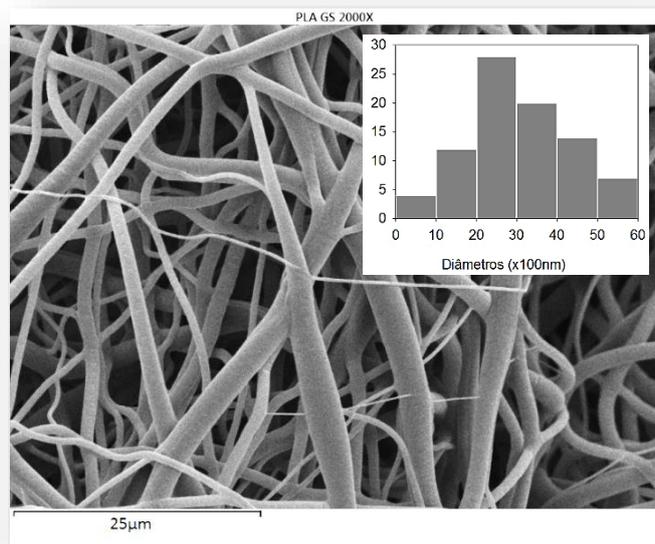


Figura 4.9 - Membrana de PLA+GS e representação do histograma distribuição de diâmetros das fibras

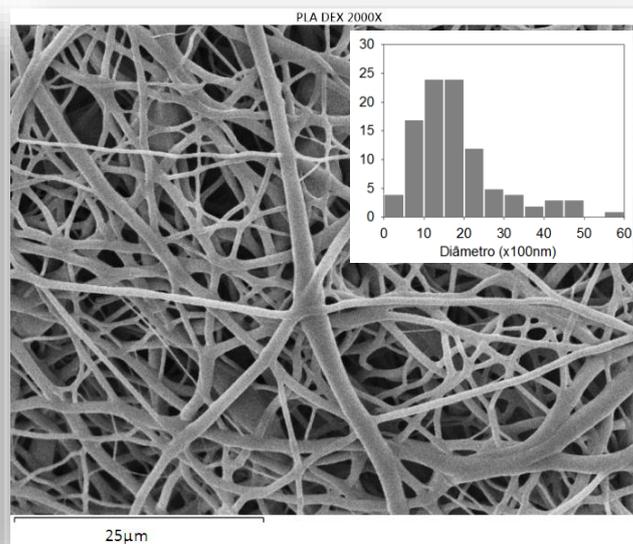


Figura 4.10 - Membrana de PLA+DEX e representação do histograma distribuição de diâmetros das fibras

Comparando fibras para a formulação sem fármacos, composta apenas pelo polímero PLA e a haloisite (PLA+ H, Figura 4.11), com as fibras de polímero PLA e haloisite carregada com GS (PLA+HGS, Figura 4.12), constata-se que não existem grandes diferenças entre as morfologias e nos tamanhos médios das fibras (Tabela 4.4) o que indica que a incorporação de GS nos nanotubos não tem uma influência significativa na formação das fibras.

Tantos nestas duas membranas como nas restantes membranas que incorporam haloisite observavam-se alguns aglomerados, mas muito mais pequenos e completamente integrados e distribuídos ao longo das fibras.

Estas observações indicam que a moagem da haloisite e a alteração do procedimento experimental contribuiriam positivamente para uma dispersão mais homogénea dos nanotubos na matriz polimérica.

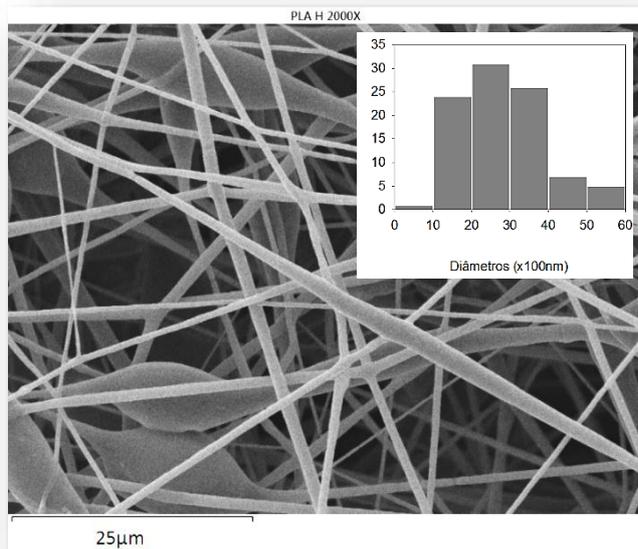


Figura 4.11- Membrana PLA+H e representação do histograma de distribuição de diâmetros das fibras

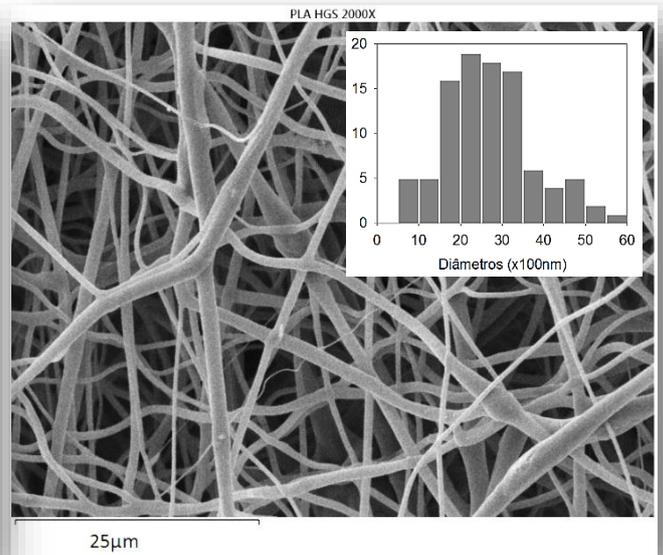


Figura 4.12- Membrana PLA+HGS e representação do histograma de distribuição de diâmetros das fibras

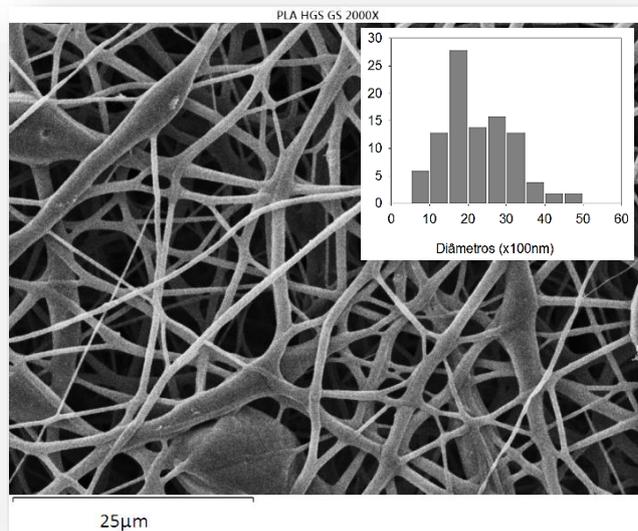


Figura 4.13- Membrana de PLA+HGS+GS e representação do histograma distribuição de diâmetros das fibras

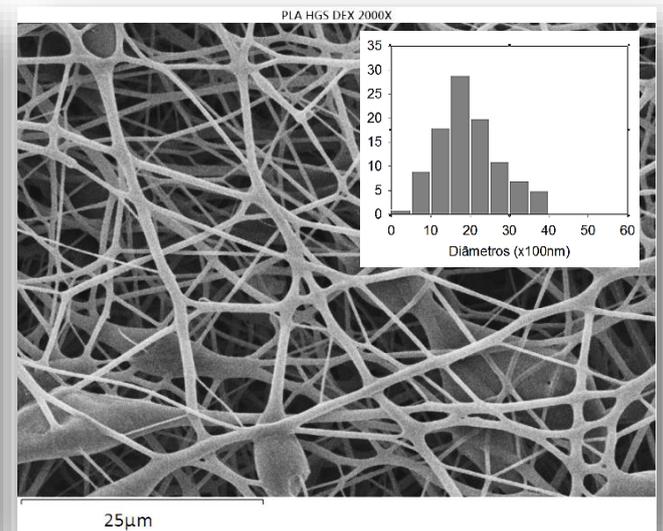


Figura 4.14 -Membrana de PLA+HGS+DEX e representação do histograma distribuição de diâmetros das fibras

Em relação à membrana PLA+HGS+GS (polímero, haloisite carregada com sulfato de gentamicina e sulfato de gentamicina “livre”) e membrana PLA+HGS+DEX (polímero, haloisite carregada com sulfato de gentamicina e dexametasona) observa-se comportamento similar às membranas PLA+GS e PLA+DEX, onde o diâmetro médio das fibras é maior para a membrana onde é adicionado o GS, 2231nm, que para a membrana PLA+HGS+DEX, 1963nm, Figura 4.13 e 4.14.

Relativamente à formulação PLA+HGS+DEX+GS, Figura 4.15, a média de diâmetro de fibra foi de aproximadamente 2306nm, ligeiramente superior à membrana PLA+HGS+GS, mas muito superior PLA+HGS+DEX.

Conclui-se pela observação dos diâmetros médios das fibras obtidas para as membranas formuladas que estas apresentam valores de diâmetro muito elevados, na ordem dos micrómetros, enquanto os tamanhos reportados na literatura apresentam valores na ordem dos nanómetros, p.e. 560nm (Kayaci *et al*, 2013), 741nm (Zaheni *et al*, 2011) e 1106nm (Torres-Giner *et al*, 2011).

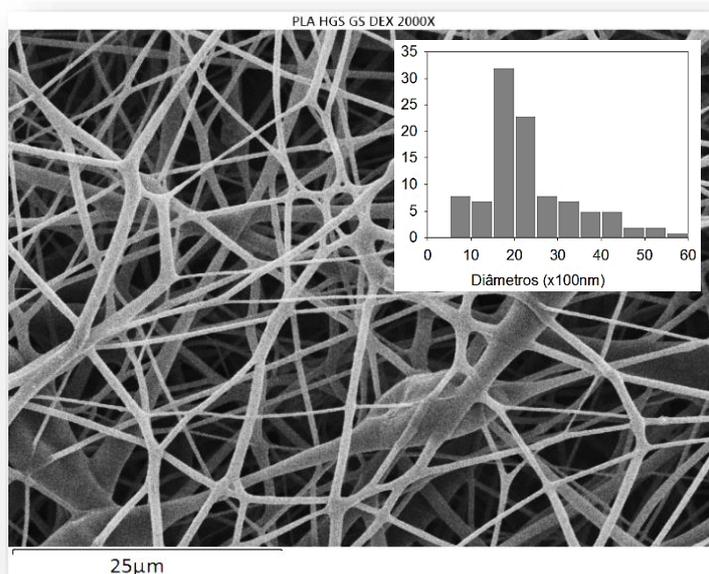


Figura 4.15 - Membrana de PLA+HGS+GS+DEX e representação do histograma distribuição de diâmetros das fibras

Na Tabela 4.4, como referido anteriormente, consta um breve estudo estatístico dos valores de médias e desvio padrão para os diâmetros das fibras, estes permitiram relacionar e tirar conclusões acerca da influência da adição de fármaco e de haloisite relativamente a cada uma das formulações.

