

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Química

Renata Fogaça Bonacin

**Hidrogéis de PVP e blendas de PVP/Polianidridos  
como potenciais curativos para feridas crônicas**

Versão corrigida da Tese defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

14/09/2011

Renata Fogaça Bonacin

**Hidrogéis de PVP e blendas de PVP/polianidridos  
como potenciais curativos para feridas crônicas**

*Tese apresentada ao Instituto de Química da  
Universidade de São Paulo para obtenção do  
Título de Doutor em Química*

*Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Catalani*

São Paulo 2011

Renata Fogaça Bonacin

**"Hidrogéis de PVP e blendas de PVP/Polianidridos como potenciais curativos para  
feridas crônicas"**

*Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para  
obtenção do Título de Doutor em Química (Química Orgânica).*

Aprovado em: \_\_\_\_\_

**Banca Examinadora**

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## **Agradecimentos**

Ao meu Deus, que me deu o dom da vida, saúde e sabedoria para que eu pudesse realizar este trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Henrique Catalani, meu orientador, por ter acreditado em mim, por ter apostado em mim e por ter sido o meu norte na execução deste trabalho.

À minha mãe, Izabel, por ser simplesmente tudo para mim.

Ao meu esposo, Juliano, por toda a compreensão e ajuda neste período. Pelas horas dedicadas e pelas contribuições durante a elaboração desta tese. Pelo amor e pela cumplicidade.

Ao grande amigo e colaborador Vitor Zamarion, por toda a contribuição científica trazida a este trabalho. Pelas constantes discussões e, acima de tudo, pela amizade.

Aos meus colegas do Laboratório de Biomateriais Poliméricos, Alliny, Antônio, Daniel, Danielle, Flávia, Janaína, Luís Carlos, Mariana, Patrícia, Ricardo, Romeu e Vânia. Agradeço pela amizade e pelos anos que passamos juntos.

Aos alunos de IC, Daniel, Flávia, Mayara, Nathalia, Henrique e Felipe pela agradável convivência.

À Dra. Kathryn E. Uhrich por me receber em seu laboratório durante o meu estágio de doutorado e pela contribuição trazida a este trabalho. Agradeço também a todo o seu grupo pela amizade e pelo acolhimento no período em que estive na *Rutgers Univeristy*.

Aos professores Dr. Koiti Araki e Dr. Henrique Toma pela colaboração durante a execução de parte deste trabalho.

A todos os meus amigos de dentro e fora da USP que foram, e que são, minha alegria e meu porto seguro.

Aos funcionários da seção de Pós-graduação, Cibele, Emiliano, Milton e Marcelo por toda a ajuda e amizade.

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida.

*“Semeie um ato, e você colhe um hábito. Semeie um hábito, e você colhe um caráter. Semeie um caráter, e você colhe um destino.”*

*Charles Reade*

## RESUMO

Bonacin, R. F., **Hidrogéis de PVP e blendas de PVP/Polianidridos como potenciais curativos para feridas crônicas**. 2011. 185p. Tese – Programa de Pós-graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Hidrogéis compreendem uma importante classe de materiais poliméricos adequados à aplicação como curativos de feridas e queimaduras. A estrutura tridimensional hidrofílica dos hidrogéis permite que estes mantenham a umidade ideal no leito das feridas, absorvam o exsudato e não causem danos ao novo tecido durante as trocas dos curativos. No caso dos hidrogéis, essas trocas podem ser menos frequentes. Além disso, curativos que auxiliem na remoção de tecidos necrosados e ainda sejam capazes de oferecer tratamentos extras que acelerem o processo de cicatrização são desejáveis. Este trabalho apresenta a produção de materiais à base de hidrogel capazes de auxiliar neste processo de diferentes maneiras. Primeiramente, são apresentados hidrogéis formados a partir de nanofibras de poli(*N*-vinil-2-pirrolidona) (PVP) produzidas por eletrofiação, seguido da reticulação através da utilização de radiação UV-C ou reação de Fenton. A utilização da eletrofiação como técnica auxiliar na formação dos hidrogéis permitiu o controle da porosidade através da formação de fibras de diferentes diâmetros. A evidência de tal propriedade foi constatada através da produção de materiais que apresentam diferentes perfis de liberação da proteína modelo albumina de soro bovino (BSA). O hidrogel de PVP nanoestruturado foi capaz de liberar e manter a atividade da colagenase, uma

importante enzima aplicada no tratamento de feridas via desbridamento enzimático, durante as 48 horas em que foi avaliado. Além disso, hidrogéis bactericidas nanoestruturados foram produzidos a partir de nanocompósitos de PVP e nanopartículas de prata (AgNP) produzidos por eletrofiação. Esses hidrogéis apresentaram propriedades térmicas semelhantes aos hidrogéis sem AgNP, diminuindo, contudo, a sua capacidade de intumescimento. Esses hidrogéis mostraram-se ativos contra bactérias gram-positivas e gram-negativas a partir de 100 ppm de AgNPs. Adicionalmente, foi estudada a formação de um hidrogel modelo composto PVP/AgNP/Imidazol, almejando-se a produção de um material bactericida-fungicida a base de hidrogel. Este hidrogel apresentou atividade contra três espécies de *Candida* a partir de 500 ppm de imidazol no material. Embora exista a formação de um complexo estável entre AgNP e Imidazol, cálculos teóricos e a constatação da atividade fungicida corroboram com o fato de que derivados imidazólicos podem ser liberados a partir deste hidrogel híbrido. A produção de hidrogéis físicos compostos por blendas de PVP/Polianidridos sintetizados a partir de derivados de hidroxicinamatos e ácido salicílico, capazes de liberar moléculas de interesse biológico quando parcialmente degradados hidroliticamente, também é descrita neste trabalho. Os resultados indicam que interações hidrofóbicas entre a PVP e os polianidridos sintetizados podem ser responsáveis pela formação dos hidrogéis físicos e pela miscibilidade das blendas produzidas. Os hidrogéis físicos de PVP/Polianidridos foram obtidos na forma de filmes por evaporação do solvente. Micro- e nanofibras também foram obtidas por eletrofiação. Desta maneira, o

presente trabalho contribui com o desenvolvimento de uma geração de curativos multifuncionais aplicados no tratamento de feridas crônicas e queimaduras.

**Palavras-chave:** Hidrogéis, Eletrofiação, PVP, Curativos, Nanopartículas de prata, Polianidridos.

## ABSTRACT

Bonacin, R. F., **PVP hydrogels and PVP/Polyanhydride blends as potential materials for chronic wounds dressings**. 2011. 185p. PhD Thesis – Graduate program in Chemistry. Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Hydrogels comprise an important class of polymeric materials that finds application as wound and burn dressings. The hydrophilic three-dimensional structure of hydrogels helps to provide the ideal humidity at the wound bed, to remove exsudates and to prevent damages to the new tissue during dressing substitution. Furthermore, these wound dressings are able to remove necrotic tissues and, therefore, capable to offer extra treatments that would benefit the healing processes. This work describes the production of hydrogel based materials that are able to act in wound healing by different ways. First, it is presented hydrogels composed of poly(*N*-vinyl-2-pyrrolidone) (PVP) nanofibers produced by electrospinning, followed by its crosslinking using UV-C radiation or Fenton reaction. The use of electrospinning in the hydrogel formation allowed porosity control by obtaining fibers of different diameters. This was evidenced by achieving materials that present different release profiles of the model protein bovine serum albumin (BSA). The nanostructured PVP hydrogel was capable of releasing and maintaining collagenase activity during 48 hour of evaluation. This is an important enzyme that find application in wound healing based on enzymatic debridement. Moreover, nanostructured bactericidal hydrogels were produced from PVP and silver nanoparticles (AgNP) composite through electrospinning, resulting in hydrogels with thermal properties similar to those hydrogels without AgNP, decreasing its swelling ability. These hydrogels were active against gram-positives and gram-negatives bacteria starting from 100 ppm of AgNP. In addition, the production of a model hydrogel composed by PVP/AgNP/Imidazole was investigated, aiming at a bactericidal-fungicidal hydrogel based material. This

hydrogel was active against three *Candida* having 500 ppm of imidazole into the structure. In spite of the formation of a stable complex between AgNP and imidazole, theoretic calculations and the observed fungicidal activity corroborate with the fact that imidazoles derivatives can be released from this hybrid hydrogel. Physical hydrogels composed of PVP/Polyanhydrides blends were synthesized from hydroxycinnamates derivatives and salicylic acid. These materials which were capable of releasing molecules with biological potential upon hydrolysis, are also described in this work. The results indicate that hydrophobic interactions between PVP and the synthesized polyanhydrides could be responsible for the hydrogel formation and blend miscibility as well. PVP/Polyanhydride physical hydrogels were obtained from cast films. Micro- and nanofibers were also obtained by electrospinning. Thus, the present work contributes with the development of the new generation of smart dressings for wound and burn healing.

**Keywords:** Hydrogels, Electrospinning, PVP, Wound dressings, Silver nanoparticles, Polyanhydrides.

## Lista de Figuras

<b>FIGURA 1.</b> IMAGEM ILUSTRATIVA DE UMA FERIDA CRÔNICA. ....	27
<b>FIGURA 2.</b> CURATIVO AQUACEL® FORMADO POR FIBRAS DE CARBOXIMETILCELULOSE SÓDICA. ....	32
<b>FIGURA 3.</b> ILUSTRAÇÃO DA ESTRUTURA 3-D DOS HIDROGÉIS. ....	34
<b>FIGURA 4.</b> HIDROGEL DE PVP. ....	35
<b>FIGURA 5.</b> ESQUEMA ILUSTRATIVO DOS POSSÍVEIS SÍTIOS DE RETICULAÇÃO DA PVP VIA RADIAÇÃO UV-C. ....	36
<b>FIGURA 6.</b> ESQUEMA ILUSTRATIVO DOS POSSÍVEIS SÍTIOS DE RETICULAÇÃO DA PVP VIA REAÇÃO DE FENTON. ....	38
<b>FIGURA 7.</b> ESQUEMA SIMPLIFICADO DO EQUIPAMENTO DE ELETROFIAÇÃO CONFIGURADO NA POSIÇÃO VERTICAL. ....	43
<b>FIGURA 8.</b> IMAGENS ILUSTRATIVAS DE MEV DE FIBRAS DE PLGA/SAA PRODUZIDAS POR ELETROFIAÇÃO E COLETADAS DE MANEIRA (B) RANDÔMICA E (D) ORIENTADA. REPRODUZIDO DE GRIFFIN, 2011 [43]. ....	45
<b>FIGURA 9.</b> ESTRUTURA QUÍMICA DA PVP. ....	68
<b>FIGURA 10.</b> IMAGENS REPRESENTATIVAS DE MEV DAS NANOFIBRAS OBTIDAS POR ELETROFIAÇÃO PARA AS AMOSTRAS RELACIONADAS AO PLANEJAMENTO FATORIAL (2 <sup>3</sup> ). OS NÚMEROS DE CADA FIGURA EQUIVALEM AO NÚMERO DA AMOSTRA DOS ENSAIOS APRESENTADOS NA TABELA 4. ....	75
<b>FIGURA 11.</b> FRAÇÃO GEL OBTIDA PARA OS HIDROGÉIS NANOESTRUTURADOS DE PVP RETICULADOS SOB DIFERENTES DOSES DE RADIAÇÃO UV-C. ....	77

<b>FIGURA 12.</b> FRAÇÃO GEL OBTIDA PARA OS HIDROGÉIS NANOESTRUTURADOS DE PVP RETICULADOS SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE $Fe^{2+}$ , VIA REAÇÃO DE FENTON..	81
<b>FIGURA 13.</b> RAZÃO DE INTUMESCIMENTO PARA OS HIDROGÉIS DE PVP PRODUZIDOS POR ELETROFIAÇÃO E RETICULADOS POR (■) RADIAÇÃO UV-C E (□) REAÇÃO DE FENTON. .	83
<b>FIGURA 14.</b> IMAGENS REPRESENTATIVAS DE MEV DE HIDROGÉIS DE PVP PRODUZIDOS POR ELETROFIAÇÃO E RETICULADOS COM RADIAÇÃO UV-C (ESQUERDA) E REAÇÃO DE FENTON (DIREITA).....	85
<b>FIGURA 15.</b> COMPARAÇÃO DAS IMAGENS REPRESENTATIVAS DE MEV PARA OS HIDROGÉIS DE PVP RETICULADOS POR REAÇÃO DE FENTON PRODUZIDOS POR SOLUÇÃO [10] E ELETROFIAÇÃO, RESPECTIVAMENTE.....	86
<b>FIGURA 16.</b> COMPARAÇÃO ENTRE OS PERFIS DE LIBERAÇÃO DE BSA (80 MG) A PARTIR DO HIDROGÉIS DE PVP PRODUZIDOS POR ELETROFIAÇÃO COM FIBRAS DE DIÂMETRO MÉDIO DE (▲) $550\pm 50$ NM (●) $150\pm 70$ NM E (■) HIDROGÉIS DE PVP PRODUZIDOS POR EVAPORAÇÃO DE SOLVENTE.....	88
<b>FIGURA 17.</b> PERFIL DE LIBERAÇÃO DA COLAGENASE (10 MG) A PARTIR DE HIDROGÉIS DE PVP PRODUZIDOS POR ELETROFIAÇÃO E RETICULADOS POR RADIAÇÃO UV-C. ....	93
<b>FIGURA 18.</b> DETERMINAÇÃO DA MANUTENÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA COLAGENASE NOS HIDROGÉIS DE PVP.....	94
<b>FIGURA 19.</b> ESPECTRO DE EXTINÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA INCORPORADAS NAS NANOFIBRAS DE PVP. ....	101
<b>FIGURA 20.</b> IMAGENS REPRESENTATIVAS DE MEV DAS NANOFIBRAS DE PVP/AGNPs. ....	102

<b>FIGURA 21.</b> ESPECTRO DE FTIR COMPARATIVO ENTRE AS NANOFIBRAS DE PVP E PVP/AgNP .....	103
<b>FIGURA 22.</b> CURVAS TERMOGRAVIMÉTRICAS (TG E DTG) DAS NANOFIBRAS DE PVP E PVP/AgNP .....	106
<b>FIGURA 23.</b> CURVA DE DSC OBTIDA PARA AS NANOFIBRAS DE PVP E PVP/AgNP .....	107
<b>FIGURA 24.</b> IMAGEM DO HIDROGEL HÍBRIDO DE PVP/AgNP INTUMESCIDO EM ÁGUA DEIONIZADA E IMAGEM REPRESENTATIVA DE MEV .....	108
<b>FIGURA 25.</b> RAZÃO DE INTUMESCIMENTO PARA OS HIDROGÉIS DE PVP/AgNP PRODUZIDOS POR ELETROFIAÇÃO E RETICULADOS POR RADIAÇÃO UV-C.....	109
<b>FIGURA 26.</b> ESPECTROS DE ABSORÇÃO DAS SOLUÇÕES DE <b>A)</b> PVP K30/AgNP (w/o H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) E PVP K30/AgNP /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> E <b>B)</b> PVP K90/AgNP (w/o H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) E PVP K90/AgNP/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO.....	112
<b>FIGURA 27.</b> IMAGENS REPRESENTATIVAS DE MEV DAS FIBRAS DE PVP/AgNP/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> OBTIDAS POR ELETROFIAÇÃO.....	114
<b>FIGURA 28.</b> RAZÃO DE INTUMESCIMENTO PARA OS HIDROGÉIS DE PVP/AgNP PRODUZIDOS POR ELETROFIAÇÃO E RETICULADOS POR REAÇÃO DE FENTON.....	115
<b>FIGURA 29.</b> IMAGENS ILUSTRATIVAS DOS TESTES BACTERICIDAS REALIZADOS PARA OS HIDROGÉIS DE PVP/AgNP CONTRA <i>P. AERUGINOSA</i> , <i>E. COLI</i> , <i>S. AUREUS</i> (HALO DE INIBIÇÃO) E IMAGEM DO ENSAIO DE MICRODILUIÇÃO.....	118
<b>FIGURA 30.</b> ESTRUTURAS QUÍMICA DE MOLÉCULAS FUNGICIDAS CONTENDO O ANEL IMIDAZÓLICO.....	120

<b>FIGURA 31.</b> ESPECTRO SERS DAS AGNPs/IMIDAZOL (A) APÓS E (B) ANTES DA TROCA DA CAMADA PASSIVANTE DE CITRATO.....	122
<b>FIGURA 32.</b> ESPECTRO DE EXTINÇÃO DAS AGNPs FUNCIONALIZADAS COM IMIDAZOL.....	124
<b>FIGURA 33.</b> IMAGEM REPRESENTATIVA DE MEV DAS NANOFIBRAS DE PVP/AGNP/IMIDAZOL OBTIDAS POR ELETROFIAÇÃO. ....	124
<b>FIGURA 34.</b> ESTRUTURA OTIMIZADA DO IMIDAZOL, <i>N</i> -( <i>SEC</i> -BUTIL)-2-PIRROLIDONA E SEUS RESPECTIVOS ORBITAIS DE FRONTEIRA. ....	127
<b>FIGURA 35.</b> IMAGENS DOS TESTES FUNGICIDAS REALIZADOS COM OS HIDROGÉIS DE PVP/AGNP/IMIDAZOL CONTRA (A) <i>CANDIDA ALBICANS</i> , (B) <i>C. KRUSEI</i> E (C) <i>C. PARAPSILOSIS</i> . ....	131
<b>FIGURA 36.</b> ESTRUTURA QUÍMICA GERAL DOS POLIANIDRIDOS.....	132
<b>FIGURA 37.</b> ESTRUTURA QUÍMICA DO DIÁCIDO FERÚLICO. ....	135
<b>FIGURA 38.</b> ESTRUTURA QUÍMICA DO DIÁCIDO SINÁPICO. ....	137
<b>FIGURA 39.</b> ESTRUTURA QUÍMICA DO DIÁCIDO <i>P</i> -CUMÁRICO . ....	139
<b>FIGURA 40.</b> ESTRUTURA QUÍMICA DA POLIASPIRINA.....	144
<b>FIGURA 41.</b> ESPECTROS DE FTIR DO PVP E DAS BLENAS DE PVP/POLIANIDRIDOS BIOATIVOS NA PROPORÇÃO 7:3, SENDO PVP (A), PVP/PAF (B), PVP/PAS (C) E PVP/PAC (D). ....	149
<b>FIGURA 42.</b> ESPECTRO DE FTIR DA BLENDAS MISCÍVEL DE PVP/POLIASPIRINA NA PROPORÇÃO 7:3.....	150
<b>FIGURA 43.</b> HIDROGEL DE PVP/PAF.....	153

<b>FIGURA 44.</b> RAZÃO DE INTUMESCIMENTO ( $Q$ ) DOS HIDROGÉIS DE PVP/POLIANIDRIDOS EM FUNÇÃO DA PORCENTAGEM DE POLIANIDRIDO INCORPORADO NA BLENDAS.....	153
<b>FIGURA 45.</b> COMPARAÇÃO ENTRE OS VALORES DE $Q$ OBTIDOS PARA AS DIFERENTES BLENDAS DE PVP/POLIANIDRIDO NA PROPORÇÃO 7:3.....	154
<b>FIGURA 46.</b> IMAGENS REPRESENTATIVAS DE MEV DOS HIDROGÉIS DE PVP/PAF 9:1, 8:2 E 7:3 E PVP/PAS 9:1, 8:2 E 7:3, RESPECTIVAMENTE.....	156
<b>FIGURA 47.</b> IMAGEM REPRESENTATIVA DE MEV DO HIDROGEL FÍSICO FORMADO POR PVP/POLIASPIRINA NA PROPORÇÃO 7:3. ....	157
<b>FIGURA 48.</b> IMAGEM ILUSTRATIVA DA MALHA DE PVP/PAF PRODUZIDA POR ELETROFIAÇÃO. ....	159
<b>FIGURA 49.</b> IMAGENS REPRESENTATIVAS DE MEV DE PVP/PAF (7:3) (IMAGENS SUPERIORES) E PVP/PAS (7:3) (IMAGENS INFERIORES). ....	160
<b>FIGURA 50.</b> IMAGEM REPRESENTATIVA DE MEV DAS FIBRAS DE PVP/POLIASPIRINA (7:3) PRODUZIDAS POR ELETROFIAÇÃO.....	161
<b>FIGURA 51.</b> ESQUEMA SINTÉTICO DOS POLIANIDRIDOS PRODUZIDOS COM CLORETO DE DIGLICÓILA COMO MOLÉCULA CONECTORA. ....	163

## Lista de Tabelas

<b>TABELA 1.</b> MATERIAIS UTILIZADOS PARA OS EXPERIMENTOS, ESPECIFICAÇÕES E FONTE.....	48
<b>TABELA 2.</b> VALORES UTILIZADOS PARA AS VARIÁVEIS INDEPENDENTES DO PROCESSO DE ELETROFIAÇÃO. ....	50
<b>TABELA 3.</b> PARÂMETROS DE ELETROFIAÇÃO UTILIZADOS NA OBTENÇÃO DE FIBRAS DE PVP/POLIANIDRIDOS. ....	63
<b>TABELA 4.</b> VALORES UTILIZADOS PARA AS VARIÁVEIS INDEPENDENTES NA PRODUÇÃO DE NANOFIBRAS DE PVP POR ELETROFIAÇÃO E RESPECTIVOS DIÂMETROS OBTIDOS (VARIÁVEL DEPENDENTE).....	71
<b>TABELA 5.</b> VALORES DE EFEITO PRINCIPAL, F-CALCULADO* E VALOR-P PARA O DIÂMETRO MÉDIO OBTIDOS PARA AS VARIÁVEIS INDEPENDENTES E SUAS INTERAÇÕES. ....	72
<b>TABELA 6.</b> PARÂMETROS CINÉTICOS OBTIDOS PARA A LIBERAÇÃO DE BSA DE HIDROGÉIS DE PVP PRODUZIDOS POR ELETROFIAÇÃO E POR EVAPORAÇÃO DO SOLVENTE.....	90
<b>TABELA 7.</b> DADOS OBTIDOS ATRAVÉS DA ANÁLISE DAS CURVAS DE TG E DSC. ....	105
<b>TABELA 8.</b> CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CIM) DE AGNP NOS HIDROGEL DE PVP DETERMINADA POR MICRODILUIÇÃO. TETRACICLINA E PVP FORAM UTILIZADAS COMO CONTROLES. ....	117
<b>TABELA 9.</b> ATRIBUIÇÃO POR TENTATIVA DOS ESPECTROS SERS DAS AGNPs COM O IMIDAZOL [114]. ....	123

<b>TABELA 10.</b> VALORES DE ENERGIA DE IONIZAÇÃO (EI), AFINIDADE ELETRÔNICA (AE) E DUREZA ABSOLUTA ( <i>H</i> ) PARA AS MOLÉCULAS DE IMIZADOL E DE <i>N</i> -( <i>SEC</i> -BUTIL)-2-PIRROLIDONA.....	128
<b>TABELA 11.</b> ENSAIO FUNGICIDA DOS HIDROGÉIS DE PVP/AgNP/IMIDAZOL CONTRA DIFERENTES ESPÉCIES DE <i>CANDIDA</i> . ....	130
<b>TABELA 12.</b> DADOS DE RMN DE <sup>1</sup> H DO DIÁCIDO FERÚLICO SINTETIZADO E DADOS REPORTADOS NA LITERATURA [48]. ....	136
<b>TABELA 13.</b> DADOS DE RMN DE <sup>1</sup> H DO DIÁCIDO SINÁPICO SINTETIZADO E DADOS REPORTADOS NA LITERATURA [48]. ....	138
<b>TABELA 14.</b> DADOS DE RMN DE <sup>1</sup> H DO DIÁCIDO <i>P</i> -CUMÁRICO SINTETIZADO E DADOS REPORTADOS NA LITERATURA [48]. ....	140
<b>TABELA 15.</b> DADOS DE RMN DE <sup>1</sup> H DOS POLIANIDRIDOS BIOATIVOS.....	142
<b>TABELA 16.</b> DADOS DE MASSA MOLAR ( <i>M<sub>w</sub></i> ) E ÍNDICE DE POLIDISPERSIVIDADE (PDI) DOS POLIANIDRIDOS SINTETIZADOS E COMPARAÇÃO COM DADOS DA LITERATURA. ....	142
<b>TABELA 17.</b> VALORES DE TEMPERATURA DE TRANSIÇÃO VÍTREA ( <i>T<sub>g</sub></i> ) E TEMPERATURA DE DECOMPOSIÇÃO ( <i>T<sub>d</sub></i> ) OBSERVADOS PARA OS POLÍMEROS OBTIDOS E COMPARAÇÃO COM DADOS DA LITERATURA.....	143
<b>TABELA 18.</b> VALORES DE TEMPERATURA DE TRANSIÇÃO VÍTREA ( <i>T<sub>g</sub></i> ) OBSERVADOS PARA AS DIFERENTES BLENDS DE PVP/POLIANIDRIDO.....	146
<b>TABELA 19.</b> VALORES DE TEMPERATURA DE TRANSIÇÃO VÍTREA ( <i>T<sub>g</sub></i> ) OBSERVADOS PARA A POLIASPIRINA, PVP E PVP/POLIASPIRINA (7:3).....	147
<b>TABELA 20.</b> COMPORTAMENTO DOS FILMES POLIMÉRICOS EM DIFERENTES CONDIÇÕES. ...	152

**TABELA 21.** DADOS DE RMN DE  $^1\text{H}$  PARA OS POLIÁCIDOS FERÚLICO E SINÁPICO UTILIZANDO CLORETO DE DIGLICÓILA COMO MOLÉCULA CONECTORA. .... 165

**TABELA 22.** DADOS DE MASSA MOLAR ( $M_w$ ) E ÍNDICE DE POLIDISPERSIVIDADE (PDI) DOS POLIANIDRIDOS SINTETIZADOS COM CLORETO DE ADIPOÍLA E CLORETO DE DIGLICÓILA COMO MOLÉCULAS CONECTORAS. .... 165

**TABELA 23.** VALORES DE TEMPERATURA DE TRANSIÇÃO VÍTREA ( $T_g$ ) OBSERVADOS PARA OS POLIANIDRIDOS SINTETIZADOS COM CLORETO DE ADIPOÍLA E CLORETO DE DIGLICÓILA COMO MOLÉCULAS CONECTORAS. .... 166

## Lista de símbolos e abreviaturas

<b>a. u.</b>	<i>atomic units</i>
<b>AE</b>	afinidade eletrônica
<b>AgNP</b>	nanopartícula de prata
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	clorofórmio
<b>DCM</b>	diclorometano
<b>DFT</b>	<i>density functional theory</i>
<b>DMF</b>	dimetilformamida
<b>DSC</b>	calorimetria exploratória diferencial
<b>DTG</b>	derivada da curva termogravimétrica
<b>EI</b>	energia de ionização
<b>EtOH</b>	etanol
<b>FTIR</b>	Espectroscopia na região do Infravermelho com transformada de Fourier
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	peróxido de hidrogênio
<b>kV</b>	10 <sup>3</sup> volt
<b>m/m</b>	massa / massa
<b>m/v</b>	massa / volume
<b>MEV</b>	microscopia eletrônica de varredura
<b>mM</b>	10 <sup>-3</sup> mol
<b>N</b>	dureza absoluta
<b>PAC</b>	poliácido <i>p</i> -cumárico
<b>PAF</b>	poliácido ferúlico
<b>PAS</b>	poliácido sinápico
<b>PTFE</b>	politetrafluoretileno
<b>PVP</b>	polivinilpirrolidona
<b>SAA</b>	poliaspirina
<b>SEC</b>	cromatografia de exclusão de tamanho
<b>TES</b>	ácido metil-2-aminometano sulfônico tris(hidroximetil)
<b>TG</b>	termogravimetria
<b>T<sub>g</sub></b>	transição vítrea
<b>THF</b>	tetrahidrofurano
<b>UHF</b>	unrestricted Hartree–Fock

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>12</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>17</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....</b>	<b>20</b>
<b>SUMÁRIO .....</b>	<b>21</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>27</b>
1.1. PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO .....	29
1.2. TRATAMENTO DE FERIDAS CRÔNICAS – TÉCNICAS DE DESBRIDAMENTO .....	31
1.3. HIDROGÉIS .....	33
1.2.1. <i>Hidrogéis para o tratamento de feridas</i> .....	39
1.4. ELETROFIAÇÃO .....	40
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>46</b>
2.1. OBJETIVO GERAL.....	46
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
<b>3. EXPERIMENTAL.....</b>	<b>48</b>
3.1. MATERIAIS.....	48
3.2. METODOLOGIAS .....	49

3.2.1. Produção das nanofibras de PVP via eletrofição.....	49
3.2.2. Reticulação das malhas eletrofiadas de PVP via radiação UV-C.....	50
3.2.3. Reticulação das malhas eletrofiadas de PVP via reação de Fenton.....	51
3.2.4. Determinação da fração gel .....	51
3.2.5. Razão de intumescimento dos hidrogéis.....	52
3.2.6. Cinética de liberação de albumina de soro bovino.....	53
3.2.7. Liberação de collagenase e determinação da atividade enzimática.....	54
3.2.8. Produção dos nanocompósitos de PVP/AgNP e PVP/AgNP/Imidazol via eletrofição .....	56
3.2.9. Reticulação dos nanocompósitos de PVP/AgNP e PVP/AgNP/Imidazol via radiação UV-C e reação de Fenton.....	57
3.2.10. Estudo teórico da interação entre os ligantes N-(sec-butil)-2-pirrolidona e imidazol com AgNPs.....	57
3.2.11 Determinação da atividade bactericida e fungicida dos hidrogéis.....	58
3.2.12. Síntese dos monômeros precursores dos polianidridos bioativos derivados de hidroxicinamatos .....	60
3.2.13. Síntese dos polianidridos bioativos derivados de hidroxicinamatos.....	61
3.2.14 Produção das blendas de PVP/Polianidridos e hidrogéis físicos.....	62
3.2.15 Produção de fibras de PVP/Polianidridos por eletrofição.....	62
3.3. TÉCNICAS E EQUIPAMENTOS .....	63
3.3.1. Eletrofição.....	63

3.3.2. Espectroscopia Eletrônica UV-Vis.....	64
3.3.3. Espectroscopia Vibracional no Infravermelho (FTIR).....	64
3.3.4. Microscopia Raman Confocal.....	64
3.3.6. Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	65
3.3.7. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	65
3.3.8. Termogravimetria (TG).....	66
3.3.9. Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	66
3.3.10. Cromatografia por exclusão de tamanho (SEC).....	66
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE 1 .....</b>	<b>67</b>
<b>4. HIDROGÉIS DE PVP PRODUZIDOS POR ELETROFIAÇÃO .....</b>	<b>67</b>
4.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	67
4.2. ESTUDO DA PRODUÇÃO DAS NANOFIBRAS DE PVP POR ELETROFIAÇÃO .....	69
4.3. RETICULAÇÃO VIA RADIAÇÃO UV-C .....	76
4.4. RETICULAÇÃO VIA REAÇÃO DE FENTON .....	78
4.5. RAZÃO DE INTUMESCIMENTO DOS HIDROGÉIS DE PVP PRODUZIDOS POR ELETROFIAÇÃO .....	81
4.6. ANÁLISE DA ESTRUTURA POROSA DOS HIDROGÉIS .....	84
4.7. ENSAIOS DE LIBERAÇÃO DE PROTEÍNAS A PARTIR DE HIDROGÉIS DE PVP .....	86
4.7.1. Cinética de liberação de albumina de soro bovino (BSA).....	86
4.7.2. Liberação de colagenase e determinação da manutenção da atividade enzimática .....	91
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE 2 .....</b>	<b>96</b>

<b>5. HIDROGÉIS DE PVP PRODUZIDOS POR ELETROFIAÇÃO INCORPORADOS COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA E IMIDAZOL.....</b>	<b>96</b>
5.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	96
5.1.1. <i>Nanopartículas metálicas.....</i>	96
5.1.2. <i>Sistemas híbridos poliméricos .....</i>	98
5.2. HIDROGÉIS NANOESTRUTURADOS DE PVP/AGNP PRODUZIDOS POR ELETROFIAÇÃO.....	100
5.2.1. <i>Reticulação por incidência de radiação UV-C.....</i>	100
5.2.1.1. Caracterização das nanofibras de PVP/AgNP.....	100
5.2.1.2. Caracterização do hidrogel de PVP/AgNP reticulados por radiação UV-C .....	107
5.2.2. <i>Reticulação por reação de Fenton.....</i>	109
5.2.2.1. Estudo da estabilidade das AgNPs frente ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	109
5.2.2.2. Caracterização das nanofibras de PVP/AgNP/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	112
5.2.2.3. Caracterização do hidrogel de PVP/AgNP reticulados por reação de Fenton.....	114
5.3. ATIVIDADE BACTERICIDA E BACTERIOSTÁTICA DOS HIDROGÉIS DE PVP/AGNP .....	115
5.4. HIDROGÉIS NANOESTRUTURADOS DE PVP/AGNP/IMIDAZOL: MODELO PARA UM HIDROGEL MULTIFUNCIONAL .....	119
5.4.1. <i>Caracterização do sistema AgNP/Imidazol e das nanofibras de PVP/AgNP/Imidazol.....</i>	121
5.4.2. <i>Estudo teórico de interação preferencial dos ligantes N-(sec-butil)-2-pirrolidona e imidazol às AgNPs.....</i>	125
5.4.3. <i>Atividade fungicida dos hidrogéis de PVP/AgNP-Imidazol.....</i>	129

<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO - PARTE 3.....</b>	<b>132</b>
<b>6. HIDROGÉIS A PARTIR DE BLENDS MISCÍVEIS DE PVP E POLIANIDRIDOS</b>	
<b>BIOATIVOS.....</b>	<b>132</b>
6.1. POLIANIDRIDOS BIOATIVOS – CLORETO DE ADIPOÍLA COMO MOLÉCULA CONECTORA .....	134
<i>6.1.1. Síntese dos monômeros - Diácidos .....</i>	<i>134</i>
6.1.1.1. Diácido ferúlico .....	135
6.1.1.2. Diácido sinápico .....	137
6.1.1.3. Diácido p-cumárico .....	139
<i>6.1.2. Síntese dos polianidridos bioativos derivados de hidroxicinamatos .....</i>	<i>141</i>
<i>6.1.3. Poliaspirina.....</i>	<i>144</i>
6.2. CARACTERIZAÇÃO DAS BLENDS DE PVP/POLIANIDRIDOS.....	145
<i>6.2.1. Avaliação da miscibilidade das blends produzidas.....</i>	<i>145</i>
6.2.1.1. Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	145
6.2.1.2. Espectroscopia no infravermelho (FTIR).....	148
6.3. HIDROGÉIS DE PVP/POLIANIDRIDOS .....	151
<i>6.3.1. Razão de intumescimento.....</i>	<i>151</i>
<i>6.3.2. Microscopia eletrônica de varredura.....</i>	<i>155</i>
6.4. MICRO- E NANOFIBRAS DE PVP/POLIANIDRIDOS POR ELETROFIAÇÃO.....	157
6.5. SÍNTESE DE NOVOS POLIANIDRIDOS BIOATIVOS – CLORETO DE DIGLICÓILA COMO MOLÉCULA	
CONECTORA.....	161

**7. CONCLUSÃO ..... 168**

**8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....170**

## 1. INTRODUÇÃO

Em linhas gerais, define-se ferida como toda e qualquer interrupção presente no tecido epitelial, mucosas ou órgãos, causada por algum trauma ou por um conjunto de sintomas, prejudicando suas funcionalidades básicas [1, 2].

