

Marcelo de Souza dos Santos

**OBTENÇÃO DE MEMBRANAS BIOPOLIMÉRICAS  
ELETROFIADAS PARA LIBERAÇÃO DE CLORIDRATO DE  
PROPRANOLOL**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química, Área de concentração Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mara G. N. Quadri

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cíntia Soares

Coorientador: Prof. Dr. Dachamir Hotza

Florianópolis - SC  
2018



Marcelo de Souza dos Santos

**OBTENÇÃO DE MEMBRANAS BIOPOLIMÉRICAS  
ELETROFIADAS PARA LIBERAÇÃO DE CLORIDRATO DE  
PROPRANOLOL**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Engenharia Química”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 20 de abril de 2018.

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cíntia Soares  
Coordenadora do Programa

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mara G. N. Quadri  
Orientadora/UFSC

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cíntia Soares  
Coorientadora/UFSC

---

Prof. Dr. Dachamir Hotza  
Coorientador/UFSC

---

Prof. Dr. Alexandre Luis Parize  
UFSC

---

Dr.<sup>a</sup>. Karina Cesca  
UFSC

---

Dr. Eduardo Niehues  
IFSC



Aos meus pais, Marenilda e Álvaro,  
por todo amor e dedicação durante  
toda minha vida. Ao meu irmão  
Fabrício, meu amigo. Obrigado por  
fazer da nossa casa um lar amoroso  
e por serem uma família  
maravilhosa.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus que sempre me fortaleceu a cada dia, conferindo saúde física e mental e discernimento para todos os acontecimentos em minha vida.

Aos meus pais, Marenilda e Álvaro, por proporcionarem a oportunidade de estudar fora, por se fazerem tão presentes mesmo com toda distância. Por cuidarem de mim, brigando, incentivando, apoiando e, principalmente, por todo amor incondicional. Obrigada por serem meu porto seguro para onde sempre posso voltar. Ao meu irmão, Fabrício, pelas contribuições e também pelo apoio.

Aos meus avôs, tios e primos, por entenderem e sempre apoiar a fazer aquilo que gostamos com muita dedicação e seriedade.

Ao meu amigo irmão Israel, pelo apoio e pelos grandes incentivos que ele me deu ao longo da minha jornada.

Ao meu mais que amigo Fernando Campelo, por todo apoio e bons momentos compartilhados.

Aos meus orientadores, professoras doutora Mara Gabriela Novy Quadri e Cíntia Soares e ao professor doutor Dachamir Hotza, pela oportunidade, confiança e pela contribuição para o meu crescimento pessoal e acadêmico.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o convite e contribuírem para a melhoria desse trabalho.

À Universidade Federal de Santa Catarina, especialmente ao programa de Pós-Graduação de Engenharia Química.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À todos do Laboratório de Sistemas porosos (LASIPO), em especial ao Clara, Valdir, Rafael, Vivian, Jeovandro, Celso.

Aos companheiros e amigos Roberta, José Luiz, Seldis, Vanessa, Ítalo, Mary, Victor, pelo apoio e bons momentos compartilhados.

Ao Douglas, Allan, amigos que tive a sorte de ganhar no decorrer do mestrado.

À toda equipe do laboratório CERMAT, em especial a Priscila por toda contribuição.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que de forma direta e indireta colaboraram para a realização deste trabalho.



## RESUMO

A gelatina é um biopolímero obtido pela desnaturação do colágeno proveniente de fontes animais. Apresenta diversas aplicações tecnológicas, inclusive, na produção de nanofibras obtidas a partir da técnica de eletrofiação. Essa técnica permite a produção eficiente de fibras através do ajuste adequado de seus parâmetros de processo. O cloridrato de propranolol é um beta bloqueador utilizado no tratamento de doenças como hipertensão, angina pectoris, enxaqueca, entre outras. Assim o presente trabalho tem como objetivo, estudar o processamento e caracterizar nanofibras de gelatina eletrofiadas e reticuladas com EDC/NHS visando à liberação de cloridrato de propranolol para a aplicação em sistemas transdérmicos. As soluções de gelatina pura (GeP) e gelatina com fármaco (GeF) foram submetidas a testes de viscosidade, e os resultados mostraram um aumento na viscosidade com a incorporação do fármaco, com obtenção de diâmetro médio para GeP de  $109\pm 48$  nm e GeF  $278\pm 78$  nm. As nanofibras foram caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), análises térmicas (TGA e DSC) e Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). O efeito da reticulação via EDC/NHS foi estudada em três concentrações de reticulante (0,1 mmol, 0,5 mmol, 1,0 mmol). Nanofibras de gelatina reticulada com fármaco na concentração 0,1 mmol (GeRF 0,1) foram produzidas e avaliadas quanto ao perfil de liberação do cloridrato de propranolol. Os resultados obtidos comprovaram a viabilidade de produção das nanofibras de gelatina incorporadas com o fármaco.

**Palavras-chave:** Biopolímero. Eletrofiação. Nanofibras. Gelatina. EDC. Sistema de liberação controlada. Cloridrato de Propranolol



## ABSTRACT

Gelatin is a biopolymer obtained from the denaturation process of collagen from animal sources, presenting several technological applications including nanofibers manufacture obtained by the electrospinning technique. This technique allows the efficient production of nanofibers by fitting the processing parameters. Propranolol hydrochloride is a beta blocker used in the treatment of various diseases such as arterial hypertension, angina pectoris, and migraine. The present work studied the processing and characterization of gelatin electrospinning membranes crosslinked with (EDC/NHS) to release propranolol hydrochloride for application in transdermal systems. The pure gelatin (GeP) and gelatin with drug (GeF) solutions were evaluated by viscosity values, where viscosity increased with incorporation of the referred drug. Morphology analysis informed diameters of  $109 \pm 48$  nm and  $278 \pm 78$  nm for GeP and GeF, respectively. The nanofibers were characterized by scanning electron microscopy (SEM), thermal analysis (TGA and DSC) and Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR). Crosslinking effect *via* EDC/NHS was evaluated under three concentrations of the crosslinking agent (0.1 mmol, 0.5 mmol, and 1,0 mmol). Crosslinked gelatin at the concentration 0.1 mmol (GeRF01) nanofibers were produced and evaluated for the propranolol hydrochloride releasing profile. The results showed the viability of the produced gelatin membranes incorporating propranolol hydrochloride for application in transdermal systems.

**Keywords:** Biopolymer. Electrospinning. Gelatine. Nanofibers. EDC. Controlled release system. Propranolol hydrochloride.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura simples de uma unidade de gelatina. ....	25
Figura 2. Aumento na intensidade da cor de gelatina extraída em função da etapa de extração. ....	29
Figura 3. Estrutura química do EDC. ....	30
Figura 4. Mecanismo de reticulação da gelatina pelo EDC. ....	31
Figura 5. Estrutura química da ninidrina. ....	31
Figura 6. Sistema de eletrofição composto por bomba de infusão, seringa equipada com agulha, fonte de alta tensão e coletor aterrado... 33	
Figura 7. Imagens de microscopia eletrônica de varredura das fibras de polímero eletrofiados sem grânulos (a), com grânulos (b) e com gotas (c). ....	34
Figura 8. Concentração do fármaco no sítio terapêutico após a sua liberação em a) controlada b) convencional. ....	40
Figura 9. Mecanismos de liberação do fármaco: (a) difusão a partir de um sistema reservatório; (b) difusão a partir de um sistema matricial; (c) difusão controlada por erosão da matriz polimérica; (d) intumescimento da matriz polimérica. ....	42
Figura 10. Estrutura química do cloridrato de propranolol. ....	46
Figura 11. Solução de gelatina a 18% (m/v) em ácido acético 89,6% (v/v). ....	50
Figura 12. Sistema de eletrofição com as condições utilizadas no experimento. ....	51
Figura 13. Curva de viscosidade para solução de gelatina pura e gelatina com propranolol. ....	57
Figura 14. Curva de fluxo das soluções de gelatina pura e gelatina com propranolol. ....	58
Figura 15. Espectros de FTIR-ATR das membranas de gelatina pura e membranas reticuladas com EDC/NHS em diferentes concentrações (0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM). ....	60
Figura 16. Espectro de infravermelho do cloridrato de propranolol. ....	62
Figura 17. Espectro de infravermelho do filme de gelatina reticulado com propranolol incorporado. ....	63
Figura 18. Análise termogravimétrica das membranas de gelatina pura e obtidas na reticulação variando-se a concentração de EDC/NHS. ....	64

Figura 19. Análise de DSC das membranas de gelatina pura e àquelas obtidas após a reticulação com EDC/NHS em diferentes concentrações. ....	65
Figura 20. Microscopia eletrônica de varredura obtidas a partir da solução de gelatina bloom 280, com concentração de 18% em ácido acético 89,6 % (v/v). ....	67
Figura 21. Imagens da microscopia eletrônica de varredura das membranas de gelatina eletrofiadas: (A) reticulada com 0,1 mM de EDC/NHS, GeR 0,1, (B) reticulada com 0,5 mM de EDC/NHS, GeR 0,5, (C) reticulada com 1 mM de EDC/NHS, GeR 1,0, (D) reticulada em 2,5% (v/v) de GTA, GeR 2,5 GTA. ....	68
Figura 22. Microscopia eletrônica de varredura do filme de Gelatina Reticulada, GeR0,1 (A), Gelatina Reticulada e com Fármaco, GeRF0,1 (B) e análise de EDS (C). ....	69
Figura 23. Efeito da reticulação das membranas de gelatina em função da concentração de EDC/NHS. ....	70
Figura 24. Curvas de tensão-deformação de membranas eletrofiadas. .	73
Figura 25. Representação gráfica do perfil de liberação do cloridrato de propranolol em PBS pH 7,4, 37 °C para (CR) e (GeRF0,1). ....	74
Figura 26. Perfil de liberação ajustado aos modelos cinéticos de primeira ordem (A), ordem zero (B) e Higuchi (C). ....	75

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sistemas e mecanismos que controlam a liberação de fármacos. ....	41
Tabela 2. Modelos cinéticos usados no estudo do perfil de liberação do filme de gelatina reticulado. ....	55
Tabela 3. Parâmetros reológicos das soluções de gelatina e gelatina com propranolol. ....	59
Tabela 4. Grupos funcionais referentes a estrutura de gelatina. ....	61
Tabela 5. Variação da massa solúvel do filme de gelatina reticulada com diferentes concentrações de EDC/NHS. ....	71
Tabela 6. Propriedades mecânicas dos filmes de gelatina puro e com concentrações variadas de EDC/NHS. ....	72



## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1: Porcentagem média dos aminoácidos constituintes da molécula de gelatina.....	27
--	----



## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

CP	Cloridrato de Propranolol
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
GP	Gelatina Pura
GeF	Gelatina com fármaco
GeR01mM	Gelatina Reticulada com concentração 0,1 mM
GeR05 mM	Gelatina Reticulada com concentração 0,5 mM
GeR1 mM	Gelatina Reticulada com concentração 1 mM
GeRF01 mM	Gelatina com Fármaco Reticulada com concentração 0,1 mM
ImageJ	Software de Análise de Imagens
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NHS	N-Hidroxisuccinimida
TGA	Análise Termogravimétrica
$\tau$	Tensão de Cisalhamento
$\tau_0$	Límite de escoamento
k	Índice De Consistência
$\gamma$	Taxa de Deformação
n	Índice de Comportamento do Fluido/ou de Fluidez
$\mu$	Viscosidade
$\eta_P$	Viscosidade plástica
E	Módulo de Young
$\epsilon_b$	Alongamento máximo de ruptura
e	Espessura



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>23</b>
1.1 OBJETIVOS.....	24
<b>1.1.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>24</b>
<b>1.1.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>24</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>25</b>
2.1 Gelatina .....	25
2.2. Agentes Reticulantes.....	29
2.3. Eletrofiação .....	32
<b>2.3.1. Parâmetros do processo de eletrofiação.....</b>	<b>34</b>
<b>2.3.2. Parâmetros de solução.....</b>	<b>36</b>
<b>2.3.3 Parâmetros ambientais.....</b>	<b>38</b>
2.4. Sistema de liberação controlada (SLC).....	39
2.5. Sistemas terapêuticos transdérmicos (STT's) .....	43
2.7. Cloridrato de propranolol.....	46
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>49</b>
3.1 MATERIAL .....	49
3.2 MÉTODOS .....	49
<b>3.2.1 Preparo das soluções.....</b>	<b>49</b>
<b>3.2.2. Viscosidade.....</b>	<b>50</b>
<b>3.2.3. Eletrofiação.....</b>	<b>51</b>
<b>3.2.4. Reticulação por EDC.....</b>	<b>51</b>
<b>3.2.5. Grau de Reticulação.....</b>	<b>52</b>
<b>3.2.6. Solubilidade em água.....</b>	<b>52</b>
<b>3.2.7. Análise Termogravimétrica (TGA).....</b>	<b>53</b>
<b>3.2.8. Análise de calorimetria diferencial de varredura.....</b>	<b>53</b>

3.2.9. Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)...	53
3.2.10. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	53
3.2.11. Propriedades Mecânicas.....	54
3.2.12. Mecanismo de liberação do fármaco.....	54
3.2.13. Cinética de liberação do fármaco.....	54
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
4.1 – Viscosidade .....	57
4.2. FTIR – ATR.....	59
4.3. Propriedades térmicas .....	64
4.4. Morfologia .....	66
4.5. Grau de Reticulação .....	70
4.6. Solubilidade .....	70
4.7. Propriedade Mecânicas .....	71
4.8. Teste de liberação .....	74
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>79</b>
<b>6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>81</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>83</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A necessidade por crescentes tecnologias, produtos e melhorias em serviços de forma sustentável, tem requerido e motivado diversos estudos para elaboração de produtos com caráter biodegradáveis.

Os filmes biopoliméricos possuem alto potencial de aplicação industrial devido à biodegradabilidade e biocompatibilidade. Contudo, dependendo da fonte de onde são provenientes, os biopolímeros de origem proteica são pouco aplicados como filmógenos devido à alta sensibilidade a água e baixa maleabilidade resultantes desses materiais.

A gelatina é produzida a partir da desnaturação do colágeno de diversas fontes de origem animal. O teor de proteínas varia entre 85 a 92%. É um produto que possui diversas aplicações tecnológicas, inclusive na produção de filmes (SCHRIEBER e GAREIS, 2007). Nanofibras de gelatina também são muito empregadas no desenvolvimento de matriz extracelular artificial para engenharia de tecido, curativos para cicatrização de ferimentos e liberação de fármacos.

O uso como filme muitas vezes se torna restrito devido à sua fragilidade. Para contornar tal restrição faz-se necessário o uso de agentes reticulantes, os quais propiciam a formação de ligações covalentes entre grupos funcionais da estrutura da gelatina. Desta forma, promove-se assim, um aumento de estabilidade térmica, inibindo a dissolução em água.

Encontram-se na literatura científica vários estudos referentes à reticulação de filmes de gelatina. O EDC é um agente químico muito utilizado devido à sua eficiência na reticulação de proteínas e polissacarídeos. Além disso, destaca-se por não ser tóxico quando comparado a reticulantes como formaldeído e glutaraldeído.

O sistema de liberação controlada de fármacos mostra-se como um desafio para profissionais de diversas áreas (SIVAKUMAR et al., 2002). O desenvolvimento de polímeros para liberação controlada de fármacos vem crescendo rapidamente desde a década de 60, com um grande avanço na síntese e fabricação de sistemas poliméricos sofisticados (HUANG et al., 2003). Os dispositivos utilizados para liberação controlada, possuem inúmeras vantagens, quando comparados às formas normais de dosagem (VERRECK et al., 2003).

Nesse contexto, o trabalho proposto tem por objetivo o processamento de membranas eletrofiadas de gelatina reticuladas com

EDC visando a liberação de cloridrato de propranolol para a aplicação em sistemas transdérmicos.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Processar membranas de gelatina eletrofiadas, formando tecido não tecido com nanofibras sobrepostas e reticuladas com EDC visando a liberação de cloridrato de propranolol para a aplicação em sistemas transdérmicos.