Tabela 4.4- Distribuição da média e desvio padrão (σ) dos diâmetros (nm) das fibras das formulações finais

	Média \pm σ (nm)		Média \pm σ (nm)
PLA+ DEX	1852 \pm 1192	PLA+ HGS +DEX	1963 \pm 798
PLA+ GS	3711 \pm 2036	PLA+ HGS +GS	2231 \pm 914
PLA+ H	3091 \pm 1594	PLA+ HGS +DEX +GS	2306 \pm 1064
PLA+ HGS	2798 \pm 1236		

4.2.2 ANÁLISE DO COMPORTAMENTO HIDRÓFILICO DAS NANOFIBROSAS

O valor do ângulo de contato formado entre uma gota de água e uma superfície permite avaliar acerca da hidrofiliicidade/hidrofobicidade dessa superfície. A adsorção de água sobre a superfície é resultante das forças intermoleculares, quanto maiores maior a tensão superficial e maior o angulo de contacto.

As membranas que foram submetidas ao estudo exibem valores acima de 120°, elevada repelência à água (Figura 4.16), o que indica que estas possuem um carácter marcadamente hidrofóbico. Isto é um resultado esperado, visto o PLA ser um polímero hidrofóbico.

As membranas constituídas por polímero e fármaco apresentam ângulos que variam entre o 130° e 134°, enquanto as membranas que apresentam polímero, fármaco e nanotubos de haloisite têm valores de ângulos de contacto ligeiramente menores, que variam entre os 119° e 125°. Esta ligeira diminuição dos ângulos de contacto nas fibras que incorporam haloisite pode ser relacionado com os nanotubos, que permitem uma maior adesão das moléculas de água à superfície das membranas, devido ao facto de a haloisite ter compostos polares que possibilitam a hidrofilia (Abdullayev & Lvov, 2013).

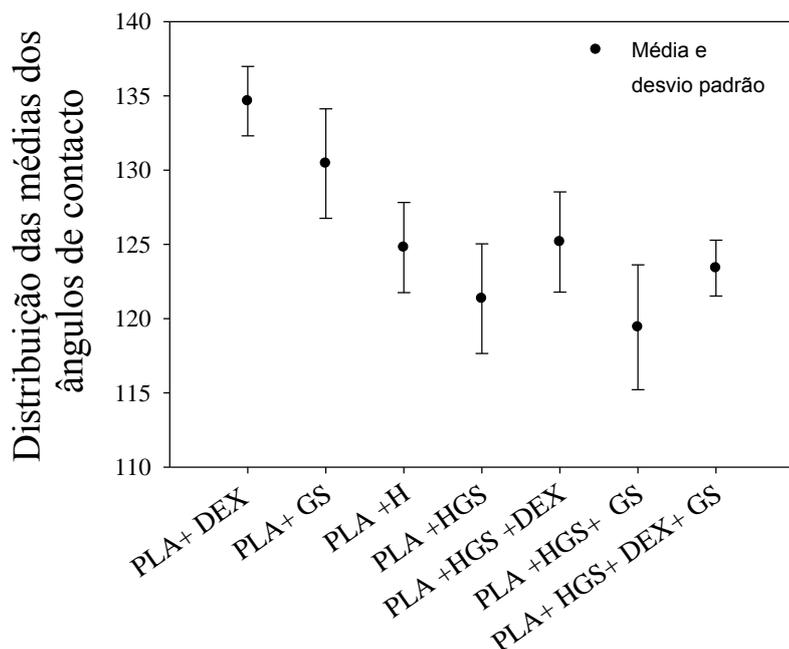


Figura 4.16- Representação da distribuição da média e desvio padrão dos ângulos de contacto para as formulações

4.2.3 ESTUDO DA LIBERTAÇÃO IN VITRO DO SULFATO DE GENTAMICINA E DA DEXAMETASONA

Análise ao perfil de libertação in vitro para as formulações preliminares

A estrutura das membranas de nanofibras incorpora naturalmente defeitos e imperfeições como poros, espaço entre as fibras e entalhes na matriz polimérica. Estes fatores permitem a entrada do PBS e com isto a lixiviação do fármaco para o exterior das membranas.

Para além destes fatores, o diâmetro das fibras também vai influenciar a libertação de fármaco, ou seja, quanto maior o diâmetro de fibra, menor a área exposta ao meio de libertação e deste modo menor a libertação de fármaco, dado a que este se encontra no interior da matriz polimérica. A natureza da base polimérica também afeta a entrada de PBS nas fibras e consequentemente a libertação de fármacos, neste caso o PLA (poli (ácido láctico)) é um composto hidrofóbico, o que retardar a entrada de PBS na matriz. Os perfis de libertação *in vitro* do sulfato de gentamicina e da dexametasona incorporados nas membranas obtidas com

as formulações preliminares (p), são apresentados na Figura 4.17 e as curvas de calibração no Anexo II.

Comparando as membranas que apenas são constituídas por polímero e fármaco (GS ou DEX) verifica-se que a libertação da GS (pPLA+GS) a partir das nanofibras dá-se de forma muito mais rápida e numa maior extensão que a libertação da dexametasona (pPLA+DEX). Enquanto a membrana (pPLA+GS), liberta 22% de GS nas primeiras 24h, a libertação de dexametasona no mesmo período de tempo atinge apenas os 6%. No final do período de estudo, 21 dias, a libertação de GS atingiu os 64% enquanto a dexametasona atingiu apenas os 18%. Os perfis obtidos podem ser explicados pela natureza dos fármacos envolvidos, sendo que o GS é hidrófilico e daí uma libertação mais rápida, e a dexametasona é hidrofóbica e a sua libertação torna-se mais lenta.

Na Figura 4.17 é possível também comparar a libertação de GS a partir das fibras resultantes das formulações pPLA+HGS e pPLA+HGS-ácido oleico. Nestas duas membranas a GS presente nas nanofibras encontra-se carregada nos nanotubos de haloisite, sendo que estas diferem apenas na presença ou não de ácido oleico, adicionado na formulação pPLA+HGS-ácido oleico com o intuito de melhorar a dispersão dos nanotubos. Seria de esperar que estas duas membranas apresentassem perfis de libertação semelhantes, mas como se pode observar os perfis obtidos diferem drasticamente. Assim verifica-se que ao fim das primeiras 24 horas a membrana com ácido oleico liberta aproximadamente 73% de GS, enquanto a membrana pPLA+HGS liberta no mesmo período de tempo de apenas 10% de GS atingindo apenas 36% no final de 21 dias. Estes resultados indicam que a adição do ácido oleico, embora não tenha proporcionado uma melhor dispersão das partículas de haloisite, tem uma influência determinante na cinética de libertação da GS.

Comparando ainda a membrana em que a GS se encontra carregada nos nanotubos (pPLA+HGS) com a membrana em que o antibiótico se encontra apenas disperso nas nanofibras (pPLA + GS), observa-se que a libertação da GS desta última membrana ocorre a uma taxa mais elevada do que a registrada para a membrana pPLA+HGS, o que era expetável dado que os nanotubos retêm a libertação de fármaco.

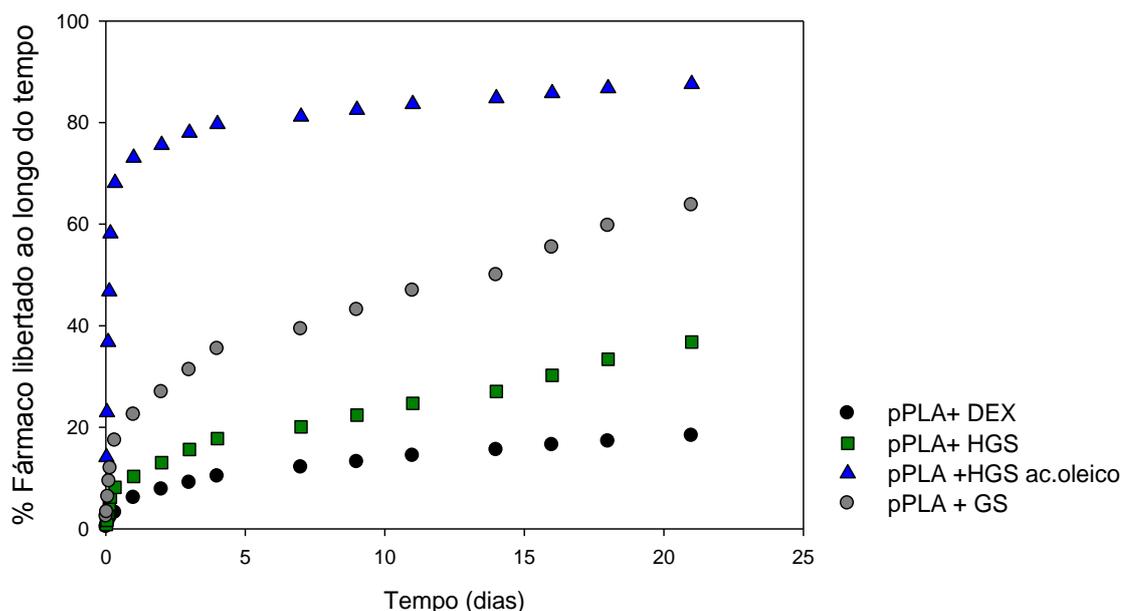


Figura 4.17 - Perfil de liberação (%) de sulfato de gentamicina e dexametasona para as membranas nas formulações preliminares durante 21 dias

Análise ao perfil de liberação in vitro do sulfato de gentamicina para as formulações finais

Como se discutiu anteriormente, os resultados obtidos com as formulações preliminares contribuíram para afinar os procedimentos e ajustar alguns parâmetros das formulações e das condições operacionais do processo de electrofiação que permitiram, nas formulações finais, obter fibras contínuas com poucos *beads* e com uma melhora dispersão das nanopartículas de haloisite.

