



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Ciências

Produção de nanofibras de Pectina/PVA por
electrospinning, utilizando L-Cisteína como agente
antimicrobiano

Ana Catarina Nascimento Matias da Silva

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotechnology
(2º Ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Dr. Isabel Cristina Aguiar de Sousa e Silva Gouveia
Co-orientador: Dr. Sílvia Cristina Cláudio Nunes

Covilhã, outubro de 2014

Agradecimentos

A realização desta dissertação nem sempre foi uma tarefa fácil e, por isso, divulgo uma lista de pessoas a quem gostaria de agradecer:

Em primeiro lugar, queria agradecer às minhas orientadoras Prof^a Isabel Gouveia e Prof^a Sílvia Nunes pela disponibilidade, compreensão e pela confiança que depositaram em mim durante a elaboração desse trabalho de investigação.

Agradeço também aos meus colegas de laboratório Cláudia Mouro, Sílvia Araújo e Frederico Nogueira pelos momentos de companheirismo e por serem sempre disponíveis para me tirarem algumas dúvidas.

Quero também reconhecer o apoio da Prof^a Ana Ramos na utilização do reómetro e da Eng^a Ana Paula Gomes na microscopia eletrónica de varrimento.

Obrigado às minhas colegas de Mestrado Patrícia Pousada, Zélia Proença e Susana Alves pelos momentos de boa-disposição que me proporcionaram.

Mas, acima de tudo, a quem quero agradecer muito é à minha família, em especial aos meus pais e à minha irmã por me terem dado ânimo, força e coragem para seguir essa caminhada e me terem ajudado nos momentos difíceis.

E... a todos aqueles que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional, o meu

Muito Obrigada!

Resumo

A pectina, é um polímero natural que apresenta vantagens como biodegradabilidade, solubilidade em água, baixa toxicidade e propriedades bioadesivas. Estas vantagens convertem-na numa forte candidata a ser utilizada em aplicações biomédicas.

Deste modo, o objetivo deste trabalho teve por base a produção de fibras de Pectina através de *electrospinning*. No entanto, apesar da sua utilização ser vantajosa, a pectina apresentou uma fraca *electrospinnability*, que é provocada pelas cargas elétricas, nomeadamente pelas forças repulsivas existentes entre os polianíões. Desta forma, para inverter esta dificuldade adicionou-se um polímero sintético, o poli (vinil álcool) (PVA).

A adição do PVA resultou numa mistura com as características desejáveis, uma vez que a interação entre o PVA e as cadeias poliméricas da Pectina reduziu as forças repulsivas existentes. Assim, aumentou substancialmente a *electrospinnability* da Pectina e consequentemente foram produzidas as nanofibras pretendidas.

A morfologia das nanofibras de Pectina/PVA obtidas a partir do *electrospinning* foram, posteriormente, analisadas por microscopia eletrónica de varrimento (SEM). O resultado esperado verificou-se quando uma solução de 4% Pectina foi misturada com uma solução 10% de PVA numa proporção 30:70 (v/v), respetivamente. Nesta proporção observou-se fibras uniformes e homogéneas com diâmetro de 287 nm.

Posteriormente, a L-Cisteína foi adicionada à solução Pectina/PVA 30:70 (v/v). Esta adição teve como objetivo avaliar a bioactividade da L-Cisteína na mistura. Para estimar a quantidade de L-Cisteína a ser adicionada à mistura Pectina/PVA a sua concentração mínima inibitória (MIC) foi determinada, através do método de microdiluição em caldo. Os valores de MIC obtidos para a solução de Pectina/PVA 30:70 com L-Cisteína foram de 5 mg/ml para *Staphylococcus aureus* e de 10 mg/ml para *Klebsiella pneumoniae*. Estes valores, confirmam que a L-Cisteína funciona como agente antimicrobiano, o que pode ser muito útil em aplicações biomédicas.

Palavras-Chave

Nanofibras; Pectina; PVA; L-Cisteína; *electrospinning*; Actividade antimicrobiana; *Staphylococcus aureus*; *Klebsiella pneumoniae*; MIC

Abstract

Pectin, is a natural polymer that has advantages, such as biodegradability, water solubility, low toxicity and bio adhesive properties. These advantages becoming a strong candidate to be used in biomedical applications. Thus, the objective of this work was based on the fabrication of pectin fibers through electrospinning. However, although their use is advantageous, the pectin showed a low electrospinnability, which is caused by the electrical charges, particularly by repulsive forces among the polyanions.

Thus, the order to invert this situation was added a synthetic polymer, poly (vinyl alcohol) (PVA). The addition of PVA resulted in a blend with the desired characteristics since the interaction between PVA and chains polymeric pectin it reduced the existing repulsive forces. Hence, electrospinnability of pectin increased substantially and consequently required nanofibers were produced.

The morphology of nanofibers Pectin/PVA obtained from electrospinning were analyzed by Scan Electron Microscopy (SEM). The expected result was found when a solution of 4% pectin was mixed with a solution 10% PVA in a proportion of 30:70 (v/v), respectively. This proportion uniform and homogeneous fibers were observed with a diameter of 287 nm.

Afterward, L-Cysteine was added to the pectin/PVA 30:70 (v/v) solution. This addition was aimed assess the bioactivity of L-Cysteine in the blend. To estimate the amount of L-Cysteine to be added in the Pectin/PVA blend its minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the broth microdilution test.

The MIC values obtained for L-Cysteine of the pectin/PVA 30:70 solution were 5 mg/ml for *Staphylococcus aureus* and 10 mg/ml of *Klebsiella pneumoniae*. These values confirm that L-Cysteine acts as an antimicrobial agent, which can be very useful in biomedical applications.

Keywords

Nanofibers; pectin; PVA; L-Cysteine; *electrospinning*; Antimicrobial activity; *Staphylococcus aureus*; *Klebsiella pneumoniae*; MIC

Índice

	Páginas
Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Abstract	iv
Lista de Figuras	viii
Lista de Tabelas	ix
Lista de Acrónimos	x
Contextualização e Estrutura da dissertação	1
Capítulo 1- Introdução	
1.1 Nanomateriais e nanotecnologia	2
1.2 Polímeros	
1.2.1 Polímeros naturais	3
1.2.1.1 Polissacarídeos	3
1.2.1.1.1- Pectina	4
1.2.1 Polímeros sintéticos	
1.2.1.1- PVA	5
1.3- Agentes antimicrobiano	6
1.3.1- Cisteína	6
1.4 <i>Electrospinning</i> ou electrofiação	8
1.4.1- Caracterização da técnica	9
1.4.2- Parâmetros que influenciam o <i>electrospinning</i>	
1.4.2.1- Propriedades intrínsecos da solução	
1.4.2.1.1- Viscosidade da solução	11
1.4.2.1.2- Condutividade elétrica	11
1.4.2.1.3- Tensão superficial	12

1.4.2.2- Condições operacionais	
1.4.2.2.1- Voltagem aplicada	12
1.4.2.2.2- Distância entre a gota e o coletor	13
1.4.2.2.3- Velocidade de fluxo da solução	13
1.4.2.3- Parâmetros ambientais	
1.4.2.3.1- Temperatura	14
1.4.2.3.2- Humidade	14
1.4.3- Aplicações biomédicas das fibras produzidas por <i>electrospinning</i>	
1.4.3.1 - Engenharia de tecidos	15
1.4.3.2 - Entrega de fármacos	16
1.4.3.3 - Revestimentos para feridas	17
1.4.4- <i>Electrospinning</i> da mistura Pectina/PVA	18
Capítulo 2- Materiais e Métodos	
2.1- Materiais	20
2.2- Métodos	
2.2.1- Configuração do <i>electrospinning</i>	21
2.2.2- Preparação das soluções poliméricas	22
2.2.3- Avaliação das propriedades da solução	
2.2.3.1- Avaliação da viscosidade	23
2.2.2.2- Avaliação da condutividade	24
2.2.4- Processo de <i>electrospinning</i>	24
2.2.5- Microscopia eletrónica de varrimento (SEM)	25
2.2.6- Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC)	26
Capítulo 3- Resultados e Discussão	
3.1- Avaliação das Propriedades da Solução	
3.1.1- Efeito da Variação da Concentração	27
3.1.2- Efeito da Viscosidade e da Condutividade	28
3.2- Caracterização das fibras	29

3.3- Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC)	31
3.4- Caracterização das fibras Pectina/PVA/L-Cisteína	33
Capítulo 4- Conclusões	34
4.1- Perspetivas futuras	35
Capítulo 5- Referências Bibliográficas	36

Lista de Figuras

	Páginas
Capítulo 1 - Introdução	
Figura 1	Estrutura química da Pectina. 4
Figura 2	Estrutura química do PVA obtida através da hidrólise alcalina do PVAc. 5
Figura 3	Estrutura química da L-Cisteína. 6
Figura 4	Formação de Cistina. Ligação entre duas moléculas de Cisteína por ligações dissulfureto (S-S). 7
Figura 5	Esquema de montagem de um sistema de <i>electrospinning</i> . 9
Figura 6	Mudança na forma dos jatos emitidos pela ponta da agulha, contendo um líquido, em presença de um potencial elétrico crescente. 10
Capítulo 2 - Materiais e Métodos	
Figura 7	Sistema de <i>electrospinning</i> utilizado. 21
Figura 8	Eléctrodo de <i>spinning</i> cilíndrico de arames. 21
Figura 9	Painel de controlo do sistema de <i>electrospinning</i> utilizado. 22
Figura 10	Reómetro utilizado para medição da viscosidade da solução. 23
Figura 11	Conduvívímetro utilizado para medição da condutividade da solução. 24
Figura 12	Microscópio Eletrónico de Varrimento (SEM) utilizado para avaliar a morfologia das nanofibras. 25
Capítulo 3 - Resultados e Discussão	
Figura 13	Imagens SEM (a) 10% PVA; (b) Pectina/PVA 30:70; (c) Pectina/PVA 50:50; (d) Pectina/PVA 70:30. 31
Figura 14	Imagens SEM (a) Pectina/PVA 30:70; (b) Pectina/PVA 30:70 com 2% L-Cisteína. 33

Lista de Tabelas

	Páginas
Capítulo 2 - Materiais e Métodos	
Tabela 1 Reagentes usados no decorrer do trabalho.	20
Tabela 2 Equipamentos usados no decorrer do trabalho.	20
Tabela 3 Parâmetros aplicados no processo de <i>electrospinning</i> .	25
Capítulo 3 - Resultados Ae Discussão	
Tabela 4 Valores de viscosidade obtidos a partir das soluções Pectina/PVA preparadas.	28
Tabela 5 Valores de condutividade obtidos a partir das soluções Pectina/PVA preparadas.	29
Tabela 6 Valores de MIC obtidos para o <i>Staphylococcus aureus</i> e para a <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	32

Lista de Acrónimos

Acrónimo	Designação
AATCC	American Association of Textile Chemists and Colorists
BSA	Albumina sérica bovina
CAP	Aceto ftalato de celulose
CHCl ₃	Clorofórmio
CS ₂	Dissulfureto de carbono
DMF	Dimetil formamida
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGF	Fatores de crescimento
Lst	Lizostatina
MIC	Concentração mínima inibitória
MM	Massa molecular
NaCl	Cloreto de sódio
nm	Nanómetro (=10 ⁻⁹ m)
PCL	Policaprolactona
PDLA	Ácido Poli-D,L láctico
PEO	Polióxido de etileno
PLGA	Ácido láctico e glicólico
PMMA	Acrílico polimetil metacrilato
PU	Poliuretano
PVA	Poli (vinil álcool)
PVAc	Poli (vinil acetato)
SEM	Microscopia eletrónica de varrimento
THF	Tetrahidrofurano
VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana
γ	Velocidade de corte
τ	Tensão de corte

Contextualização e Estrutura da dissertação

A nanotecnologia é uma área inovadora de investigação que se destina a produzir materiais de dimensões reduzidas, conhecidos por nanomateriais, que podem ser úteis numa vasta área de aplicações. A biomedicina é uma das áreas que suscita mais interesse na atualidade, uma vez que os nanomateriais podem ser utilizados na engenharia de tecidos, na entrega de fármacos e nos revestimentos para feridas. Esses materiais podem ser obtidos por electrofiação ou *electrospinning*.

A técnica de *electrospinning* é uma técnica simples e versátil que tem como objetivo a formação de fibras, sob a ação de um campo elétrico. As fibras produzidas por *electrospinning* podem ser baseadas em polímeros naturais ou sintéticos. O *electrospinning* de polímeros naturais é mais vantajoso relativamente ao *electrospinning* de polímeros sintéticos, uma vez que o *electrospinning* de polímeros naturais diminui os custos associados à utilização de produtos químicos, tornando-se assim numa tecnologia ecológica. A pectina é um dos mais abundantes polímeros naturais. Apresenta um baixo custo e é extraída das paredes celulares das plantas. Para além disso, a pectina demonstra inúmeras vantagens, como biodegradabilidade, solubilidade em água, baixa toxicidade e propriedades bioadesivas, o que faz com que esta seja um polissacarídeo bastante promissor na biomedicina.