As feridas podem ser classificadas em agudas e crônicas [2, 3]. As feridas agudas são aquelas em que o processo de cicatrização é concluído de maneira ordenada e dentro do tempo esperado. Além disso, sua anatomia e funcionalidade resultantes são satisfatórias. Quando o processo de cicatrização não acontece de maneira ordenada, estacionando-se na fase inflamatória, a ferida é classificada como crônica (Figura 1).



**Figura 1.** Imagem ilustrativa de uma ferida crônica.

Fonte: <http://www.coloplast.com.br>, acessado em 06/2011

O processo de cicatrização define-se como um sistema ordenado de fenômenos dinâmicos que se apresentam como resposta à ação de vários tipos de células, a exemplo de inflamatórias, plaquetárias, epiteliais e fibroblastos, que atuam conjuntamente para a recuperação dos tecidos lesionados [1, 2].

Os mecanismos de cicatrização podem ser classificados como fechamento primário ou por primeira intenção, onde há reepitelização com mínima formação de tecido de granulação. Também podem ocorrer por fechamento secundário (segunda intenção ou espontâneo), onde as feridas são mantidas abertas e a cicatrização depende da formação do tecido de granulação e contração da ferida. O terceiro tipo denomina-se fechamento primário tardio, onde técnicas de desbridamento são aplicadas juntamente com antibioticoterapia, visto que geralmente são acompanhados por contaminação e/ou infecção [1, 2, 4]. O foco maior de aplicação dos materiais desenvolvidos neste trabalho é neste terceiro processo de cicatrização.

### **1.1. Processo de cicatrização**

A resposta do tecido às lesões (cicatrização) pode ser dividida em três fases que, geralmente, encontram-se sobrepostas, sendo: (1) inflamatória, (2) proliferativa e (3) de maturação [3].

#### *Fase inflamatória ou exudativa*

A fase inflamatória tem duração de um a quatro dias, tendo como objetivo limitar a extensão da área lesionada, combater a contaminação por bactérias e controlar o acúmulo de debris celulares.

#### *Fase proliferativa ou regenerativa*

Também é conhecida como fase de reparação, onde se dá início à síntese dos componentes da matriz extra-celular (fibrogênese), rica em ácido hialurônico e colágeno tipo I e III. Concomitantemente a esta, ocorre a proliferação de células endoteliais, com o processo de angiogênese (vascularização) e infiltração densa de macrófagos, resultando na formação do tecido de granulação.

Nessa fase é possível observar a ocorrência de eventos como a modificação da matriz extracelular (diminuição do colágeno III e aumento da proporção do colágeno tipo I) e a ativação dos queratinócitos (epitelização).

#### *Fase de maturação ou reparativa*

Compreende a formação do tecido cicatricial, composto por colágeno e pobremente vascularizado. Esta fase é longa, e pode ser avaliada clinicamente através de medições da força tênsil da ferida que, geralmente, atinge um valor de até 80% da força apresentada pela pele íntegra.

Diversos fatores podem influenciar de maneira negativa o processo de cicatrização. Dentre os mais comuns destacam-se desnutrição, perfusão tecidual de oxigênio, diabetes e principalmente infecção por fungos e/ou bactérias. Se a contaminação por bactérias estiver acima de 10<sup>5</sup> unidades formadoras de colônia (UFC) por miligrama de tecido, ocorre a interrupção do processo de cicatrização, mesmo com a utilização de enxertos ou recobrimentos secundários.

A infecção por bactérias atinge a fase inflamatória de maneira a prolongá-la, resultando na reepitelização, contração e deposição de colágeno, o que dá origem, nestas condições, ao tecido necrosado.

## **1.2. Tratamento de feridas crônicas – técnicas de desbridamento**

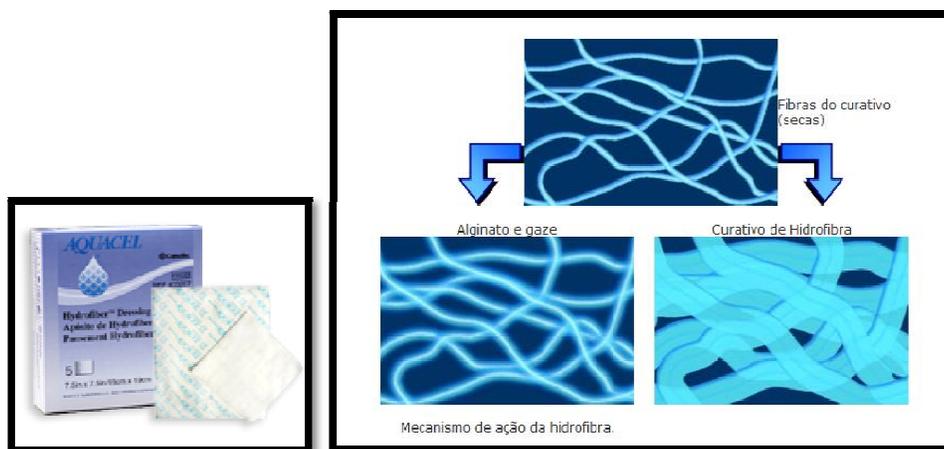
Os agentes e procedimentos utilizados para o tratamento de feridas crônicas são diversos, onde técnicas de desbridamento são comumente empregadas. O desbridamento nada mais é do que a limpeza, que tem como objetivo a remoção de tecidos necrosados e corpos estranhos que permaneceram aderidos ao leito da ferida. As técnicas de desbridamento são divididas em cirúrgico, mecânico, autolítico e enzimático [1-3].

No desbridamento cirúrgico, como o próprio nome já diz, a remoção dos detritos é realizada através de uma intervenção cirúrgica. Entretanto, existem muitos pacientes com restrições a esse processo, sendo necessária a utilização de tratamentos alternativos.

O desbridamento mecânico é a menos seletiva dentre todas as técnicas, podendo causar dano ao novo tecido de granulação. O local é lavado com jatos de

água e são utilizados curativos de gaze (secos ou úmidos) para auxiliar o processo de limpeza.

O desbridamento autolítico consiste em um procedimento seletivo, onde curativos úmidos tais como hidrogéis, alginatos e hidrocolóides (Figura 2) são empregados para promover a ação de enzimas do próprio corpo capazes de remover o tecido não viável. Contudo, trata-se de um procedimento lento, onde geralmente são empregados outros métodos de desbridamento como alternativa.



**Figura 2.** Curativo Aquacel® formado por fibras de carboximetilcelulose sódica.

Fonte: <http://www.convatec.com.br>, acessado em 06/2011.

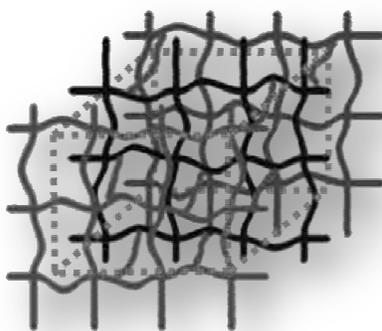
Por fim, no desbridamento enzimático, enzimas proteolíticas são utilizadas para a remoção dos tecidos necrosados. Este método é bastante seletivo e promove, assim como o autolítico, a formação do tecido de granulação. Entretanto, os procedimentos de aplicação dessas enzimas causam dor considerável aos pacientes. Geralmente, são realizados utilizando-se materiais duros para a distribuição homogênea da pomada contendo a enzima por toda a extensão da ferida, seguidos de cobertura com curativo de gaze.

Neste sentido, os curativos a base de hidrogel apresentam-se como materiais promissores, pois além de manterem uma umidade ideal ao processo de cicatrização, estes são macios e não causam danos aos tecidos de granulação. Além disso, os hidrogéis podem atuar como sistemas de liberação de ativos que aumentam a eficiência do tratamento.

### **1.3. Hidrogéis**

Hidrogéis são redes poliméricas capazes de absorver e reter volumes de água e fluidos corpóreos sem se dissolver [5]. Para isso, os hidrogéis possuem em sua estrutura porções ou domínios hidrofílicos que são hidratados, além de ligações

cruzadas entre as cadeias poliméricas, dando origem à sua estrutura 3-D (Figura 3) [5]. As ligações cruzadas, ou reticulações, são tipicamente de natureza covalente ou iônica. Todavia, ligações hidrogênio, forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas também podem formar reticulações, gerando redes intumescidas que possuem o comportamento de hidrogéis [6].



**Figura 3.** Ilustração da estrutura 3-D dos hidrogéis.

Deste modo, os hidrogéis são comumente classificados como químicos ou físicos, de acordo com a natureza das suas ligações cruzadas. Além disso, podem ser de origem natural ou sintética, neutros ou iônicos, formados ou não a partir de IPNs ou semi-IPNs (IPN - *interpenetrating polymer network* - rede polimérica interpenetrante) [6, 7].

A poli(*N*-vinil-2-pirrolidona) (PVP) vem sendo amplamente utilizada para a produção de hidrogéis visando aplicações biomédicas [8-21]. Este polímero destaca-se por ser biocompatível e apresentar caráter hidrofílico e hidrofóbico (anfifílico) [22, 23], o que possibilita a formação de hidrogéis, bem como a inclusão de moléculas de interesse com natureza hidrofóbica.

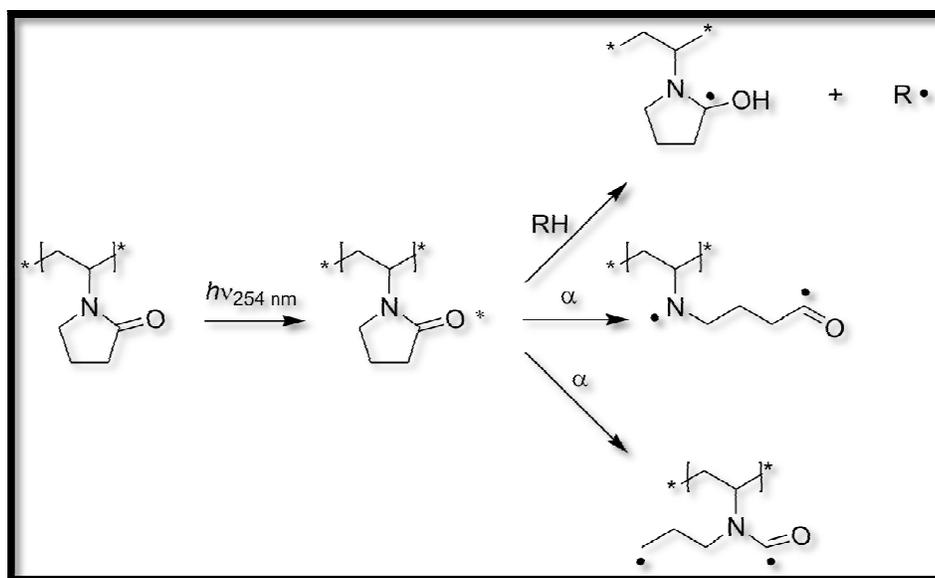
O grupo de pesquisas liderado pelo Prof. Dr. Luiz H. Catalani tem se dedicado ao longo dos anos no desenvolvimento de hidrogéis a partir de PVP (Figura 4), bem como no estudo de diferentes métodos de produção [10, 15, 18, 24-26]. Dentre as principais metodologias para a reticulação da PVP, destacam-se duas que possuem alta relevância na produção de macroradicaís neste trabalho: a utilização de radiação UV-C e reação de Fenton.



**Figura 4.** Hidrogel de PVP.

Fonte: <http://www.revistapesquisa.fapesp.br>, acessado em 06/2011.

A Figura 5 apresenta os principais sítios de geração de macrorradicais na estrutura da PVP via fotólise. A utilização da radiação UV-C para a reticulação de polímeros e formação de hidrogéis possui a vantagem de excluir as impurezas e traços de monômeros e/ou moléculas conectoras comumente utilizadas na formação de ligações cruzadas. Possui ainda vantagens com relação à utilização de radiação gama ( $\gamma$ ), visto que o aparato necessário à radiação UV-C é consideravelmente mais simples.

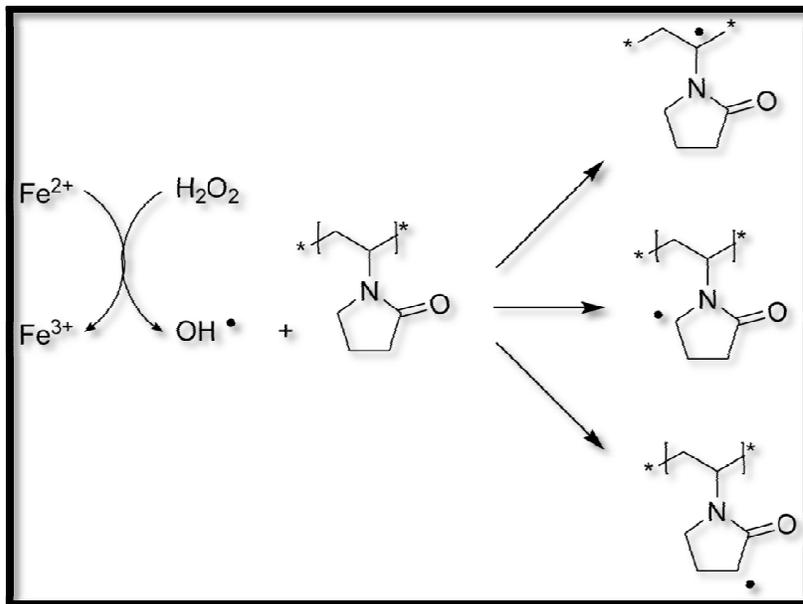


**Figura 5.** Esquema ilustrativo dos possíveis sítios de reticulação da PVP via radiação UV-C.

Em termos operacionais, a utilização da reação de Fenton como metodologia para a reticulação da PVP apresenta vantagem ainda maior, pois não exige equipamento algum. Por outro lado, envolve a geração e complexação de  $Fe^{3+}$ , o que pode representar um problema caso seja necessário a incorporação de moléculas ou biomoléculas sensíveis a este íon. A Figura 6 ilustra as possibilidades de geração de macroradicaís na estrutura da PVP através da reação de Fenton.

A reação de Fenton compreende uma sequência de processos redox que resultam na geração de radicais hidroxila, altamente reativos. Tal processo ocorre pela reação das espécies  $Fe^{2+}$  e  $H_2O_2$ , conforme representado de maneira global pela Equação 1. Além de aplicada à produção de hidrogéis, a reação de Fenton é largamente utilizada no tratamento de águas e efluentes [27, 28].





**Figura 6.** Esquema ilustrativo dos possíveis sítios de reticulação da PVP via reação de Fenton.

Trabalhos como o publicado por Wichterle e Lim [29] conferiram impacto à utilização dos hidrogéis como biomateriais. Além da capacidade de reter fluidos, propriedades como maciez e elasticidade tornam os hidrogéis interessantes materiais para aplicações como sistemas de encapsulação e liberação controlada de fármacos ou curativos para feridas crônicas e queimaduras.

### 1.2.1. Hidrogéis para o tratamento de feridas

As vantagens da utilização de materiais com características de hidrogéis para o tratamento de feridas têm sido apontadas há tempos [30]. Historicamente, a proteção do leito da ferida contra agentes externos tem sido parte integrante do tratamento. Além disso, trabalhos como os publicados por Winter [31], Hinman e Mailback [32] apontaram que o processo de reepitelização é consideravelmente melhorado em feridas úmidas quando comparado ao tratamento realizado em feridas secas.

Adicionalmente, o trabalho publicado por Winter descreve a importância da manutenção da umidade do leito da ferida, auxiliando enzimas como as colagenases e proteinases na capacitação de migração de células através da ferida para onde há fibrina. Quando uma ferida fica seca ocorre a formação de uma crosta, fazendo com que as células epiteliais penetrem mais profundamente na ferida para encontrar a umidade necessária para a sua proliferação.

Atualmente, muitas empresas têm focado no desenvolvimento da tecnologia de produção de hidrogéis para aplicação em curativos para feridas ou mesmo para cuidados da pele em geral. Como exemplo dessas companhias tem-se a *Zhejiang*

*Kanglidi Medical Articles Co. Ltd.*, que desenvolve diversos kits de primeiros socorros e, dentre estes, hidrogéis com ou sem íon prata em diferentes formatos para a adequação a diferentes feridas. A *AquaMed Technologies INC.*, comercializa hidrogéis de PEO/PVP, utilizando radiação de alta energia como fonte principal de reticulação.

De maneira geral, espera-se que um curativo seja capaz de manter a umidade ideal no leito da ferida, ocasione mínima dor ao paciente durante o tratamento, absorva os exudatos produzidos, seja de fácil aplicação e remoção e mantenha a integridade do tecido de granulação. Além disso, o curativo deve conter ativos que promovam a cicatrização de maneira mais eficiente e seja poroso, permitindo trocas gasosas entre o leito da ferida e o ambiente.

Neste sentido, a eletrofiação apresenta-se como uma técnica bastante promissora para produção de materiais porosos a partir de fibras.

#### **1.4. Eletrofiação**

Os processos convencionais aplicados à produção de fibras poliméricas possuem a limitação de não gerar fibras menores que 2  $\mu\text{m}$ . Neste sentido, a

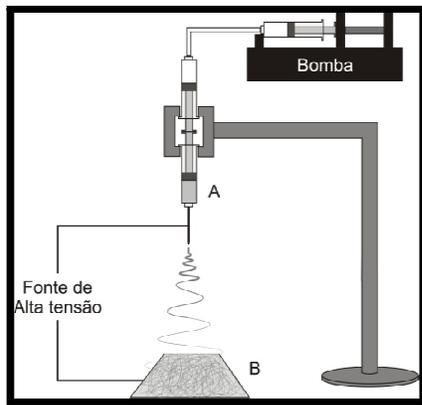
eletrofiação (*electrospinning*) apresenta-se como uma técnica relativamente simples, de baixo custo e eficiente para a produção de materiais fibrosos na escala nanométrica e sub-micrométrica. O produto resultante da eletrofiação é uma malha tramada na forma de um não-tecido com elevada área superficial [33-35].

Os materiais produzidos por eletrofiação são maleáveis, podendo adquirir uma variedade de formas e tamanhos. Além disso, existe a possibilidade de se controlar a composição das malhas para alcançar uma propriedade desejada, principalmente quando características interfaciais e porosidade possuem significativa importância [36]. Desta maneira, as nanofibras podem ser produzidas por uma imensa variedade de materiais, incluindo polímeros sintéticos e naturais [33, 34].

Embora a utilização da eletrofiação na produção de materiais fibrosos tenha ocupado posição de destaque nos últimos anos, os primeiros relatos da produção de nanofibras foram publicados nos Estados Unidos em 1902 [37, 38]. Após isso, muitas patentes foram publicadas nas décadas de 30 e 40, descrevendo experimentalmente esta técnica, dentre elas a patente de Formhals, publicada em 1934 [39].

Devido a inúmeras vantagens, a técnica de eletrofiação tem despertado a atenção de muitos pesquisadores, resultando na produção de materiais para as mais diversas aplicações, tais como: filtros, sensores químicos e óticos, suportes para crescimento celular e imobilização de enzimas, curativos, sistemas de liberação controlada, entre outros [33, 34, 40, 41].

A técnica de eletrofiação possui semelhanças em termos operacionais com a técnica de eletropulverização (*electrospraying*). O equipamento de eletrofiação é simples, sendo composto por uma fonte de alta voltagem conectada a uma agulha de pequeno diâmetro (*spinneret*), uma bomba de infusão e um alvo coletor metálico. Pode ser configurado nas posições horizontal e vertical, adequando-se às diferentes necessidades dos sistemas poliméricos utilizados (Figura 7).



**Figura 7.** Esquema simplificado do equipamento de eletrofiação configurado na posição vertical.

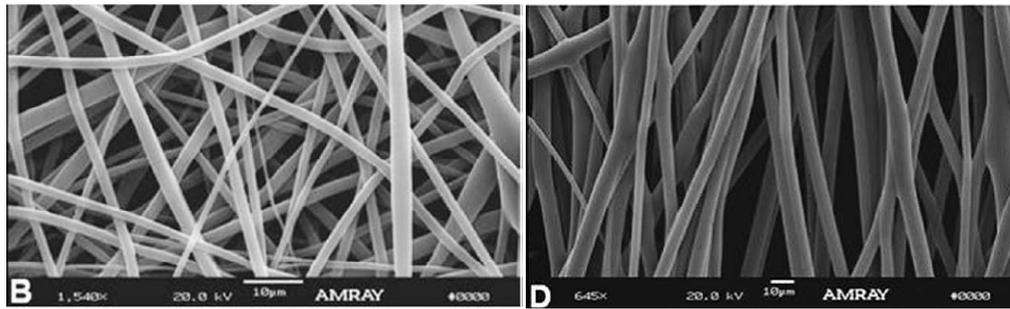
O procedimento geral baseia-se no estabelecimento de um campo elétrico entre o coletor metálico e a agulha conectada ao recipiente contendo a solução ou fundido polimérico. Em consequência deste campo elétrico, cargas são injetadas no sistema polimérico, que é forçado a passar através da agulha pela ação da bomba de infusão. Inicialmente, devido à tensão superficial da solução, é formada na extremidade da agulha uma gota com superfície esférica ou semi-esférica, que é alongada quando as forças de atração superam a tensão superficial do líquido ali presente, gerando uma estrutura conhecida como cone de Taylor. Neste momento, a solução polimérica é ejetada em direção ao anteparo coletor, e, durante o trajeto

ocorre a evaporação do solvente e eventos que resultam no estiramento e na deposição de fibras de diâmetros nanométricos e sub-micrométricos [34].

Os eventos que geram a alongação e a redução significativa do diâmetro do jato polimérico são, majoritariamente, provocados pelo acúmulo de cargas na superfície que se repelem. Esta repulsão é o fator básico que promove o estiramento. Além disso, a distribuição heterogênea das cargas na superfície acabam gerando instabilidade do jato polimérico em seu trajeto, sendo expressada por um movimento de chicoteamento conhecido como *whipping*. [34, 42]

A espessura da malha formada, bem como características morfológicas, tais como diâmetro das fibras, porosidade e tamanho de poro podem ser controlados a partir de parâmetros de solução (viscosidade, tensão superficial, elasticidade e condutividade) e variantes do processo de eletrofiação (voltagem aplicada, fluxo, distância de trabalho, entre outras).

Diversos tipos de coletores metálicos podem ser utilizados no processo de eletrofiação. Estes coletores são determinantes em relação à orientação das fibras produzidas, que podem ser depositadas de maneira randômica ou orientadas em uma dada direção (Figura 8), adequando-se à aplicação desejada.



**Figura 8.** Imagens ilustrativas de MEV de fibras de PLGA/SAA produzidas por eletrofiação e coletadas de maneira (b) randômica e (d) orientada. Reproduzido de Griffin, 2011 [43].

Para se obter êxito nos materiais produzidos por eletrofiação, as propriedades devem estar adequadas à aplicação desejada, conforme já mencionado. No caso de materiais destinados ao tratamento de feridas, devem proporcionar a regeneração do tecido, atuando nas diferentes frentes que auxiliem o processo de cicatrização.

Neste sentido, curativos produzidos por eletrofiação possuem a vantagem de serem porosos, estruturalmente semelhantes à matriz extracelular, e formados a partir de sistemas que podem conter diversos ativos favoráveis ao tratamento de feridas e queimaduras.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

O objetivo do presente trabalho é a produção de hidrogéis de PVP nanoestruturados e multifuncionais com potencial aplicação no tratamento de feridas crônicas e queimaduras. Tais curativos foram idealizados para auxiliarem significativamente nos tratamentos acima mencionados por possuírem ativos bactericidas, fungicidas e desbridantes incorporados em sua estrutura. A produção de hidrogéis capazes de liberar moléculas que apresentem atividades antiinflamatória, antioxidantes e analgésica também fizeram parte dos objetivos deste trabalho.

### **2.2. Objetivos específicos**

Como objetivos específicos deste trabalho têm-se:

- i) a produção de hidrogéis de PVP, PVP/AgNP, PVP/AgNP/Imidazol nanoestruturados por eletrofiação e reticulados com a utilização de (a) radiação UV-C e (b) reação de Fenton.

- ii) o estudo das características fundamentais destes hidrogéis, tais como morfologia, fração gel, razão de intumescimento, atividade biológica e perfil de liberação de proteínas destes materiais.
  
- iii) a produção e caracterização de hidrogéis físicos formados a partir de blendas de PVP/Polianidridos derivados de hidroxicinamatos e do ácido salicílico.
  
- iv) obtenção de fibras de PVP/Polianidridos via eletrofiação.
  
- v) síntese de novos polianidridos.

### 3. EXPERIMENTAL

#### 3.1. Materiais

Todos os reagentes para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados da maneira em que foram recebidos, sem nenhuma purificação extra.

Os compostos, polímeros, proteínas e solventes utilizados e suas fontes encontram-se descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Materiais utilizados para os experimentos, especificações e fonte.

Reagente	Empresa
Poli( <i>N</i> -2-vinil-pirrolidona) K90, Mw 1.300.000	ISP technologies; Sigma-Aldrich
Poli( <i>N</i> -2-vinil-pirrolidona) K30, Mw 56.000	Sigma-Aldrich
Etanol	Sinc
<i>N,N</i> -dimetilformamida	Mallinckrodt
Nitrato de prata	Sigma-Aldrich
Albumina de soro bovino	Sigma-Aldrich
Colagenase Tipo I	Sigma-Aldrich
Colágeno Tipo I	Sigma-Aldrich
TES	Sigma-Aldrich
Imidazol	Sigma-Aldrich
Ácido ferúlico	Sigma-Aldrich
Ácido sinápico	Sigma-Aldrich
Ácido <i>p</i> -cumárico	Sigma-Aldrich

---

Ácido salicílico	Sigma-Aldrich
Trifosgênio	Sigma-Aldrich
Clorofórmio	Sigma-Aldrich
Diclorometano	Sigma-Aldrich
Tetraidrofurano	Sigma-Aldrich
Cloreto de cálcio	Sigma-Aldrich
Ninidrina	Sigma-Aldrich
Citrato de sódio	Sigma-Aldrich
Etileno glicol éter monoetílico	Sigma-Aldrich
Cloreto estanoso	Sigma-Aldrich
<i>n</i> -propanol	Sinc
Éter dietílico	-
Ácido clorídrico	Sigma-Aldrich
Trietilamina	Sigma-Aldrich
Sulfato de magnésio	Sigma-Aldrich
Peróxido de hidrogênio	Sinc

---

## 3.2. Metodologias

### 3.2.1. Produção das nanofibras de PVP via eletrofiação

As nanofibras de PVP foram obtidas através de solução de PVP 15% m/v em EtOH:DMF (1:1). Esta solução, após 48 horas de agitação, foi submetida à eletrofiação com voltagem, distância de trabalho e fluxo de alimentação de 20 kV, 20 cm e 3 mL/h, respectivamente. Umidade e temperatura foram mantidas controladas

(40-50% e 20°C, respectivamente). Realizou-se um planejamento fatorial ( $2^3$ ) com o intuito de avaliar a influência dos principais parâmetros de eletrofição (variáveis independentes) no diâmetro médio das nanofibras (variável dependente). Os valores utilizados para as variáveis independentes encontram-se dispostos na Tabela 2. Os resultados obtidos a partir deste planejamento fatorial foram analisados com a utilização do programa Statistica 5.0 (StatSoft Inc.).

**Tabela 2.** Valores utilizados para as variáveis independentes do processo de eletrofição.

<b>Variáveis independentes</b>	<b>(-)</b>	<b>(+)</b>
Voltagem aplicada (kV)	12	26
Distância de trabalho (cm)	10	24
Fluxo de alimentação (mL/h)	1,5	5,0

### 3.2.2. Reticulação das malhas eletrofiadas de PVP via radiação UV-C

A reticulação das malhas eletrofiadas através da radiação UV-C foi realizada em câmara de irradiação (LuzChem ICH2) com um conjunto de 6 lâmpadas UV-C (Sankyo Denki G8T5 -  $\lambda=254$  nm). A distância entre as lâmpadas e as amostras foi

mantida constante (15 cm), variando-se apenas as doses de irradiação entre 8 e 80 kJ/cm<sup>2</sup>, aproximadamente .

### **3.2.3. Reticulação das malhas eletrofiadas de PVP via reação de Fenton**

A reticulação das malhas utilizando-se o sistema Fenton foi realizada de acordo com o seguinte procedimento adaptado da literatura [10]: Adicionou-se H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à solução de PVP 15% em EtOH:DMF (1:1) de modo a ter-se concentração final de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> igual a 50 mM. Essa solução foi eletrofiada em seguida, produzindo nanofibras de PVP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As nanofibras obtidas foram mergulhadas em uma solução aquosa de FeSO<sub>4</sub> (concentração variando de 5 a 120 mM) para a reticulação, à temperatura ambiente.

### **3.2.4. Determinação da fração gel**

A fração gel dos hidrogéis reticulados por radiação UV-C e Fenton foi determinada através da extração da fração solúvel (polímero não reticulado) em extrator Soxhlet, durante um período de 30 horas utilizando-se água deionizada como solvente. As amostras foram empacotadas em bolsas de nylon para manter a

sua integridade durante a extração e, após as 30 horas, foram secas em estufa a 70°C até atingirem massa constante. Após isso, tiveram suas massas determinadas e a fração gel calculada de acordo com as equações que se seguem:

$$s(\%) = \left( \frac{W_d - W_o}{W_d} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

$$g(\%) = 100 - s(\%) \quad (\text{Eq. 3})$$

onde,  $s(\%)$  corresponde à fração solúvel,  $g(\%)$  à fração gel,  $W_d$  é a massa do hidrogel antes da extração e  $W_o$  é a massa do hidrogel após a extração.

### 3.2.5. Razão de intumescimento dos hidrogéis

A razão de intumescimento ( $Q$ ) dos hidrogéis obtidos foi medida através da imersão dos mesmos em água deionizada, pH 6,5 a 25°C e determinada em diferentes intervalos de tempo até sua estabilização, de acordo com a Equação 4,

$$Q = \frac{w_s - w_d}{w_d} \quad (\text{Eq. 4})$$

onde,  $w_s$  corresponde à massa do hidrogel intumescido e  $w_d$  à massa do hidrogel seco.

### 3.2.6. Cinética de liberação de albumina de soro bovino

Albumina de soro bovino (BSA) foi utilizada como proteína modelo para o estudo da cinética de liberação a partir de três diferentes tipos de hidrogéis de PVP, sendo dois deles produzidos por eletrofiação, contendo fibras de diferentes diâmetros (150 nm e 550 nm), e um terceiro na forma de filme obtido por evaporação do solvente. Para tal, soluções protéicas de BSA foram preparadas (10 mg/mL; tampão fosfato pH 7,4) e aplicadas (8 mL – 80 mg de BSA) sobre uma das faces dos hidrogéis colocados em uma cela de Franz a 37°C. O experimento de liberação teve duração de 48 h e alíquotas foram retiradas a cada 2 h nas primeiras 12 h, sendo substituídas pelo mesmo volume de tampão fosfato, e analisadas por espectrofotometria UV-Vis a  $\lambda = 280$  nm.

