



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Heloisa Diehl Doring

**Desenvolvimento de Fibras de Estrutura Tripla Contendo Rosa de Bengala e
Nanopartículas de Prata Almejando a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana**

Florianópolis
2024

Heloisa Diehl Doring

Desenvolvimento de Fibras de Estrutura Tripla Contendo Rosa de Bengala e Nanopartículas de Prata Almejando a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Química do Centro de Ciências Físicas e Matemáticas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharelado em Química.

Orientador(a): Prof^a Dr^a Camila Fabiano de Freitas Marin

Coorientador(a): Yara Schuvinski Ricken

Florianópolis

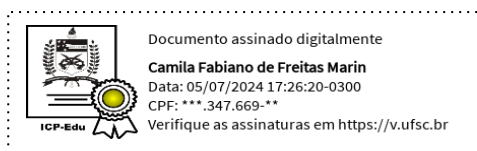
2024

Heloisa Diehl Doring

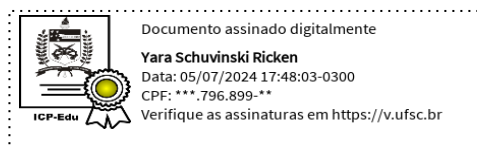
Desenvolvimento de Fibras de Estrutura Tripla Contendo Rosa de Bengala e Nanopartículas de Prata Almejando a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Químico e aprovado em sua forma final pelo Curso de Química

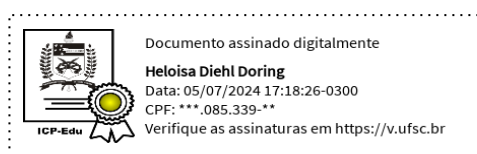
Florianópolis, 01 de junho de 2024.



Profª Drª Camila Fabiano de Freitas Marin
Orientador(a)



Yara Schuvinski Ricken
Coorientador(a)



Heloisa Diehl Doring

Florianópolis, 2024.

Dedico este trabalho a minha heroína, minha mommy! Serei eternamente grata por tudo que fez e ainda faz por mim!

AGRADECIMENTOS

Durante esses quatro anos de graduação, fui privilegiada ao estar cercada por pessoas incríveis. Sei que não conseguirei expressar minha gratidão a todos da maneira que desejo, mas gostaria de registrar meu imenso agradecimento a cada pessoa. Espero conseguir transmitir um pouco dessa gratidão aqui.

Primeiramente agradeço a minha orientadora, a Prof^a Dr^a Camila, por ter me “resgatado” da monitoria e me apresentado essa linha de pesquisa, onde tive a oportunidade de me descobrir como pesquisadora. Sou grata por toda paciência ao me ensinar, por seu cuidado, orientação e por estar sempre presente para me acalmar nos momentos que precisei.

A minha co-orientadora, a doutoranda Yara, por ser a irmã mais velha que nunca tive. Obrigada por todos os congressos, cafés, fofocas e risadas. Por sempre ter paciência comigo, me ensinar tudo e se preocupar com a minha pesquisa.

A minha mãe, Vera, que sempre me apoiou, torceu e vibrou em todas as minhas vitórias, mas que, nas derrotas, sempre esteve ali para me acolher. Sem seu apoio nada disso seria possível.

Ao meu pai, Emerson, por sempre estar on para me apoiar e torcer pelo meu sucesso, por sempre me ajudar quando precisei e entender minha ausência nesse tempo. A minha boadrasta, Jussara, por todo apoio e cuidado comigo, meus irmãos e meu pai, e claro, por todos os áudios engraçados.

A minha irmã, Sofia, por toda a cumplicidade, festas, viagens e por estar comigo independente do momento. Obrigada por ser incondicionalmente a minha melhor amiga!

Ao meu irmão Miguel por ser o menino mais cuidadoso e amoroso de todos e a minha irmã Julia por todas as maquiagens e carmeds. Obrigada por serem a leveza muitas vezes necessária nos meus dias.

Ao pessoal do POLIMAT. A Eloah, por sempre estar disposta a me ajudar e lutar pelos meus dois artigos. Aos meninos do GSCorr, Binder e Flávio, por consertarem todos os LEDs queimados e os pen drives com vírus. A todo pessoal do lab, Mari, Gabriel, Cinthia, David, Layla, Ângela, Alemão, Nathalia e João por todos os bares e cafés e por tornarem meus dias mais divertidos. Ao Prof^o Dr^o Alexandre Parize, obrigada por estar sempre disposto a ajudar.

Aos meus colegas da graduação, a Lavínia por todos os laboratórios, ao Vinicius por todos os cafés e conversas, a Nath por todas as histórias. Obrigada a todos que tornaram o curso mais leve.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC, a Central de Análises do Departamento de Química, a Central de Análises do EQA e ao LACFI. Ao LINDEN pelos ensaios de estabilidade no LumiSizer. A doutoranda Thais L. Braga da UEM pelas imagens de MEV.

Aos professores e funcionários do Departamento de Química da UFSC. Ao CNPq, CAPES e Fapesc pelo apoio financeiro e viabilização deste trabalho.

Por fim, agradeço a banca Prof^a Dr^a Adriana Passarella Gerola e Dr^a Juliana Priscila Dreyer por aceitarem contribuir neste trabalho.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de matrizes eletrofiadas para aplicação em Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDA) no tratamento de feridas infectadas. Nesse sentido, foram selecionados como possíveis fármacos um corante xanteno, a Rosa de Bengala (RB), combinado com nanopartículas de prata (AgNPs). Essa combinação estratégica da RB com AgNPs, além de incluir os efeitos antimicrobianos intrínsecos de cada espécie, também acarreta o efeito “*Metal Enhanced Singlet Oxygen Generation*” (ME^1O_2), possivelmente levando a efeitos antimicrobianos de sinergia. A RB e as AgNPs foram em um primeiro momento avaliados em nanoformulações do Pluronic®F-127 na obtenção de F-127/AgNPs/RB. Vale destacar que as AgNPs foram geradas por fotoindução utilizando LED-UV, em que o copolímero F-127, em diferentes concentrações, atuou como agente redutor e estabilizante. A RB foi então incorporada ao sistema por adição passiva. As micelas obtidas apresentaram diâmetros inferiores a 120 nm, baixa polidispersão ($<0,30$) e potencial zeta próximo a zero. A formação das AgNPs foi confirmada por espectroscopia de absorção eletrônica, mostrando uma banda de absorção plasmônica com λ_{max} em 418 nm, combinada à banda de absorção eletrônica da RB com λ_{max} em 553 nm. A detecção indireta de oxigênio singleto confirmou a geração da espécie e também a ocorrência do efeito ME^1O_2 . O equilíbrio protolítico da RB foi investigado, determinando-se que, em pH fisiológico, a forma predominante é a diânionica, que apresenta maior absortividade molar e os melhores parâmetros fotofísicos. Para a produção das nanofibras eletrofiadas, com base nos estudos prévios das nanoformulações, escolheu-se duas concentrações de F-127 (0,5 e 2,0% m/V). Matrizes em três camadas foram depositadas sequencialmente, formando uma fibra de estrutura tripla (FET). A primeira e a última camada, reticuladas, foram produzidas dissolvendo-se PVA em F-127 e incorporando-se o reticulante, ácido cítrico, e obtendo-se as AgNPs por fotoindução. A camada intermediária continha a RB. As nanofibras resultantes apresentaram elevada homogeneidade, ausência de *beads*, morfologia e propriedades mecânicas adequadas. Estudos de liberação *in vitro* em fluido simulado confirmaram a eficácia na liberação da RB.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica, Rosa de Bengala, Nanopartículas de Prata.

ABSTRACT

The present study aimed to develop electrospun matrices for application in Antimicrobial Photodynamic Therapy (TFDA) in the treatment of infected wounds. In this sense, a xanthene dye, Rose Bengal (RB), combined with silver nanoparticles (AgNPs) was selected as possible drugs. This strategic combination of RB with AgNPs, in addition to including the intrinsic antimicrobial effects of each species, also leads to the “Metal Enhanced Singlet Oxygen Generation” (ME^1O_2) effect, possibly leading to synergistic antimicrobial effects. RB and AgNPs were initially evaluated in Pluronic®F-127 nanoformulations to obtain F-127/AgNPs/RB. It is worth noting that the AgNPs were generated by photoinduction using LED-UV, in which the F-127 copolymer, in different concentrations, acted as a reducing and stabilizing agent. RB was then incorporated into the system by passive addition. The micelles obtained had diameters below 120 nm, low polydispersity (<0.30) and zeta potential close to zero. The formation of AgNPs was confirmed by electronic absorption spectroscopy, showing a plasmonic absorption band with λ_{max} at 418 nm, combined with the RB electronic absorption band with λ_{max} at 553 nm. The indirect detection of singlet oxygen confirmed the generation of the species and the occurrence of the ME^1O_2 effect. The protolytic balance of RB was investigated, determining that, at physiological pH, the predominant form is the dianionic form, which presents the highest molar absorptivity and the best photophysical parameters. To produce electrospun nanofibers, based on previous studies of nanoformulations, two concentrations of F-127 were chosen (0.5 and 2.0% m/V). Three-layer arrays were deposited sequentially, forming a triple structure fiber (FET). The first and last layers, cross-linked, were produced by dissolving PVA in F-127 and incorporating the cross-linker, citric acid, and obtaining AgNPs by photoinduction. The middle layer contained the RB. The resulting nanofibers showed high homogeneity, absence of beads, morphology, and adequate mechanical properties. In vitro release studies in simulated fluid confirmed the effectiveness in releasing RB.

Keywords: Photodynamic Therapy, Rose Bengal, Silver Nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da pele.	19
Figura 2. Esquema geral de um sistema de eletrofiação.....	23
Figura 3. Evolução do cone de Taylor com o aumento da voltagem aplicada.....	23
Figura 4. Estrutura do (A) Plurônic® F-127 e (B) PVA.	27
Figura 5. Diagrama de Jablonski. Onde CI: Conversão Interna; CIS: Cruzamento Intersistemas; RV: Relaxamento Vibracional; S ₀ : Estado Singlete Fundamental; S ₁ : Estado Singlete Excitado; T ₁ : Estado Tripleto Excitado.	29
Figura 6. Representação esquemática geral para alguns xantenos. Em destaque, estrutura do anel xantênico em pH fisiológico.	31
Figura 7. Espécies protolíticas e equilíbrios tautoméricos propostos para Rosa de Bengala. CAT (catiônica); MAC (monoaniônica carboxilato); MAF (monoaniônica fenolato); NEZ (zwitteriônica); NEQ (quinóide); NEL (lactona); DA (dianiônica).	32
Figura 8. Aparato para realização do experimento.....	40
Figura 9. Liberação <i>in vitro</i>	41
Figura 10. Eletrofiador disponível no POLIMAT.	42
Figura 11. Espectro de absorção eletrônica obtido para sistemas nanoestruturados em diferentes porcentagens (m/V) do copolímero F-127 contendo AgNPs incorporadas com e sem exposição ao LED.	47
Figura 12. Espectro de absorção eletrônica obtido para sistemas nanoestruturados em diferentes porcentagens (m/V) do copolímero F-127 contendo AgNPs incorporadas e Rosa de Bengala.	48
Figura 13. Efeito da variação de temperatura no perfil de espalhamento de luz dinâmico (DLS) das nanoformulações na ausência do FS; (A) 0,50% m/V F-127; (B) 1,00% m/V F-127; (C) 2,00% m/V F-127; (D) 4,00% m/V F-127.....	51
Figura 14. Efeito da variação de temperatura no perfil de espalhamento de luz dinâmico (DLS) das nanoformulações na presença do FS; (A) 0,50% m/V F-127; (B) 1,00% m/V F-127; (C) 2,00% m/V F-127; (D) 4,00% m/V F-127.....	51
Figura 15. Efeito da variação de temperatura no espectro de absorção eletrônica das nanoformulações F-127/AgNPs; (A) 0,50% m/V F-127; (B) 1,00% m/V F-127; (C) 2,00% m/V F-127; (D) 4,00% m/V F-127.....	52
Figura 16. Gráficos de índice de instabilidade obtidos através do LumiSizer®.....	53

Figura 17. Gráfico de integração das amostras de F-127/RB/AgNPs sendo [F-127]: (A) 0,5% m/V (B) 1,0% m/V (C) 2,0% m/V e (D) 4,0% m/V	54
Figura 18. Microscopia Eletrônica de Transmissão da nanoformulações; (A) 0,5% m/V F-127; (B) 0,5% m/V F-127 / RB; (C) 0,5% m/V F-127 / AgNPs; (D) 0,5% m/V F-127 / RB / AgNPs.	56
Figura 19. Frações das espécies protolíticas da Rosa de Bengala em diversos pH. ...	57
Figura 20. Soluções de F-127 0,5% m/V com Rosa de Bengala ($5 \cdot 10^{-6}$ mol L ⁻¹) em diferentes valores de pH.	57
Figura 21. Emissão de fluorescência para a Rosa de Bengala em micelas copolímeras de F-127 com a adição de iodeto. [F-127] = (A) 0,5% , (B) 1,0% , (C) 2,0% e (D) 4,0% m/V; [RB] = $5 \cdot 10^{-6}$ mol/L; [AgNO ₃] = $X \cdot 10$ mol/L e λ_{exc} = 490 nm.	59
Figura 22. Variação na emissão de fluorescência da RB em função da concentração de F-127 em PBS e isotermas de ligação da RB com o F-127.	60
Figura 23. Calorimetria diferencial de varredura (DSC) para (A) F-127 (B) Rosa de Bengala (C) F-127/RB (D) F-127/AgNPs e (E) F-127/RB/AgNPs.	62
Figura 24. Cinética na presença de luz para a análise da sonda UA na amostra RB/EtOH.....	63
Figura 25. Cinética na presença de luz para análise da sonda UA na amostra RB/F-127.	63
Figura 26. Cinética na presença de luz para análise da sonda UA na amostra RB/AgNPs/F-127.....	64
Figura 27. Liberação in vitro da nanoformulação 0,5% F-127/RB/AgNPs.	65
Figura 28. Reograma de fluxo das soluções a serem eletrofiadas (A) PVA/0,5% F-127 (B) PVA/0,5% F-127/RB (C) PVA/0,5% F-127/AgNPs (D) PVA/0,5% F-127/RB/AgNPs (E) PVA/2,0% F-127 (F) PVA/2,0% F-127/RB (G) PVA/2,0% F-127/AgNPs (H) PVA/2,0% F-127/RB/AgNPs.....	67
Figura 29. Reograma de viscosidade pela taxa de cisalhamento das soluções a serem eletrofiadas (A) PVA/0,5% F-127 (B) PVA/0,5% F-127/RB (C) PVA/0,5% F-127/AgNPs (D) PVA/0,5% F-127/RB/AgNPs (E) PVA/2,0% F-127 (F) PVA/2,0% F-127/RB (G) PVA/2,0% F-127/AgNPs (H) PVA/2,0% F-127/RB/AgNPs.....	67
Figura 30. Nanofibras produzidas contendo (A) PVA/F-127/RB e (B) PVA/F-127/Ácido cítrico/AgNPs em sua composição.	71
Figura 31. Microscopia Eletrônica de Varredura e gráfico de distribuição normal do diâmetro da nanofibra de PVA.	71

Figura 32. Microscopia Eletrônica de Varredura e gráficos de distribuição normal dos diâmetros das nanofibras (A) PVA (B) PVA/ 0,5% F-127; (C) PVA/ 2,0% F-127; (D) PVA/ 0,5% F-127/ Ácido cítrico e (E) PVA/ 2,0% F-127/ Ácido cítrico.	73
Figura 33. Microscopia Eletrônica de Varredura e gráficos de distribuição normal dos diâmetros das nanofibras (A) PVA/0,5% F-127/RB (B) PVA/0,5% F-127/AgNPs e (C) PVA/0,5% F-127/RB/AgNPs.....	74
Figura 34. Microscopia Eletrônica de Varredura das nanofibras (A) PVA/0,5% F-127/Ácido cítrico (B) PVA/0,5% F-127/Ácido cítrico – Reticulada (C) PVA/2,0% F-127/Ácido cítrico (D) PVA/2,0% F-127/Ácido cítrico – Reticulada (E) PVA/0,5% F-127/Ácido cítrico/AgNPs (F) PVA/0,5% F-127/Ácido cítrico/AgNPs – Reticulada (G) PVA/2,0% F-127/Ácido cítrico/AgNPs e (H) PVA/2,0% F-127/Ácido cítrico/AgNPs – Reticulada.	76
Figura 35. Microscopia Eletrônica de Varredura das fibras em camadas sendo (A) PVA/0,5% F-127/Ácido cítrico PVA/0,5% F-127/RB PVA/0,5% F-127/Ácido cítrico (B) fibra (A) reticulada (C) PVA/0,5% F-127/Ácido cítrico/AgNPs PVA/0,5% F-127/RB/AgNPs PVA/0,5% F-127/Ácido cítrico/AgNPs (D) fibra (C) reticulada (E) PVA/0,5% F-127/Ácido cítrico/AgNPs PVA/0,5% F-127/RB/AgNPs PVA/0,5% F-127/Ácido cítrico/AgNPs (F) fibra (E) reticulada (G) PVA/2,0% F-127/Ácido cítrico/AgNPs PVA/2,0% F-127/RB/AgNPs PVA/2,0% F-127/Ácido cítrico/AgNPs (H) fibra (G) reticulada.....	77
Figura 36. Imagem da nanofibra em camadas PVA/0,5% F-127/Ácido cítrico/AgNPs PVA/0,5% F-127/RB/AgNPs PVA/0,5% F-127/Ácido cítrico/AgNPs – Reticulada...	78
Figura 37. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) para (A) PVA (B) PVA/F-127 (C) PVA/F-127/RB (D) PVA/F-127/AgNPs (E) PVA/F-127/RB/AgNPs.	79
Figura 38. Entumecimento da fibra reticulada em camadas durante o ensaio de ângulo de contato.....	80
Figura 39. Gráfico de tensão versus porcentagem de deformação das fibras (A) PVA/0,5% F-127/RB/AgNPs (B) PVA/0,5% F-127 (C) PVA/0,5% F-127/RB e (D) PVA/0,5% F-127/AgNPs.....	81
Figura 40. Gráfico de tensão versus porcentagem de deformação das fibras (A) PVA (B) PVA/Ácido cítrico/0,5% F-127 (C) PVA-Reticulado/0,5% F-127 (úmida) (D) PVA/Ácido cítrico/2,0% F-127 e (E) PVA-Reticulado/2,0% F-127 (úmida).....	82
Figura 41. Gráfico de tensão versus porcentagem de deformação das fibras (A) PVA-Reticulado/0,5% F-127/AgNPs PVA/0,5% F-127/RB/AgNPs PVA-Reticulado/0,5%	

F-127/AgNPs, seca (B) fibra (A) umedecida com água (C) PVA-Reticulado/2,0% F-127/AgNPs PVA/2,0% F-127/RB/AgNPs PVA-Reticulado/2,0% F-127/AgNPs, seca (D) fibra (C) umedecida com água.	83
Figura 42. Concentração de RB liberada ao longo do tempo em fluído simulado de ferida com pH=5,0.	84
Figura 43. Concentração de RB liberada ao longo do tempo em fluído simulado de ferida com pH=7,4.	84
Figura 44. Concentração de RB liberada ao longo do tempo em fluído simulado de ferida com pH=8,0.	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo dos parâmetros da eletrofiação e seus efeitos sobre a fibra.....	25
Tabela 2. Concentrações de Pluronic®F-127, Rosa de Bengala e AgNO ₃ nas amostras.....	37
Tabela 3. Resultados de diâmetro hidrodinâmico (D_H), índice de polidispersão (IP) e potencial zeta (ζ), respectivamente, das amostras de F-127/AgNPs sem LED.....	49
Tabela 4. Resultados de diâmetro hidrodinâmico (D_H), índice de polidispersão (IP) e potencial zeta (ζ), respectivamente, das amostras de F-127/AgNPs com LED.....	49
Tabela 5. Resultados de diâmetro hidrodinâmico (D_H), índice de polidispersão (IP) e potencial zeta (ζ), respectivamente, das amostras de F-127/AgNPs/RB com LED...	49
Tabela 6. Constante de supressão de Stern-Volmer (K_{sv}) da Rosa de Bengala em F-127.	59
Tabela 7. Análises térmicas para as diferentes formulações liofilizadas.	61
Tabela 8. Constante de velocidade da cinética de degradação do ácido úrico (K_{UA}) e constante de velocidade da cinética de fotobranqueamento da Rosa de Bengala (K_{RB}).	64
Tabela 9. Condutividade das soluções utilizadas na eletrofiação.	66
Tabela 10. Valores dos parâmetros reológicos: índice de consistência (K), índice de comportamento de fluxo (n), valor de cedência (T_0) e viscosidade plástica (η_p).	69
Tabela 11. Condições padrões utilizadas durante o processo de eletrofiação.	70
Tabela 12. Valores dos diâmetros médios, mínimos e máximos para as amostras de nanofibras.....	72
Tabela 13. Valores dos diâmetros médios, mínimos e máximos para as amostras de nanofibras com os fármacos.	74
Tabela 14. Análises térmicas para as diferentes nanofibras.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNPs	Nanopartícula de prata
CI	Conversão Interna
CIS	Conversão Intersistema
CLP	Camada de Liberação Prolongada
CMC	Concentração Micelar Crítica
CPE	Camada de Proteção Externa
DH	Diâmetro Hidrodinâmico
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
F-127	Copolímero tribloco F-127
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FET	Fibras de Estrutura Tripla
FS	Fotossensibilizador
FTIR-ATR	Espectroscopia de refletância atenuada por infravermelho com transformada de Fourier
K_b	Constante de Ligação
K_{RB}	Constante de fotodegradação da Rosa de Bengala
K_{SV}	Constante de Stern-Volmer
K_{UA}	Constante de velocidade de reação do ácido úrico
LCME	Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
LED	Diodo emissor de luz
ME¹O₂	<i>Metal Enhanced Singlet Oxygen Generation</i>
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NP	Nanopartícula
PDI	Índice de Polidispersividade
PEO	Poli(óxido de etileno)
PPO	Poli(óxido de propileno)
PVA	Poli(vinil álcool)
RB	Rosa de Bengala

RV	Relaxamento Vibracional
SUS	Sistema Único de Saúde
TMC	Temperatura Micelar Crítica
TFD	Terapia Fotodinâmica
TFDA	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

LISTA DE SÍMBOLOS

1S	Estado Fundamental
1S*	Primeiro Estado Excitado Singleto
1T*	Primeiro Estado Excitado Tripleto
3T*	Terceiro Estado Excitado Tripleto
¹O₃	Oxigênio Tripleto
¹O₂	Oxigênio Singleto
Φ_Δ¹O₂	Rendimento Quântico de Oxigênio Singleto
λ	Comprimento de onda
ε	Absortividade Molar
ζ	Potencial Zeta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 FERIDAS, TRATAMENTOS CONVENCIONAIS E CURATIVOS IDEAIS	18
2.2 ELETROFIAÇÃO	22
2.3 POLÍMEROS BIOCOMPATÍVEIS: POLI(ÁLCOOL VINIL) E PLURONIC® F-127	25
2.4 TERAPIA FOTODINÂMICA	27
2.5 FOTOSSENSIBILIZADORES	30
2.6 ROSA DE BENGALA	31
2.7 NANOPARTÍCULAS DE PRATA	33
2.8 AVANÇOS E PESQUISAS RECENTES	34
3. OBJETIVOS	36
3.1 GERAL	36
3.2 ESPECÍFICOS	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 MATERIAIS	37
4.2 NANOFORMULAÇÕES	37
4.2.1 Obtenção das nanoformulações Pluronic®F-127/RB/AgNPs	37
4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOFORMULAÇÕES	38
4.3.1 Espalhamento de luz dinâmico – DLS	38
4.3.2 Estabilidade das nanoformulações F-127/RB-AgNPs	38
4.3.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão - TEM	38
4.3.4 Análise Multivariada de pKa	39
4.3.5 Estudos de supressão de fluorescência: ajustes de Stern-Volmer (K_{SV}) ..	39
4.3.6 Determinação da Constante de ligação (K_b) da RB em sistema micelar ...	39
4.3.7 Cinética de degradação do ácido úrico: Rendimento quântico de oxigênio singlete ($\Phi_{\Delta^1O_2}$)	40
4.3.8 Liberação in vitro dos fármacos RB e AgNPs encapsulados nas nanopartículas	40
4.4 OBTENÇÃO DAS NANOFIBRAS	41
4.4.1 Obtenção das nanofibras PVA- Pluronic®F-127/RB/AgNPs	41
4.4.2 Obtenção das nanofibras reticuladas PVA-Pluronic®F127/Ácido citríco/RB/AgNPs	42

4.5 CARACTERIZAÇÃO DA SOLUÇÃO PARA ELETROFIAÇÃO	43
4.5.1 Condutividade	43
4.5.2 Reologia	43
4.6 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOFIBRAS	44
4.6.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	44
4.6.2 Espectroscopia de refletância atenuada por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR-ATR)	44
4.6.3 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	44
4.6.4 Ângulo de contato	44
4.6.5 Teste mecânico: texturômetro	Erro! Indicador não definido.
4.6.6 Teste de liberação <i>in vitro</i> dos fármacos	45
4.7 SEGURANÇA NO LABORATÓRIO E DESCARTE DE RESÍDUOS	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 NANOFORMULAÇÕES	47
5.1.1 Caracterização das nanoformulações Pluronic®F-127/RB/AgNPs	47
5.1.2 Estabilidade das nanoformulações Pluronic®F-127/RB/AgNPs	50
5.1.3 LumiSizer	53
5.1.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão – TEM	55
5.1.5 Estudo multivariado de pKa da Rosa de Bengala	56
5.1.6 Estudo de supressão de fluorescência com ajuste de Stern-Volmer (Ksv)	58
5.1.7 Constante de ligação (Kb)	60
5.1.8 Calorimetria Diferencial de Varredura – DSC	61
5.1.9 Cinética de degradação do ácido úrico: Rendimento quântico de oxigênio singlete ($\Phi_{\Delta^1O_2}$)	62
5.1.10 Liberação <i>in vitro</i>	65
5.2 SOLUÇÃO PARA ELETROFIAÇÃO	65
5.2.1 Condutividade	66
5.2.2 Reologia	67
5.3 NANOFIBRAS	70
5.3.1 Produção das nanofibras	70
5.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	71
5.3.3 Calorimetria diferencial de varredura – DSC	78
5.3.4 Ângulo de contato	80
5.3.5 Teste mecânico: texturômetro	81

5.3.6 Liberação <i>in vitro</i>	83
6. CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS.....	88
ANEXO	98

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que até 2026 de 20 a 60 milhões de pessoas sejam afetadas por feridas crônicas.¹ Essas feridas além de interromperem o curso normal da vida dos pacientes, frequentemente resultam em hospitalizações prolongadas e altos custos para o sistema de saúde.² Portanto, este estudo concentra-se na criação e caracterização de curativos bioativos ou inteligentes altamente eficazes.

Esses curativos foram fabricados a partir de polímeros na obtenção de matrizes poliméricas eletrofiadas. Estas matrizes são projetadas para a liberação prolongada de fármacos/ativos combinados, com o objetivo de aprimorar o tratamento de feridas.³ Assim, a busca por terapias mais eficazes e que não gerem resistência constituem o principal foco no tratamento de feridas. Neste contexto a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDA) surge como uma alternativa aos tratamentos convencionais.⁴

A modalidade terapêutica em questão é baseada na fotoativação de um fármaco fotossensibilizador (FS) por meio de uma fonte de luz em um comprimento de onda adequado na presença de oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$). A combinação destes três elementos leva a formação de espécies citotóxicas, como o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), capaz de conduzir à inativação de microrganismos.⁵

Os fármacos FS precisam apresentar certas características para que sejam considerados ideais para utilização na TFD. Dentre estes pré-requisitos é necessário que este FS apresente elevado coeficiente de absorvidade molar, elevado rendimento quântico de oxigênio singlete ($\phi_{\Delta}^1\text{O}_2$), facilidade de obtenção, ausência ou baixa taxa de reação de fotobranqueamento, mínima toxicidade no escuro, alta afinidade e ativação em comprimentos de onda com luz de ótima penetração nos tecidos (600-800 nm, janela fototerapêutica).⁶

Dentre os fármacos FS que vem sendo estudados destaca-se a Rosa de Bengala (RB), um corante da classe dos xantenos que em pH fisiológico (~7,4) apresenta um alto rendimento quântico de oxigênio singlete ($\phi_{\Delta}^1\text{O}_2$).⁷ A combinação da RB com nanopartículas metálicas, como as nanopartículas de prata (AgNPs), pode levar ao fenômeno conhecido como “*Metal Enhanced Singlet Oxygen Generation*” (ME^1O_2) potencializando a ação fotodinâmica e até mesmo desencadeando possíveis efeitos sinérgicos na inativação de microrganismos.^{8,9} Por outro lado, por si só as AgNPs possuem propriedades intrínsecas anticancerígenas além de já serem utilizadas no controle de microrganismos e em exames de contraste.^{10,11} Diante disto,

a combinação destes dois possíveis fármacos se mostra bastante promissora. Para otimizar a entrega dos ativos aos tecidos é necessário a utilização de um sistema carreador, os chamados sistemas de *drug delivery*.

Uma das alternativas de sistemas de *drug delivery* são os copolímeros do tipo Pluronic[®] que tem atraído muita atenção devido à sua versatilidade e biocompatibilidade. Pluronic[®] são copolímeros tribloco sintéticos contendo dois blocos hidrofílicos de poli (óxido de etileno) – (PEO) intercalados por um bloco mais hidrofóbico de poli (óxido de propileno) – (PPO) dispostos em uma estrutura do tipo $(EO)_a(PO)_b(EO)_a$.^{12,13} Neste contexto o Pluronic[®] F-127 é uma alternativa muito interessante, por ser aprovado pela FDA (do inglês: *Food and Drug Administration*) além de servir como agente redutor e estabilizante para as nanopartículas metálicas.^{13,14} Assim a incorporação dos ativos neste sistema se mostra bastante promissora.

Neste contexto, a hipótese deste estudo sugere a obtenção de curativos bioativos fotoativos a partir de matrizes poliméricas de poli(vinil álcool)- PVA, eletrofiadas e carregadas com RB e AgNPs previamente incorporadas em um sistema nanocarreador de Pluronic[®] F-127. Vale destacar que o Pluronic[®] F-127 além de atuar como nanocarreador para os ativos, também funcionará como agente redutor e estabilizante para as AgNPs. Além disso, a nanoformulação prévia além de servir de base para a obtenção das matrizes eletrofiadas posteriores, também trará informações sobre a interação da RB com as AgNPs. Ademais a iluminação funcionará como gatilho para a desativação de microrganismos prejudiciais por meio da TFDA. Sendo assim, o presente estudo tem dois enfoques principais: primeiramente avaliar a interação entre a RB e as AgNPs na nanoformulação de F-127/RB/AgNPs; e, em segundo momento, imobilizar essas nanoformulações em matrizes eletrofiadas de PVA para a obtenção dos curativos.

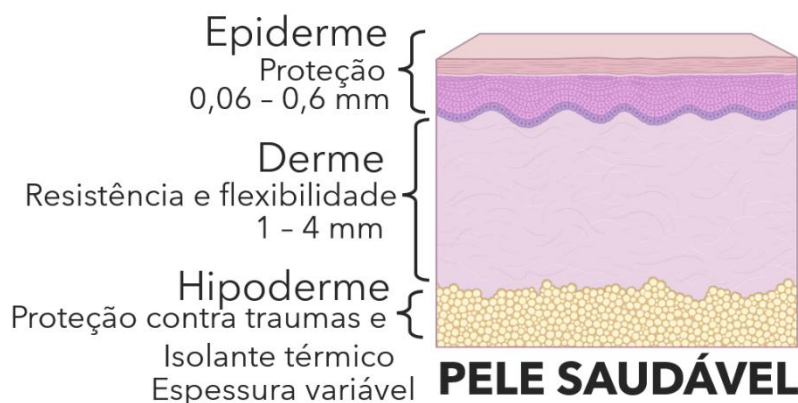
2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 FERIDAS, TRATAMENTOS CONVENCIONAIS E CURATIVOS IDEAIS

Constituindo cerca de 15% do peso corporal e sendo o maior órgão do corpo humano, a pele tem papel crucial na proteção do organismo e nas interações com o meio externo, por isso é de suma importância que a mesma esteja íntegra e em boas condições.¹⁵ Em circunstâncias normais o pH da pele apresenta-se entre 4 e 6 dependendo do local anatômico e da idade da pessoa. Esse meio ácido encontrado na superfície da pele é resultado da produção e liberação de ácidos graxos, aminoácidos e outros compostos produzidos pela epiderme. Essa acidez é considerada um aspecto importante na função de barreira da pele por fornecer resistência as principais bactérias causadoras de infecções, as quais precisam de um pH superior a 6 para se desenvolverem.^{15,16}

Estruturalmente, a pele se divide em três camadas, sendo elas a epiderme, a derme e a hipoderme, também chamada de camada subcutânea, como mostra a Figura 1.¹⁷ A epiderme é a camada superficial da pele e possui origem embrionária ectodérmica, assim como o sistema nervoso. Desta forma é possível que se encontre uma provável relação entre sintomas dermatológicos com aspectos emocionais. Esta camada possui espessura de 0,06–0,6 mm, e nela estão presentes os queratinócitos que atuam na proteção e ainda são responsáveis por pigmentar a pele. As células de Langerhans ali presentes funcionam como mediadoras no processo de inflamação. A derme é um tecido conectivo denso composto principalmente por colágeno, elastina e glicosaminoglicanos. As fibras colágenas e elásticas executam a proteção mecânica de barreira e mantêm a coesão da epiderme. Por possuir uma rede vascular maior em relação as outras camadas da pele possui uma relevante atuação no controle da temperatura corporal. A espessura da derme altera-se ao longo do corpo, podendo aumentar em regiões como a palma das mãos e na planta dos pés e se afinar nas pálpebras. Por fim, a hipoderme é responsável pela proteção mecânica e o isolamento térmico e ainda serve como reserva lipídica, protegendo também o organismo contra choques.¹⁸

Figura 1. Estrutura da pele.