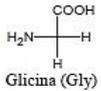
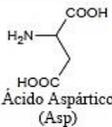
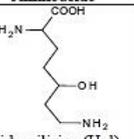
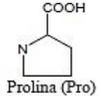
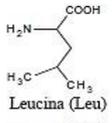
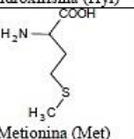
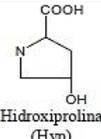
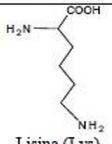
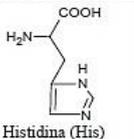
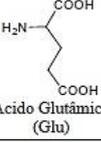
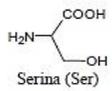
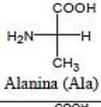
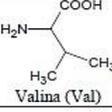
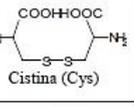
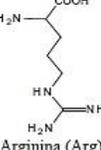
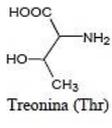
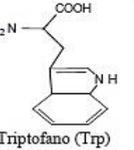
### 1.1.2 Objetivos Específicos

- obter membranas de gelatina a partir da técnica de eletrofiação;
- utilizar concentrações diferentes de reticulante;
- caracterizar as membranas reticuladas através das técnicas de viscosidade, FTIR, TGA, DSC, MEV, propriedades mecânicas;
- avaliar a liberação do fármaco cloridrato de propranolol tendo como base um comprimido de CP como controle de referência;
- analisar o perfil contendo Cloridrato de propranolol, a fim de traçar o perfil de liberação do fármaco;



Tanto o colágeno quanto a gelatina consistem de quantidades variáveis de 18 aminoácidos, onde a glicina (Gly), a prolina (Pro) e a hidroxiprolina (Hyp) são encontradas em maiores quantidades, representando quase dois terços do total de constituintes aminoácidos da molécula de gelatina. A estrutura primária da gelatina tem a forma geral  $[\text{Gly-X-Y}]_n$ , onde “X” e “Y” são resíduos de aminoácidos, sendo ocupados geralmente por resíduos de prolina ou hidroxiprolina, e “n” pode variar de 337 a 343 dependendo do tipo do colágeno. Esta cadeia peptídica apresenta em uma de suas extremidades um grupo funcional carboxila (-COOH) e na outra um grupo amina (-NH<sub>2</sub>) (INSUMOS, 2009; MALLMANN, 2010; PROCKOP, 2013). É composta basicamente de 50,5 % de carbono, 6,8 % de hidrogênio, 17 % de nitrogênio e 25,2 % de oxigênio (NUR HANANI; ROOS; KERRY, 2014). O Quadro 1 mostra a porcentagem média de aminoácidos que constituem a molécula de gelatina.

Quadro 1: Porcentagem média dos aminoácidos constituintes da molécula de gelatina.

Aminoácido	%	Aminoácido	%	Aminoácido	%
 Glicina (Gly)	27,5	 Ácido Aspártico (Asp)	6,7	 Hidroxilisina (Hyl)	0,9
 Prolina (Pro)	16,4	 Leucina (Leu)	5,1	 Metionina (Met)	0,9
 Hidroxiprolina (Hyp)	14,1	 Lisina (Lys)	4,5	 Histidina (His)	0,8
 Ácido Glutâmico (Glu)	11,4	 Serina (Ser)	4,2	 Tirosina (Tyr)	0,3
 Alanina (Ala)	11,0	 Valina (Val)	2,6	 Cistina (Cys)	Traços
 Arginina (Arg)	8,8	 Treonina (Thr)	2,2	 Triptofano (Trp)	Traços

Fonte: Mallmann, 2010.

A gelatina é basicamente o colágeno desnaturado. A perda da estrutura tridimensional do colágeno original pode ser obtida por processos químicos, enzimáticos ou térmicos. Os principais agentes de desnaturação são a mudança no pH, as mudanças na concentração do sal e as mudanças na temperatura (SENA, 2004).

Conforme Saxena (2005), dependendo do tipo e intensidade do tratamento utilizado, o colágeno pode dar origem a diferentes tipos de gelatinas. Gelatina do tipo A é derivada do processamento ácido do

colágeno e gelatina do tipo B é obtida por tratamento alcalino do colágeno, resultando em diferentes pontos isoelétricos. Observa-se que a gelatina do tipo A possui pI de 7 a 9, e a gelatina do tipo B de 4 a 5.

O índice Bloom, que é uma medida da força do gel, é outra característica importante da gelatina. Ele consiste na força requerida para que um êmbolo específico pressione a superfície de um gel padrão ao longo de uma distância de 4 mm, sob termostatização e condições padrão. Quanto maior o índice Bloom, maior a força do gel (SCHRIEBER; GAREIS, 2007). Esta força é dependente, principalmente, da proporção de frações que contenham massa molecular de aproximadamente  $100.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , enquanto a viscosidade é função, principalmente, das frações com massa molecular de valores entre  $200.000$  e  $400.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Por esta razão, dependendo do método de manufatura, gelatinas de mesmo Bloom podem ter viscosidades bastante diferentes (SCHRIEBER; GAREIS, 2007). Bigi, Panzavolta e Rubini (2004) relataram que, em geral, o índice Bloom é proporcional ao teor de tripla-hélice da gelatina e a viscosidade aumenta com o aumento das frações de massa molecular mais elevada. Lai (2009) indicou que gelatinas de alto índice Bloom têm viscosidades maiores do que amostras de baixo índice Bloom.

A coloração da gelatina é outra propriedade que está correlacionada às condições de obtenção a partir do colágeno. Com o aumento do tempo de reação, a proteína reage com traços de carboidratos da matéria-prima (reação de Maillard) e aumenta a intensidade da cor (Figura 2). Portanto, quanto menor o índice Bloom, mais intensa é a cor da gelatina (SCHRIEBER; GAREIS, 2007).

Figura 2. Aumento na intensidade da cor de gelatina extraída em função da etapa de extração.



Fonte: SCHRIEBER e GAREIS (2007).

Abruzzo et al. (2012) realizaram estudos de filmes a base de gelatina e quitosana para liberação de cloridrato de propranolol na cavidade oral. Eles observaram, para os filmes à base de gelatina, uma melhor distribuição do fármaco na matriz quando comparado com a quitosana e blendas (quitosana e gelatina).

Assim, a gelatina, por ser um polímero natural, possui um amplo campo de aplicações e tem sido estudada tanto pura como em compósitos, principalmente nas áreas de engenharia de tecidos (AZHAR; OLAD; SALEHI, 2014), de revestimento comestíveis (POVERENOV et al., 2014), de adesivos para cicatrização de feridas (SHEFY-PELEG et al., 2014), de administração de fármacos (PHADKE; MANJESHWAR; AMINABHAVI, 2014), entre outras.

## 2.2. Agentes Reticulantes

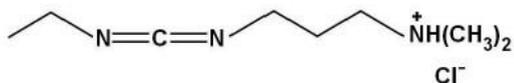
Um das formas de se reduzir a solubilidade em água de um biopolímero é realizar ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas, as quais podem ser obtidas através de um processo de reticulação. Dessa forma, propriedades inerentes ao material, como estabilidades térmica e mecânica bem como a taxa de degradação (que está diretamente relacionada à solubilidade), são alteradas (YOUNG et al., 2005). Os

agentes de reticulação químicos mais comuns são o glutaraldeído, o gliceraldeído, o formaldeído, o ácido tânico e o ácido láctico (BASTIOLI, 2005).

Além dos agentes reticulantes químicos, é possível utilizar métodos de reticulação física, utilizando radiação (ultravioleta, por exemplo) ou tratamento térmico. Métodos enzimáticos envolvem uso de enzimas como transglutaminases ou peroxidases aplicadas para estabilizar materiais proteicos.

O cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (Figura 3) é um agente reticulante muito utilizado, já que é bastante eficiente nas reticulações de proteínas e polissacarídeos. Apresenta a vantagem de não ser tóxico quando comparado a reticulantes como formaldeído e o glutaraldeído (TOMIHATA; BURCZAK; SHIRAKI, 1993).

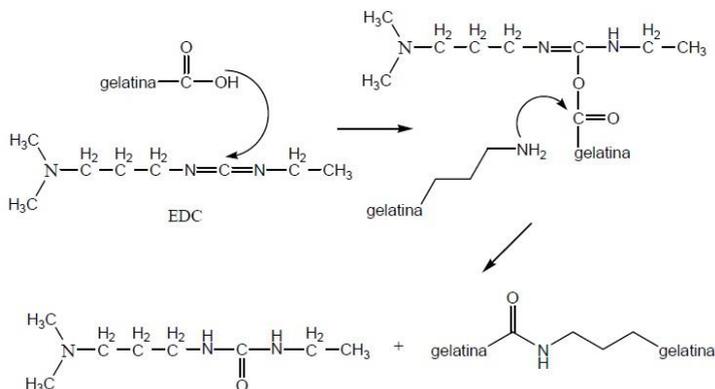
Figura 3. Estrutura química do EDC.



Fonte: Autor (2018).

Uma outra vantagem é o fato do EDC não pode ser incorporado na estrutura do polímero reticulado, formando um derivado de ureia pode ser facilmente retirado com sucessivas lavagens com água por ter caráter iônico (THOMIHATA et al., 1993). No processo de reticulação (Figura 4), o EDC é protonado e reage com o grupo carboxila da gelatina para formar a o-isoacilureia. A seguir ocorre um ataque nucleofílico das aminas, gerando a reticulação e simultaneamente liberando o derivado de ureia gerado pelo EDC (CHEN et al., 2005). A reticulação com carbodiimida induz a formação de uma ligação amida ou peptídica entre os grupos amino primário e ácido carboxílico. Esta reação envolve aminoácidos de lisina, hidroxilisina, ácido aspártico e ácido glutâmico da gelatina, por exemplo.

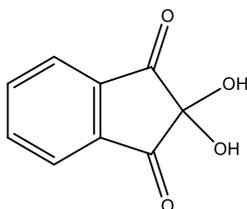
Figura 4. Mecanismo de reticulação da gelatina pelo EDC.



Fonte: CHEN, 2005.

A quantidade de grupos amina envolvida na reação de reticulação pode ser determinada por espectroscopia UV-Vis utilizando ninidrina (2,2-diidróxi-1,3-indenodiona) (Figura 5). As aminas livres, restantes após a reação de reticulação, reagem com a ninidrina formando um complexo de coloração roxa, comumente conhecido como purpura de Ruhemann. A absorvância da solução, medida em 570 nm, é proporcional à quantidade de grupos amina livres após a reação com o agente reticulante (MARTUCCI; ACCAREDDU; RUSECKAITE, 2012; DASH; FOSTON; RAGAUSKAS, 2013).

Figura 5. Estrutura química da ninidrina.



Fonte: Autor (2018).

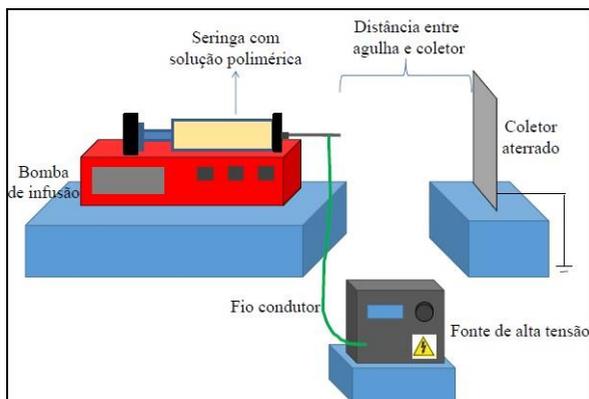
### 2.3. Eletrofiação

A técnica de eletrofiação ou fiação eletrostática (*electrospinning*) tem sido muito utilizada pelo fato de produzir fibras com diâmetros médios muito pequenos quando comparadas com as técnicas tradicionais como fiação à seco (*dry spinning*), fiação úmida (*wet spinning*), fiação via gel (*gel spinning*) e fiação com material fundido (*melt spinning*) (PARK et al., 2001; HUANG et al., 2003; SATO, 2011). A eletrofiação permite produzir fibras na forma de malhas ou mantas, ou membranas poliméricas, cujos diâmetros variam entre 10 nm a 10  $\mu\text{m}$  (EICHHORN; SAMPSON, 2005). As nanofibras têm como vantagens: alta área superficial, podem ser obtidas numa variedade de formas e tamanhos, podem possuir propriedades e funcionalidades a partir do controle sobre a composição dessas membranas, além de poderem ser produzidas por uma infinidade de polímeros (BHARDWAJ; KANDU, 2010; SATO, 2011; SILVA et al., 2013).

O primeiro estudo de eletrofiação foi patenteado por Formhals (1934) que descreve a produção de filamentos poliméricos decorrentes da utilização de forças eletrostáticas. Em 1969 Taylor lançou as bases para o *electrospinning*, e que passou a ter este nome apenas por volta de 1994 (BHARDWAJ; KUNDU, 2010).

O sistema de eletrofiação é composto por três componentes básicos: uma fonte de alta tensão, um tubo capilar (por exemplo, uma agulha) e um coletor aterrado (usualmente uma placa de metal). O processo consiste em uma aplicação de campo elétrico entre o polímero e um coletor metálico. Normalmente, esse polímero (solubilizado em um solvente apropriado, ou seja, em uma solução com concentração e viscosidade adequadas) está presente em um tubo capilar (seringa), e é empurrado através deste capilar por ação de uma bomba peristáltica (ALCOBIA, 2013). A agulha é ligada ao polo positivo da fonte de alta tensão e fica situado à frente do coletor. Este último encontra-se conectado ao polo negativo. A Figura 6 apresenta um esquema do sistema de eletrofiação.

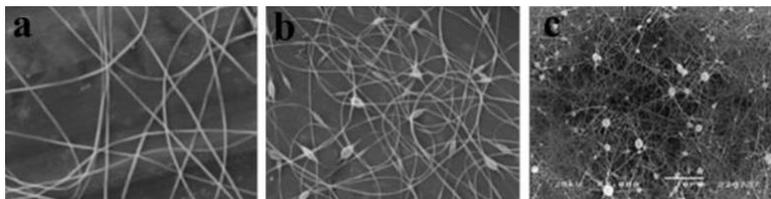
Figura 6. Sistema de eletrofição composto por bomba de infusão, seringa equipada com agulha, fonte de alta tensão e coletor aterrado.



Fonte: NIEHUES, 2015.

A solução é mantida inicialmente pela sua tensão superficial na extremidade do capilar na forma de gota. Com a alta carga eletrostática gerada pela fonte de alta tensão, a gota se deforma na direção do receptor; com o aumento da tensão elétrica, forma-se um cone chamado cone de Taylor (SILL e RECUM, 2008). Quando as forças eletrostáticas, de ação repulsiva, superam a tensão superficial, de ação coesiva, um jato carregado da solução na extremidade do cone é ejetado e atraído ao coletor. Uma vez que este jato é carregado, a sua trajetória pode ser controlada pelo campo elétrico. À medida que a solução percorre no ar, a distância do capilar até a placa receptora, o solvente se evapora e uma fibra de polímero carregada é fixada aleatoriamente no coletor. Assim, as fibras são continuamente dispostas sobre o coletor para formar uma manta (tecido não tecido) de diâmetros micro ou nanométricos, como mostrado na Figura 7.a (BAJI et al., 2010; SCHUEREN et al., 2010; JÚNIOR et al., 2013; NIEHUES, 2015). No entanto, quando as condições experimentais não estão bem ajustadas, observa-se a formação de grânulos, como pérolas em um fio, ou gotas como mostrado nas Figuras 7b e c, respectivamente.

Figura 7. Imagens de microscopia eletrônica de varredura das fibras de polímero eletrofiadas sem grânulos (a), com grânulos (b) e com gotas (c).



Fonte: FONG; CHUN; RENEKER, 1999; MIT-UPPATHAM; NITHITANAKUL; SUPAPHOL, 2004.

Em função destes pontos é importante a investigação da influência dos seguintes parâmetros sobre as características das fibras: propriedades da solução, como viscosidade, condutividade elétrica e tensão superficial; variáveis de processo, como vazão, potencial elétrico na agulha e a distância entre a ponta da agulha e o coletor, e ainda as variáveis relativas ao ambiente como temperatura e umidade relativa; estas duas últimas são importantes variáveis na etapa de secagem (BHARDWAJ; KUNDU, 2010).

### 2.3.1. Parâmetros do processo de eletrofição

#### 2.3.1.1. Vazão da solução polimérica

A vazão da solução determina a quantidade de solução disponível para a eletrofição. Quando ocorre um aumento da taxa de alimentação, aumenta-se o diâmetro das fibras já que há um aumento do fluxo da solução que sai da ponta da agulha (WANG et al., 2004). Vazões elevadas necessitam de tempo maior para evaporação do solvente de modo a não originar fibras com defeitos (HUANG et al., 2003). Para que o solvente tenha tempo suficiente para evaporar, o ideal é que o fluxo seja contínuo e a taxa de alimentação seja baixa (WANG et al., 2004; BHARDWAJ; KUNDU, 2010). Okutan, Terzi e Altay (2014) avaliaram o efeito de alguns parâmetros experimentais na morfologia de fibras de gelatina eletrofiadas e concluíram que o aumento da velocidade de 0,1 para  $1\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$  resultou em fibras mais espessas e formação de grânulos.