A fração de BSA liberada ( $F_R$ ) para cada intervalo de tempo  $t$  foi determinada de acordo com a Equação 5,

$$F_R(t) = \frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (\text{Eq. 5})$$

onde,  $M_t$  é a quantidade cumulativa de BSA liberada no tempo  $t$ ,  $M_\infty$  corresponde à quantidade total de BSA incorporada ao hidrogel,  $k$  representa uma constante relacionada com a estrutura/geometria do hidrogel e  $n$  é o expoente que permite obter informações sobre o mecanismo de liberação em questão.

### 3.2.7. Liberação de colagenase e determinação da atividade enzimática

Colagenase tipo I foi utilizada para preparar uma solução 10 mg/mL em tampão TES 0,05M enriquecido com cloreto de cálcio (0,36 mM) em pH 7,5. O procedimento de liberação de colagenase a partir dos hidrogéis de PVP produzidos por eletrofiação seguiu os mesmos padrões descritos anteriormente para BSA, sendo que para este a atividade enzimática foi determinada durante o processo.

A atividade colagenolítica foi medida utilizando-se o método colorimétrico com ninidrina descrito na literatura, através da digestão de colágeno tipo I [44, 45].

Alíquotas da solução de colagenase liberadas pelo hidrogel de PVP foram adicionadas a tubos de ensaio contendo 25 mg de colágeno em 5 mL do mesmo tampão TES e incubadas a 37 ° C por 5 horas. Após isso, a reação enzimática foi interrompida pela transferência de 200 µL da solução (porção sobrenadante) para um tubo contendo 1,0 mL de solução de ácido cítrico-ninidrina (volumes iguais de solução de ninidrina 4% em etileno glicol éter monoetílico com solução de cloreto estano 7,1 mM, preparada em solução de citrato de sódio 0,2 M em pH 5,0) e aquecido em banho-maria (100°C) por 20 minutos. Após o resfriamento, 5 µL de solução de *n*-propanol/água (1:1, v/v) foi adicionada. A absorbância foi monitorada em 600 nm, e a atividade colagenolítica foi calculada e expressa em unidades/mg. Para este ensaio de liberação foram aplicados 10 mg de colagenase.

### **3.2.8. Produção dos nanocompósitos de PVP/AgNP e PVP/AgNP/Imidazol via eletrofiação**

Os nanocompósitos PVP/AgNP foram produzidos adicionando-se quantidades variadas de  $\text{AgNO}_3$  (25 – 10.000 ppm, com relação à quantidade de PVP) às soluções de PVP 15% em EtOH:DMF (1:1), seguido de agitação vigorosa para promover a redução  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Ag}^0$ , seguido do processo de eletrofiação. Para a produção dos nanocompósitos PVP/AgNP/Imidazol, o imidazol (quantidades variadas de 50 – 1.000 ppm) foi previamente coordenado às AgNPs através da redução da  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Ag}^0$  em presença de imidazol. Neste caso, 200  $\mu\text{L}$  uma solução de  $\text{NaBH}_4$  0,1M foi adicionada para promover a redução. Em seguida, a solução contendo as nanopartículas de AgNP/Imidazol foi incorporada à solução de PVP e submetidas à eletrofiação, mantendo-se a concentração final de PVP a 15%. Para PVP/AgNP foram utilizada as mesmas condições para PVP. Para o sistema PVP/AgNP/Imidazol as condições utilizadas foram: 35 kV, 22 cm e 1,5 mL/h.

### **3.2.9. Reticulação dos nanocompósitos de PVP/AgNP e PVP/AgNP/Imidazol via radiação UV-C e reação de Fenton**

A reticulação dos nanocompósitos de PVP/AgNP e PVP/AgNP/Imidazol produzidos por eletrofição com radiação UV-C foi realizada de acordo com o procedimento já descrito para as nanofibras de PVP na seção 3.2.2. Para a reticulação via reação de Fenton, utilizou-se o mesmo procedimento descrito para as nanofibras de PVP na seção 3.2.3 (adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à solução contendo PVP e AgNPs, seguido de eletrofição e imersão em solução aquosa de FeSO<sub>4</sub>).

### **3.2.10. Estudo teórico da interação entre os ligantes *N*-(*sec*-butil)-2-pirrolidona e imidazol com AgNPs**

Os cálculos foram realizados com o programa Gaussian 03 para Windows e para a visualização das estruturas foi empregado o programa GaussView 3.07.

As estruturas do imidazol e da *N*-(*sec*-butil)-2-pirrolidona foram otimizadas utilizando-se o método *ab initio* DFT (Density Functional Theory - Teoria do Funcional de Densidade) empregado o conjunto de base: 6-311G(++)(2df, 2p)/UHF. Para a otimização da geometria foi utilizado o critério de convergência de 10<sup>-6</sup> a.u. no

método de gradiente conjugado. Adicionalmente a esse método foi utilizado um método de correlação eletrônica baseado nos três parâmetros de funcional híbrido proposto por Becke [46], com a correlação funcional proposta por LYP [47], originando o funcional B3LYP [46, 47].

Para verificar se as moléculas estão no mínimo de energia potencial foram realizados cálculos vibracionais e não foram observadas frequências imaginárias.

### **3.2.11 Determinação da atividade bactericida e fungicida dos hidrogéis**

Os ensaios bactericidas e fungicidas foram realizados em colaboração com o laboratório dos professores Dra. Marina B. Martinez e Sandro R. de Almeida do departamento de análises clínicas da FCF-USP.

Para a verificação da atividade bactericida, os hidrogéis foram testados contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Para a verificação da atividade fungicida, os hidrogéis foram testados contra *Candida albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* (leveduras).

Para as leveduras, o tempo de incubação para a verificação do crescimento foi de 24 horas a 37°C. A concentração de inóculo ( $10^6$  células/mL) foi determinada

em câmara de Neubauer. Foram aplicados 20 mL do meio de cultura contendo o inóculo em cada placa de Petri e deixadas solidificar. Após isso foram colocados os hidrogéis de PVP/AgNP/Imidazol (1 x 1 cm, em concentrações de 100, 250, 500 e 1000 ppm) e os respectivos controles (discos de anfotericina B, miconazol e hidrogel de PVP e PVP/AgNP).

Para as bactérias, de maneira semelhante aos fungos, as suspensões contendo os microrganismos foram convenientemente diluídas (de acordo com a escala 0,5 de McFarland,  $10^8$  UFC/mL) e aplicadas às placas de Petri (20 mL) e deixadas solidificar. Após isso foram colocados os hidrogéis de PVP/AgNP (1 x 1 cm, em concentrações de 50, 100, 250, 500 e 1000, 5000 e 10000 ppm) e os respectivos controles (discos de tetraciclina e hidrogel de PVP). O tempo de incubação para a verificação do crescimento foi de 18-24 horas a 37°C.

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada através do teste de microdiluição seriada das soluções, utilizando-se placas de 96 poços, seguindo-se os mesmos padrões de concentração utilizado para os hidrogéis. Foi realizada uma leitura visual do desenvolvimento do microrganismo nos poços inoculados após 24 horas a 37°C, com relação ao controle negativo (ausência de

crescimento). A CIM foi fixada para a o poço com menor concentração do ativo para o qual não foi observado crescimento.

### **3.2.12. Síntese dos monômeros precursores dos polianidridos bioativos derivados de hidroxicinamatos**

A síntese dos diácidos precursores dos polianidridos bioativos foi realizada conforme procedimento descrito na literatura [48]. O ácido (ferúlico, sinápico ou *p*-cumárico) (24 mmol) foi solubilizado em 75 mL de THF anidro, seguido da adição de piridina (48 mmol). Cloreto de adipoila (12 mmol) foi dissolvido em 15 mL de THF anidro e adicionado gota-a-gota (20 mL/h) na mistura reacional. A reação permaneceu em agitação durante 24 horas em atmosfera inerte de nitrogênio. Após esse período, a mistura reacional foi precipitada em água (600 mL) e acidificada até pH 2 com HCl concentrado. O sólido obtido foi filtrado, lavado com água deionizada (3 x 200 mL) e seco sob vácuo à temperatura ambiente.

Para a síntese dos diácidos de ácido ferúlico e sinápico utilizando-se cloreto de diglicóila como molécula conectora seguiu-se o mesmo procedimento experimental.

### 3.2.13. Síntese dos polianidridos bioativos derivados de hidroxicinamatos

A síntese dos polímeros bioativos foi realizada conforme procedimento descrito na literatura [48]. O diácido (ferúlico, sinápico ou *p*-cumárico) (6 mmol) foi solubilizado em 30 mL de DCM anidro, sob atmosfera inerte de nitrogênio. Adicionou-se trietilamina (26,5 mmol) e mistura reacional foi resfriada à 0°C. Trifosgênio (6,6 mmol) foi dissolvido em 20 mL DCM anidro e adicionado gota-a-gota (14mL/h) à mistura reacional. A reação foi mantida em agitação por 4 horas e precipitada em éter dietílico (400 mL) seguido de filtração. O polímero obtido foi solubilizado em DCM e lavado em água acidificada (pH 2; 3 x 150 mL) em um funil de separação. A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio, concentrada em evaporador rotatório e precipitado em éter dietílico. O sólido obtido foi filtrado e seco sob vácuo à temperatura ambiente.

### **3.2.14 Produção das blendas de PVP/Polianidridos e hidrogéis físicos**

Foram produzidas blendas de PVP com os polianidridos bioativos sintetizados nas seguintes proporções (PVP/Polianidrido, m/m): 9:1, 8:2 e 7:3. O solvente utilizado para o preparo das soluções, a uma concentração de 15% (m/v), foi o DMF. As soluções foram despejadas em uma placa de Petri de PTFE e os diferentes filmes compostos pelas blendas foram obtidos por evaporação do solvente (72 horas).

### **3.2.15 Produção de fibras de PVP/Polianidridos por eletrofição**

Fibras eletrofiadas compostas por blendas de PVP/Polianidridos foram obtidas a partir das soluções 15% (m/v) de PVP/PAF, PVP/PAS e PVP/SAA na proporção 7:3 (m/m).

Os valores dos parâmetros de eletrofição utilizadas para a obtenção de fibras encontram-se apresentadas na Tabela **3**.

**Tabela 3.** Parâmetros de eletrofição utilizados na obtenção de fibras de PVP/Polianidridos.

Sistema polimérico	Solvente	Voltagem (kV)	Fluxo (mL/h)	Distância (cm)
PVP/PAF	CHCl <sub>3</sub> e CHCl <sub>3</sub> /DMF	24	8 e 5	20
PVP/PAS	CHCl <sub>3</sub> e CHCl <sub>3</sub> /DMF	24	8 e 5	20
PVP/SAA	CHCl <sub>3</sub> /DMF	24	5	20

### 3.3. Técnicas e Equipamentos

#### 3.3.1. Eletrofição

As malhas compostas por nanofibras tramadas na forma de um não tecido foram produzidas em um equipamento de eletrofição composto por fonte de alta tensão (*Glassman High Voltage, Inc. Series serie EH high voltage*), bomba de infusão (*Cole-Parmer, Hz 50/60*), uma placa metálica como alvo para a deposição e um reservatório (10 mL) acoplado com ponteira metálica (20 gauche).

### 3.3.2. Espectroscopia Eletrônica UV-Vis

Espectros eletrônicos foram obtidos em espectrofotômetro *Shimadzu Multispec-1501*, com faixa de leitura de 190 – 800 nm. Para tanto, cubetas de quartzo de duas faces com caminho óptico de 1,0 cm foram utilizadas.

### 3.3.3. Espectroscopia Vibracional no Infravermelho (FTIR)

Os materiais que foram submetidos a análises por infravermelho foram preparados na forma de filmes por evaporação do solvente sobre pastilhas de NaCl ou malhas eletrofiadas. Para a aquisição de espectros no infravermelho utilizou-se o equipamento *Thermo Nicolet/Avatar 360* e *Bomem MB100*, operando de 4000 a 350  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.3.4. Microscopia Raman Confocal

Para a obtenção de espectros SERS (Surface Enhanced Raman Scattering) utilizou-se um microscópio Raman confocal *Witec* com laser de excitação em 532 nm, com faixa de operação de 0 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  potência máxima de 100 mW e

harmônica em 1046 nm com potência máxima em 50 mW. As objetivas utilizadas proporcionavam um aumento 100 vezes e resolução lateral de 400 nm.

### **3.3.6. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

Espectros de RMN  $^1\text{H}$  foram obtidos em um equipamento *Varian 400 MHz*.

Para estas análises foram utilizadas amostras contendo 5-10 mg e  $\text{DMSO-}d_6$  como solvente.

### **3.3.7. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Micrografias foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura equipado com canhão eletrônico de emissão de campo *JEOL*, modelo *FEG 7401F* e em um segundo microscópio *AMRAY 1830 I*. As condições de aquisição das imagens estão apresentadas nas respectivas figuras.

### 3.3.8. Termogravimetria (TG)

As curvas termogravimétricas foram obtidas em equipamento *Hi-Res TGA 2950 Thermogravimetric Analyzes TA Instruments*. A taxa de aquecimento utilizada foi de 10 °C/min, fluxo de nitrogênio de 50 mL/min e temperatura variando de 25 a 700 °C. As curvas obtidas foram tratadas no programa *TA Analysis*.

### 3.3.9. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas de DSC foram obtidas em equipamento *Q200 e Q10-0535-DSC TA Instruments*. A taxa de aquecimento utilizada foi de 20 °C/min, fluxo de nitrogênio de 50 mL/min e temperatura variando de 0 a 250 °C em rampa de aquecimento/resfriamento/aquecimento. As curvas obtidas foram tratadas no programa *TA Analysis*.

### 3.3.10. Cromatografia por exclusão de tamanho (SEC)

As massas molares médias ( $M_w$ ), bem como a razão  $M_w/M_n$  que é o índice de polidispersividade (PDI), foram determinados por cromatografia por exclusão de

tamanho (SEC), realizadas em cromatógrafo *Perkin-Elmer*, equipado com um detector de índice de refração (*Series 200*), bomba LC (*Series 200*) e injetor automático (*ISS 200*), com fluxo de 0,5 mL/min. A concentração das amostras injetadas foi de 10 mg/mL em DCM, aproximadamente, filtradas previamente em filtro PTFE 0,45 µm. Foram utilizadas *Jordi* (7,8 x 300 nm, Alltech Associates, Deerfield, IL) utilizando-se DCM como fase móvel. Os valores de massas molares foram reportados com relação a padrões de poliestireno utilizados na construção de curvas de calibração.

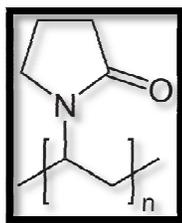
## **RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE 1**

### **4. HIDROGÉIS DE PVP PRODUZIDOS POR ELETROFIAÇÃO**

#### **4.1. Considerações gerais**

A PVP (Figura 9) foi escolhida como polímero base para a produção dos hidrogéis nanoestruturados, pois este polímero é adequado à aplicação como curativo para feridas. Dentre as principais características destacam-se a sua

biocompatibilidade [49], e a sua propriedade anfifílica. Desta maneira, a PVP possui a hidrofiliabilidade necessária a formação de hidrogéis e a hidrofobicidade que permite a sua interação com fármacos e outros polímeros de interesse.



**Figura 9.** Estrutura química da PVP.

Além disso, a PVP tem sido amplamente utilizada para a produção de hidrogéis a partir da irradiação com feixe de elétrons ou radiação gama de soluções aquosas, onde ocorre primeiramente a radiólise da água seguida da produção de radicais hidroxila [20, 49-51]. Estes radicais reagem rapidamente com a PVP, onde são produzidos macroradicais que se recombinam e dão origem às ligações cruzadas [18, 49, 50]. Outras metodologias de produção de hidrogéis de PVP são através do uso das reações de Fenton e foto-Fenton [10, 15]. Em ambos os casos, radicais hidroxila são gerados a partir de reações de oxidação-redução envolvendo

as espécies  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Na reação de foto-Fenton utiliza-se radiação UV (355 nm) que incide sobre os íons  $\text{Fe}^{3+}$  hidratado, proporcionando sua redução e formação de radicais hidroxilas que resultam na formação de macroradicaís nas cadeias da PVP, provocando a sua reticulação.

Embora seja vasta a quantidade de materiais a base de hidrogéis produzidos com PVP [9, 14, 18, 24, 49, 52-58], hidrogéis multifuncionais e estruturados a partir de nanofibras de PVP compreendem um novo campo de estudo para a área dos biomateriais. Nesta seção encontram-se descritos os principais resultados obtidos acerca do estudo feito para a obtenção deste tipo de hidrogel.

#### **4.2. Estudo da produção das nanofibras de PVP por eletrofiação**

A literatura a respeito dos materiais desenvolvidos para aplicações biomédicas é bastante enfática na importância do devido controle sobre a liberação de ativos [1, 59-63]. Neste sentido, a técnica de eletrofiação é bastante promissora na produção de materiais estruturados em escala nanométrica com aplicação em sistemas de liberação controlada [64-67].

O trabalho publicado por Yang e colaboradores [68] teve como abordagem principal a avaliação do efeito de alguns solventes na obtenção de nanofibras de

PVP produzidas por eletrofiação. Neste sentido, a etapa inicial do projeto baseou-se no desenvolvimento de condições ideais de eletrofiação para a produção de fibras de diâmetro controlado. Com isso, espera-se obter uma relação entre o diâmetro médio das fibras produzidas, que exercerá direta influência sobre o tamanho dos poros e, conseqüentemente, na cinética de liberação [67].

Um planejamento fatorial ( $2^3$ ) foi realizado com o intuito de se estabelecer condições de eletrofiação que pudessem resultar em (a) fibras de menores diâmetros e (b) fibras de maiores diâmetros. Este tipo de planejamento realizado em dois níveis é bastante simples e constitui uma importante ferramenta para o estudo mais detalhado de um sistema.

Os parâmetros de controle escolhidos para avaliação foram voltagem aplicada, distância de trabalho (distância entre o orifício da agulha e o coletor metálico) e fluxo de alimentação do sistema (velocidade com que a solução é ejetada para fora da agulha). A Tabela 4 apresenta as condições de produção das nanofibras de PVP, bem como os diâmetros médios obtidos.

**Tabela 4.** Valores utilizados para as variáveis independentes na produção de nanofibras de PVP por eletrofiação e respectivos diâmetros obtidos (variável dependente).

Ensaio	Variáveis independentes			Variável dependente
	Voltagem (kV) <i>x</i>	Distância (cm) <i>y</i>	Fluxo (mL/h) <i>z</i>	Diâmetro médio (nm)
1	26	24	5	350±80
2	26	24	1.5	300±100
3	12	24	5	550±70
4	12	24	1.5	500±90
5	26	10	5	200±70
6	26	10	1.5	150±70
7	12	10	5	500±60
8	12	10	1.5	400±70

De acordo com a Tabela 4, observa-se que as condições **3** e **6** foram as que resultaram na produção de fibras de PVP de maiores e menores diâmetros, respectivamente. Os resultados também revelaram que as três variáveis avaliadas (voltagem, distância e fluxo) foram estatisticamente relevantes para o sistema, ou seja, exercem influência sobre o diâmetro final das fibras (valores de efeito mostrados na Tabela 5). Contudo, a voltagem aplicada apresentou-se como o parâmetro estatisticamente mais significativo dentre os analisados. Tal fato pode ser constatado através do alto valor de efeito principal obtido, quando comparado com a distância e o fluxo (Tabela 5). O sinal negativo representa o efeito inverso da variável sobre o sistema, ou seja, no caso da voltagem quanto maior o seu valor, menor o diâmetro obtido para as fibras.

**Tabela 5.** Valores de efeito principal, F-calculado\* e valor- $p$  para o diâmetro médio obtidos para as variáveis independentes e suas interações.

<b>Variáveis</b>	<b>Efeito principal</b>	<b>F-calculado</b>	<b>Valor-<math>p</math></b>
Voltage ( $x$ )	-230.02	38.5	$1.00 \times 10^{-5}$
Distância ( $y$ )	141.08	14.5	$1.42 \times 10^{-3}$
Fluxo ( $z$ )	85.23	5.28	$3.45 \times 10^{-2}$
$x$ e $y$	49.28	1.76	$2.01 \times 10^{-1}$

---

$x$ e $z$	-34.86	0.88	$3.60 \times 10^{-1}$
$y$ e $z$	-3.20	0.007	$9.32 \times 10^{-1}$

---

\* $F_0$  ( $F$  teórico) = 4,49;  $\alpha$  = 0,05 e GL (grau de liberdade) = 16

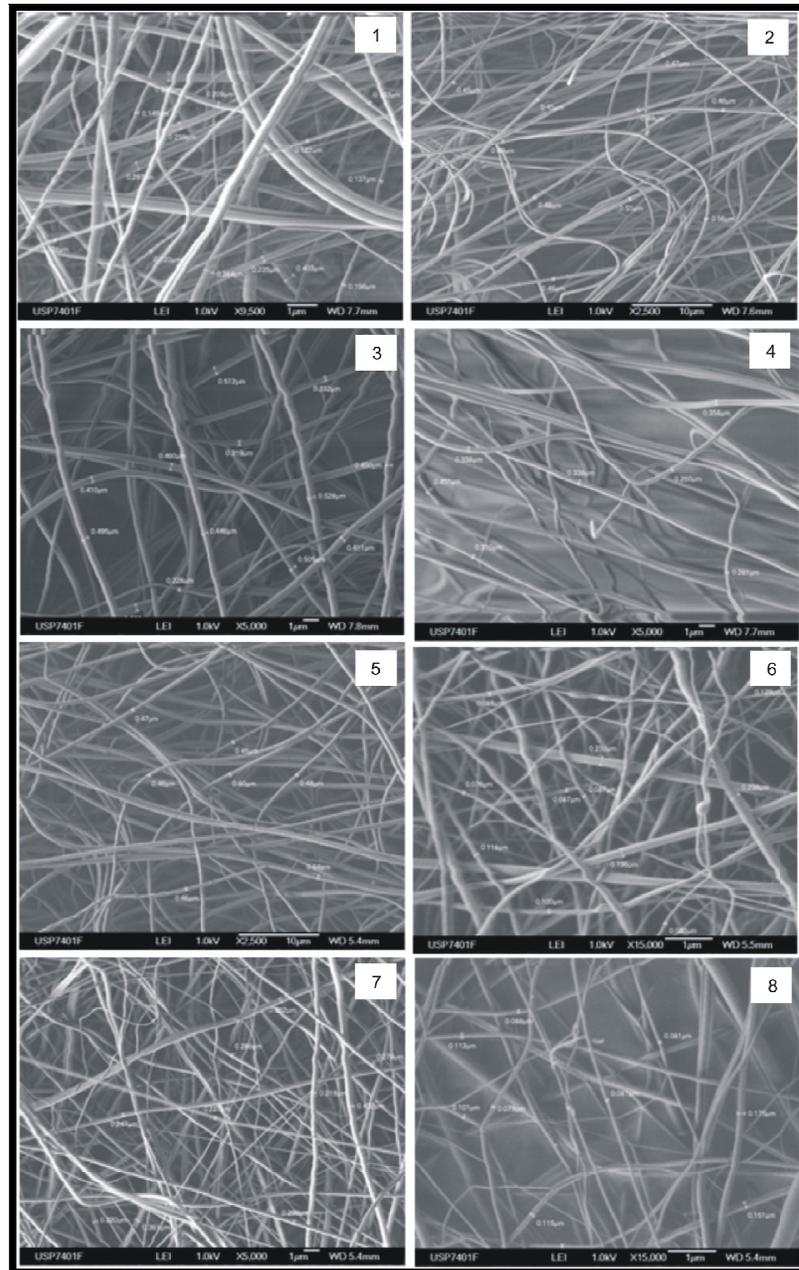
O fluxo de alimentação do sistema foi a variável que apresentou menor influência sobre o diâmetro final das fibras, da mesma forma com que sua interação com a distância também foi a menos significativa ( $y$  e  $z$ ).

A análise da variância (valor de  $F$ ) atribui significância ao resultado obtido, ou seja, se o valor de  $F$  calculado é numericamente maior do que  $F_0$ , então pode-se considerar o efeito apresentado como estatisticamente relevante. De acordo com a Tabela 5, todas as variáveis são estatisticamente relevantes, sendo que o mesmo não pode ser observado para as interações entre elas [10, 69, 70].

O valor de  $p$  se relaciona com a confiabilidade dos resultados obtidos, de maneira que quanto menor for o valor de  $p$ , mais confiável é o resultado. Assim, constata-se que o menor valor obtido para  $p$  está associado à variável  $x$  (voltagem aplicada), sendo maior para as demais variáveis e suas interações [10, 69, 70].

A morfologia das nanofibras de PVP obtidas com a realização deste planejamento fatorial foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura e as

imagens estão apresentadas na Figura 10. Constatou-se que, para todos os materiais produzidos, as nanofibras se apresentaram uniformes e livres da presença de gotas ou aglomerados poliméricos na estrutura.



**Figura 10.** Imagens representativas de MEV das nanofibras obtidas por eletrofiação para as amostras relacionadas ao planejamento fatorial ( $2^3$ ). Os números de cada figura equivalem ao número da amostra dos ensaios apresentados na Tabela 4.

#### **4.3. Reticulação das nanofibras de PVP produzidas por eletrofiação**

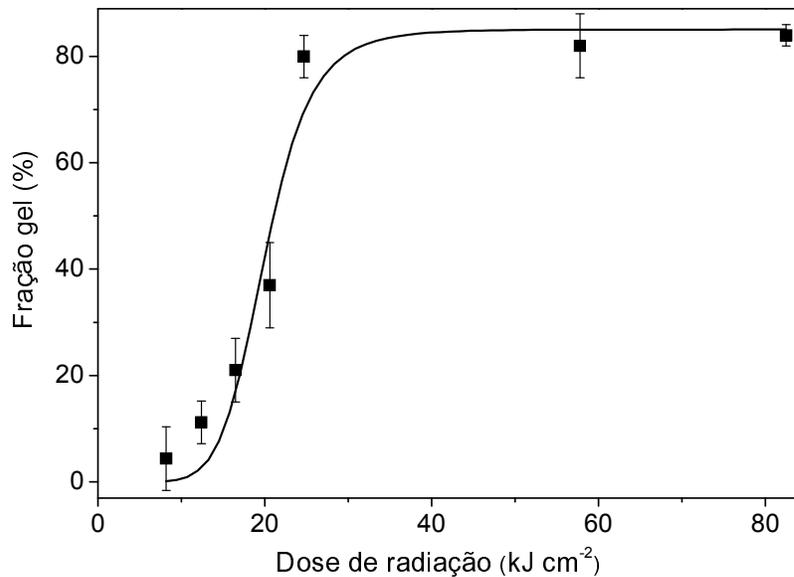
Para a reticulação do PVP foram escolhidas duas técnicas: (1) incidência de radiação UV-C e (2) reação de Fenton. O laboratório de Biomateriais Poliméricos do IQ/USP tem trabalhado na produção de hidrogéis a partir de soluções e filmes de PVP produzidos por evaporação do solvente, além de hidrogéis obtidos a partir de nanoesferas [10, 15, 18, 25]. Contudo, a obtenção de hidrogéis estruturados a partir de nanofibras de PVP produzidas por eletrofiação está sendo descrita pela primeira vez neste trabalho.

#### **4.3. Reticulação via radiação UV-C**

A aplicação de radiação UV-C para a reticulação de PVP vem sendo amplamente utilizada para a produção de hidrogéis [26, 55, 71, 72]. A principal vantagem da utilização deste tipo de radiação para a produção de hidrogéis comparando-se com a radiação gama está em sua acessibilidade.

As malhas de PVP produzidas por eletrofiação foram submetidas à radiação UV-C por diferentes intervalos de tempos, ou seja, sob diferentes doses de radiação.

A Figura 11 apresenta os intervalos de tempo dentro dos quais as amostras foram irradiadas e os respectivos valores de fração gel (%) obtidos.



**Figura 11.** Fração gel obtida para os hidrogéis nanoestruturados de PVP reticulados sob diferentes doses de radiação UV-C.

Os resultados obtidos foram muito satisfatórios e comparáveis às frações gel obtidas para hidrogéis de PVP produzidos a partir de soluções. Entretanto, esses hidrogéis apresentaram-se superiores quanto à velocidade de formação de materiais com fração gel acima de 80%. Constatou-se que, para malhas de PVP com espessura aproximada de 150 micrometros, o tempo necessário para se produzir os

hidrogéis desta qualidade foi de apenas 10 minutos (cerca de 25 kJ cm<sup>-2</sup>), contra aproximadamente 120 minutos (cerca de 300 kJ cm<sup>-2</sup>) para aqueles obtidos a partir de membranas produzidas por evaporação do solvente.

As razões que explicam tal comportamento não foram alvo de estudo neste trabalho. Contudo, por se tratar de um material nanoestruturado, a área superficial é substancialmente aumentada nesta escala, trazendo novas propriedades ao material [73], quando comparado a um material que não se encontra estruturado em escala nanométrica. Com isso, as propriedades ópticas do material podem colaborar para o aumento da velocidade de reticulação, pois o aumento da ocorrência de espalhamento de luz, causada pelas nanoestruturas, pode permitir que esta luz espalhada seja absorvida.

#### **4.4. Reticulação via reação de Fenton**

A utilização da reação de Fenton como metodologia para a reticulação e, conseqüentemente, formação de hidrogéis de PVP possui a vantagem de constituir um processo extremamente rápido que não exige um equipamento específico, tal como os processos que usam irradiação. A produção de hidrogéis de PVP via

reação de Fenton a partir de soluções foi estudada amplamente por Barros e colaboradores [10], sendo posteriormente aplicada à formação de nanogéis de PVP [25].

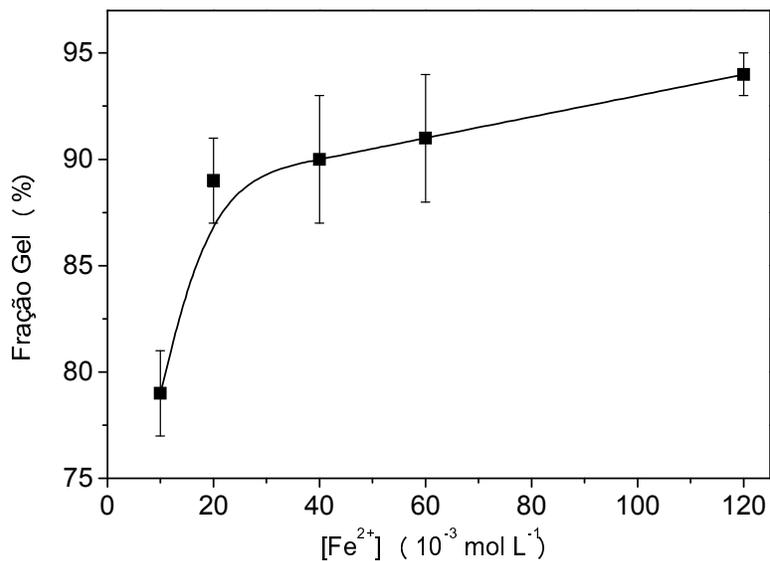
As concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{Fe}^{2+}$ , previamente estabelecidas para a produção de hidrogéis a partir de soluções aquosas de PVP/ $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{Fe}^{2+}$  via reação de Fenton não foram adequadas para o sistema proposto neste trabalho. De acordo com a literatura, a relação ótima da razão  $\text{H}_2\text{O}_2/[\text{Fe}^{2+}]$  é próxima a 10 [10]. Contudo, utilizando-se aqui as mesmas condições, não foi observada a formação de hidrogel de PVP, e sim a completa dissolução da malha eletrofiada.

Um dos fatores ao qual este comportamento pode ser atribuído é à competição existente entre os processos de reticulação e solubilização, visto que a malha de PVP/ $\text{H}_2\text{O}_2$  é amplamente solúvel em água. Desta maneira, uma alternativa encontrada foi aumentar a concentração de  $\text{Fe}^{2+}$  na solução, pois esse aumento acarretaria uma melhora da cinética desta reação, favorecendo a reticulação frente a solubilização.

Neste sentido, a fração gel (%) foi determinada para diferentes concentrações de  $\text{Fe}^{2+}$  na solução, mantendo-se constante a concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  no material (50

mM). De acordo com os resultados apresentados na Figura 12, observou-se que a concentração mínima de  $\text{Fe}^{2+}$  para obter um hidrogel manipulável (fração gel em torno de 78%) é de aproximadamente 10 mM. Esse valor de fração gel atinge aproximadamente 95%, quando a reticulação ocorre em soluções de concentração 120 mM de  $\text{Fe}^{2+}$ . Os valores de fração gel obtidos para os hidrogéis compostos por nanofibras mostraram-se comparáveis aos produzidos a partir de solução de PVP [10].