Um dos aspetos que se pretendia investigar com as membranas produzidas com as formulações finais era os perfis de liberação obtidos com os diferentes métodos utilizados para incorporar a GS nas nanofibras, que incluíam:

- i) A simples dispersão das partículas de fármaco na solução polimérica (PLA+GS);
- ii) A dispersão dos nanotubos de haloisite carregadas com GS na solução polimeria (PLA+HGS);
- iii) A conjugação das duas formas anteriores, onde metade da GS era adicionada na forma livre e a outra metade imobilizada nas partículas de haloisite (PLA+HGS+GS).

Os perfis de liberação da GS para as membranas correspondentes a estes três métodos encontram-se representados na Figura 4.18.

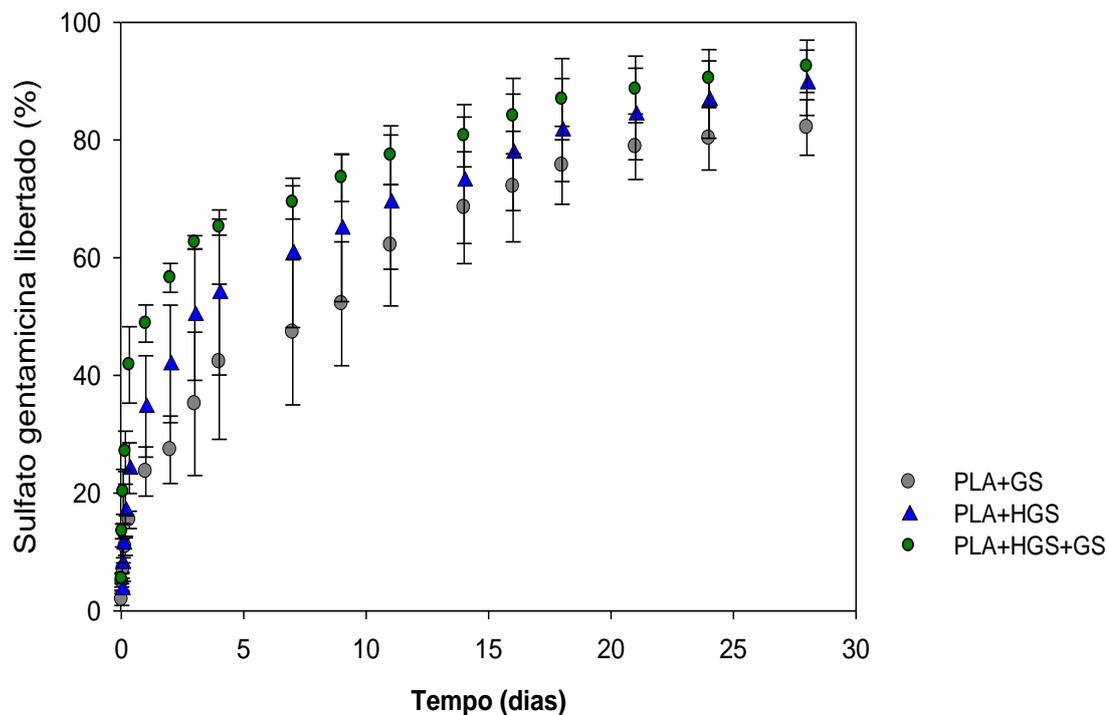


Figura 4.18 - Perfil de liberação (%) de sulfato de gentamicina libertado ao longo de 28 dias

Como se pode verificar, os três perfis de liberação seguem as mesmas tendências: No primeiro dia verifica-se um *burst release* com a liberação de 23% (PLA+GS), 34% (PLA+HGS) e 49% (PLA+HGS+GS) do antibiótico; segue-se um período de duas a três semanas caracterizado por uma liberação gradual de GS, a uma taxa aproximadamente constante; na última semana, a taxa de liberação diminui, tendendo para um patamar. No final do ensaio, às quatro semanas, mais de 80% do antibiótico foi libertado.

Considerando apenas o método de incorporação da GS, e considerando que o mecanismo que domina a liberação é a difusão (a degradação do polímero terá pouca influência, visto que o tempo médio de biodegradação do PLA é muito superior ao período de liberação investigado), era de esperar que a membrana PLA+GS apresentasse uma cinética de liberação mais rápida do que a membrana PLA+HGS, como se observou nas formulações preliminares. Isto porque nas fibras de PLA+HGS o antibiótico tem teoricamente mais barreiras para ultrapassar, visto que primeiro tem de se difundir para o exterior dos nanotubos (caso esteja

efetivamente no interior do lúmen) ou ser desadsorvido da superfície dos nanotubos (se tiver imobilizado à superfície), antes de se difundir por entre a matriz polimérica até à superfície das fibras. No entanto, o perfil de libertação da membrana PLA+GS é até ligeiramente mais lento que o da membrana PLA+ HGS. Estes resultados podem ter várias causas, como o padrão de distribuição das nanopartículas de haloisite ao longo das fibras ou a morfologia e as dimensões das fibras. Como se discutiu anteriormente, o diâmetro médio das fibras de PLA+GS e PLA+HGS é de 3711 nm e 2798 nm, respetivamente (Tabela 4.4).

Adicionalmente, o facto de que as fibras de PLA+HGS são em média consideravelmente menores em diâmetro que as fibras PLA+GS, implica que nestas últimas, a GS imobilizada no interior das nanofibras tem de percorrer um caminho difusional mais longo, o que retarda a cinética de libertação de libertação do fármaco, ou seja, menor diâmetro vai exibir maior área ao meio e daí maior libertação, dada que esta é realizada por difusão no sentido radial.

Quanto à membrana PLA+HGS +GS, esta tem imobilizado o dobro do fármaco (Tabela 3.3) do que as outras duas membranas, e é constituída por fibras com o diâmetro médio ainda mais pequeno (2231 nm), o que explica o facto de ter o perfil de libertação mais rápido das três membranas e o *burst release* mais acentuado, o que era expectável.

Um dos grandes objetivos deste trabalho era produzir uma membrana que libertasse, simultaneamente e de forma controlada, a GS e a dexametasona (DEX). Assim, em algumas formulações foram combinados os dois fármacos.

Na Figura 4.19 encontram-se representados os perfis de libertação da GS a partir membranas PLA+HGS+DEX e PLA+HGS+DEX+GS, as membranas que incorporam os dois fármacos em simultâneo. Na mesma figura, e para efeitos de comparação, representam-se novamente os perfis de libertação da GS das membranas PLA+HGS e PLA+HGS+GS. Os fármacos presentes encontram-se na mesma proporção, Tabela 3.3.

Como se pode verificar, a presença da dexametasona contribui para um ligeiro aumento da taxa de libertação da GS, comparativamente com as membranas correspondentes sem DEX.

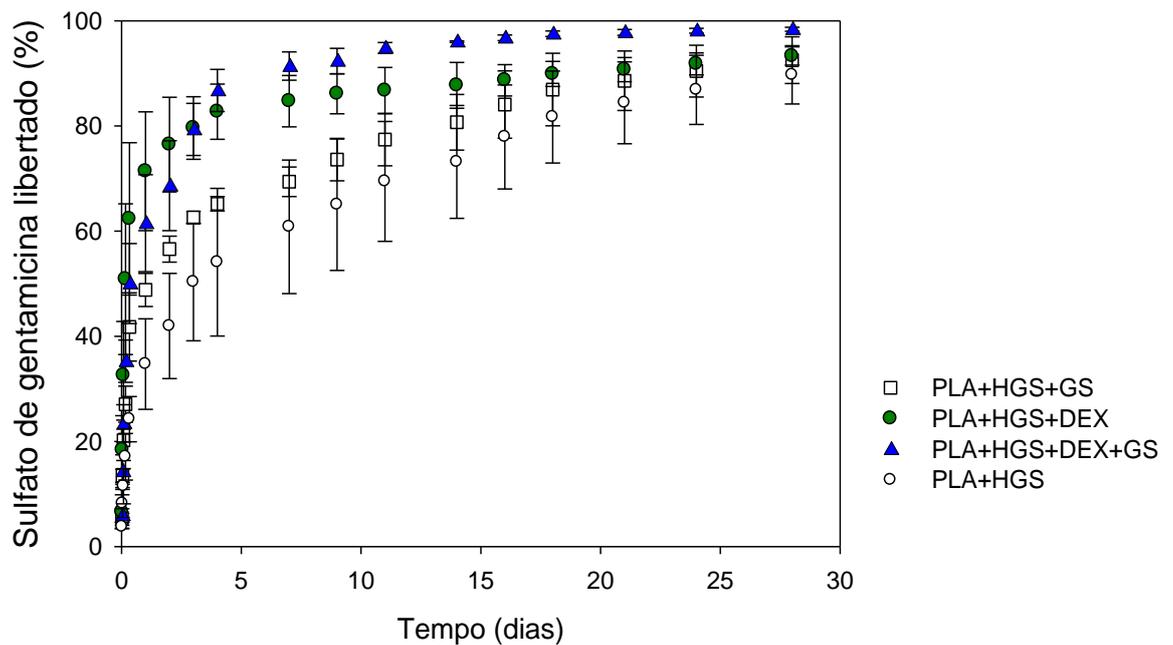


Figura 4.19 - Perfil de libertação (%) de sulfato de gentamicina libertado

Por outro lado, e de forma muito mais marcada, a presença de GS, na forma livre ou imobilizada nos nanotubos altera substancialmente o perfil de libertação da dexametasona. Isto pode ser observado na Figura 4.20, onde se comparam os perfis de libertação da DEX a partir da membrana só com dexametasona (PLA+DEX) e das membranas com os dois fármacos (PLA+HGS+DEX e PLA+HGS+DEX+GS).

Pela análise das curvas de libertação da dexametasona verifica-se que a libertação a partir da membrana PLA +DEX é bastante mais lenta e gradual, em comparação com as outras duas.

A extensão do *burst release*, considerado neste contexto como a percentagem de fármaco libertado durante as primeiras 24h, é também marcadamente inferior, apresentando um valor de 12% em contraste com os 25% e 38% das membranas PLA+HGS+DEX+GS e PLA+HGS+DEX. O facto de a libertação da DEX ser bastante lenta deve-se em parte à grande hidrofobicidade da dexametasona e à boa compatibilidade entre esta e o PLA, existindo fortes interações moleculares entre ambos. Por outro lado, a baixa taxa de carregamento de DEX nas fibras (2,5%, relativamente ao peso do polímero) também favorece uma libertação lenta.