### 2.3.1.2. Diferença de Potencial Elétrico no Sistema de Eletrofiação

O uso de um potencial elétrico na solução polimérica é essencial para que ocorra a formação de fibras no processo de eletrofiação. Assim, forças elétricas são responsáveis por gerar instabilidade no polímero e induzir a formação do cone de Taylor. A tensão aplicada tem que ser suficientemente alta para que as forças eletrostáticas superem a tensão superficial da gota. A partir dessa voltagem, o processo de fiação é iniciado (COSTA et al., 2012a). Existem diversos trabalhos que relatam resultados diferentes ao avaliar o comportamento da diferença de potencial elétrico no processo de eletrofiação. Okutan, Terzi e Altay (2014) observaram o aumento da espessura das fibras de gelatina ao aumentar a diferença de potencial elétrico. Homayoni, Ravandi e Valizadeh (2009) observaram que o aumento da intensidade da diferença de potencial elétrico resultou na diminuição da espessura das fibras de quitosana. No entanto, em ambas as investigações os autores descrevem melhoria na qualidade de eletrofiação com o aumento da diferença de potencial elétrico, ou seja, observaram a diminuição da quantidade de grânulos. Ainda, na literatura, com o aumento das forças elétricas, há maior quantidade ejetada de polímero, que contribui para formação de fibras mais espessas. Outros autores relatam que aumentando a intensidade da diferença de potencial elétrico o efeito de repulsão eletrostática é maior no jato do fluido polimérico, o que favorece o estiramento e o consequente estreitamento do diâmetro da fibra (BHARDWAJ; KUNDU, 2010). Assim, o efeito deste parâmetro na morfologia das fibras não pode ser considerado de forma individual. É necessário considerar outros fatores, como o tipo de polímero, a viscosidade da solução, a vazão e a distância da ponta da agulha ao coletor.

### 2.3.1.3. Distância entre a ponta da agulha e o coletor

O trajeto do jato polimérico durante o processo de eletrofiação começa na ponta da agulha e termina no coletor. Deste modo, é necessária uma distância mínima para que ocorra a evaporação do solvente (SILL; RECUM, 2008). Distâncias muito pequenas ou muito grandes podem gerar a presença de grânulos ao invés de fibras (KULKARNI et al., 2010). Porém esse parâmetro não tem um efeito acentuado sobre a morfologia das fibras (BHARDWAJ; KUNDU, 2010). Na literatura encontram-se várias pesquisas que abordam esse

parâmetro. Ki e colaboradores (2005) avaliaram a influência da distância da ponta da agulha ao coletor nas características de fibras de gelatina, obtidas por eletrofição, e não constataram mudanças significativas na espessura das fibras. Entretanto, ao aumento da distância permite a observação de gotas no coletor.

#### 2.3.1.4. Tipos de coletor

Diversos tipos de coletores podem ser utilizados no processo de eletrofição como por exemplo, grade arame, barras paralelas, folhas de alumínio, cilindros rotatórios, entre outros. Em comparação com os coletores estáticos, a utilização de coletores cilíndricos rotatórios pode resultar em fibras alinhadas, diminuição do diâmetro da fibra e aumento da área de coleta do filme, mantendo a homogeneidade da espessura do filme. Porém, vale ressaltar que existe um limite de velocidade de rotação, acima do qual não é possível obter fibras alinhadas, já que rotações muito elevadas favorecem a quebra do jato polimérico ao tocar o coletor (HUANG et al., 2003)

### 2.3.2. Parâmetros de solução

#### 2.3.2.1. Solvente

A escolha de um solvente ideal para cada tipo de polímero é importante para que este seja completamente solubilizado e que este seja volátil na temperatura de eletrofição. Alta volatilidade do solvente garante rápida separação de fase no processo de formação das fibras (WANNATONG et al., 2004). Alguns avaliam que a presença de solventes como flúor e álcoois melhoram a eficiência na eletrofição de gelatina à temperatura ambiente (HUANG et al., 2004; CHOKTAWEE SAP et al., 2007). No entanto, sua alta citotoxicidade afeta a estrutura original da proteína (GAST et al., 2001). Com isso, o ácido acético tem sido uma excelente opção para eletrofiar gelatina pois, além de eliminar o problema da gelificação, não é tóxico em baixas concentrações (CHOKTAWEE SAP et al., 2007; SONGCHOTIKUNPAN; TATTIYAKUL; SUPAPHOL, 2008; ERENCIA et al., 2014).

### 2.3.2.2. Viscosidade

A viscosidade da solução está relacionada com o grau de entrelaçamentos das cadeias de moléculas poliméricas. Para que ocorra a formação de fibras uniformes e sem gotas (grânulos ou defeitos) no processo de eletrofiação, é necessário que se tenha um valor mínimo de emaranhamento, o qual corresponde a um valor de viscosidade mínima (COSTA *et al.*, 2012a). O aumento na viscosidade ou na concentração da solução origina fibras com diâmetro maior e mais uniforme. Quando a viscosidade da solução é muito baixa pode não haver material suficiente no jato e grau de emaranhamento adequado para que uma fibra contínua se forme. Entretanto, soluções muito viscosas geram dificuldade na ejeção do jato. A viscosidade está relacionada com a concentração da solução e a massa molar do polímero. Na literatura há inúmeros estudos relacionados com esta propriedade e a morfologia das fibras formadas, onde observa-se o aumento da espessura das fibras com o aumento da viscosidade da solução; além de se detectar a presença de grânulos e gotículas na eletrofiação de soluções pouco viscosas (MIT-UPPATHAM; NITHITANAKUL; SUPAPHOL, 2004; SONGCHOTIKUNPAN; TATTIYAKUL; SUPAPHOL, 2008; GELTMEYER *et al.*, 2013).

### 2.3.2.3. Condutividade elétrica

A condutividade elétrica está ligada à quantidade de carga na solução. Maior condutividade com adição de sais nas soluções possibilita maior fluidez de carga e aceleração eletrostática maior sob mesmo campo elétrico, resultando em fibras mais finas (RAMAKRISHNA *et al.*, 2005). Ou seja, o tipo de polímero utilizado, solvente e a disponibilidade de sais ionizáveis determinam a condutividade elétrica na solução. Entretanto, Mit-Uppatham, Nithitanakul e Supaphol (2004) observaram que a adição de sais na solução polimérica gerou aumento da condutividade elétrica e da viscosidade da solução, produzindo fibras mais espessas. O aumento na espessura das fibras foi atribuído ao aumento das forças viscoelásticas que superaram as forças de repulsão elétrica.

#### 2.3.2.4. Tensão Superficial

A tensão superficial é a força a ser vencida para que ocorra a deformação da gota da solução na ponta da agulha. Como mencionado anteriormente na eletrofiação, as cargas da solução polimérica devem ser altas o suficiente para vencer a tensão superficial da solução. A tensão superficial é função da composição de solventes da solução, a qual desempenha um papel crítico no processo de eletrofiação. Com a redução da tensão superficial de uma solução, fibras podem ser obtidas sem grânulos (CHOKTAWEESSAP et al., 2007). Uma vez que a tensão superficial da solução precisa ser superada pela força elétrica repulsiva, o aumento da tensão superficial da solução requer aumento da tensão elétrica para a ejeção dos fios poliméricos (BHARDWAJ; KUNDU, 2010).

### 2.3.3 Parâmetros ambientais

#### 2.3.3.1. Temperatura do processo de eletrofiação

A temperatura do processo de eletrofiação é um parâmetro que, assim como a distância entre a ponta da agulha e o coletor, influem para a evaporação do solvente. Além disto, é um parâmetro que influencia nas propriedades da solução, como por exemplo a viscosidade. Com o aumento da temperatura, há geração de fibras com diminuição do diâmetro; esta diminuição é atribuída à diminuição da viscosidade das soluções do polímero. Há uma relação inversa entre viscosidade e temperatura (BHARDWAJ; KUNDU, 2010).

#### 2.3.3.2. Umidade relativa

A umidade relativa do meio está diretamente associada com a evaporação do solvente durante a eletrofiação. É importante que se tenha um ambiente com condições controladas, pois este é um parâmetro que pode influenciar na formação e morfologia das nanofibras (MEDEIROS et al., 2009). Em ambiente com elevada umidade, é observada a formação de uma pele com contornos bem definidos ao redor do jato eletrofiado, enquanto que em uma situação oposta, uma fina estrutura permite uma evaporação rápida do solvente (COLLINS et al., 2012).

## 2.4. Sistema de liberação controlada (SLC)

A busca por novos sistemas de liberação controlada de fármacos tem sido muito relevante no sentido de estabelecer alternativas terapêuticas mais eficientes que possibilitem administrar os fármacos com mais segurança e com efeitos colaterais minimizados (STULZER et al., 2008). Existem diversos sistemas de liberação de fármacos, os quais possuem diferentes expressões para defini-los: liberação retardada, repetida, controlada, sustentada, entre outras. Esse leque de denominações deve-se ao fato de surgirem classificações ligadas tanto à ação farmacológica propriamente dita como ao processo tecnológico de obtenção dos medicamentos (XIAOLING & BHASKARA, 2006). Dentre os termos citados, o mais adequado, segundo a maioria dos autores, é liberação controlada, por ser mais geral. Ele engloba todos os outros termos sem, no entanto, diferenciar exatamente o tipo de controle existente e de que maneira este é alcançado (LORDI, 2001). Em sistemas convencionais o fármaco é liberado causando uma elevação momentânea deste no organismo, caindo drasticamente após um pequeno intervalo de tempo. Além disso, são utilizadas altas concentrações, já que apenas uma parte irá alcançar o alvo desejado. Desta forma, a liberação controlada tem sido tratada como uma forma mais eficiente, segura e confiável de terapia (CAMPOS, 2009).

A liberação controlada de um fármaco é prolongada, e requer administrações menos frequentes do medicamento em relação às formas convencionais, cuja concentração apresenta um aumento na corrente sanguínea, atingindo um pico máximo e declinando posteriormente (Figura 8). Todo fármaco possui uma faixa de ação terapêutica, acima da qual se torna tóxico, e abaixo ineficaz. Sendo assim, os níveis plasmáticos são dependentes das dosagens administradas. Este fato se torna mais crítico se a dose efetiva estiver mais próxima à dosagem tóxica (LYRA, 2007).

Figura 8. Concentração do fármaco no sítio terapêutico após a sua liberação em a) controlada b) convencional.



Fonte: LYRA, 2007.

Segundo Lyra (2007), destacam-se algumas vantagens do sistema de liberação controlada (SLC) sobre os métodos convencionais, tais como:

- diminuição da toxicidade e maior tempo de permanência da droga na circulação sanguínea;
- diminuição dos efeitos colaterais devido ao maior nível de precisão e localização do fármaco no organismo;
- liberação progressiva e controlada do fármaco, a partir da degradação da matriz, aumentando assim a eficácia terapêutica;
- administração segura com ausência de reações inflamatórias locais e um menor número de doses;
- substâncias hidrofílicas e lipofílicas podem ser incorporadas.

Os SLCs classificam-se de acordo com o mecanismo que controla a liberação do agente terapêutico como é mostrado na Tabela 1. A escolha de um sistema para uma aplicação particular depende de alguns fatores, incluindo o custo, a natureza do agente ativo, o nível de carga requerida para o dispositivo, o ambiente de uso, o nível de biodegradabilidade necessária e ainda a velocidade de liberação específica requerida para uma determinada aplicação (FUNG et al., 1997).

Tabela 1. Sistemas e mecanismos que controlam a liberação de fármacos.

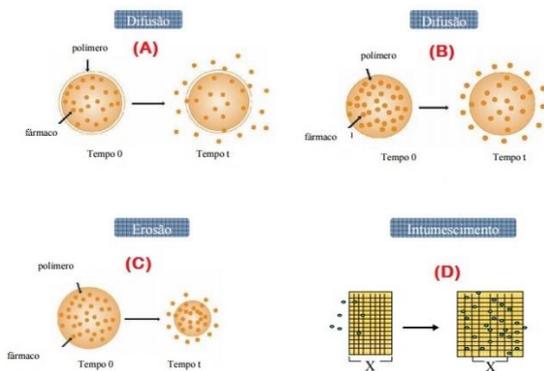
<b>Tipo de sistema</b>		<b>Mecanismo de controle da liberação</b>
<b>Controlado por difusão</b>	Sistema reservatório	Difusão através de membrana ou filme poroso
	Sistema matricial	Difusão da matriz polimérica
<b>Controlado por penetração de água</b>	Sistema osmótico	Transporte osmótico de água através de membranas semipermeáveis
	Sistemas por intumescimento	Penetração de água no polímero no estado vítreo
<b>Controlado quimicamente</b>	Sistema monolítico	Qualquer erosão do polímero puro (erosão de superfície) ou combinação de erosão e difusão.
	Sistema de cadeia pendente	Combinação de hidrólise de grupos pendentes e difusão de polímeros volumosos
	Magnético ou ultrassom	Aplicação externa de campo magnético ou dispositivo de ultrassom
<b>Sistemas regulados</b>	Químico	Uso de desorção (liberação do agente ativo) competitiva ou reações enzimáticas.

Fonte: adaptado de CERCENÁ (2008).

Pode-se destacar três principais mecanismos onde o agente ativo pode ser libertado em um sistema polimérico: difusão, erosão e intumescimento. A difusão ocorre preferencialmente entre as regiões amorfas da matriz polimérica, onde as cadeias estão mais desordenadas e o volume livre entre as cadeias é maior. A Figura 9 apresenta diferentes formas controladas de liberação de fármaco. Na Figura 9a está representado o sistema reservatório onde observa-se que a liberação se dá pela dissolução e posterior difusão do fármaco através da parede polimérica. Na Figura 9b tem-se um sistema matricial, em que a liberação é controlada por difusão e tem como vantagens a simplicidade

na produção e maior segurança em relação ao sistema reservatório. A Figura 9c mostra uma liberação controlada por erosão. Nesse caso, o polímero pode sofrer degradação como, por exemplo, quando ocorre hidrólise promovida por enzimas, permitindo a entrada do solvente e posterior liberação do fármaco. A Figura 9d ilustra a liberação controlada por intumescimento, onde o solvente (água ou fluido biológico) entra em contato com o sistema polimérico, resultando na relaxação das cadeias poliméricas com expansão do volume, permitindo a difusão do fármaco inicialmente incorporado (FUNG et al., 1997; CERCENÁ, 2008).

Figura 9. Mecanismos de liberação do fármaco: (a) difusão a partir de um sistema reservatório; (b) difusão a partir de um sistema matricial; (c) difusão controlada por erosão da matriz polimérica; (d) intumescimento da matriz polimérica.



Fonte: CERCENÁ, 2008.

## 2.5. Sistemas terapêuticos transdérmicos (STT's)

Os STT's promovem a passagem de quantidades terapêuticas de fármaco através da pele com objetivo de atingir a corrente sanguínea e exercer efeitos sistêmicos. O primeiro STT comercializado baseava-se na liberação de escopolamina em período de 72 h, com profilaxia ou tratamento de contração induzida por náuseas, com nome comercial Transderm-Scop<sup>®</sup> da Ciba (ANSEL, 2005). Outros sistemas de liberação transdérmica foram bem comercializados, tais como: Deponit<sup>®</sup>, Nitrodisc<sup>®</sup>, Nitro-Dur<sup>®</sup> e Transderm-Nitro<sup>®</sup>, utilizando a nitroglicerina como fármaco para o tratamento diário de *angina pectoris*. Ainda, é conhecido o sistema transdérmico de liberação de clonidina (Catapress-TTS), para tratamento da hipertensão (CHIEN, 1987; ANSEL et al., 2005; BARRY, 2005; HAFEEZ et al., 2013).

Dentre as vantagens dos sistemas de liberação transdérmicos, pode-se destacar as seguintes (ANSEL et al., 2005):

- evitam os problemas relacionados à absorção gastrointestinal, como pH, atividade enzimática e interação do fármaco com alimentos, bebidas ou outros fármacos administrados oralmente;
- substituem a administração oral quando essa é inadequada, como nos casos de vômitos e diarreia;
- são eficazes em menores doses diárias totais graças a contínua permeação do fármaco e por não sofrerem o efeito de primeira passagem pelo fígado;
- oferecem mínimos riscos de superdosagem ou subdosagem como resultado da liberação prolongada e pré-programada à taxa terapêutica desejada;
- o uso do medicamento pode ser interrompido de modo rápido por meio da remoção do sistema aplicado sobre a superfície da pele.