Fonte: Adaptado de S.Chen et al.¹⁷ Criado utilizando Biorender.com

Por definição, as feridas são o resultado da interrupção da continuidade da pele devido a danos físicos, químicos ou térmicos, podendo ser causadas por condições médicas que provocam a alteração na estrutura e função da pele.¹⁶ Segundo a Associação Brasileira de Estomaterapia (SOBEST), o tempo de cicatrização de uma ferida, as complicações (infecções), a gravidade, a extensão e as condições clínicas do paciente são fatores determinantes para cronicidade e complexidade da ferida. Nesse sentido, as feridas podem ser classificadas como agudas ou crônicas.¹

As feridas agudas são aquelas que possuem um tempo de reparação adequado e podem ser causadas por diversos traumas como acidentes traumáticos, quedas ou até mesmo por meio mecânico através de instrumentos cortantes, perfurantes, contundentes, entre outros. Além disso, as feridas agudas podem ser causadas por radiação, eletricidade, produtos químicos corrosivos ou fontes térmicas, sendo então denominadas de lesões químicas.¹⁹

As feridas crônicas, por sua vez, estão associadas a comorbidades como hipertensão, doenças renais, câncer ou algumas isquemias. Essas feridas ocorrem quando o processo de cicatrização tecidual estagna ou falha sendo na maior parte dos casos recorrentes. A difícil cicatrização faz com que esse tipo de ferida seja facilmente contaminada levando a perda significativa de tecido, atingindo outras estruturas do organismo.² Condições patológicas como infecções persistentes e obesidade podem levar ao desenvolvimento de feridas crônicas. Ademais, as feridas crônicas podem levar à hospitalização por longos períodos, acarretando altos custos para o sistema de saúde.²⁰

O grau de contaminação das feridas é outra forma de classificação importante, pois orienta o tratamento antibiótico e fornece o risco de desenvolvimento de infecções. Neste contexto, as feridas podem ser classificadas como limpas, limpas-contaminadas, contaminadas e infectadas. As feridas ditas como limpas são produzidas em ambiente cirúrgico e possuem uma baixa probabilidade de infecção (1 a 5%). As feridas limpas-contaminadas são ocasionadas por materiais não estéreis como, por exemplo, uma faca de cozinha ou em situações cirúrgicas que envolvam a abertura de sistemas como o digestório, respiratório e genito-urinário. Ademais o risco de infecção é de 3 a 11%. As feridas contaminadas apresentam a reação inflamatória e são aquelas que tiveram contato com materiais como terra e/ou fezes, o risco de infecção é de 10 a 17%. Por fim, as feridas infectadas, são aquelas que apresentam sinais nítidos de infecção como a produção de exsudato.^{2,20}

Biologicamente, o corpo é capaz de reparar o dano nos tecidos através do processo de cicatrização. Esse processo consiste em uma coordenada série de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a repavimentação e a reconstituição do tecido. A cicatrização é dividida em três fases na qual a primeira, que ocorre imediatamente após a injúria, envolve a inflamação local, a segunda é denominada de proliferação pois um novo tecido é formado e, por fim, a última etapa chamada de maturação que envolve a remodelagem e reorganização do tecido.²¹

O processo de cicatrização destas feridas e a eficácia dos medicamentos dependem de diversos fatores. Dentre estes fatores destacam-se a temperatura, que afeta as funções celulares do corpo, e o pH, que influencia na atividade bioquímica em cada estágio da ferida. Como supracitado, a pele saudável possui um pH ácido, o que apoia a função de barreira natural e evita a proliferação microbiana. No caso das feridas estudos mostram que a temperatura média das lesões é próxima de 32,5°C e o pH varia dependendo o tipo de ferida. Assim, as feridas infectadas apresentam um pH mais alcalino devido a produção de amônia pelas bactérias.¹⁵

Outro fator responsável pela alteração do pH destas feridas é o tipo de tratamento utilizado. Schneider *et al.*¹⁵ investigaram o pH de feridas crônicas dentre 39 pacientes em que um total de 247 medições de pH foram realizadas. Neste estudo os valores de pH individuais das feridas variou de pessoa para pessoa e numa faixa total de 5,4-8,6. Foi encontrado ainda, em feridas crônicas tratadas de acordo com os padrões modernos de cuidados, um pH médio de cerca de 7,4. O estudo concluiu então que o tipo de curativo aplicado à ferida afeta o valor de pH.¹⁵

Os tratamentos convencionais e os curativos tradicionais utilizados em feridas têm sido aprimorados ao longo dos anos. Atualmente existem diversos tipos de materiais para cobertura em curativos para as mais diversas feridas. Dessa forma o tratamento inclui métodos clínicos e cirúrgicos, além dos curativos que compreendem a abordagem mais frequentemente utilizada e também é, em alguns casos, o procedimento definitivo.¹¹

Com o avanço da pesquisa médica e dos estudos voltados para o desenvolvimento de curativos mais eficazes, algumas características relacionadas às propriedades que estes produtos devem possuir foram estabelecidas. Portanto, o curativo deve ter a capacidade de permitir a passagem de gases, manter o nível de umidade sob controle, remover o excesso de exsudato (líquido produzido em resposta a danos nos tecidos e vasos sanguíneos), proporcionar isolamento térmico e mecânico, ser livre de substâncias tóxicas, não causar reações alérgicas, estar esterilizado, oferecer conforto e prevenir infecções na área afetada.³

Esses produtos vêm sofrendo avanços tecnológicos ao longo dos anos e Fan *et al.*²² sugerem que sejam classificados em curativos passivos (ou não oclusivos), curativos com princípios ativos (ou interativos) e curativos inteligentes (ou bioativos). Dentre os curativos passivos, destacam-se os curativos convencionais e gazes, utilizados para isolar lesões do ambiente externo, adaptando-se a diversos formatos de ferimentos. Podem ser aplicados em feridas infectadas ou não, com alta produção de exsudato, permitindo a passagem de gases e umidade. Apesar de sua ubiquidade, não são ideais para o tratamento e isolamento eficaz de lesões devido à tendência de umedecer e aderir à pele, resultando em trauma durante a remoção, desbridamento mecânico e desconforto, que podem prejudicar a cicatrização.²³ Além disso, podem deixar resíduos que ativam o sistema imunológico, potencialmente desencadeando reações alérgicas.

Já os curativos com princípios ativos são atenuantes no desbridamento e controle bacteriano de feridas, alginato de cálcio e carvão ativado com prata são exemplos desta classe de curativos. Por fim os chamados “curativos inteligentes” são aqueles que têm como objetivo a substituição da pele degradada, além de fornecerem substâncias ativas durante a cicatrização, auxiliando assim no fechamento da ferida. As matrizes de colágeno e celulose se encaixam nesta categoria.¹⁸

Atualmente o foco dos estudos buscando o gerenciamento de feridas visa facilitar o processo de cicatrização em um curto período, com o mínimo de dor e

desconforto para o paciente. Nesse contexto os “curativos inteligentes” se destacam, pois quando comparados aos curativos sólidos como algodão, bandagem e gaze apresentam inúmeras vantagens por possuírem constituintes com atividade biológica ou fármacos incorporados além de oferecem um ambiente úmido para ferida possibilitando a sua regeneração.²⁴

Assim estes “curativos inteligentes” ou bioativos atuam como cobertura e favorecem o processo de cicatrização das feridas além de melhorarem a qualidade de vida dos pacientes. Dentre eles destaca-se as matrizes nanofibrosas ou não-tecidos, obtidos pela técnica de eletrofiação que será dissertada no tópico a seguir.¹⁶

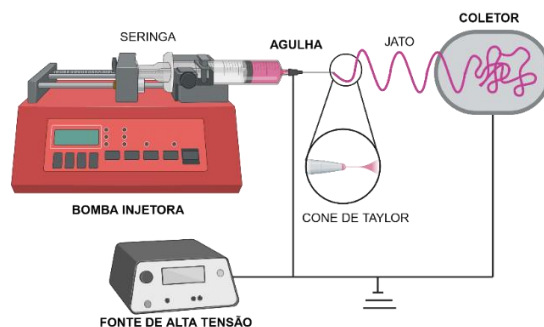
2.2 ELETROFIAÇÃO

A eletrofiação foi reportada pela primeira vez na literatura por Charles V. Boys em 1887.²⁵ Neste estudo Charles notou que fibras poderiam ser obtidas a partir de um líquido viscoelástico na presença de um campo elétrico externo, assim esta técnica amplamente conhecida atualmente abre portas para a produção de fibras ultrafinas com diâmetros que chegam à escala de nanômetros. As nanofibras possuem elevada área superficial por unidade de volume, porosidade e flexibilidade. Por conta destas características possuem diversas aplicações no campo biomédico, engenharia de tecidos, na indústria têxtil, indústria de embalagens e, como foco do presente trabalho, na liberação prolongada de fármacos e ação antimicrobiana.²⁶

Visando aplicação em sistemas de *drug delivery* as nanofibras se mostram bastante promissoras. Por conta da sua elevada área superficial, a matriz nanofibrosa favorece o aumento da taxa de dissolução do fármaco. A literatura atualmente tem explorado esta vertente pois, além da possibilidade de um tratamento mais preciso em aplicações biológicas, as nanofibras podem atuar na liberação de um ou mais fármacos simultaneamente no mesmo carreador.²⁷

Nesse cenário, diversas metodologias vêm sendo propostas para obtenção dessas fibras. A eletrofiação se destaca por ser uma técnica relativamente simples e que apresenta resultados satisfatórios na produção desses materiais. Os componentes básicos para a eletrofiação são praticamente acessíveis a todos os laboratórios e entre eles tem-se uma fonte de alta tensão, um tubo capilar, o qual pode ser uma agulha com um diâmetro pequeno, uma bomba de infusão e uma placa coletora aterrada, conforme demonstrado na Figura 2.²⁸

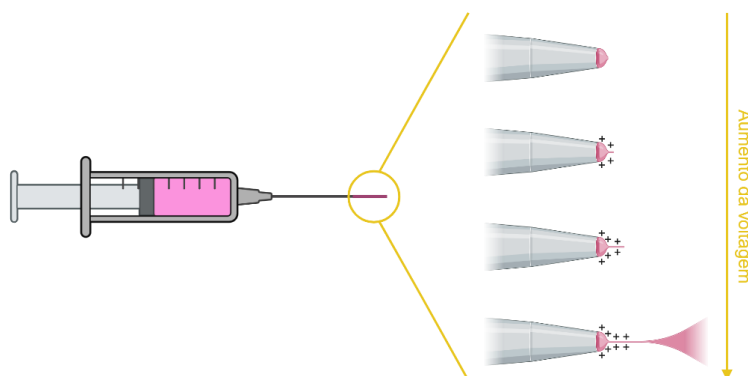
Figura 2. Esquema geral de um sistema de eletrofiação.



Fonte: Adaptado de Islam M.S. et al²⁶. Criado utilizando Biorender.com

Para que o processo de eletrofiação se inicie é necessário que haja uma diferença de potencial entre o capilar e a placa coletora. Assim, sob a influência do campo eletrostático, uma gota eletricamente carregada é formada na ponta do capilar e sofre uma deformação, gerando uma força eletrostática que compete com a tensão superficial. Essa deformação assume o formato de um cone, denominado “cone de Taylor”, conforme mostrada na Figura 3.²⁵ No momento em que a tensão aplicada no sistema ultrapassa um valor limite, específico de cada solução, as forças eletrostáticas superam a tensão superficial e um jato fino é ejetado em direção ao coletor, fazendo com que o solvente seja evaporado e a fibra se solidifique formando um conjunto de fibras que se depositam sobre o coletor. Assim, após a completa formação no coletor, as fibras podem ser recolhidas.²⁹

Figura 3. Evolução do cone de Taylor com o aumento da voltagem aplicada.



Fonte: Adaptado de Islam M.S. et al.²⁶ Criado utilizando Biorender.com

Com o objetivo de obter fibras com características mais adequadas aos tipos de aplicações os parâmetros da técnica vêm sendo aprimorados, para isto é de suma

importância que modelos elucidando o mecanismo da eletrofiação sejam propostos.²⁹ A formação do jato pode ser descrita como a consequência direta de expor uma gota de um fluido em contato com um condutor e com um forte campo elétrico. O alongamento do jato ocorre devido às forças que atuam nele e pode ser dividido em duas fases distintas. A fase inicial é descrita pelo estiramento do jato de maneira retilínea e a segunda fase é dada pelo alongamento do jato devido às instabilidades.³⁰

Durante a produção das fibras diversos fatores devem ser levados em consideração para que o material obtido não apresente aspecto heterogêneo como a presença de grânulos (do inglês *beads*). Assim, a otimização de alguns parâmetros é fundamental para que uma morfologia adequada das fibras seja obtida.²⁵

As propriedades da solução são fatores predominantes. Assim, se o solvente utilizado possui baixa volatilidade as fibras podem ser recolhidas ainda úmidas ou, no caso de solventes muito voláteis, corre-se o risco de o jato solidificar ainda no cone de Taylor, interrompendo a formação das fibras. A viscosidade da solução deve ser o suficiente para que a fibra não se rompa, mas não tão alta a ponto de prejudicar a formação do jato (formando gotas), essa propriedade pode ser controlada pela concentração e massa molecular do polímero. Por fim, a condutividade da solução é outro parâmetro que deve ser levado em conta, uma vez que em altas condutividades a formação de beads pode ser reduzida assim como o diâmetro, resultando em fibras sem defeitos.²⁶

Alguns parâmetros de processamento também devem ser acertados para otimizar a formação das nanofibras. A alta voltagem modifica o campo elétrico levando a um maior alongamento do jato, evaporando mais rápido o solvente e formando fibras com menores diâmetros, porém pode aumentar a formação de beads. A taxa de fluxo selecionada é muito importante para que ocorra a efetiva evaporação do solvente. A distância entre a ponta do capilar e o coletor também deve ser acertada, uma vez que quanto maior a distância, maior a evaporação do solvente e menor o diâmetro final da fibra.²⁸

Outro parâmetro a ser verificado é o ambiental, que envolve a temperatura e umidade do ar. Estudos mostram que com o aumento da temperatura fibras com menor diâmetro são obtidas, pois ocorre maior evaporação do solvente além de que há diminuição na viscosidade da solução polimérica em maiores temperaturas. Com relação à umidade, se estiver baixa, mais rapidamente o solvente evapora e menor o

diâmetro da fibra. A Tabela 1 mostra um resumo dos parâmetros observados durante a eletrofiação e quais os seus efeitos sobre as fibras obtidas.²⁹

Tabela 1. Resumo dos parâmetros da eletrofiação e seus efeitos sobre as fibras.

Parâmetro	Efeito nas fibras
↓ Volatilidade do solvente	↑ Umidade da fibra
↑ Condutividade	↓ Diâmetro da fibra e ↓ Formação de <i>beads</i>
↑ Viscosidade	↑ Diâmetro da fibra e ↑ Heterogeneidade
↑ Constante dielétrica	↓ Diâmetro da fibra e ↓ Formação de <i>beads</i>
↑ Tensão superficial	↑ Formação de <i>beads</i>
↑ Voltagem	↓ Diâmetro da fibra e ↑ Formação de <i>beads</i>
↓ Taxa de fluxo	↓ Diâmetro da fibra
↑ Distância entre o capilar e o coletor	↓ Diâmetro da fibra
↑ Temperatura	↓ Diâmetro da fibra
↓ Umidade	↓ Diâmetro da fibra

Com o ajuste dos parâmetros citados acima é possível eletrofiar quase todos os polímeros solúveis ou fundidos. Neste trabalho propõe-se a obtenção de blendas de poli(álcool vinílico) (PVA) e Pluronic® F-127 para a obtenção de nanofibras. Almeja-se também a incorporação de ativos dotados de propriedades antimicrobianas para o tratamento de feridas. As especificidades dos polímeros e possíveis fármacos escolhidos são apresentadas a seguir.

2.3 POLÍMEROS BIOCOMPATÍVEIS: POLI(ÁLCOOL VINIL) E PLURONIC®F-127

Dentre os polímeros que apresentam características desejáveis para eletrofiação e aplicações médicas destaca-se o PVA, o qual tem despertado o interesse dos pesquisadores devido à sua biocompatibilidade e possibilidade em diversas aplicações. Se trata de um polímero sintético e hidrofílico que já vem sendo utilizado em uma ampla gama de aplicações industriais, alimentícias e médicas. Além disso, o PVA é biodegradável, não tóxico, não carcinogênico e apresenta uma boa estabilidade química e térmica.³¹

As fibras de PVA possuem alta resistência à tração e compressão, sendo bastante reportadas na literatura.³¹ Ademais o PVA já é aprovado pela *FDA* (*Food and*

Drug Administration) para uso em embalagens alimentícias, medicamentos e aplicações medicinais.³²

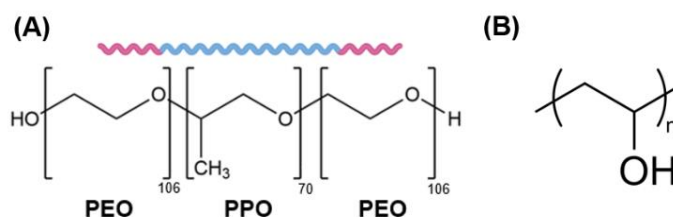
Além disto, visando a eficiência clínica dos fármacos fotossensibilizadores (FS) e o sucesso da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDA), o uso de sistemas de *Drug Delivery* são necessários, assim as propriedades fotofísicas e físico-químicas do FS são mantidas.

Dentre os mais variados sistemas de *Drug Delivery* destacam-se novamente os polímeros, que já são empregados na nanomedicina.³³ Estes, além de exercerem a função de suporte nanofibroso, também podem atuar na nano incorporação prévia dos fármacos. Vale destacar que alguns copolímeros em bloco têm chamado muita atenção devido a seu baixo custo, fácil funcionalização e versatilidade para formar vários tipos de nanopartículas. Em solução aquosa, acima de sua concentração micelar crítica (CMC) e temperatura micelar crítica (TMC), se auto-agregam na forma de micelas poliméricas nanoestruturadas do tipo core-shell.³⁴

A vantagem na utilização destes copolímeros no campo biomédico está associada à sua biocompatibilidade, evitando a adsorção por proteínas do sistema retículo endotelial, o que também aumenta o tempo de circulação pela corrente sanguínea. Além disso são capazes de driblar a resistência a múltiplos fármacos, pois inibem a ação da glicoproteína-P, principal responsável no efluxo de fármacos e, consequentemente, pela ação de resistência.³⁵

Estruturalmente polímeros do tipo Pluronic® apresentam dois blocos externos hidrofílicos de poli(óxido etileno) (PEO) e um bloco interno de poli(óxido propileno) (PPO) ligados em uma sequência PEO-PPO-PEO, como representado na Figura 4. Em geral, o núcleo hidrofóbico, PPO, é capaz de promover a encapsulação de fármacos hidrofóbicos e sustentar a estrutura micelar. Por outro lado, a corona hidrofílica, PEO, promove a estabilidade e a biocompatibilidade em fluídos biológicos, além da possibilidade de acomodar fármacos hidrofílicos.³⁶

Figura 4. Estrutura do (A) Pluronic® F-127 e (B) PVA.



Fonte: Adaptado de Yu et al.³⁷ Criado utilizando Biorender.com

Dentre os copolímeros tribloco destaca-se o Pluronic®F-127 $(\text{EO})_{106}(\text{PO})_{70}(\text{EO})_{106}$, também comercializado como Poloxamer®407. Diversos estudos reportam a utilização deste copolímero em aplicações biomédicas *in vitro* e *in vivo*, seja como polímero adjuvante de superfícies, dada sua alta biocompatibilidade, ou como sistema nanocarreador estruturado na forma de micelas. Além disto o F-127 melhora o transporte de fármacos através do endotélio cerebral, da barreira intestinal e provoca a transcrição da expressão de genes tanto *in vitro* como *in vivo*.³⁸

Sua escolha para elaboração do presente estudo é baseada não somente em suas propriedades biológicas favoráveis, mas também na possibilidade de atuar como agente redutor na obtenção das AgNPs.³⁹ Além disso, é capaz de incorporar dois ou mais fármacos, possibilitando a liberação combinada dos ativos.

2.4 TERAPIA FOTODINÂMICA

Diversos avanços foram promovidos pela utilização da nanotecnologia no transporte, direcionamento e entrega de fármacos. Neste contexto a comunidade científica tem se focado em tratamentos minimamente invasivos e mais eficazes. Aliado a isso, é crucial que essas terapias sejam seletivas e eficazes, além de evitarem a resistência aos fármacos. Dentre as terapias que se enquadram nesses quesitos destaca-se a Terapia Fotodinâmica (TFD).⁴

Em sua origem as aplicações fotodinâmicas buscavam a inativação de microrganismos através da geração de espécies citotóxicas como o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$).⁴⁰ O combate a estas cepas se dá de forma eficiente além de não gerar resistência, uma vez que as técnicas fotodinâmicas atuam de forma física e não bioquímica como a grande maioria dos fármacos convencionais.⁶

Na literatura diversas aplicações para TFD são reportadas, entre elas destacam-se a esterilização de bolsas de sangue, uso na odontologia contra infecções

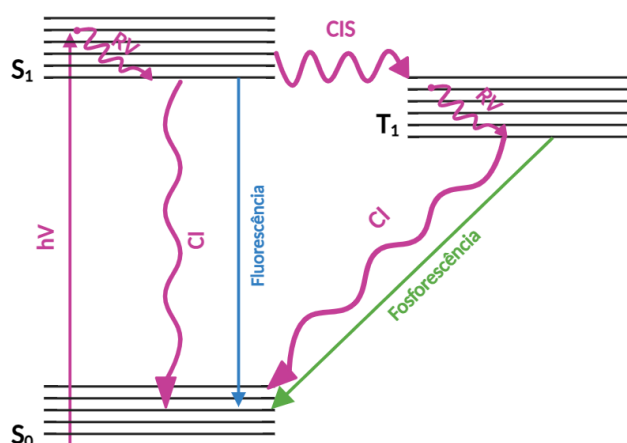
periodontais, controle bacteriano em alimentos e, como foco deste estudo, no tratamento de lesões superficiais contaminadas por microrganismos prejudiciais.⁴¹

A primeira utilização fotodinâmica de corantes foi reportada em 1903 por Tappeiner e Jesionek, utilizando a Eosina no tratamento de tumores.⁴² A partir de então, diversos estudos foram realizados para compreensão dos fenômenos envolvendo a combinação da luz com os corantes. As descobertas culminaram no desenvolvimento da TFD como um procedimento clínico. Os medicamentos de primeira geração começaram a ser comercializados na década de 50 e, na década de 70, surgiu o Photofrin®, o primeiro fotossensibilizador (FS) com uso aprovado pelos órgãos governamentais. Estudos subsequentes resultaram em medicamentos de segunda geração como o Levulan® Kerastick®, um pró-fármaco para lesões de pele, e o Visudyne® para degeneração macular da retina.⁴³ Atualmente, a utilização da TFD é aprovada em vários países sendo recentemente aprovada no SUS para o tratamento de câncer de pele do tipo basocelular superficial e nodular. As pesquisas continuam focadas em corantes das classes das porfirinas, ftalocianinas, xantenos e fenotiazinas.⁴⁴

A TFD baseia-se na aplicação tópica ou sistêmica de um composto FS sensível à luz seguida da irradiação em baixas doses com luz visível de comprimento de onda adequado na presença de oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$). A interação entre estes três elementos acarreta a geração espécies citotóxicas, como o oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) e outras espécies reativas de oxigênio (EROs) que são responsáveis pela morte celular.⁵ Embora ainda esteja sendo investigado, o mecanismo de ação da TFD está associado aos processos fotofísicos desencadeados pela absorção da radiação eletromagnética. Deste modo, a interação com a luz promove o FS para o seu primeiro estado singleto excitado ($^1\text{S}^*$), como mostra a Figura 5. A partir deste estado instável e de curtíssima duração, o FS tende a retornar rapidamente ao seu estado fundamental (^1S). Então, podem ocorrer duas vias de desativação, a não radiativa (conversão interna – CI, relaxamento vibracional) ou a radiativa (emissão de fluorescência), característica que pode ser aproveitada para teranóstica, a união de terapia com diagnóstico. Além disto, sendo mais importante e crucial para TFD, e podendo ocorrer em determinadas condições, o cruzamento intersistemas (CIS), resultado da transferência do elétron do primeiro estado singleto excitado ($^1\text{S}^*$) para o primeiro estado tripleto excitado ($^3\text{T}^*$), com inversão de spin. Deste estado, o FS pode retornar ao estado fundamental novamente por duas vias de desativação, a não

radiativa (conversão interna – CI, relaxamento vibracional) ou a radiativa (emissão de fosforescência). Por fim, e o mais importante para a TFD, o FS em $^1T^*$ pode transferir sua energia para as moléculas de oxigênio (3O_2), gerando espécies quimicamente reativas por meio de dois tipos de reações: mecanismo do tipo I e tipo II.^{40,45}

Figura 5. Diagrama de Jablonski. Onde CI: Conversão Interna; CIS: Cruzamento Intersistemas; RV: Relaxamento Vibracional; S_0 : Estado Singlete Fundamental; S_1 : Estado Singlete Excitado; T_1 : Estado Tripleto Excitado.



Fonte: Adaptado de Heidelberg *et al.*⁴⁶ Criada utilizando Biorender.com

No mecanismo do tipo I o FS transfere elétrons ou abstrai átomos de hidrogênio de um substrato que levam à produção das espécies reativas de oxigênio (EROs). No mecanismo do tipo II ocorre a transferência de energia de $^1T^*$ para o oxigênio molecular em seu estado fundamental tripleto (3O_2) e leva à produção de oxigênio singlete (1O_2). Essa transferência de energia que ocorre no segundo tipo de mecanismo é possível devido à alta reatividade entre moléculas de mesma multiplicidade de spin.^{4,45}

Como elucidadas no parágrafo anterior, as reações fotodinâmicas que induzem a ativação dos FS são bem descritas na literatura, porém, a compreensão dos mecanismos que levam à morte celular ainda é incompleta. Neste contexto três mecanismos fundamentais têm sido reconhecidos como contribuintes para a redução ou desaparecimento de tumores após o tratamento fotodinâmico: apoptose e/ou necrose, resposta imune e efeito vascular.⁴⁵ A possibilidade de diferentes mecanismos de ação dificulta o desenvolvimento de resistência, sendo uma das principais vantagens da fotossensibilização, além da morte celular direcionada pela ação da luz.

Embora se faça a distinção terminológica, o mecanismo de ação e elementos necessários para Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDA) são os mesmos que para TFD. Nesse sentido, em ambas as modalidades de fototerapia, a escolha adequada do FS é crucial para a efetividade da terapia, como será abordado no tópico a seguir.

2.5 FOTOSSENSIBILIZADORES

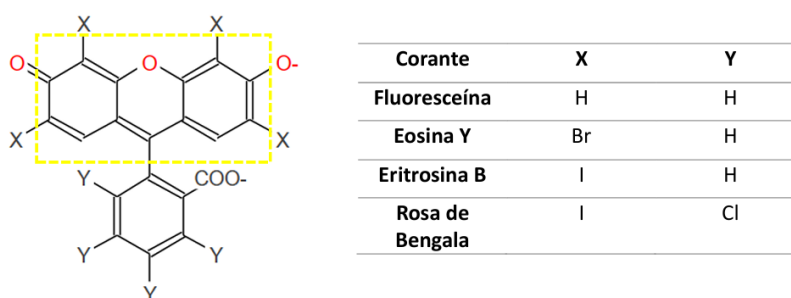
Apesar de ser um elemento fundamental para o sucesso da TFD o número de fármacos FS disponíveis comercialmente ainda é bastante limitado. Cada FS deve ser utilizado em uma concentração e dose de luz selecionadas, além de que devem obedecer a alguns pré-requisitos. Nesse contexto, para que um fármaco seja enquadrado como agente FS ele deve possuir um elevado rendimento quântico de oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), facilidade de obtenção, elevado índice de pureza, alta afinidade e seletividade pelas células tumorais e ativação em comprimentos de onda com luz de ótima penetração em tecidos, ou seja, dentro da janela fototerapêutica (600-800 nm). Esses FS ainda devem apresentar curtos intervalos de tempo entre a administração e a acumulação máxima no tecido tumoral, farmacocinética favorável e excreção pelo organismo após o tratamento. Por fim, baixas taxas de fotobranqueamento, mínima toxicidade no escuro, fotossensibilidade não prolongada, simplicidade na formulação, reprodutibilidade e alta estabilidade química/física.⁴⁷

Os fotossensibilizadores podem ser classificados de acordo com a época que foram desenvolvidos. Assim, os FS de primeira geração são derivados hematoporfirínicos e seus análogos. Já, na segunda geração, os FS foram desenvolvidos com base nas limitações apresentadas pelos fármacos da primeira geração. Por fim, a terceira geração engloba os FS da segunda geração modificados com marcadores biológicos, anticorpos e nanopartículas.⁴⁴

Dentre as classes de possíveis fármacos FS que vem sendo amplamente estudadas, destacam-se os corantes xâtenicos. Os xantenos se caracterizam por possuírem três anéis aromáticos em arranjo linear, apresentando um átomo de oxigênio central. Além disso, em sua estrutura os anéis xâtenico (sistema triciclo) e benzênico são ortogonais entre si assim a sobreposição dos orbitais entre as duas regiões é mínima fazendo com que os anéis sejam praticamente independentes um do outro. Assim, durante o processo de absorção de luz, o elétron excitado confina-se na região xantênica e todos os processos fotofísicos e fotoquímicos subsequentes

derivam desta região, denominada região cromofórica.⁴⁸ O principal representante desta classe é a fluoresceína (Figura 6), este corante apresenta excelentes propriedades fluorescentes em pH alcalino sendo empregada em exames oculares e como sonda em estudos biológicos. Por possuir um baixo rendimento quântico de oxigênio singlete a fluoresceína não atende aos pré-requisitos exigidos para aplicação na TFD.⁴⁹

Figura 6. Representação esquemática geral para alguns xantenos. Em destaque, estrutura do anel xantênico em pH fisiológico.



Fonte: Adaptado a partir de Mchedlov-Petrosyan *et al.*⁵⁰ Criado utilizando ChemDraw.

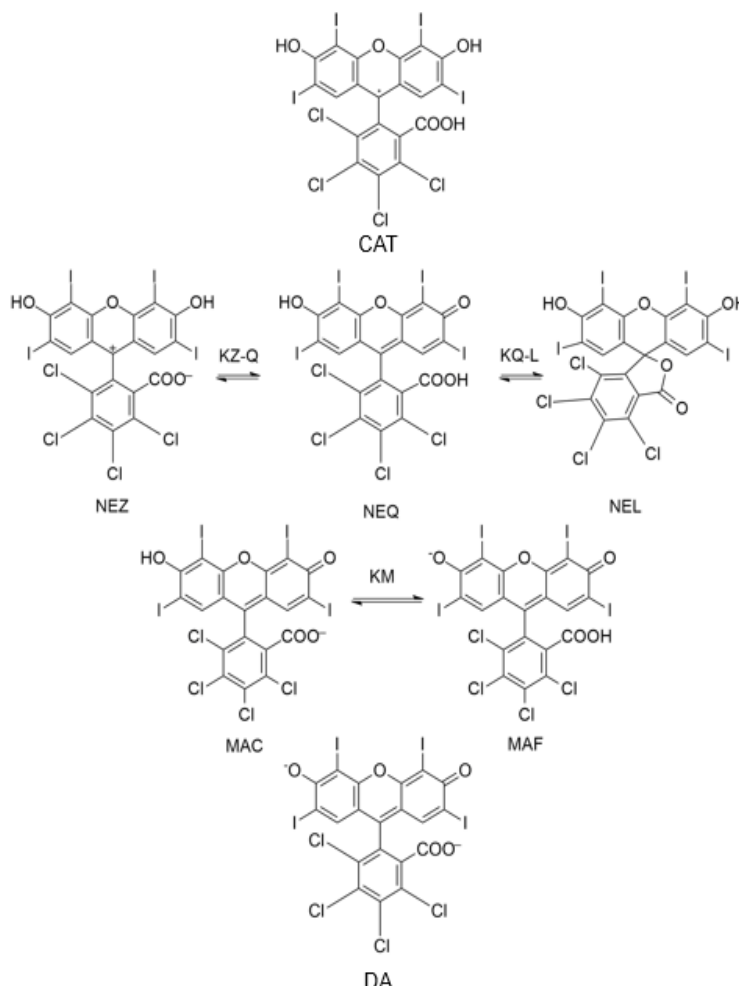
Nesse contexto, alterações sintéticas podem ser realizadas com o intuito de melhorar a geração de oxigênio singlete por essa classe de compostos. Uma dessas modificações é a introdução de elementos de elevada polarizabilidade como os átomos de halogênios (Br e I). A adição destes átomos favorece o acoplamento spin-órbita e, conseqüentemente, o processo de conversão intersistemas também é favorecido. Desta forma ocorre um aumento da população do estado tripleto e, conseqüentemente, uma diminuição nos processos de emissão de luz fluorescente.⁴⁸ Dentre os derivados xântenicos halogenados destaca-se a Rosa de Bengala.

2.6 ROSA DE BENGALA

A Rosa de Bengala (RB) (2,4,5,7-tetraiodo-3,4',5',6'-tetraclorofluoresceína) é reportada na literatura na inativação de microrganismos em diversos contextos, inclusive no combate à placa bacteriana dental.⁷ Além disto destacam-se aplicações comerciais como na formulação de colírios, com o objetivo de realizar marcação de lesões oculares. Esse corante possui em sua estrutura quatro átomos de iodo substituídos diretamente na estrutura xâtenica e quatro átomos de cloro ligados ao anel benzoico, Figura 7.⁵⁰

As características fotofísicas da RB, e dos xantenos em geral, dependem fortemente da forma protolítica e da estrutura tautomérica em que estas moléculas se encontram. Na literatura são reportadas quatro formas protolíticas possíveis para Rosa de Bengala: catiônica, neutra, monoaniônica e dianiônica. Sendo a forma dianiônica a que apresenta melhores parâmetros fotofísicos e fotoquímicos para aplicação na TFD, como um maior coeficiente de absorvidade molar.⁵¹ Além disto algumas destas espécies protolíticas podem apresentar equilíbrios tautoméricos como representado na Figura 7.⁵⁰

Figura 7. Espécies protolíticas e equilíbrios tautoméricos propostos para Rosa de Bengala. CAT (catiônica); MAC (monoaniônica carboxilato); MAF (monoaniônica fenolato); NEZ (zwitteriônica); NEQ (quinóide); NEL (lactona); DA (dianiônica).