No entanto, a utilização dos polímeros naturais no *electrospinning* é ainda uma limitação, devido à sua baixa *electrospinnability* e resistência mecânica. Assim, a adição de polímeros sintéticos torna-se uma alternativa viável para melhorar o processo e as propriedades da estrutura final dos materiais.

Um dos polímeros sintéticos mais utilizados no *electrospinning* é o poli (vinil álcool) (PVA) devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade.

As fibras de Pectina/PVA, para que possam ser aplicadas na biomedicina, têm de apresentar características únicas como, elevada porosidade, elevada razão área/volume, diâmetro adequado, biocompatibilidade, biodegradabilidade e boa resistência mecânica. Para além disso, também têm de cumprir determinados requisitos, sendo o mais imprescindível o efeito antimicrobiano, combatendo microrganismos, como bactérias e fungos patogénicos, que são responsáveis por vários problemas de saúde.

O trabalho de investigação realizado no âmbito desta dissertação de Mestrado em Biotecnologia tem, portanto, como objectivo produzir nanofibras de Pectina/PVA através de *electrospinning*. As nanofibras de Pectina/PVA foram, posteriormente, funcionalizadas com L-Cisteína, de maneira a conferir-lhes bioatividade.

Capítulo 1

Introdução

1.1 Nanomateriais e nanotecnologia

Uma das definições mais usadas para nanotecnologia foi adotada pelo *National Nanotechnology Initiative* (NNI), uma iniciativa desenvolvida pelos Estados Unidos para coordenar as investigações realizadas na área das nanociências, engenharias e tecnologias [1]. Esta iniciativa foca-se na nanotecnologia, que é uma área de investigação que tem como base os seguintes desafios [1]:

1. Pesquisa e desenvolvimento da tecnologia a níveis atômicos, moleculares, ou macromoleculares, à escala de, aproximadamente, 1-100 nm;
2. Criação e uso de estruturas, máquinas, e sistemas que possuem novas propriedades e desempenham novas funções devido ao seu tamanho;
3. Capacidade de controlo ou produção à escala atômica.

Os produtos da nanotecnologia são os nanomateriais. Os nanomateriais são constituídos por componentes provenientes da Natureza (poeiras dos fogos florestais, partículas biológicas) e por partículas antropogénicas não intencionais (motores a diesel, centrais elétricas) com uma dimensão inferior a 100 nm [1]. Esses nanomateriais podem ser produzidos no laboratório ou na indústria por duas maneiras diferentes: “*top-down*” ou “*bottom-up*” [1]. O procedimento “*top-down*” envolve a obtenção de nanomateriais na conformação desejada, enquanto o procedimento “*bottom-up*” associa as partículas mais pequenas para obter nanomateriais através de vários processos, entre os quais a síntese química. Muitas aplicações “*top-down*”, tais como os processos litográficos para fabricar *chips* informáticos, têm sido investigadas durante muitos anos, enquanto outros procedimentos “*bottom-up*”, tais como produção de fibras de Pectina/PVA para aplicações biomédicas, são relativamente novos.

Os nanomateriais, devido ao seu tamanho reduzido, apresentam algumas vantagens, nomeadamente, melhores propriedades magnéticas, melhor atividade elétrica e ótica, e uma integridade estrutural elevada.

Estas propriedades permitem que os nanomateriais sejam capazes de melhorar o desempenho de uma grande variedade de produtos e serviços, incluindo equipamento desportivo, têxteis, geração e distribuição de energia, fármacos, dispositivos médicos e processamento de alimentos [1].

1.2 Polímeros

1.2.1 Polímeros naturais

Os polímeros naturais ou biopolímeros são derivados dos materiais encontrados na natureza tais como: exosqueletos de crustáceos, cogumelos, ou madeira, entre outros. Enquanto algumas aplicações se centram no uso de polímeros naturais por causa da sua sustentabilidade, eficiência ecológica, ecologia industrial, e natureza renovável, o uso racional de polímeros naturais está predominantemente baseado nas suas propriedades inerentes. Os polímeros naturais para além de derivarem de fontes renováveis exibem intrinsecamente atividade antimicrobiana, biodegradabilidade e biocompatibilidade [2]. Essas propriedades fazem com que sejam ideais para uma grande variedade de indústrias tais como oftalmologia, medicina, agricultura, têxteis, revestimentos de papel, e automóveis [2]. As fibras de polímeros naturais produzidas por *electrospinning* podem oferecer aplicações específicas incluindo filtração do ar, vestuário protetivo, substitutos para pesticidas agrícolas, e nanocompósitos [2,3].

É importante notar que trabalhar com polímeros naturais pode ser um desafio. Por exemplo, a quitina pode ser extraída do exosqueleto de crustáceos, das cutículas de insetos ou da biomassa de fungos [2]. Baseados na sua fonte, variam em massa molecular, grau de desacetilação, pureza, distribuição de grupos carregados e cristalinidade [2]. Esta variação torna-se verdadeira para todos os polímeros. Apesar dos desafios supracitados, os benefícios intrínsecos não podem ser ignorados; é por esta razão que as microfibras contendo polímeros naturais tais como quitosano [2,4], alginato [2,5], celulose/quitina [2,6], alginato/carboximetil/quitosano [2,7], colagénio/PLGA [2,8], têm sido previamente fabricados utilizando as técnicas tradicionais de processamento de fibras. A produção de fibras de polímeros naturais é uma área que está atualmente a ser investigada. Essas fibras são de interesse adicional para várias áreas de investigação no futuro, uma vez que, hoje em dia, consegue-se trabalhar com partículas reduzidas devido ao avanço das novas tecnologias.

1.2.1.1- Polissacarídeos

Ao longo das últimas três décadas o uso de materiais poliméricos tornou-se muito usual para aplicações biomédicas [3,9]. Os polissacarídeos pertencem à classe dos polímeros naturais e são constituídos por monómeros de hidratos de carbono unidos por ligações glicosídeas. Os estudos descritos na literatura têm-se focado na atividade biológica específica dos polissacarídeos, que têm um elevado interesse de pesquisa na atualidade. No corpo humano realizam funções biológicas únicas de sinalização celular para reconhecimento da imunidade [9, 10].

Os polissacarídeos são provenientes de várias fontes naturais, tais como as algas (alginato), plantas (pectinas e goma de guar), animais (quitosano, condroitina), e microrganismos (dextrano, goma de xantano) [9].

Do ponto de vista dos polissacarídeos iônicos, podem ser divididos em polieletrólitos e não-polieletrólitos. Os polissacarídeos polieletrólitos também podem ser divididos em polissacarídeos carregados positivamente (quitosano) e em carregados negativamente (alginato, heparina, ácido hialurônico, pectina) [9].

Os polissacarídeos diferem das proteínas e ácidos nucleicos pela formação de estruturas ramificadas [9].

Os polissacarídeos são capazes de formar complexos no intervalo da nanoescala. Essas novas estruturas dos polissacarídeos estão a ser usadas para a entrega controlada de fármacos, proteínas e terapia gênica; engenharia de células e tecidos; e novas plataformas para o estudo da bioquímica [9, 11]. Os polissacarídeos são extremamente úteis na alimentação, cosmética, biomedicina e indústria farmacêutica [9, 12], devido às suas propriedades físicas e bioquímicas.

1.2.1.1- Pectina

A pectina é um polissacarídeo derivado de muitas fontes naturais e é o principal componente da parede celular das plantas. A pectina é um dos maiores constituintes da parede celular e apresenta uma grande capacidade de formação de géis [13]. Quimicamente, a pectina é constituída por ácidos 1, 4- α galacturônicos, com vários graus de metilação dos resíduos de ácido carboxílico, figura 1 [13].

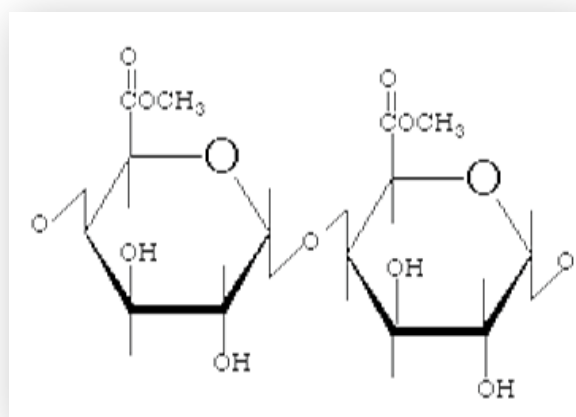


Figura 1 - Estrutura química da Pectina (adaptado de [13]).

A pectina com baixo grau de metilação forma géis na presença de iões multivalentes, enquanto a pectina com alto grau de metilação forma géis em meio ácido com a adição de açúcares diferentes, como sacarose ou glicose [13]. Estruturalmente, a pectina pode ser dividida em regiões lineares e regiões ramificadas. O grau de esterificação dos resíduos de ácido galacturónico afeta a solubilidade da pectina e as suas propriedades de formação de géis e de filmes. O grau de esterificação varia de acordo com a fonte de origem da planta, o tempo e o espaço em que esta é recolhida e com as condições do processo de esterificação [13, 14].

A pectina tem sido usada na indústria alimentar como um agente de formação de compotas e geleias, sumos de fruta, produtos de confeitaria e formação de iogurtes [13]. A pectina é um constituinte da fruta e dos vegetais que é crucial para a saúde, pois pode reduzir os níveis de colesterol e de glicose no soro [13]. Também se tem provado que o consumo regular de pectina melhora o ambiente fecal, protege o esmalte dentário, modera a produção de citocinas pró-inflamatórias e imunoglobulinas para regular a resposta inflamatória no colón e inibe a expressão de galectina, importante para a proliferação de células malignas [15].

A pectina apresenta ainda certas propriedades, como baixo custo, biodegradabilidade, elevada solubilidade em água, baixa toxicidade e propriedades bioadesivas, fazendo assim com que esta seja muito utilizada em várias aplicações biomédicas [16]. Nas aplicações biomédicas, a pectina é usada para entrega controlada de fármacos para efeitos digestivos, transportadores celulares, remoção de metais pesados e na criação de scaffolds não-citotóxicos [15].

1.2.2- Polímeros sintéticos

1.2.2.1- PVA

O poli (vinil álcool) (PVA) é um polímero sintético [17], altamente solúvel em água e com boa estabilidade química e térmica [18]. Este polímero é frequentemente produzido por transterificação, em que o PVAc é hidrolisado por tratamento de uma solução alcoólica de PVAc com uma solução alcalina [17], como mostrado na figura 2.

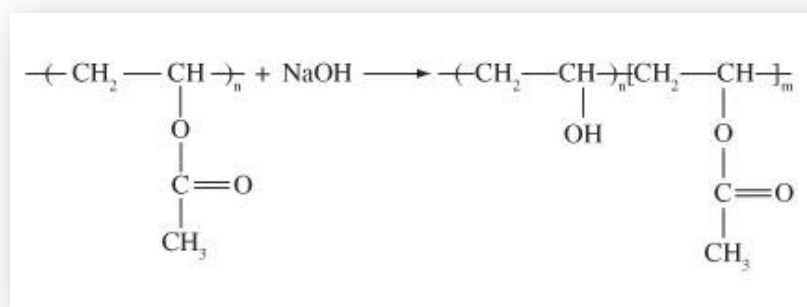


Figura 2- Estrutura química do PVA obtida através da hidrólise alcalina do PVAc (adaptado de [19]).

As propriedades básicas do PVA dependem do grau de polimerização e do grau de hidrólise [20]. O grau de hidrólise tem um efeito significativo na solubilidade do PVA em água. O PVA com maior grau de hidrólise tem os grupos hidroxilo mais expostos, o que faz com que aumente as ligações de hidrogénio entre estes, levando assim a uma diminuição da solubilidade do PVA em água. O grau de cristalização do PVA depende, portanto, do grau de hidrólise, podendo induzir assim uma diminuição da solubilidade [21]. As soluções aquosas de PVA com um elevado grau de hidrólise apresentam também uma maior viscosidade, o que pode levar à formação de géis [17].

Para além disso, o PVA ainda apresenta outras propriedades, nomeadamente elevada biocompatibilidade, elevada biodegradabilidade e baixa toxicidade [18]. Isto faz com que seja utilizado em diversas aplicações biomédicas, como lentes de contacto, engenharia de tecidos e sistemas de entrega de fármacos [22].

1.3- Agentes antimicrobianos

Diferentes compostos para proporcionar atividade antimicrobiana aos materiais têm vindo a ser estudados. Compostos sintéticos orgânicos, compostos de amónia quaternária, poli-guaninas, N-halaminas, metais como a prata e polímeros naturais como o quitosano, foram alguns dos agentes que apresentaram efeito antimicrobiano [23].