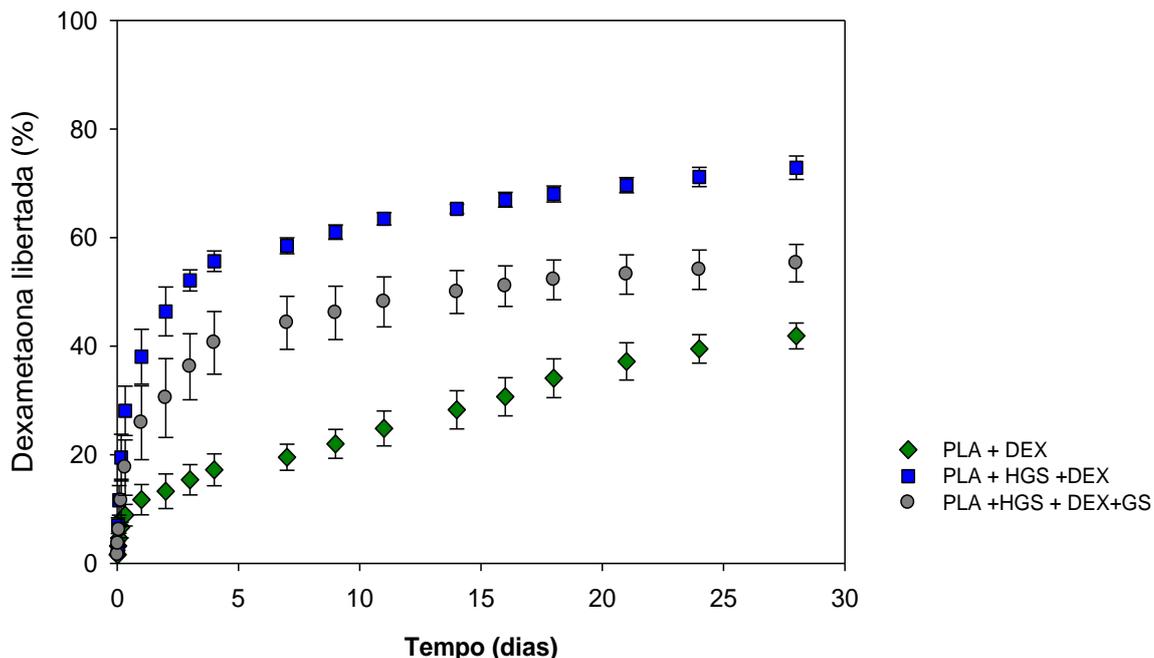


Figura 4.20- Perfil de liberação (%) da dexametasona em 28 dias

Quando a GS (altamente hidrófila) está presente, é rapidamente dissolvida quando em contacto com o PBS e difunde-se mais depressa até à superfície das fibras. Esta liberação relativamente mais rápida do GS cria microporosidades ao longo das fibras, que, por sua vez, facilitam a difusão da DEX, proporcionando assim um perfil de liberação mais rápido.

Como se pode também constatar na Figura 4.20, no final dos 28 dias de ensaio a liberação da DEX não é completa, sendo a percentagem de DEX libertada ao fim deste tempo de 42% para a membrana PLA+DEX, 55% para a membrana PLA+HGS+ DEX +GS, e 72% para a membrana PLA+HGS+DEX. Assim o período de liberação da DEX será superior a um mês, podendo mesmo a liberação total da DEX só ser atingida por degradação do polímero sendo que a liberação irá depender da taxa de degradação do polímero. (Vacanti *et al*, 2012)

Finalmente, e em jeito de síntese, nas Figuras 4.21 e 4.22 apresentam-se os gráficos dos perfis de liberação dos dois fármacos, para as membranas PLA+HGS+DEX e PLA+HGS+ DEX +GS respetivamente, onde é possível verificar a hidrofobia da DEX, com uma liberação lenta, e com menor *burst release* relativamente ao GS. Dado o perfil de liberação da dexametasona, esta mantém o efeito terapêutico por um período mais longo que o GS, retardado uma resposta adversa do organismo à membrana.

Comparando as duas membranas é possível verificar o efeito do diâmetro de fibra relativamente ao perfil de libertação dos fármacos, maior diâmetro de fibra para a membrana PLA+HGS+ DEX +GS revela menor libertação de DEX; enquanto o GS tem um perfil mais acentuado em relação à membrana PLA+HGS+DEX, devido a maior quantidade de fármaco presente na membrana.

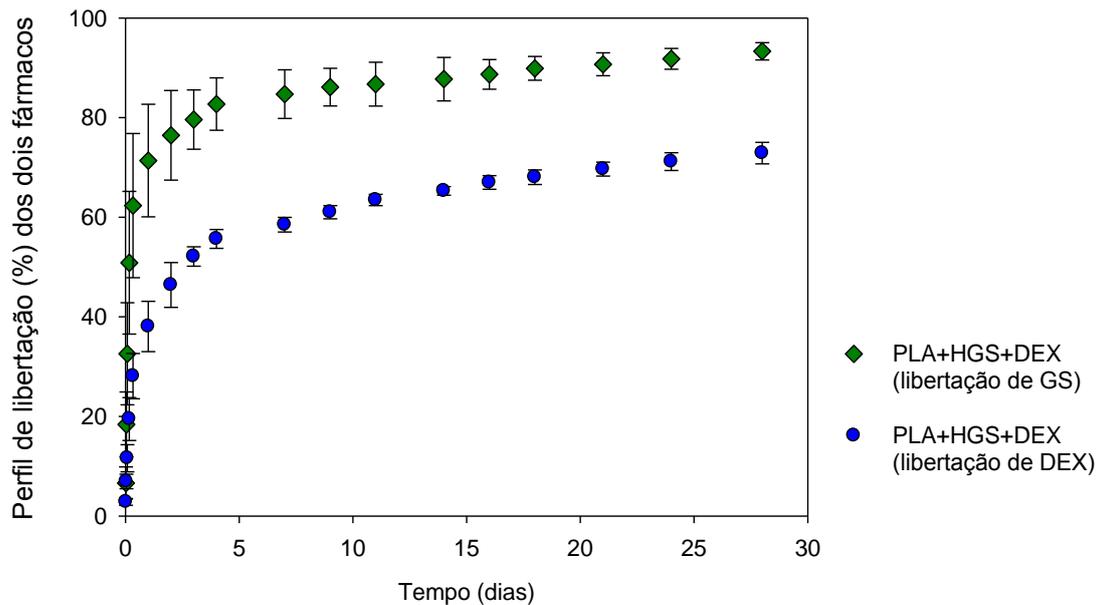


Figura 4.21 - Comparação do perfil de libertação (%) entre libertação dos dois fármacos sulfato de gentamicina e dexametasona para a membrana PLA+HGS+DEX

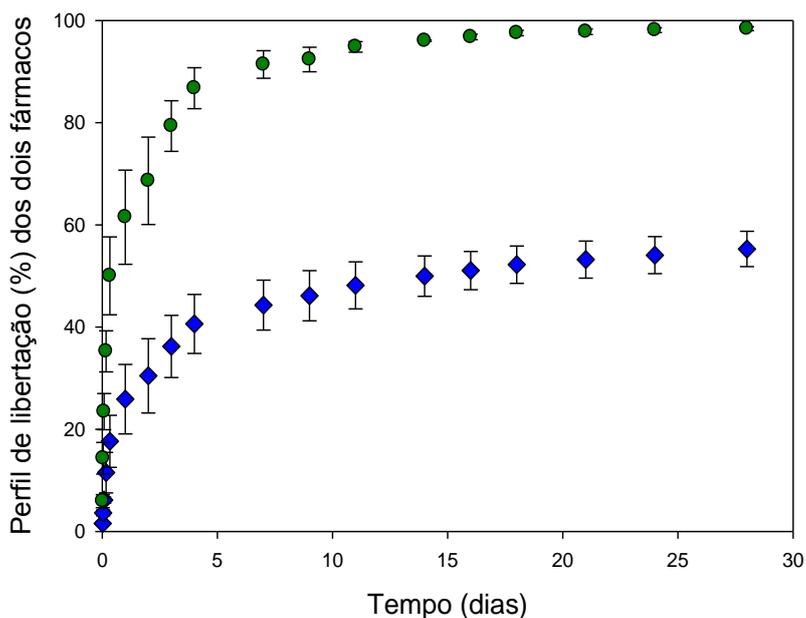


Figura 4.22- Comparação do perfil de libertação (%) entre libertação dos dois fármacos sulfato de gentamicina e dexametasona para a membrana PLA+HGS+DEX+GS

4.2.4 ANÁLISE AOS TESTES MICROBIOLÓGICOS

Para averiguar a atividade antibacteriana do sulfato de gentamicina imobilizado nas membranas, foram realizados testes de difusão em agar contra a estirpe de bactérias *Staphylococcus aureus*, utilizando amostras circulares com cerca de 7mm de diâmetro.

Nas Figuras 4.22 e 4.23 apresentam-se as fotografias tiradas às placas de Petri com as diferentes amostras, onde se podem ver os halos de inibição formados à volta das amostras que contêm gentamicina. Também é possível visualizar, e como era expectável, as membranas que contêm apenas halosite pura (PLA+H) e a membrana com dexametasona (PLA+ DEX) não exibem qualquer tipo de resposta inibitória, isto acontece já que nas membranas de PLA+H e PLA+ DEX não em presente o antibiótico (GS) e a dexametasona apenas tem como função inibição da resposta adversa por parte do organismo e a estimulação da proliferação de células estaminais mesenquimais, promovendo a diferenciação osteogénica.

Na Tabela 4.5 apresentam-se as dimensões dos halos de inibição (cm) obtidos para cada amostra bem como a massa teórica do sulfato de gentamicina presente em cada um dos discos expostos à bactéria, cálculos da massa teórica encontram se no Anexo III.

Tabela 4.5 - Dados relativos atividade antibacteriana do sulfato de gentamicina imobilizado nas nanofibras contra a estirpe de bactérias *Staphylococcus aureus*

Designação da membrana	Massa do disco (mg)	Massa teórica de GS no disco (mg)	Dimensão do halo com inibição (cm)
PLA + GS	4,59	0,109	3,3
PLA + DEX	4,25	0	0
PLA + HGS	4,28	0,095	3
PLA + H	4,27	0	0
PLA + HGS + GS	4,55	0,203	3,1
PLA + HGS +DEX	4,33	0,094	3
PLA + HGS +DEX +GS	4,52	0,196	3,2

Conclui-se que nas membranas onde está presente o sulfato de gentamicina formou-se claramente uma zona de inibição, o que permite afirmar que houve propagação do fármaco no meio e que a combinação de polímero, GS livre e halosite carregada com GS não alterou o

efeito antibacteriano do sulfato de gentamicina. A difusão do fármaco no meio foi relativamente lenta, já que no final das 48h a dimensão do halo de inibição não exibiu qualquer alteração na dimensão.