Fonte: Adaptado a partir de Mchedlov-Petrosyanm *et al.*⁵⁰ Criado utilizando ChemDraw.

Este FS apresenta propriedades interessantes tais como: elevado coeficiente de absorvidade molar, elevado rendimento quântico do estado tripleto ($\Phi_T=0,76$),

longo tempo de vida do estado tripleto em tampão PBS ($t_{1/2} = 0,1 - 0,3$ ms) e alto rendimento quântico de oxigênio singleto em tampão PBS ($\Phi_{\Delta^1O_2} = 0,57$).⁷ Características estas que tornam ideal o uso da RB como fotossensibilizador na TFDA.

Aliado a isso e pensando no sinergismo entre dois fármacos, é proposto que a RB quando combinada às AgNPs apresente melhores resultados e parâmetros para TFDA.⁵² Assim, no tópico a seguir discutem-se as possíveis aplicações destas nanopartículas metálicas.

2.7 NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Atualmente diversos tipos de nanopartículas têm sido reportadas na literatura, dentre elas as metálicas têm fascinado os cientistas por estarem relacionadas a diversas propriedades físicas, químicas e biológicas únicas que não são observadas nos metais em macro escala. Outra característica bastante importante das nanopartículas metálicas com tamanho entre 1 e 100 nm é o aparecimento de bandas de absorção plasmônica na região visível (400-800nm). Essa absorção decorre das interações dos elétrons da banda de condução com a radiação eletromagnética.^{53,54} Dentre os vários metais, as nanopartículas de prata (AgNPs – *silver nanoparticles*) são particularmente interessantes, pois apresentam propriedades ópticas, elétricas e térmicas únicas.⁵⁵

Por possuírem atividade antimicrobiana as AgNPs são estudadas no desenvolvimento de diversos produtos como sprays antissépticos, cateteres, bandagens e recipientes de armazenamento de comida. Já no campo biomédico as AgNPs tem sido empregadas no diagnóstico por imagem por serem pontos de partida importantes e eficientes contrastes em imagens biológicas.^{56,57}

Deste modo formulações contendo a combinação AgNPs/RB poderiam aliar os efeitos intrínsecos de cada agente, além de possivelmente levar à geração de efeitos sinérgicos. As interações AgNPs/RB podem levar ao aumento da geração de oxigênio singleto que, segundo a literatura, é decorrente do aumento da população do estado tripleto do FS. Este aumento na geração de oxigênio singleto no meio é associada ao efeito ME^1O_2 (“*Metal Enhanced Singlet Oxygen Generation*”).^{9,52}

De um modo geral, nanopartículas metálicas intensificam o efeito fotodinâmico dos FS por meio de três mecanismos essenciais: amplificação da absorção, transferência de energia e geração de “elétrons quentes”. Assim, em um primeiro momento, o aumento do campo elétrico local próximo às nanopartículas

metálicas intensifica a absorção de luz pelo FS, o que resulta uma maior produção dos estados excitados singleto e tripleto. Isso implica em uma maior geração de $^1\text{O}_2$. Além disso, os metais podem atuar facilitando a transferência de energia do estado tripleto do FS para o $^3\text{O}_2$, aumentando assim a eficiência na geração de $^1\text{O}_2$. Por fim, a excitação plasmônica das nanopartículas metálicas resulta na geração de elétrons de alta energia cinética, conhecidos como "elétrons quentes", aumentando a população do estado tripleto do FS.⁹

De um modo geral, tanto a RB como as AgNPs satisfazem de forma independente ou combinada os requisitos básicos para aplicações biológicas envolvendo a TFDA.

Sendo assim, no presente estudo almeja-se a incorporação da RB combinada AgNPs em micelas de copolímeros triblocos do tipo $(\text{EO})_x(\text{PO})_y(\text{EO})_x$ que serão sequencialmente dispersas em uma matriz de PVA e eletrofiadas para produção de nanofibras para aplicação como curativos em feridas, almejando sua aplicação em TFDA.

2.8 AVANÇOS E PESQUISAS RECENTES

A literatura reporta inúmeras pesquisas sobre sistemas similares ao proposto neste estudo. Dentre eles Chengcheng Li *et al*⁵⁸ propõe formulações contendo RB e um exopolissacarídeo bacteriano, o EPS-605, em solução. Essas formulações têm a capacidade de se auto-organizar em NPs e, com a irradiação, o rendimento de $^1\text{O}_2$ é aprimorado significativamente.⁵⁸ Outra investigação, conduzida por Campanholi K.S.S. *et al.*, utiliza a RB como em géis micelares termorresponsivos, provenientes da combinação de Pluronic®F-127 e Carbopol®C934P, propondo-os como plataforma dermatológica. Esses géis micelares exibiram propriedades de gelificação e capacidade de penetração cutânea condizente com a aplicação sugerida.⁵⁹

Em um estudo relatado por Ballesteros C.A.S. *et al.* foi proposto um nanogel fotoresponsivo que incorpora AgNPs imobilizadas na superfície das nanofibras de policaprolactona (PCL) para aplicação clínica como curativo em feridas. Os resultados de inibição obtidos revelaram-se promissores tanto para as formulações que continham exclusivamente as AgNPs quanto para as formulações AgNPs-Nanogel.⁶⁰

Com o intuito de otimizar as propriedades intrínsecas de cada um dos ativos mencionados anteriormente propõe-se a combinação da RB com AgNPs, visando alcançar o fenômeno conhecido como "*Metal Enhanced Singlet Oxygen Generation*"

(ME^1O_2).⁵² Além disso, considerando os desafios associados à penetração da luz verde na pele, essencial para a fotoativação da RB, sugere-se a incorporação desses ativos em nanofibras. Essa abordagem visa facilitar a aplicação da formulação sobre feridas, proporcionando uma via mais eficaz de administração.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

- Desenvolver e caracterizar matrizes eletrofiadas compostas pelos polímeros PVA e F-127 incorporada com nanopartículas de prata (AgNPs) combinadas a Rosa de Bengala (RB) para aplicação em curativos bioativos fotoativos almejando o tratamento de feridas através da TFDA.

3.2 ESPECÍFICOS

- Encapsulação da Rosa de Bengala e nanopartículas de prata em micelas do copolímero tribloco Pluronic® F-127 assim como a caracterização das mesmas por análises de espalhamento de luz dinâmico (DLS), espectroscopia de absorção eletrônica UV-Vis, análises de fluorescência, análises térmicas e microscopia eletrônica.
- Desenvolver nanofibras por meio da eletrofiação de soluções contendo a combinação entre PVA/F-127/AgNPs/RB.
- Caracterizar morfologicamente, estruturalmente, mecanicamente e composicionalmente as nanofibras obtidas por diferentes técnicas, tais como: microscopia eletrônica de varredura; análises termogravimétricas, análise de textura, entre outras.
- Avaliar a incorporação e liberação (*drug-delivery*) das AgNPs e da RB a partir das nanofibras produzidas em diferentes pH.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Para a produção das nanofibras eletrofiadas foram utilizados os polímeros PVA ($M_w = 72.000$ g/mol, grau de hidrólise 87-89%), adquirido da Neon, e o Pluronic®F-127 ($M_w = 12.600$ g/mol) adquirido da Sigma Aldrich. O nitrato de prata também adquirido da Sigma Aldrich. Os solventes etanol e DMSO foram adquiridos da Neon. O fotossensibilizador Rosa de Bengala foi adquirido da Nuclear. O ácido úrico e o ácido cítrico foram adquiridos da Dinâmica. O cloreto de potássio, fosfato de sódio e o fosfato de potássio foram adquiridos da Sigma Aldrich. Para todas as nanoformulações foi utilizada água ultrapura. Todos os materiais foram utilizados sem purificação prévia.

4.2 NANOFORMULAÇÕES

4.2.1 Obtenção das nanoformulações Pluronic®F-127/RB/AgNPs

A obtenção das nanopartículas metálicas foi realizada empregando nitrato de prata (AgNO_3) na presença do copolímero tribloco F-127, o qual atua como agente redutor e estabilizante das AgNPs.^{14,61}

A síntese inicia com a solubilização do copolímero F-127 em diferentes concentrações (0,5; 1,0; 2,0; 4,0% m/V) em tampão fosfato (pH = 7,4). Em seguida uma alíquota de solução estoque de AgNO_3 ($1 \cdot 10^{-2}$ mol/L) em água utrapura é adicionada, gerando uma concentração final de $5 \cdot 10^{-4}$ mol/L . Em seguida, a amostra é exposta diretamente a um sistema de iluminação LED com faixa de emissão entre 380 e 420 nm ($I = 67,4$ W/m²), durante 5 minutos e sob agitação constante para que ocorra a geração das AgNPs.⁶² A incorporação do FS, RB, foi realizada através do método de incorporação passiva, onde uma alíquota de solução estoque concentrada ($1 \cdot 10^{-3}$ mol/L) de RB em DMSO é adicionada as amostras, obtendo-se concentração final de $5 \cdot 10^{-6}$ mol/L. Na Tabela 2 as concentrações dos componentes presentes na amostra estão elencadas.

Tabela 2. Concentrações de Pluronic®F-127, Rosa de Bengala e AgNO_3 nas amostras.

Amostra	F-127 (% m/v)	Rosa de Bengala	AgNO_3
1	0,5	$5 \cdot 10^{-6}$ mol/L	$5 \cdot 10^{-4}$ mol/L
2	1,0		
3	2,0		
4	4,0		

4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOFORMULAÇÕES

4.3.1 Espalhamento de luz dinâmico – DLS

O diâmetro hidrodinâmico, o índice de polidispersividade (PDI) e o potencial de superfície Zeta (ζ) das amostras foram obtidos através de medidas DLS em um Zetasizer Nano Series modelo SZ (Malvern Instruments, Reino Unido) disponível no Grupo de Estudo em Materiais Poliméricos (POLIMAT), com laser de 633 nm e ângulo de 173°. Os resultados são apresentados como a média de três medidas.

4.3.2 Estabilidade das nanoformulações F-127/RB-AgNPs

A avaliação da estabilidade das nanoformulações e do FS em dispersão coloidal foram realizadas em uma faixa de temperatura (20 – 37°C). A estabilidade foi avaliada através do espalhamento de luz dinâmico, conforme metodologia descrita em 4.3.1. Ainda foi monitorada por meio da espectroscopia UV-Vis na mesma faixa de temperatura, através do espectrofotômetro UV-vis Varian Cary® 50, disponível no laboratório LACFI.

Ainda neste contexto, avaliou-se a estabilidade das nanoformulações através do equipamento LumiSizer® (LUM GmbH, Alemanha). As amostras foram transferidas para cubetas de poliamida com caminho óptico de 1 mm e posicionadas horizontalmente no equipamento, sendo posteriormente submetidas à incidência de um feixe de luz na região do infravermelho próximo ($\lambda = 865$ nm) em um campo centrífugo imposto pela rotação a 2493 rpm. A estabilidade destas nanoformulações foram avaliadas a partir da correlação transmitância/posição/tempo. A partir desta, obtiveram-se os valores de índice de instabilidade (II), valor adimensional entre 0 e 1, sendo tão mais instável quanto mais próximo de 1.⁶³

4.3.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão - TEM

A morfologia das micelas foi avaliada por meio da técnica de microscopia eletrônica de transmissão. Como porta amostras uma grade cobre foi utilizado recoberto com filme de carbono/Formvar. A análise foi realizada utilizando-se um microscópio JEM 1011 disponível no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) na UFSC a uma aceleração de 100 kV. O preparo do grid ocorreu 24 h antes da análise, para isso 5 μ L da nanoformulação foram depositados no grid e o excesso removido com papel absorvente, este processo foi repetido três vezes sobre o mesmo grid.

4.3.4 Análise Multivariada de pKa

A análise multivariada de pKa permite a determinação das espécies protolíticas e tautoméricas que prevalecem no sistema em cada condição de pH. Para isso foram preparadas 40 soluções contendo F-127 0,5% (m/V) e RB em concentração fixa ($5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$). Os valores de pH utilizados abrangiam uma faixa de 0–10, em que, para pH entre 0–2 uma solução de HCl padrão foi empregada, para os valores de pH entre 2,0–8,0 foi empregado o tampão McIlvaine e, por fim, para faixa de 8,0–10,0 o tampão de ácido bórico foi utilizado. As soluções foram submetidas a espectroscopia UV-Vis no espectrofotômetro UV-vis Varian Cary®50, disponível no laboratório LACFI do Departamento de Química da UFSC. Os dados foram processados por um conjunto computacional constituído por quatro aplicativos, o MASDA.⁶⁴

4.3.5 Estudos de supressão de fluorescência: ajustes de Stern-Volmer (K_{SV})

A supressão de fluorescência da RB incorporada nas micelas na presença das AgNPs foi realizada utilizando o íon iodeto como agente supressor aquo-solúvel (iodeto de sódio).⁶⁵ A constante de Stern-Volmer (K_{SV}) pode ser calculada pela Equação 1.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[I^-] \text{ (Equação 1)}$$

Na qual F_0 e F : são as intensidades de fluorescência na ausência e presença do supressor, respectivamente, e $[I^-]$: é a concentração de iodeto.

4.3.6 Determinação da Constante de ligação (K_b) da RB em sistema micelar

Para determinação dos parâmetros de ligação entre o FS e as micelas do copolímero F-127 utilizou-se a emissão de fluorescência no fluorímetro Varian Cary® Eclipse disponível no Laboratório LACFI do Departamento de Química da UFSC, o comprimento de onda de excitação foi de 490 nm com fendas de 5 nm. Neste experimento uma solução aquosa de RB ($5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) foi titulada com uma solução estoque (8,0 % m/V) de F-127. A partir dos dados obtidos um espectro de emissão foi gerado e o comprimento de onda máximo de emissão foi selecionado, do qual foram coletados valores de fluorescência para o ajuste dos pontos experimentais, utilizando a Equação 2.⁶⁶

$$F = \frac{(F_0 - F_f)}{(\frac{1}{K_b} \cdot [S]) + 1} \text{ (Equação 2)}$$

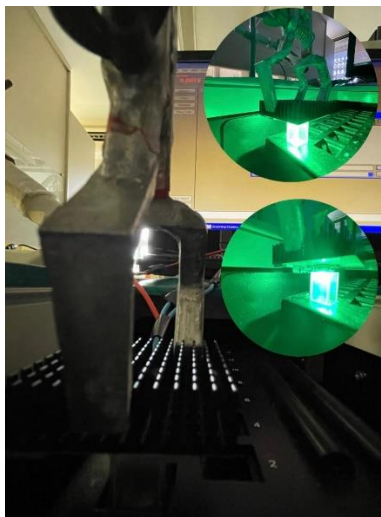
onde F é a intensidade de fluorescência; F_f : emissão do FS ligado ao copolímero; F_0 : emissão do FS na ausência do copolímero; $[S]$: concentração de F-

127; N: o número de moléculas de polímero por molécula de FS e CMC: concentração micelar crítica.

4.3.7 Cinética de degradação do ácido úrico: Rendimento quântico de oxigênio singleto ($\Phi_{\Delta^1\text{O}_2}$)

A geração de oxigênio singleto ($\Phi_{\Delta^1\text{O}_2}$) foi verificada por meio do método indireto usando o ácido úrico (UA) como sonda.⁶⁷ Os experimentos foram realizados em uma cubeta de quartzo (1,0 cm de caminho óptico) contendo uma solução aquosa de UA ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) e a formulação 0,5% m/V F-127/RB/AgNPs, assim como os controles, incluindo a RB em etanol. As amostras com o UA foram mantidas sob agitação no escuro durante 30 minutos anteriores ao início da iluminação. A fotodegradação do UA foi avaliada durante 18 horas em espectrofotômetro Varian Cary®50, disponível no laboratório LACFI do Departamento de Química da UFSC, por varredura no modo cinético. A iluminação foi realizada com um sistema de iluminação equipado com LEDs de emissão branco quente ($29,2 \text{ W m}^{-2}$ de irradiância e distância de 1,0 cm da superfície do líquido). Como o espectrofotômetro opera no modo de fase modulada, a incidência de luz externa não interfere nas medições, Figura 8.⁶⁸

Figura 8. Foto do aparato para realização do experimento.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3.8 Liberação *in vitro* da RB e das AgNPs encapsulados nas nanopartículas

A liberação *in vitro* em fluido simulado (pH=7,4) foi realizada como teste preliminar para a liberação da RB-AgNPs encapsulado nas nanopartículas micelares. O experimento foi realizado pelo método de diálise, onde 4,5 mL da formulação 0,5%

F-125/RB/AgNPs foi colocada na membrana de diálise (MWCO = 3500 Da, Spectra/Por®). A amostra foi mergulhada em 45,0 mL de uma solução de PBS contendo F-127 (0,5% m/V) a fim de garantir condições *sink* do sistema e evitar a agregação do FS. Os conjuntos foram mantidos a 37,0°C e, em determinados intervalos de tempo, 1,0mL do meio era retirado e substituído por um volume igual de meio fresco. A quantificação da RB liberada a partir das micelas poliméricas bem como a curva de calibração foram realizadas por emissão de fluorescência no fluorímetro Varian Cary® Eclipse disponível no Laboratório LACFI do Departamento de Química da UFSC. Os comprimentos de onda avaliados foram 430 nm e 545 nm.

Figura 9. Liberação *in vitro*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4 OBTENÇÃO DAS NANOFIBRAS

4.4.1 Obtenção das nanofibras PVA- Pluronic®F-127/RB/AgNPs

Na etapa de obtenção das nanofibras, uma massa correspondente de PVA (10% m/V) foi adicionada a um Erlenmeyer e solubilizada com uma solução de Pluronic®F-127 (0,5 ou 2,0% m/V) em tampão fosfato. Vale destacar que as duas diferentes porcentagens em massa do Pluronic®F-127 foram estabelecidas com base nos resultados obtidos na etapa de avaliação das nanoformulações. O sistema foi levado a uma chapa de agitação a 600 rpm por 8 horas. Após a completa dissolução dos polímeros uma alíquota de solução estoque de AgNO₃ em água ultrapura foi adicionada ao meio, gerando uma concentração final de $5 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹. Por fim, foi adicionado junto a solução a RB (0,8% m/V) e o sistema foi mantido sob agitação até completa homogeneidade. A solução final foi dividida em seringas de 5 mL contendo agulhas com diâmetro de 1,0 mm (calibre - 19 G) e então submetidas ao processo de eletrofiação. Os parâmetros de eletrofiação previamente definidos com base na

literatura compreendem uma tensão de 18 kV, uma distância entre o coletor e a agulha de 15 cm e uma vazão de 0,79 mL h⁻¹.⁶⁹

O aparelho utilizado é da empresa Hsensor Equipamentos disponível no Grupo de Estudos em Materiais Poliméricos (POLIMAT), como mostra a Figura 10. No sistema também há um termo-higrômetro da marca Exlom para o monitoramento da temperatura e umidade durante a eletrofiação.

Figura 10. Foto do eletrofiador disponível no POLIMAT.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4.2 Obtenção das nanofibras reticuladas PVA-Pluronic®F127/Ácido cítrico/RB/AgNPs

Na etapa de obtenção das nanofibras reticuladas, uma massa correspondente de PVA (10% m/V) foi adicionada a um Erlenmeyer e solubilizada com uma solução de Pluronic®F-127 (0,5 ou 2,0% m/V) em tampão fosfato (pH 7,4). O agente reticulante utilizado pode ser adicionado, seguindo a metodologia presente em Czibulya Z. *et al.*⁷⁰, assim o ácido cítrico (6,1% m/V) foi adicionado ao Erlenmeyer e então levado a uma chapa de agitação (600 rpm) sob aquecimento (~50°C) *overnight*. Após a completa dissolução dos polímeros uma alíquota de solução estoque de AgNO₃ em água ultrapura foi adicionada, gerando uma concentração final de 5.10⁻⁴ mol L⁻¹. Por fim, foi adicionado junto ao meio a massa correspondente de RB (0,8% m/V) e o sistema foi mantido sob agitação até completa homogeneidade. A solução final foi dividida em seringas de 5 mL contendo agulhas com calibre de 1,0 mm e então submetidas ao processo de eletrofiação. Os parâmetros de eletrofiação previamente definidos com base na literatura compreendem uma tensão de 18 kV, uma distância entre o coletor e a agulha de 15 cm e uma vazão de 0,79 mL h⁻¹.⁶⁹ Por fim, a fibra contendo o agente reticulante foi aquecida em uma estufa a 120°C durante diferentes

intervalos (45 min, 1 h e 2 h) para que o processo de reticulação aconteça. A análise preliminar constatou que a melhor condição incluía 45 min de reticulação, sendo essa condição mantida em todos os demais experimentos.

Além das fibras de camada única, foram desenvolvidas fibras de estrutura tripla (FET). Neste caso, foram realizadas três etapas consecutivas de eletrofiação, com deposição sequencial de uma camada sobre a outra. As camadas externas, denominadas Camadas de Proteção Externa (CPE), incluíam todos os ativos mencionados anteriormente, exceto a RB. Por outro lado, a camada interna, denominada Camada de Liberação Prolongada (CLP), incluía todos os ativos, exceto o ácido cítrico. As razões para esses cuidados específicos serão discutidas no item 5.

O aparelho utilizado é da empresa Hsensor Equipamentos disponível no Grupo de Estudos em Materiais Poliméricos (POLIMAT). No sistema também há um termo-higrômetro da marca Exlom para o monitoramento da temperatura e umidade durante a eletrofiação.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DA SOLUÇÃO PARA ELETROFIAÇÃO

Para avaliar as propriedades da solução para eletrofiação (PVA/F-127/RB/AgNPs e PVA/F-127/Ácido cítrico/RB/AgNPs) foram empregadas as seguintes técnicas:

4.5.1 Condutividade

O estudo de condutividade das soluções teve como objetivo caracterizá-las e assim aprimorar os parâmetros da eletrofiação. No ensaio foi utilizado um condutímetro da marca MS Tecnopon mCA-150 disponível laboratório LACFI do Departamento de Química da UFSC. O eletrodo foi introduzido diretamente na solução utilizada para eletrofiação e o teste foi realizado em triplicata.

4.5.2 Reologia

As medições reológicas das soluções para eletrofiação foram realizadas usando um reômetro da marca Anton Paar modelo MCR 72 disponível na Central de Análises do EQA na UFSC. As amostras foram colocadas em repouso por um minuto para estabilização anterior a análise e as medidas da tensão de cisalhamento e viscosidade foram realizadas em triplicata para todas as soluções.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOFIBRAS

4.6.1 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

A análise foi realizada no SEM da marca JOEL JSM-6390LV (100kV) disponível no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) na UFSC, a fim de fazer a verificação da morfologia superficial da nanofibra. Para tornar as amostras eletricamente condutoras, as mesmas foram metalizadas com uma fina camada de ouro utilizando uma recobridora de ouro (*sputtering*) da marca Leica modelo EM SCD 500. Para medir os diâmetros das nanofibras obtidas o software Image J foi utilizado, de domínio público para processamento de imagens, desenvolvido pelo National Institutes of Health (USA).

4.6.2 Espectroscopia de refletância atenuada por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR-ATR)

A Espectroscopia de refletância atenuada por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR-ATR) foi realizada em um espectrômetro modelo Shimadzu Prestige-21, disponível no laboratório POLIMAT. Os espectros do F-127, do PVA e da Rosa de Bengala puros também foram analisados a fim de comparação. A faixa selecionada foi de 4000 a 400 cm^{-1} com 128 *scans* e resolução de 1 cm^{-1} .

4.6.3 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

O estudo da interação entre os componentes das matrizes eletrofiadas foi realizado por meio da calorimetria diferencial de varredura (DSC). Neste contexto, as curvas de calorimetria foram obtidas com o calorímetro da marca TA Instruments Q20 disponível na Central de Análises do Departamento de Química da UFSC. Para as análises empregou-se atmosfera de nitrogênio, sendo avaliada de -90 a 350 °C com uma velocidade de aquecimento de 20°C/min.^{14,61} Com esta análise foi possível obter para cada material o valor da temperatura de fusão (T_f) e a entalpia de fusão (ΔH_f).

4.6.4 Ângulo de contato

Para determinação de ângulo de contato e hidrofiliicidade da superfície das matrizes eletrofiadas utilizou-se um goniômetro acoplado a uma câmera. Amostras das matrizes foram coladas com fita dupla face em lâminas de vidro e foram acomodadas em suporte localizado em frente a câmera. Nessas membranas pingou-se gotas de água, com uma micropipeta. Imediatamente após o gotejamento, sua imagem foi captada e o software realizou 10 medidas de ângulo de contato a cada 1 segundo de exposição do material à gota. As medidas de ângulo de contato objetivam

investigar as características hidrofóbicas da superfície de um material. Para estas medidas o goniômetro utilizado foi da marca Ramé-Hart 250 disponível na Central de Análises do EQA na UFSC.

4.6.5 Avaliação das propriedades mecânicas

Ademais, foi realizado o estudo das propriedades mecânicas das fibras utilizando-se o texturômetro TA.HD Plus Texture Analyser (Stable Micro Systems) disponível na Central de Análises do EQA na UFSC. O ensaio realizado foi o de resistência à tração com objetivo de medir a força necessária para rasgar o curativo. Para isto foi utilizada uma célula de carga de 50 kgf e amostras com dimensões de 4x1 cm, conforme as diretrizes da norma ASTM D882 (2002).⁷¹ A velocidade utilizada no teste foi de 0,8 mm/s. Todas as amostras tiveram os perfis avaliados.

Considerando aplicação tópica em feridas os parâmetros citados foram avaliados para as fibras secas e úmidas. Para isso, os corpos de prova foram imersos em solução de tampão fosfato pH 7,4 por 5 minutos.

4.6.6 Teste de liberação *in vitro* dos fármacos

Neste trabalho também foi realizado o teste de liberação *in vitro* dos fármacos em fluído simulado de ferida com controle de temperatura e agitação. A metodologia utilizada no estudo foi baseada no estudo realizado por Jiang *et al.* (2014)⁷² em que um pedaço da nanofibra (2x1 cm, recortado) foi imerso em um fluído simulado de ferida (FSF) com diferentes pHs (5, 7,4 e 8) em temperatura fixa de 32,5 °C e agitação constante.

A quantificação da RB liberada a partir das nanopartículas poliméricas bem como a curva de calibração foram realizadas por espectroscopia de absorção eletrônica no espectrofotômetro Varian Cary-60, disponível no laboratório LACFI do Departamento de Química da UFSC. Por fim, estudos no DLS foram realizados segundo metodologia citada em 4.3.1. Para quantificação, as curvas de calibração da RB em FSF nos diferentes pH (5,0, 7,4 e 8,0) foram obtidas (Anexo J).

4.7 SEGURANÇA NO LABORATÓRIO E DESCARTE DE RESÍDUOS

As medidas de segurança durante a realização dos experimentos foram tomadas através da utilização de equipamentos de proteção individual, compostos de jaleco, luvas e máscara, além de vestimentas adequadas como calça e sapatos

fechados. O laboratório também é equipado com capelas de exaustão, extintores de incêndio e saídas de emergência para maior segurança.

Todos os experimentos foram realizados com a menor quantidade de reagentes possível, buscando a rota mais eficiente e com menor geração de resíduos. A separação dos resíduos foi realizada entre sólidos e líquidos, sendo os líquidos separados em: orgânico e aquoso. Os resíduos foram encaminhados para o descarte adequado pela empresa responsável pelos resíduos químicos do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

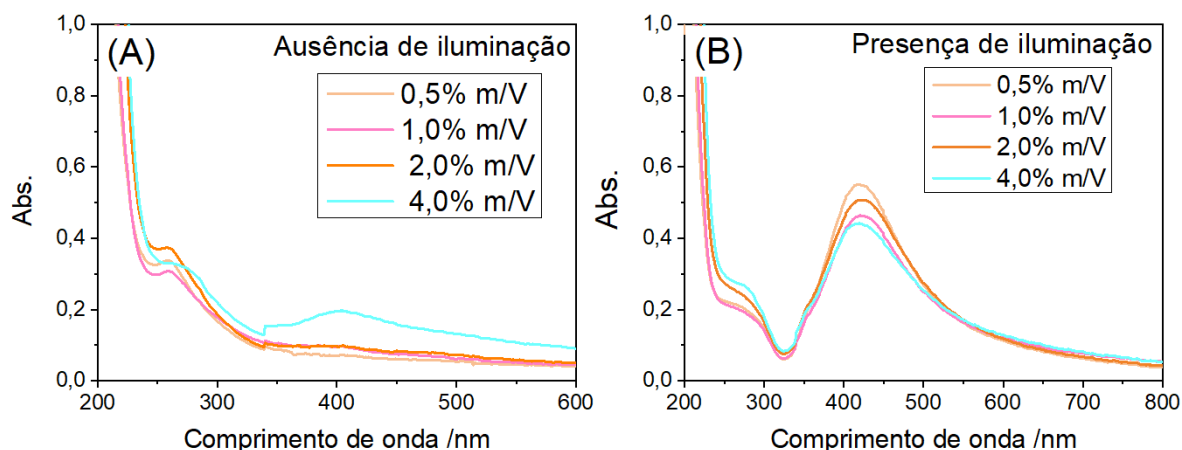
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 NANOFORMULAÇÕES

5.1.1 Caracterização das nanoformulações Pluronic®F-127/RB/AgNPs

Inicialmente avaliou-se os perfis espectrais de absorção eletrônica obtidos para as AgNPs formadas e estabilizadas pelas nanoestruturas micelares, conforme a Figura 11. Em viés de comparação os espectros de absorção eletrônica das amostras sem a exposição ao LED de comprimento de onda UV (espectro de emissão no Anexo M) estão elencados também.

Figura 11. Espectros de absorção eletrônica obtidos para sistemas nanoestruturados em diferentes porcentagens (m/V) do copolímero F-127 contendo AgNPs incorporadas **(A)** na ausência de iluminação e **(B)** na presença de iluminação com o LED UV.



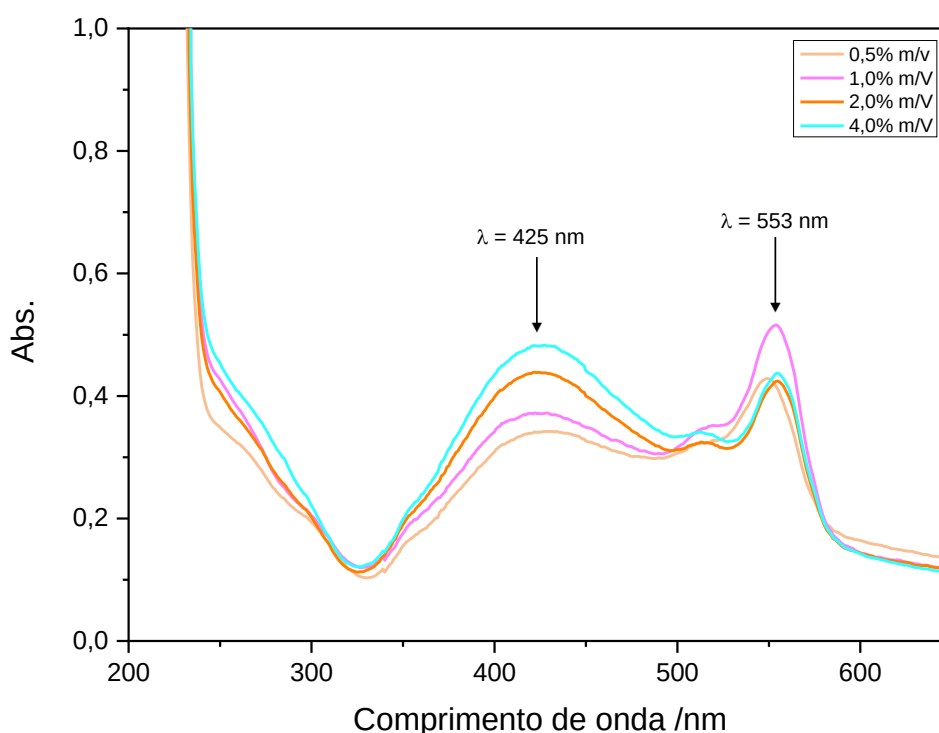
Primeiramente, observa-se na Figura 11 que na ausência de iluminação, apenas para a maior concentração de F-127 houve o surgimento de uma discreta banda de absorção plasmônica na região de 400 nm atribuída à presença de AgNPs. Contudo, na Figura 11B, mediante após a iluminação em todas as concentrações de F-127, nota-se o aparecimento de uma intensa banda de absorção com comprimento de onda máximo em 418 nm indicando a eficiente formação das AgNPs.

Vale ressaltar que as nanopartículas metálicas foram reduzidas pelo próprio copolímero tribloco e pela fotoativação do LED de emissão na região UV, dispensando assim a utilização de agentes redutores adicionais, muitas vezes tóxicos para o tipo de aplicação almejada.^{14,61} Além disso, a comparação entre as diferentes concentrações empregadas do copolímero tribloco deixa claro que o melhor resultado, ou seja, aquele onde a banda de absorção aparece com maior intensidade, foi obtido

na concentração de 0,50% m/V. Vale destacar que essas amostras foram preparadas pelo menos por três vezes, ou seja, três lotes distintos, e em todos eles os perfis de intensidade foram mantidos. Nota-se ainda que apesar das intensidades não diferirem tão significativamente, o fato dos melhores resultados ocorrerem em menor concentração do Pluronic® implica em uma economia atômica.