No entanto, a via transdérmica de absorção de fármacos não pode ser utilizada por muitas substâncias devido aos limites naturais a entrada do fármaco impostos pela permeabilidade seletiva da pele. Por isso é necessário que se conheça a cinética de permeação transdérmica (HAFEEZ et al., 2013).

## 2.6. Cinética de liberação de fármacos

Existem várias formas farmacêuticas de liberação controlada a partir de polímeros. Em função disso, foram desenvolvidas expressões matemáticas para descrever o perfil de liberação de um fármaco (mecanismo de liberação) em função da sua forma física (cilindro, esfera, gel, etc.) do sistema de liberação (EVANGELISTA, 1998; VEIGA, 1988; Rodrigues, 2005).

O modelo de Higuchi é um dos mais utilizados pois ele assume que o agente ativo é liberado a partir de uma matriz homogênea, tendo um coeficiente de difusão constante (HIGUCHI, 1961; ANDREANI, 2008). Higuchi (1961) propõe inúmeras expressões para descrever o fenômeno de dissolução a partir de matrizes planares heterogêneas, assumindo que estas não são revestidas e não sofrem alterações estruturais significativas na presença de água. A Equação 1 corresponde ao modelo de Higuchi mais difundido na literatura.

$$f_t = K_H t^{0,5} \quad (1)$$

onde  $f_t$  e  $K_H$  são respectivamente, a quantidade de fármaco dissolvido no tempo  $t$  e a constante de dissolução de Higuchi. A equação descreve a liberação como sendo um processo de difusão que, baseado na primeira lei de Fick, depende da raiz quadrada do tempo.

O segundo modelo utilizado foi o de primeira ordem. Neste modelo, a velocidade de dissolução das partículas sólidas em meio líquido depende da relação de quantidade de fármaco dissolvida e da quantidade restante na matriz. Assim pode ser descrita através da equação de Noyes-Whitney, mostrada na Equação (2):

$$dC/dt = K(C_s - C) \quad (2)$$

onde:

$C$  é a concentração do soluto no tempo  $t$ ;

$C_s$  é a solubilidade de equilíbrio;

$K$  é a constante de proporcionalidade de primeira ordem.

Considerando a forma farmacêutica como tendo área constante (condição *sink*), algumas alterações foram realizadas nessa equação, sendo descrita como:

$$\log Q_1 = (\log Q_0 + K_1 t)/2,303 \quad (3)$$

onde:

$Q_1$  é a quantidade de fármaco liberado no tempo  $t$ ;

$Q_0$  é a quantidade inicial de fármaco em solução;

$K_1$  constante de primeira ordem.

Assim, pode-se obter um gráfico linear do logaritmo decimal de quantidade de fármaco liberado em função do tempo, tendo como coeficiente angular  $K_1/2,303$  e coeficiente linear  $\log Q_0$  (ORTEGA; AGNES, 2003). Algumas formas farmacêuticas que seguem este perfil são matrizes porosas que contêm fármaco hidrofílico.

O terceiro modelo abordado neste trabalho é o de ordem zero. Neste, a dissolução de fármacos a partir de formas farmacêuticas que não sofrem desintegração ocorre de forma lenta e aplica-se a liberação controlada. Assim sendo, é possível representar graficamente a fração de fármaco que é dissolvida em função do tempo. Sempre que o resultado for linear, trata-se de uma cinética de ordem zero. Formas farmacêuticas que seguem este tipo de perfil liberam a mesma quantidade de fármaco por unidade de tempo, ficando independente da quantidade restante na formulação. Este representa o modelo ideal com destino a uma ação farmacológica prolongada. Essas podem ser expressas conforme a Equação (4):

$$Q_1 = Q_0 - K_0 t \quad (4)$$

onde:

$Q_1$  é a quantidade de fármaco dissolvida no tempo  $t$ ;

$Q_0$  é quantidade inicial de fármaco em solução;

$K_0$  é a constante de liberação de ordem zero.

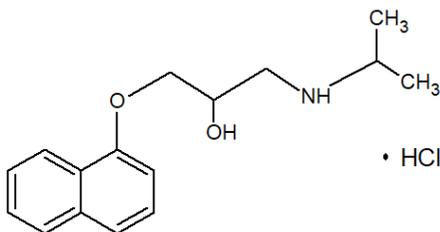
A forma gráfica da equação acima resulta em uma reta onde o coeficiente angular corresponde a  $K_0$ . Encontra-se esta relação em diversas formas farmacêuticas, tendo como exemplo, as matrizes transdérmicas de liberação prolongada (VARELAS, 1995; ORTEGA; AGNES, 2003).

## 2.7. Cloridrato de propranolol

As características físico-químicas de um fármaco são importantes, pois estas exercem influência sobre seus efeitos farmacológicos e parâmetros farmacocinéticos. Isto tendo em vista que é possível prever a velocidade de absorção e eliminação, o tempo para atingir a concentração plasmática máxima, a biodisponibilidade e o tempo de permanência no organismo, dentre outros fatores, por meio da comparação de características físico-químicas entre fármacos novos e fármacos análogos que apresentam dados farmacocinéticos e farmacológicos conhecidos (LITVIN et al., 2004).

Quimicamente o cloridrato de propranolol é um betabloqueador, cuja fórmula é  $C_{16}H_{21}NO_2 \cdot HCl$ , denominada (1-isopropilamino-3-(1-naftiloxi)-2-propanol). Sua estrutura química está representada na Figura 10. O fármaco, na forma de matéria-prima, é encontrado como um pó branco ou quase branco, cristalino, inodoro, com sabor amargo, não higroscópico, estável ao calor e instável à luz (Farmacopeia Brasileira, 2010). Apresenta massa molar de  $295,80 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ , pKa igual a 9,60, possui comportamento característico de uma base fraca, sendo solúvel em água e etanol, pouco solúvel em clorofórmio e insolúvel em éter etílico. A faixa de fusão descrita está entre  $163 - 166 \text{ }^\circ\text{C}$  (PROIKAKIS; TARANTILI; ANDREOPOULOS, 2006). Além disso, é um fármaco pertencente ao Grupo I do Sistema de Classificação Biofarmacêutica, tendo alta solubilidade e alta permeabilidade.

Figura 10. Estrutura química do cloridrato de propranolol



Fonte: Autor (2018).

O cloridrato de propranolol é altamente lipofílico e sofre absorção quase completa após administração oral. Contudo, a maior parte do fármaco administrado é metabolizada pelo fígado durante sua

primeira passagem pela circulação. Com isso, apenas cerca de 25% do fármaco atinge a circulação sistêmica (HOFFMAN; LEFKOWITZ, 1996).

Tem grande volume de distribuição ( $4 \text{ litros} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) e penetra facilmente no sistema nervoso central (SNC). Seus mecanismos de ação não estão bem esclarecidos, envolvendo diminuição do débito cardíaco (ação inicial), bloqueio do estímulo da secreção de renina do aparelho justaglomerular, readaptação dos barorreceptores e diminuição das catecolaminas nas sinapses nervosas. Sua meia vida é de 3 a 5 h e o tempo até que seu efeito máximo seja atingido é de 1 h. Cerca de 90% do cloridrato de propranolol está ligado às proteínas plasmáticas. É extensamente metabolizado, e grande parte dos metabólitos aparece na urina. O 4-hidroxiopropranolol possui atividade antagonista  $\beta$ -adrenérgica, é um produto do metabolismo hepático (HOFFMAN; LEFKOWITZ, 1996).

Entre as principais desvantagens na utilização do propranolol por via oral nas formas farmacêuticas convencionais são os efeitos adversos, resultantes da ação dos  $\beta$ -bloqueadores que podem causar bradicardia, depressão cardíaca, broncoconstrição, hipoglicemia (originada pela liberação de glicose em resposta à adrenalina), fadiga (resultante da redução do débito cardíaco) e extremidades frias provenientes da perda da vasodilatação mediada pelos receptores beta (Rang et al., 2007).

Portanto, uma maneira de minimizar esses efeitos indesejados seria a liberação do fármaco de forma controlada, pois o mesmo permaneceria por um maior tempo na faixa terapêutica, evitando a concentração sub-terapêutica e a superdosagem (Alves, 2011).



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL

Para realização deste trabalho, utilizou-se como matéria prima:

- gelatina do tipo A, extraída de pele de porco com Bloom 280, fornecida pela fábrica Gelnex (Ita-Santa Catarina – Brasil);
- ácido acético glacial ( $C_2H_4O_2$ , 99,5% - P.A., Lafan);
- cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida – EDC – Sigma Aldrich;
- n-hidroxisuccinimida – NHS – Sigma Aldrich;
- ninidrina ( $C_9H_6O_4$ , 99% - Vetec);
- etanol ( $C_2H_6O$ , 99,5% - P.A., Synth);
- fármaco cloridrato de propranolol ( $C_{16}H_{21}NO_2 \cdot HCL$ ) NR 184011 – Vita Essência;
- água destilada como solvente;

#### 3.2 MÉTODOS

##### 3.2.1 Preparo das soluções

###### 3.2.1.1. Solução de gelatina

A solução de gelatina foi preparada com uma concentração de 18% (m/v) tendo ácido acético 89,6% (v/v) como solvente. Para tanto pesou-se 0,5400 g de gelatina em balança analítica, Shimadzu AUY220, e adicionada em 3,0 mL de solvente (2,7 mL de HAc e 0,3 mL de água destilada). A mistura foi agitada suavemente em agitador magnético (MS equipamentos, TLK 48) a 40 °C por 30 min e depois procedeu-se à agitação à temperatura ambiente por 60 min para completa solubilização (NIEHUES, 2015). Na Figura 11 tem-se uma imagem da solução de GEL280 a 18% (m/v) em ácido acético 89,6% (v/v).

Figura 11. Solução de gelatina a 18% (m/v) em ácido acético 89,6% (v/v).



Fonte: Autor (2018).

### 3.2.1.2. Solução de gelatina com fármaco

A solução de gelatina com fármaco foi preparada com uma concentração de 18% (m/v) tendo ácido acético 89,6% (v/v) como solvente. Para tanto pesou-se 0,5400 g de gelatina em balança analítica, Shimadzu AUY220, e adicionada em 3,0 mL de solvente (2,7 mL de HAC e 0,3 mL de água destilada). A mistura foi agitada suavemente em agitador magnético (MS equipamentos, TLK 48) a 40 °C por 30 min e depois acrescentou-se 10 mg do fármaco cloridrato de propranolol e procedeu-se à agitação à temperatura ambiente por 60 min para completa solubilização.

### 3.2.2. Viscosidade

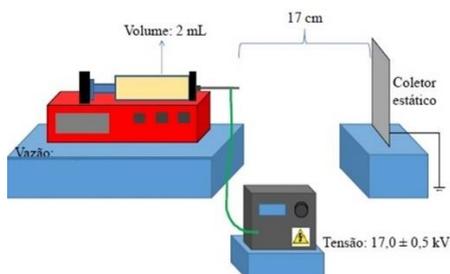
Os testes de viscosidade foram realizados em um viscosímetro rotacional com configuração de cilindros concêntricos (Thermo Haake DC 10, (modelo VT 550) com aumento da taxa de cisalhamento de 1 a 600 s<sup>-1</sup>. As medidas foram realizadas em duplicata e à temperatura de 25,0 ± 0,1 °C.

As análises foram realizadas no laboratório CERMAT do Departamento de Engenharia Mecânica da UFSC.

### 3.2.3. Eletrofição

A metodologia utilizada foi adaptada a partir da otimização realizada por (NIEHUES, 2015). As soluções preparadas foram transferidas para uma seringa de vidro com capacidade para 3 mL equipada com uma agulha de diâmetro interno de 0,723 mm. O volume eletrofiado foi de 2 mL com vazão de 0,5 mL/h, controlado por uma bomba de infusão (New Era Pump Systems NE-300), a uma temperatura de  $24,0 \pm 0,5$  °C e umidade relativa de  $55,0 \pm 2,0\%$ . O potencial elétrico aplicado foi de  $17,0 \pm 0,5$  kV e a distância entre a ponta da agulha e o coletor aterrado (folha de alumínio,  $6,0 \times 6,0$  cm<sup>2</sup>) foi de 17 cm. A Figura 12 apresenta o esquema do sistema de eletrofição, com as condições aplicadas no experimento. As membranas obtidas foram armazenadas em dessecador para testes posteriores.

Figura 12. Sistema de eletrofição com as condições utilizadas no experimento.



Fonte: Niehues (2015).

### 3.2.4. Reticulação por EDC

A reticulação foi realizada a partir da adaptação dos métodos utilizados por Lai e Li (2011) e Chou e colaboradores (2017). As membranas de gelatina foram reticuladas por imersão em uma mistura de solventes binários (etanol/água), com teor de etanol de 90%, variando a concentração de EDC (0,1 mmol, 0,5 mmol e 1 mmol). O composto N-hidroxissuccinimida (NHS) foi adicionado na razão molar (5:1) relativamente aos mols de EDC. As amostras foram deixadas a reticular por 24 h à temperatura de 25 °C. Em seguida as amostras foram

cuidadosamente lavadas com água Milli-Q para a retirada do subproduto formado pelo EDC e ureia, e a seguir foram secas em estufa a vácuo à temperatura ambiente por 24h.

### 3.2.5. Grau de Reticulação

O grau de reticulação foi determinado por ensaios com ninidrina (2-dihidroxi-1,3-indanodiona) (DASH; FOSTON; RAGAUSKAS, 2013). Em um tubo Eppendorf foram adicionados 5 mg de membranas de gelatina eletrofiadas e 1,0 mL de solução de ninidrina 1,5 % (m/v) em etanol, seguido de aquecimento da mistura por 25 min a 80 °C. Após resfriar à temperatura ambiente, realizou-se diluição da amostra com água na proporção 1:9 e a absorbância óptica (A) foi medida usando espectrofotômetro UV/VIS (Bel Spectro S05), a 570 nm, contra uma solução em branco, sem membrana, que passou pelo mesmo procedimento das membranas reticuladas. O grau de reticulação (GR) foi calculado pela Equação (5):

$$GR(\%) = \left\{ 1 - \left( \frac{A_{\text{membrana reticulada}}}{A_{\text{membrana não reticulada}}} \right) \times 100 \right\} \quad (5)$$

### 3.2.6. Solubilidade em água

O teste de solubilidade (S) em água foi realizado a partir da adaptação da metodologia utilizada por Martucci, Accareddu e Ruseckaite (2012) com modificações quanto ao período em que as membranas MF permaneceram submersas e à temperatura da água. A membrana de gelatina pura (2,0 × 2,0 cm<sup>2</sup>), além daquelas reticuladas por EDC em concentrações diferentes, foram secas em estufa a 105 °C por 24 h. Em seguida, as amostras foram pesadas para determinação da massa inicial (m<sub>i</sub>) e submersas em 30 mL de água destilada (pH ~ 6,4) sob agitação suave. A amostra de gelatina pura permaneceu submersa por 24 h à temperatura de 25 °C, enquanto as reticuladas permaneceram por 96 h na temperatura de 37 °C. Após este período, as amostras foram secas novamente a 105 °C e pesadas para determinação da massa final (m<sub>f</sub>). Os experimentos foram realizados em duplicata e a solubilidade foi calculada pela Equação (6):

$$S = \left\{ 1 - \left( \frac{m_f}{m_i} \right) \times 100 \right\} \quad (6)$$

### 3.2.7. Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica das membranas foi realizada utilizando o equipamento DTG-60 (Shimadzu). As amostras foram condicionadas em dessecador a 45% de umidade relativa, a qual foi mantida com sílica gel durante 7 dias antes dos testes. Em seguida, foram aquecidas sob atmosfera de gás nitrogênio em cadinho de platina de 30 a 700 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min.

### 3.2.8. Análise de calorimetria diferencial de varredura

A propriedade térmica da membrana de gelatina foi estudada usando um calorímetro diferencial de varredura DSC, modelo Jade-DSC (Perkin Elmer). A partir da adaptação da metodologia utilizada por Ma e colaboradores (2010), foram pesados 5 mg da amostra e selados em cadinho de alumínio. As condições experimentais estabelecidas foram: temperatura inicial de 20 °C a 110 °C, sob taxa de aquecimento de 5 °C.min<sup>-1</sup>, tendo como referência um cadinho de alumínio vazio.