Os valores de fração gel encontrados para os hidrogéis nanoestruturados de PVP reticulados através da reação de Fenton mostraram-se superiores quando comparados aos obtidos neste trabalho para radiação UV-C.



**Figura 12.** Fração gel obtida para os hidrogéis nanoestruturados de PVP reticulados sob diferentes concentrações de Fe<sup>2+</sup>, via reação de Fenton.

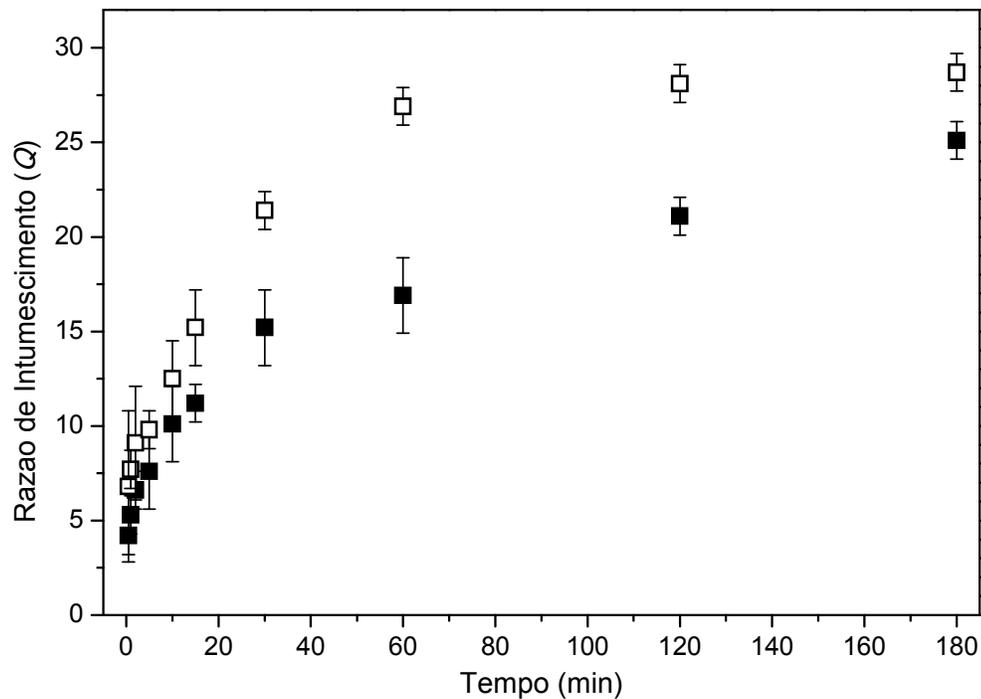
#### 4.5. Razão de intumescimento dos hidrogéis de PVP produzidos por eletrofiação

Os hidrogéis de PVP nanoestruturados tiveram suas razões de intumescimento ( $Q$ ) determinadas em água deionizada por um período de 180 minutos.

De acordo com a Figura 13, observa-se uma maior capacidade de intumescimento em intervalos mais curtos de tempo para os hidrogéis reticulados via reação de Fenton quando comparados aos reticulados com radiação UV-C.

Entretanto, ao final dos 180 minutos a diferença entre eles diminuiu significativamente. O valor máximo de  $Q$  obtido para esses hidrogéis nestas condições foi de 28 para os produzidos por Fenton e 25 para aqueles reticulados com radiação UV-C.

Macrogéis de PVP produzidos a partir de solução e reticulados por Fenton (com fração gel comparável) possuem uma razão de intumescimento de aproximadamente 24, sendo, portanto, da mesma ordem de grandeza do apresentado pelo hidrogel nanoestruturado. Nas nanoesferas de PVP reticuladas por Fenton [25] houve aumento expressivo, pois naquele caso tanto a área superficial quanto os graus de liberdade eram muito maiores, apresentando  $Q$  relativo a um hidrogel superabsorvente.



**Figura 13.** Razão de intumescimento para os hidrogéis de PVP produzidos por eletrofiliação e reticulados por (■) radiação UV-C e (□) reação de Fenton.

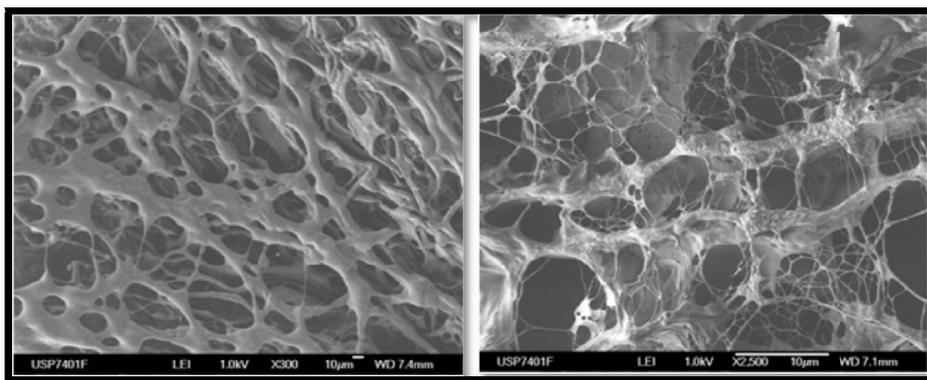
Em relação aos hidrogéis reticulados com radiação UV-C, estes mostraram-se comparáveis aos macrogéis de PVP em termos de razão de intumescimento [9]. Não é possível inferir sobre o efeito das nanoestruturas na razão de intumescimento para o caso dos hidrogéis, tanto obtidos por Fenton como por radiação UV-C, devido à ausência dos valores de densidade de reticulação para esses sistemas.

#### **4.6. Análise da estrutura porosa dos hidrogéis**

Membranas compostas por nanofibras produzidas por eletrofiliação possuem espaços intersticiais entre as fibras que são análogos aos poros presentes em outros tipos de membranas [34]. Desta maneira, quando estes materiais são reticulados e intumescidos dão origem a poros resultantes destes espaços intersticiais, de modo que são interconectados. Por outro lado, poros formados pelo intumescimento de hidrogéis produzidos a partir de filmes, que são cavidades na rede 3-D resultantes dos espaços formados pela presença da água, podem ou não apresentar interconexão com outros poros.

As malhas de PVP reticuladas com radiação UV-C e reação de Fenton tiveram suas morfologias investigadas por microscopia eletrônica de varredura após intumescimento e secagem (Figura 14). As imagens revelam a formação de estruturas altamente porosas, com poros que são, aparentemente, interconectados entre si. A técnica de MEV é largamente utilizada para o estudo da porosidade de materiais produzidos por eletrofiliação, visto que técnicas como porosimetria de mercúrio podem ser destrutivas devido à alta pressão aplicada [34]. Entretanto, uma análise de poros via MEV é limitada, pois fornece informações apenas dos poros que

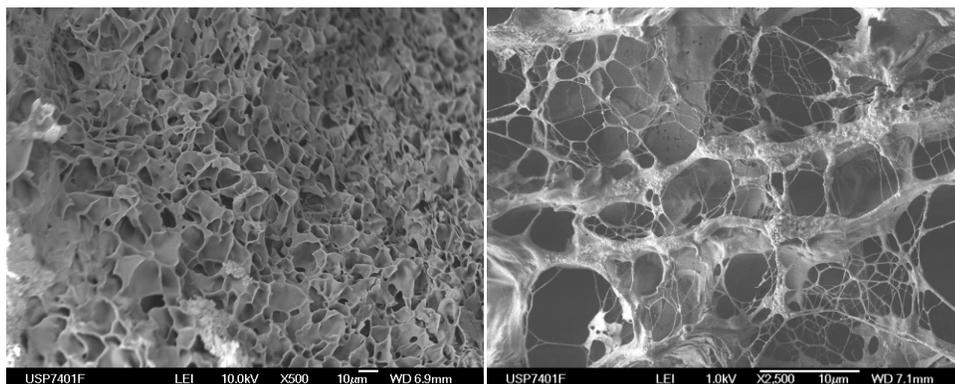
se encontram na superfície do material. Ambos os hidrogéis possuem diâmetro de poro variando de 1 a algumas dezenas de micrômetros, onde a estrutura fibrosa é parcialmente mantida (Figura 14)



**Figura 14.** Imagens representativas de MEV de hidrogéis de PVP produzidos por eletrofiação e reticulados com radiação UV-C (esquerda) e reação de Fenton (direita).

Outros hidrogéis de PVP descritos na literatura, a exemplo do obtido por reação de Fenton a partir de solução, apresentam valores de tamanho de poro semelhante, que variam de 5 a 7  $\mu\text{m}$  [10]. Contudo, muitos poros gerados através do intumescimento de hidrogéis produzidos a partir de filmes ou soluções podem não estar interconectados. Tal fato não ocorre com aqueles produzidos a partir de

malhas eletrofiadas, conforme já discutido. A Figura 15 apresenta as diferenças estruturais em termos de poros entre dois hidrogéis reticulados através da reação de Fenton.



**Figura 15.** Comparação das imagens representativas de MEV para os hidrogéis de PVP reticulados por reação de Fenton produzidos por solução [10] e eletrofição, respectivamente.

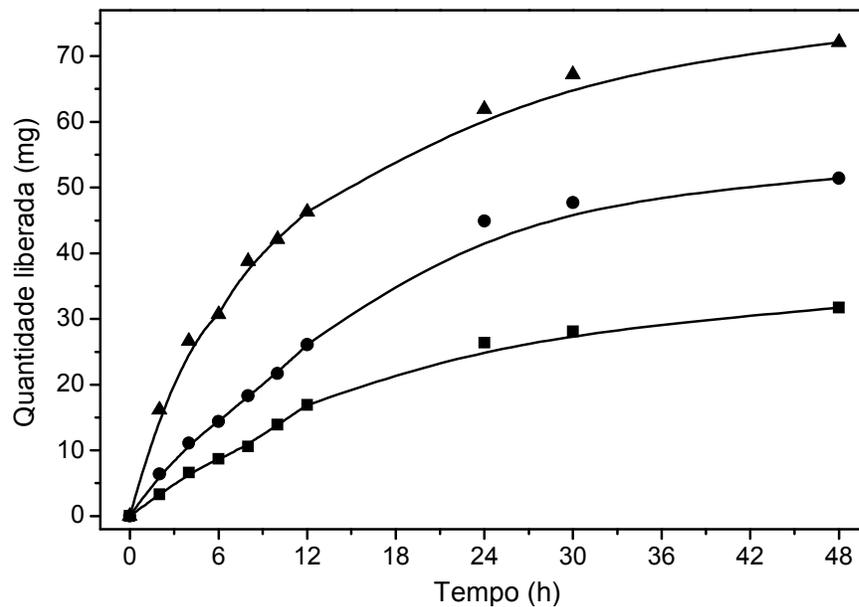
#### 4.7. Ensaio de liberação de proteínas a partir de hidrogéis de PVP

##### 4.7.1. Cinética de liberação de albumina de soro bovino (BSA)

Existe um grande esforço tanto em ciência acadêmica quanto empresarial para a produção de hidrogéis capazes de liberar de maneira controlada

medicamentos de diversos tipos, tais como proteínas, peptídeos e substâncias similares de interesse farmacológico [74-79]. Neste sentido, este trabalho também almeja a produção de curativos a base de hidrogel que liberem proteínas de interesse capazes de contribuir com o processo de cicatrização.

A BSA foi escolhida como proteína modelo para avaliação de dois diferentes hidrogéis de PVP produzidos por eletrofiação e reticulados com radiação UV-C. Os hidrogéis selecionados para esse estudo são os apresentados na Tabela 4 e identificados como 3 e 6, exemplo de malhas compostas por fibras de maior e menor diâmetro, respectivamente. Os resultados acerca da cinética de liberação da BSA dos hidrogéis de maior e menor diâmetro estão apresentados na Figura 16. Hidrogéis de PVP obtidos na forma de filmes por evaporação do solvente também foram produzidos para efeito de comparação.



**Figura 16.** Comparação entre os perfis de liberação de BSA (80 mg) a partir do hidrogéis de PVP produzidos por eletrofição com fibras de diâmetro médio de (▲)  $550\pm 50$  nm (●)  $150\pm 70$  nm e (■) hidrogéis de PVP produzidos por evaporação de solvente.

Na Figura 16 pode ser observado que os hidrogéis de PVP produzidos por eletrofição constituem melhores sistemas de liberação de proteínas quando comparados com o hidrogel de PVP produzido por evaporação do solvente. Adicionalmente, constata-se que a velocidade de liberação pode ser pré-definida através da escolha do diâmetro da fibra. Desta maneira, os hidrogéis compostos por

nanofibras de maior diâmetro demonstraram uma maior velocidade de liberação em relação àqueles formados por nanofibras de menor diâmetro.

O perfil de liberação obtido para estes hidrogéis encontra-se dentro do comportamento esperado, uma vez que as fibras eletrofiadas de menor diâmetro são mais densamente empacotadas do que as fibras de maior diâmetro, resultando em um material, como um todo, de poros menores [34]. Esse fato compreende a uma das estratégias pela qual a técnica de eletrofiação é relevante no que diz respeito ao controle da porosidade e/ou tamanho dos poros.

O perfil observado para o processo de liberação de BSA dos hidrogéis produzidos encontra-se em acordo com uma cinética de liberação controlada para este tipo de matriz [80, 81]. A Tabela 6 descreve os valores de  $F_R$  (fração de proteína liberada pelo sistema) e  $n$  (expoente que descreve o mecanismo de liberação) obtidos para a liberação de BSA a partir dos hidrogéis produzidos ( $R^2 = 0,99$ ).

**Tabela 6.** Parâmetros cinéticos obtidos para a liberação de BSA de hidrogéis de PVP produzidos por eletrofiação e por evaporação do solvente.

Hidrogéis de PVP	$n$	$F_R$
Evaporação do solvente	0,84	0,40
Eletrofiação (150nm)	0,77	0,64
Eletrofiação (550nm)	0,58	0,90

O hidrogel produzido com nanofibras de PVP de maior diâmetro apresentou um valor maior  $F_R$ , mostrando uma liberação de BSA mais rápida quando comparada com a de outros hidrogéis. A magnitude dos valores de  $n$  encontrados indica que um mecanismo de difusão não-Fickiano (anômalo) está operando. Um mecanismo de liberação tipicamente Fickiano, controlado pelo processo de difusão apresenta um valor de  $n = 0,50$ . Por outro lado, um mecanismo não-fickiano (Caso-II) que é regido pelo relaxamento das cadeias poliméricas é relacionado a um valor de  $n = 1,0$ . Neste caso, um valor de  $0,50 < n < 1,0$  foi obtido, caracterizando um material onde a liberação ocorre devido a uma mistura de contribuições relacionadas tanto ao relaxamento das cadeias poliméricas quanto pelo processo de difusão.

Apesar desse comportamento, pode ser claramente observado que o hidrogel composto por nanofibras mais espessas apresentou uma cinética de liberação BSA

mais próxima de um mecanismo Fickiano ( $n = 0,58$ ), enquanto que o hidrogel produzido por evaporação do solvente se assemelha a um transporte de caso II ( $n = 0,84$ ), em que o processo de liberação da BSA é regido, quase que totalmente, pela relaxação da cadeia polimérica.

#### **4.7.2. Liberação de colagenase e determinação da manutenção da atividade enzimática**

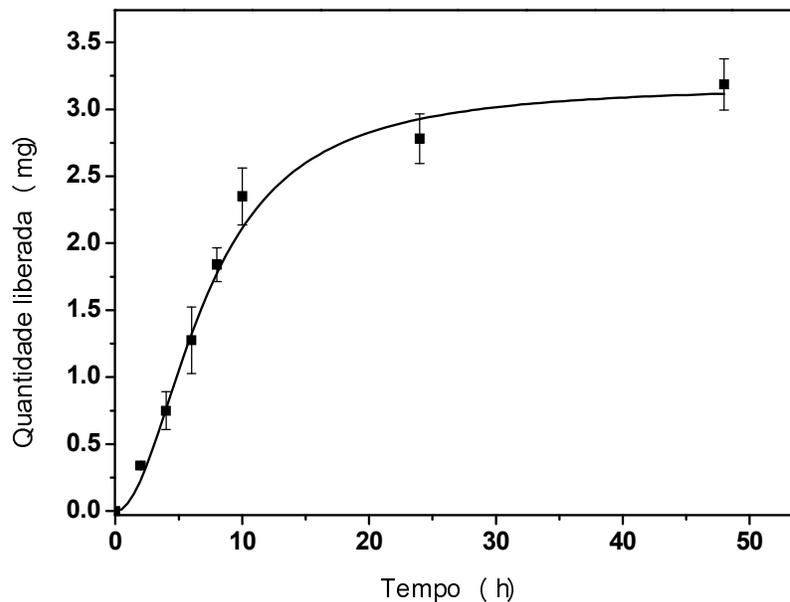
A avaliação dos perfis de liberação dos hidrogéis utilizando-se BSA como modelo mostrou que o hidrogel de PVP composto por nanofibras de maior diâmetro apresentou-se como o mais adequado para um sistema de liberação de proteínas. Sendo este um trabalho voltado ao desenvolvimento de hidrogéis com potencial aplicação ao tratamento de feridas, torna-se necessário a análise do seu perfil frente a uma enzima já utilizada para este fim: a colagenase.

A colagenase é uma enzima proteolítica, que degrada os diferentes tipos de colágeno [82]. Esta enzima vem sendo incluída em pomadas para fins de cicatrização de tecidos danificados, atuando diretamente na remodelação e remoção do tecido necrosado. No entanto, a aplicação de pomadas de colagenase

diretamente em feridas pode promover dor substancial para o paciente, pois exige um material não macio para espalhá-la pelo leito da ferida e uma cobertura adicional (gaze) que pode remover ou danificar o tecido novo formado [83].

A Figura 17 mostra o perfil de liberação de colagenase a partir de uma membrana composta de nanofibras de PVP com diâmetro médio de 550 nm e reticulada com radiação UV-C. É possível observar que há uma intensa liberação de colagenase nas primeiras 10 horas, atingindo-se um platô em 48 horas.

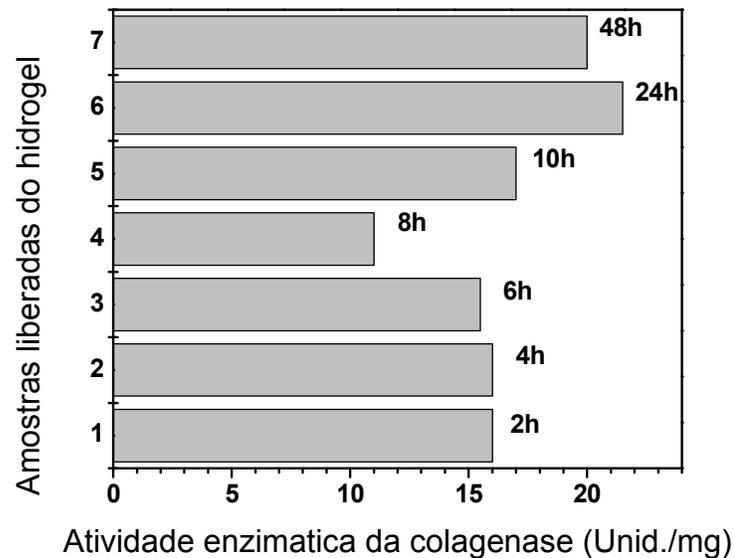
A vantagem deste tipo de sistema de tratamento de feridas é que ele combina importantes propriedades de um ideal curativo: estrutura porosa, potencial desbridante e suavidade, além da capacidade de manter um ambiente úmido ideal no leito da ferida.



**Figura 17.** Perfil de liberação da colagenase (10 mg) a partir de hidrogéis de PVP produzidos por eletrofiação e reticulados por radiação UV-C.

A atividade colagenolítica compreende um importante parâmetro e foi avaliada para cada amostra coletada do sistema de liberação durante 48 horas. Para essa finalidade, foi realizado um ensaio colorimétrico que envolve a digestão de colágeno tipo I [44, 45]. Os resultados obtidos para a atividade enzimática da colagenase estão dispostos na Figura 18. Constata-se que a atividade da colagenase foi mantida durante a sua liberação a partir do hidrogel eletrofiado de PVP, sendo observado um pequeno aumento após 10 horas. Após 48 horas, a

atividade colagenolítica foi de aproximadamente 20 unidades/mg, enquanto que a atividade máxima esperada era 36 unidades/mg.



**Figura 18.** Determinação da manutenção da atividade enzimática da colagenase nos hidrogéis de PVP.

Com base nos resultados apresentados, os hidrogéis de PVP produzidos por eletrofiação e reticulados utilizando-se radiação UV-C compreendem um sistema adequado para o tratamento de feridas. Além de todas as vantagens inerentes a um hidrogel apresentado pelo material obtido, também apresentou bom desempenho

para a liberação e manutenção da atividade enzimática da collagenase, sendo um material adequado ao tratamento via desbridamento enzimático.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE 2**

### **5. HIDROGÉIS DE PVP PRODUZIDOS POR ELETROFIAÇÃO INCORPORADOS COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA E IMIDAZOL**

#### **5.1. Considerações gerais**

##### **5.1.1. Nanopartículas metálicas**

Uma verdadeira explosão de publicações relacionadas às potencialidades das nanopartículas de metais nobres tem acontecido nos últimos anos. Por possuírem tamanho muito pequeno e elevada área superficial, as nanopartículas metálicas são únicas no que diz respeito a propriedades ópticas, magnéticas, químicas e eletrônicas [84-86].

Nanopartículas podem ser obtidas por diversas maneiras, por exemplo, através da redução dos respectivos sais, síntese eletroquímica, utilização de micelas reversas como sistemas formatadores, irradiação ultrassônica e por microondas, entre outras [87-90]. Após a síntese, a devida estabilização dessas nanopartículas também tem sido um desafio em que os cientistas da área têm focado seus

esforços. Neste sentido, descobriu-se que a PVP compreende um sistema que oferece uma estabilidade extra às nanopartículas de ouro, cobre e prata [91-93]. Encontra-se descrito que esta estabilidade ocorre por efeitos distintos, tais como efeitos estéricos de proteção dessas nanopartículas e efeitos químicos, dada a presença de ligações coordenadas, principalmente com relação às nanopartículas de prata [92, 93].

Dentre as nanopartículas metálicas já produzidas e descritas pela literatura, as nanopartículas de prata (AgNPs) compreendem materiais muito interessantes por apresentarem uma potente atividade bactericida, ampliando o seu campo de aplicação para a área médica [94, 95]. A grande vantagem, neste caso, é que as nanopartículas de prata são passíveis de serem incorporadas a materiais no intuito de reduzir infecções e prevenir a colonização por bactérias que apresentam resistência aos antibióticos.

É sabido que prata iônica ( $\text{Ag}^+$ ) também é um importante agente antimicrobiano. Contudo, sua ação difere-se daquelas observadas para as AgNps, visto que estas são influenciadas pelo tamanho, ou seja, quanto menor o tamanho melhor a atividade [94-96].

Com relação às suas propriedades ópticas, dispersões coloidais de AgNPs apresentam intensa coloração resultantes de sua interação com a luz, com cores que variam de acordo com o tamanho e forma dessas nanopartículas. Além disso, nesta escala, as nanopartículas de prata (e outras nanopartículas metálicas) possuem plasmons de superfície. A explicação mais simplista para este fato é a de que a superfície do metal atua da mesma maneira que um plasma, onde há elétrons livres na banda de condução e núcleos carregados positivamente. Absorção de ressonância plasmônica constitui-se como uma excitação coletiva dos elétrons na banda de condução que ocorrem próximas à superfície das nanopartículas, resultando em um característico espectro de absorção na região do UV-Vis [85].

### **5.1.2. Sistemas híbridos poliméricos**

O estudo de sistemas híbridos formados por polímero-NPs tem crescido muito nos últimos anos, visto que possuem a vantagem de combinar propriedades inerentes de cada material em um só [97-101]. Desta maneira, a produção de hidrogéis híbridos também tem atraído a atenção dos pesquisadores, uma vez que estes materiais encontram grande aplicação na área biomédica, como já discutido.

Além das vantagens como biomateriais, hidrogéis também são apontados como nanoreatores na produção *in situ* de AgNPs, atuando diretamente no controle do tamanho das partículas. Neste caso, a densidade de reticulação é apontada como o principal fator em que, de acordo com a concentração do agente reticulante, obtém-se partículas que variavam de 20 até 3 nm de diâmetro, aproximadamente [102, 103].

Nanogéis híbridos do tipo casca-carço (Ag-Au@PEG-ácido hialurônico) também são apresentados como biomateriais promissores no tratamento de células tumorais [104]. Sistemas como este possuem a vantagem de serem multifuncionais, aliando-se as vantagens de liberação controlada, regulada por fatores térmicos e foto-térmicos, às propriedades de sensoriamento óptico e imagem, entre outras [104].

Este capítulo apresenta o estudo de hidrogéis híbridos bactericidas de PVP/AgNP produzidos por duas diferentes metodologias e hidrogéis de PVP/AgNP/Imidazol como sistema modelo de um hidrogel bactericida-fungicida.

## **5.2. Hidrogéis nanoestruturados de PVP/AgNP produzidos por eletrofição**

### **5.2.1. Reticulação por incidência de radiação UV-C**

#### **5.2.1.1. Caracterização das nanofibras de PVP/AgNP**

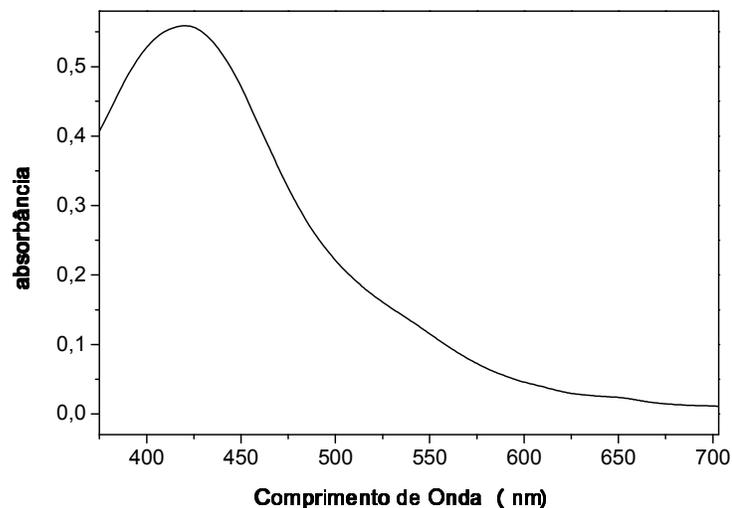
Embora a síntese e a investigação de agentes estabilizantes de AgNPs seja extensamente reportado pela literatura, bem como a sua inserção em certos materiais, sua incorporação em hidrogéis ainda é um assunto a ser explorado [102, 103]. Assim, hidrogéis de PVP/AgNP nanoestruturados foram alvos de estudo neste trabalho.

O objetivo de se produzir hidrogéis que contenham AgNPs em sua estrutura consiste em atribuir ao material funcionalidades extras, tais como combater contaminações e infecções por bactérias além de servir como um ponto de coordenação de outras moléculas de interesse farmacológico.

##### ***5.2.1.1.a Espectrofotometria UV-Vis***

A síntese e incorporação das AgNPs foi confirmada por análise espectrofotométrica através da observação da banda de ressonância plasmônica de superfície no espectro de extinção das AgNPs (Figura 19). Esta técnica é rápida,

eficaz e é também uma das mais usadas para a investigação da formação de AgNPs. Na Figura 19 observa-se uma intensa banda centrada em 425 nm (aproximadamente) referente à ressonância plasmônica das AgNPs, onde uma intensa absorção é um indicativo de uma alta concentração de AgNP. Da mesma maneira, uma banda nítida, simétrica e não alargada indica uma estreita distribuição de tamanho. Após o processo de formação das AgNPs, a solução anteriormente transparente adquire coloração marrom-claro.

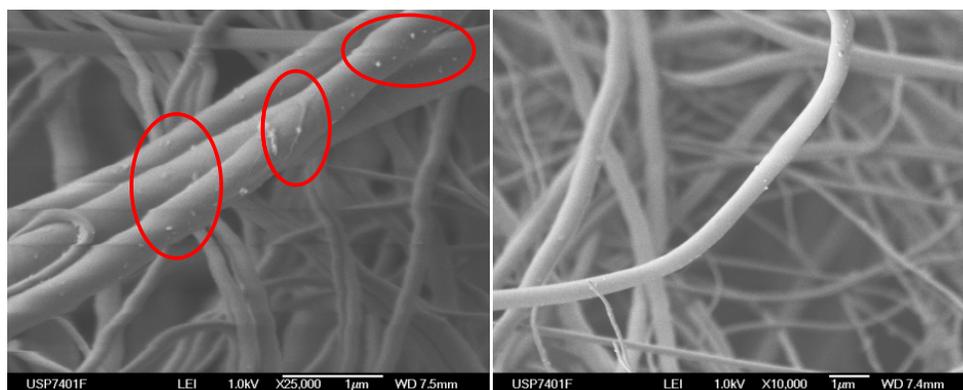


**Figura 19.** Espectro de extinção das nanopartículas de prata incorporadas nas nanofibras de PVP.

### 5.2.1.1.b Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A produção de um nanocompósito composto por nanofibras de PVP/AgNP por eletrofiação encontra-se descrita na literatura [105, 106]. Contudo, as condições de eletrofiação utilizadas foram as mesmas estabelecidas neste trabalho para a produção de nanofibras de PVP com diâmetro médio de 150 nm, onde um valor maior de campo elétrico foi empregado.

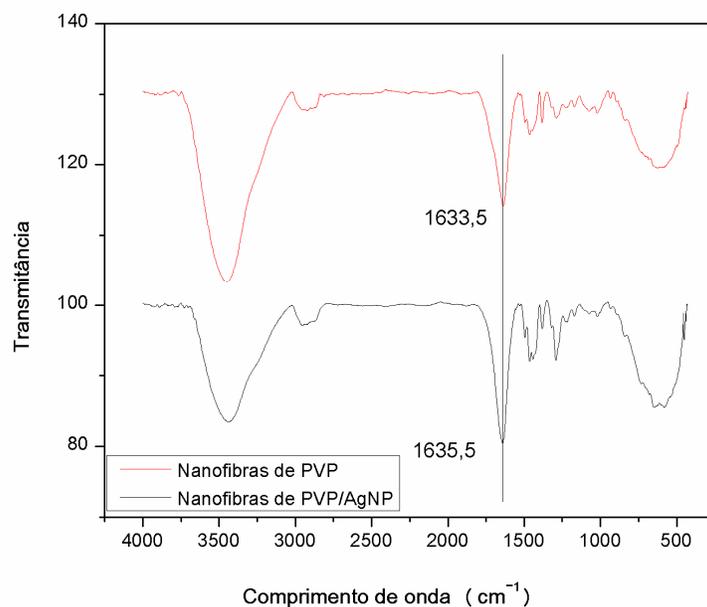
As nanofibras de PVP/AgNP foram obtidas com êxito, de acordo com as imagens de MEV apresentadas pela Figura 20, em que pode ser observada a formação de nanofibras bastante com formato bastante uniformes e com ausência de gotas ou aglomerados poliméricos. Na Figura 20 (imagem da esquerda) é possível observar a presença de algumas AgNPs na superfície das nanofibras.



**Figura 20.** Imagens representativas de MEV das nanofibras de PVP/AgNPs.

### 5.2.1.1.c Espectroscopia no infravermelho (FTIR)

A Figura 21 apresenta o espectro de FTIR-ATR (resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ ) para as nanofibras de PVP e PVP/AgNP (contendo 500 ppm de Ag) produzidas por eletrofiação e reticuladas com radiação UV-Vis. Observa-se que, nesta concentração e nas condições de preparo utilizadas neste trabalho, não ocorreu nenhuma mudança significativa nos modos vibracionais de PVP/AgNP quando comparados aos do PVP puro.



**Figura 21.** Espectro de FTIR comparativo entre as nanofibras de PVP e PVP/AgNP.

Os grupos carbonílicos (C=O) e os átomos de nitrogênio (N) presentes na estrutura do PVP são os que oferecem pontos de coordenação para o  $\text{Ag}^+$ , podendo assim sofrer redução a  $\text{Ag}^0$ . Contudo, a literatura aponta o átomo de oxigênio do grupo C=O como aquele de maior contribuição para a coordenação com  $\text{Ag}^+$ , visto que efeitos estéricos e eletrônicos com relação ao átomo de nitrogênio tornam-no mais disponível neste sentido [107]. Entretanto, nenhuma mudança no estiramento do grupo C=O foi observada, o que pode ser devido à baixa concentração de Ag no sistema ou mesmo pelo forte efeito sinérgico de redução oferecido por ambos os solventes, DMF e EtOH [108, 109].