1.3.1- Cisteína

A L-Cisteína é um aminoácido que está presente em muitos alimentos. Este aminoácido possui um grupo enxofre na sua cadeia lateral, figura 3 [24].

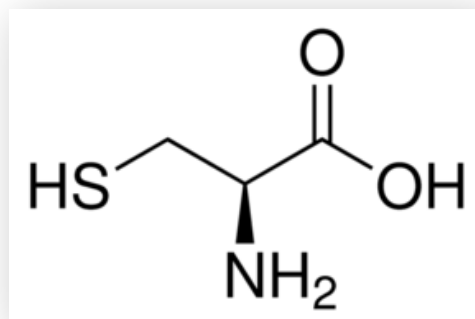


Figura 3- Estrutura química da L-Cisteína (adaptado de [25]).

As moléculas de cisteína podem ligar-se umas às outras formando um aminoácido dimérico chamado cistina. A cistina forma-se, portanto, através da ligação de duas L-Cisteínas pelos grupos de enxofre, ou seja, através de uma ligação dissulfureto (S-S), figura 4 [24].

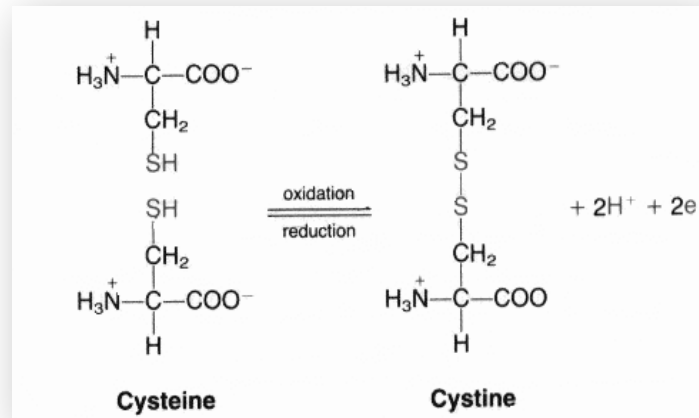


Figura 4- Formação de Cistina. Ligação entre moléculas de Cisteína por ligações dissulfureto (S-S) (adaptado de [26]).

Até à data, têm sido realizados vários estudos relativos à atividade antimicrobiana da L-Cisteína. Por exemplo, Kari *et al.* (1971) [24] verificou que a cisteína tem atividade antibacteriana contra *Escherichia coli*. Deste modo, sendo a L-cisteína um composto extremamente reativo é de prever que esta possa afetar várias reações enzimáticas *in vitro* e uma série de funções metabólicas desta bactéria, bem como de outros microrganismos [27]. Assim, L-cisteína inibe, portanto, a síntese de RNA e proteínas, e consequentemente o inibe o crescimento dos microrganismos [27].

Gomez *et al.* (1980) [28] abordaram o estudo sobre o efeito tóxico da cisteína sobre a *Salmonella typhimurium* cujos resultados indicam que o mecanismo de toxicidade pode dever-se à indução de cisões na cadeia de DNA na mesma. Recentemente, existem muitos estudos que mostram que o mecanismo de ação da cisteína tem alcançado resultados bastante interessantes. Esses resultados foram baseados na capacidade da L-cisteína exercer um efeito antimicrobiano em bactérias gram-positivas e gram-negativas, através de um mecanismo de distúrbio mecânico e de despolimerização das membranas celulares.

O efeito antimicrobiano dos grupos tiol foi anteriormente mencionado por Morris *et al.* (1984) [29] num estudo que estabelece convictamente a sua reação com os grupos sulfidril localizados na membrana celular de bactérias gram-positivas e gram-negativas. A interação entre o grupo tiol (SH) da cisteína com os grupos tíois da membrana celular causa alterações drásticas no metabolismo celular, provocando assim a redução do crescimento bacteriano. Por este motivo, os microrganismos dificilmente conseguirão desenvolver-lhe resistências. Neste caso, o crescimento microbiano só seria possível através de modificações na

organização e composição da parede celular, um processo que se torna muito dispendioso em termos energéticos. Para além disso, o fato da pectina ser um polímero natural também faz com que possua certa resistência à presença de microrganismos [30].

A resistência antimicrobiana da L-cisteína foi confirmada através de um estudo que envolve a utilização deste aminoácido na funcionalização da lã [30]. Os resultados obtidos neste estudo foram bastante promissores, uma vez que a lã funcionalizada com L-cisteína obteve um efeito antimicrobiano durável e sem danos citotóxicos para as células humanas [24].

1.4- *Electrospinning* ou eletrofiação

Electrospinning ou eletrofiação é uma técnica simples e versátil que utiliza forças eletrostáticas para produzir fibras de vários tamanhos que variam dos micrómetros até aos nanómetros. A técnica pode ser aplicada para produzir fibras de uma grande variedade de polímeros naturais, biodegradáveis, não - degradáveis, ou combinações destes [31].

Vários métodos de produção de fibras estão atualmente disponíveis tais como separação de fases, secagem, síntese de “modelos” e auto-montagem [2]. Embora essas tecnologias tenham alcançado bons resultados em diversas aplicações, o *electrospinning* tem-se tornado uma área de investigação muito procurada, o que vem incutir a facilidade de fabricar nanofibras através de uma grande seleção de materiais [32].

As fibras produzidas por *electrospinning* têm, por isso, algumas características que fazem com que estas tenham uma elevada aplicabilidade. Essas características são, portanto, elevada superfície por unidade de volume, elevada porosidade, rede de poros interconectada, diâmetro de menores dimensões, entre outras [31]. Estas características fazem com que as nanofibras produzidas por *electrospinning* sejam aplicadas em diversas áreas. Na eletrónica, as nanofibras formadas têm sido usadas como material para o ânodo das baterias de lítio, em máquinas eletrónicas micro e nano, e como nanomateriais óticos e elétricos [31]. As nanofibras têm uma aplicação como substrato catalítico devido à sua elevada área de superfície por unidade de massa [31]. Essas fibras também têm sido usadas para filtração do ar e têm sido fabricadas com sucesso em várias indústrias de filtração, como por exemplo, filtros com uma elevada eficiência de filtração e baixa resistência ao ar [31].

Os materiais nanofibrosos têm sido também investigados para absorção de água e adsorção de poluentes tais como tolueno e benzeno [31]. Por acréscimo, as membranas de nanofibras produzidas por *electrospinning* têm sido empregues no fabrico de sensores para a deteção de gases, substâncias químicas tais como ureia e fármacos tais como agentes anti-cancerígenos [31]. Na área da biomedicina, estas nanofibras têm recebido aceitação nas áreas de entrega de fármacos, entrega de genes, prevenção de adesões pós-operativas, têxteis para feridas e engenharia de tecidos [31].

1.4.1- Caracterização da técnica

O aparelho mais básico de *electrospinning* consiste em três componentes: uma fonte de alta voltagem ou tensão, um eléctrodo altamente condutor e um coletor separado a uma distância definida. No laboratório, o modelo mais comum é a seringa que armazena a solução polimérica com uma agulha como eléctrodo condutor, figura 5 [32].

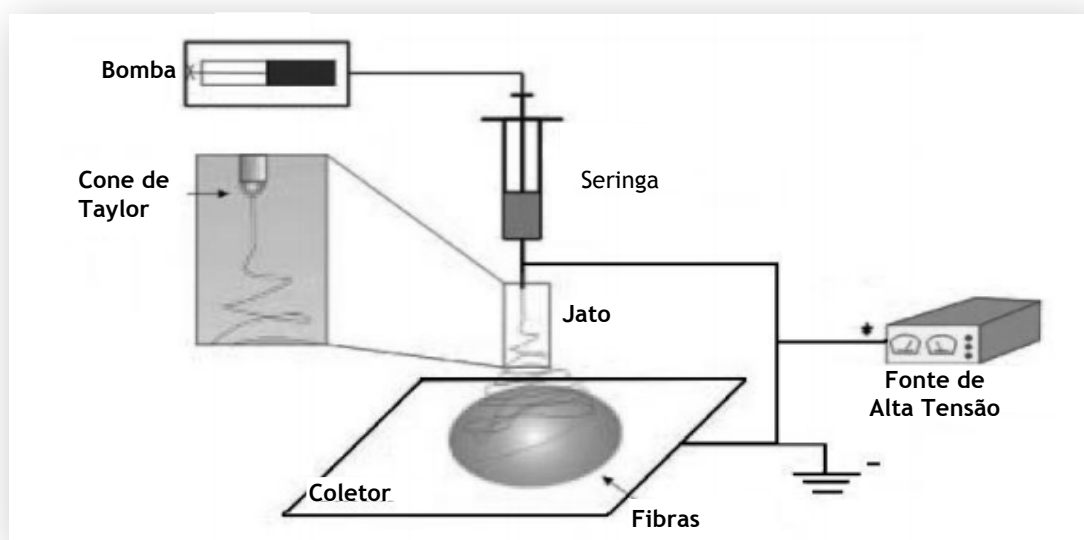


Figura 5 - Esquema de montagem de um sistema de *electrospinning* (adaptado de [33]).

O *electrospinning* pode ser encarado como um caso especial de *electrospraying*. Tal como acontece no *electrospraying*, uma seringa é carregada com uma solução onde é colocada uma agulha na sua extremidade. Esta combinação seringa-agulha é aplicada numa bomba para que um fluxo contínuo se produza da solução para a ponta da agulha. Por sua vez, o capilar é ligado a uma fonte de alta tensão para elevar o potencial eletrostático do fluido. Antes do processo começar, o campo elétrico aplicado entre a gota e o coletor é nulo. O aumento do potencial eletrostático aumenta a carga superficial do líquido. Logo, para o *electrospinning* ocorrer tem de ser aplicada uma alta voltagem à solução de polímero [34].

Normalmente, a saída da gota da ponta da agulha é ditada pela tensão superficial da solução. No entanto, quando o fluido é carregado, verifica-se uma acumulação de gotas na ponta da agulha, o que leva à formação de uma estrutura cônica, conhecida como “Cone de Taylor” [35]. A formação do Cone de Taylor é causada pelo equilíbrio existente entre as cargas elétricas induzidas na solução e a tensão superficial da mesma. Uma maior tensão superficial leva a um alongamento do cone. No limite máximo de tensão aplicada, um jato é projetado da ponta da agulha [36]. A figura 6 traduz o tipo de jato formado com o aumento do potencial.

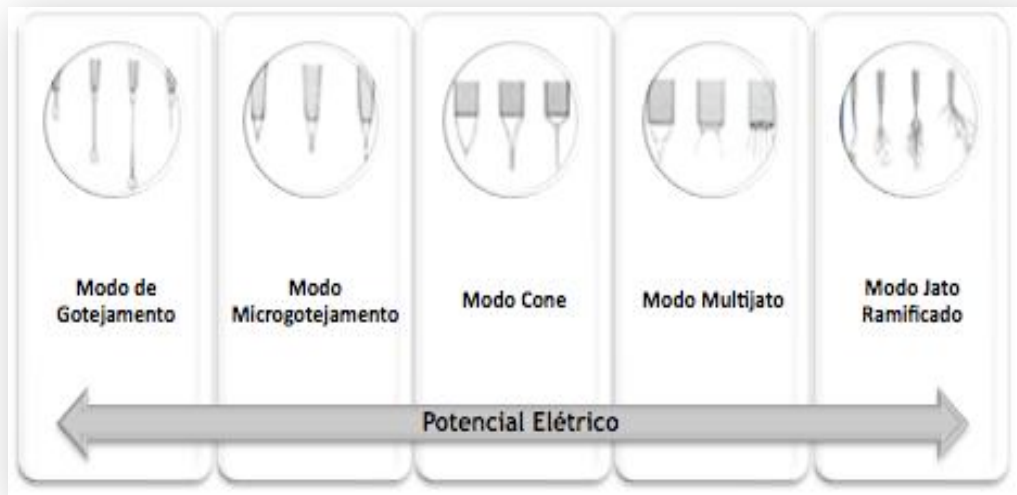


Figura 6 - Mudança na forma dos jatos emitidos pela ponta da agulha, contendo um líquido, em presença de um potencial elétrico crescente (adaptado de [34]).