### 3.2.9. Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

O espectro do cloridrato de propranolol foi obtido com o equipamento IRPrestige-21 da Shimadzu. Os ensaios de FTIR foram realizados com número de onda de 4000 a 750 cm<sup>-1</sup> com resolução de 4 cm<sup>-1</sup> e pela acumulação de 32 escaneamentos. As amostras em pó foram preparadas na forma de pastilhas de brometo de potássio (KBr) na proporção 1:100. As medidas de ATR (Refletância Total Atenuada) foram feitas em um espectrofotômetro FTIR, Agilent modelo Cary 600. Cada espectro foi adquirido em célula de cristal Zn/Se por acúmulo de 30 varreduras com resolução de 4 cm<sup>-1</sup> e intervalo de número de onda de 4000 a 650 cm<sup>-1</sup>.

### 3.2.10. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O equipamento utilizado foi o microscópio eletrônico de varredura Sem-Hitachi TM3030. As amostras foram previamente

preparadas através de recobrimento com ouro, e então suas superfícies analisadas a 10 kV.

### 3.2.11. Propriedades Mecânicas

As amostras submetidas ao ensaio de tração foram preparadas de acordo com a metodologia adotada por Niehues (2015). Os testes foram realizados em triplicata, nos quais foram avaliadas as seguintes propriedades: tensão máxima ( $\sigma$ ), alongamento máximo de ruptura ( $\epsilon$ ) e módulo de Young ( $E_0$ ).

Os testes de tração foram realizados utilizando um texturômetro (TA. HD. Plus, Stable Micro Systems) com célula de carga de 500 N, velocidade de deslocamento de  $10 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$ , distância inicial entre as garras de 30 mm e temperatura de 23 °C. As espessuras, foram determinadas com um micrômetro digital (Digimess, IP54) com base em 10 medidas randômicas para cada membrana.

### 3.2.12. Mecanismo de liberação do fármaco

A cinética de liberação do cloridrato de propranolol das membranas confeccionadas foi estudada “*in vitro*”. Nesta etapa, as membranas foram cortadas em tamanhos ( $5,0 \times 5,0 \text{ cm}^2$ ) e cada parte foi colocada em um recipiente contendo 30 mL de solução tampão fosfato de sódio pH 7,4 e mantida em estufa à 37 °C de modo a simular as condições corporais. Foram retiradas alíquotas de 3 mL do meio e substituídos por 3 mL de tampão fresco em intervalos de tempos pré-determinados. A quantidade de cloridrato de propranolol presente no meio foi analisada usando espectrofotômetro UV (modelo Q898U2M5 - QUIMIS) operando à 290 nm. A porcentagem de fármaco liberado em função do tempo foi calculada usando a seguinte equação (7):

$$\text{Liberação (\%)} = \left( \frac{C_t}{C_{Total}} \right) \times 100 \quad (7)$$

### 3.2.13. Cinética de liberação do fármaco

Os resultados obtidos a partir dos históricos de liberação do cloridrato de propranolol dos filmes de gelatina reticulado foram submetidos a testes de modelo cinético com o objetivo de identificar o

mecanismo de liberação e a cinética correspondente. Os modelos testados foram (Tabela 2): de primeira ordem, ordem zero e de Higuchi. A velocidade de dissolução ( $k$ ), obtida pelo valor do coeficiente angular, foi determinada matematicamente a partir da equação da reta de regressão que melhor definiu os perfis de liberação.

Tabela 2. Modelos cinéticos usados no estudo do perfil de liberação do filme de gelatina reticulado.

Modelo	Equação	Natureza do mecanismo
Primeira ordem	$\log Q_1 = (\log Q_0 + K_1 t)/2,303$ $K_1$ : constante de ordem 1	Liberação dependente da concentração do ativo dissolvido
Ordem Zero	$Q_1 = Q_0 - K_0 t$ $K_0$ : constante de ordem 0	Liberação independente da concentração do ativo dissolvido
Higuchi	$f_t = K_H t^{0,5}$ $K_h$ : constante de Higuchi	Liberação controlada por difusão

Fonte: adaptado de RODRIGUES (2005).

### 3.2.14. Análise estatística

As análises estatísticas dos resultados foram realizadas utilizando o software Statistica 10, e aplicando o teste de Tukey com nível de significância  $\alpha = 0,05$ .

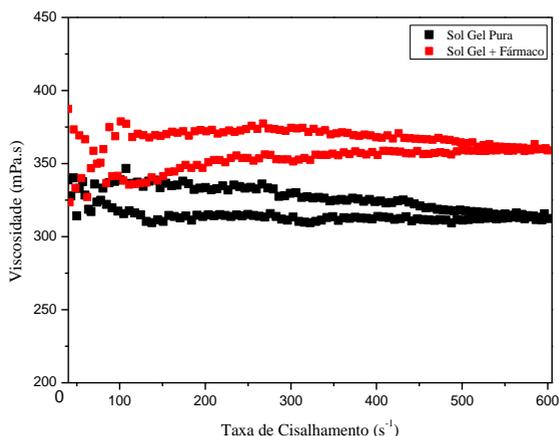


## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 – Viscosidade

A viscosidade de uma solução polimérica é um parâmetro muito importante a ser considerado no processo de eletrofiação, pois este parâmetro pode apontar informações sobre a habilidade de eletrofiação (RAMAKRISHNA et al., 2005; RATANAVARAPORN et al., 2010). A medida de viscosidade obtida para gelatina pura foi de  $321,5 \pm 12,7$  mPa.s similares a valores relatados na literatura (NIEHUES, 2015), cujos valores observados foram de  $324 \pm 13$  mPa.s. Isto foi possível devido ao uso, neste trabalho, de condições semelhantes às da literatura, obtendo assim excelente capacidade de eletrofiação. Observou-se, porém, um aumento da viscosidade com a adição do cloridrato de propranolol à solução de gelatina, resultando em uma medida de viscosidade de  $354,0 \pm 16,7$  mPa.s. Entretanto, ao permanecer utilizando os mesmos parâmetros verificou-se que a habilidade de eletrofiação, não foi alterada (Figura 13).

Figura 13. Curva de viscosidade para solução de gelatina pura e gelatina com propranolol.

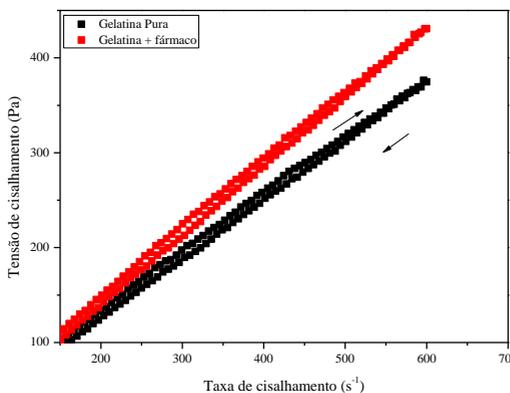


Fonte: Autor (2018).

Analisando-se a Figura 13 observa-se que a solução de gelatina pura e a que contém o fármaco na curva crescente apresentam comportamento pseudoplástico, que é evidenciado pelo decréscimo na viscosidade aparente com o aumento da taxa de cisalhamento. Esse

efeito pode ser explicado através das forças de van der Waals, por meio das quais os pequenos aglomerados originados são desfeitos pela tensão de cisalhamento aplicada. Assim valores altos de cisalhamento, levam as partículas a se orientarem numa mesma direção, o que contribui para o decréscimo da viscosidade (HAINES, 1995). Porém, para a curva decrescente, é observado outro tipo de comportamento. Tanto para solução de gelatina pura quanto a que contém o fármaco. Esta apresentou comportamento dilatante, caracterizado pelo aumento da viscosidade aparente com o aumento da taxa de cisalhamento.

Figura 14. Curva de fluxo das soluções de gelatina pura e gelatina com propranolol.



Fonte: Autor (2018).

Como visto, as duas soluções possuem dois momentos distintos. Porém através da Figura 14 verifica-se que as soluções apresentam comportamento tixotrópico, o que é esperado para fluidos com consistência de gel, onde a viscosidade aparente diminui em função do tempo durante a taxa de cisalhamento. O modelo de Ostwald-de-Waele ou Lei da Potência Equação (8) foi o melhor adaptado para os resultados encontrados.

$$\tau = k (\dot{\gamma})^n \quad (8)$$

Os parâmetros de ajuste, índice de consistência (k) e índice de comportamento do fluido (n), são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros reológicos das soluções de gelatina e gelatina com propranolol.

Amostra	Taxa de cisalhamento ida			Taxa de cisalhamento volta		
	$\eta$	K (Pa·s <sup>n</sup> )	R <sup>2</sup>	$\eta$	K (Pa·s <sup>n</sup> )	R <sup>2</sup>
GeP	0,94	0,45	0,99	1,01	0,32	0,99
GeF	0,97	0,44	0,99	1,03	0,3	0,99

GeP Gelatina Pura; GeF Gelatina com Fármaco

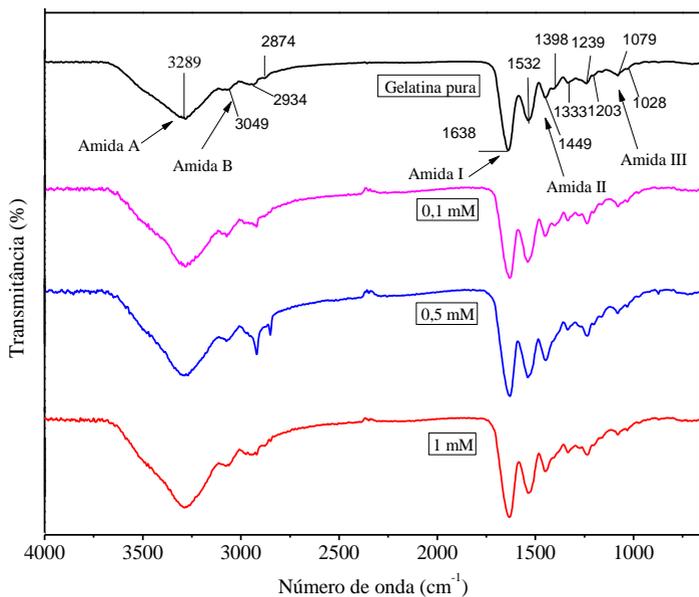
Fonte: Autor (2018).

O índice de consistência (k) indica o nível de resistência do fluido ao fluir, e quanto maior for diferença entre seus valores na taxa de cisalhamento entre a ida e a volta, maior é a histerese.

#### 4.2. FTIR – ATR

A Figura 15 mostra o espectro obtido para a gelatina pura, onde são observados os picos característicos desse material, que também foram pronunciados nas demais amostras analisadas.

Figura 15. Espectros de FTIR-ATR das membranas de gelatina pura e membranas reticuladas com EDC/NHS em diferentes concentrações (0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM).



Fonte: Autor (2018).

A Tabela mostra as principais deformações correspondentes a cada ligação e os principais picos de amida evidenciados na Figura 15.

Tabela 4. Grupos funcionais referentes a estrutura de gelatina.

Região	Grupo Funcional	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )
Amida A	NH	3300
	OH	
Amida B	NH	3078
	CH <sub>2</sub>	2944
Amida I	C=O	1633
	NH	
	NH	
Amida II	C-N	1532
	C-C	
	CH <sub>2</sub>	1448
	COO	1334
	CN	1410
Amida III	NH	1240
	CO	1080
		1030

Fonte: Hoque et al. (2011) e Staroszczyk et al. (2012).

Observa-se pelos espectros que as amostras analisadas revelam bandas de absorção características de gelatina, e essas diferenças na intensidade de cada pico são conhecidas por estarem associadas às variações na sua estrutura química.

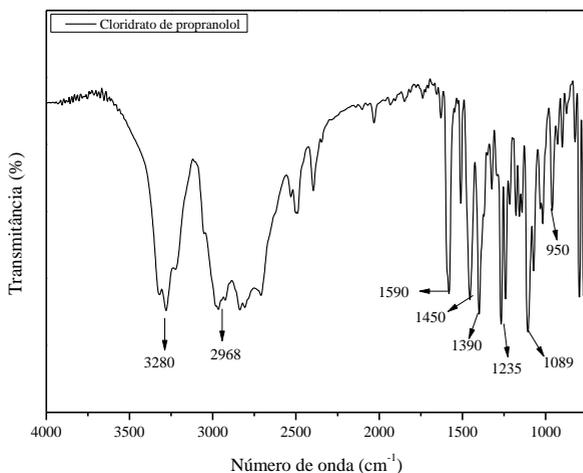
Os principais picos de absorção estão situados nas regiões das bandas de amidas: amida A em 3290 ~3306 cm<sup>-1</sup>, devido a vibrações de alongamento O-H assimétricas e simétricas de moléculas de água e vibrações de estiramento N-H de amidas, amida B em 3062 ~3065 cm<sup>-1</sup>, estiramento assimétrico de CH<sub>2</sub> em aproximadamente 2935 cm<sup>-1</sup>, estiramento simétrico 2874 cm<sup>-1</sup>, amida I em 1660 cm<sup>-1</sup>, deformação angular assimétrica da ligação N-H, amida II em 1535 cm<sup>-1</sup>, à deformação angular simétrica da ligação N-H e amida III em 1240 cm<sup>-1</sup>,

estiramento assimétrico da ligação C=O (DHANDAYUTHAPANI; KRISHNAN; SETHURAMAN, 2010; LA&Li 2011; ZHA et al., 2012).

As amostras de gelatina reticuladas onde variou-se a concentração de EDC/NHS apresentaram um aumento na intensidade de amida III (alongamento N-H), sugerindo a formação de novas ligações cruzadas dentro da tripla hélice de gelatina. Neste estudo, os espectros observados antes e depois da reticulação de carbodiimida foram típicos dos observados para proteínas, porque a gelatina é essencialmente colágeno desnaturado (MUYONGA et al., 2004). Ainda pode se destacar um padrão similar nos espectros observados, o que indica que não houve mudanças importantes nos grupos funcionais de biomateriais devido à interação entre gelatina e EDC.

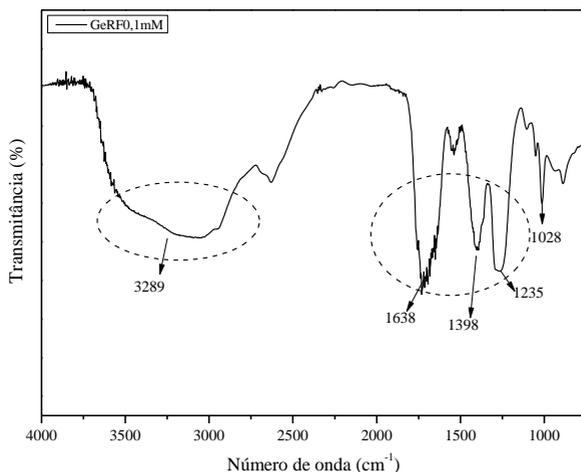
Na Figura 16 e 17 mostra-se um comparativo do espectro de FTIR do fármaco cloridrato de propranolol (referência) e o outro onde é observada a interação do fármaco na membrana de gelatina reticulada.

Figura 16. Espectro de infravermelho do cloridrato de propranolol.



Fonte: Autor (2018).

Figura 17. Espectro de infravermelho do filme de gelatina reticulado com propranolol incorporado.



Fonte: Autor (2018).

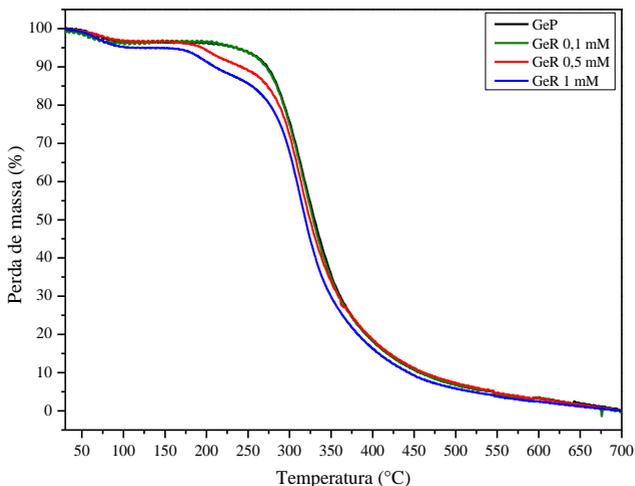
A Figura 16 apresenta um espectro característico de infravermelho para o cloridrato de propranolol. Podem ser observadas algumas informações da estrutura do propranolol. Por exemplo, acima de  $3000\text{ cm}^{-1}$  tem-se o estiramento O-H e N-H. Entre  $3000$  a  $3100\text{ cm}^{-1}$  observa-se o estiramento C-H dos aromáticos e próximo de  $1500\text{ cm}^{-1}$  tem-se informações sobre a ligação C-H (SILVERSTEIN et al., 2000).