#### ***5.2.1.1.d Termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC)***

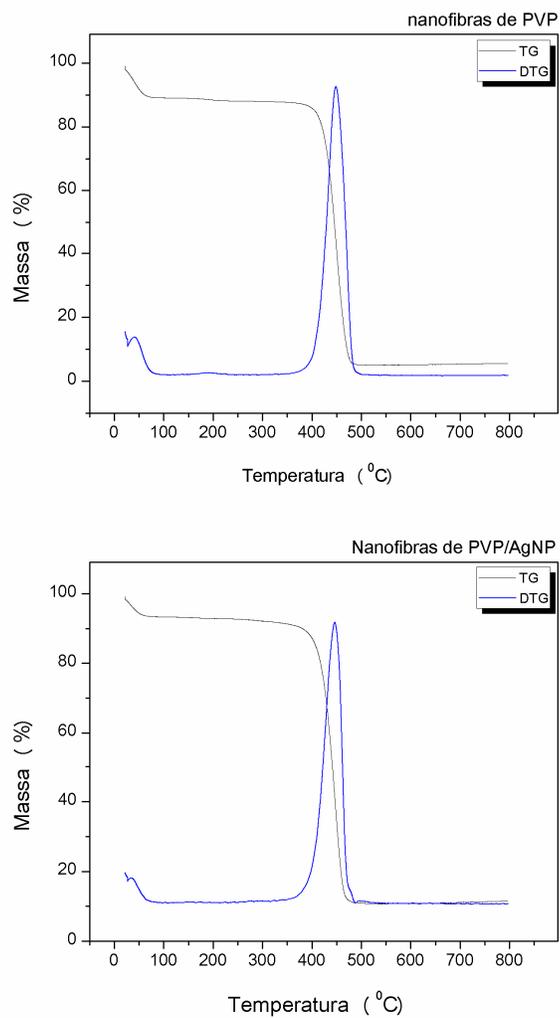
Curvas de TG, DTG e DSC obtidas para as diferentes nanofibras são apresentadas pela Figura 22 e Figura 23. Os resultados mostram que a inclusão de 500 ppm de AgNP nas nanofibras de PVP não resultam em mudanças significativas nas propriedades térmicas do material.

A Tabela 7 apresenta os valores obtidos para as temperaturas de decomposição das nanofibras e de transição vítrea ( $T_g$ ), assim como as

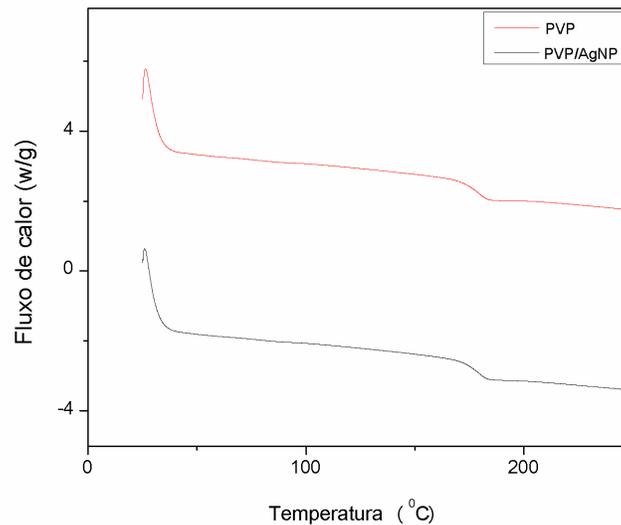
porcentagens de perdas de massa. Os valores encontram-se em acordo com os reportados o PVP e, novamente, não apresentam diferenças quando comparados aos obtidos para as nanofibras de PVP/AgNP.

**Tabela 7.** Dados obtidos através da análise das curvas de TG e DSC.

<b>Material</b>	<b>% perda de massa</b>	<b>T<sub>onset</sub> (°C)</b>	<b>T<sub>g</sub> (°C)</b>
PVP	82,7	425,9	179,5
PVP/AgNP	80,9	412,0	179,3



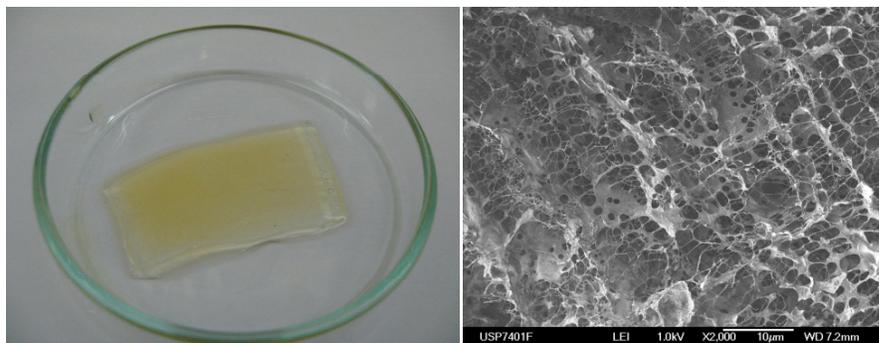
**Figura 22.** Curvas termogravimétricas (TG e DTG) das nanofibras de PVP e PVP/AgNP.



**Figura 23.** Curva de DSC obtida para as nanofibras de PVP e PVP/AgNP.

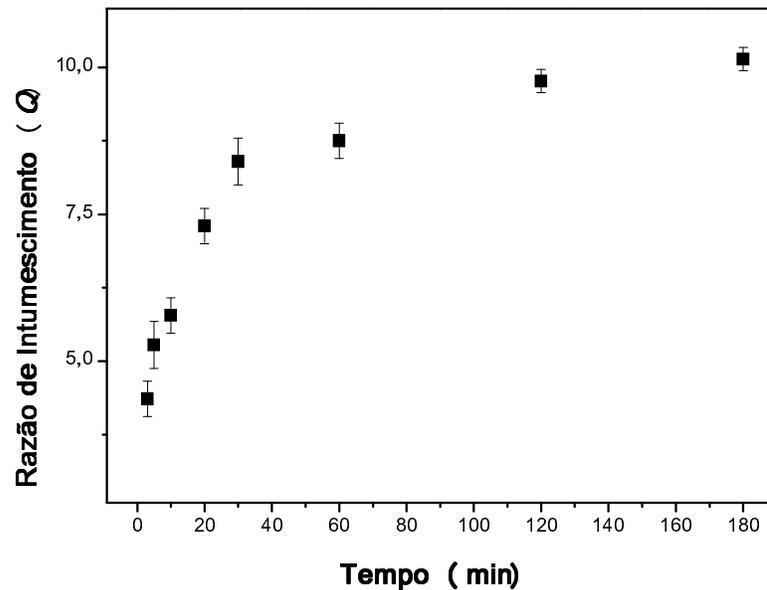
#### 5.2.1.2. Caracterização do hidrogel de PVP/AgNP reticulados por radiação UV-C

As malhas de PVP/AgNP foram reticuladas com radiação UV-C, de acordo com os mesmos parâmetros obtidos para as malhas de PVP, obtendo-se com êxito os hidrogéis. A Figura 24 apresenta a imagem do hidrogel de PVP/AgNP intumescido em água deionizada e ilustra a estrutura microscópica dos hidrogéis de PVP/AgNP, semelhante àquela obtida para os hidrogéis de PVP obtidos por eletrofiação, através da imagem de MEV.



**Figura 24.** Imagem do hidrogel híbrido de PVP/AgNP intumescido em água deionizada e imagem representativa de MEV.

A razão de intumescimento ( $Q$ ) foi determinada para os hidrogéis de PVP/AgNP e os resultados são apresentados pela Figura 25. Constatou-se que, a presença de 500 ppm de AgNPs na estrutura provoca uma mudança significativa na capacidade de intumescimento dos hidrogéis de PVP. Tal fato é semelhante ao descrito na literatura para os hidrogéis de poli(*N*-isopropilacrilamida), onde a presença de AgNP reduziu em mais de 60% o valor de  $Q$  [110]. Com relação aos hidrogéis apresentados neste trabalho, observou-se uma diminuição de 50% em sua capacidade de intumescimento (Figura 13 *versus* Figura 25).



**Figura 25.** Razão de intumescimento para os hidrogéis de PVP/AgNP produzidos por eletrofiação e reticulados por radiação UV-C.

## 5.2.2. Reticulação por reação de Fenton

### 5.2.2.1. Estudo da estabilidade das AgNPs frente ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

A reticulação das malhas PVP/AgNP também foi feita via reação de Fenton. Para isso, é importante estudar o sistema, que se comporta de formas diferentes com relação à ordem da adição de AgNO<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Realizando-se a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> antes do AgNO<sub>3</sub> compromete-se a formação das nanopartículas e também a formação do hidrogel, quando em contato com solução de Fe<sup>2+</sup>. Além disso,

observou-se total descoloramento da solução de PVP/AgNP, indicando a oxidação das AgNPs. Este comportamento é, de certa forma, quimicamente esperado, vistos os potenciais de redução das duas reações presentes no sistema (Equações 6 e 7).



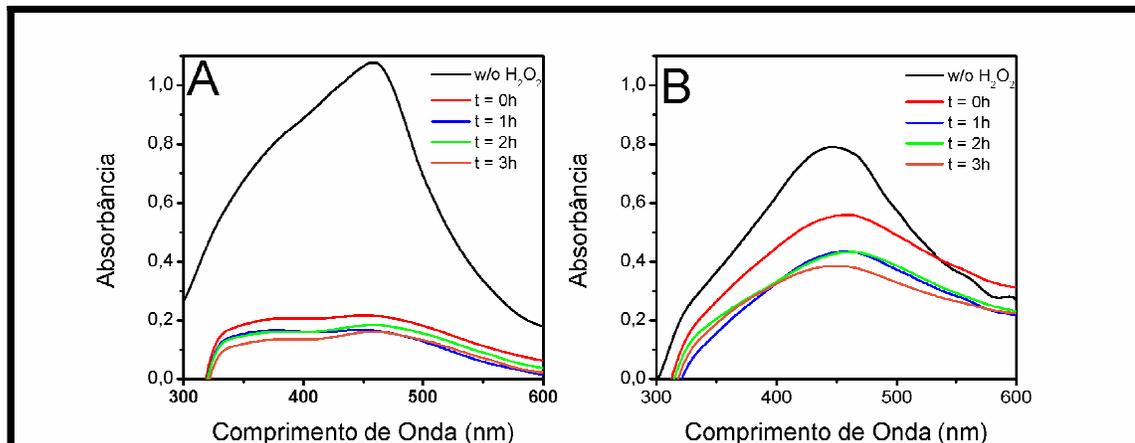
Por outro lado, adicionando-se primeiro  $AgNO_3$ , seguido da sua redução a AgNP, e posterior adição de  $H_2O_2$ , constatou-se a formação dos hidrogéis de PVP/AgNP via reação de Fenton, bem como uma menor perda de AgNPs por oxidação. Esta observação indica que, uma vez formadas as AgNPs na solução de PVP, estas podem ser blindadas e estabilizadas pela cadeia do polímero, o que retardaria o processo de difusão do  $H_2O_2$  até as AgNPs.

No intuito de se investigar o efeito dessa estabilização, o comportamento das AgNPs em solução de PVP foi acompanhado durante 3 horas após a adição de  $H_2O_2$  via espectrofotometria UV-Vis. Para tanto, avaliou-se o efeito do tamanho da cadeia polimérica utilizando PVP K30 ( $M_w = 56.000$ ) e PVP K90 ( $M_w = 1.300.000$ ).

Deste modo, mantivemos constante a contribuição química da estabilização (porção pirrolidona), variando-se o tamanho da cadeia do polímero.

A Figura 26 apresenta os espectros de absorção na região do UV-Vis das soluções PVP-K30/AgNP e PVP-K90/AgNP antes (w/o) e depois da adição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50mM).

Após a adição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, observou-se instantâneo clareamento da solução PVP-K30/AgNP, indicando a oxidação das AgNPs pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de acordo com a significativa queda na absorção da banda centrada em 460 nm, aproximadamente (Figura 26 A). Por outro lado, a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na solução PVP-K90/AgNP resultou em mudanças menos bruscas com relação às AgNPs, visto que a diminuição na absorbância da banda em 450 nm ocorreu em menor proporção, possibilitando ainda o reconhecimento da mesma mesmo após 3 h (Figura 26 B).



**Figura 26.** Espectros de absorção das soluções de **a)** PVP K30/AgNP (w/o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e PVP K30/AgNP /H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e **b)** PVP K90/AgNP (w/o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e PVP K90/AgNP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em diferentes intervalos de tempo.

Os resultados corroboram para o fato de efeitos estéricos estarem associados à estabilização extra das AgNPs. Desta maneira, torna-se possível a formação de hidrogéis nanoestruturados de PVP/AgNP reticulados por reação de Fenton.

#### 5.2.2.2. Caracterização das nanofibras de PVP/AgNP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

A reação de Fenton, conforme já discutido, constitui uma interessante metodologia para a produção de hidrogéis de PVP. Contudo, a produção de radicais hidroxila que darão origem às ligações cruzadas na estrutura da PVP provém de

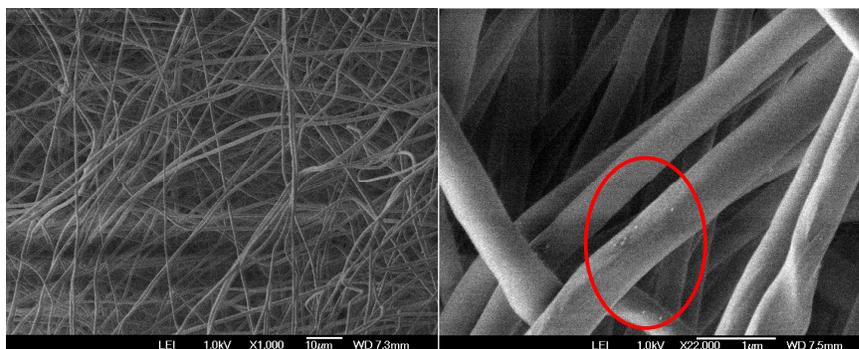
uma cascata de reações redox. Reações redox também estão presentes no processo de formação das AgNPs e, avaliando-se os valores dos potenciais de redução dos dois sistemas envolvidos, nota-se que uma competição poderá ocorrer durante a formação do hidrogel.

De acordo com os potenciais de redução das duas espécies (Equações 6 e 7) pode-se prever que quando colocadas em contato o  $H_2O_2$  oxidará a  $Ag^0$  a  $Ag^+$ , sendo consumido e inviabilizando a formação do hidrogel de PVP/AgNP por reação de Fenton. Apesar disso, decidiu-se pelo estudo da obtenção desses hidrogéis por esta técnica na expectativa de que, de alguma forma, NPs e  $H_2O_2$  fossem preservados.

#### ***5.2.2.2.a Microscopia eletrônica de varredura***

Fibras de PVP/ $H_2O_2$ /AgNP foram obtidas por eletrofiação e tiveram suas morfologias analisadas por MEV. As fibras possuem diâmetro médio de  $1\mu m$  e se apresentaram uniformes com relação à estrutura, visto a ausência de gotas ou aglomerados poliméricos (Figura 27). Além disso, igualmente às nanofibras de

PVP/AgNP, foi possível observar algumas AgNP expostas na superfície das fibras (imagem à direita).

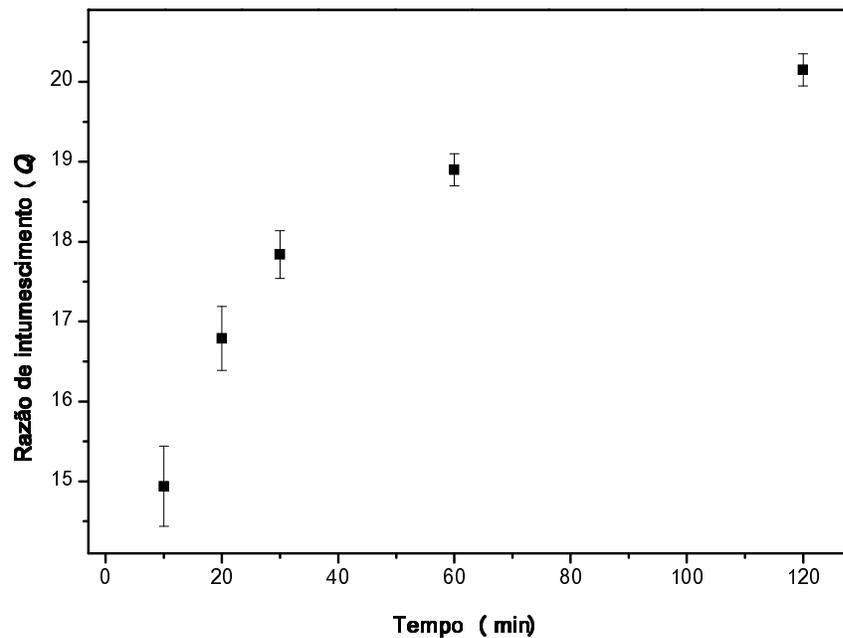


**Figura 27.** Imagens representativas de MEV das fibras de PVP/AgNP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> obtidas por eletrofiação.

### 5.2.2.3. Caracterização do hidrogel de PVP/AgNP reticulados por reação de Fenton

A razão de intumescimento ( $Q$ ) foi determinada para os hidrogéis de PVP/AgNP reticulados por reação de Fenton e os resultados obtidos encontram-se apresentados na Figura 28. Após 120 minutos esses hidrogéis apresentaram um valor de  $Q$  de aproximadamente 20, enquanto que os hidrogéis nanoestruturados de PVP também reticulados por reação de Fenton, sem AgNPs, apresentaram um  $Q$  de aproximadamente 24 (Figura 13). De maneira semelhante aos hidrogéis reticulados

por radiação UV-C, a presença de AgNPs diminui a capacidade de intumescimento dos hidrogéis. Entretanto, esse efeito foi menos pronunciado para os hidrogéis produzidos por reação de Fenton.



**Figura 28.** Razão de intumescimento para os hidrogéis de PVP/AgNP produzidos por eletrofiliação e reticulados por reação de Fenton.

### 5.3. Atividade bactericida e bacteriostática dos hidrogéis de PVP/AgNP

Os hidrogéis formados a partir de nanocompósitos de PVP/AgNP, e reticulados por radiação UV-C, foram testados quanto ao seu potencial bactericida.

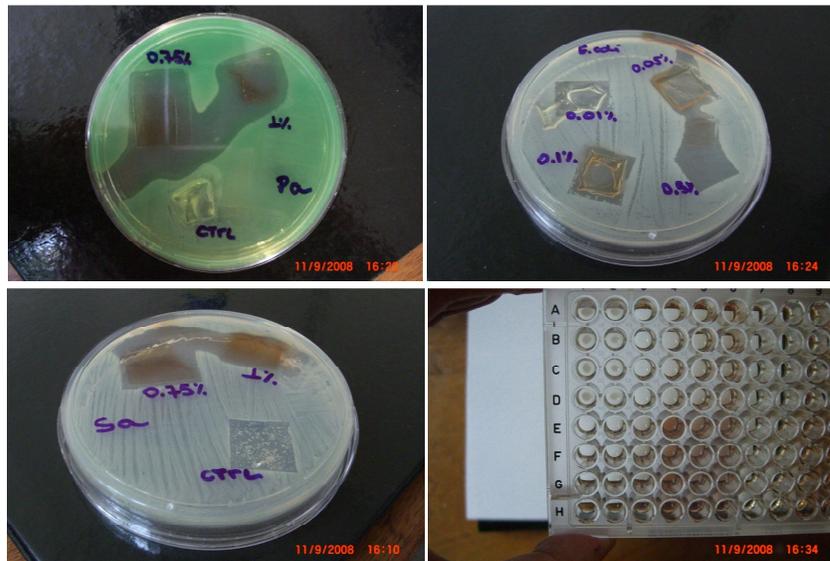
Foram escolhidas bactérias gram-positivas e gram-negativas, comumente encontradas em feridas e queimaduras, sendo *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Foram realizados os testes de microdiluição e formação de halo de inibição, com o objetivo de se determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e analisar o potencial bactericida do material na sua forma de hidrogel. Os resultados para os testes de microdiluição encontram-se dispostos na Tabela 8, onde pode ser constatado o potencial bactericida dos hidrogéis. Além disso, observa-se que os valores de CIM para as bactérias gram-negativas foram menores do que o observado para a bactéria gram-positiva (*S. aureus*). PVP e tetraciclina foram utilizadas como controle negativo e positivo, respectivamente.

**Tabela 8.** Concentração mínima inibitória (CIM) de AgNP nos hidrogel de PVP determinada por microdiluição. Tetraciclina e PVP foram utilizadas como controles.

Bactéria	Concentração de AgNP no hidrogel (%)								PVP	Tetraciclina
	0,001	0,005	0,01	0,05	0,1	0,5	1			
<i>P. aeruginosa</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	
<i>S. aureus</i>	+	+	-	-	-	-	-	+	-	
<i>E. coli</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	

A Figura 29 apresenta os halos de inibição formados pelo hidrogéis de PVP/AgNP quando em contato com as bactérias. Esses resultados mostraram-se em acordo com os obtidos nos testes de microdiluição (Tabela 8).



**Figura 29.** Imagens ilustrativas dos testes bactericidas realizados para os hidrogéis de PVP/AgNP contra *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* (halo de inibição) e imagem do ensaio de microdiluição.

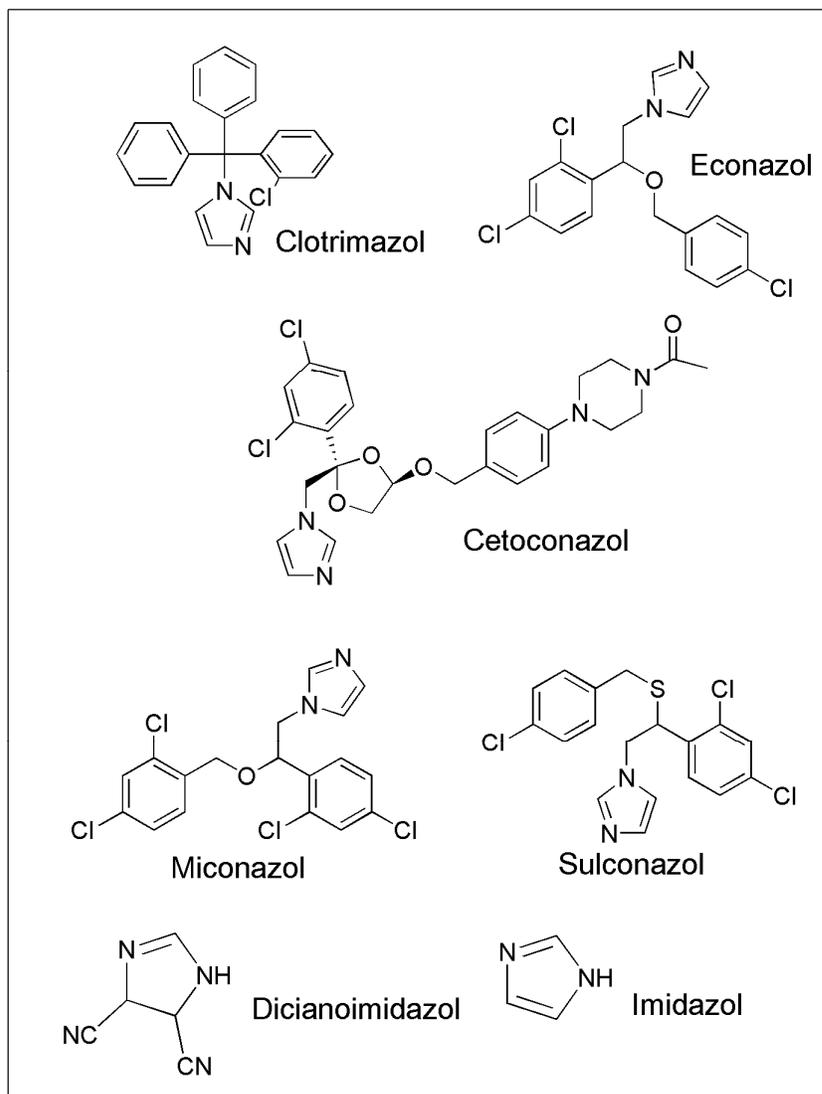
Os testes biológicos realizados constataram que os hidrogéis formados por PVP/AgNP produzidos por eletrofiliação possuem potencial bactericida. Essa atividade é bastante importante quando se almeja a obtenção de um biomaterial para aplicação em feridas crônicas, onde a infecção por bactérias constitui um grande problema ao processo de cicatrização.

#### 5.4. Hidrogéis nanoestruturados de PVP/AgNP/Imidazol: Modelo para um hidrogel multifuncional

Encontram-se relatos na literatura de infecções causadas por fungos, principalmente em feridas oriundas de queimaduras e naquelas tratadas com curativos não oclusivos. As espécies mais comuns são *Candida sp* e *Aspergillus sp*. [111, 112]

Os fungos são constituídos por uma parede de quitina e polissacarídeo e por uma membrana celular composta principalmente pelo ergosterol. Devido a essas características particulares, os fungos em geral são resistentes aos antimicrobianos empregados em infecções causadas por bactérias. Desta maneira, foi objetivo deste trabalho o estudo de um modelo de hidrogel bactericida-fungicida, fazendo-se uso de uma importante propriedade das nanopartículas metálicas: a coordenação de moléculas em sua superfície.

Derivados de imidazóis são comumente utilizados como fungicidas, tais como clotrimazol, econazol, cetoconazol, miconazol e sulcunazol (Figura 30). Esses derivados são inibidores da biossíntese do ergosterol, atuam diretamente na membrana celular dos fungos e ocasionam sua morte.



**Figura 30.** Estruturas química de moléculas fungicidas contendo o anel imidazólico.

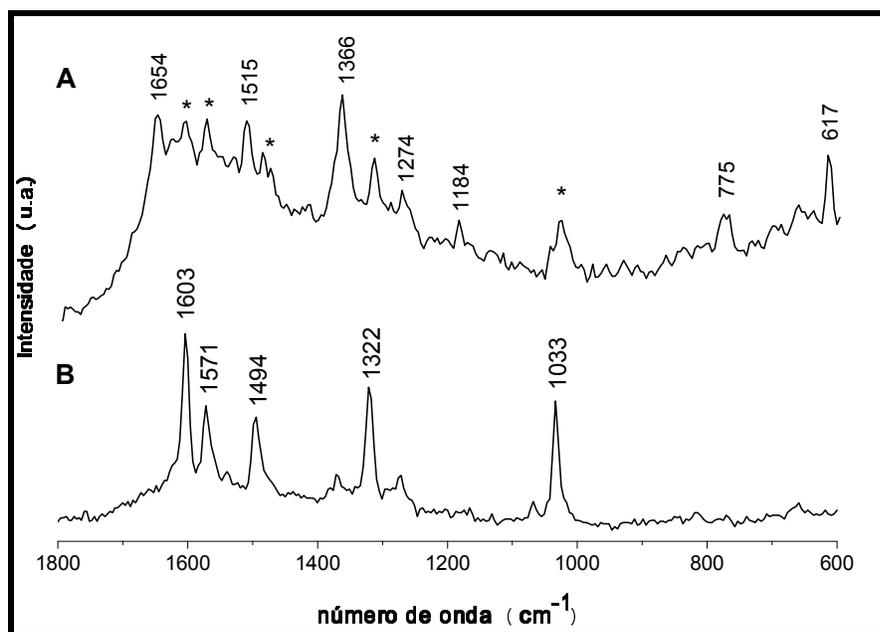
Sabe-se da literatura que nanopartículas de prata possuem grande afinidade por grupos tióis, amins e carboxilatos [113] e, conforme já discutido, elas possuem potente atividade bactericida. Desta maneira, esta etapa do trabalho descreve a

produção de um modelo de hidrogel híbrido que, além de apresentar as vantagens típicas de um hidrogel, também apresente atividade bactericida e fungicida.

#### **5.4.1. Caracterização do sistema AgNP/Imidazol e das nanofibras de PVP/AgNP/Imidazol**

Uma característica importante das AgNPs, e de outras nanopartículas metálicas, é a de não apresentarem total recobrimento de sua superfície pelo agente estabilizante. Este fato permite a interação de nanopartículas com outros tipos de moléculas [113].

É proposto que a interação entre as AgNPs e o imidazol ocorra através dos átomos de nitrogênio presentes. A confirmação da coordenação do imidazol nas AgNPs foi feita através da análise dos espectros Raman dos sistemas AgNP/Imidazol obtido por SERS. A Figura 31 apresenta os espectros Raman dos sistemas AgNP/Imidazol antes e depois da troca da camada passivante de citrato. Conclui-se que a troca foi realizada, pois é possível observar as bandas referentes ao imidazol (Figura 31 A e B). Contudo, a troca não ocorreu de maneira completa visto que ainda é possível identificar bandas de citrato.



**Figura 31.** Espectro SERS das AgNPs/Imidazol (a) após e (b) antes da troca da camada passivante de citrato.

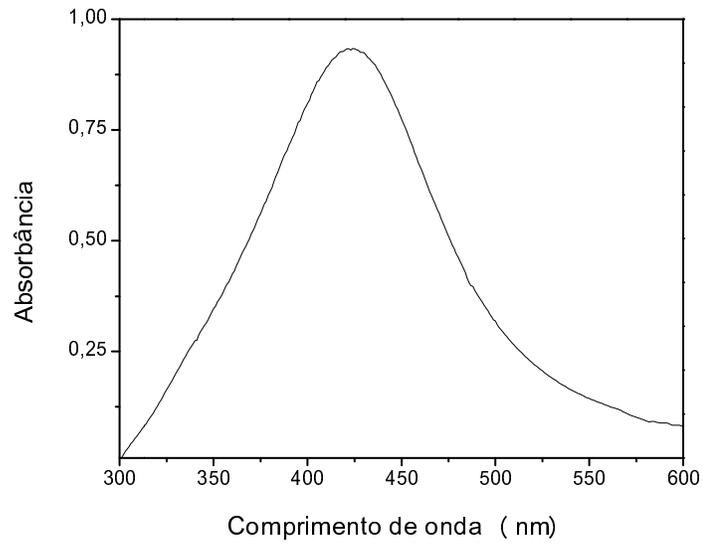
A Tabela 9 apresenta a atribuição por tentativa realizada para as bandas obtidas por Raman.

**Tabela 9.** Atribuição por tentativa dos espectros SERS das AgNPs com o imidazol [114].

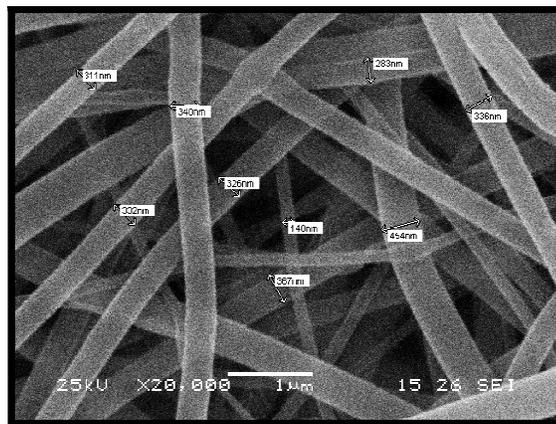
SERS Imidazol/ $\text{cm}^{-1}$	Atribuição <sup>a</sup>
1654	$\nu\text{-CH} + \delta\text{-NH} + \delta\text{-CH}$
1515	$\nu\text{-CC} + \nu\text{-CH} + \nu\text{-NH}$
1366	$\nu\text{-CC} + \nu\text{-CN} + \delta\text{-NH}$
1274	$\nu\text{-CN} + \delta\text{-CH}$
1184	$\nu\text{-CN}$
775	$\pi\text{-CH}$
617	Deformação do anel fora do plano

<sup>a</sup>  $\nu$  = estiramento;  $\delta$  = deformação angular no plano;  $\pi$  = deformação angular fora do plano

As nanofibras de PVP/AgNP/Imidazol foram obtidas com êxito por eletrofiação. A Figura 32 apresenta a banda de absorção plasmônica das AgNPs funcionalizadas com imidazol utilizadas para a produção das nanofibras, ilustradas pela Figura 33. É possível observar que as nanofibras possuem morfologia uniforme, e não apresentam gotas ou aglomerados poliméricos em sua estrutura. O diâmetro médio encontrado para essas nanofibras foi de  $300 \pm 80$  nm.



**Figura 32.** Espectro de extinção das AgNPs funcionalizadas com imidazol.



**Figura 33.** Imagem representativa de MEV das nanofibras de PVP/AgNP/imidazol

obtidas por eletrofiação.

#### 5.4.2. Estudo teórico de interação preferencial dos ligantes *N*-(*sec*-butil)-2-pirrolidona e imidazol às AgNPs

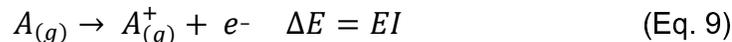
Com objetivo de avaliar a interação do imidazol e da PVP com as AgNPs foi utilizada a teoria ácido-base duro e mole proposta por R. G. Pearson [115].

Nesse caso, considera-se que a superfície das AgNPs apresentam  $\text{Ag}^+$  e que esses íons são ácidos moles, segundo Pearson [116]. O composto *N*-(*sec*-butil)-2-pirrolidona é um fragmento que está sendo utilizado para representar uma unidade monomérica da PVP. Ambos os compostos, *N*-(*sec*-butil)-2-pirrolidona e imidazol, foram tratados como uma base que interage com os íons  $\text{Ag}^+$ .