No modo de gotejamento não existe campo elétrico e o líquido flui gota a gota [34]. À medida que a voltagem aplicada aumenta, vai-se iniciando o chamado microgotejamento. Neste, há um aumento na velocidade de gotejamento e uma diminuição do tamanho da gota. Este comportamento tem dois motivos: o líquido é atraído para o coletor devido à ação da voltagem aplicada e a tensão superficial é reduzida devido à acumulação de cargas na superfície da gota pendente [34]. Para voltagens mais elevadas inicia-se o modo cone, onde a gota é deformada pelo campo elétrico e assume a forma de Cone de Taylor. Este modo é o idealmente requerido para um bom processo de *electrospinning* [34]. Para voltagens muito elevadas, o modo cone torna-se instável e inúmeros jatos emergem à superfície do líquido: é o início do modo multijato. O número de jatos aumenta com o aumento da voltagem, podendo ocorrer ramificações devido à elevada quantidade de cargas elétricas no fluido [34]. O modo jato ramificado ocorre a voltagens bastante elevadas. O jato não possui uma espessura uniforme e um ou mais jatos emergem da superfície do fluido, sendo emitidos em várias direções [34]. Posteriormente, esses jatos resultantes do aumento da voltagem vão solidificar e conseqüentemente vão formar nanofibras, cujo seu diâmetro e a morfologia podem ser ajustados aos seguintes parâmetros do processo [31, 37, 38, 39, 40]:

1. Propriedades intrínsecas da solução, tais como propriedades do solvente, viscosidade da solução, condutividade elétrica e tensão superficial;
2. Condições operacionais, tais como a voltagem aplicada, a distância entre o eletrodo de *spinning* e o coletor, a velocidade de alimentação da solução polimérica;
3. Parâmetros ambientais tais como a temperatura da solução e humidade.

1.4.2 Parâmetros que influenciam o *electrospinning*

1.4.2.1- Propriedades intrínsecas da solução

1.4.2.1.1- Viscosidade da solução

A viscosidade é um dos principais parâmetros que afeta o processo de *electrospinning*. Para baixas concentrações de polímero, a tensão superficial aumenta e o jato divide-se em gotas [31]. Para concentrações superiores, a viscosidade aumenta, o que leva a uma maior agregação das moléculas de polímero e conseqüentemente ocorre a formação de nanofibras de diâmetro adequado. A concentração do polímero tem assim um grande efeito na viscosidade da solução, ou seja, para concentrações elevadas de polímero vão-se formar nanofibras de maior diâmetro. No entanto, para concentrações que ultrapassam um certo limite, a viscosidade da solução torna-se extremamente elevada, destruindo o fluxo da solução polimérica através da ponta da agulha [31].

Doshi *et al.* (1995) [41] investigaram o efeito da viscosidade no *electrospinning* de soluções aquosas de polióxido de etileno (PEO). Neste estudo observou-se que as nanofibras foram formadas em soluções com viscosidades entre 800 e 4000 cp. Abaixo dos 800 cp, o jato subdividiu-se em gotas e acima dos 4000 cp a formação da nanofibra tornou-se difícil, uma vez que a solução não expeliu da ponta da agulha. Concluindo-se que as nanofibras só se formaram num limite de valores de viscosidade.

O efeito da variação da viscosidade em soluções de PEO, assim como, a morfologia das nanofibras também foi investigado por Fong *et al.* (1999) [42]. Neste estudo verificou-se que com o aumento da viscosidade a morfologia das nanofibras alterou-se. Para baixas concentrações poliméricas, a existência de uma elevada tensão superficial do fluido fez com que o jato se transformasse em gotas. As forças viscoelásticas competiram assim com a tensão de superfície do jato e um aumento da viscosidade favoreceu a formação de nanofibras de diâmetro mais reduzido.

1.4.2.1.2- Condutividade elétrica

A condutividade elétrica da solução, embora desempenhe um papel menos importante, pode influenciar o tamanho das nanofibras. As soluções com maior condutividade exibem maior capacidade de induzir a corrente elétrica pois nas soluções altamente condutoras, o jato de fibras está sujeito a uma maior tensão superficial. Num estudo conduzido por Hayati *et al.* (1987) [43] verificou-se que soluções altamente condutoras foram extremamente instáveis na presença de fortes campos elétricos, o que levou à produção de nanofibras deformadas.

No entanto, líquidos semi-condutores, como óleo de parafina, produziram fibras relativamente estáveis. Zhang *et al.* (2005) [22] estudou o efeito da adição de iões a uma

solução aquosa de PVA. Neste estudo, quando a concentração de NaCl adicionado à solução aumentou, o diâmetro da nanofibra diminuiu. Os autores atribuíram essa diminuição ao aumento da condutividade induzido pelo NaCl.

Jiang *et al.* (2004) [44] investigaram a incorporação da albumina sérica bovina (BSA) em fibras de dextrano para entrega de fármacos ou engenharia de tecidos. Eles verificaram que a adição da BSA levou à diminuição do diâmetro da fibra. No entanto, a viscosidade do dextrano não foi alterada com o aumento da concentração da BSA, podendo-se assim concluir que a diminuição do diâmetro da fibra aconteceu devido ao aumento da condutividade da solução.

1.4.2.1.3- Tensão superficial

O processo de *electrospinning* só ocorre se a solução ultrapassar um determinado valor de tensão superficial. A tensão superficial tem como função diminuir a massa superficial por unidade de fluido, levando assim à agregação das moléculas de solvente e ao aumento do volume da gota [37].

Uma alta tensão superficial significa que a interação entre as moléculas de solvente e de polímero é mais significativa, ou seja, quando a solução está sob a ação de um campo elétrico, os solventes tendem a difundir-se à volta das moléculas de polímero [37]. Este fenómeno pode ser controlado pela escolha de um solvente apropriado com uma tensão superficial mais baixa.

1.4.2.2- Condições operacionais

1.4.2.2.1- Voltagem aplicada

Taylor (1969) [38] estudou o efeito da voltagem aplicada no *electrospinning*, e chegou à conclusão que a voltagem pode levar à instabilidade da gota e à diminuição do volume do cone. Isto significa que voltagens superiores a um determinado valor crítico podem levar à ejeção do jato de polímero do vértice do cone. Esse valor crítico de voltagem aplicada varia com o tipo de solução, existindo assim um valor ótimo de voltagem, para o qual a formação das nanofibras é desejável. Assim, uma voltagem superior ou inferior a esse valor crítico resultará na produção de nanofibras deformadas ou até na inibição do jato. No geral, quando a voltagem aumenta para além de certo valor crítico, o diâmetro da nanofibra inicialmente diminui e depois aumenta até atingir um certo ponto [38]. A diminuição inicial do diâmetro da nanofibra é atribuída a um elevado grau de formação do jato, como consequência de um aumento na voltagem.

Por sua vez Zong *et al.* (2002) [45] investigou o efeito da voltagem aplicada na morfologia das nanofibras de ácido poli-D,L lático (PDLA). Para uma voltagem de 20 kV, foram produzidas nanofibras deformadas. Quando a voltagem aumentou para 25 kV, o volume da gota diminuiu e a produção de fibras deformadas tornou-se mais evidente. Quando a voltagem aumentou para 30 kV, a gota desapareceu completamente e o jato emergiu da ponta da agulha. As nanofibras obtidas com essa voltagem tiveram diâmetros maiores tornando-se assim mais esféricas.

1.4.2.2- Distância entre a gota e o coletor

A distância entre a gota e o coletor influencia o tamanho e morfologia das nanofibras formadas. No entanto, o seu efeito é menos relevante comparativamente com as outras variáveis do processo. Uma distância ótima entre a gota e o coletor é desejável para a formação das nanofibras. Se a distância escolhida não estiver no intervalo das distâncias ótimas podemos verificar a formação de nanofibras deformadas [31].

Geralmente, com um aumento na distância entre a capilaridade e o coletor, o diâmetro das fibras diminui [31]. Para distâncias mais curtas, o solvente não tem tempo suficiente de se evaporar, o que faz com que as nanofibras se tornem mais redondas devido à secagem inadequada [31].

Relativamente ao *spinning* de PVA [39], gelano [46] e quitosano [47] não se verificou nenhum efeito significativo da distância entre a gota e o coletor sobre o tamanho e a morfologia da fibra.

O *spinning* da fibroína da seda produziu fibras mais redondas quando a distância foi maior e fibras mais planas quando a distância foi menor [48].

1.4.2.2.3- Velocidade de fluxo da solução

A velocidade de alimentação da solução polimérica através da agulha influencia o diâmetro, a porosidade e a geometria das nanofibras [31].

Como observado por Deitzel *et al.* (2001) [49] e por Zong *et al.* (2002) [45] o volume da gota polimérica no Cone de Taylor diminuiu com o aumento da voltagem, o que fez com que o jato não fosse ejetado sob a forma de Cone de Taylor [50].

Portanto, de modo a manter o tamanho do Cone de Taylor e evitar as deformações, uma velocidade de alimentação mínima do polímero tem de ser estabelecida [31]. Melgelski *et al.* (2002) [51] verificaram que o aumento do diâmetro e do tamanho do poro das nanofibras de poliestireno, esteve associado ao aumento da velocidade de fluxo da solução. Como a velocidade de fluxo aumentou, o volume de polímero utilizado foi maior. Quando a velocidade de fluxo foi ainda mais elevada, as nanofibras foram incapazes de secar

completamente antes de alcançar o coletor, o que levou assim à formação de nanofibras irregulares.

Noutro estudo realizado por Zong *et al.* (2002) [45], foi também demonstrado que houve deformação quando se usou velocidades de alimentação mais elevadas, tendo-se obtido nanofibras de maior diâmetro. Isto foi atribuído ao aumento do volume da gota na extremidade da agulha, que fez com que a solução tivesse uma trajetória mais rápida e resultasse na secagem incompleta e na formação de deformações.

1.4.2.3- Parâmetros ambientais

1.4.2.3.1- Temperatura

Em estudos anteriores, verificou-se que para temperaturas mais baixas, obteve-se nanofibras deformadas, e para temperaturas mais elevadas obteve-se fibras mais planas [39].

A formação das deformações foi inibida a temperaturas mais baixas por variação de outros parâmetros do processo de *electrospinning* [39].

Num estudo com nanofibras de PVA [39] verificou-se que as suas espessuras variaram entre 0 e 560nm. Sabe-se que, com o aumento da temperatura, a viscosidade diminui e, portanto, a voltagem crítica requerida para o *electrospinning* diminui quando se usa uma temperatura mais elevada.

1.4.2.3.2- Humidade

A humidade do meio que rodeia o *electrospinning* tem influência na solução polimérica. Quando a humidade é elevada, é provável que a água condense à superfície da fibra. Como resultado, esta pode ter influência na morfologia da fibra, especialmente quando polímeros dissolvidos em solventes voláteis como clorofórmio, diclorometano, CS₂, acetona, CHCl₃, THF, água, tolueno e DMF são utilizados [51, 52].

A humidade também determinará a velocidade de evaporação do solvente na solução. Quando a humidade é muito baixa, um solvente volátil pode evaporar muito rapidamente, pois a evaporação do solvente pode ser mais rápida do que a remoção do solvente da ponta da agulha. Como resultado, o processo de *electrospinning* pode só ser realizado durante alguns minutos antes da ponta da agulha ser obstruída [40].

1.4.3- Aplicações biomédicas das fibras produzidas por *electrospinning*

1.4.3.1- Engenharia de tecidos

Uma das áreas que envolve nanofibras produzidas por *electrospinning* é a medicina regenerativa. Um dos objetivos da engenharia de tecidos é usar *scaffolds* como análogos da matriz extracelular ou substratos de suporte para as células que tenham sido revestidas nesta matriz [32]. O *scaffold* produzido serve assim para facilitar a ancoragem, migração, e proliferação das células para reproduzir a estrutura tridimensional do tecido a ser regenerado. Os *scaffolds* obtidos por *electrospinning* são atrativos para engenharia de tecidos porque têm propriedades biomiméticas, caracterizadas por diâmetros da fibra no intervalo de submicro, elevada razão área/volume, alta porosidade, distribuição variável do diâmetro do poro, e também por uma grande capacidade de serem manipulados numa variedade de tamanhos e formas, ou seja, as propriedades físico-químicas do *scaffold* podem ser ajustadas à sua função no organismo [32]. Assim, com o objetivo de estudar as interações entre as células e a matriz extracelular muitos estudos têm sido realizados. Esses estudos provaram que os diâmetros das fibras produzidas por *electrospinning* estão em conformidade estrutural com a matriz extracelular e são da ordem de 80-500 nm [32]. Foi também descrito que a diminuição do diâmetro da nanofibra pode levar a um aumento da biocompatibilidade do material. Num estudo realizado por Boland *et al.* (2004) [53] verificou-se que uma elevada razão área/volume e um menor diâmetro podem ajudar a aumentar a biocompatibilidade, observando-se, assim, uma maior capacidade das células aderirem às fibras.

Outro parâmetro muito importante para o crescimento celular é o grau de porosidade e a dimensão média do poro dos *scaffolds* de nanofibras. Dependendo do tipo de célula, os diâmetros ótimos do poro são 20-100 μm [54]. Além disso também é possível verificar que as células são fáceis de migrar quando o diâmetro do poro ronda os 100 μm [55].