O cloridrato de propranolol apresenta alguns grupos funcionais presentes em sua estrutura como amida secundária, éter, álcool secundário, naftaleno, entre outros. Na Figura 17 destacam-se alguns picos que apresentaram maiores intensidades, demonstrando a interação do polímero com o fármaco. Em  $3289\text{ cm}^{-1}$  ocorre a vibração de estiramento O-H e em  $2968\text{ cm}^{-1}$  tem-se o estiramento dos aromáticos. A vibração que ocorre em  $1638\text{ cm}^{-1}$  é atribuída à deformação angular simétrica no plano N-H. Em  $1398\text{ cm}^{-1}$  ocorre deformação angular de C-H e as aminas alifáticas secundárias apresentam bandas de absorção da ligação C-N não conjugada em  $1235\text{ cm}^{-1}$  e  $1028\text{ cm}^{-1}$ .

### 4.3. Propriedades térmicas

As curvas de TGA da membrana de gelatina pura e daquelas onde houve variação na concentração de EDC/NHS são mostradas na Figura 18. Pode-se observar as etapas de degradação características das membranas estudadas, o que confere também uma ideia da estabilidade térmica do material.

Figura 18. Análise termogravimétrica das membranas de gelatina pura e obtidas na reticulação variando-se a concentração de EDC/NHS.



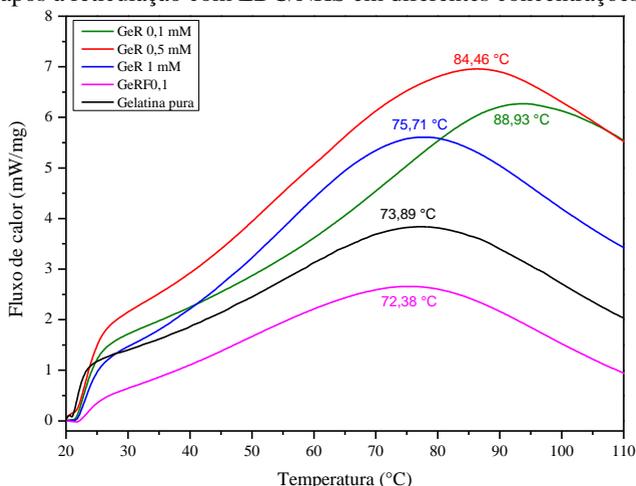
Fonte: Autor (2018).

Analisando-se as curvas apresentadas na Figura 16, observa-se uma pequena perda de massa (cerca de 4%) no intervalo de temperatura entre 50 a 110 °C. Esta etapa está relacionada com a perda de água livre adsorvida em filmes, também chamada “umidade residual” (NAGARAJAN et al., 2013). Para a gelatina pura observa-se um segundo estágio de perda de massa que inicia em 220 °C, o qual muda de comportamento em 370 °C, a partir do qual a degradação se torna mais lenta. Segundo Barreto et al. (2003), o segundo estágio de perda de massa caracteriza-se pela degradação da proteína, onde ocorre uma redução aproximada de 45%. Para as membranas com diferentes concentrações de reticulantes (EDC/NHS) observou-se que a membrana reticulada na concentração de 0,1 mM apresentou características

similares ao do filme de gelatina pura. Com o aumento na concentração de reticulantes, observa-se uma redução da temperatura de degradação, sendo que para a membrana com concentração de 0,5 mM são encontrados valores em torno de 182 °C, e de 170 °C para a membrana com concentração de 1 mM, caracterizando uma diminuição na estabilidade térmica ao aumentar as concentrações de reticulantes.

A Figura 19 mostra os resultados realizados pela análise de DSC, onde é possível notar algumas alterações ocorridas em virtude da reticulação.

Figura 19. Análise de DSC das membranas de gelatina pura e àquelas obtidas após a reticulação com EDC/NHS em diferentes concentrações.



Fonte: Autor (2018).

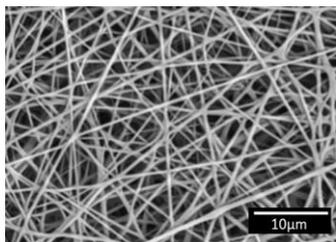
Segundo Sobral e Habitante (2001), as análises de DSC para filmes de gelatina apresentam um comportamento clássico: uma transição vítrea seguida de uma transição da tripla hélice semelhantes às do colágeno, ou seja, fusão. Porém, essas transições sofrem forte influência de outras substâncias adicionadas que, quando em maiores quantidades, podem fazer com que a fusão ocorra em várias etapas; além disso pode ocorrer a fusão de parte das triplas hélices sobrepondo-se à transição vítrea. Isso acontece em membranas de gelatina com atividade de água ( $A_w$ ) superior a cerca de 0,300, faixa em que se encontram as gelatinas estudadas.

Observa-se que as membranas reticuladas apresentam picos endotérmicos com temperaturas maiores que as obtidas pela membrana de gelatina pura. As amostras com diferentes concentrações do reticulante apresentaram um aumento em suas temperaturas de transição, com destaque para a membrana reticulada na concentração de 0,1 mM, que mostrou um ganho aproximado de 15 °C na temperatura de transição vítrea, inferindo um aumento da estabilidade térmica. Valores semelhantes foram obtidos por Chou e colaboradores (2017). Lai (2014) constatou um aumento na densidade de matérias de colágeno tratadas com diferentes concentrações de glutaraldeído. Esse fato pode estar diretamente relacionado com a estabilização da tripla hélice das moléculas de gelatina que foram melhoradas pela formação de ligações amida. Com adição do propranolol observou-se uma leve queda, aproximadamente 1,5% na temperatura de transição, o que sugere que o fármaco esteja disperso na matriz, não interferindo em sua estabilidade térmica.

#### 4.4. Morfologia

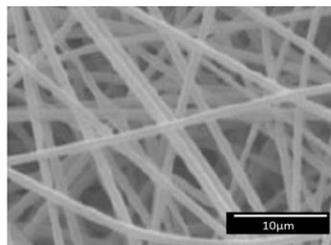
A morfologia de nanofibras está tipicamente relacionada às propriedades reológicas das soluções de polímeros e condições de processamento durante a eletrofiação. Parâmetros como tensão aplicada, vazão, distância do coletor, temperatura e umidade podem ser otimizados para que se tenha uma elaboração de fibras homogêneas com diâmetro menores (OKUTAN et al., 2014). Nesse trabalho foi utilizada a otimização realizada por Niehues (2015) conforme o item 3.2.1 do presente estudo. Por meio das imagens obtidas por microscópio eletrônico de varredura (Figura 20) observa-se as nanofibras obtidas neste trabalho e a obtida por Niehues (2015) para condições semelhantes, reduzindo apenas a vazão em 17%.

Figura 20. Microscopia eletrônica de varredura obtidas a partir da solução de gelatina bloom 280, com concentração de 18% em ácido acético 89,6 % (v/v).



Fonte: Autor (2018)

GeB 280 18% ( $109 \pm 40$  nm)



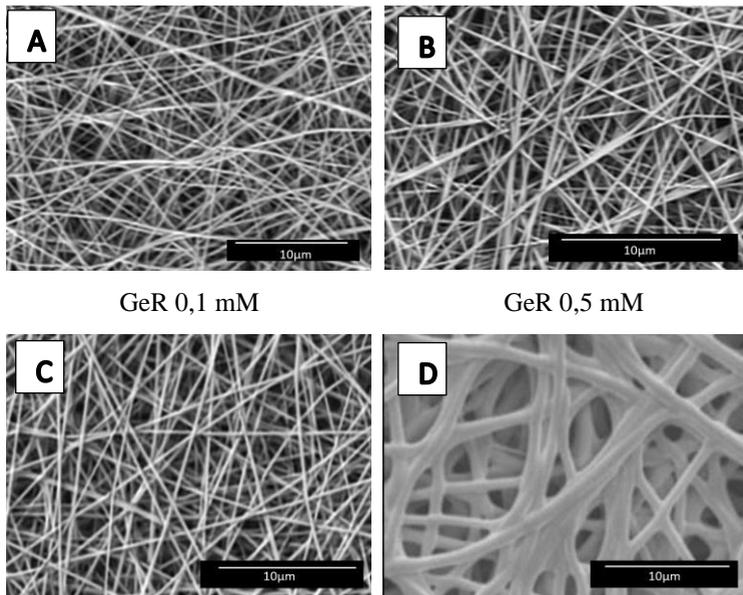
Fonte: NIEHUES (2015)

GeB 280 18% ( $351,9 \pm 41,2$  nm)

É possível observar, através da morfologia, as fibras obtidas nesse trabalho assemelham-se a fibras finas e homogêneas com ausência de gotas e grânulos. Porém, verifica-se uma diferença no diâmetro das fibras. O diâmetro médio obtido neste trabalho foi de  $109 \pm 40$  nm, resultado bem abaixo do alcançado por Niehues, (2015). Este autor usou gelatina com mesmo bloom com vazão maior que a deste trabalho, obtendo um diâmetro médio de  $351,9 \pm 41,2$  nm. No presente estudo, o diâmetro médio encontrado é semelhante ao de Chou e colaboradores (2017), que alcançaram valor de  $119 \pm 48$  nm para nanofibras de gelatina pura.

Na Figura 21 observa-se um comparativo entre as nanofibras imersas em soluções binárias 90% (etanol/água) onde variou-se as concentrações de EDC/NHS. São mostradas aquelas obtidas neste trabalho e as encontradas por Niehues (2015) ao utilizar o glutaraldeído como reticulante.

Figura 21. Imagens da microscopia eletrônica de varredura das membranas de gelatina eletrofiadas: (A) reticulada com 0,1 mM de EDC/NHS, GeR 0,1, (B) reticulada com 0,5 mM de EDC/NHS, GeR 0,5, (C) reticulada com 1 mM de EDC/NHS, GeR 1,0, (D) reticulada em 2,5% (v/v) de GTA, GeR 2,5 GTA.



GeR 0,1 mM

GeR 0,5 mM

GeR 1 mM

GeR 2,5% GTA

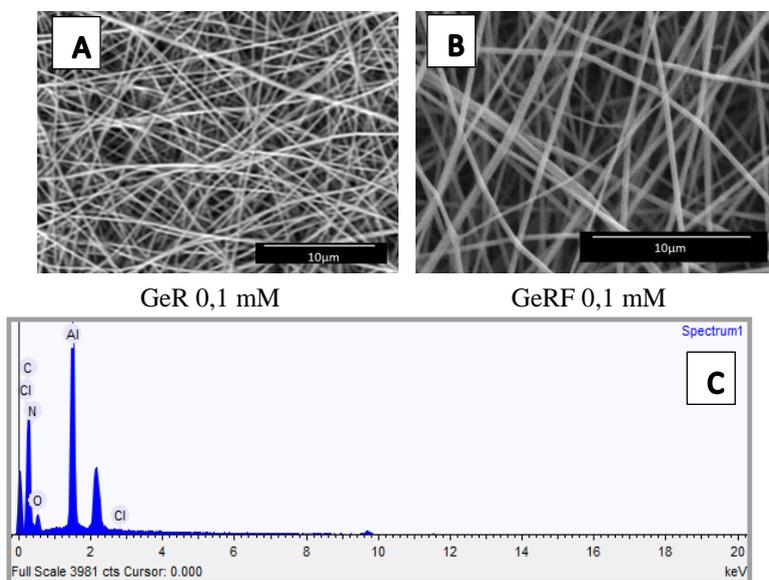
Fonte: Autor (2018)

Fonte: NIEHUES (2015)

A microestrutura das nanofibras reticuladas é semelhante à fibra sem reticulação. Porém, a partir das medidas realizadas pelo software ImageJ, observou-se um leve inchaço nas fibras desse polímero uma vez que o diâmetro médio dessas membranas foi de  $172 \pm 30$  nm para a fibras reticuladas com concentração 0,1 mM,  $200 \pm 40$  nm e  $218 \pm 40$  nm para as membranas com concentrações (0,5 e 1 mM), respectivamente. Isso ocorre devido ao fato da mistura binária conter uma pequena quantidade de água. Liu e colaboradores (2012) utilizaram EDC/NHS em seus estudos para reticular nanofibras de fibroína de seda, juntamente com uma mistura binária na proporção (95:5 v/v). Os resultados obtidos demonstraram um aumento no diâmetro de 611 nm para 841 nm devido ao inchaço das nanofibras. O mesmo foi observado por Nieheus (2015) que, ao reticular membranas de gelatina com glutaraldeído obteve um aumento no diâmetro das fibras. É de interesse

ressaltar que na reticulação com glutaraldeído, além do aumento no diâmetro, foi observado uma deformação nas fibras. Assim, os valores encontrados nesse trabalho estão semelhantes aos presentes na literatura, em que as nanofibras de gelatina eletrofiadas são suscetíveis ao inchaço no processo de reticulação com solvente devido a presença de água e, por consequência levando a aumentar o diâmetro médio das fibras. Na Figura 22 tem-se a micrografia da membrana reticulada com a incorporação do fármaco propranolol e a análise de EDS realizada para demonstrar a presença de elementos contidos na estrutura do fármaco.

Figura 22. Microscopia eletrônica de varredura do filme de Gelatina Reticulada, GeR0,1 (A), Gelatina Reticulada e com Fármaco, GeRF0,1 (B) e análise de EDS (C).



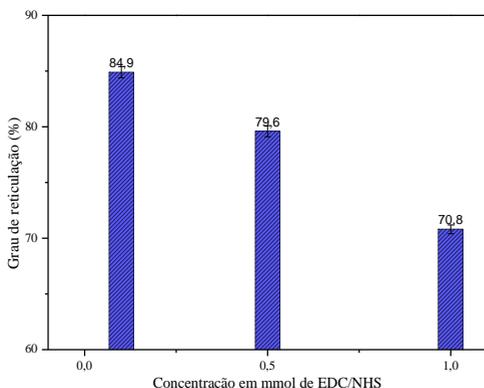
Fonte: Autor (2018)

Na Figura 22B é observado a formação de nanofibras lisas e homogêneas. A incorporação do fármaco não afetou a excelente habilidade de eletrofição, resultando em fibras com diâmetro de  $276 \pm 78$  nm, bem similares às obtidas na Figura 22A. A Figura 22C mostra uma análise elementar do filme de gelatina, onde pode-se destacar a presença de cloro (Cl) em pequenas quantidades, o que sugere a incorporação do propranolol no filme de gelatina.

#### 4.5. Grau de Reticulação

O efeito de reticulação foi quantificado pelo grau de reticulação através de ensaios com ninidrina. A partir da Equação (5) foram obtidos os resultados para o grau de reticulação. A Figura 23 mostra o índice de reticulação das membranas de gelatinas reticuladas com diferentes concentrações de EDC/NHS. Como observado, houve uma redução de  $84,9 \pm 0,5\%$  para  $70,8 \pm 0,4\%$ , ao variar a concentração de reticulante 0,1 a 1 mm, dados esses em acordo com a literatura. Aplicando o teste de Tukey para 95% de confiança, as médias diferem entre si de forma significativa. De acordo com Lai e Li (2009) em seus estudos, ao variarem a concentração de EDC de 0,1 a 0,4 mmol, obtiveram uma redução significativa de  $51,9 \pm 3,4\%$  para  $43,1 \pm 2,8\%$ . Essa redução sugere que a formação da ligação amida foi inibida na presença de uma quantidade maior de EDC.

Figura 23. Efeito da reticulação das membranas de gelatina em função da concentração de EDC/NHS.



Fonte: desenvolvido pelo autor (2018).

#### 4.6. Solubilidade

A solubilidade dos filmes foi analisada para avaliar a durabilidade das membranas em água à temperatura de  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 96h. Os resultados apresentados na Tabela 5 mostram uma diminuição na solubilidade com o aumento da concentração de reticulante na membrana. Observou-se que a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  a membrana com concentração 0,1

mM de EDC mostrou solubilidade de  $9,9 \pm 0,4\%$ , porém com o aumento da concentração de EDC/NHS, observa-se um aumento na solubilidade da membrana que para 0,5 mM foi de  $11,6 \pm 0,5\%$  e para 1 mmol obteve  $18,0 \pm 0,5\%$  de solubilidade. Isto confirma os resultados encontrados para a diminuição da reticulação com o aumento da concentração de EDC.

Tabela 5. Variação da massa solúvel do filme de gelatina reticulada com diferentes concentrações de EDC/NHS.

	Concentração de reticulante (mmol)		
	0,1	0,5	1
Solubilidade a 37 °C (%)	$9,9 \pm 0,4$	$11,6 \pm 0,5$	$18,0 \pm 0,5$

Fonte: desenvolvido pelo autor (2018).