A teoria de Pearson afirma que ácidos moles interagem preferencialmente com bases moles ou com a base que apresentar o maior caráter mole. Para avaliar o caráter duro-mole de uma molécula, é utilizado o conceito de *dureza absoluta* ( $\eta$ ) proposto por Pearson em 1983 [117], conforme Equação 8:

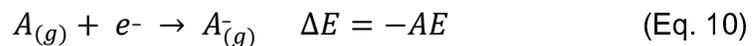
$$\eta = \frac{EI - AE}{2} \quad (\text{Eq. 8})$$

em que, EI representa a energia de ionização da molécula e AE a afinidade eletrônica. Tais grandezas podem ser determinadas experimentalmente. Entretanto, uma das maneiras de estimar os valores de EI e AE é a utilização de cálculos teóricos em nível *ab initio*, conforme metodologia proposta por F. A. Sigoli e colaboradores [108]. Nesse caso, considera-se que a EI pode ser obtida através da ionização da molécula cuja estrutura foi otimizada pelo método DFT/UHF. O processo acima descrito pode ser representado pela Equação 9:

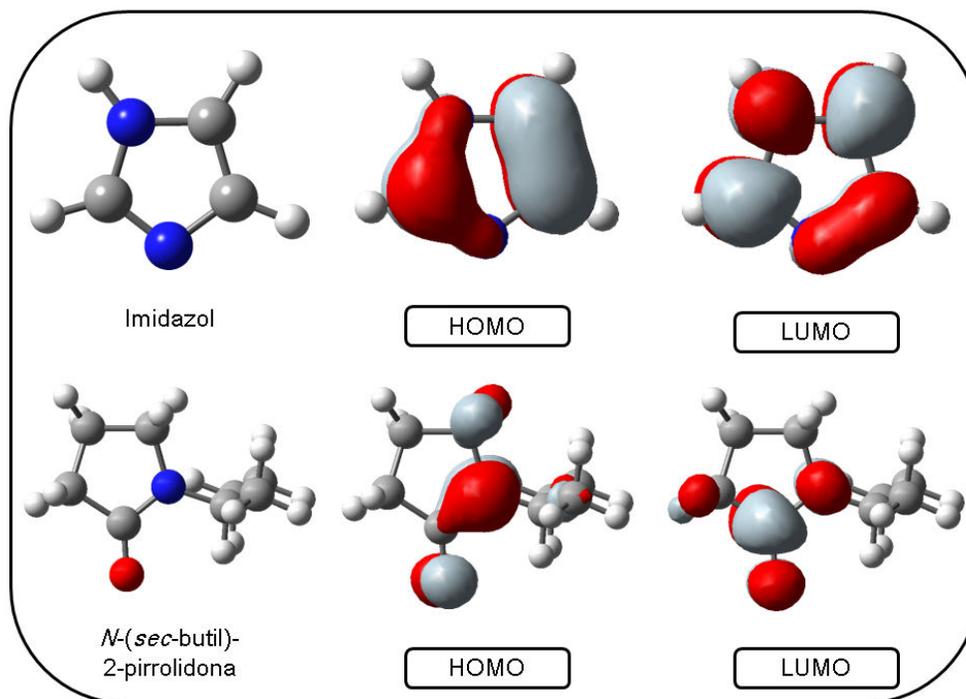


em que, A representa as moléculas que estão sendo estudadas (Imidazol e *N*-(*sec*-butil)-2-pirrolidona).

A determinação da AE é obtida através do cálculo de energia a partir da adição de um elétron à estrutura calculada como a mais estável. Esse processo pode ser representado pela Equação 10. As estruturas, catiônicas e aniônicas, foram calculadas assumindo os estados duplete.



A Figura 34 apresenta as estruturas moleculares do imidazol e da *N*-(*sec*-butil)-2-pirrolidona otimizadas por método *ab initio*. Além disso, podem-se observar os respectivos orbitais de fronteira HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital*) e LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*).



**Figura 34.** Estrutura otimizada do imidazol, *N*-(*sec*-butil)-2-pirrolidona e seus respectivos orbitais de fronteira.

Os resultados de *dureza absoluta* relacionam as interações entre ácido-base mole ou duro em fase gasosa e podem fornecer um indicativo de reação preferencial em outros meios. Com isso, podemos observar que quanto menor a *dureza absoluta* de uma molécula maior o caráter mole, ou seja, melhor será a interação com os íons  $\text{Ag}^+$ .

Com base nos resultados apresentados na Tabela 10 é possível observar que a *N*-(*sec*-butil)-2-pirrolidona apresenta melhor interação com  $\text{Ag}^+$  do que a molécula de imidazol.

**Tabela 10.** Valores de energia de ionização (EI), afinidade eletrônica (AE) e dureza absoluta ( $\eta$ ) para as moléculas de imizadol e de *N*-(*sec*-butil)-2-pirrolidona.

Molécula	EI (eV)	AE (eV)	$\eta$
Imidazol	9,01	-0,40	4,71
<i>N</i> -( <i>sec</i> -butil)-2-pirrolidona	8,63	-0,38	4,51

Esses resultados auxiliaram na interpretação das observações experimentais com relação à atividade fungicida apresentada pelos hidrogéis de PVP/AgNP/Imidazol. Há, desta maneira, um indicativo de que derivados

imidazólicos, e o próprio imidazol são passíveis de serem liberados do hidrogel, constituindo não apenas um material fungistático.

#### 5.4.3. Atividade fungicida dos hidrogéis de PVP/AgNP-Imidazol

Visando a produção de um material modelo com potencial fungicida, os hidrogéis foram testados contra três fungos da espécie *Candida*: *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*. Espécies de *Candida* têm sido incidentes em infecções, levando a complicações maiores no processo de cicatrização.

A Tabela 11 apresenta os resultados obtidos com hidrogéis de PVP/AgNP/Imidazol, relativos aos potenciais fungicidas. Foram utilizados miconazol e anfotericina B como controles positivos e o hidrogel de PVP/AgNP como controle negativo.

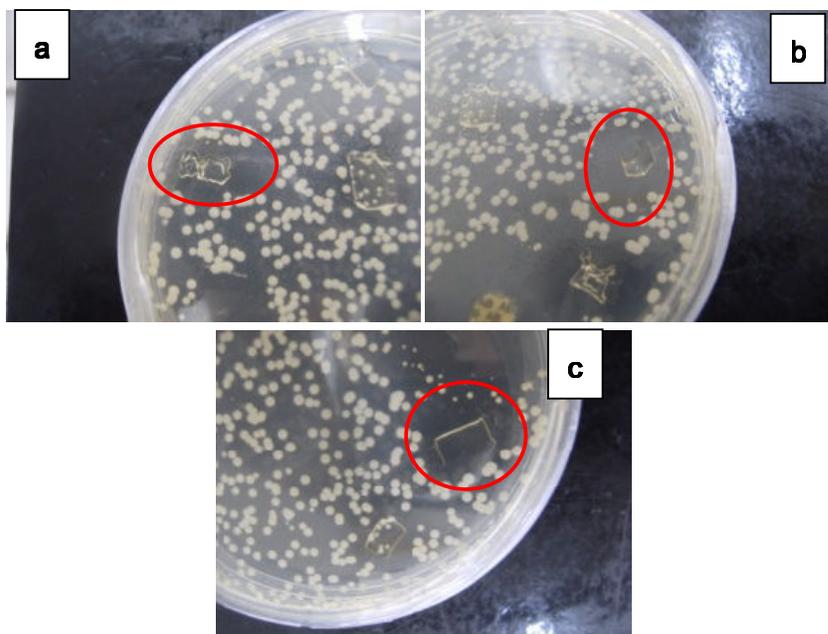
De maneira geral, os materiais foram ativos contra todas as espécies de *Candida* testadas. As cepas apresentaram-se sensíveis aos hidrogéis testados, onde uma concentração de 0,05% de imidazol foi suficiente para promover a morte dos fungos e impedir seu crescimento.

**Tabela 11.** Ensaio fungicida dos hidrogéis de PVP/AgNP/Imidazol contra diferentes espécies de *Candida*.

Fungos	Imidazol (%)				Controles		
	0,01	0,025	0,05	0,1	PVP/AgNP	Miconazol	Anfotericina B
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>C. krusei</i>	+	-	-	-	+	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	+	+	-	-	+	-	-

Na literatura estão descritos outros sistemas de hidrogéis com potencial fungicida ou de liberação de moléculas fungicidas. Como exemplo desses sistemas tem-se o formado por poli(*N*-vinil-2-pirrolidona/ácido itacônico) capaz de liberar terbinafina [118], um agente fungicida contra fungos dermatófitos e filamentosos, podendo ser fungicida ou fungistático contra leveduras. Hidrogéis de dextrana incorporados com anfotericina B também foram reportados, onde se constatou a atividade fungicida deste material contra *C. albicans* [119]. Hidrogéis formados por blends de PVP/PVA também tiveram seus potenciais antimicrobiais reportados [14]. Os resultados demonstram que tanto os hidrogéis puros quanto aqueles

incorporados com cetoconazol ou amoxicilina foram inativos contra *P. aeruginosa* e *C. albicans*, dentre outros, e bastante eficientes contra *Bacillus subtilis* [14].



**Figura 35.** Imagens dos testes fungicidas realizados com os hidrogéis de PVP/AgNP/Imidazol contra (a) *Candida albicans*, (b) *C. krusei* e (c) *C. parapsilosis*.

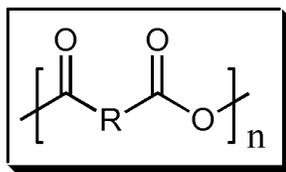
Desta maneira, o hidrogel híbrido composto por PVP/AgNP/Imidazol apresenta-se como um modelo e uma nova abordagem para a formação de materiais híbridos multifuncionais com aplicação em tratamento de feridas. Como se trata de um modelo, derivados comerciais de imidazol com eficácia fungicida comprovada deverão ser estudados numa próxima etapa.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO - PARTE 3

#### 6. HIDROGÉIS A PARTIR DE BLENDA MISCÍVEIS DE PVP E POLIANIDRIDOS

##### BIOATIVOS.

Polianidridos compreendem uma importante classe de polímeros biodegradáveis, em que os produtos de degradação são moléculas não tóxicas. São derivados de diácidos (monômeros) unidos por ligações anidrido (Figura 36) instáveis frente à degradação hidrolítica [120]. Adicionalmente, a velocidade de degradação pode ser controlada através da composição do polímero, sendo que tal degradação se dá por um processo de erosão da superfície polimérica [121, 122].



**Figura 36.** Estrutura química geral dos polianidridos.

Polianidridos bioativos derivados de várias moléculas têm sido extensivamente estudados por Urich e colaboradores. Dentre eles, destacam-se os derivados de ácidos hidroxicinâmicos e do ácido salicílico (poliaspirina) [43, 120, 121, 123-129]. Esses compostos encontram grande aplicação como biomateriais, sendo adequados a sistemas de liberação controlada, engenharia de tecidos, embalagens, produtos de cuidados pessoais, entre outros [48, 130-133].

Conforme mencionado, polianidridos de hidroxicinamatos foram obtidos, utilizando-se os ácidos ferúlico, sinápico e *p*- e *m*-cumárico como moléculas bioativas [48]. Urich e colaboradores reportaram que a cinética de degradação hidrolítica destes polímeros é consideravelmente lenta, visto o alto caráter hidrofóbico desses polímeros. Esses polímeros possuem interessante atividade biológica, cujos produtos de degradação apresentam potencial antioxidante, antiinflamatória, anticarcinogênica, antimicrobiana e antiproliferativa [48].

Neste sentido, uma formulação mais hidrofílica destes polímeros, como por exemplo, em hidrogéis na forma de blendas, pode constituir uma alternativa para o incremento da cinética de degradação/liberação destes ativos. A produção de hidrogéis a partir de blendas de PVP com os polianidridos derivados dos

hidroxicinamatos com potencial habilidade de liberar moléculas de interesse farmacológico a partir de sua estrutura foram alvos de estudo neste trabalho.

## **6.1. Polianidridos bioativos – Cloreto de adipoíla como molécula conectora**

### **6.1.1. Síntese dos monômeros - Diácidos**

A seguir encontram-se os resultados obtidos para a síntese dos monômeros (diácidos) sintetizados com cloreto de adipoíla como molécula conectora. Os materiais tiveram suas estruturas químicas e grau de pureza confirmados por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de  $^1\text{H}$ ), além de caracterizações realizadas por calorimetria diferencial exploratória (DSC), termogravimetria (TG) e cromatografia por exclusão de tamanho (SEC). Para todos os casos, os espectros revelaram a formação das moléculas e polímeros de interesse, indicando quantidade residual mínima de material de partida. Todos os dados apresentados foram comparados e encontram-se compatíveis com os descritos na literatura [48].

## 6.1.1.1. Diácido ferúlico

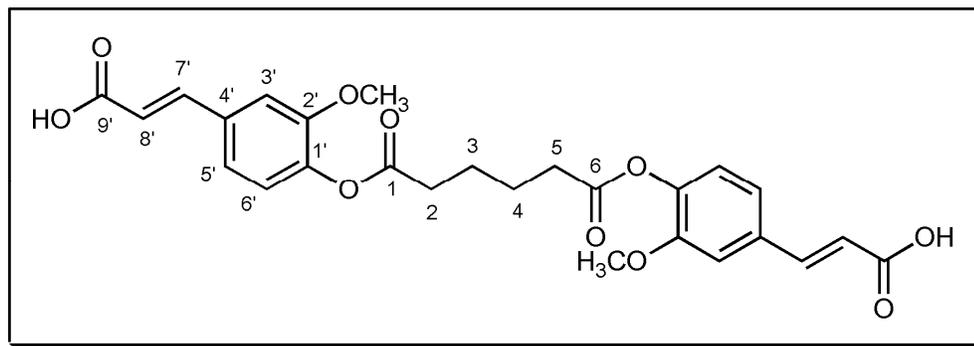


Figura 37. Estrutura química do diácido ferúlico.

A análise de RMN de  $^1\text{H}$  do diácido ferúlico apresentou sinais de multipletos em  $\delta$  1,78 e 2,63 referentes aos hidrogênios metilênicos 3/4 e 2/5, respectivamente. Os hidrogênios aromáticos 5' e 6' foram representados por dubletos em  $\delta$  7,24 e 7,10, respectivamente, com  $J = 8,0$  Hz relativo ao acoplamento *orto* entre esses hidrogênios aromáticos. Observou-se um singlete em  $\delta$  7,47 que foi atribuído ao hidrogênio aromático localizado na posição 3'.

Dubletos característicos de hidrogênios com configuração *trans* foram observados em  $\delta$  7,54 e 6,55 com  $J = 16,0$  Hz, sendo atribuídos aos hidrogênios 7' e

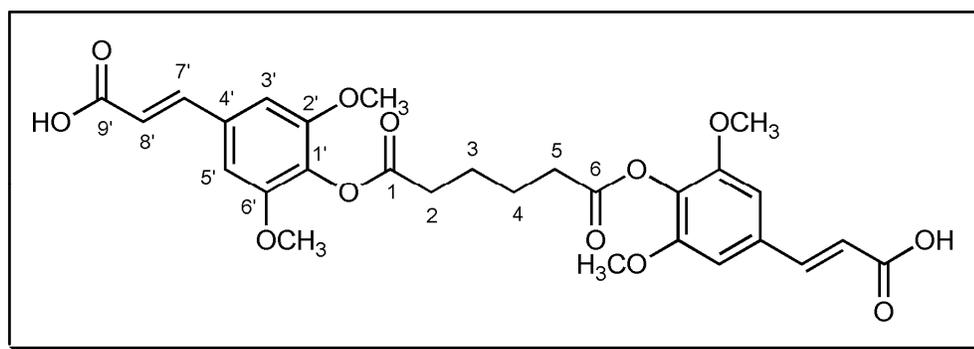
8', respectivamente. Os hidrogênios relativos às metoxilas apresentaram-se como um singlete em  $\delta$  3,80. Os hidrogênios ácidos foram observados em  $\delta$  11,5.

A análise de RMN de  $^1\text{H}$ , juntamente com a comparação dos dados reportados na literatura permitiu a confirmação da síntese do diácido ferúlico (Figura 37) precursor do polianidrido de interesse. Esta reação apresentou um rendimento satisfatório de 83%.

**Tabela 12.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  do diácido ferúlico sintetizado e dados reportados na literatura [48].

Posição	Multiplicidade, $\delta$ (ppm) e $J$ (Hz) (este trabalho)	Multiplicidade e $\delta$ (ppm) *[48]
<b>2</b>	2H 2,63 ( <i>m</i> )	2H 2,63
<b>3</b>	2H 1,78 ( <i>m</i> )	2H 1,75
<b>4</b>	2H 1,78 ( <i>m</i> )	2H 1,75
<b>5</b>	2H 2,63 ( <i>m</i> )	2H 2,63
<b>3'</b>	2H 7,47 ( <i>s</i> )	2H 7,48
<b>5'</b>	2H 7,10 ( <i>d</i> , 8,0)	2H 7,26
<b>6'</b>	2H 7,24 ( <i>d</i> , 8,0)	2H 7,47
<b>7'</b>	2H 7,54 ( <i>d</i> , 16,0)	2H 7,11
<b>8'</b>	2H 6,55 ( <i>d</i> , 16,0)	2H 6,58
<b>OCH<sub>3</sub></b>	6H 3,80 ( <i>s</i> )	6H 3,80
<b>OH</b>	2H 11,5 ( <i>br</i> )	-

### 6.1.1.2. Diácido sinápico



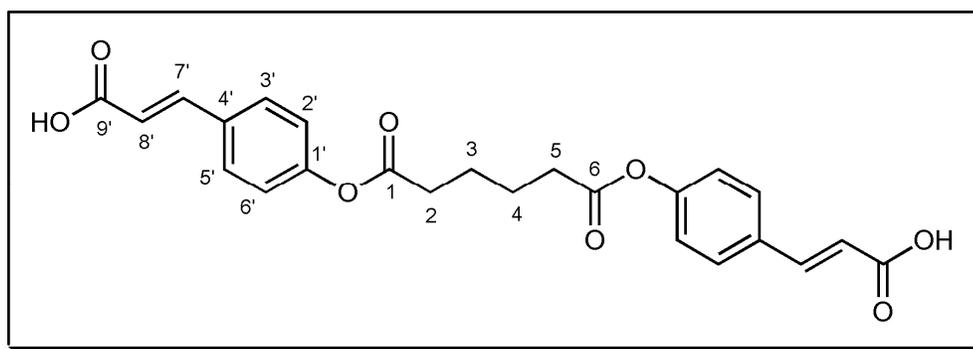
**Figura 38.** Estrutura química do diácido sinápico.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do diácido sinápico (Figura 38) é de maneira geral bastante semelhante com o obtido para o diácido ferúlico, de maneira que a descrição da atribuição será omitida. A comparação dos resultados obtidos com os dados da literatura encontra-se na Tabela 13. Esta reação apresentou um rendimento de 62,5%.

**Tabela 13.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  do diácido sinápico sintetizado e dados reportados na literatura [48].

Posição	Multiplicidade, $\delta$ (ppm) e $J$ (Hz) (este trabalho)	Multiplicidade e $\delta$ (ppm) *[48]
<b>2</b>	2H 2,61 ( <i>m</i> )	2H 2,60
<b>3</b>	2H 1,75 ( <i>m</i> )	2H 1,74
<b>4</b>	2H 1,75 ( <i>m</i> )	2H 1,74
<b>5</b>	2H 2,61 ( <i>m</i> )	2H 2,60
<b>3'</b>	2H 7,09 ( <i>d</i> , 2,8)	2H 7,09
<b>5'</b>	2H 7,09 ( <i>d</i> , 2,8)	2H 7,09
<b>7'</b>	2H 7,53 ( <i>d</i> , 16)	2H 7,55
<b>8'</b>	2H 6,60 ( <i>d</i> , 15,6)	2H 6,61
<b>OCH<sub>3</sub></b>	12H 3,80 ( <i>s</i> )	12H 3,80
<b>OH</b>	2H 12,3 ( <i>br</i> )	-

### 6.1.1.3. Diácido *p*-cumárico



**Figura 39.** Estrutura química do diácido *p*-cumárico .

Da mesma forma, o perfil do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do diácido *p*-cumárico (Figura 39) é semelhante com o obtido para o diácido ferúlico e sinápico. Esses resultados encontram-se dispostos na Tabela 14, onde também é possível estabelecer uma comparação com os dados da literatura.

**Tabela 14.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  do diácido *p*-cumárico sintetizado e dados reportados na literatura [48].

Posição	Multiplicidade, $\delta$ (ppm) e $J$ (Hz) (sintetizados)	Multiplicidade e $\delta$ (ppm) *[48]
<b>2</b>	2H 2,63 ( <i>m</i> )	2H 2,64
<b>3</b>	2H 1,75 ( <i>m</i> )	2H 1,72
<b>4</b>	2H 1,75 ( <i>m</i> )	2H 1,72
<b>5</b>	2H 2,63 ( <i>m</i> )	2H 2,64
<b>2'</b>	2H 7,59 ( <i>d</i> , 8)	2H 7,73
<b>3'</b>	2H 7,10 ( <i>d</i> , 8)	2H 7,17
<b>5'</b>	2H 7,10 ( <i>d</i> , 8)	2H 7,17
<b>6'</b>	2H 7,59 ( <i>d</i> , 8)	2H 7,73
<b>7'</b>	2H 7,85 ( <i>d</i> , 16)	2H 7,55
<b>8'</b>	2H 6,53 ( <i>d</i> , 15,6)	2H 6,50
<b>OH</b>	2H 10 ( <i>br</i> )	-

Diferentemente do observado para os outros diácidos, neste não há a presença de metoxilas e os hidrogênios ácidos foram representados por um sinal alargado em  $\delta$  10. Esta reação apresentou um rendimento de 70%.

### 6.1.2. Síntese dos polianidridos bioativos derivados de hidroxicinamatos

Os polímeros sintetizados a partir dos diácidos foram caracterizados por RMN de  $^1\text{H}$ , SEC e DSC. Todos eles apresentaram pureza adequada e os rendimentos obtidos para as reações foram de 74,3%, 73,3% e 75% para os poli(ácido ferúlico) (PAF), poli(ácido sinápico) (PAS) e poli(ácido *p*-cumárico) (PAC), respectivamente.

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos polianidridos foram obtidos com o objetivo de se constatar a formação dos polímeros através da comparação dos sinais obtidos com os respectivos diácidos. Nestes casos, o perfil do espectro e os deslocamentos químicos não se alteram de maneira significativa, sendo o desaparecimento dos sinais dos hidrogênios ácidos a mudança mais expressiva, sendo comparáveis aos dados da literatura [48].

Os valores de  $M_w$  e PDI para os polianidridos sintetizados foram determinados por análise de SEC e estão dispostos na Tabela 16. Exceto pelo PAC, os polímeros sintetizados neste trabalho apresentaram um valor menor de massa molar, com relação aos polianidridos bioativos previamente obtidos e reportados pela literatura. Este fato é mais pronunciado para o poliácido ferúlico quando comparado ao poliácido sinápico.

Tabela 15. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  dos polianidridos bioativos.

Posição	Multiplicidade, $\delta$ (ppm) e $J$ (Hz)		
	PAF	PAS	PAC
2	2H 2,63 ( <i>m</i> )	2H 2,60 ( <i>m</i> )	2H 2,65 ( <i>m</i> )
3	2H 1,79 ( <i>m</i> )	2H 1,75 ( <i>m</i> )	2H 1,73 ( <i>m</i> )
4	2H 1,79 ( <i>m</i> )	2H 1,75 ( <i>m</i> )	2H 1,73 ( <i>m</i> )
5	2H 2,63 ( <i>m</i> )	2H 2,60 ( <i>m</i> )	2H 2,65 ( <i>m</i> )
2'	-	-	2H 7,85
3'	2H 7,63 ( <i>s</i> )	2H 7,23 ( <i>d</i> )	2H 7,21
5'	2H 7,18 ( <i>d</i> )	2H 7,09 ( <i>d</i> )	2H 7,21
6'	2H 7,40 ( <i>d</i> )	-	2H 7,85
7'	2H 7,89 ( <i>d</i> , $J = 16$ )	2H 7,50 ( <i>d</i> , $J = 16$ )	2H 7,55 ( <i>d</i> , $J = 16$ )
8'	2H 6,88 ( <i>d</i> , $J = 16$ )	2H 6,58 ( <i>d</i> , $J = 16$ )	2H 6,46 ( <i>d</i> , $J = 16$ )
OCH <sub>3</sub>	6H 3,80 ( <i>s</i> )	12H 3,80 ( <i>s</i> )	-

Tabela 16. Dados de massa molar ( $M_w$ ) e índice de polidispersividade (PDI)

dos polianidridos sintetizados e comparação com dados da literatura.

Polímero	$M_w$	PDI	$M_w^*$	PDI*
PAF	23.500	1,72	71.400	1,50
PAS	20.500	1,71	38.300	1,70
PAC	30.400	1,80	26.700	1,70

\* valores reportados na literatura [48].

Os valores das temperaturas de transição vítrea ( $T_g$ ) para os polianidridos sintetizados foram obtidos através de análises de DSC e encontram-se dispostos na Tabela 17, juntamente com a  $T_g$  da PVP K90. Os valores descritos na literatura também foram reportados para efeito de comparação.

**Tabela 17.** Valores de temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) e temperatura de decomposição ( $T_d$ ) observados para os polímeros obtidos e comparação com dados da literatura.

<b>Polímero</b>	<b><math>T_g</math> (°C)</b>	<b><math>T_d</math> (°C)</b>	<b><math>T_g</math> (°C)*</b>	<b><math>T_d</math> (°C)*</b>
<b>PVP K90</b>	182	432	180 [134]	475 [135]
<b>PAF</b>	58	280	81	339
<b>PAS</b>	120	283	136	315
<b>PAC</b>	60	230	57	302

\* valores descritos na literatura [48].

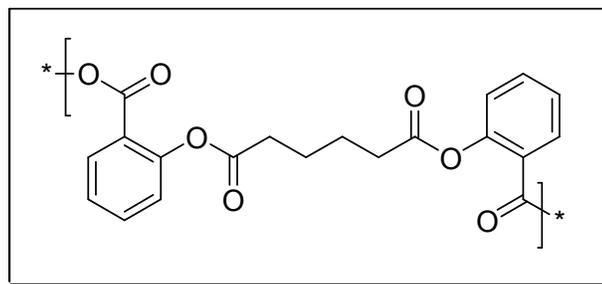
Os valores de  $T_g$  obtidos também se apresentaram menores, comparados aos polímeros sintetizados anteriormente, exceto pelo PAC. Um dos fatores ao qual podemos atribuir este comportamento seria a massa molar obtida, visto que esta

pode exercer influência sobre a temperatura de transição vítrea, o que se apresenta em acordo com os resultados dispostos na Tabela 17.

Uma vez obtidos os polímeros desejados, blendas de PVP/Polianidridos bioativos em diferentes proporções foram produzidas de acordo com procedimento descrito na seção experimental.

### 6.1.3. Poliaspirina

A obtenção e caracterização da poliaspirina utilizando-se cloreto de adipóila como molécula conectora (Figura 40) é descrita pela literatura, assim como variações em seu esqueleto base [120, 121].



**Figura 40.** Estrutura química da poliaspirina.

Esses polímeros possuem diversas vantagens e aplicações, pois um de seus produtos de degradação é o ácido salicílico, que possui potente ação analgésica e antiinflamatória. Entretanto, a poliaspirina não foi sintetizada neste trabalho, sendo produzida anteriormente por Urich e colaboradores.

## **6.2. Caracterização das blendas de PVP/Polianidridos**

### **6.2.1. Avaliação da miscibilidade das blendas produzidas**

#### ***6.2.1.1. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)***

DSC compreende uma técnica termoanalítica amplamente utilizada para a verificação de miscibilidade de blendas poliméricas. Os filmes obtidos por evaporação do solvente das blendas de PVP/PAF, PVP/PAS e PVP/PAC foram analisados por DSC para verificação de suas temperaturas de transição vítrea ( $T_g$ ).

A observação de uma única  $T_g$  compreende um forte indicativo de que os componentes de uma determinada blenda são compatíveis. De acordo com os resultados obtidos (Tabela 18) uma única temperatura de transição vítrea foi encontrada para todas as blendas produzidas, cujo valor encontra-se dentro da faixa

numérica esperada. As temperaturas de transição vítrea obtidas para os polímeros puros para efeito de comparação encontram-se na Tabela 17.

**Tabela 18.** Valores de temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) observados para as diferentes blendas de PVP/Polianidrido.

<b>Composição das blendas</b>	<b>Razão</b>	<b><math>T_g</math> (°C)</b>
PVP/PAF	9:1	130
PVP/ PAF	8:2	115
PVP/ PAF	7:3	90
PVP/PAS	9:1	140
PVP/ PAS	8:2	125
PVP/ PAS	7:3	115
PVP/PAC	9:1	155
PVP/PAC	8:2	138
PVP/PAC	7:3	100

Análises de DSC também foram obtidas para a blenda PVP/Poliaspirina 7:3, onde também foi possível confirmar a formação de um sistema miscível pela observação de uma única  $T_g$  (Tabela 19).

**Tabela 19.** Valores de temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) observados para a poliaspirina, PVP e PVP/Poliaspirina (7:3).

<b>Polímero</b>	<b><math>T_g</math> (°C)</b>
Poliaspirina	46
PVP	182
PVP/Poliaspirina (7:3)	68

A formação de blendas poliméricas miscíveis, sem a necessidade da utilização de compatibilizantes não constitui um sistema trivial, visto que tal fato resulta em uma diminuição da entropia do sistema ( $\Delta S < 0$ ). Com a diminuição da entropia, a energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) tende a apresentar um valor positivo ( $\Delta G > 0$ ), não representando um fenômeno espontâneo. A Equação 11 fundamenta esta explicação,

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (\text{Eq. 11})$$

onde  $\Delta H$  representa a entalpia do sistema e  $T$  a temperatura.

A literatura apresenta a formação de blendas de polianidridos com outros polianidridos, polilactídeo, PCL e PGLA [133, 136-138]. Contudo, pela primeira vez é descrito blendas de polianidridos bioativos com PVP.

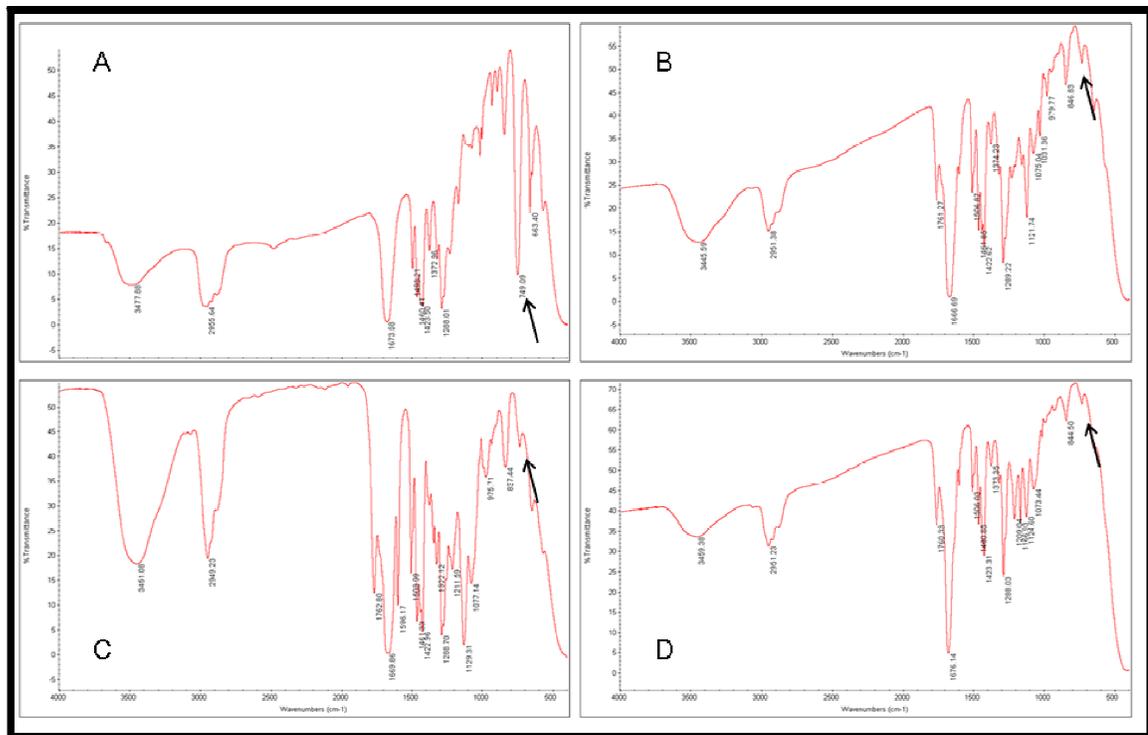
### 6.2.1.2. Espectroscopia no infravermelho (FTIR)

Análises de infravermelho foram realizadas com o intuito de se investigar a natureza da miscibilidade das blendas produzidas e consequente natureza das reticulações físicas produzidas (ver próxima seção). Os resultados indicam possíveis interações hidrofóbicas entre a PVP e os polianidridos bioativos, sendo estas responsáveis pela compatibilidade e formação dos hidrogéis físicos. A Figura 41 contém os espectros de FTIR da PVP e das blendas de PVP/Polianidridos na proporção 7:3, onde pode ser observada uma forte supressão da banda centrada em  $748\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$  *rock*), característica do PVP [139]. Nenhuma mudança significativa foi observada em outras regiões dos espectros.