Com o sucesso na síntese das AgNPs, fez-se a incorporação da RB pelo método passivo (após a etapa de iluminação) e novamente os espectros de absorção eletrônica foram obtidos, neles é possível observar dois picos, um com λ_{max} próximo a 425 nm referente à absorção plasmônica das AgNPs e outro em 553 nm referente à absorção eletrônica da RB. Os mesmos estão apresentados na Figura 12.

Figura 12. Espectros de absorção eletrônica obtidos para sistemas nanoestruturados em diferentes porcentagens (m/V) do copolímero F-127 contendo AgNPs incorporadas e Rosa de Bengala.



Na presença da RB os perfis apesar de semelhantes, revelam algumas diferenças em relação aos espectros observados na Figura 11B. Nesse caso existe um aumento contínuo da intensidade de absorção com a concentração do Pluronic®. No entanto, o mesmo não ocorre com a banda de absorção da RB. Ademais, o espalhamento na região do UV nos fornece indícios de que na maior concentração de

Pluronic® existem partículas maiores, semelhante à Figura 11B. De todo modo, em todos os casos foram obtidas AgNPs com eficiência. Além disso, os resultados indicam a eficiente incorporação da RB dado discreto deslocamento batocrômico em seu λ_{max} (de 549 nm em água pH 7,4)⁷³ para o ambiente micelar (553 nm).

As amostras foram ainda caracterizadas por DLS, visto que, em solução aquosa os copolímeros tribloco são capazes de formar nanoestruturas micelares, acima de uma dada concentração em determinadas temperaturas. Nas Tabela 3, Tabela 4 e Tabela 5 estão elencados os resultados de diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta das amostras nas diferentes concentrações de copolímero F-127.

Tabela 3. Resultados de diâmetro hidrodinâmico (D_H), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (ζ), respectivamente, das amostras de F-127/AgNPs sem LED.

Concentração de Pluronic®F-127	D_H / nm $\pm$ DP	PDI $\pm$ DP	ζ / mV.cm ⁻²
0,50 % m/V	182,5 $\pm$ 16,0	0,276 $\pm$ 0,017	-2,01 $\pm$ 0,09
1,00 % m/V	187,4 $\pm$ 2,35	0,204 $\pm$ 0,023	-1,73 $\pm$ 0,33
2,00 % m/V	173,7 $\pm$ 11,9	0,377 $\pm$ 0,018	-1,22 $\pm$ 0,12
4,00 % m/V	313,3 $\pm$ 9,38	0,464 $\pm$ 0,018	-1,09 $\pm$ 0,45

Tabela 4. Resultados de diâmetro hidrodinâmico (D_H), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (ζ), respectivamente, das amostras de F-127/AgNPs com LED.

Concentração de Pluronic®F-127	D_H / nm $\pm$ DP	PDI $\pm$ DP	ζ / mV.cm ⁻²
0,50 % m/V	125,0 $\pm$ 0,58	0,185 $\pm$ 0,009	-2,10 $\pm$ 0,11
1,00 % m/V	129,1 $\pm$ 0,93	0,225 $\pm$ 0,007	-1,92 $\pm$ 0,35
2,00 % m/V	127,5 $\pm$ 1,75	0,273 $\pm$ 0,003	-1,73 $\pm$ 0,30
4,00 % m/V	146,4 $\pm$ 3,70	0,297 $\pm$ 0,032	-1,18 $\pm$ 0,47

Tabela 5. Resultados de diâmetro hidrodinâmico (D_H), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (ζ), respectivamente, das amostras de F-127/AgNPs/RB com LED.

Concentração de Pluronic®F-127	D_H / nm $\pm$ DP	PDI $\pm$ DP	ζ / mV.cm ⁻²
0,50 % m/V	124,9 $\pm$ 1,61	0,186 $\pm$ 0,012	-8,69 $\pm$ 0,16
1,00 % m/V	126,6 $\pm$ 0,99	0,215 $\pm$ 0,009	-8,98 $\pm$ 0,12
2,00 % m/V	131,8 $\pm$ 1,94	0,252 $\pm$ 0,006	-5,99 $\pm$ 0,38
4,00 % m/V	155,3 $\pm$ 1,64	0,272 $\pm$ 0,008	-6,74 $\pm$ 0,83

Comparando os dados elencados nas Tabela 3 e Tabela 4 é possível notar que houve uma diminuição no diâmetro hidrodinâmico e no índice de polidispersão quando

as amostras foram expostas ao LED, fato que vai de encontro com os espectros de absorção apresentados na Figura 11A e 11B (redução do espalhamento na região do UV). Ainda, na Tabela 5, onde o fotossensibilizador é incorporado ao sistema é possível notar que, com o aumento da concentração de F-127, ocorre um aumento do diâmetro hidrodinâmico e no índice de polidispersão do copolímero. O potencial zeta se mantém negativo e muito próximo a zero em todas as amostras, fato que ocorre devido a presença de grupos polietileno do copolímero na superfície externa da micela. Vale destacar que os valores de potencial zeta na faixa de $-30/+30$ mV apresentam maior estabilidade em dispersão aquosa inibindo a ocorrência dos processos de auto-agregação reversíveis e irreversíveis característicos de sistemas coloidais devido aos efeitos repulsivos.⁷⁴ Contudo, para além da estabilização eletrostática, existe ainda a estabilização estérica, possibilitando que partículas com potenciais de superfície próximos a zero possam se manter estáveis por longos períodos. No caso das micelas de F-127, a estabilidade pode ser associada à presença dos grupos hidrofílicos PEO em sua corona.⁷⁵

Com relação ao potencial zeta das micelas incorporadas com FS, nota-se que a incorporação da RB, molécula volumosa e negativamente carregada em pH fisiológico, tornou o potencial zeta mais negativo do que os das formulações sem o FS. Este efeito pode estar atribuído à alteração da atmosfera iônica ao redor das micelas em decorrência da incorporação de um fármaco dianiônico.⁵⁹

Com base no conjunto de resultados discutidos acima é possível afirmar que a síntese das AgNPs foi bem-sucedida para as diferentes concentrações de F-127, sendo a 0,5% m/V e 2,0% m/V as formulações a apresentarem os melhores parâmetros eletrônicos e estruturais. Vale destacar que a redução das AgNPs está associada a um processo de oxirredução envolvendo os oxigênios existentes nos grupos éteres do copolímero, já reportado na literatura.⁶¹

5.1.2 Estabilidade das nanoformulações Pluronic®F-127/RB/AgNPs

Outro importante efeito a ser avaliado é a estabilidade das nanoformulações com a variação de temperatura, pois as amostras são preparadas, armazenadas e aplicadas em diferentes condições de temperatura. Assim, tanto a estrutura das micelas como a sua interação com os possíveis fármacos deve ser mantida. A análise de estabilidade térmica das amostras também buscou verificar possíveis alterações estruturais no tamanho das nanoformulações. Para isso, avaliou-se o diâmetro hidrodinâmico em

diferentes condições de temperatura na ausência e presença do FS. Os resultados são apresentados nas Figura 13 e Figura 14.

Figura 13. Efeito da variação de temperatura no perfil de espalhamento de luz dinâmico (DLS) das nanoformulações na ausência do FS; **(A)** 0,50% m/V F-127; **(B)** 1,00% m/V F-127; **(C)** 2,00% m/V F-127; **(D)** 4,00% m/V F-127.

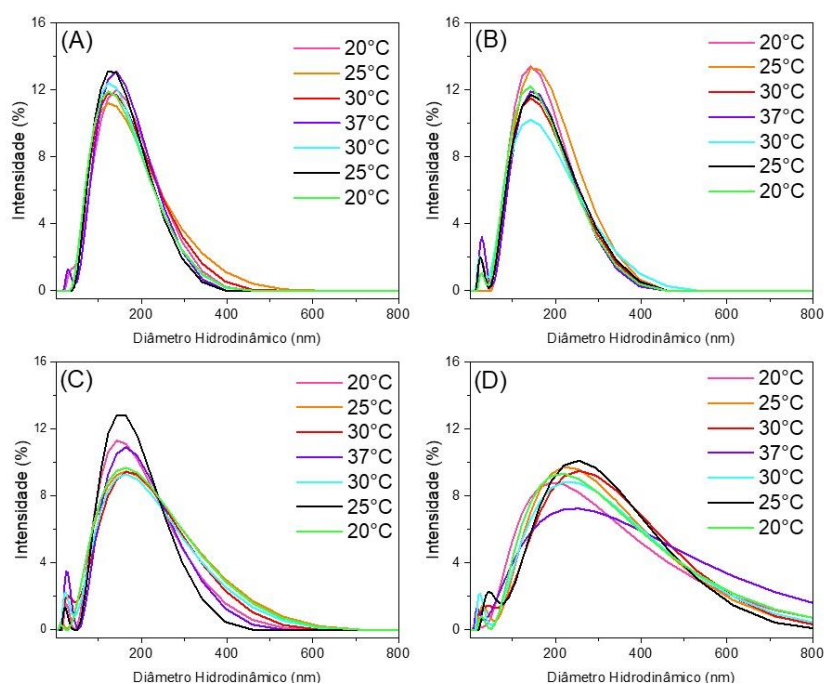
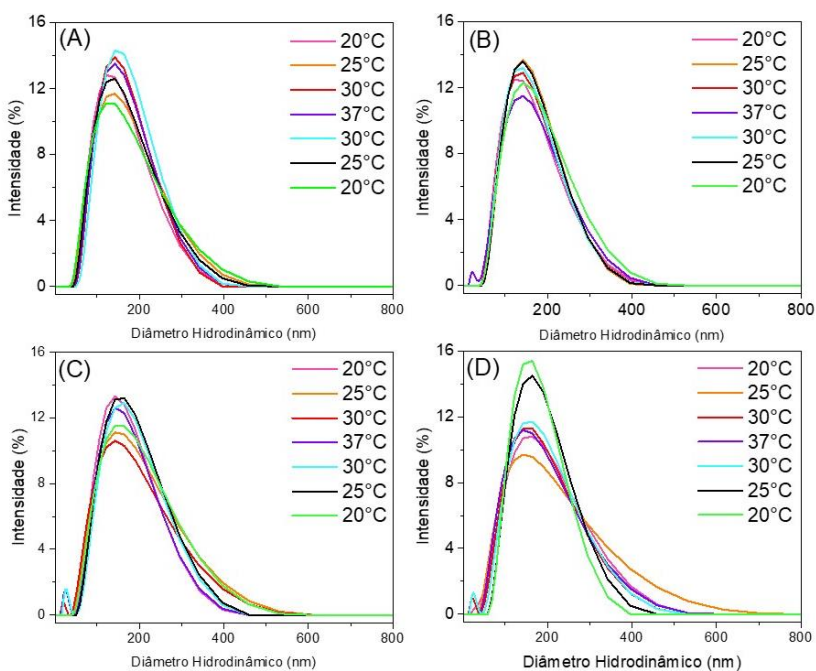


Figura 14. Efeito da variação de temperatura no perfil de espalhamento de luz dinâmico (DLS) das nanoformulações na presença do FS; **(A)** 0,50% m/V F-127; **(B)** 1,00% m/V F-127; **(C)** 2,00% m/V F-127; **(D)** 4,00% m/V F-127.

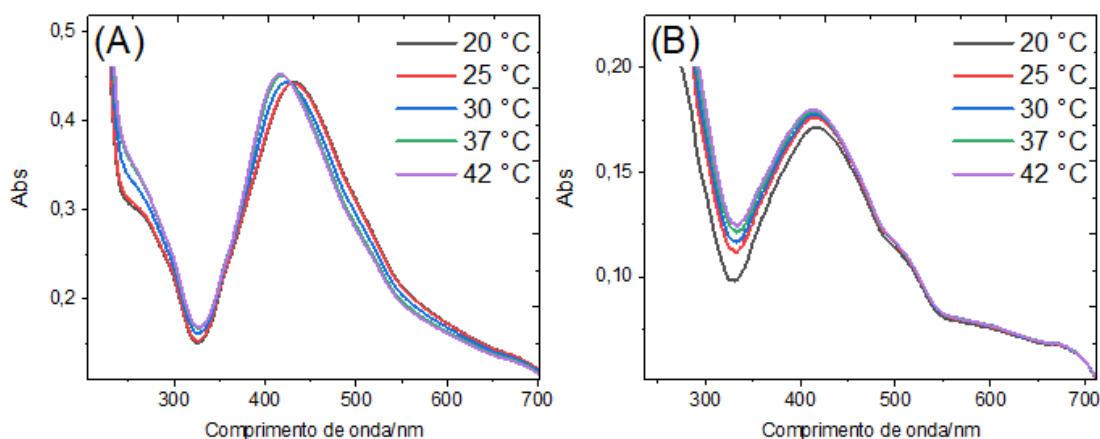


É possível observar nas Figura 13 e Figura 14 que o aumento da temperatura ocasiona alterações no perfil de intensidade de distribuição das partículas presentes no meio. Contudo, em termos de diâmetro hidrodinâmico médio e PDI, não são observadas alterações significativas nas nanoformulações. Além disso, o aumento de temperatura entre 20 e 37 °C e sua subsequente redução de 37 a 20 °C mostra um perfil com certa reversibilidade. Dessa maneira, as alterações observadas no espalhamento de luz estão provavelmente associadas aos diferentes graus de hidratação da corona hidrofílica da micela mediante as mudanças de temperatura, conforme relatado na literatura.⁷⁵

Uma observação importante refere-se ao aparecimento de uma população com intensidade abaixo de 10 nm, possivelmente referente à parcela de AgNPs que não se encontra incorporada nas micelas. Nota-se que essa população é mais intensa nas micelas na ausência da RB, indicando que de alguma maneira a presença da RB contribui para a incorporação das AgNPs na estrutura micelar. Uma das hipóteses refere-se à atração eletrostática existente entre a Ag^+ e o FS dianiônico. Nesse cenário, é fundamental avaliar se a variação de temperatura pode, de alguma maneira, afetar a estrutura das nanopartículas metálicas presentes.

Assim, com a análise dos espectros de absorção plasmônica, foi possível comprovar a estabilidade das formulações nas diferentes temperaturas avaliadas, para todas as concentrações do copolímero F-127, na Figura 15 representados pela menor e maior concentrações utilizadas. Vale ressaltar que a concentração que apresentou os melhores parâmetros de estabilidade tanto nas análises de DLS como na absorção eletrônica foi a 0,5% m/V.

Figura 15. Efeito da variação de temperatura no espectro de absorção eletrônica das nanoformulações F-127/AgNPs; **(A)** 0,50% m/V F-127 e **(B)** 4,00% m/V F-127.



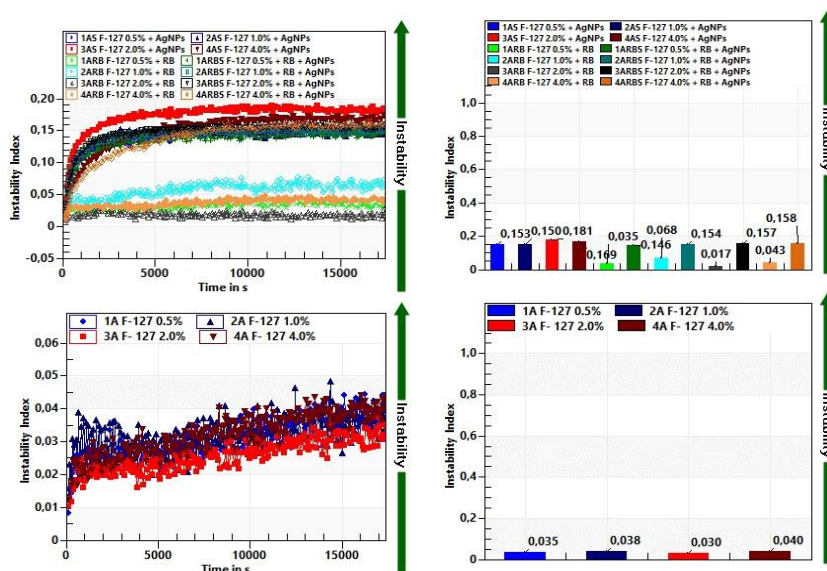
Um outro aspecto que será investigado futuramente é se a variação de temperatura pode influenciar na taxa de carregamento da RB pelas micelas. Pretende-se realizar os estudos monitorando-se as amostras mediante a variação de temperatura tanto por absorção eletrônica como por emissão de fluorescência.

5.1.3 LumiSizer®

As estabilidades das nanoformulações de F-127/RB/AgNPs foi avaliada ainda por meio do LumiSizer®. Esta técnica utiliza a tecnologia STEP-Technology (Space and Time-resolved Extinction Profiles), que combina a centrifugação com a detecção óptica para medir a sedimentação ou *creaming* das partículas em uma suspensão. Durante a análise as amostras são submetidas a um campo centrífugo controlado, a força centrífuga acelera a separação das partículas da fase líquida. Um feixe de luz atravessa a amostra e o detector mede a transmissão. Através da extinção da luz ao longo de determinada altura da célula em intervalos de tempo específicos o LumiSizer® monitora os chamados perfis de extinção, que estão relacionados com a concentração e tamanho das partículas.⁷⁶

Neste contexto, os primeiros dados elencados são os referentes ao índice de instabilidade das amostras. O índice de instabilidade é uma medida quantitativa utilizada para avaliar a estabilidade. Esta medida varia entre 0 e 1 sendo que, quanto mais próximo do 1, mais instável é a suspensão. Assim, na Figura 16, estão os gráficos contendo o comportamento das amostras ao longo do tempo e os valores de índice de instabilidade.

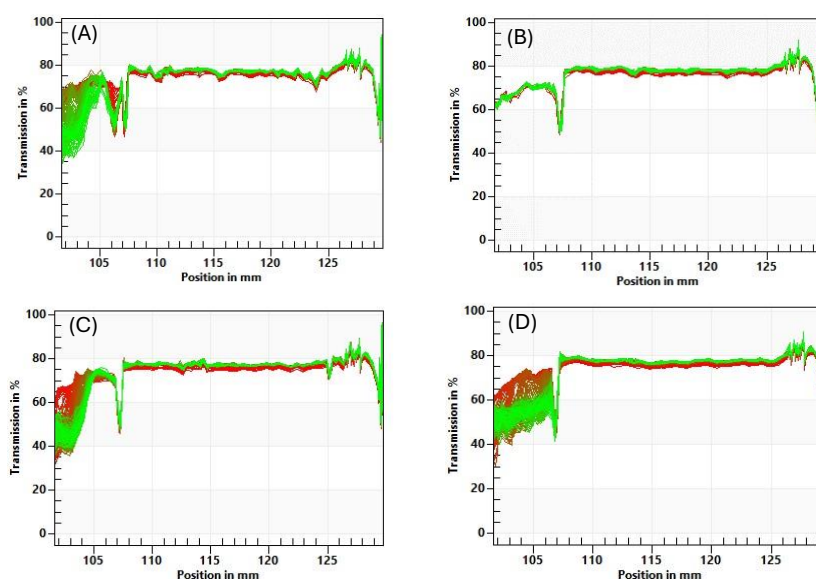
Figura 16. Gráficos de índice de instabilidade obtidos através do LumiSizer®.



A análise dos dados apresentados na Figura 16 mostra que as amostras contendo somente o F-127 demonstraram maior estabilidade. No entanto, à medida que a concentração de polímero aumenta, a instabilidade do sistema também se eleva. Esta tendência pode ser atribuída à agregação das micelas (mudança de fase) em concentrações mais elevadas.⁷⁷ As amostras que continham somente o F-127 e as AgNPs apresentaram a maior instabilidade. Em contraste, as formulações completas (F-127/RB/AgNPs) exibiram índices de instabilidade menores do que aquelas contendo apenas as nanopartículas metálicas em F-127. Portanto, observa-se que a incorporação RB aumenta a estabilidade do sistema.

Outro dado obtido a partir desta análise são os gráficos de integração onde o percentual de transmissão da luz NIR em função do tempo e da posição da amostra na cubeta é definida. Na Figura 17 estão os gráficos de integração das nanoformulações completas nas quatro diferentes concentrações de F-127. O início do teste é indicado pelas curvas vermelhas e o final do teste pelas curvas verdes.⁷⁶ Como pode ser observado na Figura 17 não houve diferença significativa entre o perfil inicial e o perfil final, ou seja, nenhum tipo de fenômeno de instabilidade física nas suspensões pode ser observado. Segundo Liu *et al.*⁷⁸, quanto maiores as mudanças de transmitância observadas com a centrifugação, durante o período do teste, mais instáveis são os sistemas analisados. Neste sentido, as formulações se mostraram bastante estáveis, por apresentarem pequena mudança na transmitância durante o teste.

Figura 17. Gráficos de integração das amostras de F-127/RB/AgNPs sendo [F-127]: **(A)** 0,5% m/V **(B)** 1,0% m/V **(C)** 2,0% m/V e **(D)** 4,0% m/V.



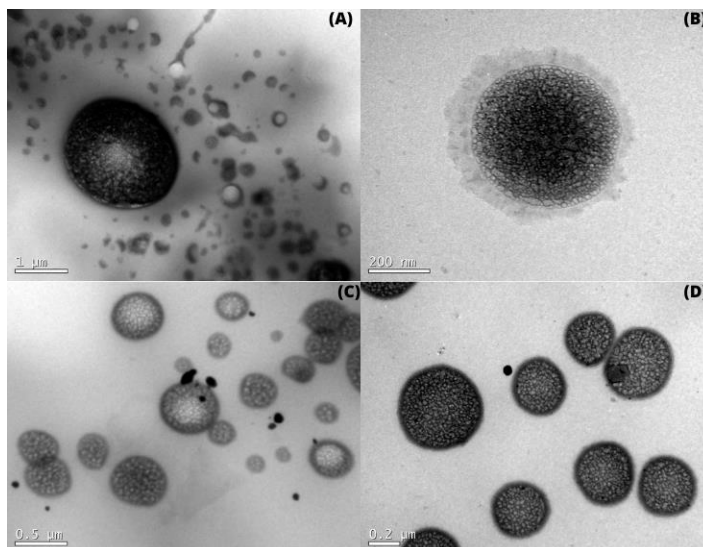
Por fim, a estimativa do tempo de prateleira das formulações pode ser obtida relacionando a desestabilização das mesmas ao tempo de ensaio.⁷⁶ Portanto, o tempo de ensaio é um fator determinante para definir a validade dessas formulações. Neste estudo, o tempo de ensaio estabelecido correspondeu a seis meses de prateleira. Contudo, como não houve desestabilização das formulações durante o período de ensaio pode-se afirmar que a formulação possui, no mínimo, seis meses de estabilidade em prateleira.

5.1.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão – TEM

A morfologia das micelas de F-127 e das AgNPs também foi avaliada. Apesar da dificuldade de se obter microscopias eletrônicas de transmissão para amostras poliméricas, observou-se um core mais escuro e uma corona mais clara (Figura 18). Além disso, as AgNPs estão, em sua grande maioria, próximas a estrutura micelar, o que corrobora com a afirmação de que o copolímero estaria agindo como agente redutor e estabilizante para as nanopartículas. A partir dos controles é possível observar que, quando há a incorporação da RB, um sombreado surge na borda das micelas, o que vai de encontro com a literatura já que este FS é hidrofílico.⁵¹

Na Figura 18 ainda é possível observar que, quando avaliar que a formulação (AgNPs/RB/F-127), o sistema apresenta maior uniformidade e definição, Figura 18D. Além disso, como destacado nas análises de DLS, existem AgNPs incorporadas e também livres da estrutura micelar. Ademais, na amostra contendo RB parece haver de fato uma maior concentração de AgNPs incorporada nas micelas. Assim, dependendo do tipo de aplicação almejada, é importante que as AgNPs estejam incorporadas, aplicações parenterais. Contudo, em aplicações cutâneas, a presença de AgNPs livres não é um entrave.

Figura 18. Micrografias de TEM das nanoformulações; **(A)** 0,5% m/V F-127; **(B)** 0,5% m/V F-127 / RB; **(C)** 0,5% m/V F-127 / AgNPs; **(D)** 0,5% m/V F-127 / RB / AgNPs.



Por fim, vale destacar que os tamanhos micelares e das AgNPs não estão de acordo com o observado por espalhamento de luz dinâmico. Isso ocorre pois a integridade das micelas, compostas exclusivamente por polímero, provavelmente é degradada quando exposta ao feixe de elétrons. Para contornar essa problemática, a técnica de criomicroscopia eletrônica de transmissão (Cryo-TEM) permitirá imagens adequadas dos sistemas para avaliação da morfologia.

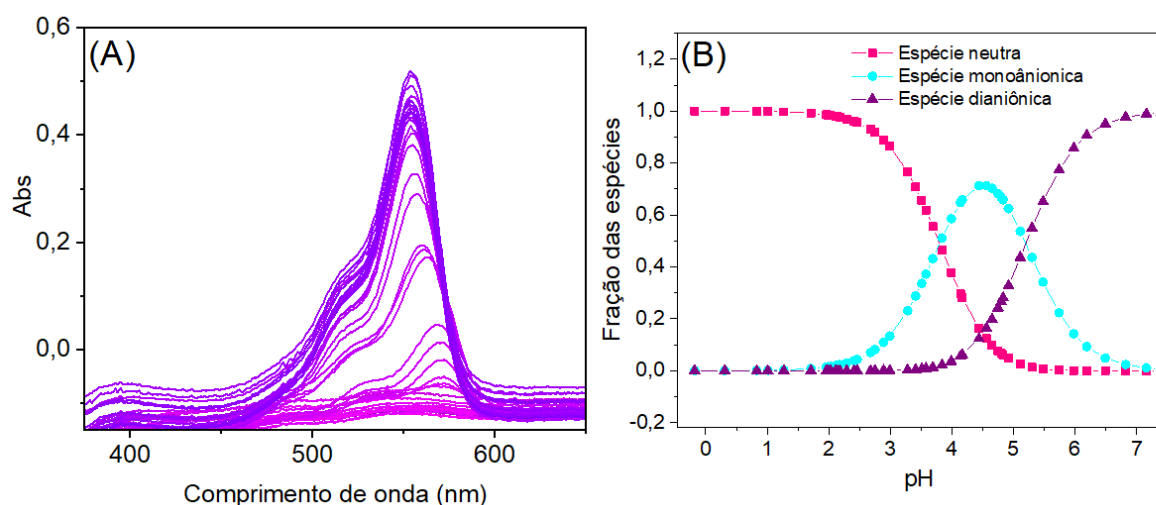
5.1.5 Estudo multivariado de pKa da Rosa de Bengala

Para a determinação das espécies protolíticas predominantes no sistema em diferentes condições de pH, estudos de pKa foram realizados. Um grande conjunto de dados referente aos 40 valores de pH em faixa de 2,0 – 10,0 foi gerado e, para análise dos mesmos, a quimiometria foi aplicada. A metodologia quimiométrica permite a avaliação das absorvâncias em vários comprimentos de onda simultaneamente, ou seja, é realizada uma análise multivariada do conjunto de absorvâncias (espectros) obtido em cada solução, no seu respectivo pH, através da ACP e do método do Q de Imbrie.⁶⁴

Com esta finalidade um conjunto de aplicativos MASDA (Multivariate Analysis of Spectroscopic Data) foi empregado para realização dos cálculos quimiométricos.⁶⁴ O MASDA é um conjunto computacional constituído por quatro aplicativos, escritos em linguagem Fortran, autoexecutáveis que processam os dados individualmente. O primeiro dos aplicativos que deve ser executado é o UV, que organiza todos os espectros na forma matricial. Em seguida, o aplicativo FATOR calcula a matriz de

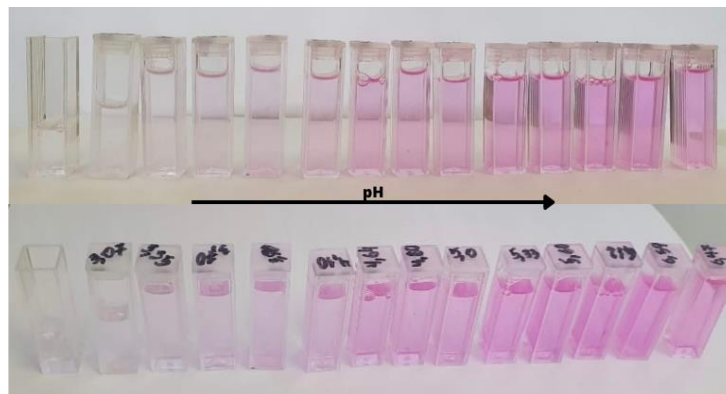
associação, aplicando o método Q de Imbrie. Esses dados são submetidos à rotação varimax e rotação oblíqua usando o terceiro aplicativo, o ROTAÇÃO, a partir do qual obtém-se as concentrações relativas das espécies protolíticas. Por fim, o uso do MATK1 fornece os espectros das espécies puras.⁶⁴ Dessa forma, na Figura 19, os dados de pKa estão elencados.

Figura 19. (A) Espectros de absorção eletrônica da RB em diferentes pH e (B) frações das espécies protolíticas da RB em diversos pH.



Na Figura 19 é possível notar que a RB possui dois equilíbrios protolíticos, definindo assim dois valores de pKa sendo eles 3,8 e 5,2. O primeiro equilíbrio ($pK_{a2} = 3,8$) refere-se ao equilíbrio entre as espécies neutra e monoaniônica. O segundo equilíbrio ($pK_{a3} = 5,2$) refere-se ao equilíbrio entre as espécies monoaniônica e dianiônica. O pK_{a1} refere-se ao equilíbrio entre as formas catiônica e neutra. Em meio aquoso, o equilíbrio entre as formas neutra e catiônica ocorre em um pH em torno de -2,0 (escala de Hammett), não avaliado no presente estudo. A espécie protolítica predominante no sistema é a diânionica, justamente a que apresenta maior absorvidade molar e, portanto, melhores parâmetros fotofísicos para aplicação na TFD. Ainda, na Figura 20, algumas das amostras analisadas são colocadas em ordem para efeito de comparação.

Figura 20. Soluções de F-127 0,5% m/V com Rosa de Bengala ($5 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹) em diferentes valores de pH.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Na Figura 20 nota-se que, em valores de pH mais baixos a RB não se apresenta em sua cor característica, isso ocorre pois o tautômero predominante no sistema é a forma lactona (NE) e com a formação desta espécie a ressonância do anel xantênico é quebrada devido à hibridização sp^3 do carbono de ligação entre os anéis xantêmicos e benzênico, tornando a solução incolor.⁵⁰

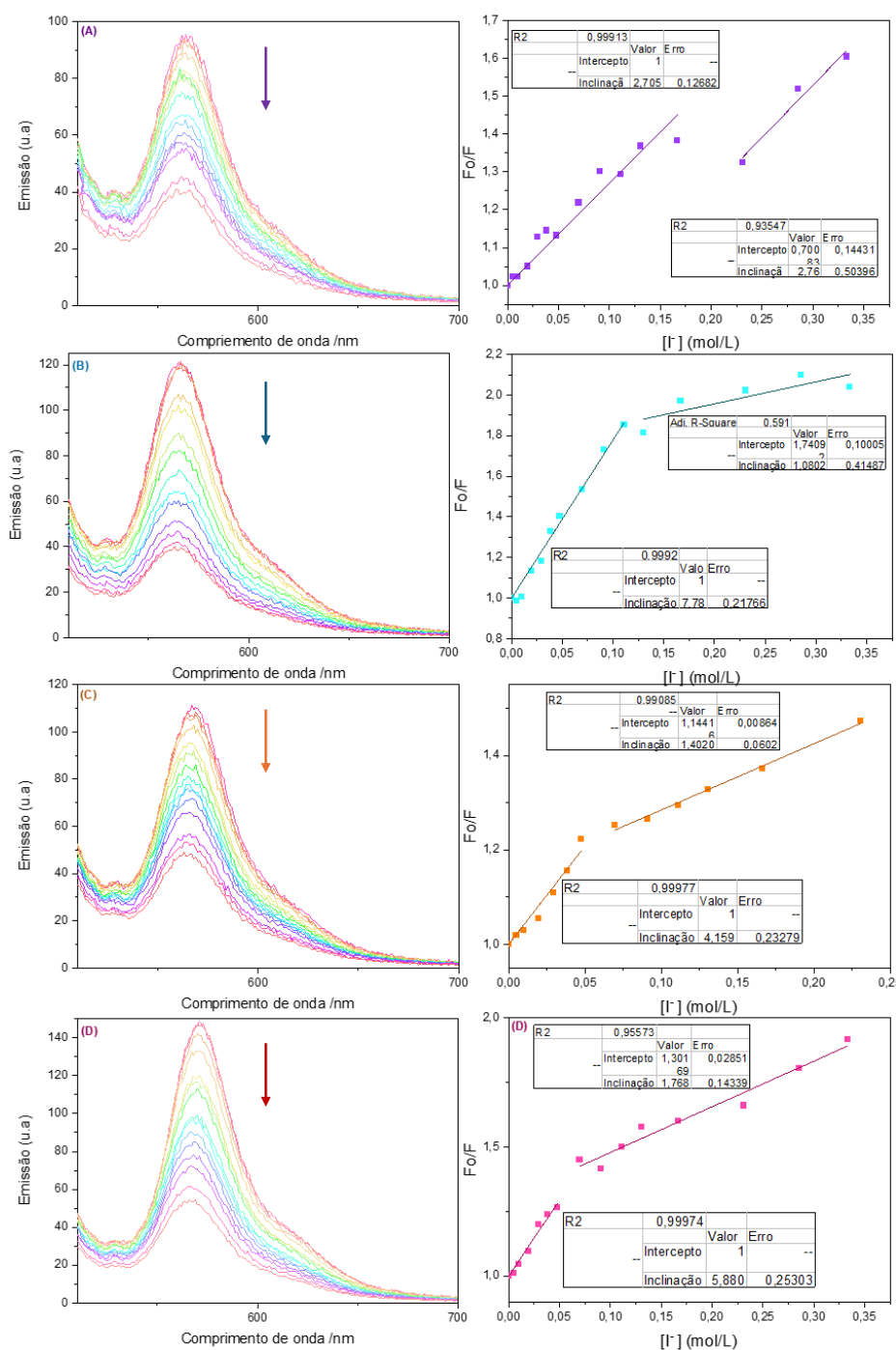
A presença do tautômero lactona em predominância para a espécie neutra está de acordo com a literatura. Inclusive, existe um aspecto peculiar dos corantes xantenos em ambientes apróticos e de baixa polaridade, como o interior da micela, que é a inversão dos valores de pK_a .⁷⁹ Naturalmente, em meio aquoso, o pK_a associado ao equilíbrio carboxílico/carboxilato (pK_aCOOH) ocorre em pH mais ácido do que o equilíbrio entre fenol/fenolato (pK_aOH), logo $pK_aOH > pK_aCOOH$. Contudo, a incorporação da RB na estrutura micelar aprótica de baixa polaridade acarreta em uma pobre solvatação do grupo benzóico dentro da micela, o que tem um efeito desestabilizador nesse grupo protolítico. Em contraste, a carga do fenolato estará em ressonância por todo o anel de xanteno, favorecendo a sua desprotonação. Por esses resultados, a inversão de pK_a fornece uma evidência clara de que o corante está interagindo/incorporado com a estrutura micelar.⁸⁰

5.1.6 Estudo de supressão de fluorescência com ajuste de Stern-Volmer (K_{sv})

A localização do FS nas nanoestruturas micelares pode ser estimada através da técnica de supressão de fluorescência onde o íon iodeto é empregado como agente supressor aquo-solúvel.⁶⁵ Moléculas localizadas mais externamente nas micelas são mais suscetíveis a sofrerem colisões com os íons iodeto, levando à desativação de seu estado excitado. No entanto, moléculas alocadas mais internamente nas micelas,

no core hidrofóbico, são protegidas dos agentes supressores aquo-solúveis. Assim, a utilização deste agente permite discriminar fluoróforos localizados internamente e externamente no sistema micelar nanoestruturado. Os espectros de emissão dos xantenos mediante adição de íon iodeto encontram-se na Figura 21.