Essa capacidade de absorção de cada amostra está relacionada diretamente com o grau de reticulação. Isto pode ser explicado pelo fato da reticulação de cadeias poliméricas criarem uma rede tridimensional que impede o polímero de absorver água indefinidamente devido às forças elásticas criadas por esta mesma rede, com uma diminuição simultânea da entropia do sistema, resultando em um aumento da rigidez.

#### 4.7. Propriedade Mecânicas

Os testes de tração foram realizados para avaliar as propriedades mecânicas dos filmes de gelatina com diferentes concentrações de reticulantes. A Tabela 6 apresenta os valores médios da espessura, do módulo de Young, da tensão máxima de tração e da deformação na ruptura das membranas e as curvas de tensão  $\times$  deformação são ilustradas na Figura 24. Curvas de tensão-deformação de membranas eletrofiadas. A concentração de gelatina está relacionada com a viscosidade da solução, que por sua vez está ligada com o grau de envelhecimento das cadeias de moléculas do polímero. Para que se tenha uma estabilidade do cone de Taylor é necessário que se tenha uma viscosidade mínima, a qual irá promover uma melhor direção das

nanofibras no coletor. Os valores obtidos para espessura dos filmes analisados foram similares aos reportados por Niehues (2015).

Tabela 6. Propriedades mecânicas dos filmes de gelatina puro e com concentrações variadas de EDC/NHS.

Concentração de EDC/NHS	$e$	E	$\sigma_{\max}$	$\epsilon_b$
	( $\mu\text{m}$ )	(Mpa)	(Mpa)	(%)
GeP	$56,0 \pm 3,2$	$0,5 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,4$	$13,3 \pm 3,3$
GeR0,1	$92,0 \pm 2,2$	$2,9 \pm 0,4$	$8,5 \pm 3,0$	$4,1 \pm 1,0$
GeR0,5	$96,0 \pm 2,9$	$2,1 \pm 0,3$	$6,4 \pm 2,1$	$3,3 \pm 0,8$
GeR1	$113,0 \pm 1,4$	$2,4 \pm 0,5$	$9,1 \pm 3,1$	$5,9 \pm 1,5$
GeF	$71,4 \pm 1,8$	$0,5 \pm 0,06$	$2,3 \pm 0,63$	$7,7 \pm 1,93$
GeRF0,1	$111,0 \pm 2,1$	$1,56 \pm 0,2$	$5,2 \pm 1,63$	$2,9 \pm 0,72$

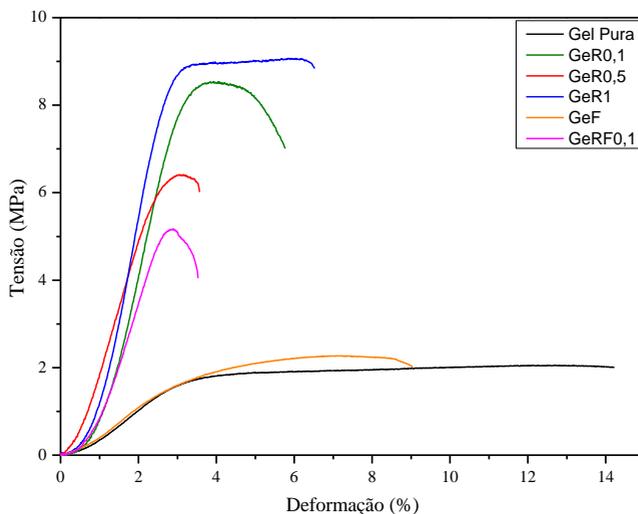
Fonte: desenvolvido pelo autor (2018).

O módulo de Young é um fator que caracteriza a rigidez do material (SOTHORNVIT & KROCHTA, 2001), o que possibilita se obter informações a respeito da dureza ou resistência que este apresenta à deformação elástica. Quanto maior o módulo de Young, maior será resistência à deformação e rigidez do filme; logo, a membrana apresenta menor flexibilidade.

Para a gelatina pura o módulo de Young foi de  $0,5 \pm 0,1$  MPa, semelhante aos padrões encontrados na literatura. Porém, ao variar as concentrações de reticulante, observou-se um aumento significativo no módulo de Young de GeR0,1 a GeR1, conforme mostrado na Tabela 7. Observa-se também que a incorporação do propranolol na membrana reticulada gerou modificações no material em estudo. Comparando-se as membranas GeF e GeRF0,1, observou-se um aumento no módulo de rigidez. Isto era esperado, pois na membrana reticulada foi observado uma retração devido ao uso de reticulante. Este fenômeno também foi observado por Niehues (2015), que ao reticular as fibras de gelatina com glutaraldeído, observou uma retração da membrana em relação as dimensões iniciais.

Comparando-se as membranas GeP e GeF, observa-se que não houve alteração no módulo de Young, o que indica que o fármaco não influencia na elasticidade da membrana.

Figura 24. Curvas de tensão-deformação de membranas eletrofiadas.



Fonte: desenvolvido pelo autor (2018).

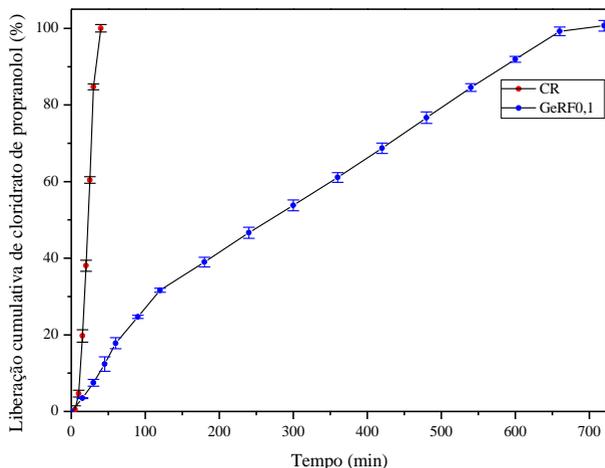
Os resultados ilustrados pelas curvas de tensão-deformação na Figura 24 evidenciam que as membranas de GeP, GeR1 e GeF possuem comportamento plástico. Enquanto as demais membranas analisadas tiveram comportamento frágil, apresentando menores valores de deformação, essa redução na deformação era esperada, tendo em vista que, com o aumento da concentração de reticulante, observou-se uma redução no grau de reticulação dos filmes. Esses dados estão de acordo com a literatura, visto que no processo de reticulação ocorre uma retração na membrana causada pela junção da reação do grupo funcional do reticulante com as amins livres não protonadas da cadeia polimérica de proteína. O resultado dessa reação é a formação de novas ligações covalentes nas moléculas de gelatina (ZHANG et al.,2006; FARRIS; SONG; HUANG, 2010).

#### 4.8. Teste de liberação

O estudo de liberação é um meio muito útil nas fases iniciais do desenvolvimento de sistemas nanoestruturados, sendo, capaz de indicar se a liberação do fármaco é controlada, sustentada ou imediata. De acordo com Sousa e colaboradores (2012), o comportamento de liberação é um fator chave para se verificar sua potencial aplicabilidade em sistema de liberação de fármaco.

Para os testes de liberação do fármaco cloridrato de propranolol em filmes de gelatina, utilizou-se a membrana reticulada na concentração de 0,1 mmol de EDC/NHS contendo 10 mg do fármaco, pois após a caracterização a membrana foi a que demonstrou melhores características físicas. Como forma de comparar a liberação, foi utilizado para controle (referência) um comprimido de propranolol (10mg) comercializado em farmácias. Na Figura 25 tem-se um comparativo da curva de liberação obtida para a quantidade de fármaco liberada em função do tempo para os dois sistemas analisados.

Figura 25. Representação gráfica do perfil de liberação do cloridrato de propranolol em PBS pH 7,4, 37 °C para (CR) e (GeRF0,1).



Fonte: desenvolvido pelo autor (2018).

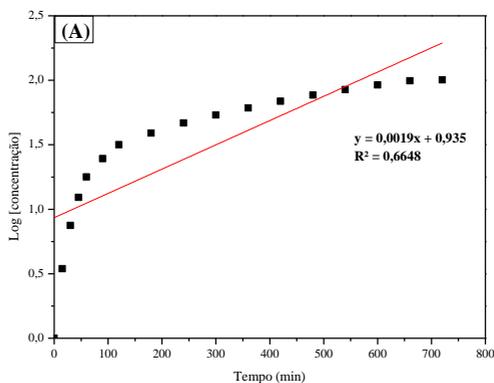
A partir da análise do perfil de liberação, o controle (referência) apresentou um efeito *burst*, onde se observa uma liberação completa do fármaco em 50 min. Já para o filme GeRF 0,1 averiguou-se um efeito *bursts* na primeira hora, onde foram liberados cerca de 20% do fármaco,

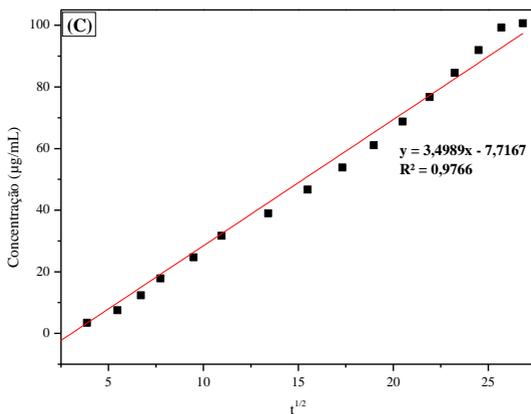
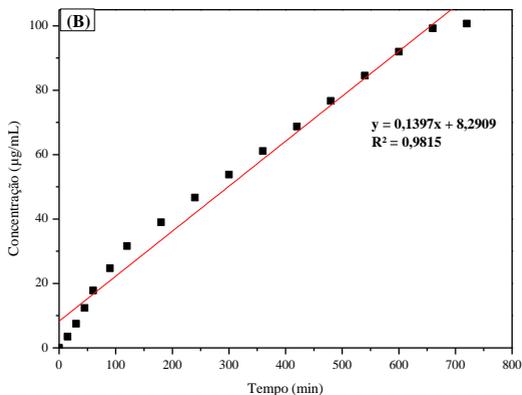
após esse período observou-se uma liberação de forma controlada, onde o ativo foi sendo liberado lentamente. Isso ocorre devido à redução da solubilidade na membrana o que se traduz por uma dissolução mais lenta, sobretudo devido à reticulação com o EDC/NHS, que atuou como uma barreira na liberação do fármaco.

O filme reticulado propiciou a liberação de  $99,2 \pm 0,4$  % de propranolol por um período de 12 h, tempo muito acima do que foi relatado por Abruzzo e colaboradores (2012), que avaliaram a liberação de propranolol em filme à base de gelatina e gelatina/quitosana, onde obtiveram uma liberação completa da droga em 30 min para gelatina e liberação de 54 % para a blenda no mesmo período.

O perfil de liberação do filme reticulado foi analisado de acordo com modelos de cinética de primeira ordem, de ordem zero e de Higuchi de acordo com as equações da Tabela 2. .

Figura 26. Perfil de liberação ajustado aos modelos cinéticos de primeira ordem (A), ordem zero (B) e Higuchi (C).





Fonte: desenvolvido pelo autor (2018).

Observa-se que para o filme em estudo o modelo que melhor descreve o mecanismo é a cinética de ordem zero, ou seja, a velocidade de liberação foi independente da concentração do fármaco dissolvida, ideal para as formas farmacêuticas de liberação controlada. A velocidade de difusão do fármaco, da parte interna para a externa da matriz, é menor que a respectiva velocidade de dissolução, o que permite a passagem constante do fármaco. Pode-se destacar que a redução na velocidade de dissolução da matriz ocorre devido à reticulação com EDC/NHS, o que fortalece a estrutura da gelatina.

Esperava-se que o modelo de Higuchi obtivesse resultados mais alinhados uma vez que considera a liberação de fármacos como um processo de difusão baseado na primeira lei de Fick, dependente então da raiz quadrada do tempo. No entanto, o coeficiente linear obtido foi inferior ao de ordem zero. Apesar disso, os eventos de difusão e erosão ocorrem simultaneamente, dando origem a cinéticas de dissolução muito complexas, caracterizando a necessidade de aplicação de modelos mais específicos.



## 5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, é possível concluir que, a técnica de eletrofiação se mostrou uma ferramenta adequada para a obtenção de fibras poliméricas com diâmetros nanométricos e aspecto homogêneo.

A reticulação com EDC/NHS utilizando a solução binária (etanol e água) mostrou-se efetiva nas três concentrações utilizadas. Porém a concentração GeR 0,1 foi a que mostrou maior grau de reticulação e menor solubilidade. Os resultados de FTIR e de análises térmicas indicaram a presença do reticulante e a incorporação do fármaco na matriz.

As imagens de MEV demonstraram fibras finas e homogêneas com ausência de gotas e grânulos. Verificou-se uma redução no diâmetro das membranas estudadas quando comparadas as obtidas por Niehues (2015), isso ocorreu devido a uma diminuição no parâmetro (vazão) no processo de eletrofiação. Com a incorporação do cloridrato de propranolol observou-se um aumento no diâmetro da membrana. Esse fato ocorreu devido ao aumento na viscosidade da solução de gelatina com o fármaco em questão.

As membranas de GeP e GeF mostraram comportamento plástico, enquanto as membranas reticuladas tiveram uma resposta diferente, onde percebeu-se uma retração nas membranas causadas pela ação do reticulante.

Os ensaios de liberação *in vitro* mostraram que a membrana GeRF0,1 propiciou uma liberação de forma controlada, atingindo a  $99,2 \pm 0,4$  % do fármaco num período de 12 h, tempo muito acima do que foi reportado na literatura. O modelo que melhor descreveu o mecanismo foi o de cinética de ordem zero, onde a velocidade de liberação foi independente da concentração de fármaco dissolvido. Porém, observou-se eventos de difusão e erosão simultâneos durante o processo, o que sugere dissoluções muito complexas. Desta forma, há a necessidade de aplicação de modelos mais específicos.

De forma geral, portanto, o estudo mostra que é possível utilizar a gelatina como matriz polimérica na liberação do cloridrato de

propranolol, no entanto mais estudos devem ser realizados acerca de melhorar o uso no sistema terapêutico transdérmicos.

## 6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nos resultados obtidos com o desenvolvimento desse trabalho, são feitas as seguintes recomendações para trabalhos futuros:

- estudar a compatibilização das bioblendas poliméricas (gelatina e policaprolactona) produzidas, a fim de melhorar suas propriedades;
- testar o uso de plastificante glicerol ao filme, para averiguar se há uma melhora nas propriedades mecânicas;
- realizar um estudo aprofundado da cinética de liberação, utilizando outros modelos que se adequem ao perfil de liberação.



## 7. REFERÊNCIAS

ABRUZZO, A.; BIGUCCI, F.; CERCHIARA, T.; CRUCIANI, F.; VITALI, B.; LUPPI, B. Mucoadhesive chitosan/gelatin films for buccal delivery of propranolol hydrochloride. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 1, p. 581–588, 2012.

ADREANI, L. **Desenvolvimento e caracterização de microesferas de glúten de trigo para utilização em sistemas de liberação.** (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

AGNES, E.J.; ORTEGA, G.G. Modelos matemáticos e físico-química da difusão. **Caderno de Farmácia**, v. 19, n. 1, p. 9-19, 2003.

ALCOBIA, D. S. **Produção de nanofibras alinhadas de polímeros biodegradáveis para crescimento e regeneração células neurais.** (Mestrado). Universidade de São Paulo, 2013.

ALVES, T. V. G. **Obtenção e caracterização de hidrogéis de poli acrilamida-co-metilcelulose como sistemas carregadores de cloridrato de propranolol.** (Mestrado). Universidade Federal do Pará, 2011.

ANSEL, H. C., ALLEN L. V. Jr., POPOVICH N. G., Formas Farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos, 8ª ed., **Artmed** editora S.A., 2005;

AZHAR, F. F.; OLAD, A.; SALEHI, R. Fabrication and characterization of chitosan-gelatin/nanohydroxyapatite-polyaniline composite with potential application in tissue engineering scaffolds. **Designed Monomers and Polymers**, v. 17, n. 7, p. 654-667, 2014.

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

BARRETO, P. L. M.; PIRES, A. T. N.; SOLDI, V. Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere. **Polymer Degradation and Stability**, v. 79, n. 1, p. 147-152, 2003.

BARRY, B., Liberação transdérmica de fármacos. In: Aulton, M.E. Delineamento de formas farmacêuticas. 2ª edição, São Paulo: **Artmed**, 2005

BASTIOLI, C. **Handbook of Biodegradable Polymers**. Rapra Technology, 2005. ISBN 9781859573891.

BHARDWAJ, N.; KUNDU, S. C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 3, p. 325-347, 2010.