A mudança observada no espectro de FTIR associados os dados da literatura acerca das possibilidades de interações da PVP e ao tipo de estrutura dos polianidridos sintetizados indicam a presença de interações de origem hidrofóbica, responsáveis pela reticulação física e miscibilidade da blenda.

As estruturas dos polianidridos bioativos possuem dois sítios de interação hidrofóbica com a PVP: (1) a molécula conectora (adipoíla), com uma cadeia de

quatro carbonos (CH<sub>2</sub>), e (2) as metoxilas presentes no anel aromático, exceto pelo polianidrido obtido a partir do ácido *p*-cumárico.

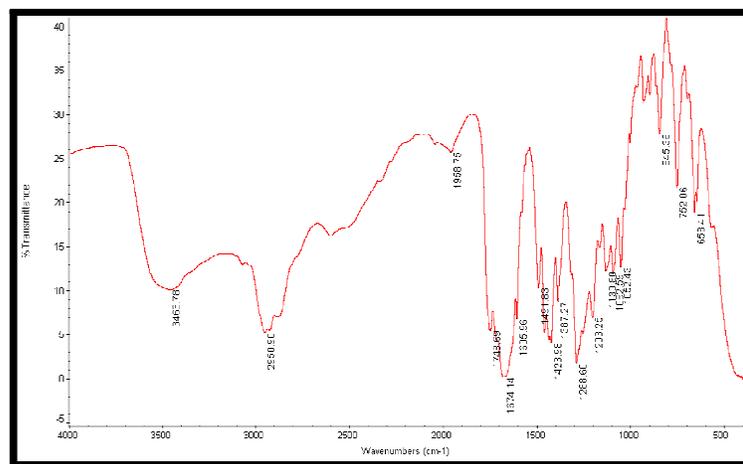


**Figura 41.** Espectros de FTIR do PVP e das blends de PVP/Polianidridos bioativos na proporção 7:3, sendo PVP (A), PVP/PAF (B), PVP/PAS (C) e PVP/PAC (D).

Com relação ao resultado obtido por FTIR (Figura 42), de maneira semelhante aos demais polianidridos, foi observada uma diminuição na banda de

CH<sub>2</sub> rock em 752 cm<sup>-1</sup> (centrada em 748 cm<sup>-1</sup> no espectro da PVP na Figura 41 a) [139]. Entretanto, a intensidade foi bem menos significativa para esta blenda.

A poliaspirina constitui um polímero menos hidrofóbico quando comparado aos outros polianidridos derivados de hidroxicinamatos utilizado neste trabalho, apresentando um valor de ângulo de contato em água de 77° [120]. Além do mais, diferente do observado para as blends formadas por PVP/PAF, PVP/PAS e PVP/PCA, apenas foi possível obter hidrogéis de PVP/Poliaspirina na proporção 7:3. Utilizando outras proporções, por exemplo, PVP/Poliaspirina 9:1 e 8:2, observou-se a completa solubilização dos sistemas.



**Figura 42.** Espectro de FTIR da blenda miscível de PVP/Poliaspirina na proporção

7:3.

### **6.3. Hidrogéis de PVP/Polianidridos**

#### **6.3.1. Razão de intumescimento**

Ao serem colocados em contato com água, os filmes de PVP/Polianidridos intumescem, dando origem a um hidrogel onde a natureza das reticulações é física. Esse fato foi comprovado ao colocar os filmes na presença de DMF, solvente utilizado para a formação da blenda, e foram imediatamente solubilizados (Tabela 20). Além disso, eles foram submetidos a extrator sohxlet com água deionizada a 100°C, onde também se observou a completa solubilização destes materiais (Tabela 20). Devido a esse comportamento, a fração gel não pode ser determinada.

Os hidrogéis produzidos a partir de blends de PVP com os polianidridos bioativos possuem menor caráter hidrofílico do que hidrogéis formados apenas por PVP. Estes polianidridos apresentam valores de ângulo de contato característicos de substâncias hidrofóbicas, sendo 86,5° para o PAF, 85,9° para o PAS e 81,4° para o PAC [48].

**Tabela 20.** Comportamento dos filmes poliméricos em diferentes condições.

<b>Sistemas poliméricos</b>	<b>Solvente</b>	<b>Comportamento observado</b>
PVP	Água 25°C	Dissolve
Polianidridos	Água 25°C	Não dissolvem
PVP/Polianidridos	Água 25°C	<b>Intumescem</b>
PVP	Água 100°C	Dissolve
Polianidridos	Água 100°C	Não dissolvem
PVP/Polianidridos	Água 100°C	Dissolvem
PVP	DMF	Dissolve
Polianidridos	DMF	Dissolvem
PVP/Polianidridos	DMF	Dissolvem

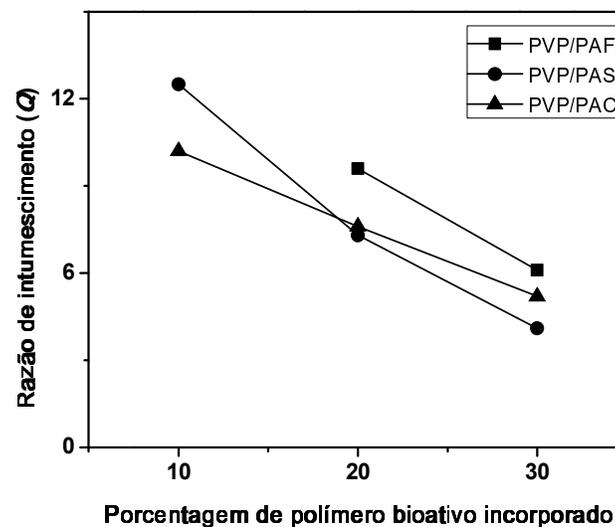
Devido aos altos valores de ângulo de contato e consequente baixa solubilidade em água, esses polímeros bioativos apresentam um tempo de atraso (*lag time*) no perfil de degradação hidrolítica e liberação das moléculas bioativas [48].

A formulação destes polímeros em hidrogéis com PVP pode contribuir a favor do tempo de degradação, visto que a presença de PVP no material resulta em uma maior absorção de água por parte do sistema. Uma imagem do hidrogel PVP/PAF pode ser encontrada na Figura 43.



**Figura 43.** Hidrogel de PVP/PAF.

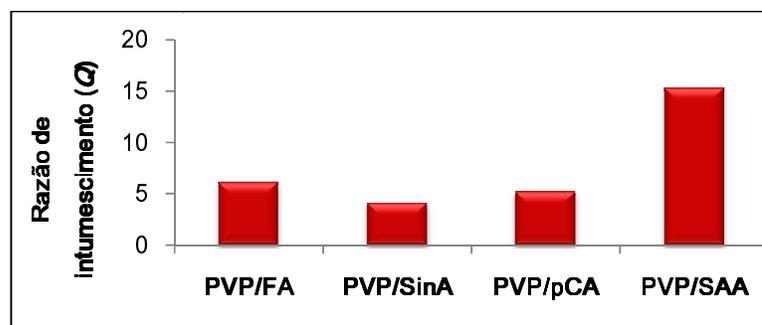
De acordo com a Figura 44 observa-se que a razão de intumescimento está intimamente relacionada com a porcentagem de polianidrido na blenda, o que, por sua vez, afeta a hidrofiliicidade do sistema e consequentemente a sua capacidade de absorver água.



**Figura 44.** Razão de intumescimento ( $Q$ ) dos hidrogéis de PVP/Polianidridos em função da porcentagem de polianidrido incorporado na blenda.

Os hidrogéis contendo 10% de polianidrido possuem os maiores valores de  $Q$ , e na medida em que o teor de polianidrido na blenda é aumentado, a capacidade de intumescimento em água diminui. Esta diminuição em  $Q$  pode ser atribuída à diminuição da hidrofiliicidade do hidrogel, visto que os polianidridos adicionados são bastante hidrofóbicos.

Como a poliaspirina é um polímero de caráter mais hidrofílico quando comparado aos outros polianidridos descritos neste trabalho, o hidrogel formado por PVP/Poliaspirina apresentou uma razão de intumescimento superior ao das outras blendas estudadas (Figura 45). O valor de  $Q$  obtido foi de aproximadamente 16.



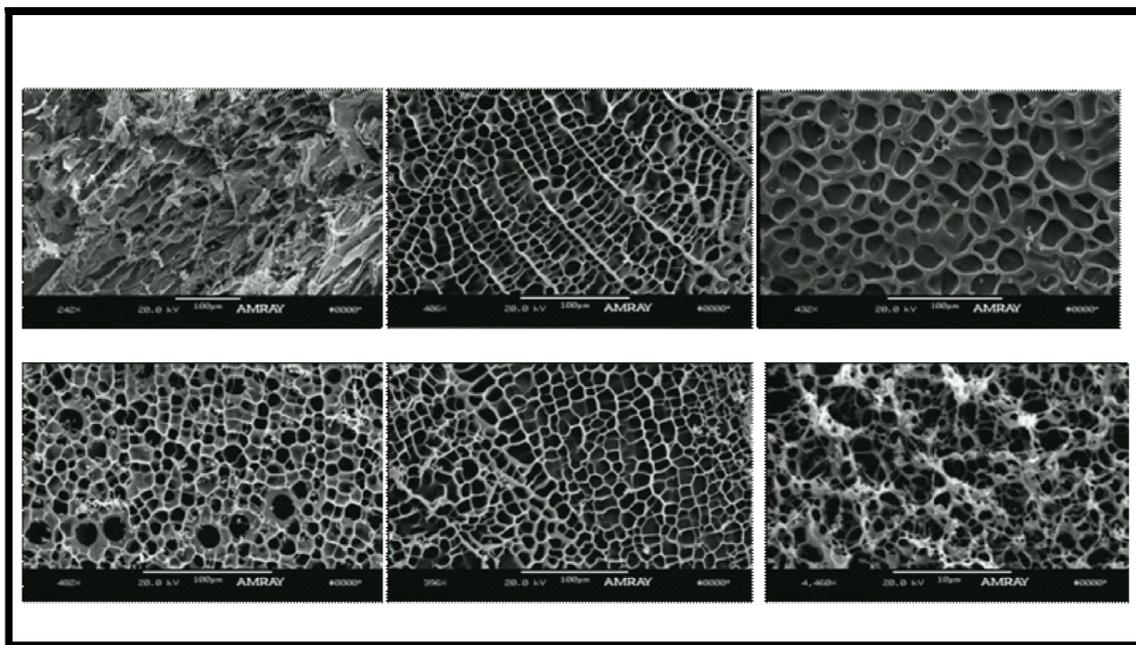
**Figura 45.** Comparação entre os valores de  $Q$  obtidos para as diferentes blendas de PVP/Polianidrido na proporção 7:3.

Contudo, este hidrogel não se mostrou estável como aqueles obtidos a partir das blendas de PVP com os polianidridos derivados de hidroxicinamatos, solubilizando-se após aproximadamente 48h a 20°C e após 2 horas a 37°C.

A capacidade de intumescimento para esses hidrogéis físicos obtidos a partir de blendas de PVP/Polianidridos apresentaram-se comparáveis a outros sistemas formados a partir de interações físicas. Ainda que observada uma diminuição no valor de  $Q$ , os hidrogéis contendo 30% de polianidrido, possuem significativa razão de intumescimento, sendo também comparáveis com hidrogéis já reportados.

### **6.3.2. Microscopia eletrônica de varredura**

Os hidrogéis formados por blendas de PVP/Polianidridos tiveram suas morfologias investigadas por MEV. A Figura 46 apresenta as imagens resultantes desta análise, onde pode-se verificar a formação de uma estrutura bastante porosa na superfície do hidrogel, com diâmetro médio da ordem de dezenas de micrômetros. Contudo tais poros podem não estar interligados, pois compreendem cavidades que se formam na estrutura gerados pela presença da água na estrutura do hidrogel.

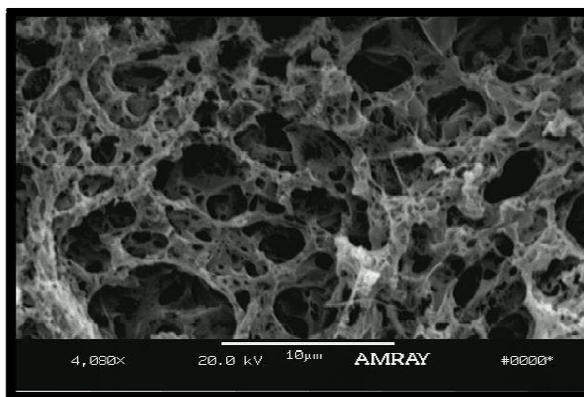


**Figura 46.** Imagens representativas de MEV dos hidrogéis de PVP/PAF 9:1, 8:2 e 7:3 e PVP/PAS 9:1, 8:2 e 7:3, respectivamente.

Para todos os hidrogéis constata-se uma regularidade nas formações dos poros pelo intumescimento, com exceção do hidrogel formado por PVP/PAF 9:1. Neste a estrutura de hidrogel não é estável, ocorrendo a dissolução do filme em água após algumas horas.

A estrutura porosa do hidrogel formado por PVP/Poliaspirina também foi investigada. A imagem de MEV (Figura 47) revela uma estrutura bastante porosa,

com poros de diâmetro menor do que aqueles obtidos para as outras blendas de PVP/PAF e PVP/PAS, além de serem bastante irregulares.



**Figura 47.** Imagem representativa de MEV do hidrogel físico formado por PVP/Poliaspirina na proporção 7:3.

#### 6.4. Micro- e nanofibras de PVP/Polianidridos por eletrofição

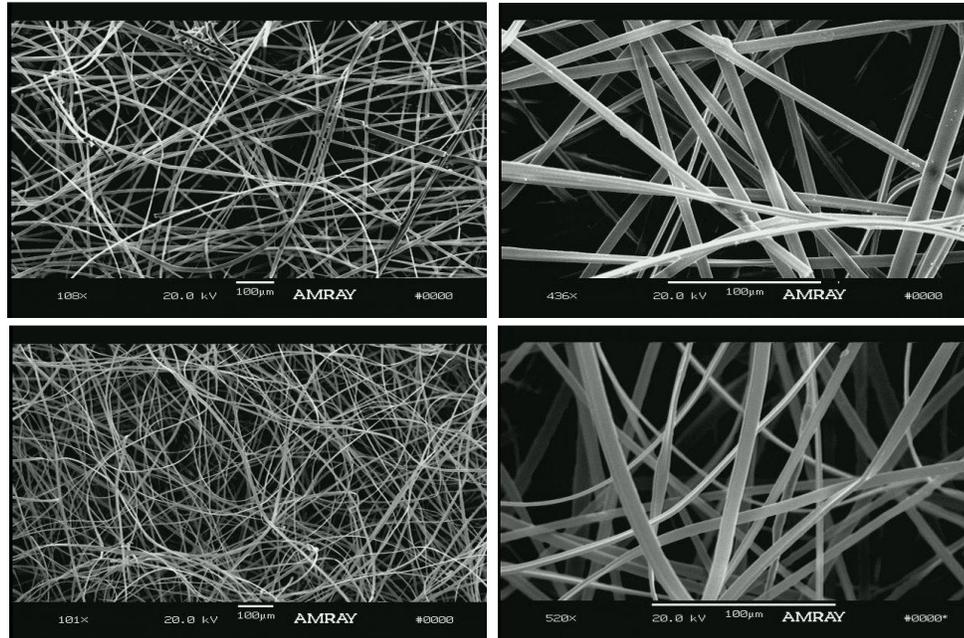
Em vista dos baixos valores obtidos das massas molares dos polianidridos bioativos, observou-se que o processamento destes polímeros puros via eletrofição é inviável, pois é necessário um tamanho mínimo de cadeia polimérica para que ocorra formação de fibras. Contudo, este processamento torna-se possível quando incorporados na forma de blendas com PVP.

Os parâmetros de solução e de eletrofição utilizados para a obtenção de fibras de PVP/Polianidridos encontram-se descritos na seção experimental. Fibras de PVP/PAF e PVP/PAS foram obtidas, conforme pode ser visto nas imagens de MEV na Figura 49 e foto ilustrativa na Figura 48. Em ambos os casos as fibras obtidas apresentam-se bastante uniformes tanto em estrutura (onde não foram observados gotas ou aglomerados poliméricos ao longo das fibras) e em diâmetro. Tanto para as fibras compostas por PVP/PAF como para as de PVP/PAS foi encontrado um diâmetro médio de 10 micrometros. Adicionalmente, as fibras obtidas a partir das blendas não apresentaram um formato totalmente esférico, formando-se fibras na forma de fitas (*ribbon-like*). A literatura é relativamente escassa com relação à descrição deste tipo de material, contudo, a formação de fibras na forma de fitas pode estar relacionada à evaporação do solvente durante o processo de eletrofição [34].



**Figura 48.** Imagem ilustrativa da malha de PVP/PAF produzida por eletrospinning.

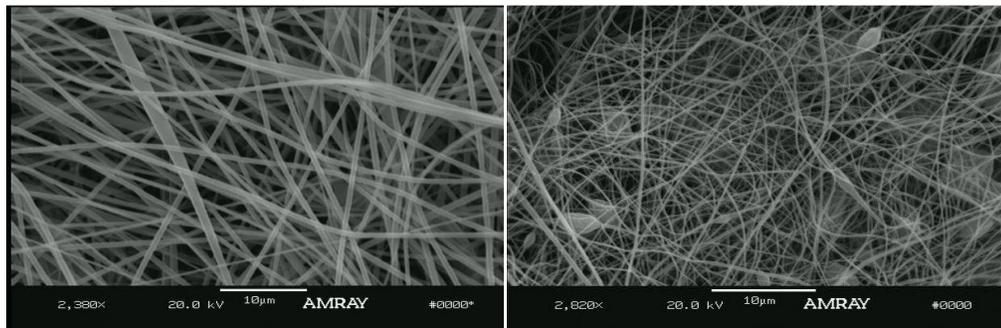
Segundo a literatura, fibras sem a completa evaporação do solvente, atingem o coletor metálico e podem ser achatadas pelo impacto. Além disso, uma camada ultrafina do sistema polimérico utilizado pode se formar como resultado da evaporação do solvente na superfície do jato, originando uma fina camada sólida com um centro líquido (sistema *core-shell*). Devido à ação da pressão atmosférica, a fibra inicialmente esférica começa a colapsar com a evaporação do solvente do centro, tornando-se achatada [34] (Figura 49).



**Figura 49.** Imagens representativas de MEV de PVP/PAF (7:3) (imagens superiores) e PVP/PAS (7:3) (imagens inferiores).

Fibras de PVP/Poliaspirina foram igualmente obtidas por eletrofiação, resultando na produção de nanofibras de diâmetro médio de 600 nm (Figura 50). As nanofibras apresentaram-se uniformes em diâmetro, contudo constatou-se a formação de gotas ao longo da estrutura das fibras em algumas regiões da malha. Da mesma forma com que os outros polianidridos aqui utilizados, a poliaspirina não possui massa molar suficiente para ser submetida à eletrofiação, sendo necessário um segundo polímero para suportar a formação das fibras por eletrofiação. O estudo

da produção de nanofibras compostas por poliaspirina é recente na literatura, havendo somente um trabalho descrito até o momento. Neste trabalho, nanofibras formadas por blendas de PLGA/SAA (1:1 e 2:1) foram submetidas à eletrofiação e fibras de diâmetro médio de 2,1 e 0,6  $\mu\text{m}$  foram obtidas, respectivamente [43].



**Figura 50.** Imagem representativa de MEV das fibras de PVP/Poliaspirina (7:3)

produzidas por eletrofiação.

### **6.5. Síntese de novos polianidridos bioativos – Cloreto de diglicofla como molécula conectora**

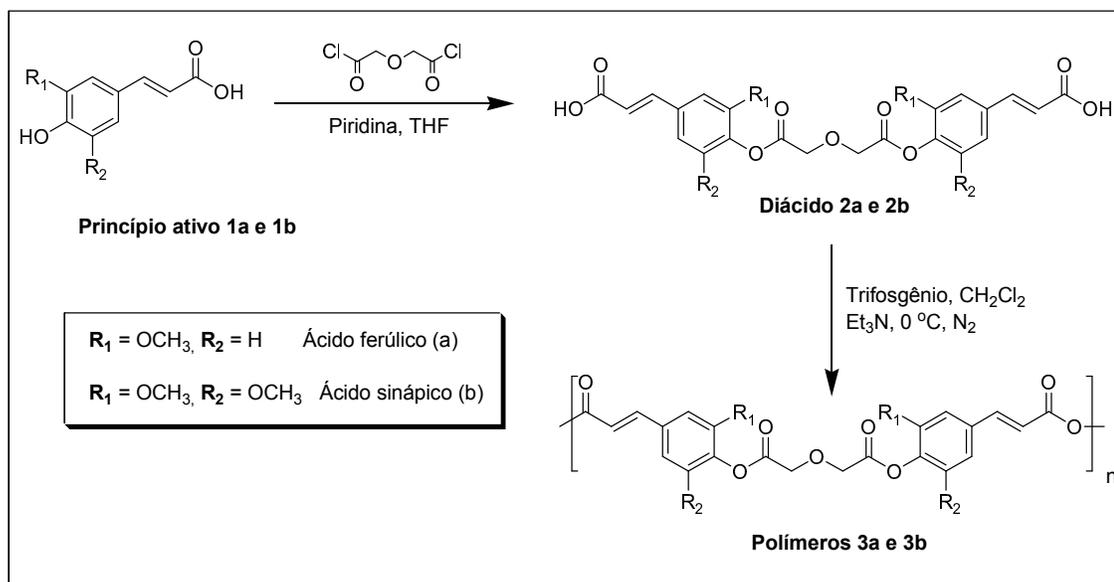
Conforme descrito na literatura, os polianidridos bioativos sintetizados utilizando-se cloreto de adipoíla como molécula conectora são bastante hidrofóbicos, resultando em uma cinética de degradação lenta [48]. Em um período de 30 dias são

liberados aproximadamente 19% de ácido sinápico, 8% de ácido ferúlico e 2% de ácido *p*-cumárico.

É esperado que biomateriais voltados à aplicação como curativos de feridas apresentem liberação de seus ativos imediatamente após a sua aplicação, inviabilizando a aplicação destes polianidridos por si só.

Neste sentido, este trabalho apresenta uma abordagem inicial da produção de polianidridos bioativos mais hidrofílicos e, com isso, uma maior velocidade de degradação hidrolítica é esperada. Este fato é comprovado pela literatura onde a troca da molécula conectora cloreto de adipóila por cloreto de diglicóila em poliaspirinas resultou em uma mudança de 40% para 100% de ácido salicílico liberado em um período de 50 horas [120].

Poliácidos ferúlico e sinápico foram obtidos a partir de seus ácidos e o cloreto de diglicóila, segundo o esquema reacional apresentado pela Figura 51 e descrito detalhadamente na seção experimental.



**Figura 51.** Esquema sintético dos polianidridos produzidos com cloreto de diglicóila como molécula conectora.

Nesta parte do trabalho serão discutidos apenas os dados de RMN de  $^1\text{H}$  dos polímeros obtidos a partir dos diácidos de ácido ferúlico e sinápico contendo cloreto de diglicóila, visto a grande semelhança entre os espectros dos diácidos precursores e polímeros.

A análise de RMN de  $^1\text{H}$  dos poliácidos ferúlico e sinápico apresentaram um singlete em  $\delta$  4,61 e 4,62 referentes aos hidrogênios metilênicos 2 e 3 do cloreto de diglicóila, respectivamente. Esta compreende a principal mudança no perfil do espectro destes polímeros com relação àqueles que foram sintetizados com cloreto

de adipoíla. Os demais sinais observados encontram-se dispostos na Tabela 21 e apresentam semelhança com aqueles descritos para os polianidridos derivados de hidroxicinamatos sintetizados com cloreto de adipoíla como molécula conectora.

Estes polímeros estão sendo descritos pela primeira vez na literatura e compreendem um campo de estudo ainda a ser muito explorado com relação a esta classe de polianidridos bioativos.

Os polímeros tiveram suas massas molares e temperatura de transição vítrea determinados por SEC e DSC, respectivamente, e os resultados estão dispostos na Tabela 22 e na Tabela 23. Estas tabelas também apresentam a comparação com os dados obtidos para os polianidridos sintetizados com cloreto de adipoíla.

**Tabela 21.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  para os poliácidos ferúlico e sinápico utilizando cloreto de diglicoíla como molécula conectora.

Posição	Multiplicidade, $\delta$ (ppm) e $J$ (Hz)	
	PAF (3a)	PAS (3b)
<b>2</b>	2H 4,61 ( <i>s</i> )	2H 4,62 ( <i>s</i> )
<b>3</b>	2H 4,61 ( <i>s</i> )	2H 4,62 ( <i>s</i> )
<b>3'</b>	2H 7,51 ( <i>d</i> , 1,6)	2H 7,31 ( <i>s</i> )
<b>5'</b>	2H 7,44 ( <i>s</i> )	2H 7,31 ( <i>s</i> )
<b>6'</b>	2H 7,26 ( <i>d</i> , 1,6)	-
<b>7'</b>	2H 7,84 ( <i>d</i> , 16,0)	2H 7,80 ( <i>d</i> , 16,0)
<b>8'</b>	2H 6,91 ( <i>d</i> , 15,6)	2H 6,97 ( <i>d</i> , 16,0)
<b>OCH<sub>3</sub></b>	6H 3,86 ( <i>s</i> )	12H 3,84

**Tabela 22.** Dados de massa molar ( $M_w$ ) e índice de polidispersividade (PDI) dos polianidridos sintetizados com cloreto de adipoíla e cloreto de diglicoíla como moléculas conectoras.

Polianidrido - diglicólico	$M_w$	PDI	Polianidrido - adípico	$M_w$	PDI
PAF (3a)	52.300	1,90	PAF	23.500	1,72
PAS (3b)	10.900	1,79	PAS	20.500	1,71

**Tabela 23.** Valores de temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) observados para os polianidridos sintetizados com cloreto de adipoíla e cloreto de diglicoíla como moléculas conectoras.

<b>Polianidrido - diglicólico</b>	<b><math>T_g</math> (°C)</b>	<b>Polianidrido - adípico</b>	<b><math>T_g</math> (°C)</b>
PAF (3a)	120	PAF	58
PAS (3b)	161	PAS	120

Observou-se um aumento significativo da massa molar na cadeia do poliácido ferúlico quando utilizado o cloreto de diglicoíla como molécula conectora. O resultado oposto foi obtido para o poliácido sinápico, apresentando um valor menor de massa molar Tabela 22. A tentativa de aumento da massa molar destes polímeros faz parte de projetos futuros para a continuação deste trabalho, bem como a realização de estudos de cinética de degradação hidrolítica.

A literatura relacionada à troca de cloreto de adipoíla por cloreto de diglicoíla como molécula conectora na poliaspirina resultou, de maneira semelhante ao poliácido sinápico, em uma diminuição do valor da massa molar [120].

A Tabela 23 apresenta os valores de  $T_g$  encontrados para estes novos polianidridos. Para ambos os casos constatou-se um aumento considerável da  $T_g$ ,

diferentemente do observado para a poliaspirina [120], onde a temperatura de transição vítrea foi diminuída de 40 para 35 °C. No caso dos polianidridos sintetizados neste trabalho, o aumento da  $T_g$  foi mais significativo para o poliácido ferúlico.

## 7. CONCLUSÃO

A técnica de eletrofiação mostrou-se adequada à produção de hidrogéis nanoestruturados a partir de nanofibras de PVP, em que foi possível a reticulação tanto por radiação UV-C quanto por reação de Fenton. Através da modulação dos parâmetros de eletrofiação, foram obtidas malhas de PVP cujo controle do diâmetro médio das nanofibras exerceu uma influência direta na cinética de liberação da proteína modelo BSA. Além disso, os hidrogéis mostraram-se capazes de liberar e manter a atividade enzimática da colagenase, tornando esses materiais elegíveis à aplicação no tratamento de feridas crônicas.

Os hidrogéis híbridos formados a partir dos nanocompósitos PVP/AgNP e PVP/AgNP/Imidazol apresentaram resultados promissores quanto a sua utilização como materiais multifuncionais no auxílio ao tratamento de feridas. Estes hidrogéis foram ativos contra a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus*, as gram-negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e contra três espécies de fungos do gênero *Candida*, sendo *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*.

Hidrogéis físicos foram obtidos a partir de blendas de PVP/Polianidridos, sendo estes derivados dos ácidos ferúlico, sinápico, *p*-cumárico e salicílico. Os resultados iniciais obtidos, juntamente com o suporte da literatura, apontam para a existência de interações hidrofóbicas, responsáveis tanto pela miscibilidade das blendas como pela formação dos hidrogéis físicos. Tratando-se de polianidridos significativamente hidrofóbicos e formulados como hidrogéis, é esperada uma melhora na cinética de liberação das moléculas constituintes.

De maneira geral, o presente trabalho contribui tanto para o campo de estudo de hidrogéis nanoestruturados, como oferece alternativas ao desenvolvimento de curativos ideais para o tratamento de feridas crônicas e queimaduras.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Boateng, J.S., et al., *Wound healing dressings and drug delivery systems: A review*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008. **97**(8): p. 2892-2923.
2. Blanes, L. (2004) *Tratamento de Feridas*. Cirurgia Vascular: Guia Ilustrado Disponível em: URL: <http://www.bapbaptista.com>.
3. Kim, G.H., et al., *Wound Dressings for Wound Healing and Drug Delivery*. Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2011. **8**(1): p. 1-7.
4. Vasconcelos, A. and A. Cavaco-Paulo, *Wound dressings for a proteolytic-rich environment*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011. **90**(2): p. 445-460.
5. Hennink, W.E. and C.F. van Nostrum, *Novel crosslinking methods to design hydrogels*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2002. **54**(1): p. 13-36.
6. Peppas, N.A., et al., *Hydrogels in pharmaceutical formulations*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2000. **50**(1): p. 27-46.
7. Brannon-Peppas, L., J.D. Kosmala, and D.B. Henthorn, *Preparation of interpenetrating networks of gelatin and dextran as degradable biomaterials*. Biomaterials, 2000. **21**(20): p. 2019-2023.
8. Abd El-Mohdy, H.L. and E.A. Hegazy, *Preparation of Polyvinyl Pyrrolidone-Based Hydrogels by Radiation-Induced Crosslinking with Potential Application as Wound Dressing*. Journal of Macromolecular Science Part a-Pure and Applied Chemistry, 2008. **45**(12): p. 997-1004.
9. Alla, S.G.A., H.M.N. El-Din, and A.W.M. El-Naggar, *Structure and swelling-release behaviour of poly(vinyl pyrrolidone) (PVP) and acrylic acid (AAc) copolymer hydrogels prepared by gamma irradiation*. European Polymer Journal, 2007. **43**(7): p. 2987-2998.

10. Barros, J.A.G., et al., *Poly (N-vinyl-2-pyrrolidone) hydrogels produced by Fenton reaction*. Polymer, 2006. **47**(26): p. 8414-8419.
11. Benamer, S., et al., *Synthesis and characterisation of hydrogels based on poly(vinyl pyrrolidone)*. Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms, 2006. **248**(2): p. 284-290.
12. Can, H.K., et al., *Swelling behavior of poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) and poly(N-vinyl-2-pyrrolidone)/K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> hydrogels in alpha-lactose solutions*. Advances in Polymer Technology, 2003. **22**(3): p. 252-259.
13. Dergunov, S.A. and G.A. Mun, *gamma-irradiated chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogels as pH-sensitive protein delivery system*. Radiation Physics and Chemistry, 2009. **78**(1): p. 65-68.
14. El-Mohdy, H.L.A. and S. Ghanem, *Biodegradability, antimicrobial activity and properties of PVA/PVP hydrogels prepared by gamma-irradiation*. Journal of Polymer Research, 2009. **16**(1): p. 1-10.
15. Fechine, G.J.M., J.A.G. Barros, and L.H. Catalani, *Poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) hydrogel production by ultraviolet radiation: new methodologies to accelerate crosslinking*. Polymer, 2004. **45**(14): p. 4705-4709.
16. Kadlubowski, S., et al., *Hydrogels of polyvinylpyrrolidone (PVP) and poly(acrylic acid) (PAA) synthesized by photoinduced crosslinking of homopolymers*. Polymer, 2007. **48**(17): p. 4974-4981.
17. Kaplan, H. and A. Guner, *Swelling behavior of poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) and poly(N-vinyl-2-pyrrolidone)/K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> hydrogels in urea solutions*. Advances in Polymer Technology, 2000. **19**(3): p. 210-217.