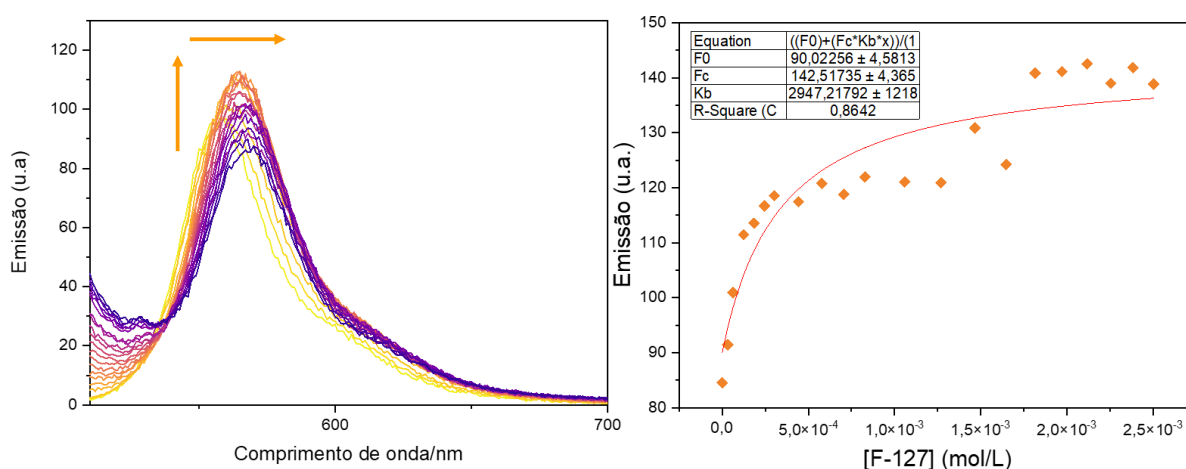
Figura 21. Espectros de emissão de fluorescência para a Rosa de Bengala em micelas copoliméricas de F-127 com a adição de iodeto. [F-127] = **(A)** 0,5%, **(B)** 1,0%, **(C)** 2,0% e **(D)** 4,0% m/V; [RB] = $5 \cdot 10^{-6}$ mol/L; [AgNO₃] = $5 \cdot 10^{-4}$ mol/L e λ_{exc} = 490 nm.



5.1.7 Constante de ligação (Kb)

Os parâmetros de ligação da RB com o copolímero tribloco foram avaliados monitorando-se a variação da intensidade de emissão de fluorescência da RB à medida em que era realizada a titulação com uma solução 8,0% m/V de F-127. As variações na intensidade do espectro de emissão, bem como as isotermas de ligação obtidas para este sistema são mostradas na Figura 22.

Figura 22. Variação na emissão de fluorescência da RB em função da concentração de F-127 em PBS e isotermas de ligação da RB com o F-127.



Os dados foram ajustados em relação a Equação 2 obtendo a 25°C uma constante de ligação de $2,95 \cdot 10^3 \text{ L mol}^{-1}$. Observando a Figura 22 percebe-se que, a medida que se adiciona copolímero, ocorre um aumento significativo na intensidade de emissão. Além disso, observa-se que o pico de máxima emissão é deslocado em direção ao vermelho (deslocamento batocrômico). Segundo a literatura, esse deslocamento está intrinsicamente relacionado ao particionamento dos corantes xantênicos em ambientes de menor polaridade, tais como o interior das micelas de Pluronic®F-127.⁸¹

Além disso, a localização do FS no interior das micelas acarreta a diminuição das desativações não radiativas ocasionadas por colisões com moléculas de água, um conhecido supressor de estados excitados. Assim, a via de desativação do estado excitado da RB por emissão de fluorescência é favorecida, indo de encontro com os efeitos observados.

5.1.8 Calorimetria Diferencial de Varredura – DSC

A temperatura de transição de fusão do sistema foi analisada a partir da calorimetria diferencial de varredura (DSC). As amostras utilizadas foram previamente liofilizadas, sem a utilização de crioprotetor. Na literatura a temperatura de fusão reportada para o copolímero tribloco é de 51 °C, assim a análise da Figura 23, mostra que a curva do DSC obtida para o F-127 puro vai ao encontro com o valor teórico já que ocorre somente um único evento entre 45,0-60,0 °C.⁸² Para a RB pura um único evento ocorreu entre 33,0-140,0 °C, segundo a literatura a temperatura de fusão da RB é de 325 °C⁸³, assim há uma discrepância entre o valor teórico e o obtido experimentalmente, isso ocorreu pois provavelmente amostra utilizada na análise estava úmida. Neste contexto, análises futuras com a amostra seca por um período de tempo maior serão realizadas.

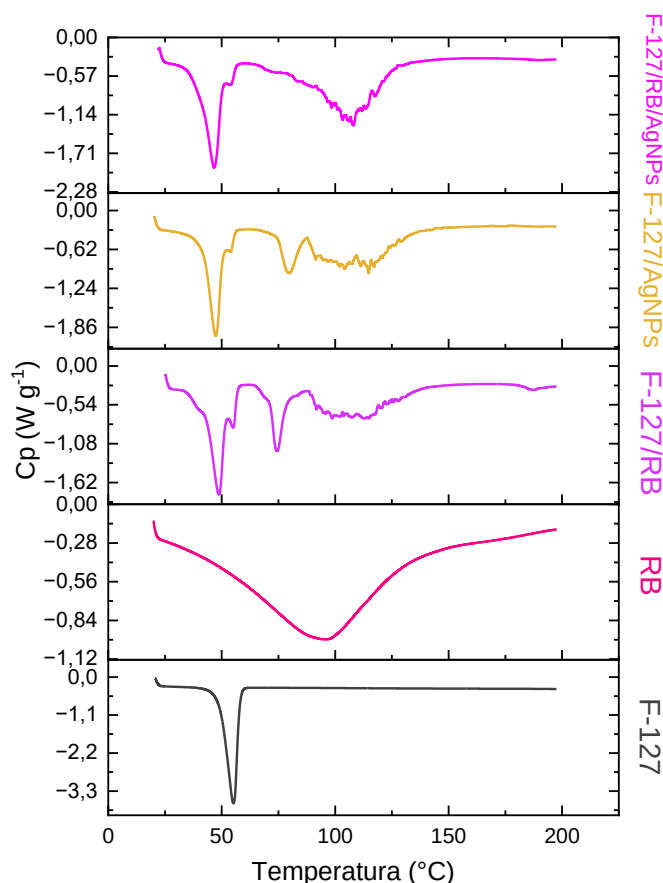
Para a nanoformulação contendo o F-127 e RB verifica-se a presença de dois eventos, um que ocorre inicialmente entre 32,0-58,0 °C e um segundo evento em 65,0-140,0 °C. O primeiro pico é condizente ao copolímero enquanto o segundo pico pode estar associado a RB, por se mostrar alargado indica que há uma interação entre o FS e o F-127.

No caso da amostra contendo F-127 e AgNPs são observados dois eventos, um inicialmente na faixa de 35,0-56,0 °C correspondente ao copolímero e, um segundo evento entre 75,0-135,0 °C. Por fim, a formulação completa, ou seja, contendo o copolímero e os dois ativos, apresentou dois eventos. O primeiro evento entre 35,0-56,0 °C correspondente ao F-127 e um segundo evento entre 67,0-130,0 °C, correspondente a umidade ainda presente na amostra.

Tabela 6. Análises térmicas para as diferentes formulações liofilizadas.

Composição	1ºEvento (°C)	ΔH (J/g)	2ºEvento (°C)	ΔH (J/g)
F-127	45,0 – 60,0	110,6	-	-
Rosa de Bengala	33,0 – 140,0	209,7	-	-
F-127/RB	32,0 – 58,0	74,07	65,0 – 140,0	123,0
F-127/AgNPs	35,0 – 56,0	64,40	75,0 – 135,0	154,9
F-127/RB/AgNPs	35,0 – 56,0	74,61	67,0 – 130,0	138,2

Figura 23. Calorimetria diferencial de varredura (DSC) para **(A)** F-127 **(B)** Rosa de Bengala **(C)** F-127/RB **(D)** F-127/AgNPs e **(E)** F-127/RB/AgNPs.



5.1.9 Cinética de degradação do ácido úrico: Rendimento quântico de oxigênio singlete ($\Phi_{\Delta^1O_2}$)

Para que uma formulação possa ser considerada ideal para aplicação em TFD é necessário a quantificação de 1O_2 gerado pelo sistema. Esta quantificação pode ser realizada diretamente a partir da avaliação da cinética de decaimento fosforescente do oxigênio no infravermelho próximo, em torno de 1270 nm em função do tempo. No entanto, este método requer equipamentos especializados e de difícil acesso.⁶⁸

Uma metodologia alternativa para esta análise é por meio da abordagem indireta, utilizando sondas captadoras ou aceitadoras de oxigênio singlete. Essas sondas reagem com o oxigênio singlete, passando por modificações em suas características espectroscópicas. Na literatura, diversas sondas são frequentemente empregadas, assim é necessário que uma análise prévia seja realizada levando em conta o comprimento de onda de absorção eletrônica de interesse da sonda a ser utilizada, além da solubilidade da mesma.⁶⁷

Neste contexto, a sonda escolhida para a realização dos experimentos foi o ácido úrico (UA), um marcador muito interessante para quantificação do $^1\text{O}_2$. As cinéticas para a interação entre o UA e as formulações, assim como o padrão RB/EtOH, foram acompanhadas por UV-Vis. Como pode-se observar, na presença de luz (LED branco quente, $I = 29,35 \text{ W/m}^2$) ocorre a diminuição da intensidade de absorbância para a RB ($\lambda = 550 \text{ nm}$), assim como para a banda correspondente ao UA, a qual ocorre em 293 nm . A diminuição na intensidade de absorção da RB está associada ao seu processo de fotobranqueamento. No caso do UA, a diminuição da intensidade de absorbância para o comprimento de onda máximo indica a sua interação com o $^1\text{O}_2$. Nas Figura 24, Figura 25 e Figura 26 estão apresentadas as cinéticas das nanoformulações contendo RB e AgNPs na presença de luz para análise da sonda UA.

Figura 24. Cinética na presença de luz para a análise da sonda UA na amostra RB/EtOH.

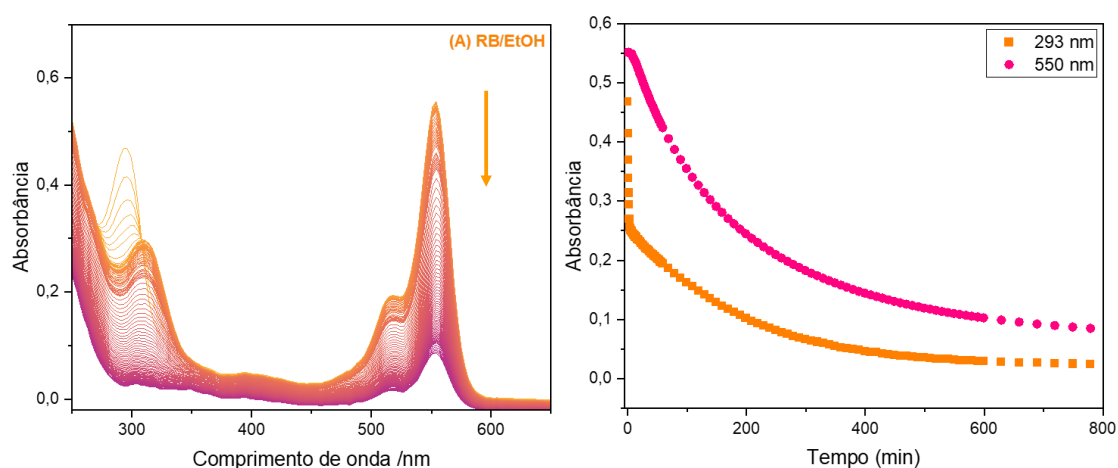


Figura 25. Cinética na presença de luz para análise da sonda UA na amostra RB/F-127.

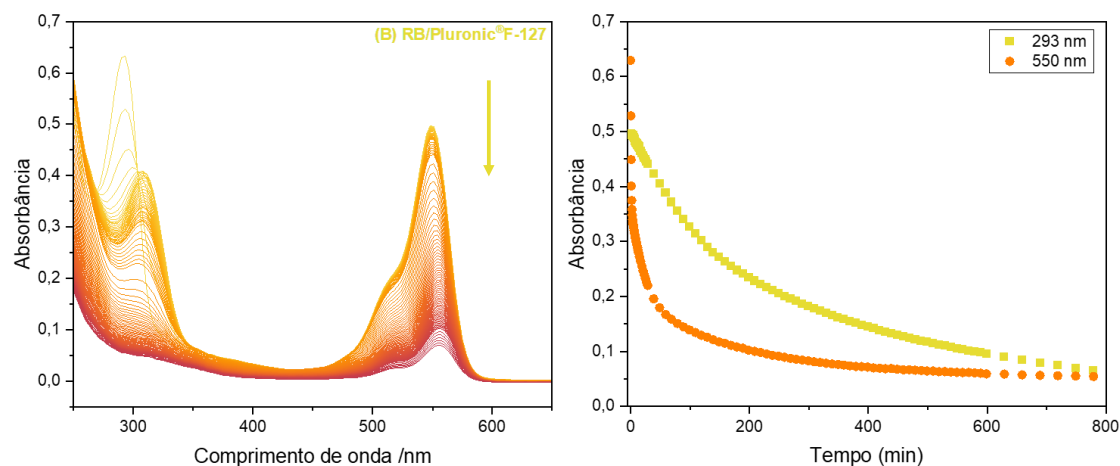
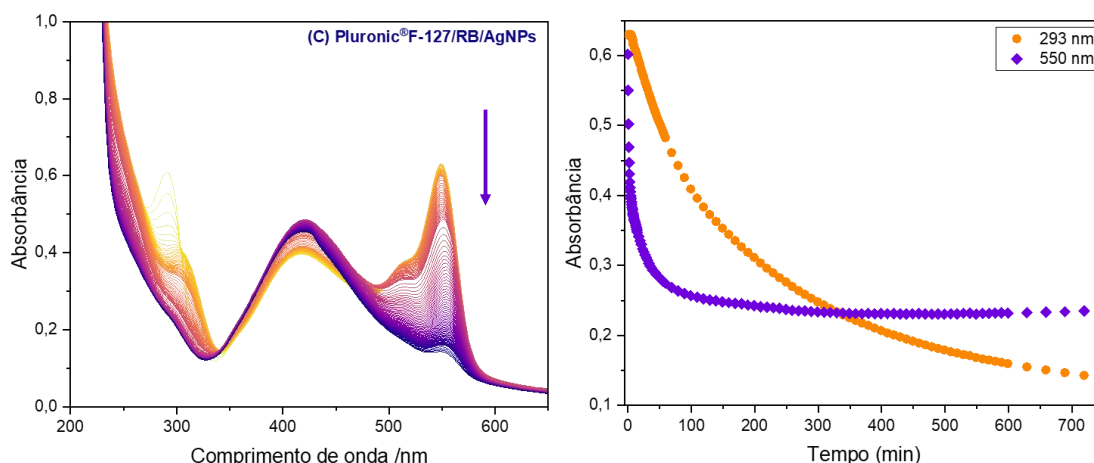


Figura 26. Cinética na presença de luz para análise da sonda UA na amostra RB/AgNPs/F-127.



A eficácia da aplicação das formulações na TFD depende diretamente da geração de oxigênio singleto e, portanto, as constantes de velocidade K_{UA} e K_{RB} foram determinadas e estão apresentadas na Tabela 7. Vale destacar que essas cinéticas serão devidamente reproduzidas a fim de alcançar o infinito na fotodegradação da RB.

Tabela 7. Constantes de velocidade da cinética de degradação do ácido úrico (K_{UA}) e constante de velocidade da cinética de fotobranqueamento da Rosa de Bengala (K_{RB}).

Composição	K_{UA} (10^{-3} min^{-1})	K_{RB} (10^{-3} min^{-1})
RB/EtOH	$6,8 \pm 1,3$	$5,5 \pm 0,1$
RB/0,5% F-127	$35,0 \pm 7,1$	$4,8 \pm 0,2$
0,5% F-127/RB/AgNPs	$49,0 \pm 7,2$	$5,8 \pm 0,2$

Como esperado, a RB em EtOH apresentou uma constante de velocidade bem menor dentre os sistemas analisados. Isto ocorre pois, como mostra o K_{RB} , com a iluminação a RB sofre fotodegradação rapidamente, gerando produtos que são menos eficazes para a produção de 1O_2 . A incorporação da RB em sistemas de *drug delivery* como o F-127 faz com que a constante de velocidade da mesma diminua, isso ocorre pois os processos de fotobranqueamento são minimizados já que as micelas protegem o FS. Neste contexto, para a amostra RB/F-127, a constante de velocidade do UA aumenta, evidenciando assim a maior geração de 1O_2 . Além disso, a incorporação da RB na estrutura micelar diminui a desativação não radiativa, protegendo o FS das moléculas de água, moléculas supressoras.

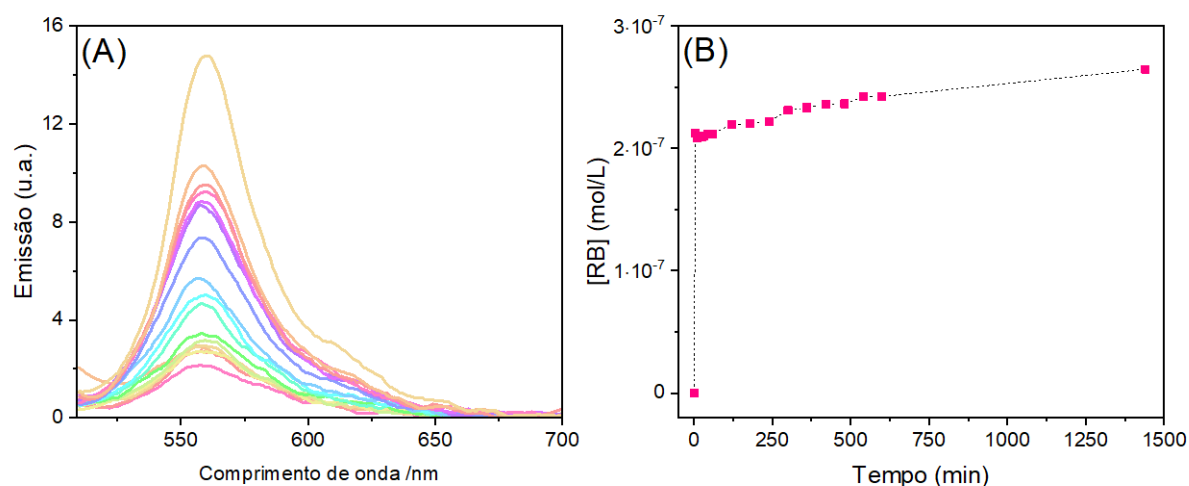
Por fim, a combinação AgNPs-RB mostra um considerável incremento quando comparado ao sistema micelar contendo apenas RB. Isto é associado ao efeito

ME¹O₂, “*Metal Enhanced Singlet Oxygen Effect*”. Este efeito é observado quando a energia da excitação da ressonância plasmônica da nanopartícula metálica é semelhante à diferença entre a energia de orbitais HOMO-LUMO do FS. Neste contexto, o valor da constante cinética do UA para a amostra RB/AgNPs/F-127 é a maior, o que vai ao encontro com a hipótese do estudo.

5.1.10 Liberação *in vitro*

O perfil de liberação da nanoformulação contendo 0,5% F-127/RB/AgNPs foi avaliado por diálise. O perfil apresentado na Figura 27 evidencia que o sistema liberou FS. O experimento foi realizado durante 24 h e durante este período a concentração de RB liberada foi de $2,65 \cdot 10^{-7}$ mol/L. É possível observar que mesmo com 24 horas de experimento a concentração de RB no meio ainda aumenta, indicando que a liberação total ainda não ocorreu. Para isto, o experimento será repetido por um tempo maior, a fim de analisar estes dados por modelos matemáticos para elucidação de como ocorre esta liberação. Quanto a concentração de AgNPs, serão quantificadas por espectrometria de absorção atômica na Central de Análises do Departamento de Química da UFSC com prévia digestão das AgNPs.

Figura 27. Espectros de emissão de fluorescência referentes aos **(A)** dados de liberação da RB a partir da nanoformulação 0,5% F-127/RB/AgNPs de emissão de fluorescência da RB liberada **(B)** curva de liberação *in vitro* da RB.



5.2 SOLUÇÃO PARA ELETROFIAÇÃO

Tendo como base os resultados obtidos no estudo de interação da RB e AgNPs nas nanoformulações de Pluronic®F-127, optou-se por trabalhar na obtenção das nanofibras com as duas concentrações de F-127 que apresentaram os melhores

resultados em meio micelar. Assim, nos estudos subsequentes, as nanofibras eletrofiadas serão obtidas em duas diferentes concentrações de F-127, sendo elas 0,5 e 2,0% (m/V). A etapa inicial de obtenção das micelas e AgNPs será realizada exatamente da mesma maneira empregada nas nanoformulações, no intuito de se obter as AgNPs devidamente estabilizadas e reduzidas pelo copolímero tribloco.

Um outro aspecto importante a ser destacado relaciona-se à terminologia empregada. De acordo com a Iniciativa Nacional de Nanotecnologia (*National Nanotechnology Initiative* - NNI) dos Estados Unidos, a nanotecnologia é definida como a ciência, engenharia e tecnologia conduzidas em escala nanométrica, que varia de 1 a 100 nanômetros.⁸⁴ No entanto, após uma extensa exploração da literatura nos últimos anos, percebemos que muitas referências utilizam o termo "nanofibra" para diâmetros que variam de alguns nanômetros a micrômetros.^{16,85,86} Portanto, no presente estudo optamos por categorizar nosso material de acordo com essa prática. A seguir são apresentados os dados de caracterização da solução de eletrofiação e na sequência as matrizes eletrofiadas obtidas.

5.2.1 Condutividade

A condutividade da solução para eletrofiação é um parâmetro importante para a obtenção das fibras. Assim, quanto maior seu valor, observa-se a tendência em ausência de defeitos, baixa formação de *beads* e diâmetros reduzidos nas fibras produzidas.²⁹ Dessa forma, a fim de determinar a condutividade, foram realizados ensaios em triplicata para cada uma das amostras das soluções utilizadas na eletrofiação e a média dos resultados estão expostos na Tabela 8.

Tabela 8. Condutividade das soluções utilizadas na eletrofiação.

Amostra	Temperatura (°C)	Condutividade (μS/cm)
PVA	25	17,17
PVA/F-127 0,5%	25	17,34
PVA/F-127 0,5%/Ácido cítrico	25	32,67
PVA/F-127 0,5%/Ácido cítrico/AgNPs	25	37,12
PVA/F-127 0,5%/AgNPs	25	17,10
PVA/F-127 2,0%	25	17,45
PVA/F-127 2,0%/Ácido cítrico	25	33,81
PVA/F-127 2,0%/Ácido cítrico/AgNPs	25	37,66
PVA/F-127 2,0%/AgNPs	25	16,40

Dessa forma, nota-se que as amostras contendo PVA/F-127/Ácido cítrico apresentaram um aumento substancial na condutividade, devido à presença do ácido cítrico na sua forma ionizada. Em meio aquoso, na ausência dos demais componentes pode-se prever cerca de 75% das moléculas na forma monoaniônica e 16% na forma dianiônica. Além disso, observa-se que as soluções contendo prata também apresentaram um aumento na condutividade. Dessa forma, pode-se inferir que mesmo após a iluminação UV, ainda existe uma parcela da prata que não se encontrará na forma reduzida. Esses dados servirão de base para quaisquer adaptações nos parâmetros que sejam necessárias.

5.2.2 Reologia

Os ensaios reológicos avaliam as características e comportamentos das amostras em termos da tensão e viscosidade ao variar a taxa de cisalhamento. Assim as propriedades mecânicas das soluções para eletrofição são analisadas a fim de correlacionar a sua capacidade de eletrofição com a morfologia das fibras obtidas ⁷².

A Figura 28 mostra a curva de tensão de cisalhamento pela taxa de cisalhamento. Já a Figura 29 mostra a viscosidade pela taxa de cisalhamento, sendo evidente que o aumento na taxa de cisalhamento faz com que a viscosidade das amostras diminua.

Figura 28. Reograma de fluxo das soluções a serem eletrofiadas **(A)** PVA/0,5% F-127 **(B)** PVA/0,5% F-127/RB **(C)** PVA/0,5% F-127/AgNPs **(D)** PVA/0,5% F-127/RB/AgNPs **(E)** PVA/2,0% F-127 **(F)** PVA/2,0% F-127/RB **(G)** PVA/2,0% F-127/AgNPs **(H)** PVA/2,0% F-127/RB/AgNPs.

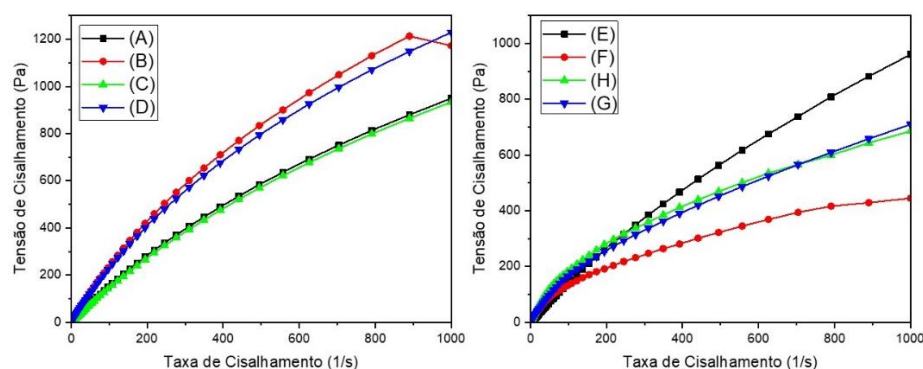
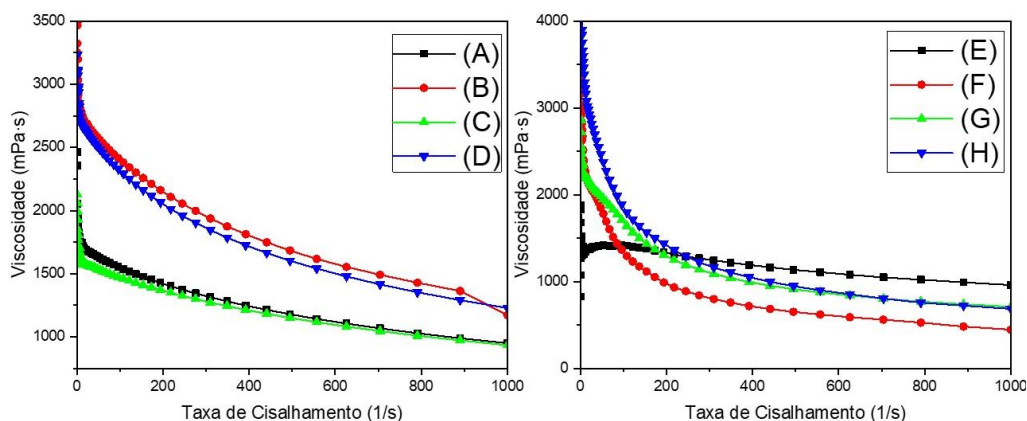


Figura 29. Reograma de viscosidade pela taxa de cisalhamento das soluções a serem eletrofiadas **(A)** PVA/0,5% F-127 **(B)** PVA/0,5% F-127/RB **(C)** PVA/0,5% F-127/AgNPs **(D)** PVA/0,5% F-

127/RB/AgNPs **(E)** PVA/2,0% F-127 **(F)** PVA/2,0% F-127/RB **(G)** PVA/2,0% F-127/AgNPs e **(H)** PVA/2,0% F-127/RB/AgNPs.



Os comportamentos observados nas Figura 28 e Figura 29 são indicadores de um fluido não-newtoniano, uma vez que a viscosidade depende do cisalhamento e tempo aplicado. Assim, a viscosidade é denominada de viscosidade aparente. Ainda, observando-se as curvas convexas na Figura 28, é possível caracterizar as soluções como um fluido pseudoplástico. Esse tipo de fluido apresenta uma diminuição na viscosidade aparente com o aumento da taxa de cisalhamento, fato observado na Figura 29. Assim, o comportamento de pseudoplástico pode ser explicado pelo fato de determinados sistemas poliméricos no estado fundido passarem de uma estrutura altamente enovelada no repouso, para uma altamente orientada na direção do escoamento, assumindo a forma linear e, conseqüentemente, diminuindo sua viscosidade aparente.

Comparando o perfil das amostras analisadas é possível notar que as que continham RB (Figura 29) apresentaram uma maior tensão de cisalhamento e um aumento significativo da viscosidade aparente quando comparada às demais amostras, indicando que a presença do FS torna o sistema mais viscoso.⁸⁷ Entretanto, nas amostras com as AgNPs, o comportamento contrário pode ser observado, ou seja, o sistema apresenta uma menor tensão de cisalhamento e uma redução da viscosidade aparente.⁸⁸ Esse perfil indica que a presença de prata torna o sistema menos viscoso, isso ocorre, pois, a viscosidade está relacionada com a presença de cargas no sistema. Assim, a presença da prata e conseqüentemente o aumento de cargas promove um afastamento das cadeias, diminuindo a interação, logo, reduzindo também a viscosidade e melhorando o deslizamento das cadeias poliméricas.⁸⁸

A Tabela 9 mostra os valores obtidos para os parâmetros reológicos para as diferentes amostras de soluções para eletrofiação. O índice de consistência (K)

representa a média da viscosidade de todos os pontos obtidos por uma curva de fluxo. O índice de comportamento de fluxo, também chamado de índice da lei das potências, (n) representa o comportamento de diluição por cisalhamento, onde $n=1$ indica um fluido Newtoniano, $n<1$ refere-se um fluido com comportamento pseudoplástico e $n>1$ é característico de um fluido dilatante. O valor de cedência (T_0) diz respeito à tensão a partir da qual a deformação de um corpo não é recuperável. Por fim, a viscosidade plástica é a medida da resistência de um fluido ao fluxo após a tensão de cedência ter sido superada.

Tabela 9. Valores dos parâmetros reológicos: índice de consistência (K), índice de comportamento de fluxo (n), valor de cedência (T_0) e viscosidade plástica (η_p).

Componentes	K (Pa.s)ⁿ	n (u.a.)	T_0 (Pa)	η_p (Pa.s)
PVA/0,5% F-127	2,12 ± 0,008	0,91 ± 0,005	1,04 ± 0,02	25,2 ± 5,2
PVA/0,5% F-127/RB	3,57 ± 0,011	0,89 ± 0,006	1,42 ± 0,04	49,1 ± 10,5
PVA/0,5% F-127/AgNPs	1,99 ± 0,007	0,92 ± 0,004	1,02 ± 0,02	22,4 ± 4,8
PVA/0,5% F-127/RB/AgNPs	3,43 ± 0,011	0,89 ± 0,006	1,37 ± 0,03	45,7 ± 8,9
PVA/2,0% F-127	1,46 ± 0,014	0,97 ± 0,008	1,03 ± 0,02	17,8 ± 4,1
PVA/2,0% F-127/RB	4,24 ± 0,017	0,72 ± 0,001	0,51 ± 0,02	40,5 ± 5,6
PVA/2,0% F-127/AgNPs	3,13 ± 0,017	0,83 ± 0,001	0,77 ± 0,02	39,9 ± 6,3
PVA/2,0% F-127/RB/AgNPs	6,11 ± 0,014	0,72 ± 0,007	0,76 ± 0,03	54,7 ± 7,6

Os valores obtidos na Tabela 9, estão de acordo com os reogramas observados nas Figura 28 e Figura 29. O índice (K) indica o grau de resistência ao escoamento do fluido, ou seja, quanto maior o seu valor, mais viscoso será o fluido, assim as soluções contendo RB são as mais viscosas, indicado pela maior viscosidade no reograma. Neste sentido, os valores de viscosidade plástica vão ao encontro com os do índice (K), onde as amostras mais viscosas são as contendo o FS. O índice (n) apresentou valores menores que 1, indicando mais uma vez que o fluido tem comportamento de pseudoplástico. Por fim o índice (T_0) está relacionado diretamente com as forças de interação entre as partículas dispersas no meio, isso significa que se a força aplicada no fluido for menor que o valor de T_0 o fluido se comportará como um sólido, no caso das amostras, o índice variou de 0,6 a 1

indicando que a força necessária para que o fluido inicie o escoamento é muito pequena.