BIGI, A.; PANZAVOLTA, S.; RUBINI, K. Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. **Biomaterials**, v. 25, n. 25, p. 5675-5680, Nov 2004.

CERCENÁ, R. **Liberação de fármacos modelo a partir de filmes de acetato de celulose/poli (caprolactona triol)**. (Doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

CHAPLIN, M. Water structure and science. **Gelatin**, Disponível em: <<http://www1.lsbu.ac.uk/water/gelatin.html>>, 2014. Acesso em: 21/09/2017.

CHEN, P-R.; KANG, P-L.; SU, W-S.; LIN, F-H.; CHENA, M-H. The evaluation of thermal properties and in vitro test of carbodiimide or glutaraldehyde cross-linked gelatin for pc 12 cells culture. **Biomedical Engineering Applications**, Basis & Communications, 17, 44-49, 2005.

CHIEN, Y. W. Advanced in transdermal systemic medication, **New York: Marcel Dekker**, p. 1-22, 1987.

CHOKTAWEESSAP, N.; ARAYANARAKUL, K.; AHT-ONG, D.; MEECHAISUE, C.; SUPAPHOL, P. Electrospun gelatin fibers: Effect of solvent system on morphology and fiber diameters. **Polymer Journal**, v. 39, n. 6, p. 622-631, 2007 2007.

CHOU, S. F.; LUO, L. J.; LAI, J. Y.; MA, D. H. K. Role of solvent-mediated carbodiimide cross-linking in fabrication of electrospun gelatin nanofibrous membranes as ophthalmic biomaterials. **Materials Science and Engineering C**, v. 71, p. 1145–1155, 2017.

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

COSTA, R. G. F.; OLIVEIRA, J. E.; PAULA, G. F.; PICCIANI, P. H. S.; MEDEIROS, E. S.; RIBEIRO, C.; MATTOSO, L. H. C. Eletrofição de Polímeros em Solução. a: Fundamentação Teórica. **Polímeros**, Artigo Técnico Científico, v.22, n2, p170-177, 2012.

DASH, R.; FOSTON, M.; RAGAUSKAS, A. J. Improving the mechanical and thermal properties of gelatin hydrogels cross-linked by cellulose nanowhiskers. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 2, p. 638-645, Jan 2013.

DHANDAYUTHAPANI, B.; KRISHNAN, U. M.; SETHURAMAN, S. Fabrication and characterization of chitosan-gelatin blend nanofibers for skin tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials**, v. 94B, n. 1, p. 264-272, Jul 2010.

EBNESAJJAD, S. **Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics: Properties, Processing and Applications**. Elsevier Science, 2012.

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

ERENCIA, M.; CANO, F.; TORNERO, J. A.; MACANAS, J.; CARRILLO, F. Resolving the Electrospinnability Zones and Diameter Prediction for the Electrospinning of the Gelatin/Water/Acetic Acid System. **Langmuir**, v. 30, n. 24, p. 7198-7205, Jun 24 2014.

EVANGELISTA, R. C. Tecnologia Farmacêutica para produção de medicamentos de liberação controlada. Encontro Técnico Científico para as Indústrias Farmacêuticas e Cosméticas. **Racine Qualificação e Acessória**, p. 01-80. São Paulo, 1998.

FONG, H. e RENEKER, D. H. Electrospinning and formation of nanofiber. **Journal of Polymer Science**, part b; Polymer Physics, 37 p 3488-3493, 1999.

FARRIS, S.; SONG, J.; HUANG, Q. Alternative Reaction Mechanism for the Cross-Linking of Gelatin with Glutaraldehyde. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 2, p. 998-1003, Jan 27 2010.

FORMHALS, A. **Patent** No. 1.975.504. USA. 1934.

FUNG, L.; K., SALTZMAN, W. M. Polymeric implants for cancer chemotherapy. **Advanced Drug delivery Reviews**, v. 26, p. 209-230, 1997.

GAST, K.; SIEMER, A.; ZIRWER, D.; DAMASCHUN, G. Fluoroalcohol-induced structural changes of proteins: some aspects of cosolvent-protein interactions. **European Biophysics Journal with Biophysics Letters**, v. 30, n. 4, p. 273-283, Aug 2001.

GELTMEYER, J.; VAN DER SCHUEREN, L.; GOETHALS, F.; DE BUYSSER, K.; DE CLERCK, K. Optimum sol viscosity for stable electrospinning of silica nanofibres. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 67, n. 1, p. 188-195, Jul 2013.

HAINES, P. J. **Thermal methods of analysis: Principles, applications and problems**. New York, EUA: Blackie Academic and Chapman and Hall, 1995.

HIGUCHI, T. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drug in suspension. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, p. 874-875, 1961.

HOQUE, M. S.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Effects of partial hydrolysis and plasticizer content on the properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 1, p. 82-90, 2011.

HOMAYONI, H.; RAVANDI, S. A. H.; VALIZADEH, M. Electrospinning of chitosan nanofibers: Processing optimization. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 3, p. 656-661, Jul 2009.

HUANG, Z. M.; ZHANG, Y. Z.; KOTAKI, M.; RAMAKRISHNA, S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their

applications in nanocomposites. **Composites Science and Technology**, v. 63, n. 15, p. 2223-2253, Nov 2003.

HUANG, Z. M.; ZHANG, Y. Z.; RAMAKRISHNA, S.; LIM, C. T. Electrospinning and mechanical characterization of gelatin nanofibers. **Polymer**, v. 45, n. 15, p. 5361-5368, Jul 2004.

INSUMOS. Gelatina um ingrediente alimentício com muitos benefícios para a saúde. **ADITIVOS & INGREDIENTES**, 2009.

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

KI, C. S.; BAEK, D. H.; GANG, K. D.; LEE, K. H.; UM, I. C.; PARK, Y. H. Characterization of gelatin nanofiber prepared from gelatin-formic acid solution. **Polymer**, v. 46, n. 14, p. 5094-5102, 2005.

KULKARNI, A.; BAMBOLE, V. A.; MAHANWAR, P. A. Electrospinning of polymers, their modeling and applications. **Polymerplastics Technology Andengineering**, 49: 427-441, 2010.

LAI, J. Y., LI, Y. T. Influence of Cross-Linker Concentration on the Functionality of Carbodiimide Cross-Linked Gelatin Membranes for Retinal Sheet Carriers. **Journal of biomaterials science. Polymer edition**, v. 22, n. December 2014, p. 277-295, 2009.

LIU. R.; MING. J. ZHANG. H. ZUO. B. EDC/NHS Crosslinked Electrospun Regenerated Tussah Silk Fibroin Nanofiber Mats, **Fibers and Polymers**. Vol.13, No.5, 613-617, 2012.

LITVIN, A.; KOLYVANOV, G.; ZHERDEV, V.; ARZAMASTSEX, A. Relationship between physicochemical characteristics and pharmacokinetic parameters of 1, 4- benzodiazepine derivatives, **Pharmaceutical Chemistry Journal**. 38: 583-586, 2004.

LORDI, N. G. Formas Farmacêuticas de Liberação Prolongada. In: LACHMAN L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. v. 2. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1517 p. 2001.

LYRA, M. A. M.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; BRASILEIRO, M. T.; DE LA ROCA, M. F.; BARRAZA, J. A.; VIANA, O. D. S.; ROLIM-NETO, P. J. Sistemas matriciais hidrofílicos e mucoadesivos para liberação controlada de fármacos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 5, p. 784–793, 2007.

MA. D. H. K.; LAI. J. Y.; CHENG. H. Y.; TSAI. C. C. YEH. L. K. Carbodiimide cross-linked amniotic membranes for cultivation of limbal epithelial cells, **Biomaterials** 31 6647–6658. (2010).

MALLMANN, E. J. J. **Obtenção de um novo compósito biológico com propriedades magnéticas.** (Mestrado). Universidade Federal do Ceará, 2010.

MARTUCCI, J. F.; ACCAREDDU, A. E. M.; RUSECKAITE, R. A. Preparation and characterization of plasticized gelatin films cross-linked with low concentrations of Glutaraldehyde. **Journal of Materials Science**, v. 47, n. 7, p. 3282-3292, Apr 2012.

MEDEIROS, E. S., GLENN, G. M., KLAMCZYNSKI, A. P., ORTS, W. J., MATTOSO, L. H. C. Solution Blow Spinning: A New Method to Produce Micro- and Nanofibers from Polymer Solutions. *Journal of Applied Polymer Science*, p2322-2330, 2009.

MIT-UPPATHAM, C.; NITHITANAKUL, M.; SUPAPHOL, P. Ultrathin electrospun polyamide-6 fibers: Effect of solution conditions on morphology and average fiber diameter. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 205, n. 17, p. 2327-2338, Nov 26 2004.

MUYONGA, J. H.; COLE, C. G. B.; DUODU, K. G. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). **Food Chemistry**, v. 86, n. 3, p. 325-332, Jul 2004.

NAGARAJAN, M. et al. Film forming ability of gelatins from splendid squid (*Loligo formosana*) skin bleached with hydrogen peroxide. **Food Chemistry**, v. 138, n. 2–3, p. 1101-1108, 2013.

NIEHUES, E. **Elaboração e caracterização de membranas de gelatina eletrofiadas e modificadas por glutaraldeído ou nanocristais de celulose.** (Doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.

NUR HANANI, Z. A.; ROOS, Y. H.; KERRY, J. P. Use and application of gelatin as potential biodegradable packaging materials for food products. **International Journal of Biological Macromolecules**, n. 0, 2014.

OKUTAN, N.; TERZI, P.; ALTAY, F. Affecting parameters on electrospinning process and characterization of electrospun gelatin nanofibers. **Food Hydrocolloids**, v. 39, p. 19-26, Aug 2014.

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

PHADKE, K. V.; MANJESHWAR, L. S.; AMINABHAVI, T. M. Biodegradable polymeric microspheres of gelatin and carboxymethyl guar gum for controlled release of theophylline. **Polymer Bulletin**, v. 71, n. 7, p. 1625-1643, Jul 2014.

POVERENOV, E.; ZAITSEV, Y.; ARNON, H.; GRANIT, R.; ALKALAI-TUVIA, S.; PERZELAN, Y.; WEINBERG, T.; FALLIK, E. Effects of a composite chitosan-gelatin edible coating on postharvest quality and storability of red bell peppers. **Postharvest Biology and Technology**, v. 96, p. 106-109, Oct 2014.

PROCKOP, D. J. Collagens. In: LANE, W. J. L. D. (Ed.). **Encyclopedia of Biological Chemistry**. Waltham: Academic Press, 2013. p.545-549. ISBN 978-0-12-378631-9.

PROIKAKIS, C.S.; TARANTILI, P.A.; ANDREOPOULOS, A.G. The role of polymer/drug interactions on the sustained release from poly (DL-lactic acid) tablets. **European Polymer Journal**, v. 42, p. 3269-3276, 2006.

RAMAKRISHNA, S.; FUJIHARA, K.; TEO, W.-E.; LIM, T.-C.; MA, Z. **An Introduction to Electrospinning and Nanofibers**. World Scientific Publishing Company 396. 2005.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia** 6º Ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda. 2007.

RATANAVARAPORN, J.; RANGKUPAN, R.; JEERATAWATCHAI, H.; KANOKPANONT, S.; DAMRONGSAKKUL, S. Influences of physical and chemical crosslinking techniques on electrospun type A and B gelatin fiber mats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, n. 4, p. 431-438, 2010.

RODRIGUES, P. O. **Mecanismo de liberação e modelo matemático**. (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

SATO, J. A. P. **Fabricação e Caracterização de Sistemas Poliméricos Nanoestruturados Obtidos por Meio do Uso da Técnica De Eletrofição**. (Mestrado). Universidade Federal do ABC, 2011.

SAXENA, A.; SACHIN, K.; BOHIDAR, H. B.; VERMA, A. K. Effect of molecular weight heterogeneity on drug encapsulation efficiency of gelatin nano-particles. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 45, n. 1, p. 42-48, Sep 25 2005.

SCHRIEBER, R.; GAREIS, H. **Gelatine Handbook - Theory and Industrial Practice**. Weinheim: Wiley-VCH-Verl. 2007.

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

SENA, L. A. **Produção e caracterização de compósitos hidroxiapatita-colágeno para aplicações biomédicas**. (Doutorado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.

SHEFY-PELEG, A.; FOOX, M.; COHEN, B.; ZILBERMAN, M. Novel Antibiotic-Eluting Gelatin-Alginate Soft Tissue Adhesives for Various Wound Closing Applications. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 63, n. 14, p. 699-707, Sep 22 2014.

SILL, T.J., VON RECUM, H.A. Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. **Biomaterials** 29 (13), 1989–2006, 2008.

SILVA, A. B., SANTOS, J. P. F., BRETAS RES. 12° CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS, 2013, Florianópolis, SC. Sistemas Poliméricos Nanoestruturados Baseados em Mantas de Nanofibras Conductoras. 2013. 4p

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Spectrometric identification of organic compounds**. Wiley, 1998. ISBN 9780471134572.

SIVAKUMAR, M.; RAO, K. P. "Preparation, characterization and *in vitro* release of gentamicin from coralline hydroxyapatite-gelatin composite microspheres", **Biomaterials** 2002, 23, 3175-3181

SOBRAL, P. J. A.; HABITANTE, A. M. Q. B. Phase transitions of pigskin gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 377-382, 2001.

STHORNVIT, R.; KROCHTA, J. M. Oxygen permeability and mechanical properties of films from hydrolyzed whey protein. **J. Agric. Food Chem.** 48: 3913. 2001

SOUSA, F. F. O.; LUZARDO-ÁLVAREZ, A.; BLANCO-MÉNDEZ, J.; MARTÍN-PASTOR, M. NMR techniques in drug delivery: Application to zein protein complexes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 439, n. 1–2, p. 41–48, 2012.

STAROSZCZYK, H.; PIELICHOWSKA, J.; SZTUKA, K.; STANGRET, J.; KOŁODZIEJSKA, I. Molecular and structural characteristics of cod gelatin films modified with EDC and TGase. **Food Chemistry**, v. 130, n. 2, p. 335-343, Jan 2012.

STULZER. H. K.; LACERDA. L.; TAGLIARI. M. P.; SILVA. M. A. S.; FAVERE. V. T.; LARANJEIRA. M. C. M. Synthesis and characterization of cross-linked malonylchitosan microspheres for controlled release of acyclovir. **Carbohydr. Polym.** 73:490–497. 2008.

TOMIHATA, K. et al. Cross-Linking and Biodegradation of Native and Denatured Collagen. In: (Ed.). **Polymers of Biological and Biomedical Significance**: American Chemical Society, v.540, 1993. cap. 24, p.275-286. (ACS Symposium Series). ISBN 0-8412-2732-2.

VARELAS, C. G.; DIXON, D. G.; STEINER, C. A. Zero-order release from biphasic polymer hydrogels. **Journal of Controlled Release**, v. 34, n. 3, p. 185–192, 1995.

VARGAS, D. M.; AUDÍ, L.; CARRASCOSA, A. Peptídeos derivados do colágeno: novos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 367-370, 1997.

VEIGA, F. Medicamentos orais de liberação controlada. Comprimidos matriciais hidrófilos. **Bol. Fac. Farm. Coimbra**, Coimbra, v. 12, n. 2, p. 17-87, 1988.

VERRECK, G.; CHUN, I.; ROSENBLATT, J.; PEETERS, J.; DIJCK, A. V.; MENSCH, J.; NOPPE, M.; BREWSTER, M. E. “Incorporation of drugs in an amorphous state into electrospun nanofibers composed of a water-insoluble, nonbiodegradable polymer”, **J. Control. Release**, 92, 349-360. 2003.

XIAOLING, L.; BHASKARA, R. J. Design of controlled release drug delivery systems, 1ed, New York, 2006.

WANG, M.; SINGH, H.; HATTON, T.; RUTLEDGE, G. Field-responsive superparamagnetic composite nanofibers by electrospinning. **Polymer**, 45, 5505–5514, 2004.

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

YOUNG, S.; WONG, M.; TABATA, Y.; MIKOS, A. G. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. **Journal of Controlled Release**, 109, 256-274, 2005.

ZHA, Z. B.; TENG, W. B.; MARKLE, V.; DAI, Z. F.; WU, X. Y. Fabrication of gelatin nanofibrous scaffolds using ethanol/phosphate buffer saline as a benign solvent. **Biopolymers**, v. 97, n. 12, p. 1026-1036, Dec 2012.

ZHANG, Y. Z.; VENUGOPAL, J.; HUANG, Z. M.; LIM, C. T.; RAMAKRISHNA, S. Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers. **Polymer**, v. 47, n. 8, p. 2911-2917, Apr 5 2006.