18. Lopergolo, L.C., A.B. Lugao, and L.H. Catalani, *Direct UV photocrosslinking of poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) (PVP) to produce hydrogels*. Polymer, 2003. **44**(20): p. 6217-6222.
19. Lugao, A.B., S.O. Rogero, and S.M. Malmonge, *Rheological behaviour of irradiated wound dressing poly(vinyl pyrrolidone) hydrogels*. Radiation Physics and Chemistry, 2002. **63**(3-6): p. 543-546.
20. Rosiak, J.M., et al., *Hydrogels of polyvinylpyrrolidone (PVP) and poly(acrylic acid) (PAA) synthesized by photoinduced crosslinking of homopolymers*. Polymer, 2007. **48**(17): p. 4974-4981.
21. Zhu, X.F., et al., *Studies of UV crosslinked poly(N-vinylpyrrolidone) hydrogels by FTIR, Raman and solid-state NMR spectroscopies*. Polymer, 2010. **51**(14): p. 3054-3063.
22. Lowry, G.V., et al., *Hydrophobic Interactions Increase Attachment of Gum Arabic- and PVP-Coated Ag Nanoparticles to Hydrophobic Surfaces*. Environmental Science & Technology, 2011. **45**(14): p. 5988-5995.
23. Pinto, J.R., S.W. Novak, and M. Nicholas, *Aqueous dye diffusion in thin films of water-soluble poly(vinyl pyrrolidone) copolymers: A dynamic secondary ion mass spectrometry study*. Journal of Physical Chemistry B, 1999. **103**(37): p. 8026-8032.
24. Bastos, E.L., et al., *Studies on PVP hydrogel-supported luminol chemiluminescence: 1. Kinetic and mechanistic aspects using multivariate factorial analysis*. Luminescence, 2007. **22**(2): p. 113-25.
25. Bueno, V.B., et al., *PVP superabsorbent nanogels*. Colloid and Polymer Science, 2009. **287**(6): p. 705-713.
26. Lopergolo, L.C., A.B. Lugao, and L.H. Catalani, *Development of a poly(N-vinyl-2-pyrrolidone)/poly (ethylene glycol) hydrogel membrane reinforced with methyl*

- methacrylate-grafted polypropylene fibers for possible use as wound dressing*. Journal of Applied Polymer Science, 2002. **86**(3): p. 662-666.
27. Barbusinski, K., *Fenton Reaction - Controversy Concerning the Chemistry*. Ecological Chemistry and Engineering S-Chemia I Inzynieria Ekologiczna S, 2009. **16**(3): p. 347-358.
28. Neyens, E. and J. Baeyens, *A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique*. Journal of Hazardous Materials, 2003. **98**(1-3): p. 33-50.
29. Wichterle, O. and D. Lim, *Hydrophilic gels for biological use*. Nature, 1960. **185**.
30. Anumolu, S.S., et al., *Doxycycline hydrogels with reversible disulfide crosslinks for dermal wound healing of mustard injuries*. Biomaterials, 2011. **32**(4): p. 1204-17.
31. Winter, G.D., *Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig*. Nature, 1962. **193**: p. 293-294.
32. Hinman, C.M., H., *Effect of air exposed and occlusion on experimental human skin wounds*. Nature, 1963. **200**: p. 377-379.
33. Huang, Z.M., et al., *A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites*. Composites Science and Technology, 2003. **63**(15): p. 2223-2253.
34. Ramakrishna, S.F., K.; Teo, W.E.; Lim, T.C.; Ma, Z., ed. *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers*. 2005, World Scientific.
35. Teo, W.E. and S. Ramakrishna, *A review on electrospinning design and nanofibre assemblies*. Nanotechnology, 2006. **17**(14): p. R89-R106.
36. Hsiao, B.S., D. Liang, and B. Chu, *Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2007. **59**(14): p. 1392-1412.

37. Cooley, J.F., *Apparatus for electrically dispersing fluids*. Vol. U.S. Patent 692,631. 1902.
38. Morton, W.J., *Method of dispersing fluids*. U.S. Patent 705,691, 1902.
39. Formhals, A., *Process and apparatus for preparing artificial threads*. U.S. Patent 1,975,504, 1934.
40. Venugopal, J. and S. Ramakrishna, *Applications of polymer nanofibers in biomedicine and biotechnology*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2005. **125**(3): p. 147-157.
41. Zhang, Y., et al., *Recent development of polymer nanofibers for biomedical and biotechnological applications*. J Mater Sci Mater Med, 2005. **16**(10): p. 933-46.
42. Catalani, L.H., G. Collins, and M. Jaffe, *Evidence for molecular orientation and residual charge in the electrospinning of poly(butylene terephthalate) nanofibers*. Macromolecules, 2007. **40**(5): p. 1693-1697.
43. Griffin, J., et al., *Salicylic acid-derived poly(anhydride-ester) electrospun fibers designed for regenerating the peripheral nervous system*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2011. **97A**(3): p. 230-242.
44. Moore, S.S., W.H. , *Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids*. J. Biol. Chem., 1948. **176**: p. 367-388.
45. Mandl, I.M., J.D.; Howes, E.L.; DeBellis, R.H.; Sohler, A., *Isolation and characterization of proteinase and collagenase from *Cl. histolyticum**. J. Clin. Invest., 1953. **32**: p. 1323-1329.
46. Becke, A.D., *Density-functional thermochemistry. III. the role of exact exchange*. J. Chem. Phys., 1993. **98**(7).
47. Lee, C.Y., W.; Parr, R.G., Physical Review, 1998. **B37**: p. 785.

48. Carbone, A.L., *Natural bioactive-based polyanhydrides for controlled release applications*, in *Chemistry and Chemical Biology*. 2009, Rutgers, The State University of New Jersey: New Brunswick. p. 176.
49. Baccaro, S., et al., *Mechanical properties of polyvinylpyrrolidone (PVP) hydrogels undergoing radiation*. Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms, 1995. **105**(1-4): p. 100-102.
50. Ajji, Z., I. Othman, and J.M. Rosiak, *Production of hydrogel wound dressings using gamma radiation*. Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms, 2005. **229**(3-4): p. 375-380.
51. Lugao, A.B., et al., *Study of wound dressing structure and hydration/dehydration properties*. Radiation Physics and Chemistry, 1998. **52**(1-6): p. 319-322.
52. Abad, L.V., et al., *Properties of radiation synthesized PVP-kappa carrageenan hydrogel blends*. Radiation Physics and Chemistry, 2003. **68**(5): p. 901-908.
53. Ali, A.E.H., et al., *Synthesis and characterization of PVP/AAc copolymer hydrogel and its applications in the removal of heavy metals from aqueous solution*. European Polymer Journal, 2003. **39**(12): p. 2337-2344.
54. Choi, E.K., H.I. Kim, and Y.C. Nho, *Preparation and characterization of PVAL/PVP/hexylene glycol/chitosan hydrogels by gamma-ray*. Polymer-Korea, 2003. **27**(4): p. 349-357.
55. Foroutan, H., M. Khodabakhsh, and M. Rabbani, *Investigation of synthesis of PVP hydrogel by irradiation*. Iranian Journal of Radiation Research, 2007. **5**(3): p. 131-136.
56. Hill, D.J.T., A.K. Whittaker, and Zainuddin, *Water diffusion into radiation crosslinked PVA-PVP network hydrogels*. Radiation Physics and Chemistry, 2011. **80**(2): p. 213-218.

57. Kadlubowski, S., et al., *Hydrogels of polyvinylpyrrolidone (PVP) and poly(acrylic acid) (PAA) synthesized by radiation-induced crosslinking of homopolymers*. Radiation Physics and Chemistry, 2010. **79**(3): p. 261-266.
58. Lu, S.Y., et al., *A Novel pH- and Thermo-Sensitive PVP/CMC Semi-IPN Hydrogel: Swelling, Phase Behavior, and Drug Release Study*. Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics, 2010. **48**(15): p. 1749-1756.
59. Costache, M.C., et al., *Polymer-xerogel composites for controlled release wound dressings*. Biomaterials, 2010. **31**(24): p. 6336-6343.
60. Sikareepaisan, P., U. Ruktanonchai, and P. Supaphol, *Preparation and characterization of asiaticoside-loaded alginate films and their potential for use as effectual wound dressings*. Carbohydrate Polymers, 2011. **83**(4): p. 1457-1469.
61. Bayramoglu, G., E. Batislam, and M.Y. Arica, *Preparation and Drug-Release Behavior of Minocycline-Loaded Poly[hydroxyethyl methacrylate-co-poly(ethylene glycol)-methacrylate] Films*. Journal of Applied Polymer Science, 2009. **112**(2): p. 1012-1020.
62. Pielesz, A. and M.K.K. Bak, *Raman spectroscopy and WAXS method as a tool for analysing ion-exchange properties of alginate hydrogels*. International Journal of Biological Macromolecules, 2008. **43**(5): p. 438-443.
63. Huang, M.H. and M.C. Yang, *Evaluation of glucan/poly(vinyl alcohol) blend wound dressing using rat models*. International Journal of Pharmaceutics, 2008. **346**(1-2): p. 38-46.
64. Chen, Y.M., et al., *Study of Electrospun PLLACL Nanofibrous Mats for Drug Delivery System*. Materials Research, Pts 1 and 2, 2009. **610-613**: p. 1319-1322.

65. Michniak, B.B., et al., *Electrospun nanofibrous polymeric scaffold with targeted drug release profiles for potential application as wound dressing*. International Journal of Pharmaceutics, 2008. **364**(1): p. 87-93.
66. Supaphol, P., O. Suwanton, and U. Ruktanonchai, *Electrospun cellulose acetate fiber mats containing asiaticoside or Centella asiatica crude extract and the release characteristics of asiaticoside*. Polymer, 2008. **49**(19): p. 4239-4247.
67. Natu, M.V., H.C. de Sousa, and M.H. Gil, *Effects of drug solubility, state and loading on controlled release in bicomponent electrospun fibers*. International Journal of Pharmaceutics, 2010. **397**(1-2): p. 50-58.
68. Yang, Q.B., et al., *Influence of solvents on the formation of ultrathin uniform poly(vinyl pyrrolidone) nanofibers with electrospinning*. Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics, 2004. **42**(20): p. 3721-3726.
69. Forte, M.M.C.C., F.O.V.; Santos, J.H.Z.; Zacca, J.J., *Ethylene and 1-butene copolymerization catalyzed by a Ziegler-Natta/Metallocene hybrid catalyst through a 23 factorial experimental design*. Polymer, 2003. **44**: p. 1377-1384.
70. Cunha, F.O.V.M., D.H.R.; Veronese, V.B.; Forte, M.M.C. , *Study of castor oil polyurethane-poly(methyl methacrylate) semi-interpenetrating polymer network (SIPN) reaction parameters using a 23 factorial experimental design*. Mater. Res., 2004. **7**: p. 539-543.
71. D'Errico, G., et al., *Structural and mechanical properties of UV-photo-cross-linked poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) hydrogels*. Biomacromolecules, 2008. **9**(1): p. 231-40.
72. Kim, T.H. and Y.C. Nho, *Synthesis of PVA/PVP hydrogel by irradiation crosslinking*. Polymer-Korea, 2001. **25**(2): p. 270-278.
73. Toma, H.E., et al., *The Coordination Chemistry at Gold Nanoparticles*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2010. **21**(7): p. 1158-1176.

74. Hassan, C.M., J.E. Stewart, and N.A. Peppas, *Diffusional characteristics of freeze/thawed poly(vinyl alcohol) hydrogels: applications to protein controlled release from multilaminate devices*. Eur J Pharm Biopharm, 2000. **49**(2): p. 161-5.
75. Hennink, W.E., et al., *Biodegradable dextran hydrogels crosslinked by stereocomplex formation for the controlled release of pharmaceutical proteins*. Int J Pharm, 2004. **277**(1-2): p. 99-104.
76. Im, J.S., et al., *Fluorination of electrospun hydrogel fibers for a controlled release drug delivery system*. Acta Biomaterialia, 2010. **6**(1): p. 102-109.
77. Risbud, M.V., et al., *pH-sensitive freeze-dried chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogels as controlled release system for antibiotic delivery*. Journal of Controlled Release, 2000. **68**(1): p. 23-30.
78. Sen, M. and A. Yakar, *Controlled release of antifungal drug terbinafine hydrochloride from poly(N-vinyl 2-pyrrolidone/itaconic acid) hydrogels*. Int J Pharm, 2001. **228**(1-2): p. 33-41.
79. Yaung, J.F. and T.K. Kwei, *pH-sensitive hydrogels based on polyvinylpyrrolidone-polyacrylic acid (PVP-PAA) semi-interpenetrating networks (semi-IPN): Swelling and controlled release*. Journal of Applied Polymer Science, 1998. **69**(5): p. 921-930.
80. Moura, M.R.A., F.A.; Favaro, S.L.; Radovanovic, E.; Rubira, A.F.; Muniz, E.C., *Release of BSA from porous matrices constituted of alginate-Ca<sup>2+</sup> and PNIPAAm-interpenetrated networks*. Mater. Sci. Eng. C, 2009. **29**: p. 2319-2325.
81. Molina, I., et al., *Protein release from physically crosslinked hydrogels of the PLA/PEO/PLA triblock copolymer-type*. Biomaterials, 2001. **22**(4): p. 363-9.
82. Harrington, D.J., *Bacterial collagenases and collagen-degrading enzymes and their potential role in human disease*. Infect. Immun., 1996. **64**: p. 1885-1891.

83. Elsner, J.J. and M. Zilberman, *Antibiotic-eluting bioresorbable composite fibers for wound healing applications: Microstructure, drug delivery and mechanical properties*. Acta Biomaterialia, 2009. **5**(8): p. 2872-2883.
84. Cortie, M.B. and A.M. McDonagh, *Synthesis and Optical Properties of Hybrid and Alloy Plasmonic Nanoparticles*. Chemical Reviews, 2011. **111**(6): p. 3713-3735.
85. Daniel, M.C. and D. Astruc, *Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology*. Chemical Reviews, 2004. **104**(1): p. 293-346.
86. Xia, Y.N. and Y.G. Sun, *Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles*. Science, 2002. **298**(5601): p. 2176-2179.
87. Majima, T., M. Sakamoto, and M. Fujistuka, *Light as a construction tool of metal nanoparticles: Synthesis and mechanism*. Journal of Photochemistry and Photobiology C-Photochemistry Reviews, 2009. **10**(1): p. 33-56.
88. Mandal, D., et al., *The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006. **69**(5): p. 485-492.
89. Eastoe, J., M.J. Hollamby, and L. Hudson, *Recent advances in nanoparticle synthesis with reversed micelles*. Advances in Colloid and Interface Science, 2006. **128**: p. 5-15.
90. Venkataraman, A., et al., *Microwave-assisted rapid extracellular synthesis of stable bio-functionalized silver nanoparticles from guava (Psidium guajava) leaf extract*. Journal of Nanoparticle Research, 2011. **13**(5): p. 2021-2028.
91. Yang, Z.G., X.F. Tang, and W.J. Wang, *A simple way of preparing high-concentration and high-purity nano copper colloid for conductive ink in inkjet printing technology*.

- Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects, 2010. **360**(1-3): p. 99-104.
92. Zeng, T.F., et al., *Reducing Ability and Mechanism for Polyvinylpyrrolidone (PVP) in Silver Nanoparticles Synthesis*. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2010. **10**(4): p. 2342-2347.
93. Qiao, X.L., et al., *Mechanisms of PVP in the preparation of silver nanoparticles*. Materials Chemistry and Physics, 2005. **94**(2-3): p. 449-453.
94. Hoek, E.M.V. and C. Marambio-Jones, *A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment*. Journal of Nanoparticle Research, 2010. **12**(5): p. 1531-1551.
95. Sharma, V.K., R.A. Yngard, and Y. Lin, *Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities*. Advances in Colloid and Interface Science, 2009. **145**(1-2): p. 83-96.
96. Jeong, D.H., et al., *Antimicrobial effects of silver nanoparticles*. Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine, 2007. **3**(1): p. 95-101.
97. Kale, G.M., et al., *Synthesis, characterisation and antibacterial activity of PVA/TEOS/Ag-Np hybrid thin films*. Journal of Colloid and Interface Science, 2010. **349**(1): p. 77-85.
98. Wang, X., et al., *Gelatin-g-Poly(methyl methacrylate)/Silver Nanoparticle Hybrid Films and the Evaluation of Their Antibacterial Activity*. Journal of Applied Polymer Science, 2010. **116**(5): p. 2617-2625.
99. Lee, K.P., et al., *Facile synthesis of conducting polymer-metal hybrid nanocomposite by in situ chemical oxidative polymerization with negatively charged metal nanoparticles*. Materials Letters, 2008. **62**(12-13): p. 1815-1818.

100. Pich, A., et al., *Preparation of hybrid microgels functionalized by silver nanoparticles*. Macromolecular Rapid Communications, 2006. **27**(5): p. 344-350.
101. Greiner, A., et al., *Polymer grafted silver and copper nanoparticles with exceptional stability against aggregation by a high yield one-pot synthesis*. Polymer, 2011. **52**(4): p. 912-920.
102. Geckeler, K.E., et al., *Hydrogel networks as nanoreactors: A novel approach to silver nanoparticles for antibacterial applications*. Polymer, 2007. **48**(1): p. 158-164.
103. Raju, K.M., et al., *Controlling of silver nanoparticles structure by hydrogel networks*. Journal of Colloid and Interface Science, 2010. **342**(1): p. 73-82.
104. Wu, W.T., et al., *Core-shell hybrid nanogels for integration of optical temperature-sensing, targeted tumor cell imaging, and combined chemo-photothermal treatment*. Biomaterials, 2010. **31**(29): p. 7555-7566.
105. Dong, G.P., et al., *Preparation and characterization of Ag nanoparticle-embedded polymer electrospun nanofibers*. Journal of Nanoparticle Research, 2010. **12**(4): p. 1319-1329.
106. Ignatova, M., et al., *Antibacterial and antimycotic activity of a cross-linked electrospun poly(vinyl pyrrolidone)-iodine complex and a poly(ethylene oxide)/poly(vinyl pyrrolidone)-iodine complex*. Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition, 2008. **19**(3): p. 373-386.
107. Wu, C.W., et al., *Reducing Ability and Mechanism for Polyvinylpyrrolidone (PVP) in Silver Nanoparticles Synthesis*. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2010. **10**(4): p. 2342-2347.
108. Luiz Pereira da Costa, A.L.B.F., Italo Odone Mazali, Fernando Aparecido Sigoli, *Spontaneous formation of highly dispersed spheroidal metallic silver nanoparticles in surfactant-free N,N-dimethylacetamide*. Synthetic Metals, 2011. **161**(15-16).

109. Devi, S., A. Pal, and S. Shah, *Microwave-assisted synthesis of silver nanoparticles using ethanol as a reducing agent*. Materials Chemistry and Physics, 2009. **114**(2-3): p. 530-532.
110. Mohan, Y.M., et al., *Hydrogel networks as nanoreactors: A novel approach to silver nanoparticles for antibacterial applications*. Polymer, 2007. **48**(1): p. 158-164.
111. Mousa, H.A.-L., *Burn and scald injuries*. Eastern Mediterranean Health Journal, 2005. **11**: p. 1099-1109.
112. Soares de Macedo, J.L.S., J.B., *Complicações infecciosas em pacientes queimados*. Rev. Soc. Bras. Cir. Plást., 2006. **21**(2): p. 108-111.
113. ARAKI, K.T., H.; OGAWA, T., *Preparation of very reactive thiol-protected gold nanoparticles: Revisiting the Brust-Schiffrin method*. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2006. **6**: p. 708-712.
114. Tatara, W.W., M.J.; Lindgren, J.; Probst, M., *Theoretical study of structures, energies and vibrational spectra of the imidazole-imidazolium system*. Journal of Physical Chemistry A, 2003. **107**(39): p. 7827-7831.
115. Pearson, R.G., *Hard and Soft Acids and Bases*. Journal of the American Chemical Society, 1963. **85**(22): p. 3533-&.
116. Pearson, R.G., *Acids and Bases*. Science, 1966. **151**(3707): p. 172-&.
117. Parr, R.G. and R.G. Pearson, *Absolute Hardness - Companion Parameter to Absolute Electronegativity*. Journal of the American Chemical Society, 1983. **105**(26): p. 7512-7516.
118. Sen, M. and A. Yakar, *Controlled release of antifungal drug terbinafine hydrochloride from poly(N-vinyl 2-pyrrolidone/itaconic acid) hydrogels*. International Journal of Pharmaceutics, 2001. **228**(1-2): p. 33-41.

119. Fink, G.R., et al., *Antifungal hydrogels*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**(32): p. 12994-12998.
120. Carbone, A.L. and K.E. Uhrich, *Design and Synthesis of Fast-Degrading Poly(anhydride-esters)*. Macromolecular Rapid Communications, 2009. **30**(12): p. 1021-1026.
121. Schmeltzer, R.C. and K.E. Uhrich, *Synthesis and characterization of salicylic acid-based poly(anhydride-ester) copolymers*. Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 2006. **21**(2): p. 123-133.
122. Whitaker-Brothers, K. and K. Uhrich, *Poly(anhydride-ester) fibers: Role of copolymer composition on hydrolytic degradation and mechanical properties*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2004. **70A**(2): p. 309-318.
123. Erdmann, L., B. Macedo, and K.E. Uhrich, *Degradable poly(anhydride ester) implants: effects of localized salicylic acid release on bone*. Biomaterials, 2000. **21**(24): p. 2507-2512.
124. Kim, Y. and K.E. Uhrich, *Synthesis and Characterization of 5-Aminosalicylic Acid Based Poly(anhydride-esters) by Solution Polymerization*. Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry, 2010. **48**(24): p. 6003-6008.
125. Krogh-Jespersen, E., T. Anastasiou, and K. Uhrich, *Synthesis of a novel aromatic polyanhydride containing Aminosalicic acid*. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 2000. **219**: p. U422-U422.
126. Macedo, B., et al., *The in vivo response to bioactive polyanhydride monofilament*. Journal of Dental Research, 2000. **79**: p. 627-627.
127. Prudencio, A., et al., *A Novel Approach for Incorporation of Mono-Functional Bioactive Phenols into Polyanhydrides*. Macromolecular Rapid Communications, 2009. **30**(13): p. 1101-1108.

128. Schmeltzer, R.C., et al., *Comparison of salicylate-based poly(anhydride-esters) formed via melt-condensation versus solution polymerization*. Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition, 2008. **19**(10): p. 1295-1306.
129. Uhrich, K.E., T.J. Anastasiou, and M.L. Beaton, *Syntheses of aminosaliclate-based polyanhydride prodrugs: Esters, amides, and azos*. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 2001. **222**: p. U317-U317.
130. Carbone, A.L., M. Song, and K.E. Uhrich, *Iodinated salicylate-based poly(anhydride-esters) as radiopaque biomaterials*. Biomacromolecules, 2008. **9**(6): p. 1604-12.
131. Djordjevic, J., M. Barch, and K.E. Uhrich, *Polymeric micelles based on amphiphilic scorpion-like macromolecules: novel carriers for water-insoluble drugs*. Pharm Res, 2005. **22**(1): p. 24-32.
132. Erdmann, L., B. Macedo, and K.E. Uhrich, *Degradable poly(anhydride ester) implants: effects of localized salicylic acid release on bone*. Biomaterials, 2000. **21**(24): p. 2507-12.
133. Griffin, J., et al., *Design and evaluation of novel polyanhydride blends as nerve guidance conduits*. Acta Biomaterialia, 2010. **6**(6): p. 1917-1924.
134. Turner, D.T. and A. Schwartz, *The Glass-Transition Temperature of Poly(N-Vinyl Pyrrolidone) by Differential Scanning Calorimetry*. Polymer, 1985. **26**(5): p. 757-762.
135. Bianco, G., et al., *Thermal stability of poly(N-vinyl-2-pyrrolidone-co-methacrylic acid) copolymers in inert atmosphere*. Polymer Degradation and Stability, 2003. **80**(3): p. 567-574.
136. Chen, L.B., et al., *Ofloxacin-delivery system of a polyanhydride and polylactide blend used in the treatment of bone infection*. Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials, 2007. **83B**(2): p. 589-595.

137. Ben-Shabat, S., et al., *Biodegradable polycaprolactone-polyanhydrides blends*. Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry, 2003. **41**(23): p. 3781-3787.
138. Qiu, L.Y. and K.J. Zhu, *Compatibility and degradation of novel polyphosphazene polyanhydride blends*. Acta Polymerica Sinica, 2001(5): p. 660-664.
139. Sen, M. and E.N. Avci, *Radiation synthesis of poly(N-vinyl-2-pyrrolidone)-kappa-carrageenan hydrogels and their use in wound dressing applications. I. Preliminary laboratory tests*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2005. **74A**(2): p. 187-196.

## 9. SÚMULA CURRICULAR

### Renata Fogaça Bonacin

**Nascimento** 17/07/1981 – Santo André/SP – Brasil

---

#### Formação Acadêmica/Titulação

- 2006-Presente**      Doutorado em Química
- Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
- Título: *Hidrogéis de PVP e blendas de PVP/Polianidridos como potenciais curativos para feridas crônicas.*
- Orientador: Dr. Luiz Henrique Catalani
- Suporte financeiro: CNPq
- 2009-2010**      Estágio de doutorado
- Rutgers, The State University of New Jersey, Piscataway, USA
- Supervisor: Dra. Kathryn Elizabeth Uhrich
- Suporte financeiro: CNPq e Rutgers
- 2004-2006**      Mestrado em Química
- Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
- Título: *Metabólitos secundários das raízes de Piper crassinervium kunth (Piperaceae).*
- Orientador: Dr. Massuo Jorge Kato
- Suporte financeiro: CAPES

**1999-2002**            Graduação em Química – Bacharel em Química

Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, UNESP,  
Araraquara, Brasil

Título: *Estudo fitoquímico das raízes de Piper arboreum Aublet  
(Piperaceae).*

Orientador: Dra. Maysa Furlan

---

**Atuação profissional**

**2011-Presente**      Professora de Química

Escola Beit Yaacov, São Paulo

**2011-2011**            Produção de livro didático

Título: *Observatório de Ciências - 6*

Editora Moderna

**2006-2010**            Vínculo institucional, USP

Aluno de doutorado, carga horária: 40 h, Regime: Dedicção  
exclusiva, bolsista CNPq.

**2002-2006**            Vínculo institucional, USP

Aluno de mestrado, carga horária: 40 h, Regime: Dedicção  
exclusiva, bolsista CAPES.

**2003-2004**            Professora de Química

Sistema estadual de ensino médio, São Paulo

**2001-2002** Vínculo institucional, UNESP  
Professora de Física – Cursinho universitário do campus de Araraquara

---

### **Prêmios e títulos**

**2010** Melhor trabalho de Pesquisa de Base em Química e Bioquímica  
2º Encontro dos alunos da Pós-graduação – IQUSP, São Paulo

**2008** Olimpíadas USP de Inovação – Área da Saúde

---

### **Produção bibliográfica**

#### **Artigos completos aceitos para publicação em periódicos**

1. FOGAÇA, R.; CATALANI, L.H. PVP hydrogel membranes produced by electrospinning for protein release devices, *Soft Materials*, 2011.

#### **Patentes**

2. Renata Fogaça da Silva, Vitor de Moraes Zamarion, Koiti Araki, Henrique Eisi Toma, Luiz Henrique Catalani. Membrana de hidrogel e curativos inteligentes, 2009.
  3. Renata Fogaça da Silva, Michelle Aimeé Ouitmet, Luiz Henrique Catalani, Kathryn Elizabeth Uhrich. Bioactive-based PVP/Polyanhydride physically cross-linked hydrogels, 2010 (Pedido de patente - Rutgers).
-

**Trabalhos publicados em anais de eventos (Doutorado)**

1. CARA, F.; ZAMARION, V.Z.; FOGAÇA, R.; TOMA, H.E.; CATALANI, L.H.  
*Inclusion of gold nanoparticles functionalized with 2,4,6-trimercapto-1,3,5-triazine in PVP hydrogels: A nanocomposite for metal chelation.* In: Hybrid Materials, 2011, Strasbourg, France.
2. CARA, F.; ZAMARION, V.Z.; FOGAÇA, R.; TOMA, H.E.; CATALANI, L.H.  
*Hidrogel de PVP com AuNPs estabilizadas por 2,4,6-trimercapto-1,3,5-triazina: Nanocompósito para a detecção de traços de metais pesados.* In: 34° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis/SC.
3. BARBOSA, F.M.; FOGAÇA, R.; ZAMARION, V.Z.; TOMA, H.E.; CATALANI, L.H. *Estudo da Produção de Hidrogéis de PVP contendo AgNP por Reação de Fenton.* In: 34° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis/SC.
4. FOGAÇA, R.; OUITMET, M.A.; CATALANI, UHRICH, K.E. *Bioactive-based Polyhydride/PVP physically cross-linked hydrogels.* In: Polymer Drug Delivery Symposia, 2010, Piscataway, USA.
5. FOGAÇA, R.; OUITMET, M.A.; CATALANI, UHRICH, K.E. *Synthesis and characterization of novel bioactive PVP-based hydrogels.* In: ACS Fall, 2010, Boston, USA.

6. FOGAÇA, R.; OUITMET, M.A.; CATALANI, L.H.; UHRICH, K.E. *Bioactive-based Polyanhydride/PVP physically cross-linked hydrogels*. In: Polymer Drug Delivery Symposia, 2010, Piscataway, USA.
7. FOGAÇA, R.; OUITMET, M.A.; CATALANI, L.H.; UHRICH, K.E. *Bioactive-based Polyanhydride/PVP physically cross-linked hydrogels*. In: 2° Encontro dos alunos da Pós-graduação, 2010, Instituto de Química-USP, São Paulo.
8. FOGAÇA, R.; OAKE, S.A.; ZAMARION, V.M.; ARAKI, K.; TOMA, H.E.; CATALANI, L.H. *Bactericidal-fungicidal electrospun PVP hydrogels: A new approach in wound healing*. In: 2° Encontro dos alunos da Pós-graduação, 2010, Instituto de Química-USP, São Paulo.
9. FOGAÇA, R.; ZAMARION, V.M.; ARAKI, K.; TOMA, H.E.; CATALANI, L.H. *Hidrogel de PVP/AgNP/Papaína como sistema inteligente para o tratamento de feridas crônicas*. In: 32° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009, Fortaleza/CE.
10. FOGAÇA, R.; CATALANI, L.H. *Reticulação instantânea de hidrogéis de PVP produzidos por eletrofiação*. In: 32° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009, Fortaleza/CE.
11. FOGAÇA, R.; BONACIN, J.A.; CATALANI, L.H. *Caracterização de Hidrogéis Porosos Nanoestruturados de Poli(N-vinil-2-pirrolidona) Produzidos por Eletrofiação e Reação de Fenton*. In: 31° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia/SP.

12. FOGAÇA, R.; CATALANI, L.H. *Incorporation and Permeation of BSA-FITC in Poly(N-2-vinil-pirrolidone) Porous Hydrogels Produced by Electrospinning*. In: 2nd French-Brazilian Meeting on Polymers, 2008, Florianópolis/SC.
13. FOGAÇA, R.; ZAMARION, V.M.; ARAKI, K.; TOMA, H.E.; CATALANI, L.H. *Bactericidal Hydrogels Composed by PVP/AgNP Electrospun Nanofibers to use as Wound Dressing*. In: VII Encontro da Sociedade Brasileira de Materiais (Brazil-MRS), 2008, Guarujá/SP.
14. BUENO, V.B.; FOGAÇA, R.; CATALANI, L.H. *Hydrogel Microspheres produced by electrospray*. In: International Congress on Biohydrogels, 2007, Viareggio, Italy.
15. FOGAÇA, R.; CATALANI, L.H. *Hidrogéis a partir de Fibras de Poli(N-2-vinil-pirrolidona) Obtidas via Eletrospinação*. In: 9º Congresso Brasileiro de Polímeros, 2007, Campina Grande/PB.

---

### **Entrevistas**

1. FOGAÇA, R. Universo Nano. Jornal Bom Dia Brasil, 2009.
-

**Participação em bancas examinadoras****Trabalho de conclusão de curso de graduação**

1. FOGAÇA, R.; CASARANO, R.; DEMARQUETTE, N. Participação em banca de Fábio Akio Shiomi Iha. *Eletrofiação de Poliésteres Biodegradáveis*. 2009. Graduação em Engenharia de Materiais - Universidade de São Paulo.

---

**Disciplinas cursadas no doutorado**

---

Disciplina	Créditos	Conceito
Caracterização de Polímeros	8	A
Seminários Gerais do Departamento de Química Fundamental I	2	A
Biomateriais	4	A
Seminários Gerais em Química Orgânica II		
Apresentado: "Géis lipofílicos de polieletrólitos como polímeros superabsorventes de solventes orgânicos apolares"	3	A
Mecanismos das Reações Orgânicas	8	A
Microscopia Eletrônica II	12	A
Química dos Colóides Formados por Autoassociação	4	Ouvinte

---