Vários polímeros naturais e sintéticos têm sido usados para produzir tecidos. Recentemente, a fibroína da seda tem ganho imensa popularidade na área da engenharia de tecidos. A fibroína exibe boa biocompatibilidade, boa cristalinidade, boa elasticidade, boa resistência à tração, dureza e resistência à rutura na compressão. Esta proteína foi originalmente produzida para engenharia de tecidos de ligamentos mas tem sido também usada para engenharia de tecidos vasculares, ósseos, e dérmicos [32]. Outro exemplo de aplicação na engenharia de tecidos pode ser dado pela produção de *scaffolds* a partir de misturas poliméricas de pectina/quitosano/PVA [56]. Esta mistura polimérica permitiu produzir um *scaffold* rugoso para crescimento de fibroblastos durante a cura da ferida, com um tamanho da fibra semelhante às fibras de colagénio da matriz extracelular, esse tipo de *scaffold* foi capaz de promover a rápida regeneração do tecido. Assim, com um crescimento celular mais lento, o *scaffold* de pectina/quitosano/PVA ofereceu uma resistência mecânica semelhante à da pele natural.

1.4.3.2- Entrega de fármacos

O objetivo do desenvolvimento de um sistema de entrega de fármacos é permitir a libertação do fármaco a uma velocidade controlada num período de tempo desejado [57].

As nanofibras produzidas por *electrospinning* apresentam características especiais para poderem ser aplicadas na entrega de fármacos. Estas características são: área superficial elevada (que está relacionada com uma maior velocidade de dissolução), facilidade de incorporação do fármaco e rápida cristalização [57, 58]. Para além disso, várias biomoléculas têm sido incorporadas com sucesso nas nanofibras para libertação do fármaco, tais como DNA, proteínas e enzimas [57].

Em termos do processo, há dois métodos diferentes de incorporar biomoléculas em fibras: *electrospinning* de fusão e *electrospinning* co-axial. No *electrospinning* de fusão, as moléculas de fármaco estão fundidas ou misturadas com o polímero e o *electrospinning* desta mistura forma fibras encapsuladas com o fármaco. Isso já não se verifica para o *electrospinning* co-axial, uma vez que o *electrospinning* do polímero e do fármaco produz nanofibras sob a forma de “núcleos”. O *electrospinning* co-axial é o mais favorável no fabrico de *scaffolds* nanofibrosos para entrega de fármacos. A libertação de fatores de crescimento é mais controlada para nanofibras em forma de “núcleos” do que para nanofibras produzidas através do *electrospinning* de fusão [57].

Muitos sistemas de entrega de fármacos são desenvolvidos especificamente para várias aplicações, tais entrega por via oral, entrega direcionada ao colón, quimioterapia e até prevenção da transmissão do HIV. Park *et al.* (2012) [59] criaram um sistema linear de entrega de fármacos de nifedina usando um método de produção simples para entrega por via oral. Por exemplo, as fibras de aceto ftalato de celulose (CAP) produzidas por *electrospinning* foram incorporadas com fármacos antivirais para prevenir a transmissão do HIV do homem para a mulher. Os resultados deste processo mostraram que a prevenção do HIV é mais eficaz no esperma do que no fluido vaginal, uma vez que as fibras de CAP foram mais solúveis no esperma, que tem um pH entre 7,4 e 8,4, do que na vagina que tem um pH abaixo de 4,5 [59].

As fibras de CAP são atóxicas para células epiteliais, e por este motivo não conseguem impedir a proliferação da microflora vaginal. Para além disso, as fibras de CAP sem fármacos anti-HIV também inibiram a infeção das células CD4+ e TZMbl *in vitro*. No entanto, são necessários mais estudos *in vitro* para explorar o potencial das fibras de CAP na prevenção da transmissão do HIV [59].

Embora as fibras produzidas por *electrospinning* sirvam como excelentes transportadores de fármacos, ainda há algumas questões que precisam de ser resolvidas. O perfil de libertação do fármaco das fibras tem sido um dos principais problemas encontrados pelos investigadores, principalmente para concentrações elevadas devido à agregação das moléculas do fármaco perto da superfície das fibras [57, 60]. Isto acontece sempre quando os

fármacos são diretamente encapsulados ou misturados com a solução de polímero para *electrospinning*.

Outro desafio enfrentado pelos investigadores na área de entrega de fármacos é confirmar se a bioatividade ou a eficiência funcional do fármaco não é afetada por condições adversas durante o processo de produção ou pelos próprios sistemas de entrega. A ultrasonificação realizada na preparação da solução polimérica e a alta voltagem aplicada durante o *electrospinning* podem alterar a estrutura do fármaco [61]; O DNA incorporado em partículas de quitosano apresenta uma eficiência de transfecção relativamente elevada em relação à entrega sem transportador [62].

1.4.3.3- Revestimentos para feridas

Os revestimentos para feridas têm como objetivo acelerar o processo de reparação da ferida [58, 64]. As nanofibras produzidas por *electrospinning* são excelentes candidatas a têxteis biomédicos, pois apresentam características únicas, tais como elevada razão área/volume, elevada porosidade e elevada capacidade de incorporação do agente antimicrobiano [57, 63]. Estas características das nanofibras fazem com que desempenhem determinadas funções no processo de cura de feridas, tais como absorção do sangue, prevenção da secagem da ferida, prevenção da ferida contra a infecção bacteriana e permeação a gases [57, 63].

Um dos estudos realizados com têxteis biomédicos envolveu a imobilização da enzima lítica lizostatina (Lst) em nanofibras baseadas em celulose [64]. As nanofibras de celulose, celulose/quitosano e celulose/acrílico polimetil metacrilato (PMMA) foram funcionalizadas com Lst através de oxidação, *cross-linking* e hidrólise, respetivamente. As nanofibras oxidadas e hidrolisadas mostraram neutralização completa da atividade de *Staphylococcus aureus* em ensaios antimicrobianos. Um teste *in vitro* em que foram utilizados queratinócitos mostrou que as fibras de celulose oxidadas inibiram completamente o crescimento do *Staphylococcus aureus*, o que demonstra que estas nanofibras funcionalizadas com Lst têm potencial para superar a resistência desta estirpe à metilcilina. Além disso, as nanofibras de celulose não revelaram qualquer tipo de toxicidade em queratinócitos, o que reforçou a hipótese de que estas nanofibras são biocompatíveis.

Noutro estudo realizado por Schneider *et al.* (2013) [65], os fatores de crescimento (EGF) foram incorporados em nanofibras de fibroína, com o objetivo de investigar o aumento da velocidade de re-epitelização durante o processo de cicatrização da ferida. O perfil de libertação inicial do EGF é considerado favorável porque ajuda rapidamente a ativar os queratinócitos. Um modelo *in vitro* da pele humana foi usado para investigar a eficácia das nanofibras na cicatrização da ferida. Desta forma, verificou-se que a velocidade de cicatrização de feridas foi muito maior nas nanofibras da seda funcionalizadas com EGF do que nas nanofibras sem EGF.

Vários materiais poliméricos podem ser usados para cura de feridas e a fácil incorporação do agente bioativo pode fornecer atividade antimicrobiana e promover o crescimento do tecido [66]. Os polímeros sintéticos, tais como poliuretano (PU), PLA, PCL e PLGA têm um grande potencial para serem aplicados em têxteis biomédicos, pois apresentam boas propriedades mecânicas [66]. No entanto, a sua natureza hidrofóbica faz com que eles tenham uma baixa afinidade com a água, o que pode levar a uma diminuição na velocidade de cura da ferida. Este problema pode ser ultrapassado com a conjugação de polímeros sintéticos hidrofóbicos a polímeros naturais hidrofílicos. Logo, os polímeros naturais hidrofílicos tais como quitosano, gelano, dextrano, acetato de celulose e colagênio são sempre usados em dispositivos médicos, pois a hidrofiliabilidade é essencial para acelerar o processo de cura de ferida [57]. A avaliação *in vitro* e *in vivo* da atividade dessas fibras à base de polímeros compostos têm confirmado o seu potencial na área dos têxteis biomédicos.

No entanto, o aspecto mecânico dos têxteis biomédicos tem sido sempre focado. Em termos práticos, o módulo de elasticidade, que indica a dureza, deve ser suficientemente elevado para evitar a fácil degradação do têxtil no processo de cura. No entanto, as propriedades mecânicas do fármaco variam após interação com o ambiente aquoso da vizinhança da ferida. Por exemplo, o módulo de elasticidade das nanofibras de quitosano/PLGA diminuiu significativamente de 178.7 ± 50.4 MPa no estado seco para somente 2.42 ± 0.54 MPa no estado húmido [67]. Estes valores estão fora do intervalo de forças tênsis da pele humana, que está entre 15 e 150 MPa [67]. Outro estudo realizado por Liu *et al.* (2010) [68] mostrou que a força tênsil do algodão é significativamente maior do que a de polímeros como PVA, poliácridonitrilo (PAN), PCL, PAN-PU, entre outros. A incorporação de um polímero hidrofóbico pode baixar a sua força tênsil e daí ser necessário verificar a força tênsil antes e durante o processo de cura *in vitro*, especialmente quando são utilizados polímeros hidrofóbicos.

1.4.4- *Electrospinning* da mistura Pectina/PVA

As nanofibras têm sido utilizadas em diversas aplicações biomédicas, como produção de *scaffolds* para engenharia de tecidos, sistemas de entrega de fármacos e têxteis biomédicos. A grande vantagem das nanofibras é a elevada porosidade por unidade de área e o diâmetro na ordem dos nanômetros. Para além disso, as nanofibras também podem apresentar uma morfologia semelhante à matriz extracelular, o que pode ser útil na formação de *scaffolds* para engenharia de tecidos, pois pode promover a adesão, migração e proliferação celular [33]. Uma técnica simples, eficaz e inovadora de produzir nanofibras é o *electrospinning*. O *electrospinning* é um processo de produção de fibras de polímero que variam entre o micrómetro e o nanómetro por uso de um campo elétrico [32].

Um dos polímeros mais utilizados no *electrospinning* é o quitosano, que tem sido muito utilizado na regeneração da pele [57]. O quitosano é biodegradável, biocompatível e

pode aumentar a regeneração da ferida por migração dos fibroblastos na matriz extracelular durante os primeiros dias [69]. No entanto, os hidrogéis de quitosano não apresentam resistência mecânica suficiente para serem usados em aplicações biomédicas. Como resultado, outros componentes, tais como gelano, colagénio e fibroína foram utilizados para produção de fibras com maior resistência mecânica e melhor performance biológica [70].

A pectina é um polissacarídeo aniónico natural que é extraído das paredes celulares das plantas [13]. Alguns estudos com a pectina mostraram que este polímero tem melhor biocompatibilidade, maior solubilidade em água e maior resistência mecânica em relação a outros polímeros naturais [56]. Para além disso, também tem a particularidade de ser um polieletrólito aniónico devido aos grupos carboxilos dos ácidos galacturónicos [9, 13, 71], o que faz com que reaja com catiões divalentes, como cálcio, de modo a formar hidrogéis que, posteriormente, vão contribuir por, exemplo, para a regeneração óssea [72].

Muitos progressos têm sido feitos com o objetivo de produzir nanofibras de pectina através de *electrospinning*. Por exemplo, Lin *et al.* (2013) [56] estudaram as nanofibras de pectina/quitosano como *scaffolds* para regeneração da pele. Estes investigadores observaram que essas nanofibras tiveram uma resistência mecânica e um diâmetro semelhante ao das fibras de colagénio da matriz extracelular, promovendo assim a regeneração rápida do tecido. Esta funcionalidade faz com que as nanofibras de pectina sejam fortes candidatas a serem utilizadas na engenharia de tecidos.

No entanto, o *electrospinning* de polímeros naturais nem sempre foi tarefa fácil e houve várias razões para que isso acontecesse. Por exemplo, em polímeros naturais carregados negativamente, como o alginato, e em polieletrólitos carregados positivamente, como o quitosano, as interações repulsivas entre os iões, levaram a uma diminuição da sua viscosidade em solução aquosa, tornando difícil o processo de *electrospinning* [73, 74]. Deste modo, para ultrapassar estas dificuldades, adicionaram um polímero sintético, como PVA, escolhido pelas seguintes razões:

1. O PVA interage fortemente com os polímeros naturais através de ligações de hidrogénio [73, 74];
2. O *electrospinning* do PVA pode ser realizado em solução aquosa [75];
3. Melhora as propriedades mecânicas dos polímeros naturais [74].

Até á data, o PVA já foi utilizado em muitos polímeros naturais como quitosano [73], alginato [74] e gelano [76].

As nanofibras de pectina/PVA são um biomaterial que pode ser bastante promissor para ser aplicado em têxteis biomédicos devido à elevada biocompatibilidade e biodegradabilidade. No entanto, os têxteis biomédicos têm de cumprir certos requisitos, sendo o mais imprescindível, a actividade antimicrobiana. Os têxteis biomédicos devem, portanto, ser resistentes à contaminação por bactérias e fungos patogénicos, que podem comprometer a qualidade dos mesmos e provocar doenças graves na população.