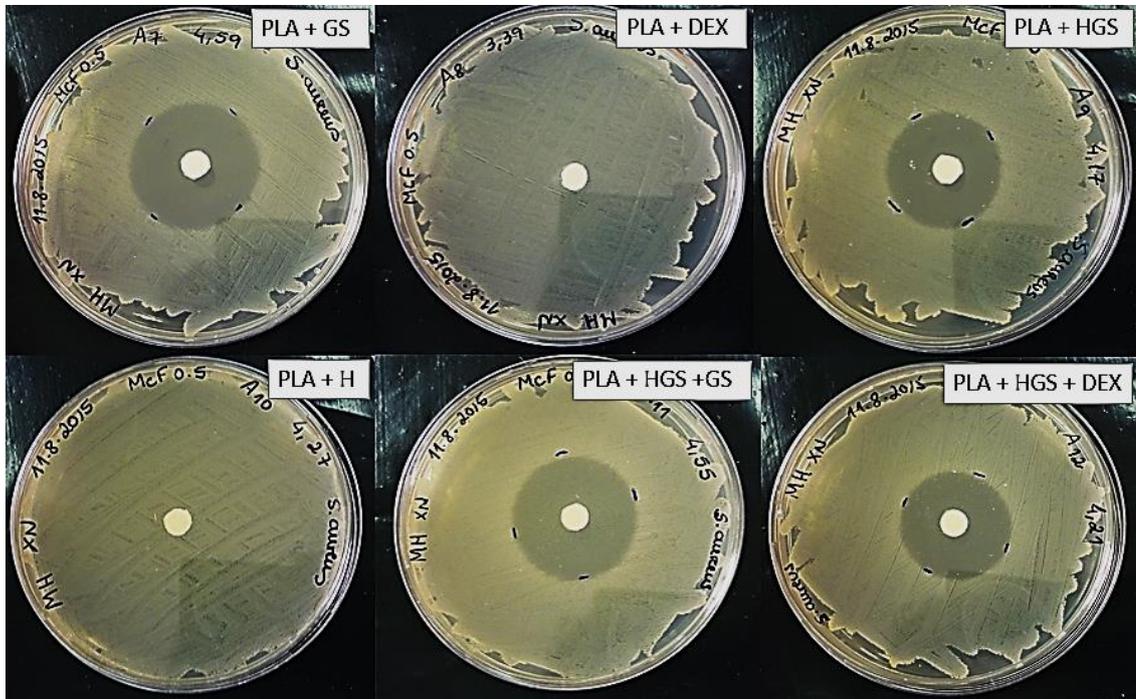


Figura 4.23 - Atividade antibacteriana do GS incorporado nas nanofibras contra a estirpe de bactérias *Staphylococcus aureus*



Figura 4.24 -Atividade antibacteriana do GS incorporado nas nanofibras contra a estirpe de bactérias *Staphylococcus aureus*

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de membranas nanofibrosas de base polimérica, com a inclusão de nanotubos de haloisite carregados com sulfato de gentamicina, através do método de electrospinning, para a libertação controlada e localizada de dois fármacos. Pretende-se com este sistema atingir um perfil de libertação de fármaco até quatro semanas, de modo a ser aplicável a pacientes da área da ortopedia para prevenção de infeções pós-cirúrgicas.

Com a aplicação de nanotubos de haloisite pretendeu-se retardar a libertação de antibiótico. De facto, o GS por ser hidrófilico vai difundir mais rapidamente pela matriz do PLA, logo o seu encapsulamento em nanotubos resultará em uma difusão mais lenta. Estes nanotubos foram sujeitos a tratamento com ácido com o intuito de permitir o aumento do lúmen dos nanotubos e com isso aumentar a sua capacidade de carregamento. Assim, foram caracterizados antes e após tratamento, designadamente através da técnica de adsorção de azoto que permitiu confirmar o aumento da área superficial específica após o tratamento (de 51 m²/g para 68 m²/g). A percentagem de GS carregado nos nanotubos foi avaliada TGA, tendo-se verificado que os nanotubos sem tratamento atingiram uma percentagem de 17,5% e após o tratamento ácido essa percentagem aumentou para 25%. Este aumento indicia que as moléculas de GS ocupam os espaços vazios existentes nos nanotubos, o que é justificado pelo aumento de área superficial específica, concluindo-se que o objetivo de reter e sustentar o GS parece ter sido alcançado.

Foram realizados testes preliminares com formulações de polímero (PLA) com fármaco (GS e dexametasona), com nanotubos de haloisite carregado com GS, e com nanotubos de haloisite carregado com GS e com ácido oleico, de modo a otimizar os procedimentos e condições operatórias. A adição do ácido oleico à formulação teve como objetivo facilitar a dispersão dos nanotubos na matriz polimérica, o que não se verificou.

Os testes finais foram realizados testes com diferentes tipos de incorporação dos fármacos: fármaco (GS e DEX) disperso na matriz polimérica, haloisite carregada com GS, e a combinação dos dois, isto é, haloisite carregada com GS e fármaco livre (GS e/ou DEX). As fibras resultantes das formulações foram submetidas a caracterização por SEM. Foram também analisados o diâmetro médio de fibras para cada uma das formulações, tendo-se concluído que estes se situam numa gama micrométrica.

Seguidamente foram realizados testes *in vitro* durante um período de 28 dias, em meio semelhante ao fluido fisiológico, com o intuito de obter os perfis de libertação dos fármacos existentes em cada uma das membranas. Durante a libertação de fármaco *in vitro* foram obtidos perfis de libertação onde consta as três fases de libertação (*burst release*, libertação lenta e libertação constante).

A análise da libertação dos fármacos foi realizada separadamente para cada um dos fármacos. Tendo-se obtido libertações acima dos 80% para o sulfato de gentamicina no final do período de estudo (quatro semanas), quando este é o único fármaco presente nas fibras. Na fase de *burst release* a libertação do sulfato gentamicina varia entre os 23 e 49%.

Quando os dois fármacos estão presentes nas fibras, verifica-se que a dexametasona estimula a libertação do sulfato de gentamicina, tendo-se constatado um *burst release* de 60% para o GS. Conclui-se que a cinética de libertação do sulfato de gentamicina é justificada pela natureza hidrófila do antibiótico, e que a presença de dexametasona potencia a sua libertação.

Quando analisada a libertação da dexametasona, verificou-se uma libertação mais lenta, facto que se prende com a hidrofobicidade e as fortes interações moleculares da dexametasona com o PLA. Neste caso o *burst release* variou entre os 12 e os 38%, sendo que a maior quantidade de dexametasona libertada está relacionada com a presença de sulfato de gentamicina nas fibras, a qual induz a sua libertação. No final do período de estudo verificou-se ainda uma grande quantidade de dexametasona presente nas fibras (em alguns casos superior a 50%), indicando que a libertação total da dexametasona só será atingida por degradação do polímero.

A adição de haloisite carregada com GS teve um comportamento de libertação próximo das libertações das membranas com ausência dos nanotubos, facto que se pensa estar relacionado com a disposição da haloisite nas fibras, junto à superfície e/ou em aglomerados, ou pelo tipo de adesão do sulfato de gentamicina aos nanotubos, podendo estar contido apenas à superfície dos nanotubos.

No entanto os perfis de libertação obtidos demonstram que foi possível atingir uma libertação conjunta para os fármacos, dexametasona e sulfato de gentamicina, por um período de quatro semanas, sendo visíveis as três fases de libertação de fármaco indicativas de um processo controlado. Um dos fatores que proporciona este perfil de libertação é o diâmetro das fibras, que, por estarem numa gama micrométrica, permitem um maior retardamento da entrega de fármaco. A dexametasona, por apresentar um perfil mais lento de libertação, vai

proporcionar um efeito terapêutico por um período mais longo que o GS, retardando uma resposta adversa do organismo à membrana.

Por fim foi realizado um teste microbiológico às membranas para verificar a atuação do sulfato de gentamicina em tratamento contra a estirpe de bactérias *Staphylococcus aureus*, este teste em que se verificou a propagação do fármaco foi realizado por um período de 48 horas. O GS livre e haloisite carregada com GS não alterou o efeito antibacteriano do fármaco. Concluiu-se portanto que o processo de electrofiação que conjuga PLA, haloisite e GS manteve o efeito terapêutico do antibiótico por um período superior a quatro semanas.

Contudo, de forma a atingir maior eficiência para o SLC, há necessidade de alterar e/ou ajustar alguns parâmetros. De facto, as maiores dificuldades parecem centrar-se na libertação de sulfato de gentamicina: esta libertação ocorre bruscamente e a adição de haloisite carregada com GS manteve o mesmo perfil de libertação rápido. Uma possibilidade de contornar este comportamento passará por substituir os nanotubos por outro tipo de dispositivo para reter o antibiótico, em uma escala nano para atrasar a libertação do fármaco, como: a sílica mesoporosa, nanoesferas poliméricas, nanocápsulas poliméricas. Uma outra possibilidade seria conjugar um outro polímero ao PLA de modo a proporcionar uma barreira à difusão dos fármacos e com isso retardar a sua libertação.