5.3 NANOFIBRAS

5.3.1 Produção das nanofibras

A partir dos resultados obtidos, os parâmetros de processamento da eletrofiação foram ajustados, garantindo assim a produção de nanofibras com melhor qualidade e promissoras para aplicação escolhida. Após a realização de alguns testes avaliando a estrutura e espessura das nanofibras, a melhor condição observada para a formação das nanofibras está expressa na Tabela 10. A mesma condição foi utilizada para todas as amostras, mantendo-se um padrão para eletrofiação mesmo que não houvesse AgNPs ou ácido cítrico, condições que exigem maior voltagem na fonte de tensão.

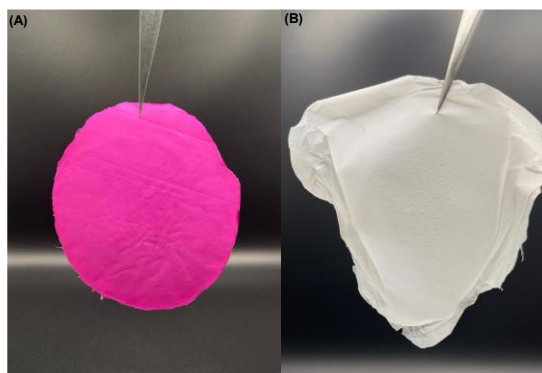
Tabela 10. Condições padrões utilizadas durante o processo de eletrofiação.

Parâmetros de processamento	
Voltagem da fonte de tensão	18 kV
Vazão da solução	0,79 mL/h
Material para coleta	Papel manteiga
Número de seringas	2
Volume da seringa	5 mL
Calibre da agulha	19G
Distância entre o coletor e a agulha	15 cm

Dos parâmetros de processamento ainda vale ressaltar que a eletrofiação foi realizada na horizontal e as seringas foram posicionadas horizontalmente entre si. Além disso, foi possível observar a formação do cone de Taylor em todas as eletrofiações. Ademais os parâmetros ambientais também foram monitorados através de um termo-higrômetro, assim, a temperatura média foi de 25 ± 10 °C, e a umidade média do ar foi de $45 \pm 10\%$.

A Figura 30 mostra o aspecto das fibras recém recolhidas. Fisicamente as matrizes apresentaram textura macia, assim como uniformidade e elasticidade. Vale ressaltar que as nanofibras contendo ácido cítrico não apresentaram tanta uniformidade quanto as amostras sem este agente reticulante (Figura 30). Todas as nanofibras obtidas foram caracterizadas por meio de diversas técnicas que serão descritas nos tópicos que seguem.

Figura 30. Foto das nanofibras produzidas contendo **(A)** PVA/F-127/RB e **(B)** PVA/F-127/Ácido cítrico/AgNPs em sua composição.

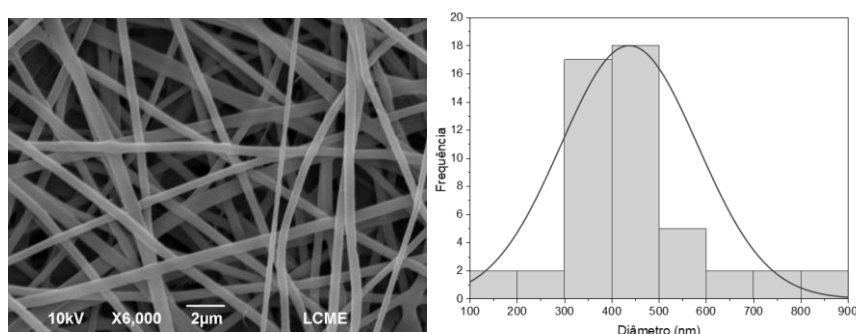


5.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

A técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) consiste na observação e caracterização de microestruturas de materiais sólidos previamente submetida ao processo de metalização. Dessa forma, a morfologia de todas as nanofibras obtidas através do processo de eletrofiação foram avaliadas pela técnica de SEM, onde foram obtidas diversas imagens em diferentes magnificações e regiões da amostra para a devida caracterização.⁸⁹

Inicialmente foi produzida uma nanofibra contendo apenas PVA, mantendo os parâmetros de eletrofiação descritos anteriormente, para verificar a sua estrutura final, Figura 31. É possível notar na Figura 31 que a fibra apresentou uma morfologia adequada, sendo bastante homogênea e não apresentou a formação de *beads*. Após essa análise inicial, foi realizada a inserção do copolímero F-127 e do ácido cítrico, como mostra a Figura 32. Em seguida as imagens foram processadas no software livre ImageJ para que fossem determinados os diâmetros das nanofibras produzidas. Nas Figuras 31 e 32 estão representados os gráficos com a distribuição normal dos diâmetros de 50 fibras encontrados nas imagens processadas.

Figura 31. Micrografias de SEM e gráfico de distribuição normal do diâmetro das nanofibras de PVA.



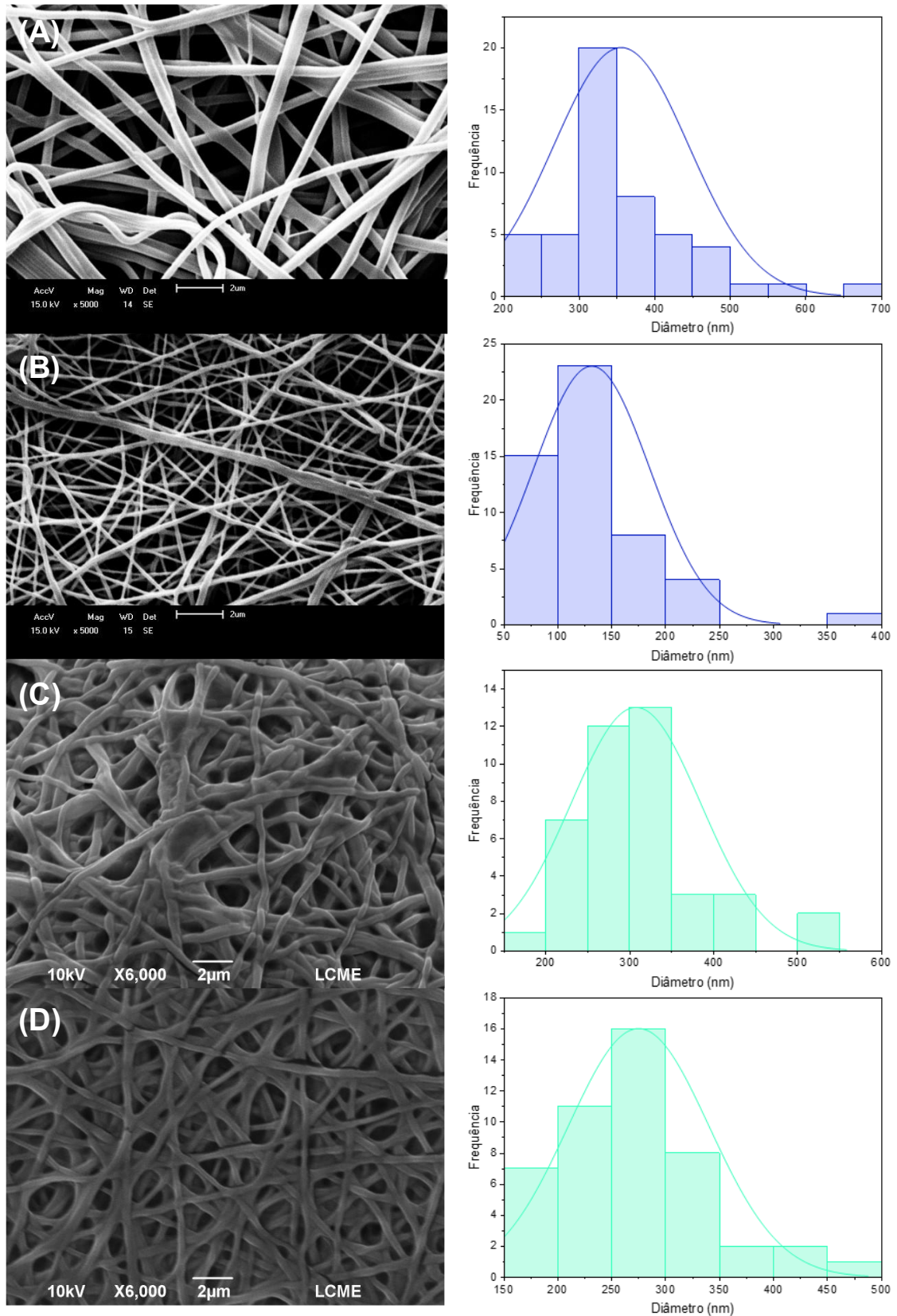
Ainda utilizando o software ImageJ foi possível determinar, por meio de 50 medidas, a média dos diâmetros em cada amostra, bem como os seus valores de mínimos e máximos. Estes dados estão expostos na Tabela 11.

Tabela 11. Valores dos diâmetros médios, mínimos e máximos para as amostras de nanofibras.

Composição	Diâmetro médio (nm) $\pm$ DP	Diâmetro mínimo (nm)	Diâmetro máximo (nm)
PVA	411 $\pm$ 143	151	836
PVA/ 0,5% F-127	333 $\pm$ 88	212	677
PVA/ 2,0% F-127	121 $\pm$ 53	61	379
PVA/ 0,5% F-127/ Ácido cítrico	301 $\pm$ 76	157	548
PVA/ 2,0% F-127/ Ácido cítrico	271 $\pm$ 64	170	467

Nota-se, tanto nas Figuras 31 e 32 como na Tabela 11, que os valores de diâmetro sofrem variações em todas as nanofibras. No entanto, é nítido que a amostra contendo PVA e 2,0% m/V de Pluronic®F-127 apresenta menores diâmetros e uma maior homogeneidade.

Figura 32. Micrografias de SEM e gráficos de distribuição normal dos diâmetros das nanofibras **(A)** PVA/ 0,5% F-127; **(B)** PVA/ 2,0% F-127; **(C)** PVA/ 0,5% F-127/ Ácido cítrico e **(D)** PVA/ 2,0% F-127/ Ácido cítrico.

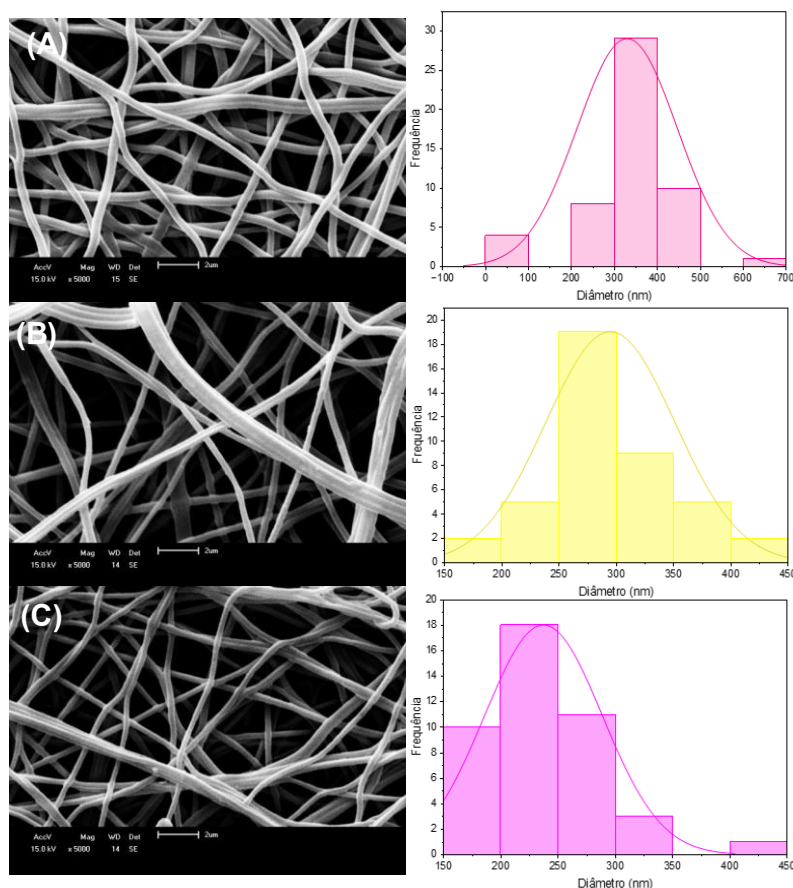


A partir dos resultados obtidos, foram produzidas nanofibras contendo os possíveis fármacos. As micrografias de SEM para nanofibras de PVA/ 0,5% F-127/RB/AgNPs estão elencadas na Figura 33 assim como os gráficos com a distribuição normal dos diâmetros. Ainda, na Tabela 12, os valores da média dos diâmetros em cada amostra, bem como os seus mínimos e máximos estão elencados.

Tabela 12. Valores dos diâmetros médios, mínimos e máximos para as amostras de nanofibras com os fármacos.

Composição	Diâmetro médio (nm) $\pm$ DP	Diâmetro mínimo (nm)	Diâmetro máximo (nm)
PVA/0,5% F-127/RB	333 $\pm$ 94	75	636
PVA/0,5% F-127/AgNPs	289 $\pm$ 55	165	429
PVA/0,5% F-127/RB/AgNPs	230 $\pm$ 50	154	441

Figura 33. Micrografias de SEM e gráficos de distribuição normal dos diâmetros das nanofibras **(A)** PVA/0,5% F-127/RB **(B)** PVA/0,5% F-127/AgNPs e **(C)** PVA/0,5% F-127/RB/AgNPs.

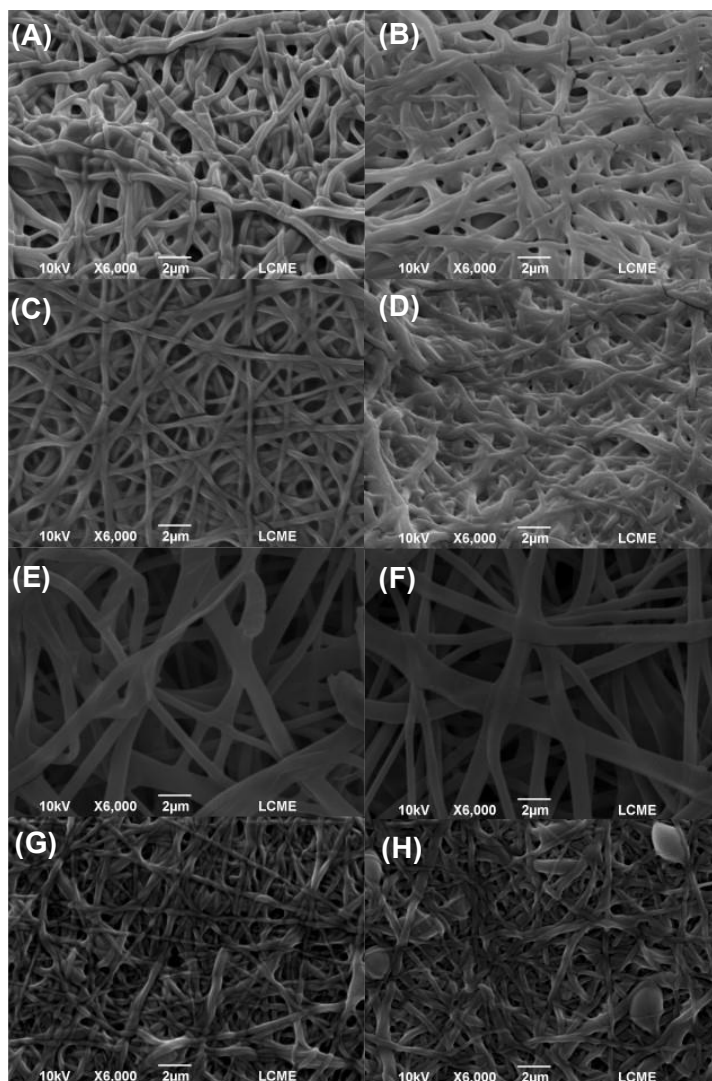


Nota-se, tanto na Figura 33 como na Tabela 12, que com a inserção dos fármacos as fibras diminuem o diâmetro médio e apresentam uma maior homogeneidade. Na literatura alguns estudos reportam este comportamento de diminuição no diâmetro e o associam com o AgNO_3 presente no meio. Um trabalho realizado por Tan *et al.* (2016)⁹⁰ mostrou que quanto maior a concentração de AgNO_3 no meio, menor o diâmetro das fibras. Ainda, em um trabalho realizado por Wang *et al.* (2022)⁹¹, o mesmo fato é observado. Ademais é reportado que ao aumentar a concentração de AgNO_3 para 10% m/V, as AgNPs começam a agregar e com isso o diâmetro médio das fibras e o tamanho médio das AgNPs tornam-se maiores e desigualmente distribuídos.

Após a incorporação dos fármacos o ácido cítrico foi adicionado às soluções e então as nanofibras foram submetidas ao aquecimento para que o processo de reticulação ocorresse. As imagens de SEM foram obtidas para a comparação da morfologia das fibras antes e após a reticulação, Figura 34. A incorporação dos fármacos também foi realizada, porém, como discutido no item 5.1.5, a RB possui diversas espécies protolíticas que variam de acordo com o pH do meio. Com a incorporação do agente reticulante, a solução para eletrofiação passa a apresentar valores menores de pH (pH~4), o que impossibilita a adição da RB (precipitação). Assim estão representadas na Figura 34 as imagens das nanofibras contendo somente as AgNPs.

É possível observar na Figura 34 que, para todas as amostras, a incorporação do ácido cítrico gera fibras menos uniformes e, após o processo de reticulação, há um aumento na agregação das nanofibras.

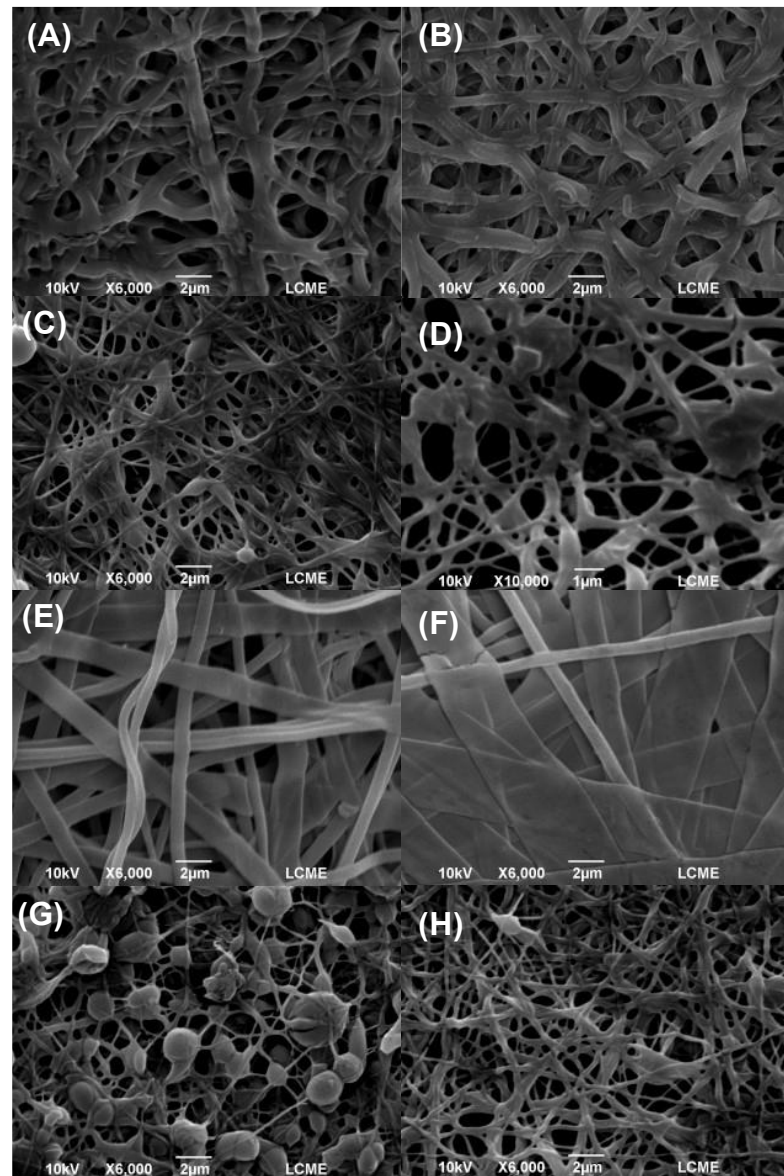
Figura 34. Microscopia Eletrônica de Varredura das nanofibras **(A)** PVA/0,5% F-127/Ácido cítrico **(B)** PVA– Reticulado/0,5% F-127 **(C)** PVA/2,0% F-127/Ácido cítrico **(D)** PVA– Reticulado/2,0% F-127 **(E)** PVA/0,5% F-127/Ácido cítrico/AgNPs **(F)** PVA– Reticulado/0,5% F-127/AgNPs **(G)** PVA/2,0% F-127/Ácido cítrico/AgNPs e **(H)** PVA– Reticulado/2,0% F-127/AgNPs.



Como as fibras de PVA apresentam um caráter hidrosolúvel a incorporação do agente reticulante é imprescindível. Neste contexto, a solução encontrada foi desenvolver nanofibras em camadas (para que estas contivessem, simultaneamente, RB e ácido cítrico). Esta abordagem buscou encapsular o FS entre as fibras reticuladas, visando uma liberação prolongada da RB além de garantir a integridade estrutural destes curativos por um período maior. Assim a primeira e última camada foram compostas de PVA/F-127/Ácido cítrico/AgNPs, denominadas Camadas de Proteção Externa (CPE). Por outro lado, a camada intermediária continha o FS na ausência do agente reticulante, ou seja, PVA/F-127/RB/AgNPs, sendo denominada

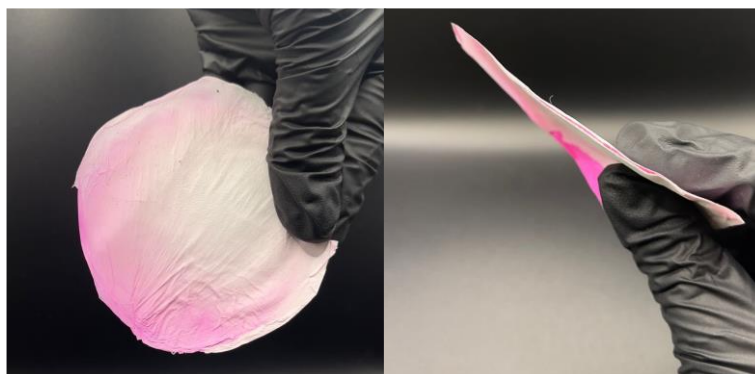
Camada de Liberação Prolongada (CLP). As matrizes obtidas foram chamadas de Fibras de Estrutura Tripla (FET). As imagens de SEM para estas nanofibras em camadas estão elencadas na Figura 35, antes e após a reticulação.

Figura 35. Microscopia Eletrônica de Varredura das fibras em camadas sendo **(A)** PVA/0,5% F-127/Ácido cítrico | PVA/0,5% F-127/RB | PVA/0,5% F-127/Ácido cítrico **(B)** fibra (A) reticulada **(C)** PVA/0,5% F-127/Ácido cítrico/AgNPs | PVA/0,5% F-127/RB/AgNPs | PVA/0,5% F-127/Ácido cítrico/AgNPs **(D)** fibra (C) reticulada **(E)** PVA/0,5% F-127/Ácido cítrico/AgNPs | PVA/0,5% F-127/RB/AgNPs | PVA/0,5% F-127/Ácido cítrico/AgNPs **(F)** fibra (E) reticulada **(G)** PVA/2,0% F-127/Ácido cítrico/AgNPs | PVA/2,0% F-127/RB/AgNPs | PVA/2,0% F-127/Ácido cítrico/AgNPs **(H)** fibra (G) reticulada.



Através da Figura 35 é possível notar que, nas amostras contendo 2,0% de F-127, houve a formação de *beads*, consequência da má formação dos fios. Enquanto as amostras contendo 0,5% de F-127 apresentaram um aspecto homogêneo sendo que, após a reticulação, ocorreu uma agregação nas fibras. Por fim é possível notar que, como citado anteriormente, a presença das AgNPs resulta em fibras com diâmetros menores.

Figura 36. Imagem da nanofibra em camadas PVA/0,5% F-127/Ácido cítrico/AgNPs | PVA/0,5% F-127/RB/AgNPs | PVA/0,5% F-127/Ácido cítrico/AgNPs – Reticulada.



5.3.3 Calorimetria diferencial de varredura – DSC

A técnica de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) é muito importante no estudo de polímeros, uma vez que é usada para investigar processos físico-químicos associados à absorção e liberação de calor pelo polímero (reações químicas e/ou processos degradativos) e transições de segunda ordem, como a transição vítrea. Propriedades como a temperatura de cristalização, a temperatura de transição vítrea, a capacidade de calor e a temperatura de fusão caracterizam os materiais poliméricos. Neste sentido, as análises no DSC de polímeros servem para determinar a entalpia de transição, o grau de cristalinidade e a condutividade térmica.⁸²

As análises foram realizadas para o PVA puro e para as nanofibras produzidas a fim de verificar se houve mudança na temperatura de fusão assim como investigar as interações entre os constituintes da amostra. Neste sentido, observando a Figura 37, o PVA puro apresentou dois eventos, o primeiro entre 14,0-136,0 °C e um segundo evento entre 163,0-200,0 °C. Quando o copolímero é incorporado ao sistema (Figura 37B) não são notadas diferenças significativas. O pico de fusão da RB pura não apareceu nas curvas calorimétricas das nanofibras onde foi adicionada, provavelmente pela pequena proporção em relação aos polímeros e também eficaz

dispersão da mesma na fibra. No demais, as formulações se apresentaram bastante semelhantes, mantendo dois eventos em intervalos de temperaturas muito próximos.

Figura 37. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) para **(A)** PVA **(B)** PVA/F-127 **(C)** PVA/F-127/RB **(D)** PVA/F-127/AgNPs **(E)** PVA/F-127/RB/AgNPs.

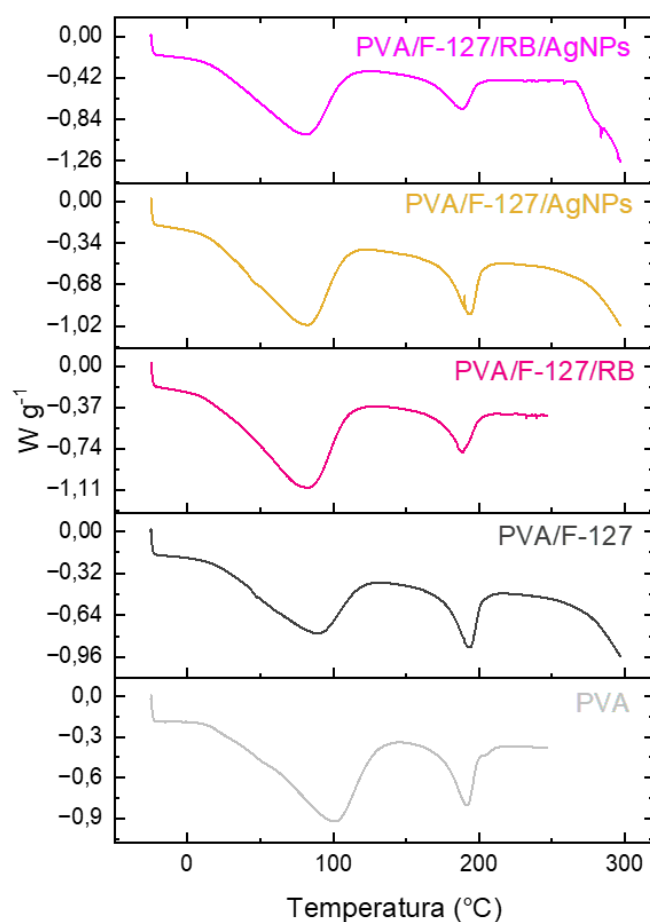


Tabela 13. Análises térmicas para as diferentes nanofibras.

Composição	1ºEvento (°C)	ΔH (J/g)	2ºEvento (°C)	ΔH (J/g)
PVA	14,0 – 136,0	214,3	163,0 – 200,0	40,01
PVA/F-127	27,0 – 126,0	117,8	167,0 – 209,0	50,26
PVA/F-127/RB	8,0 – 114,0	217,1	160,0 – 202,0	42,88
PVA/F-127/AgNPs	10,0 – 113,0	178,3	170,0 - 207,0	32,73
PVA/F-127/RB/AgNPs	14,0 – 113,0	186,2	164,0 – 207,0	19,64

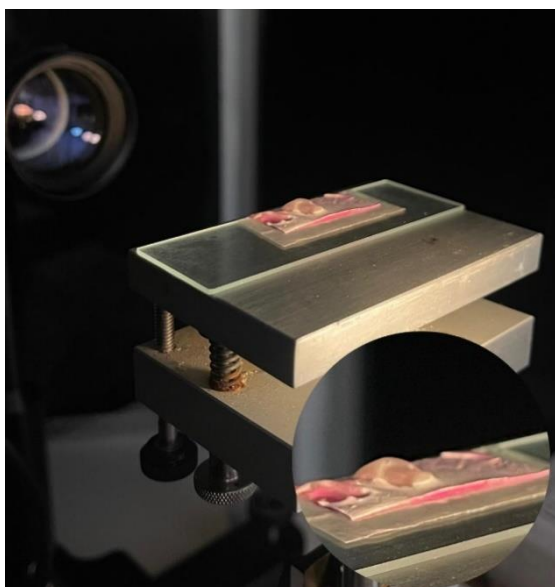
As matrizes também foram avaliadas por FTIR, e todos os picos associados aos polímeros e fármacos foram observados (Anexos K e L).

5.3.4 Ângulo de contato

O estudo do ângulo de contato por meio do goniômetro investiga as características hidrofílicas/hidrofóbicas de uma amostra. A análise é realizada colocando-se uma gota de líquido na superfície do material e utilizando-se o goniômetro para determinar o ângulo formado na interface sólido-líquido. É um parâmetro que fornece informações sobre a energia superficial e a interação do material com líquidos, influenciando diretamente na aplicação.

A precisão na medição do ângulo de contato é crucial. No caso das nanofibras ao se realizar o ensaio não foi possível mensurar o ângulo de contato, mesmo para as amostras reticuladas, isso ocorreu pois, como mostra a Figura 38, ao gotejar uma gota de água a fibra a absorveu imediatamente e entumeceu. Assim, ensaios futuros para determinação do grau de entumecimento das fibras serão realizados.

Figura 38. Entumecimento da fibra reticulada em camadas durante o ensaio de ângulo de contato.



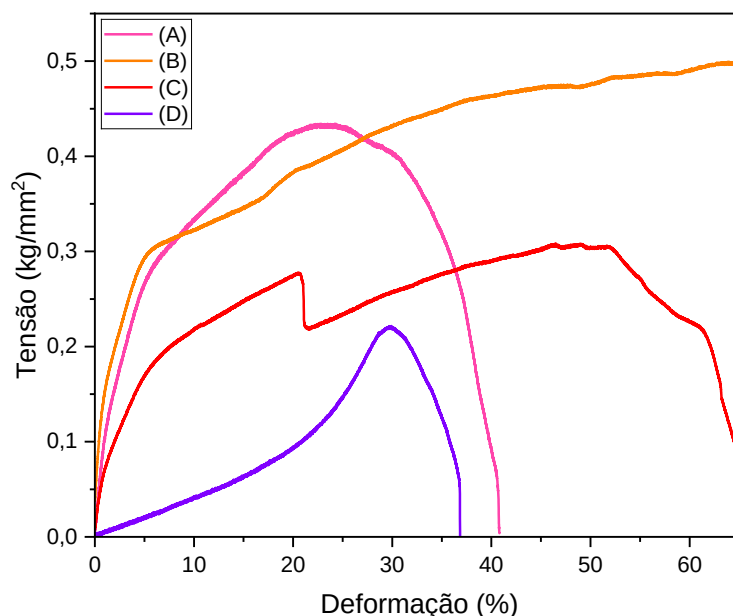
Apesar de não ser possível determinar o ângulo de contato, o fato de as matrizes apresentarem uma forte tendência em absorver água é um aspecto muito positivo para a aplicação almejada. A absorção dos exsudatos gerados pelas feridas é um requisito crucial em curativos bioativos. Isso não apenas alivia os sintomas da ferida, mas também facilita a liberação dos agentes terapêuticos incorporados no curativo. A eficiente absorção dos exsudatos ajuda a manter a área da ferida seca, prevenindo infecções e promovendo um ambiente propício para a cicatrização.

5.3.5 Teste mecânico: texturômetro

As propriedades mecânicas de um material são extremamente importantes, principalmente quando se pensa em uma aplicação tópica com sistema de *drug delivery* para facilitar sua aderência na pele. Nesse contexto, é interessante que as propriedades mecânicas das fibras sejam semelhantes àsquelas encontradas na pele humana, garantindo uma melhor aderência, maleabilidade para adaptar-se à superfície e movimento do corpo, resistência ao rompimento e liberação adequada do possível fármaco.

Nesse contexto, as nanofibras preparadas tiveram suas propriedades mecânicas estudadas através do texturômetro, onde as medidas foram obtidas em valores tempo (segundos), deformação (%) e a tensão (kg/mm²), assim, podem ser obtidos os gráficos de tensão (kg/mm²) por deformação (%). A Figura 39 mostra o gráfico realizado para as fibras na ausência do agente reticulante.

Figura 39. Gráfico de tensão versus porcentagem de deformação das fibras **(A)** PVA/0,5% F-127/RB/AgNPs **(B)** PVA/0,5% F-127 **(C)** PVA/0,5% F-127/RB e **(D)** PVA/0,5% F-127/AgNPs.