Capítulo 2

Materiais e Métodos

2.1- Materiais

Os materiais usados no decorrer deste trabalho estão descritos na tabela 1 e 2.

Tabela 1- Reagentes usados no decorrer do trabalho.

Reagentes	Marca
Poli (vinil álcool) (PVA) (MM 115000Da) Grau de hidrólise: 87 % Grau de polimerização: 87 %	BDH
Pectina comercial Grau de esterificação: 25 %	Obi Pektin D075
L-Cisteína	Sigma Aldrich
Meios de Cultura	Marca
Mueller Hinton Broth (MHB)	LiofilChem
Nutrient Agar (NA)	Panreac
Nutrient Broth (NB)	Panreac

Tabela 2- Equipamentos usados no decorrer do trabalho.

Equipamentos	Marca e Modelo
<i>Electrospinning</i>	Elmarco's, Nanospider Laboratory (NS LAB 500)
SEM	Hitachi Field Emission S-3400 Type II
Viscosidade	Haake Rheo Rheometer RS 150
Condutividade	Inolab, level 2
Autoclave	Advantage Lab - ALO2-03-100
Câmara de Fluxo Laminar	TopSafe 1.2 BioAir EuroClone
Vórtex	Heidolph Reax top Vidrolab 2
Densitômetro McFarland	Grant-bio DEN-1
Agitador Orbital	Agitorb 200 Aralab
Estufa de Incubação	Memmert

2.2- Métodos

2.2.1- Configuração do *Electrospinning*

O NS LAB 500, especialmente concebido para o desenvolvimento de estruturas planares (têxteis ou não têxteis), foi utilizado para realizar o processo de *electrospinning*, figura 7. Este sistema ao contrário dos normalmente utilizados, não possui bomba de seringa nem agulha. Neste caso, elétrodos cilíndricos de aço inoxidável em constante rotação são utilizados. Ou seja, este sistema possui diferentes elétrodos cilíndricos, os quais são escolhidos consoante a aplicação.



Figura 7- Sistema de *electrospinning* utilizado.

Neste trabalho foi selecionado o elétrodo cilíndrico de arames, figura 8 uma vez que permite trabalhar numa vasta gama de viscosidades, sendo recomendado para a maioria das soluções preparadas em solventes orgânicos e/ou inorgânicos ou em água.



Figura 8- Elétrodo de spinning cilíndrico de arames.

Relativamente ao funcionamento do sistema o princípio é o mesmo dos restantes sistemas. As gotas formam-se nos elétrodos cilíndricos, em constante rotação, que se encontram mergulhados na solução (ao invés da gota formada na extremidade de uma agulha). Isto permite a existência de inúmeras (centenas) de gotas que mediante a aplicação da tensão originarão os correspondentes cones de Taylor e as respetivas nanofibras. É um sistema prático, eficiente, e caracterizado por permitir não só a deposição em multicamada das nanofibras num coletor planar, como uma constante velocidade de alimentação e uma excelente anisotropia da deposição das nanofibras. Além disso é possível a produção de maiores quantidades, em menor espaço de tempo, tendo em conta que os restantes sistemas suportam 1-8 seringas no máximo (1-8 gotas).

À semelhança dos restantes sistemas, o NS LAB 500 é composto por uma fonte de alimentação de alta voltagem, a qual pode ser controlada por um painel de controlo e por um coletor no qual se depositam as fibras.

No entanto, ao contrário da maioria dos sistemas, este apresenta uma câmara de *spinning* e um painel de controlo. A câmara de *spinning* consiste na área de operação. Esta área confere maior proteção e segurança. O painel de controlo, por sua vez, permite controlar as condições operacionais (distância entre o elétrodo e o coletor, rotação do elétrodo, voltagem aplicada, corrente aplicada) que podem influenciar o processo de *electrospinning* e conseqüentemente a morfologia e as propriedades das fibras obtidas, figura 9.



Figura 9- Painel de controlo do sistema de *electrospinning* utilizado.

2.2.2- Preparação das soluções poliméricas

Solução de Poli (vinil álcool) (PVA). O PVA foi dissolvido em água destilada, sobre agitação vigorosa, a uma concentração de 10% (m/V). Para facilitar a dissolução do PVA a solução foi aquecida a 85°C durante 5 h.

Solução de Pectina. A pectina foi dissolvida em água destilada, sobre agitação vigorosa, a uma concentração de 4% (m/V). A dissolução da pectina na solução foi realizada à temperatura ambiente durante 2h.

Solução de Pectina/PVA. De forma a avaliar a influência do PVA e da pectina na formação de fibras, foram preparadas soluções de polímero em diferentes proporções Pectina/PVA. As soluções foram preparadas com base nas combinações selecionadas de Pectina/PVA: 70:30 (v/v); 50:50 (v/v); 30:70 (v/v).

Solução de Pectina/PVA/L-Cisteína. De forma a avaliar a influência da L-Cisteína na formação das nanofibras e o efeito antimicrobiano que esta pode apresentar, foi preparada uma solução de mistura Pectina/PVA/L-Cisteína. A solução final foi preparada através de uma solução Pectina/PVA na proporção 30:70 à qual foi adicionado 2% de L-Cisteína.

2.2.3- Avaliação das propriedades da Solução

2.2.3.1- Avaliação da Viscosidade

A viscosidade foi uma das propriedades da solução estudada. Para tal, recorreu-se a um reómetro de tensão controlada (Haake Rheo Rheometer RS 150) com cone e prato (ângulo $0,5^\circ$ e diâmetro 35 mm), figura 10.



Figura 10 - Reómetro utilizado para medição da viscosidade da solução.

No decorrer do ensaio, cada uma das soluções foi colocada em quantidade suficiente sobre o prato e foram realizados testes de varrimento de tensões entre 0,00 a 100 Pa para uma frequência fixa de 1Hz. Além disso, foram realizadas curvas de escoamento da solução variando a taxa de deformação entre 0,1 e 700 s⁻¹.

Os resultados obtidos para a tensão de corte (τ), velocidades de corte ($\dot{\gamma}$) e viscosidade aparente foram posteriormente transferidos para o Microsoft Office Excel onde foi realizado o tratamento dos resultados e, conseqüentemente determinada a viscosidade das soluções de polímero.

2.2.3.2- Avaliação da Condutividade

A condutividade das soluções foi medida no condutivímetro (Inolab, level 2), devidamente calibrado, figura 11. Este equipamento permite medir diretamente a condutividade da solução, de forma eficiente e prática.



Figura 11 - Condutivímetro utilizado para medição da condutividade da solução.

2.2.4- Processo de *electrospinning*

As soluções previamente preparadas foram adicionadas a uma cuba que contem, devidamente colocado, o elétrodo cilíndrico de arames. Assim, após se transferir para a cuba, que se encontra na câmara de *spinning*, cada solução o processo de *electrospinnig* foi iniciado.

A diferença de potencial aplicada durante o processo de *electrospinnig*, a corrente aplicada, a velocidade de rotação do elétrodo e a distância entre o elétrodo e o coletor foram

os parâmetros de *electrospinning* estudados e otimizados. Na tabela 3 encontra-se registrado os valores aplicados dos parâmetros que influenciam o processo de *electrospinning*.

Tabela 3 - Parâmetros aplicados no processo de *electrospinning*.

Pectina/PVA (V/V)	Voltagem (Kv)	Corrente (Ma)	Rotação do elétrodo (rpm)	Distância elétrodo- coletor (cm)
70:30	72,000	0,032	7,000	18,000
50:50	75,000	0,070	7.000	17,000
30:70	73,700	0,063	7.000	17,000
10% PVA	71,000	0,027	7,000	18,000

2.2.5- Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM)

A morfologia das fibras foi analisada por microscopia eletrônica de varrimento (SEM). As nanofibras resultantes do processo de *electrospinnig* foram analisadas em um microscópio eletrônico de varrimento, Hitachi Field Emission S-3400 Type II equipado com Bruker x-flash 5010 a alto vácuo, operando a 20 kV. Antes da observação as amostras com as nanofibras foram revestidas com uma camada de ouro, no sputter coater (Biotech SC005), durante 60 s.

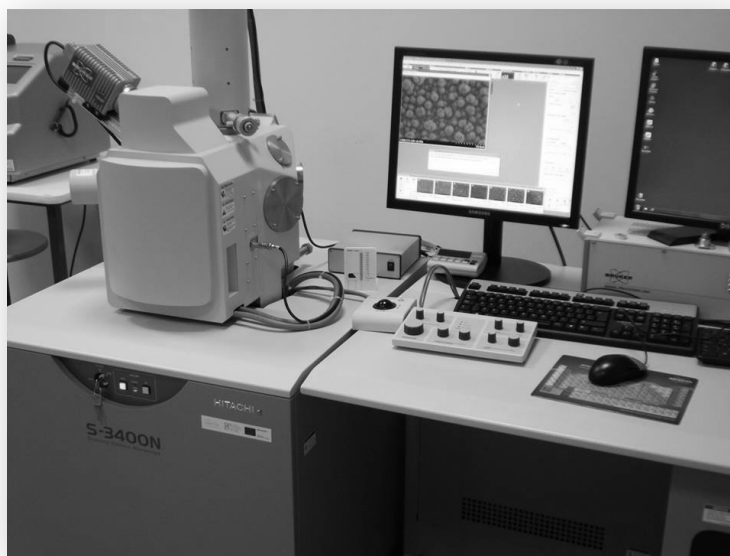


Figura 12 - Microscópio Eletrônico de Varrimento (SEM) utilizado para avaliar a morfologia das nanofibras.

2.2.6- Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC)

A determinação da concentração mínima inibitória (MIC) foi realizada pelo método de microdiluição em caldo, em placas de 96 poços.

Por definição, o MIC é a menor concentração do agente antimicrobiano que é necessária para impedir o crescimento visível de um microrganismo. A determinação do MIC permitiu, desta forma, quantificar a quantidade de L-Cisteína a ser utilizada na preparação das misturas Pectina/PVA. Para avaliar o MIC das misturas de Pectina/PVA com e sem L-Cisteína foram utilizadas as estirpes bacterianas *Staphylococcus aureus* (ATCC6538) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC11296). Este ensaio foi realizado segundo a norma descrita na NCCLS (*National National Committee for Clinical Laboratory Standards*, 1997, 2002) em que as bactérias foram incubadas durante 24h a 37°C, usando o meio Mueller-Hinton.

Assim, de acordo com esta norma, o MIC foi determinado por diluições em série no mesmo tipo de meio (Mueller-Hinton), partindo de uma solução composta por 10 mg/ml de pectina misturada com uma solução de 56 mg/ml PVA, numa proporção Pectina/PVA 30:70. A esta mistura foi adicionado 20 mg/mL L-Cisteína. Deste modo, 50 µl de inóculo bacteriano (solução de trabalho) foi adicionado a cada poço, já contendo 50 µl da solução de Pectina/PVA com L-Cisteína. A placa de 96 poços foi, posteriormente, incubada durante 24 h a 37°C. O mesmo procedimento foi efetuado para a solução de Pectina/PVA sem L-Cisteína e para a L-Cisteína.

Capítulo 3

Resultados e Discussão

As condições experimentais foram otimizadas para permitir a obtenção de estruturas com características únicas e altamente desejáveis. A otimização das condições operacionais do *electrospinning* e das propriedades da solução foram feitas em paralelo, uma vez que estas variáveis dependem sempre uma da outra.

Relativamente às propriedades de solução, efetuou-se um estudo aprofundado a cerca da influência da concentração de pectina e PVA na formação das nanofibras. Este parâmetro tem uma influência determinante sob outras propriedades da solução, nomeadamente sobre a viscosidade e a condutividade da solução o que conseqüentemente irá influenciar as características das nanofibras obtidas.

Simultaneamente, foi realizada uma análise das condições operacionais mais importantes. Desta forma, a distância entre o eletrodo e o coletor, a velocidade de rotação do eletrodo e a diferença de potencial aplicada foram os parâmetros ajustados e deste ajuste resultaram as estruturas de nanofibras. Uma vez ajustadas as condições operacionais, estas foram mantidas fixas ao longo de todo o processo investigativo.

3.1 Avaliação das Propriedades da Solução

3.1.1 Efeito da variação da concentração

De forma a estudar a influência do PVA na formação das nanofibras, prepararam-se soluções com diferentes proporções de PVA. Para isso uma solução de 4% pectina foi misturada com uma solução de 10% PVA em diferentes proporções (Pectina/PVA 100/0; 70/30; 50/50; 30/70).