BIBLIOGRAFIA

- Abdullayev, E., Lvov, Y. (2012) *Functional polymer–clay nanotube composites with sustained release of chemical agents*. *Progress in Polymer Science* 38:1690 – 1719.
- Abdullayev, E., Lvov, Y. (2013). *Halloysite clay nanotubes as a ceramic “skeleton” for functional biopolymer composites with sustained drug release*. *J. Mater. Chem. B.* 1:2894–2903.
- Bhardwaj, N.; Kundu, S.C. (2010). *Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique*. *Biotechnology Advances* 28: 325-347.
- Cabanillas, P.F., Pen˜a, E.D., Barrales-Rienda, J.M., Frutos, G. (200). *Validation and in vitro characterization of antibiotic-loaded bone cement release*. *International Journal of Pharmaceutics* 209: 15–26.
- Campoccia, D., Montanaro, L., Speziale, P., Arciola, C.R. (2010). *Antibiotic-loaded biomaterials and the risks for the spread of antibiotic resistance following their prophylactic and therapeutic clinical use*. *Biomaterials* 31:6363-6377.
- Cao, H., Jiang, X., Chai, C., Chew, S.Y. (2010). *RNA interference by nanofiber-based siRNA delivery system*. *Journal of Controlled Release* 144: 203-212.
- Cevher, E., Orhan, Z., Mülazımođlu, L., Şensoy, D., Alper, M., Yıldız, A., Özsoy, Y. (2006). *Characterization of biodegradable chitosan microspheres containing vancomycin and treatment of experimental osteomyelitis caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus with prepared microspheres*. *International Journal of Pharmaceutics*. 317: 127-135.
- Chen, Y., Zhou, S., Li, Q. (2011). *Mathematical modeling of degradation for bulk-erosive polymers: applications in tissue engineering scaffolds and drug delivery systems*. *Acta Biomaterialia*. 7(3), 1140-1149.
- Cheng, H., Liu, Q., Yang, J., Zhang, J., Frost, R.L. (2010). *Thermal analysis and infrared emission spectroscopic study of halloysite–potassium acetate intercalation compound*. *Thermochimica Acta*. 511:124–128.
- Delfosse, V., Warrak, A. E., Clerfond, P., & Lussier, B. (2011). *Clinical investigation of local implantation of gentamicin-impregnated collagen sponges in dogs*. *The Canadian Veterinary Journal*, 52(6), 627–630.
- Fang, X., Reneker, D.H. (1997). *DNA fibers by electrospinning*. *Journal of Macromolecular Science, Part B: Physics*. 36(2): 169-173
- Freiberg, S., & Zhu, X.X. (2004). *Polymer microspheres for controlled drug release*. *International Journal of Pharmaceutics*. 282(1–2): 1-18.

- Friedrich, R B., Ravanello, A., Cichota, L.C., Rolim, C. M.B., Beck R.C.R. (2009). *Validation of a simple and rapid UV spectrophotometric method for dexamethasone assay in tablets*. Química Nova. 32(4) 1052-1054.
- Folkman J, Long DM. (1964). *The use of silicone rubber as a carrier for prolonged drug therapy*. Journal of Surgical Research 4: 139-142.
- Gao, P., Nie, X., Zou, M., Shi, Y., Cheng, G. (2011). *Recent advances in materials for extended-release antibiotic delivery system*. J Antibiot. 64: 625-634.
- Gao, Y., Truong, B.Y., Zhu, Y., Kyrtzis, L. I. (2014). *Electrospun antibacterial nanofibers: Production, activity, and in vivo applications*. Journal of Applied Polymer Science. 131(18): n/a-n/a.
- Gilchrist, S.E., Lange, D., Letchford, K., Bach, H., Fazli, L., Burt, H.M. (2013). *Fusidic acid and rifampicin co-loaded PLGA nanofibers for the prevention of orthopedic implant associated infections*. Journal of Controlled Release. 170(1): 64-73.
- Goh, Y-F., Shakir, I., Hussain, R. (2013). *Electrospun fibers for tissue engineering, drug delivery, and wound dressing*. Journal of Materials Science. 48(8): 3027-3054.
- Hou, T., Xu, J., Li, Q, Feng, J., Zen, L.,(2008) , *In vitro evaluation of a fibrin gel antibiotic delivery system containing mesenchymal stem cells and vancomycin alginate beads for treating bone infections and facilitating bone formation*. Tissue Eng Part A. 14(7):1173-82.
- Hu, X., Liu, S., Zhou, G.; Huang, Y., Xie, Z., Jing, X. (2014). *Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications*. Journal of Controlled Release, 185(1).
- Jahno V.D. (2005). *Síntese e Caracterização do Poli (L-Ácido Láctico) para uso como Biomaterial*. Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Jain K.K. (2008). Drug delivery systems. Methods in Molecular Biology. Human Press. 437(1):1-51.
- Jalil, R., Nixon, J.R. (1990). *Biodegradable poly(lactic acid) and poly(lactide-co-glycolide) microcapsules: problems associated with preparative techniques and release properties*. J Microencapsul. 7(3):297-325.
- Ji, W., Yang, F., van den Beucken, J.J.J.P., Bian, Z., Fan, M., Chen, Z., Jansen, J.A. (2010). *Fibrous scaffolds loaded with protein prepared by blend or coaxial electrospinning*. Acta Biomater. 6(11):4199-207.
- Juarez, D., Ferrandiz, S., Peydro, M.A., Sanchez-Caballero, S. (2013). *Thermal analysis (differential scanning calorimetry and thermogravimetric analysis) of SEBS blends for injection molding*. Fascicle of Management and Technological Engineering. Oradea University.
- Junior A. R. S., Wada M. L. F. (2007). *Polímeros Biorreabsorvíveis como Substrato para Cultura de Células e Engenharia Tecidual*. Polímeros. Ciência e Tecnologia, 17(4): 308-317.

- Kamble, R., Ghag, M., Gaikawad, S., Panda, B. K. (2012). *Halloysite Nanotubes and Applications: A Review*. J Adv Scient Res. 3(2): 25-29.
- Kanellakopoulou, K., Thivaios, G.C., Kolia, M., Dontas, I., Nakopoulou, L., Dounis, E., Giamarellou, H., Andreopoulos, A., Karagiannakos, P., Giamarellou, H. (2008). *Local Treatment of Experimental Pseudomonas aeruginosa Osteomyelitis with a Biodegradable Dilactide Polymer Releasing Ciprofloxacin*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 52(7): 2335-2339.
- Kenawy, E-R.; Bowlin, G.L.; Mansfield, K.; Layman, J.; Simpson, D.G.; Sanders, E.H.; Wnek, G.E.; (2002). *Release of tetracycline hydrochloride from electrospun poly (ethylene-co-vinylacetate), poly (lactic acid), and a blend*. Journal of Controlled Release, 81: 57-64.
- Kayaci, F., Umu, O. C. O, Tekinay, T., Uyar, T. (2013) *Antibacterial Electrospun Poly(lactic acid) (PLA) Nanofibrous Webs Incorporating Triclosan/Cyclodextrin Inclusion Complexes*. J. Agric. Food Chem. 61: 3901–3908.
- Krasko, M.Y., Golenser, J., Nyska, A., Nyska, M, Brin, Y.S., Domb, A.J. (2007). *Gentamicin extended release from an injectable polymeric implant*. Journal of Controlled Release. 117(1): 90-96.
- Levis, S.R., Deasy, P.B. (2002). *Characterisation of halloysite for use as a microtubular drug delivery system*. International Journal of Pharmaceutics. 243:125–134.
- Li, C-C., Anseth, K.S. (2013). *Degradation of materials in the biological environment*. Biomaterial Science – An introduction to materials in medicine. 716-728.
- Li, J., Fu, R., Li, L., Yang, G., Ding, S., Zhong, Z., Zhou, S. (2013). *Co-delivery of Dexamethasone and Green Tea Polyphenols Using Electrospun Ultrafine Fibers for Effective Treatment of Keloid*. Pharm Res. 31:1632–1643.
- Li, L., Zhou, G., Wang, Y., Yang, G., Ding, S., Zhou, S. (2015). *Controlled dual delivery of BMP-2 and dexamethasone by nanoparticle-embedded electrospun nanofibers for the efficient repair of critical-sized rat calvarial defect*. Biomaterials. 37: 218-229.
- Maretschek, S., Greiner, A., Kissel, T. (2008). *Electrospun biodegradable nanofiber nonwovens for controlled release of proteins*. Journal of Controlled Release. 127(2):180-7.
- Marks, K.E., Nelson, C.L., Lautenschlager, E.P. (1976). *Antibiotic impregnated acrylic bone cement*. J J Bone Joint Surg Am. 58 (3): 358 -364.
- Martins, A.; Duarte, A.R.C.; Faria, S.; Marques, A.P.; Reis, R.L. (2010). *Osteogenic induction of hBMSCs by electrospun scaffolds with dexamethasone release functionality*. Biomaterials 5875-5885.
- McLaren A.C. (2004). *Alternative Materials to Acrylic Bone Cement for Delivery of Depot Antibiotics in Orthopaedic Infections*. Clinical Orthopaedics and Related Research. 427:101–106.
- Meani, E.; Romanò, C.; Crosby, L.; Hofmann; G.; Calonego, G. (2007). *Local Antibiotic Therapy: Present and Future. Infection and Local Treatment in Orthopedic Surgery*. Springer Berlin Heidelberg. 385-395.

- Meinel, A.J.; Gernershaus, O.; Luhmann, T.; Merkle, H.P.; Meinel L. (2012). *Electrospun matrices for localized drug delivery: Current technologies and selected biomedical applications*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 81(1): 1-13.
- Meng, Z.X., Xu, X.X., Zheng, W., Zhou, H.M., Li, L., Zheng, Y.F., Lou, X. (2011). *Preparation and characterization of electrospun PLGA/gelatin nanofibers as a potential drug delivery system*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 84(1): 97-102.
- Mickova, A., Buzgo, M., Benada, O., Rampichova, M., Fisar, Z., Filova, E., Tesarova, M., Lukas, D., Amler, E. (2012). *Core/shell nanofibers with embedded liposomes as a drug delivery system*. 13(4):952-62.
- Montali, A., (2006). *Antibacterial coating systems*. Injury. 2:S81-6.
- Nandi, S.K., Mukherjee, P., Roy S., Kundu, B., Kumar, D., Basu, D. (2009) *Local antibiotic delivery systems for the treatment of osteomyelitis – A review*. Materials Science and Engineering C 29:2478–2485.
- National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov/, consultado em 19/8/2015.
- Natu, M.; Sousa, H., Gil, H. (2011). *Electrospun Drug-Eluting Fibers for Biomedical Applications. Active Implants and Scaffolds for Tissue Regeneration*. M. Zilberman, Springer Berlin Heidelberg. **8**: 57-85.
- Neut, D., Kluin, O.S., Crielaard, B.J., van der Mei, H.C., Busscher H.J., Grijpma D.W. (2009). *A biodegradable antibiotic delivery system based on poly-(trimethylene carbonate) for the treatment of osteomyelitis*. Acta Orthopaedica. 80 (5): 514–519.
- Nicolini, K.P., Fukamachi, C. R. B., Wypych F., Mangrich A.S. (2009). *Dehydrated halloysite intercalated mechanochemically with urea: Thermal behavior and structural aspects*. Journal of Colloid and Interface Science. 338:474–479.
- Oliveira L.F. (2008) *Síntese de Poli (Ácido Láctico-co-Ácido glicólico) através de Policondensação Catalisada por Resina de troca Iônica contendo Óxido de Estanho como Co-Catalizador*. Universidade Federal de Goiás. Goiânia.
- Okuda, T., Tominaga, K., Kidoaki, S. (2010). *Time-programmed dual release formulation by multilayered drug-loaded nanofiber meshes*. Journal of Controlled Release. 143(2): 258-264.
- Otsuka, M., Sawada, M., Matsuda, Y., Nakamura, T., Kokubo, T., (1997). *Antibiotic delivery system using bioactive bone cement consisting of Bis-GMA/TEGDMA resin and bioactive glass ceramics*. 18(23):1559-64.
- Park, C.G., Kim, E., Park, M., Park, J-H., Choy, Y.B. (2011). *A nanofibrous sheet-based system for linear delivery of nifedipine*. Journal of Controlled Release. 149(3): 250-257.
- Pillay, V., Dott, C., Choonara, Y.E., Tyagi, C., Tomar, L., Kumar, P., Toit, L., Ndesendo, V.M.K (2013) *A Review of the Effect of Processing Variables on the Fabrication of Electrospun Nanofibers for Drug Delivery Applications*. Journal of Nanomaterials. 22pages.