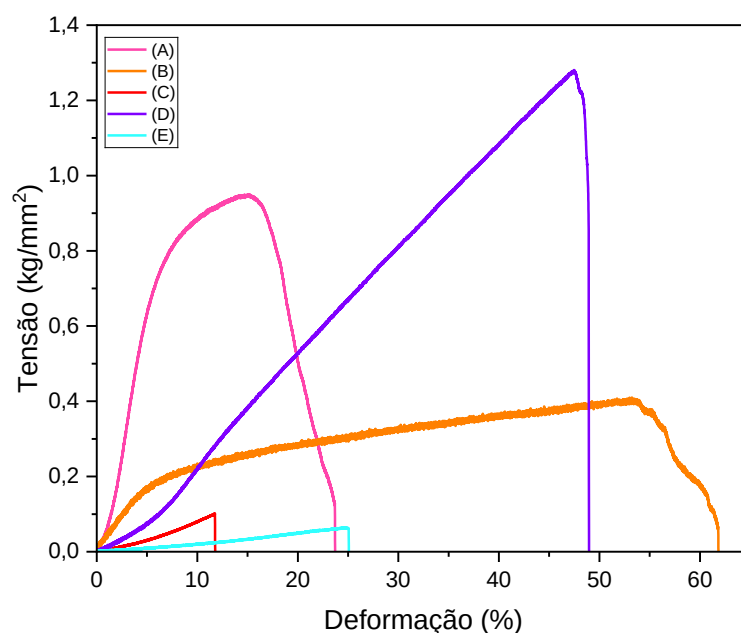


A análise do gráfico na Figura 39 mostra diferentes comportamentos para cada uma das nanofibras produzidas. Assim, a fibra contendo PVA/0,5% F-127/AgNPs possui a menor plasticidade, seguida da fibra contendo PVA/0,5% F-127/RB/AgNPs sendo a maior delas a fibra branca, ou seja, somente PVA/0,5% F-127. As fibras

contendo as nanopartículas metálicas apresentaram uma menor plasticidade pois a presença das AgNPs na superfície da nanofibra promove uma separação física entre os fios, podendo facilitar o deslize das fibras umas sobre as outras e modificar as propriedades mecânicas. Ainda, é interessante notar que a fibra contendo os dois ativos apresenta um comportamento intermediário quando comparada às fibras contendo apenas um dos possíveis fármacos.

Neste contexto, a incorporação do agente reticulante foi realizada e as fibras obtidas foram aquecidas para que o processo de reticulação ocorresse. Em seguida, essas fibras foram submetidas ao ensaio mecânico umedecidas, buscando mimetizar a superfície úmida da ferida. Dessa forma, as propriedades mecânicas foram determinadas alinhando-se à aplicação proposta. O comportamento destas fibras pode ser avaliado pela Figura 40.

Figura 40. Gráfico de tensão versus porcentagem de deformação das fibras **(A)** PVA **(B)** PVA/Ácido cítrico/0,5% F-127 **(C)** PVA-Reticulado/0,5% F-127 (úmida) **(D)** PVA/Ácido cítrico/2,0% F-127 e **(E)** PVA-Reticulado/2,0% F-127 (úmida).

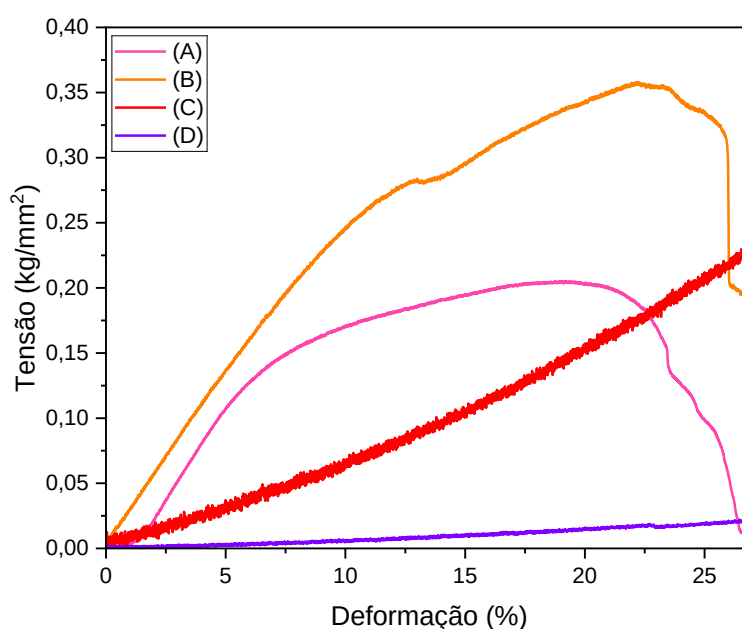


A análise da Figura 40 mostra que as fibras reticuladas e umedecidas possuem a menor plasticidade, isso ocorre pois o processo de aquecimento necessário para que a reticulação ocorra leva a um enrijecimento das fibras, como mostrado através das micrografias de SEM. A fibra que apresentou o maior valor de plasticidade foi a contendo PVA/Ácido cítrico/0,5% F-127, sendo que a fibra contendo PVA/Ácido

cítrico/2,0% F-127 teve quase metade do valor, assim menores concentrações de F-127 tendem a melhorar o perfil mecânico das fibras.

Por fim, as análises foram realizadas para as fibras em camadas reticuladas contendo os dois fármacos, como mostra a Figura 41.

Figura 41. Gráfico de tensão versus porcentagem de deformação das fibras **(A)** PVA-Reticulado/0,5% F-127/AgNPs | PVA/0,5% F-127/RB/AgNPs | PVA-Reticulado/0,5% F-127/AgNPs, seca **(B)** fibra (A) umedecida com água **(C)** PVA-Reticulado/2,0% F-127/AgNPs | PVA/2,0% F-127/RB/AgNPs | PVA-Reticulado/2,0% F-127/AgNPs, seca **(D)** fibra (C) umedecida com água.



A análise do gráfico na Figura 41 mostra um perfil bastante semelhante para as nanofibras sendo que as fibras umedecidas, nas duas concentrações copolímero, apresentaram propriedades mecânicas melhoradas como maior plasticidade. De forma geral, as nanofibras demonstraram uma alta plasticidade sendo favorável para aplicações como curativos inteligentes capazes de recobrir ferimentos e liberar os fármacos sem que se rompa como o movimento natural do corpo.

5.3.6 Liberação *in vitro*

Ensaio de liberação *in vitro* são comumente utilizados para simular o comportamento de um material em um determinado meio e avaliar a sua capacidade de prolongar a liberação de um fármaco como um sistema de *drug delivery*. No caso das matrizes nanofibrosas para o tratamento de feridas há uma dificuldade de se testar

esses sistemas em feridas reais. Dessa forma, uma alternativa conveniente é a utilização de fluídos simulados de feridas (FSF)⁷², em diferentes condições de pH (5,0; 7,4 e 8,0). Assim, torna-se possível estimar o comportamento da matriz nas diferentes feridas de pele, mantendo-se a temperatura mais comum em feridas, sendo 32,5 °C.

No presente estudo realizou-se um experimento preliminar de liberação *in vitro*. Para tanto, escolheu-se como objeto de estudo as nanofibras em camadas (FET). Como supracitado, essas fibras são estruturadas em três camadas, sendo a primeira e última compostas por PVA-Reticulado/0,5% F-127/RB/AgNPs e, a camada intermediária, composta por PVA/0,5% F-127/RB/AgNPs. Nesse ensaio apenas a RB foi quantificada e utilizou-se medidas de absorção eletrônica da RB em λ_{max} de 553 nm em diferentes intervalos de tempo de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150, 180 e 1440 minutos. Assim, a RB foi quantificada a partir de uma curva de calibração previamente obtida em fluido simulado de feridas (FSF) para cada valor de pH (5,0, 7,4 e 8,0). A concentração de RB liberada ao longo do tempo pode ser determinada, como mostram as Figura 42, 43 e 44.

Figura 42. Concentração de RB liberada ao longo do tempo em fluído simulado de ferida com pH=5,0.

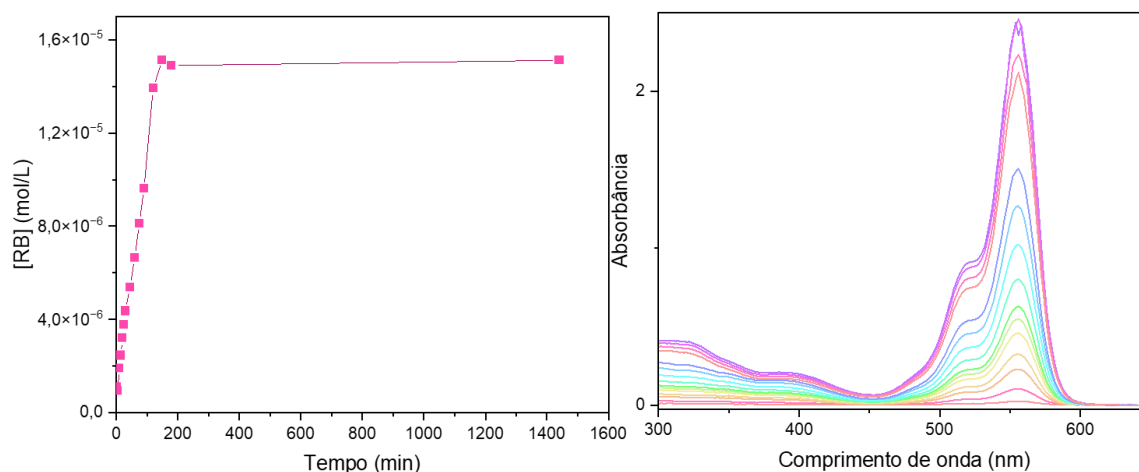


Figura 43. Concentração de RB liberada ao longo do tempo em fluido simulado de ferida com pH=7,4.

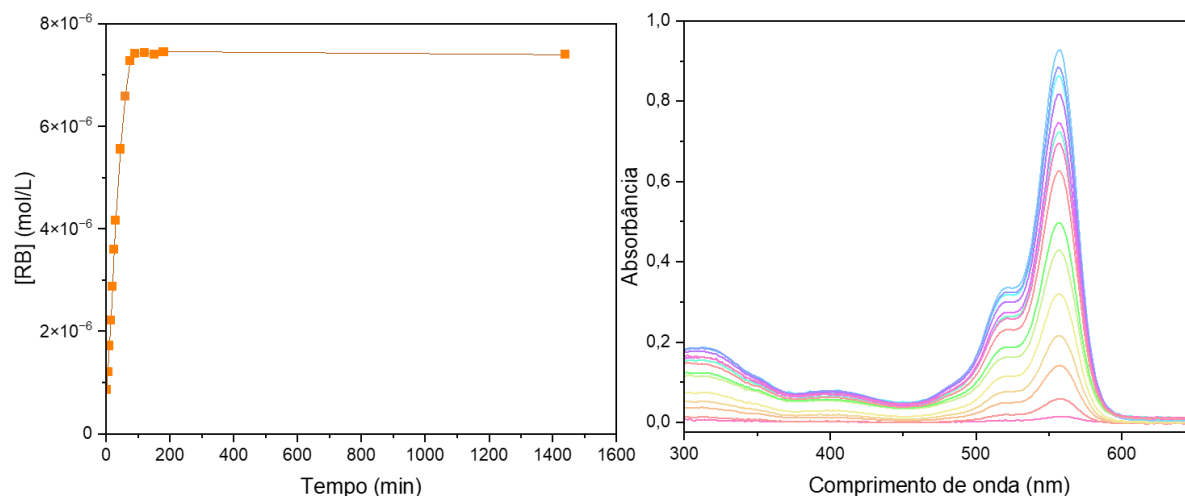
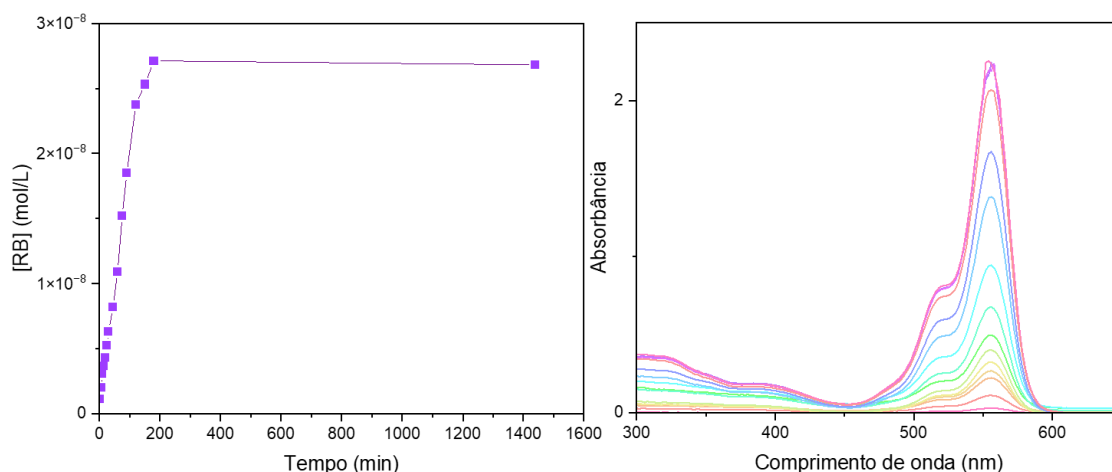


Figura 44. Concentração de RB liberada ao longo do tempo em fluido simulado de ferida com pH=8,0.



Em todos os experimentos, as matrizes com 2 cm^2 foram empregadas. Para o experimento em FSF com $\text{pH} = 5,0$ a amostras de FET tinha $14,9 \text{ mg}$ e a concentração de RB liberada em 24h foi de $7,4 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$. No caso da liberação realizada para em FSF com $\text{pH} = 7,4$ a amostra de FET tinha $26,4 \text{ mg}$ e a concentração de RB liberada em 24h foi de $1,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$. Por fim, para o FSF com $\text{pH} = 8,0$ foi utilizada uma amostra de FET de $29,8 \text{ mg}$ e a concentração liberada de RB em 24 h foi de $2,7 \cdot 10^{-8} \text{ mol/L}$. Os dados apresentados mostram que apesar das fibras apresentarem áreas idênticas, a massa do material variou. Para contornar esse entrave, estudos futuros serão realizados controlando-se não apenas a área e a massa, mas também a espessura da FET empregada. Ademais, a concentração de RB por cm^2 será também determinada e todos os experimentos serão realizados em triplicata.

Vale destacar que ao final das 24 h, as nanofibras haviam se dissolvido completamente nos FSF, portanto esse curativo não necessita de trocas ou um grande manejo das feridas constantemente. Esse é outro aspecto que se pretende avaliar, o grau de desintegração e de intumescimento das matrizes em FSF com o decorrer do tempo. Apesar das dificuldades enfrentadas, as FET apresentaram propriedades promissoras no que se refere ao caráter de curativo bioativo. O caráter fotoativo também será investigado adiante, visto que as FET apresentam poros suficientemente grandes para a permeação do oxigênio, elemento essencial na TFDA.

6. CONCLUSÃO

No presente trabalho, foram obtidas matrizes poliméricas de PVA carregadas de RB e AgNPs previamente incorporadas em um sistema nanocarreador de Pluronic® F-127. As fibras foram obtidas com sucesso utilizando a técnica de eletrospinning. A caracterização preliminar da nanoformulação forneceu informações sobre a interação da RB com as AgNPs. A síntese das AgNPs foi realizada de maneira rápida e eficaz, a partir da fotoindução UV em condições ambiente, utilizando o próprio copolímero como agente redutor e estabilizante.

As micelas obtidas apresentaram um diâmetro hidrodinâmico (DH) de no máximo 120 nm e índice de polidispersidade (PDI) de até 0,3. Análises realizadas por TEM mostraram que as AgNPs se agregam próximas às micelas, corroborando a hipótese de que o F-127, além de atuar como estabilizante, também serve como agente redutor. Estudos utilizando o LumiSizer® indicaram que a incorporação da RB as nanoformulações F-127/AgNPs resulta em um aumento da estabilidade. Estudos de pKa da RB evidenciaram que a espécie protolítica predominante no sistema em pH fisiológico (~7,4) é a forma diânionica, ideal para aplicação em TFD. Estudos fotofísicos mostraram evidenciaram a geração de oxigênio singleto para o sistema F-127/RB/AgNPs, conforme proposto pelo efeito ME^1O_2 , além de taxas reduzidas de fotobranqueamento com a incorporação do FS nas micelas.

A obtenção das matrizes eletrofiadas propostas, contendo PVA reticulado/F-127/RB/AgNPs, bem como suas variações, foi realizada com sucesso. Os parâmetros da solução, como condutividade e viscosidade, foram avaliados para definir as melhores condições de trabalho. Como resultado, foram obtidas fibras homogêneas, comprovadas por meio da análise de SEM, apresentando diâmetros de até 900 nm. Ensaio mecânicos demonstraram que as fibras possuem elasticidade compatível com aplicações tópicas. As matrizes apresentaram uma forte tendência em absorver água, aspecto positivo para a aplicação desejada uma vez que a absorção dos exsudatos gerados pelas feridas é um requisito crucial em curativos. Além disso, os testes de liberação in vitro foram realizados em fluido simulador de fluido fisiológico (FSF) em diferentes pHs durante 24 horas, observando-se a liberação da RB.

REFERÊNCIAS

- ¹ Da Silva, L. P.; Reis, R. L.; Correlo, V. M.; Marques, A. P. Hydrogel-Based Strategies to Advance Therapies for Chronic Skin Wounds. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2019**, *21*, 145. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-060418-052422>.
- ² Gonzalez, A. C. D. O.; Costa, T. F.; Andrade, Z. D. A.; Medrado, A. R. A. P. Wound healing - A literature review. *An. Bras. Dermatol.* **2016**, *91*, 614. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20164741>.
- ³ Dong, R.; Guo, B. Smart wound dressings for wound healing. *Nano Today* **2021**, *41*, 101290. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2021.101290>.
- ⁴ Oniszczyk, A.; Wojtunik-Kulesza, K. A.; Oniszczyk, T.; Kasprzak, K. The potential of photodynamic therapy (PDT)—Experimental investigations and clinical use. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2016**, *83*, 912. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.07.058>.
- ⁵ Yanovsky, R. L.; Bartenstein, D. W.; Rogers, G. S.; Isakoff, S. J.; Chen, S. T. Photodynamic therapy for solid tumors: A review of the literature. *Photoderm Photoimm Photomed* **2019**, *35*, 295. <https://doi.org/10.1111/phpp.12489>.
- ⁶ Allison, R. R.; Moghissi, K. Oncologic photodynamic therapy: Clinical strategies that modulate mechanisms of action. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2013**, *10*, 331. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2013.03.011>.
- ⁷ Lamberts, J. J. M.; Neckers, D. C. Rose Bengal derivatives as singlet oxygen sensitizers. *Tetrahedron* **1985**, *41*, 2183. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)96591-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)96591-3).
- ⁸ Farooq, S.; De Araujo, R. E. Identifying high performance gold nanoshells for singlet oxygen generation enhancement. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2021**, *35*, 102466. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102466>.
- ⁹ De Freitas, C. F.; Kimura, E.; Rubira, A. F.; Muniz, E. C. Curcumin and silver nanoparticles carried out from polysaccharide-based hydrogels improved the photodynamic properties of curcumin through metal-enhanced singlet oxygen effect. *Materials Science and Engineering: C* **2020**, *112*, 110853. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110853>.
- ¹⁰ Rai, M.; Yadav, A.; Gade, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances* **2009**, *27*, 76. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.09.002>.

¹¹ Grassi, L. T.; Grassi, V. M. T. Ação da nanopartícula de prata no processo de cicatrização de ferida: uma revisão sistemática/ Silver nanoparticle action on wound healing: a systematic review. *BJDV* **2021**, 7, 58109. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n6-286>.

¹² Alexandridis, P.; Holzwarth, J. F.; Hatton, T. A. Micellization of Poly(ethylene oxide)-Poly(propylene oxide)-Poly(ethylene oxide) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions: Thermodynamics of Copolymer Association. *Macromolecules* **1994**, 27, 2414. <https://doi.org/10.1021/ma00087a009>.

¹³ Torcello-Gómez, A.; Wulff-Pérez, M.; Gálvez-Ruiz, M. J.; Martín-Rodríguez, A.; Cabrerizo-Vílchez, M.; Maldonado-Valderrama, J. Block copolymers at interfaces: Interactions with physiological media. *Advances in Colloid and Interface Science* **2014**, 206, 414. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2013.10.027>.

¹⁴ Sokolsky-Papkov, M.; Kabanov, A. Synthesis of Well-Defined Gold Nanoparticles Using Pluronic: The Role of Radicals and Surfactants in Nanoparticles Formation. *Polymers* **2019**, 11, 1553. <https://doi.org/10.3390/polym11101553>.

¹⁵ Schneider, L. A.; Korber, A.; Grabbe, S.; Dissemond, J. Influence of pH on wound-healing: a new perspective for wound-therapy? *Arch Dermatol Res* **2007**, 298, 413. <https://doi.org/10.1007/s00403-006-0713-x>.

¹⁶ Hernández-Rangel, A.; Martin-Martinez, E. S. Collagen based electrospun materials for skin wounds treatment. *J Biomedical Materials Res* **2021**, 109, 1751. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37154>.

¹⁷ Chen, S.; Liu, B.; Carlson, M. A.; Gombart, A. F.; Reilly, D. A.; Xie, J. Recent Advances in Electrospun Nanofibers for Wound Healing. *Nanomedicine (Lond.)* **2017**, 12, 1335. <https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0017>.

¹⁸ Smaniotto, P. H. D. S.; Ferreira, M. C.; Isaac, C.; Galli, R. Sistematização de curativos para o tratamento clínico das feridas. *Rev. Bras. Cir. Plást.* **2012**, 27, 623. <https://doi.org/10.1590/S1983-51752012000400026>.

¹⁹ Porto, S. G.; Suzuki, L. M. Joseane Brandão dos Santos. [s.d.].

²⁰ Han, G.; Ceilley, R. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. *Adv Ther* **2017**, 34, 599. <https://doi.org/10.1007/s12325-017-0478-y>.

²¹ Thaiane Da Silva, T.; Cesar, G. B.; Francisco, C. P.; Mossini, G. G.; De Castro Hoshino, L. V.; Sato, F.; Radovanovic, E.; Da Silva Agostini, D. L.; Caetano, W.; Hernandes, L.; Matioli, G. Electrospun curcumin/polycaprolactone/copolymer F-

108 fibers as a new therapy for wound healing. *J of Applied Polymer Sci* **2020**, *137*, 48415. <https://doi.org/10.1002/app.48415>.

²² Fan, K.; Tang, J.; Escandon, J.; Kirsner, R. S. State of the Art in Topical Wound-Healing Products: *Plastic and Reconstructive Surgery* **2011**, *127*, 44S. <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e3181f8e275>.

²³ Aljghami, M. E.; Saboor, S.; Amini-Nik, S. Emerging Innovative Wound Dressings. *Ann Biomed Eng* **2019**, *47*, 659. <https://doi.org/10.1007/s10439-018-02186-w>.

²⁴ Derakhshandeh, H.; Kashaf, S. S.; Aghabaglou, F.; Ghanavati, I. O.; Tamayol, A. Smart Bandages: The Future of Wound Care. *Trends in Biotechnology* **2018**, *36*, 1259. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.07.007>.

²⁵ Bhardwaj, N.; Kundu, S. C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances* **2010**, *28*, 325. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.01.004>.

²⁶ Islam, M. S.; Ang, B. C.; Andriyana, A.; Afifi, A. M. A review on fabrication of nanofibers via electrospinning and their applications. *SN Appl. Sci.* **2019**, *1*, 1248. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1288-4>.

²⁷ Luraghi, A.; Peri, F.; Moroni, L. Electrospinning for drug delivery applications: A review. *Journal of Controlled Release* **2021**, *334*, 463. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.03.033>.

²⁸ Ahmed, F. E.; Lalia, B. S.; Hashaiekh, R. A review on electrospinning for membrane fabrication: Challenges and applications. *Desalination* **2015**, *356*, 15. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2014.09.033>.

²⁹ Xue, J.; Wu, T.; Dai, Y.; Xia, Y. Electrospinning and Electrospun Nanofibers: Methods, Materials, and Applications. *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 5298. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00593>.

³⁰ Kishan, A. P.; Cosgriff-Hernandez, E. M. Recent advancements in electrospinning design for tissue engineering applications: A review. *J Biomedical Materials Res* **2017**, *105*, 2892. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36124>.

³¹ Elkasaby, M.; Hegab, H. A.; Mohany, A.; Rizvi, G. M. Modeling and optimization of electrospinning of polyvinyl alcohol (PVA). *Adv Polym Technol* **2018**, *37*, 2114. <https://doi.org/10.1002/adv.21869>.

³² Lee, J. S.; Choi, K. H.; Ghim, H. D.; Kim, S. S.; Chun, D. H.; Kim, H. Y.; Lyoo, W. S. Role of molecular weight of atactic poly(vinyl alcohol) (PVA) in the structure

and properties of PVA nanofabric prepared by electrospinning. *J of Applied Polymer Sci* **2004**, 93, 1638. <https://doi.org/10.1002/app.20602>.

³³ Wang, J.; Yao, K.; Wang, C.; Tang, C.; Jiang, X. Synthesis and drug delivery of novel amphiphilic block copolymers containing hydrophobic dehydroabietic moiety. *J. Mater. Chem. B* **2013**, 1, 2324. <https://doi.org/10.1039/c3tb20100g>.

³⁴ Adams, M. L.; Lavasanifar, A.; Kwon, G. S. Amphiphilic block copolymers for drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2003**, 92, 1343. <https://doi.org/10.1002/jps.10397>.

³⁵ Nakashima, K.; Bahadur, P. Aggregation of water-soluble block copolymers in aqueous solutions: Recent trends. *Advances in Colloid and Interface Science* **2006**, 123–126, 75. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2006.05.016>.

³⁶ Tiwari, S.; Kansara, V.; Bahadur, P. Targeting anticancer drugs with pluronic aggregates: Recent updates. *International Journal of Pharmaceutics* **2020**, 586, 119544. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119544>.

³⁷ Yu, J.; Qiu, H.; Yin, S.; Wang, H.; Li, Y. Polymeric Drug Delivery System Based on Pluronic for Cancer Treatment. *Molecules* **2021**, 26, 3610. <https://doi.org/10.3390/molecules26123610>.

³⁸ Molecules | Free Full-Text | Polymeric Drug Delivery System Based on Pluronic for Cancer Treatment. [s.d.], <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/12/3610>.

³⁹ Sokolsky-Papkov, M.; Kabanov, A. Synthesis of Well-Defined Gold Nanoparticles Using Pluronic: The Role of Radicals and Surfactants in Nanoparticles Formation. *Polymers* **2019**, 11, 1553. <https://doi.org/10.3390/polym11101553>.

⁴⁰ Abdel-Kader, M. H., organizador *Photodynamic Therapy: From Theory to Application* Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2014.

⁴¹ Melo, W. de C. M. A. de; Perussi, J. R. Comparando inativação fotodinâmica e antimicrobianos. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* **2012**, 33, <http://200.145.71.41/index.php/ojs/article/view/268>.

⁴² Machado, A. E. D. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Quím. Nova* **2000**, 23, 237. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422000000200015>.

⁴³ Chen, J.; Fan, T.; Xie, Z.; Zeng, Q.; Xue, P.; Zheng, T.; Chen, Y.; Luo, X.; Zhang, H. Advances in nanomaterials for photodynamic therapy applications: Status and challenges. *Biomaterials* **2020**, 237, 119827. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.119827>.

⁴⁴ Pham, T. C.; Nguyen, V.-N.; Choi, Y.; Lee, S.; Yoon, J. Recent Strategies to Develop Innovative Photosensitizers for Enhanced Photodynamic Therapy. *Chem. Rev.* **2021**, *121*, 13454. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00381>.

⁴⁵ Castano, A. P.; Demidova, T. N.; Hamblin, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2004**, *1*, 279. [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00007-4](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00007-4).

⁴⁶ Abdel-Kader, M. H. In *Photodynamic Therapy*; Abdel-Kader, M. H., org.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2014.

⁴⁷ Escudero, A.; Carrillo-Carrión, C.; Castillejos, M. C.; Romero-Ben, E.; Rosales-Barrios, C.; Khier, N. Photodynamic therapy: photosensitizers and nanostructures. *Mater. Chem. Front.* **2021**, *5*, 3788. <https://doi.org/10.1039/D0QM00922A>.

⁴⁸ Gandin, E.; Lion, Y.; Van De Vorst, A. QUANTUM YIELD OF SINGLET OXYGEN PRODUCTION BY XANTHENE DERIVATIVES. *Photochem & Photobiology* **1983**, *37*, 271. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1983.tb04472.x>.

⁴⁹ Sjöback, R.; Nygren, J.; Kubista, M. Absorption and fluorescence properties of fluorescein. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **1995**, *51*, L7. [https://doi.org/10.1016/0584-8539\(95\)01421-P](https://doi.org/10.1016/0584-8539(95)01421-P).

⁵⁰ Mchedlov-Petrosyan, N. O.; Kleshchevnikova, V. N. Influence of the cetyltrimethylammonium chloride micellar pseudophase on the protolytic equilibria of oxyxanthene dyes at high bulk phase ionic strength. *Faraday Trans.* **1994**, *90*, 629. <https://doi.org/10.1039/ft9949000629>.

⁵¹ Neckers, D. C. Rose Bengal. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **1989**, *47*, 1. [https://doi.org/10.1016/1010-6030\(89\)85002-6](https://doi.org/10.1016/1010-6030(89)85002-6).

⁵² Tavakkoli Yarak, M.; Hu, F.; Daqiqeh Rezaei, S.; Liu, B.; Tan, Y. N. Metal-enhancement study of dual functional photosensitizers with aggregation-induced emission and singlet oxygen generation. *Nanoscale Adv.* **2020**, *2*, 2859. <https://doi.org/10.1039/D0NA00182A>.

⁵³ Amendola, V.; Pilot, R.; Frascioni, M.; Maragò, O. M.; Iatì, M. A. Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review. *J. Phys.: Condens. Matter* **2017**, *29*, 203002. <https://doi.org/10.1088/1361-648X/aa60f3>.

⁵⁴ Lakowicz, J. R. Radiative decay engineering 5: metal-enhanced fluorescence and plasmon emission. *Analytical Biochemistry* **2005**, 337, 171. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.11.026>.

⁵⁵ González, A. L.; Noguez, C.; Beránek, J.; Barnard, A. S. Size, Shape, Stability, and Color of Plasmonic Silver Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2014**, 118, 9128. <https://doi.org/10.1021/jp5018168>.

⁵⁶ Durán, N.; Durán, M.; De Jesus, M. B.; Seabra, A. B.; Fávaro, W. J.; Nakazato, G. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2016**, 12, 789. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.11.016>.

⁵⁷ Grassi, L. T.; Grassi, V. M. T. Ação da nanopartícula de prata no processo de cicatrização de ferida: uma revisão sistemática/ Silver nanoparticle action on wound healing: a systematic review. *BJDV* **2021**, 7, 58109. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n6-286>.

⁵⁸ Li, C.; Lin, F.; Sun, W.; Wu, F.-G.; Yang, H.; Lv, R.; Zhu, Y.-X.; Jia, H.-R.; Wang, C.; Gao, G.; Chen, Z. Self-Assembled Rose Bengal-Exopolysaccharide Nanoparticles for Improved Photodynamic Inactivation of Bacteria by Enhancing Singlet Oxygen Generation Directly in the Solution. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, 10, 16715. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b01545>.

⁵⁹ Da Silva Souza Campanholi, K.; Combuca Da Silva Junior, R.; Cazelatto Da Silva, I.; Said Dos Santos, R.; Vecchi, C. F.; Bruschi, M. L.; Soares Dos Santos Pozza, M.; Vizioli De Castro-Hoshino, L.; Baesso, M. L.; Hioka, N.; Caetano, W.; Batistela, V. R. Stimulus-responsive phototherapeutic micellar platform of Rose Bengal B: A new perspective for the treatment of wounds. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **2021**, 66, 102739. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102739>.

⁶⁰ Ballesteros, C. A. S.; Correa, D. S.; Zucolotto, V. Polycaprolactone nanofiber mats decorated with photoresponsive nanogels and silver nanoparticles: Slow release for antibacterial control. *Materials Science and Engineering: C* **2020**, 107, 110334. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110334>.

⁶¹ Braga, T. L.; Conrado, P. C. V.; Silva, L. G. Z.; Bergmann, E. V.; Da Silva, A. C. P.; De Souza Bonfim De Mendonça, P.; Mikcha, J. M. G.; Herculano, L. S.; Malacarne, L. C.; I Muniz, E. C.; De Freitas, C. F.; Caetano, W. Pluronic® P-123 as a reductant and stabilizing agent for gold nanoparticles (AuNPs) combined with

methylene blue for photodynamic and photothermal therapy. *Journal of Molecular Liquids* **2023**, 383, 122111. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.122111>.

⁶² Asif, M.; Yasmin, R.; Asif, R.; Ambreen, A.; Mustafa, M.; Umbreen, S. Green Synthesis of Silver Nanoparticles (AgNPs), Structural Characterization, and their Antibacterial Potential. *Dose-Response* **2022**, 20, 155932582210887. <https://doi.org/10.1177/15593258221088709>.

⁶³ Zielińska, A.; Martins-Gomes, C.; Ferreira, N. R.; Silva, A. M.; Nowak, I.; Souto, E. B. Anti-inflammatory and anti-cancer activity of citral: Optimization of citral-loaded solid lipid nanoparticles (SLN) using experimental factorial design and LUMiSizer®. *International Journal of Pharmaceutics* **2018**, 553, 428. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.10.065>.

⁶⁴ Pereira, P. C. D. S.; Freitas, C. F. D.; Chaves, C. S.; Estevão, B. M.; Pellosi, D. S.; Tessaro, A. L.; Batistela, V. R.; Scarminio, I. S.; Caetano, W.; Hioka, N. CHEMOMETRY IN UNDERGRADUATE CHEMISTRY COURSES: A PROPOSAL FOR THE USE OF MULTIVARIATE ANALYSIS IN THE DETERMINATION OF pK_a. *Química Nova* **2014**, <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140216>.

⁶⁵ Lakowicz, J. R., organizador *Em Principles of Fluorescence Spectroscopy* Springer US: Boston, MA, 2006.