A junção do polímero sintético, PVA, à pectina foi pensada face à dificuldade/impossibilidade de produzir nanofibras de pectina no *electrospinning*. Esta impossibilidade é devida à fraca *electrospinnability* da solução de pectina provocada pelas cargas elétricas, nomeadamente pelas forças repulsivas existentes entre os polianiões [9]. Além disso, a pectina apresenta fracas propriedades mecânicas logo a mistura com um polímero sintético, nomeadamente, com o PVA permitiu superar este problema, resultando numa mistura com as características desejadas [73, 74, 75]. Desta forma, a interação intermolecular do PVA com a pectina através de ligação de hidrogénio aumentou substancialmente a *electrospinnability* da pectina e conseqüentemente permitiu que fossem produzidas as nanofibras pretendidas. Ou seja, a interação entre o PVA e as cadeias poliméricas da pectina reduziu as forças repulsivas existentes entre as moléculas de pectina.

Assim, para todas as misturas de Pectina/PVA analisadas (Pectina/PVA: 70/30; 50/50; 30/70) verificou-se que o aumento da quantidade de PVA nas misturas possibilitou a deposição de nanofibras na superfície do coletor, em vez de pequenas *beads* como verificado para as proporções com maior quantidade de pectina.

3.1.2 Efeito da Viscosidade e da Condutividade

A viscosidade da solução aumenta com o aumento da concentração do polímero. Este fator é determinante para o sucesso do processo de *electrospinning* [42, 77]. Assim, à medida que a viscosidade aumenta, a forma adquirida pelo jato da solução passa de pequenas gotas esféricas para gotas mais estiradas, até que um valor mínimo que suporta um estiramento contínuo é atingido. Nesse ponto um filamento uniforme é originado. No entanto, uma viscosidade excessivamente elevada pode dificultar a saída da solução do eletrodo e conseqüentemente afetar a trajetória do jato até ao coletor [31].

Desta forma, no presente estudo a viscosidade obtida para as misturas de Pectina/PVA aumentou ligeiramente com o aumento da quantidade de PVA, tabela 4. Nesse sentido, foi obtido um valor de viscosidade mais baixo para a mistura Pectina/PVA 70:30, 0,1964 Pa.s, e um valor mais alto para a mistura Pectina/PVA 30:70, 0,3519 Pa.s. Relativamente, à solução de 10% PVA a viscosidade foi bastante mais elevada, 0,8412 Pa.s, o que está de acordo com um estudo realizado por Supaphol *et al.* (2007) que observou um valor de 0,810 Pa.s para uma solução de PVA com a mesma concentração [78].

Tabela 4 - Valores de viscosidade obtidos a partir das soluções Pectina/PVA preparadas.

Pectina/PVA (V/V)	Viscosidade (PA.s)
100:0	0,2168
70:30	0,1964
50:50	0,3160
30:70	0,3519
0:100	0,8412

Por sua vez, a condutividade da solução influencia o modo como a solução se comporta por ação da diferença de potencial. Este parâmetro é importante pois no processo de *electrospinning* a formação das nanofibras ocorre devido ao estiramento da solução polimérica causado pela aplicação de uma elevada diferença de potencial. Assim, quanto

maior é a condutividade da solução, maior é também a repulsão das cargas superficiais. Isto provoca um maior estiramento da solução e conseqüentemente o diâmetro das fibras é menor e a formação de *beads* é reduzida [79].

Os valores de condutividade obtidos neste trabalho para as misturas de Pectina/PVA aumentaram com o aumento da quantidade de pectina, tabela 5. Este aumento deve-se ao facto da pectina ser um polieletrólito enquanto o PVA é um polímero não iónico. Assim, a condutividade das misturas diminuiu de $4,72 \pm 0,020$ mS/cm para $0,18 \pm 0,008$ mS/cm, valores correspondentes à solução de 4% pectina e 10% PVA. No entanto, quando a quantidade de pectina foi excessivamente elevada, os valores de condutividade foram também bastante altos e conseqüentemente as forças repulsivas entre os grupos iónicos, nomeadamente entre os grupos carboxílicos do ácido galacturónico impossibilitaram a formação das nanofibras, o que comprova a dificuldade em produzir fibras nos *electrospinning* com a solução de 4% pectina [9, 13, 80].

Este resultado está de acordo com o obtido num estudo realizado por Islam *et al.* (2010) em que o PVA foi adicionado à solução de alginato de forma a melhorar a sua *electrospinnability* [81].

Tabela 5 - Valores de condutividade obtidos a partir das soluções Pectina/PVA preparadas.

Pectina/PVA (V/V)	Condutividade (mS/cm)
100:0	$4,72 \pm 0,020$
70:30	$3,36 \pm 0,010$
50:50	$2,18 \pm 0,030$
30:70	$1,30 \pm 0,006$
0:100	$0,18 \pm 0,008$

Assim, tanto a viscosidade como a condutividade da solução influenciam a morfologia das fibras e a *electrospinnability* da solução.

3.2 Caracterização das fibras

A morfologia das nanofibras obtidas foi determinada por microscopia eletrónica de varrimento (SEM).

A figura 11 mostra as imagens SEM das nanofibras obtidas através das soluções preparadas com diferentes proporções Pectina/PVA (Pectina/PVA 100/0; 70/30; 50/50;

30/70). As imagens evidenciam uma melhoria na qualidade das nanofibras com o aumento da concentração de PVA.

A imagem SEM correspondente à solução de 10% PVA demonstra que fibras lisas e homogêneas foram obtidas com diâmetro médio de 752,400 nm, num intervalo compreendido entre os 379 nm e os 1350 nm, figura 11 (a). Este intervalo é semelhante ao obtido num estudo realizado por Alhosseini *et al.* (2008) em que para a solução de PVA o diâmetro médio das fibras foi 744 nm, num intervalo correspondido entre os 395 nm e os 1105 nm [82].

No entanto, quando a quantidade de pectina foi significativamente aumentada nas misturas verificou-se uma tendência para formar *beads*. Esta tendência deve-se às forças repulsivas existentes entre os grupos iónicos da pectina, o que faz com que a formação de nanofibras seja dificultada. Ou seja, sendo a pectina um polieletrólito a densidade de carga na superfície do jato formado durante o *electrospinning* é maior. Assim, numa proporção adequada a pectina provoca um maior estiramento da solução e conseqüentemente o diâmetro das fibras torna-se menor. Em contrapartida se a quantidade de pectina for demasiado elevada a formação das fibras é dificultada devido ao excesso de forças repulsivas. Este facto explica a dificuldade em se conseguir formar o jato da solução de 4% pectina, durante o processo de *electrospinning*, o que conseqüentemente impediu a formação de fibras [83, 84].

A formação de *beads* ocorreu quando a solução de 4% pectina foi misturada com a solução de 10% PVA numa proporção 50:50, figura 11 (c). Neste caso foram obtidas fibras com diâmetro médio de 240,900 nm, num intervalo compreendido entre os 140 nm e os 461 nm. As fibras lisas e homogêneas diminuíram e mais *beads* foram formadas quando a quantidade de pectina aumentou na mistura, proporção Pectina/PVA 70:30, figura 11 (d). Neste caso fibras com diâmetro médio de 224,182 nm, num intervalo correspondido entre os 119 nm e os 298 nm foram obtidas.

Resultados semelhantes foram anteriormente alcançados por Charernsriwilaiwat *et al.* (2010) em que concentrações crescentes de quitosano, polieletrólito catiónico, foram adicionadas ao PVA. Neste estudo verificou-se que as *beads* se formavam quando a quantidade de quitosano na mistura quitosano/PVA aumentava. Quando a quantidade de quitosano foi ainda mais aumentada na mistura não foi possível formar o jato da solução e conseqüentemente não foram obtidas fibras [85].

O mesmo se verificou no estudo realizado por Islam *et al.* (2010) em que não obtiveram fibras a partir de uma solução de alginato. Assim, para ultrapassar a fraca *electrospinnability* da solução de alginato, polímeros sintéticos, como o PVA foram adicionados. As misturas resultantes permitiram melhorar a *electrospinnability* e conseqüentemente fibras contínuas e uniformes foram obtidas [86].

A análise da média dos diâmetros e as imagens obtidas no SEM permitiram ainda concluir que, quando foi aumentada nas misturas a quantidade de pectina, proporções Pectina/PVA 50:50 e 70:30, o diâmetro médio das fibras diminuiu. Esta diminuição foi tanto

mais sentida quanto maior a proporção de pectina. Este resultado seria o desejado caso não se tivesse conjuntamente formado *beads*.

Assim, fibras lisas e homogêneas foram obtidas com diâmetro médio de 287,000 nm, num intervalo correspondido entre os 179 nm e os 343 nm, quando a solução de 4% pectina foi misturada com a solução de 10% PVA numa proporção 30:70, figura 11 (b).

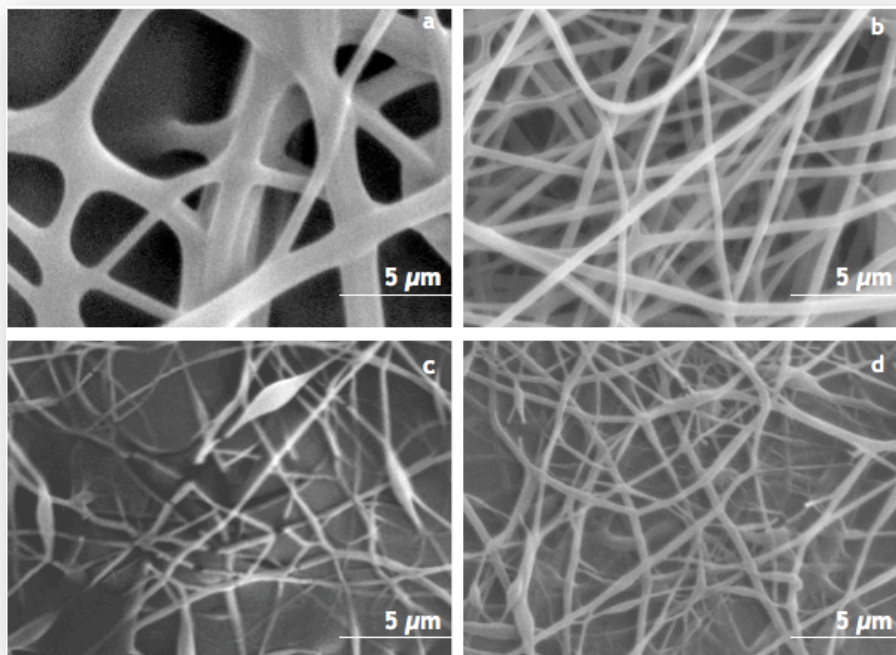


Figura 13 - Imagens SEM (a) 10% PVA; (b) Pectina/PVA 30:70; (c) Pectina/PVA 50:50; (d) Pectina/PVA 70:30.

Existem assim vários parâmetros que podem afetar a morfologia e as propriedades das fibras obtidas por *electrospinning*. Desta forma, a variação da composição da mistura Pectina/PVA resultou em alterações significativas na morfologia das nanofibras. Assim, uma vez que a variação da proporção Pectina/PVA permitiu verificar as modificações morfológicas que as fibras sofreram, a estrutura com melhor qualidade fibrosa foi portanto a das nanofibras obtidas a partir da mistura de Pectina/PVA 30:70, como é observável na figura 13.

3.3- Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC)

A determinação do MIC permitiu estimar a quantidade de L-Cisteína a ser utilizada na preparação das misturas Pectina/PVA. Os valores de MIC obtidos encontram-se registados na tabela 6.

Tabela 6- Valores de MIC obtidos para o *Staphylococcus aureus* e para a *Klebsiella pneumoniae*.

	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Pectina/PVA	-	-
Pectina/PVA/L-Cisteína	5,00 (mg/ml)	10,00 (mg/ml)
L-Cisteína	5,00 (mg/ml)	10,00 (mg/ml)

A mistura Pectina/PVA com L-Cisteína mostrou ter atividade preferencial contra a bactéria gram-positiva em estudo. Assim, o valor de MIC relativo à mistura Pectina/PVA com L-Cisteína para o *Staphylococcus aureus* foi de 5 mg/ml. Este valor foi obtido para a diluição em que uma solução de 2,5 mg/ml de pectina foi adicionada a uma solução de 5 mg/ml de PVA. A esta solução foi ainda adicionado 20 mg/ml de L-Cisteína.

Relativamente à mistura Pectina/PVA não foi verificado inibição do crescimento bacteriano para qualquer diluição. Desta forma, nenhum valor de MIC foi obtido.

Contudo, a mistura Pectina/PVA com L-Cisteína mostrou ter também atividade contra a bactéria gram-negativa em estudo, *Klebsiella pneumoniae*. Neste caso, um valor de MIC de 10 mg/ml foi alcançado. Este valor corresponde à diluição em que uma solução de 5 mg/ml de pectina foi adicionada a uma solução de 28 mg/ml de PVA. A esta solução foi ainda adicionado 20 mg/ml de L-Cisteína.

À semelhança do obtido para a bactéria gram-positiva, a mistura Pectina/PVA sem L-Cisteína não obteve qualquer valor de MIC para a *Klebsiella pneumoniae*, bactéria gram-negativa.