- Quan, J., Yu, Y., Branford-White C., Williams, G.R., Yu, D-G., Nie, W., Zhu, L-M. (2011). *Preparation of ultrafine fast-dissolving feruloyl-oleyl-glycerol-loaded polyvinylpyrrolidone fiber mats via electrospinning*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 88: 304-309.
- Qi, R., Guo, R., Shen, M., Cao, X., Zhang, L., Xu, J., Yu, J., Shi X. (2010). *Electrospun poly(lactic-co-glycolic acid)/halloysite nanotube composite nanofibers for drug encapsulation and sustained release*. J. Mater. Chem. 20:10622-10629.
- Qi, R., Guo, R., Zhenga, F., Liua, H., Yu, J., Shi, X. (2012). *Controlled release and antibacterial activity of antibiotic-loaded electrospun halloysite/poly(lactic-co-glycolic acid) composite nanofibers*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 110:148– 155.
- Ranganath, S. H., Wang, C.H. (2008). *Biodegradable microfiber implants delivering paclitaxel for post-surgical chemotherapy against malignant glioma*. Biomaterials **29**(20): 2996-3003.
- Rissing, J.P.,(1997) *Antimicrobial therapy for chronic osteomyelitis in adults: role of the quinolones*. Clinical Infections Diseases. 25 (6): 1327-1333.
- Rodrigues, N. O. L. (2012). *Estudo da liberação controlada de fármacos por hidrogéis de PVA/ATAPULGITA*. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro.
- Ruckh, T. T., Carroll, D. A., Weaver, J. R., Popat, K. C. (2012). *Mineralization Content Alters Osteogenic Responses of Bone Marrow Stromal Cells on Hydroxyapatite/Polycaprolactone Composite Nanofiber Scaffolds*. Journal of Functional Biomaterials. 3(4), 776–798.
- Saraf, A., Baggett, L.S., Raphael, R.M., Kasper, F.K., Mikos, A.G. (2010). *Regulated non-viral gene delivery from coaxial electrospun fiber mesh scaffolds*. Journal of Controlled Release. 143(1): 95-103.
- Segreti, J.; Nelson, J. A.; Gordon, M. T. (1998) - “*Prolonged Suppressive Antibiotic Therapy for Infected Orthopedic Prostheses*” - Clinical Infectious Diseases 27(4): 711-713.
- Siegel, R.A., Rathbone, M.J. (2012). *Overview of Controlled Release Mechanisms*. Controlled Release Society.594:19-42.
- Sigma Aldrich, www.sigmaaldrich.com, consultado em 19/8/2015.
- Smilack, J.D., Flittie, W.H., Temple W.W. JR. (1975). *Bone Concentrations of Antimicrobial Agents After Parenteral Administration*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 9(1) 169-171.
- Son, Y.; Kim, W.; Yoo, H. (2014). *Therapeutic applications of electrospun nanofibers for drug delivery systems*. Archives of Pharmacal Research, 37(1): 69-78.
- Su, Y., Su, Q., Liu, W., Lim, M., Venugopal, J.R., Mo, X., Ramakrishna, S., Al-Deyab S.S., El-Newehy, M. (2012). *Controlled release of bone morphogenetic protein 2 and dexamethasone loaded in core-shell PLLACL-collagen fibers for use in bone tissue engineering*. Acta Biomaterialia. 8(2): 763-771.

- Tan, X., Jiang, Y., Huang, Y., Hu, S-H. (2009). *Persistence of gentamicin residues in milk after the intramammary treatment of lactating cows for mastitis*. Journal of Zhejiang University. Science. B 10 (4): 280-284.
- Thakur, R.A., Florek, C.A., Kohn, J., Michniak, B.B. (2008). *Electrospun nanofibrous polymeric scaffold with targeted drug release profiles for potential application as wound dressing*. International Journal of Pharmaceutics 364(1): 87-93.
- Torres-Giner, S., Martinez-Abad, A., Gimeno-Alcañiz, J.V., Ocio, M. J., Lagaron, J.M. (2011). *Controlled Delivery of Gentamicin Antibiotic from Bioactive Electrospun Polylactide-Based Ultrathin Fibers*. Advanced Engineering Materials. 14(4):B112 - B122.
- Tsourvakas, S. (2012). *Local Antibiotic Therapy in the Treatment of Bone and Soft Tissue Infections*. Orthopedic Department, General Hospital of Trikala Greece.
- Ulery, B.D.; Nair, L.S.; Laurencin, C.T. (2011). *Biomedical Applications of Biodegradable Polymers*. Journal of polymer science. Part B, Polymer physics 49 (12): 832-864.
- Vacanti, N. M., Hao, C., Hill, P. S., Guerreiro, J. D. T., Dang, T. T., Ma, M., Watson, S., Hwang N. S., Langer R., Anderson D. G. (2012). *Localized Delivery of Dexamethasone from Electrospun Fibers Reduces the Foreign Body Response*. Biomacromolecules 13(10): 3031–3038.
- Virto, M.R., Elorza, B., Torrado, S., Elorza, M. L., Frutos, G., (2007). *Improvement of gentamicin poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres for treatment of osteomyelitis induced by orthopedic procedures*. Biomaterials. 28(5):877-85.
- Wang Y, Wang X, Wei K, Zhao N, Zhang S, Chen J. 2007. Fabrication, characterization and long-term in vitro release of hydrophilic drug using PHBV/HA composite microspheres. Materials Letters 61: 1071-1076.
- Wei, W., Abdullayev, E., Hollister, A., Mills, D., Lvov, Y. M. (2012). *Clay Nanotube/Poly(methyl methacrylate) Bone Cement Composites with Sustained Antibiotic Release*. Macromol. Mater. Eng., 297: 645–653.
- Weinstein, M.J., Luedemann, G.M., Oden, E.M., Wagman, G.H., Rossetlet, J.P., Marquez, J.A., Coniglio, C.T., Charney, W., Herzong, H.L., Black, J. (1963). *Gentamicin, a new antibiotic complex from Micromonospora*. Journal of Medicinal Chemistry. 6:463-464.
- Weldon, C.B, Tsui, J.H., Shankarappa, S.A., Nguyen, V.T., Ma, M., Anderson, D.G., Kohane, D.S. (2012). *Electrospun drug-eluting sutures for local anesthesia*. Journal of Controlled Release. 161(3): 903-909.
- Xu, X., Chen, X., Wang, Z., Jing, X. (2009). *Ultrafine PEG–PLA fibers loaded with both paclitaxel and doxorubicin hydrochloride and their in vitro cytotoxicity*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 72(1): 18-25.
- Xu, J., Jiao, Y., Shao, X., Zhou, C., (2011). *Controlled dual release of hydrophobic and hydrophilic drugs from electrospun poly(l-lactic acid) fiber mats loaded with chitosan microspheres*. Materials Letters. 2800–2803.

- Xue, J., Niu, Y., Gong, M., Shi, R., Che, D., Zhang, L., Lvov, Y. (2014). *Electrospun Microfiber Membranes Embedded with Drug-Loaded Clay Nanotubes for Sustained Antimicrobial Protection*. ACS Nano. 9 (2):1600–1612.
- Yalkowsky, S.H., He, Yan., *Handbook of Aqueous Solubility Data: An Extensive Compilation of Aqueous Solubility Data for Organic Compounds Extracted from the AQUASOL dATABASE*. CRC Press LLC, Boca Raton, FL. 2003., p. 1197
- Yan, S., Xiaoqiang, L., Shuiping, L., Xiumei, M., Ramakrishna, S. (2009). *Controlled release of dual drugs from emulsion electrospun nanofibrous mats*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 73 (2): 376-381.
- Yang, Y., Li, X., Qi, M., Zhou, S., Weng, J. (2007). *Release pattern and structural integrity of lysozyme encapsulated in core–sheath structured poly(DL-lactide) ultrafine fibers prepared by emulsion electrospinning*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 69: 106–116.
- Yang, Y., Li, X., Cui, W., Zhou, S., Tan, R., Wang, C. (2008). *Structural stability and release profiles of proteins from core-shell poly (DL-lactide) ultrafine fibers prepared by emulsion electrospinning*. J. Biomed. Mater. Res.86A: 374–385.
- Yeo, Y., & Park K. (2004). *Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems*. Archives of Pharmacal Research. 27(1): 1-12.
- Yohe, S. T., Colson, Y. L., Grinstaff, M. W. (2012). *Superhydrophobic Materials for Tunable Drug Release: Using Displacement of Air To Control Delivery Rates*. J. Am. Chem. Soc.134 (4):2016–2019.
- Zahedi, P., Karami, Z., Rezaeian, I., Jafari, S., Mahdaviani, P., Abdolghaffari, A.H., Abdollahi, M. (2011). *Preparation and Performance Evaluation of Tetracycline Hydrochloride Loaded Wound Dressing Mats Based on Electrospun Nanofibrous Poly(lactic acid)/Poly(ϵ -caprolactone) Blends*. Journal of Applied Polymer Science. 124(5), 4174-4183.
- Zelken, J., Wanich. T., Gardner, M., Griffith, M., Bostrom, M., (2007). *PMMA is superior to hydroxyapatite for colony reduction in induced osteomyelitis*. Clin Orthop Relat Res. 462:190-4.
- Zeng, J., Yang, L., Liang, Q., Zhang, X., Guan, H., Xu, X., Chen, X., Jing, X. (2005). *Influence of the drug compatibility with polymer solution on the release kinetics of electrospun fiber formulation*. Journal of Controlled Release. 105(1-2): 43-51.
- Zhang, A-B., Pan, L., Zhang, H-Y., Liu, S-T., Ye, Y., Xia, M-S., Chen, X-G. (2012). *Effects of acid treatment on the physico-chemical and pore characteristics of halloysite*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 396: 182-188.
- Zhang, C-L., Yu, S-H. (2014). *Nanoparticles meet electrospinning: recent advances and future prospects*. Chemical Society Reviews 43(13): 4423-4448.