⁶⁶ Caetano, W.; Tabak, M. Interaction of chlorpromazine and trifluoperazine with ionic micelles: electronic absorption spectroscopy studies. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **1999**, 55, 2513. [https://doi.org/10.1016/S1386-1425\(99\)00043-8](https://doi.org/10.1016/S1386-1425(99)00043-8).

⁶⁷ Bregnhøj, M.; Dichmann, L.; McLoughlin, C. K.; Westberg, M.; Ogilby, P. R. Uric Acid: A Less-than-Perfect Probe for Singlet Oxygen. *Photochem & Photobiology* **2019**, 95, 202. <https://doi.org/10.1111/php.12971>.

⁶⁸ Rabello, B. R.; Gerola, A. P.; Pellosi, D. S.; Tessaro, A. L.; Aparício, J. L.; Caetano, W.; Hioka, N. Singlet oxygen dosimetry using uric acid as a chemical probe: Systematic evaluation. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2012**, 238, 53. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2012.04.012>.

⁶⁹ Braga, T. L.; De Souza Rossin, A. R.; Fernandes, J. A.; De Souza Bonfim De Mendonça, P.; De Castro-Hoshino, L. V.; Baesso, M. L.; De Freitas, C. F.; Radovanovic, E.; Caetano, W. Electrospun silver nanoparticles/curcumin-loaded nanohybrids for Photodynamic Therapy. *Applied Materials Today* **2024**, 36, 102073. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2024.102073>.

⁷⁰ Czibulya, Z.; Csík, A.; Tóth, F.; Pál, P.; Csarnovics, I.; Zelkó, R.; Hegedűs, C. The Effect of the PVA/Chitosan/Citric Acid Ratio on the Hydrophilicity of Electrospun Nanofiber Meshes. *Polymers* **2021**, *13*, 3557. <https://doi.org/10.3390/polym13203557>.

⁷¹ Kumar, Y.; Roy, S.; Sharma, A.; Yadav, D. K.; Kishore, A.; Kumar, N.; Meghwal, M. Em *Edible Food Packaging*; Poonia, A.,; Dhewa, T., orgs.; Springer Nature Singapore: Singapore, 2022.

⁷² Jiang, H.; Wang, L.; Zhu, K. Coaxial electrospinning for encapsulation and controlled release of fragile water-soluble bioactive agents. *Journal of Controlled Release* **2014**, *193*, 296. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.025>.

⁷³ Pereira, P. C. D. S.; Costa, P. F. D. A.; Pellosi, D. S.; Calori, I. R.; Vilsinski, B. H.; Estevão, B. M.; Hioka, N.; Caetano, W. Photophysical properties and interaction studies of Rose Bengal derivatives with biomimetic systems based in micellar aqueous solutions. *Journal of Molecular Liquids* **2017**, *230*, 674. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.01.055>.

⁷⁴ Stetefeld, J.; McKenna, S. A.; Patel, T. R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys Rev* **2016**, *8*, 409. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>.

⁷⁵ Sezgin, Z.; Yuksel, N.; Baykara, T. Preparation and characterization of polymeric micelles for solubilization of poorly soluble anticancer drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2006**, *64*, 261. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2006.06.003>.

⁷⁶ Sobisch, T.; Lerche, D. Thickener performance traced by multisample analytical centrifugation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2008**, *331*, 114. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2008.05.040>.

⁷⁷ Barba, A. A.; d'Amore, M.; Grassi, M.; Chirico, S.; Lamberti, G.; Titomanlio, G. Investigation of Pluronic® F127–Water solutions phase transitions by DSC and dielectric spectroscopy. *J of Applied Polymer Sci* **2009**, *114*, 688. <https://doi.org/10.1002/app.30586>.

⁷⁸ Liu, F.; Wang, D.; Sun, C.; Gao, Y. Influence of polysaccharides on the physicochemical properties of lactoferrin–polyphenol conjugates coated β -carotene emulsions. *Food Hydrocolloids* **2016**, *52*, 661. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.08.007>.

⁷⁹ Batistela, V. R.; Pellosi, D. S.; De Souza, F. D.; Da Costa, W. F.; De Oliveira Santin, S. M.; De Souza, V. R.; Caetano, W.; De Oliveira, H. P. M.; Scarminio, I. S.;

Hioka, N. pKa determinations of xanthene derivates in aqueous solutions by multivariate analysis applied to UV–Vis spectrophotometric data. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2011**, 79, 889. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2011.03.027>.

⁸⁰ Mchedlov-Petrosyan, N. Ionization and Tautomerism of Chloro-Derivatives of Fluorescein in Water and Aqueous Acetone. *Dyes and Pigments* **1992**, 18, 179. [https://doi.org/10.1016/0143-7208\(92\)87002-I](https://doi.org/10.1016/0143-7208(92)87002-I).

⁸¹ De Freitas, C. F.; Pelloso, D. S.; Estevão, B. M.; Calori, I. R.; Tsubone, T. M.; Politi, M. J.; Caetano, W.; Hioka, N. Nanostructured Polymeric Micelles Carrying Xanthene Dyes for Photodynamic Evaluation. *Photochem & Photobiology* **2016**, 92, 790. <https://doi.org/10.1111/php.12645>.

⁸² Drzeżdżon, J.; Jacewicz, D.; Sielicka, A.; Chmurzyński, L. Characterization of polymers based on differential scanning calorimetry based techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2019**, 110, 51. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.10.037>.

⁸³ Aboderbala, M.; Zeyada, H.; Youssif, M.; El-Ghamaz, N. The role of the annealing temperatures on the structure and optical properties of Rose Bengal thin films. *International Journal of Scientific & Engineering Research* **2015**, 6, 895.

⁸⁴<https://www.nano.gov/>. [s.d.].

⁸⁵ Wu, S.; Dong, T.; Li, Y.; Sun, M.; Qi, Y.; Liu, J.; Kuss, M. A.; Chen, S.; Duan, B. State-of-the-art review of advanced electrospun nanofiber yarn-based textiles for biomedical applications. *Applied Materials Today* **2022**, 27, 101473. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2022.101473>.

⁸⁶ Toriello, M.; Afsari, M.; Shon, H.; Tijing, L. Progress on the Fabrication and Application of Electrospun Nanofiber Composites. *Membranes* **2020**, 10, 204. <https://doi.org/10.3390/membranes10090204>.

⁸⁷ J.Freeman. *Steffe Rheological methods in food process engineering* [s.d.].

⁸⁸ Lahoud, M. H.; Campos, R. ASPECTOS TEÓRICOS RELACIONADOS À REOLOGIA FARMACÊUTICA. *VA* **2010**, 11, <https://doi.org/10.5380/acd.v11i1.21356>.

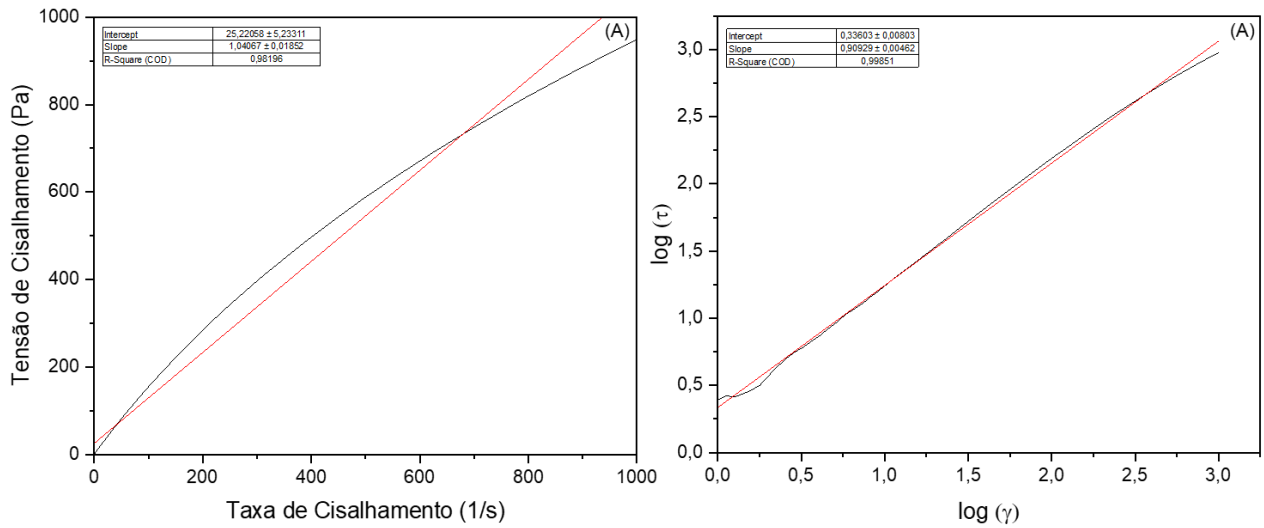
⁸⁹ Abd Mutalib, M.; Rahman, M. A.; Othman, M. H. D.; Ismail, A. F.; Jaafar, J. *Em Membrane Characterization* Elsevier, 2017.

⁹⁰ Tan, G.; Sağlam, S.; Emül, E.; Erdönmez, D.; Sağlam, N. Synthesis and characterization of silver nanoparticles integrated in polyvinyl alcohol nanofibers for bionanotechnological applications. *Turk J Biol* **2016**, 40, 643. <https://doi.org/10.3906/biy-1505-71>.

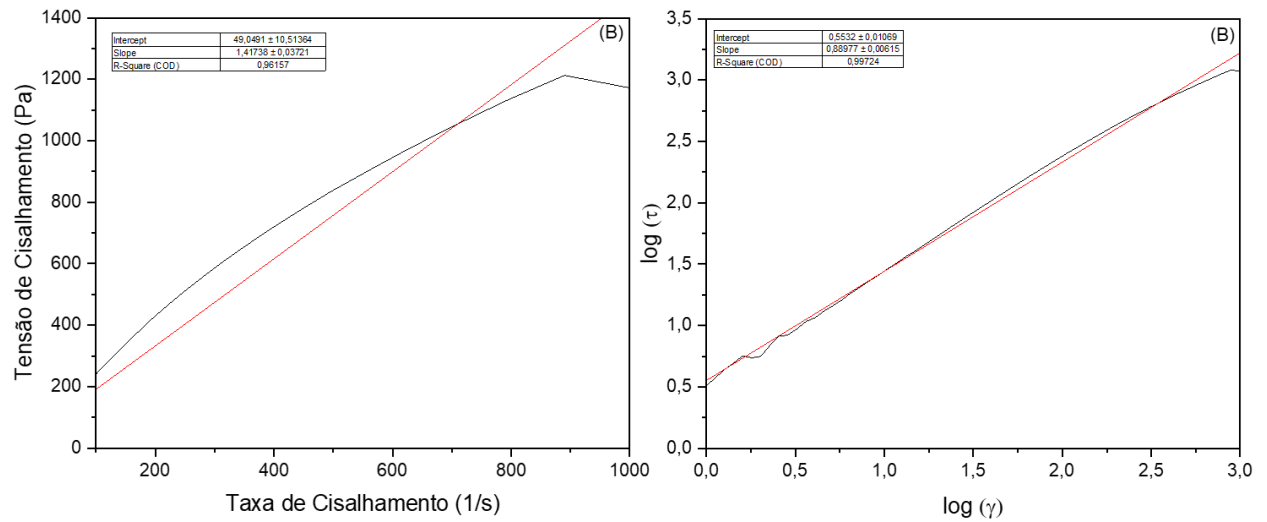
⁹¹ Wang, Q.; Liu, S.; Lu, W.; Zhang, P. Fabrication of Curcumin@Ag Loaded Core/Shell Nanofiber Membrane and its Synergistic Antibacterial Properties. *Front. Chem.* **2022**, *10*, 870666. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.870666>.

ANEXO

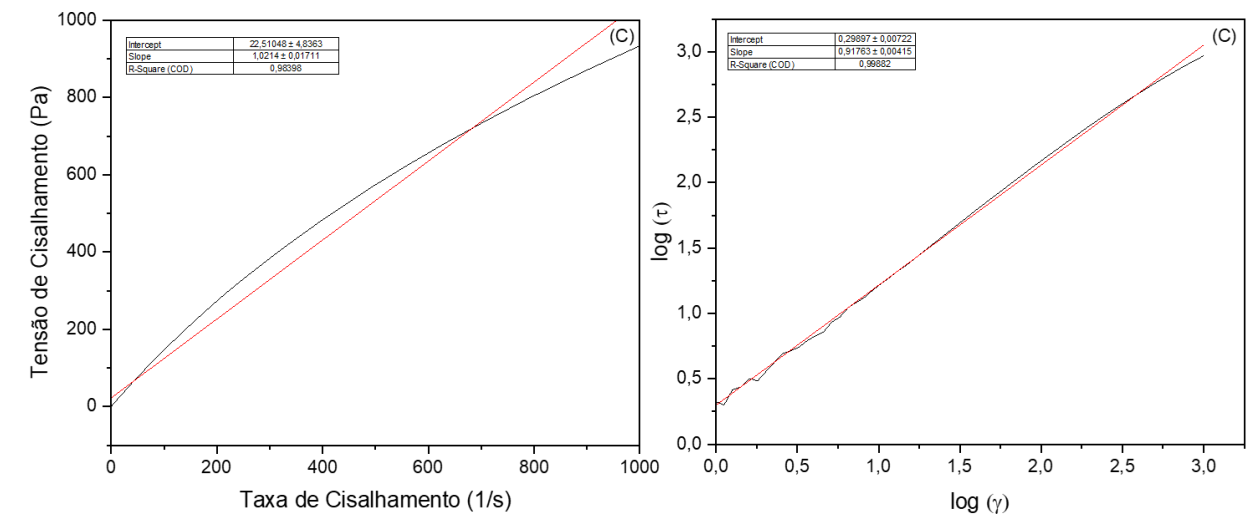
Anexo A. Reograma de fluxo para a amostra de 0,5% m/V F-127 e os ajustes lineares utilizados para determinação dos parâmetros.



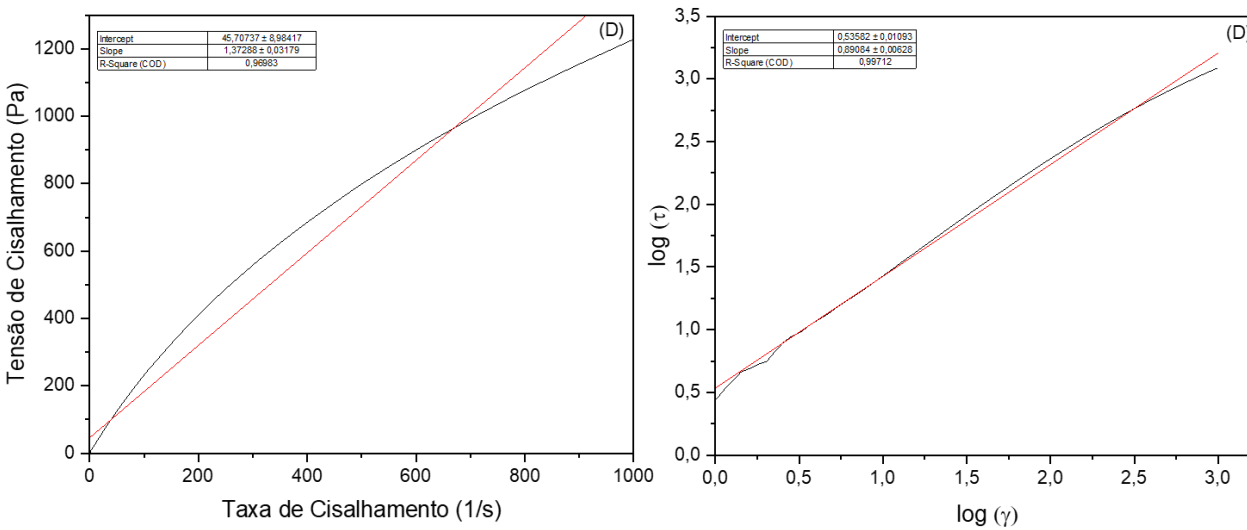
Anexo B. Reograma de fluxo para a amostra de 0,5% m/V F-127/RB e os ajustes lineares utilizados para determinação dos parâmetros.



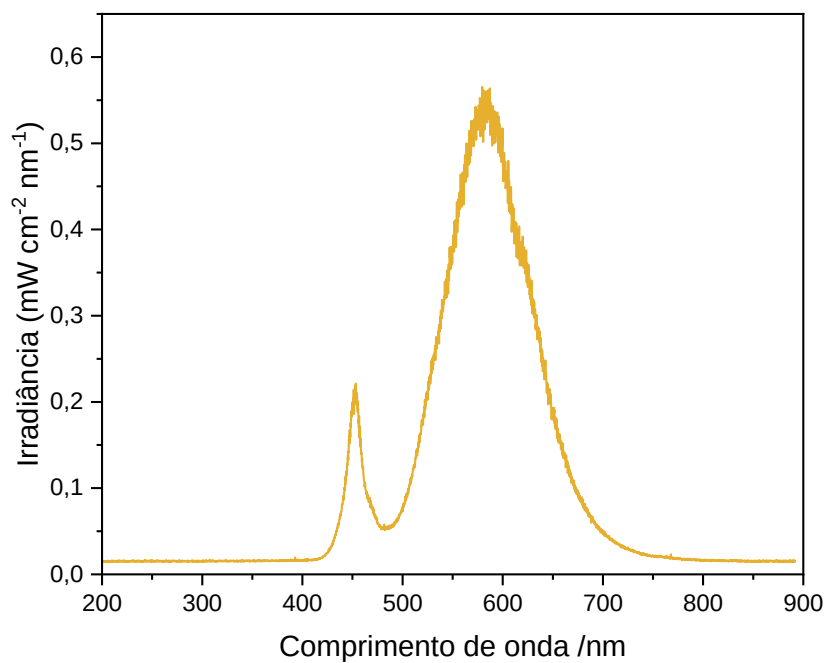
Anexo C. Reograma de fluxo para a amostra de 0,5% m/V F-127/AgNPs e os ajustes lianeares utilizados para determinação dos parâmetros.



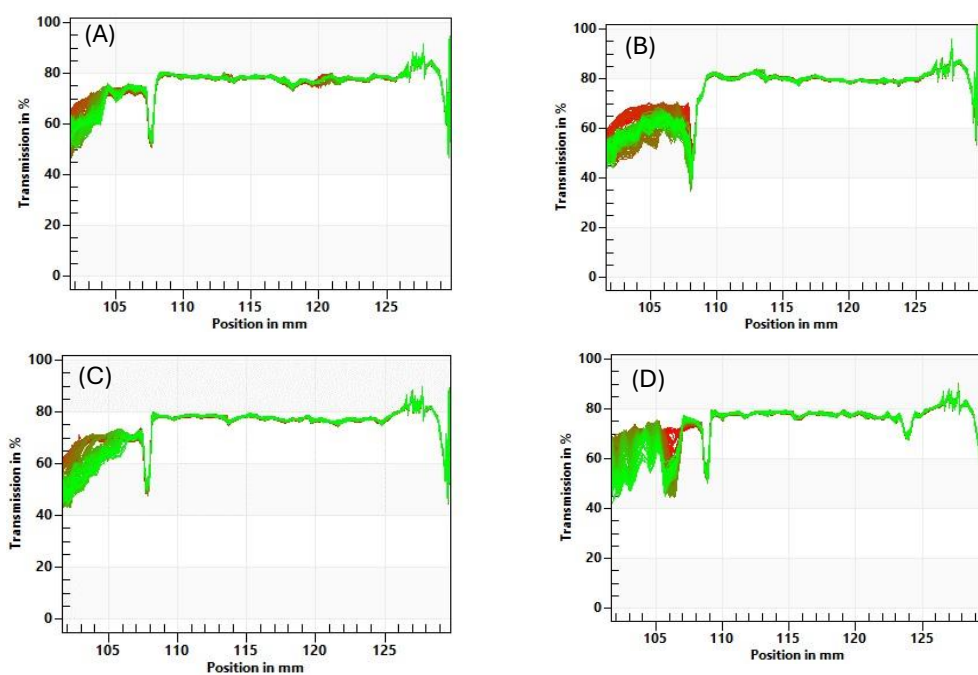
Anexo D. Reograma de fluxo para a amostra de 0,5% m/V F-127/RB/AgNPs e os ajustes lianeares utilizados para determinação dos parâmetros.



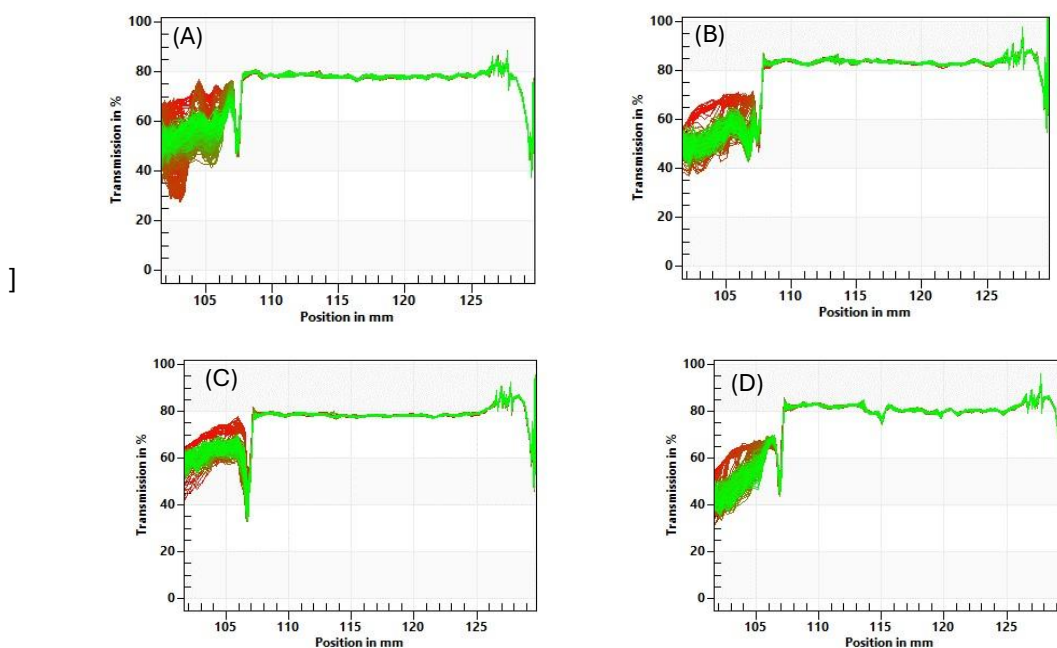
Anexo E. Espectro de emissão – Fonte de luz utilizada no experimento para determinação do rendimento de oxigênio singlete.



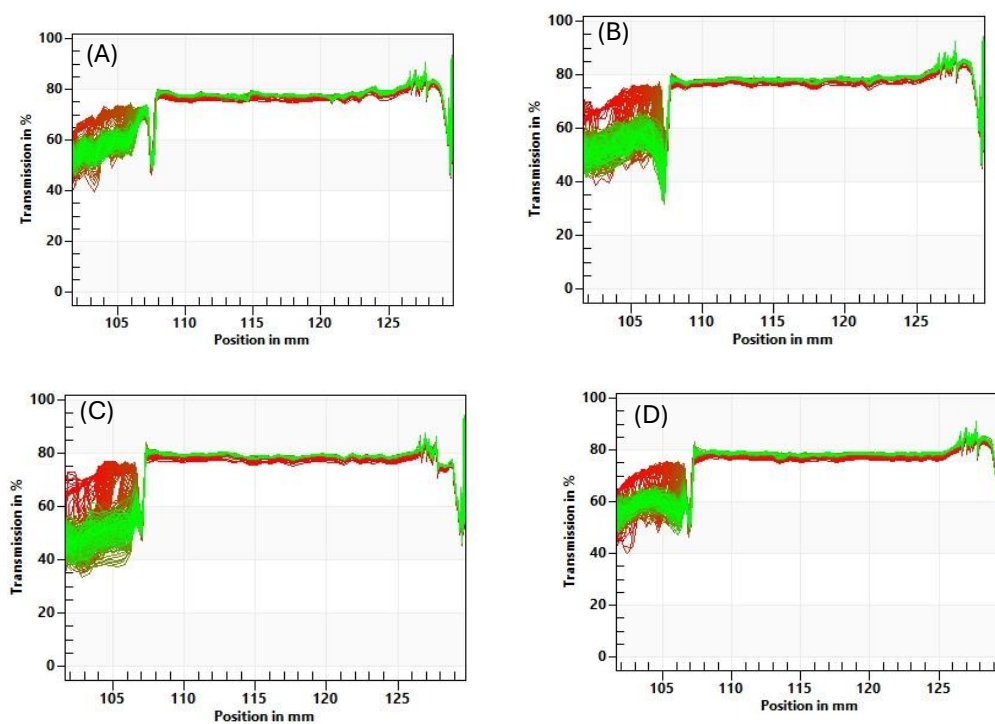
Anexo F. Gráfico de integração das amostras de F-127 sendo [F-127]: **(A)** 0,5% m/V **(B)** 1,0% m/V **(C)** 2,0% m/V e **(D)** 4,0% m/V.



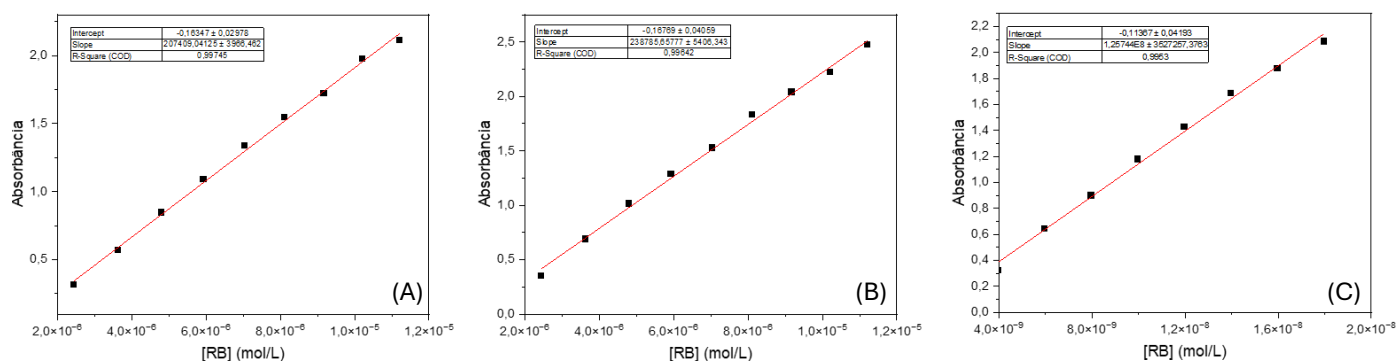
Anexo G. Gráfico de integração das amostras de F-127/RB sendo [F-127]: **(A)** 0,5% m/V **(B)** 1,0% m/V **(C)** 2,0% m/V e **(D)** 4,0% m/V.



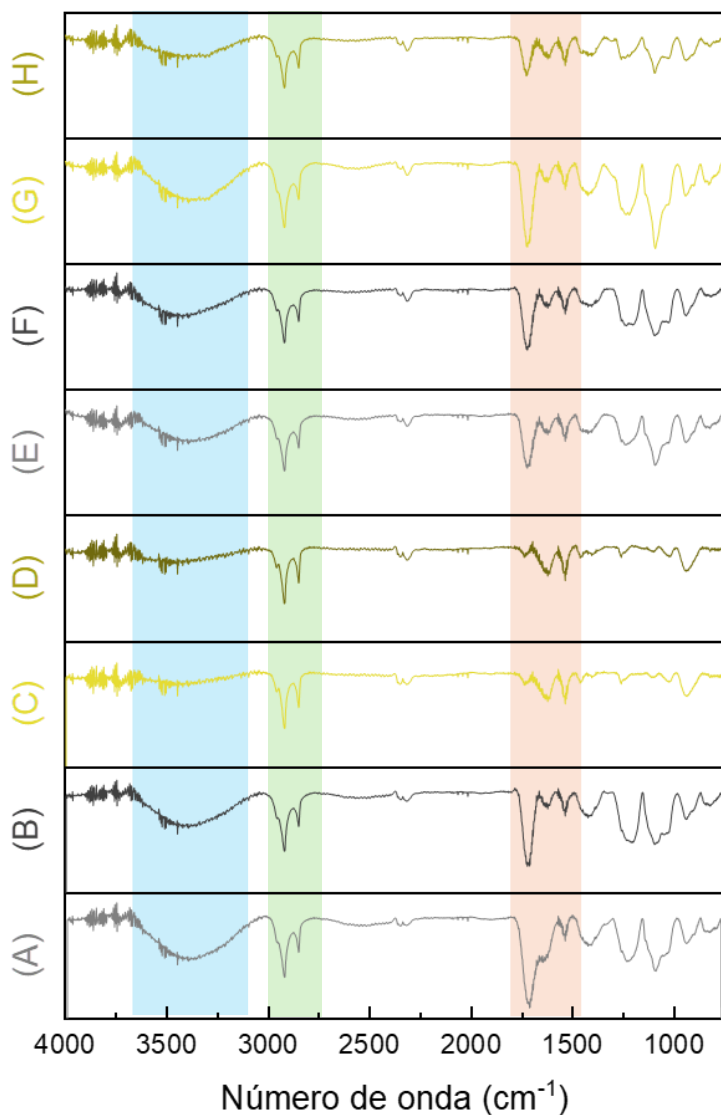
Anexo H. Gráfico de integração das amostras de F-127/AgNPs sendo [F-127]: **(A)** 0,5% m/V **(B)** 1,0% m/V **(C)** 2,0% m/V e **(D)** 4,0% m/V.



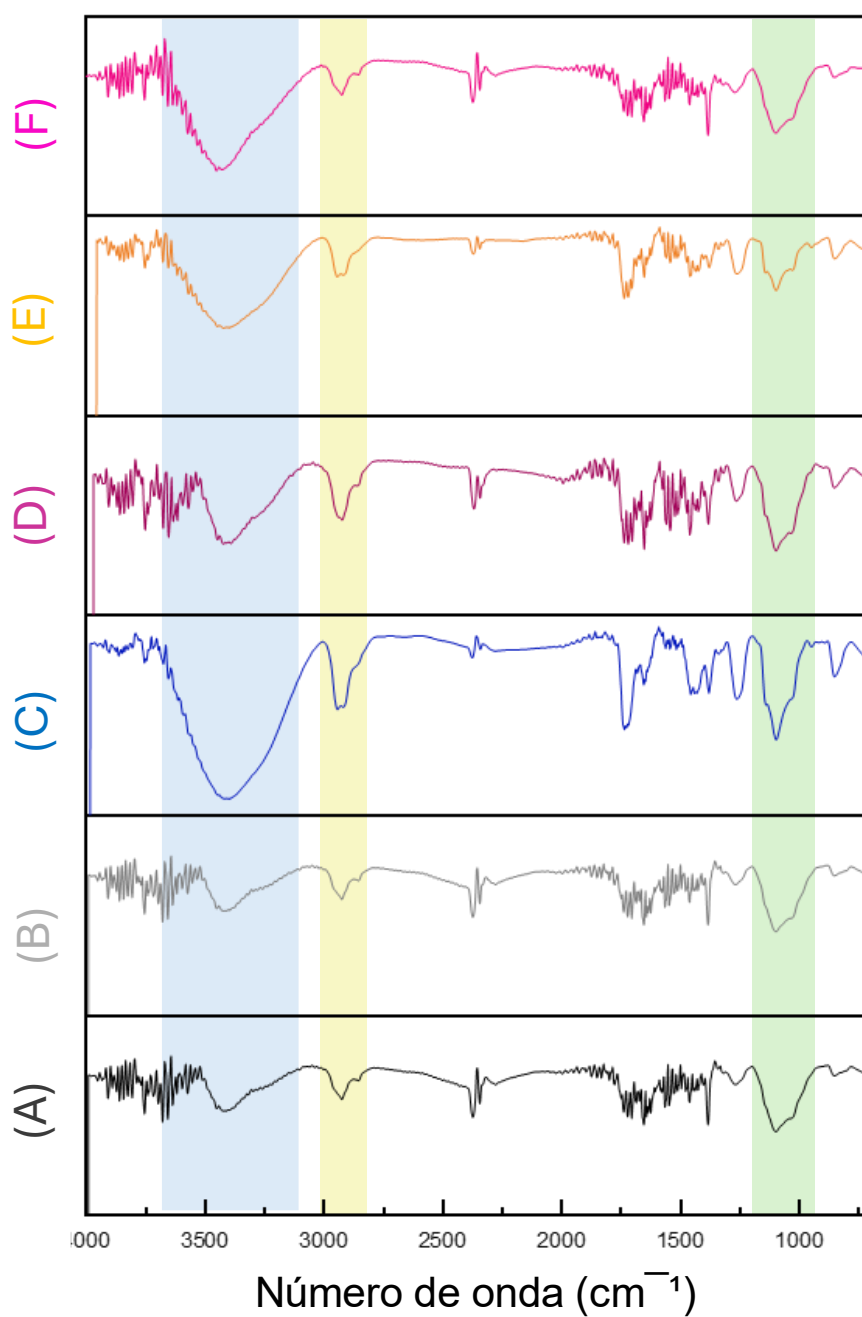
Anexo J. Curvas de calibração da RB em FSF com (A) pH=5,0 (B) pH=7,4 e (C) pH=8,0.



Anexo K. Espectro de FTIR-ATR para (A) PVA/0,5% F-127/Ácido cítrico (B) PVA-Reticulado/0,5% F-127 (C) PVA/0,5% F-127/Ácido cítrico/AgNPs (D) PVA-Reticulado/0,5% F-127/AgNPs (E) PVA/2,0% F-127/Ácido cítrico (F) PVA-Reticulado/2,0% F-127 (G) PVA/2,0% F-127/Ácido cítrico/AgNPs (H) PVA-Reticulado/2,0% F-127/AgNPs.



Anexo L. Espectro de FTIR-ATR para (A) PVA puro (B) F-127 puro (C) PVA/0,5% F-127 (D) PVA/0,5% F-127/RB (E) PVA/0,5% F-127/AgNPs (F) PVA/0,5% F-127/RB/AgNPs.



Anexo M. Espectro de emissão LED utilizado para fotoindução das AgNPs.