ANEXOS

ANEXO I - AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE CARREGAMENTO DOS NANOTUBOS

Avaliação da eficácia de carregamento dos nanotubos com sulfato de gentamicina pela técnica de TGA

Balanço de massa ao sulfato de gentamicina incorporado nos nanotubos de haloisite sem tratamento (Figura 4.4)

Curva do sulfato de gentamicina (GS): 72% da massa é vaporizada e 28% são cinzas que restaram;

Curva da haloisite pura (H): 15% da massa é vaporizada e 85% são cinzas;

Curva da haloisite sem tratamento carregada com sulfato gentamicina (HGS): 25% da massa é vaporizada e 75% são cinzas.

$$\text{Balanço de massa} \begin{cases} 0,15H + 0,72 GS = 0,25 \\ 0,85 H + 0,28 GS = 0,75 \end{cases} \rightarrow \begin{cases} GS = 0,175 \\ H = 0,825 \end{cases}$$

Logo, 17,5% de sulfato de gentamicina incorporado na haloisite.

Balanço de massa ao sulfato de gentamicina incorporado nos nanotubos de haloisite trata com ácido sulfúrico (Figura 4.5)

Curva do sulfato de gentamicina (GS): 72% da massa é vaporizada e 28% são cinzas que restaram;

Curva da haloisite com tratamento (H): 14% da massa é vaporizada e 86% são cinzas;

Curva da haloisite tratada e carregada com sulfato gentamicina (HGS): 28% da massa é vaporizada e 72% são cinzas.

$$\text{Balanço de massa} \begin{cases} 0,14H + 0,72 GS = 0,25 \\ 0,86 H + 0,28 GS = 0,75 \end{cases} \rightarrow \begin{cases} GS = 0,25 \\ H = 0,75 \end{cases}$$

Logo, 25% de sulfato de gentamicina incorporado na haloisite

ANEXO II - CURVAS DE CALIBRAÇÃO, PARA A DEXAMETASONA E SULFATO DE GENTAMICINA

Curvas de calibração, para a dexametasona e sulfato de gentamicina, realizadas a partir das absorvâncias por espectrofotometria para os testes de libertação de fármaco *in vitro*.

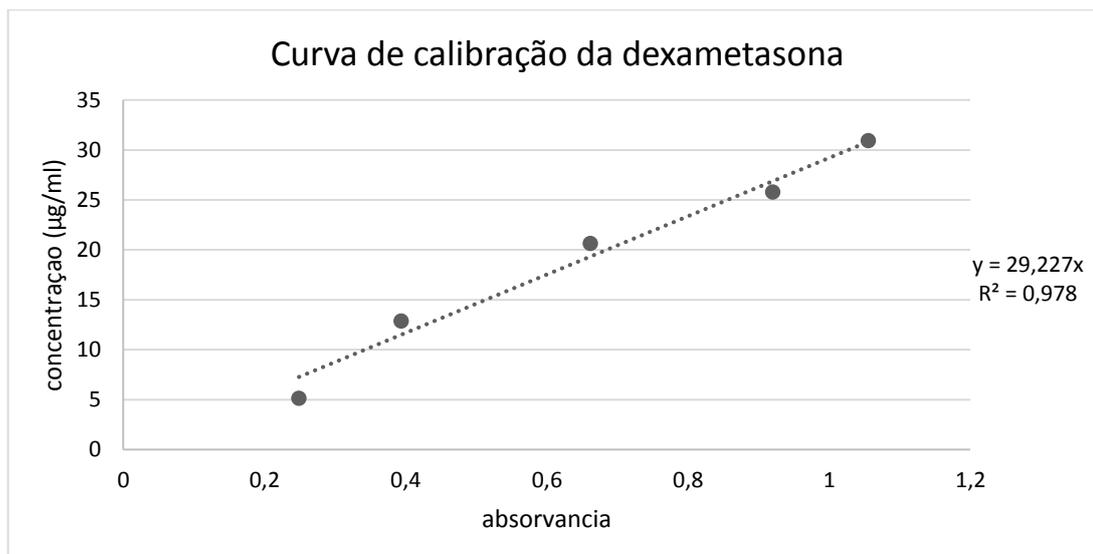


Figura A II.1 - Curva de calibração para a dexametasona

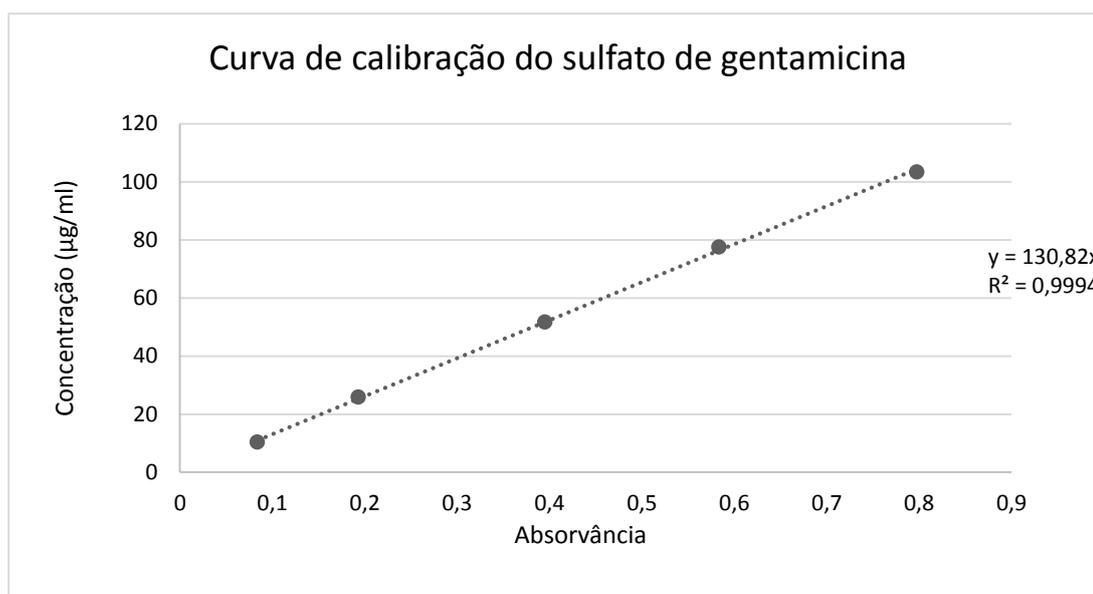


Figura A II.2 - Curva de calibração para a Sulfato de gentamicina

Haloisite não tratada

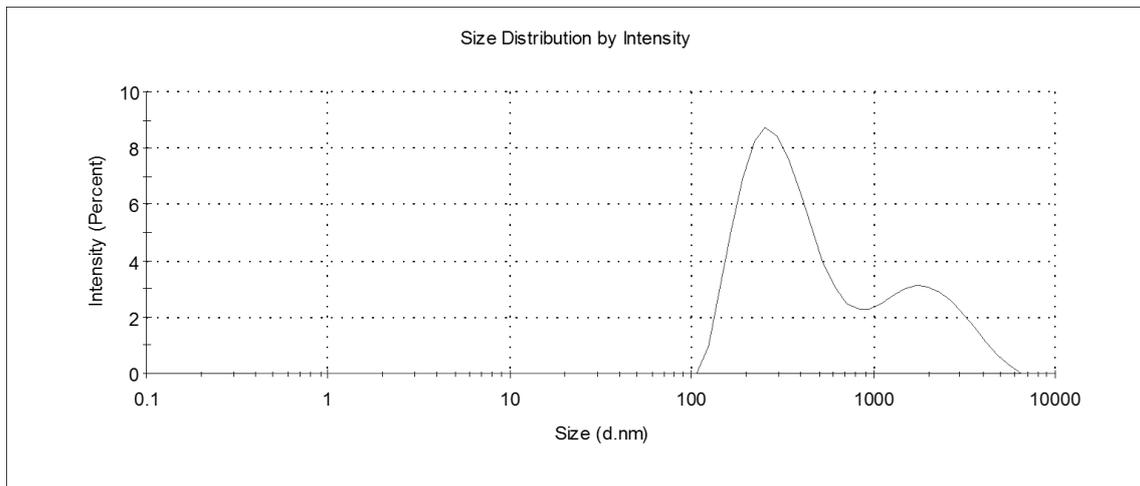


Figura AIII.1 - Distribuição de tamanhos dos nanotubos de haloisite sem tratamento ácido

Haloisite tratada

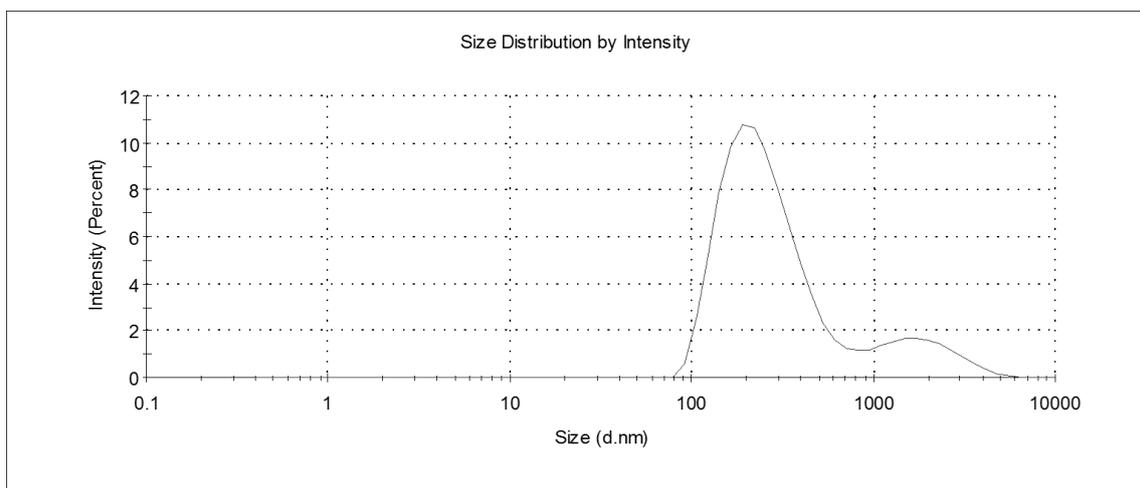


Figura AIII.2 - Distribuição de tamanhos dos nanotubos de haloisite com tratamento ácido