Relativamente à L-Cisteína os valores de MIC obtidos foram de 5 mg/ml para o *Staphylococcus aureus* e de 10 mg/ml para *Klebsiella pneumoniae*. Através destes resultados podemos verificar que houve também uma preferencial atividade da L-Cisteína para a bactéria gram-positiva em estudo, pois um valor de MIC mais baixo foi obtido para o *Staphylococcus aureus*. É ainda de salientar que apesar da L-Cisteína ter sido adicionada à mistura Pectina/PVA na proporção 30:70 os valores de MIC não foram alterados, para ambas as bactérias, comparativamente com os alcançados para a L-Cisteína.

Num estudo realizado anteriormente por Gouveia *et al.* (2012) [24] para determinação do MIC da L-Cisteína foi obtido um valor de MIC para o *Staphylococcus aureus* de 6 mg/ml e para a *Klebsiella pneumoniae* de 48 mg/ml. Neste caso apesar dos valores obtidos terem sido determinados por um teste de macrodiluição em caldo os valores obtidos estão de acordo com os alcançados neste estudo. Contudo, neste estudo é possível verificar um valor mais baixo de MIC para a *Klebsiella pneumoniae*, o que é benéfico pois uma menor concentração de L-Cisteína será necessária para que exiba atividade antimicrobiana.

3.4- Caracterização das Fibras Pectina/PVA/L-Cisteína

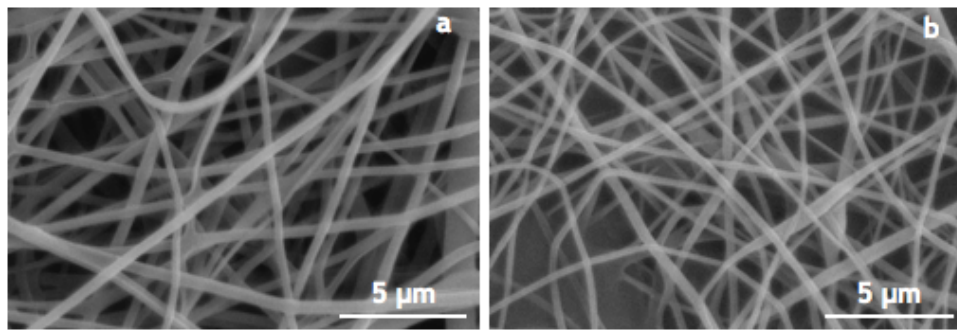


Figura 14 - Imagens SEM (a) Pectina/PVA 30:70; (b) Pectina/PVA 30:70 com 2% L-Cisteína.

A comparação da morfologia das nanofibras foi efectuada por microscopia eletrónica de varrimento (SEM).

A figura 14 mostra as imagens SEM das nanofibras obtidas através das soluções poliméricas preparadas com uma proporção Pectina/PVA 30:70, com e sem L-Cisteína. Através das imagens obtidas verifica-se que a incorporação da L-Cisteína não teve qualquer influência na morfologia das fibras tendo-se alcançado resultados semelhantes para ambas as misturas. Desta forma, foram conseguidas fibras contínuas e lineares.

Neste sentido, a adição da L-Cisteína à mistura será uma mais-valia pois irá conferir bioatividade às fibras, sem alterar a sua estrutura morfológica.

Capítulo 4

Conclusões

O trabalho desenvolvido cumpriu com as expectativas geradas aquando a elaboração da proposta. O objectivo do trabalho foi superado, embora se tenham sentido dificuldades na produção de fibras somente de Pectina. Para superar este problema optamos por utilizar um polímero sintético de forma a conferir uma nova abordagem, no que se refere à produção de fibras de Pectina por *electrospinning* e a conseguirmos obter os resultados pretendidos.

No início do processo investigativo, efetuou-se um estudo para se verificar qual a concentração ideal de cada polímero a ser utilizada no processo de *electrospinning*, concluindo-se que 4 % Pectina e 10% de PVA seriam as concentrações ótimas.

Posteriormente diferentes proporções Pectina/PVA foram preparadas a fim de avaliar qual a influência do PVA na produção das nanofibras. Assim, verificou-se a formação de nanofibras irregulares e com muitas *beads* para elevadas proporções de pectina (superiores a 50%). No entanto, quando a proporção de PVA aumentou acima dos 50% formaram-se nanofibras uniformes e sem *beads*.

Com este estudo, podemos assim concluir que o PVA melhora a *electrospinnability* da pectina e confere melhores propriedades mecânicas às nanofibras. A proporção ótima da mistura Pectina/PVA, a ser utilizada no *electrospinning* foi a 30:70 (v/v), respectivamente, desta proporção resultaram fibras uniformes e homogéneas com um diâmetro médio de 287nm.

Na fase final da investigação, foi determinada a concentração mínima inibitória (MIC) da L-Cisteína com o objectivo de estimar a quantidade necessária a ser adicionada à mistura Pectina/PVA 30:70 (v/v) para inibir o crescimento bacteriano. Os valores de MIC obtidos para a solução de Pectina/PVA com L-Cisteína foram 5 mg/ml para *Staphylococcus aureus* e 10 mg/ml para *Klebsiella pneumoniae*.

Neste sentido foram produzidas fibras a partir da mistura de Pectina/PVA/L-Cisteína, que foram analisadas por microscopia eletrónica de varrimento (SEM), onde foi possível observar comparativamente com as nanofibras de Pectina/PVA que a L-Cisteína não alterou a sua morfologia. Neste sentido, a L-Cisteína pode ser incorporada na mistura Pectina/PVA, de forma a conferir-lhe propriedades bioactivas.

Em suma, o estudo desenvolvido conclui que as nanofibras de Pectina/PVA em conjunto com L-Cisteína é uma abordagem a explorar futuramente, considerando os resultados promissores, tendo em conta o objectivo nas aplicações biomédicas como engenharia de tecidos, entrega de fármacos e revestimentos para feridas.

4.1 - Perspetivas Futuras

Os resultados obtidos durante as diferentes etapas deste estudo deixam em aberto diversas possibilidades de otimização dos vários parâmetros que influenciam o processo de *electrospinning*, assim como a possível utilização de diferentes misturas poliméricas tendo por base a Pectina. Desta forma é fundamental dar lugar a uma investigação mais detalhada acerca da influência dos diferentes polímeros na mistura com Pectina.

É ainda de importância relevante o estudo da aplicação da L-Cisteína como agente antimicrobiano em diferentes misturas poliméricas, utilizando polímeros naturais, biodegradáveis e biocompatíveis.

Já com ambições posteriores foi aqui abordada a utilização da L-Cisteína na mistura Pectina/PVA, como agente antimicrobiano de potencial uso nas estruturas de nanofibras com futura aplicação na biomedicina, uma vez que a L-Cisteína atua sob concentrações bastante baixas. Esta aplicação, futuramente, poderá ser abordada com o intuito de comprovar a sua bioatividade nas misturas poliméricas testando o espectro de ação nomeadamente contra bactérias e fungos.

A aplicabilidade destes processos de produção de estruturas de nanofibras, no sentido de melhorar as suas propriedades e ainda de lhes conferir novas, torna real proporção e importância uma vez que a L-Cisteína foi aplicada para que numa fase seguinte possa ser utilizada em aplicações biomédicas como engenharia de tecidos, entrega de fármacos e revestimentos para feridas.

Capítulo 5

Referências

- [1] Thomas, K; Sayret, P. (2005) Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, Part I: Evaluating the human health implications of exposure to nanoscale materials. *Toxicological Sciences*, 87, 316-321.
- [2] Shifman, J D; Schauer, C L. (2008) A Review: Electrospinning of biopolymer nanofibers and their applications. *Polymer reviews*, 48, 317-352.
- [3] Huang, Z M; Zang, Y Z; Kotaki, M; Ramakrishna, S. (2003) A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composite Science and Technology*, 63, 2223-2253.
- [4] Modrzejewska, Z; Eckstein W. (2004) Chitosan hollow fiber membranes. *Biopolymers*, 73, 61-68.
- [5] Kim, Y J; Yoon, K J; Ko, S W. (2000) Preparation and properties of alginate superabsorbent filament fibers crosslinked with glutaraldehyde. *Journal Applied Polymer Science*, 8, 1797-1804.
- [6] Marsano, E; Conio, J; Martino, R; Turturro, A; Bianchi, E. (2002) Fibers based on cellulose-chitin blends. *Journal Applied Polymer Science*, 83, 1825-1831.
- [7] Fan, L; Du, Y; Zhang, B; Yang, J; Zhou, J; Kennedy, J F. (2006) Preparation and properties of alginate/carboxymethyl chitosan blend fibers. *Carbohydrate Polymers*, Vol. 65, 447-452.
- [8] Chen, G; Sato, T; Ushida, T; Hirochica, R; Shirasaki, Y; Ochiai, N; Tateishi, T. (2003) The use of a novel PLGA fiber/collagen composite web as a scaffold for engineering of articular cartilage tissue with adjustable thickness. *Journal Biomedical Materials Research*, 67, 1170-1180.
- [9] Muntimagadu, E; Ickowicz, D E; Domb, A J; Khan, W. (2013) Polysaccharide Biomaterials. *Israel Journal of Chemistry*, 53, 787-794.
- [10] Nair, L S; Laurencin, C T. (2007) Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science.*, 32, 702.
- [11] Boddohi, S; Kipper, M. (2010) Engineering nanoassemblies of polysaccharides. *Journal of Advanced Materials*, 22, 2998

- [12] Rinaudo, M. (2006) Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Progress in Polymer Science*, 31, 603-632.
- [13] Mishra, R K; Banthia, A K; Majeed, A B. (2012) Pectin based formulations for biomedical applications: a review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5, 1-7.
- [14] Liu, L.; Fishman, M. L.; Hicks, K. B. (2007) Pectin in controlled drug delivery: a review. *Cellulose*, 14, 15-24.
- [15] Rodriguez, G G. (2011) Formation of Oriented Polymeric Nanofibers Containing Poly(ethylene oxide) and Pectin. *Proceedings of The National Conference*, 108-114.
- [16] Rockwell, P L; Kiechel, M A; Atchison, J S; Toth, L J; Schauer, C L. (2014). *Carbohydrate Polymers*, 107, 110-118.
- [17] Jiang, Y. (2009) Poly (vinyl alcohol) for Biomedical Applications. *Dissertation*, 1-4.
- [18] Koski, A; Yim, K; Shivkumar, S. (2004) Effect of molecular weight on fibrous PVA produced by electrospinning. *Materials Letters*, 58, 110-118.
- [19] Guerrini, L M; Braciforti, M C; Bretas, R E S. (2006). Eletrofição do poli(álcool vinílico) via solução aquosa. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 16, 286-293.
- [20] Tubbs, R K. (1966) Sequence distribution of partially hydrolyzed poly(vinyl acetate). *Journal of Polymer Science*, 4, 623.
- [21] Nord, F F; Bier, F; Timasheff, S N. (1951) Investigations on proteins and polymers. *Journal of the American Chemical Society*, 73, 289.
- [22] Zhang, C; Yuan, X; Wu, L; Han, Y; Sheng, J. (2005) Study on morphology of electrospun poly (vinyl alcohol) mats. *European Polymer Journal.*, 41, 423-432.
- [23] Windler, L., Height, M., Nowack B. (2013) Comparative evaluation of antimicrobials for textile applications - Review. *Environment International*, 53, 62-73.
- [24] Gouveia, I.C., Sá, D., Henriques, M. (2012) Functionalization of wool with L-Cysteine: process characterization and assessment of antimicrobial activity and cytotoxicity. *Journal of Applied Polymer Science*, 124, 1352-1358.
- [25] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/168149?lang=pt®ion=PT>, consultado dia 22 de Setembro de 2014, às 17h30min.

[26] <http://cs.stedwards.edu/chem/Chemistry/CHEM43/CHEM43/Thioredox/FUNCTION.HTML>
Consultado dia 22 de Setembro de 2013, às 21h00min.

[27] Kari, C., Nagy Z., Kóvacs, P., Hernandi F. (1971) Mechanism of the growth inhibitory effect of cysteine on *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology*, 68, 349-356.

[28] Gomez, R.F., Montville, T, Blais, K. (1980) Toxic effect of cysteine against *Salmonella typhimurium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 39, 1081-1083.

[29] Morris, S. L., Walsh, R. C., Hansen, J. N. (1984) Identification and characterization of bacterial membrane sulfhydryl groups which are targets on bacteriostatic and antibiotic action. *The journal of Biological Chemistry*, 259, 13590-13594.

[30] Gouveia, I. C. (2010) Nanobiotechnology: A new strategy to develop non-toxic antimicrobial Textiles. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 410-414.

[31] Pillary, V; Dott, C; Choonara, Y E; Tyagi, C; Tomar, L; Kumar, P; Toit, L C; Ndesendo, V M. (2012) A review of the effect of processing variables on the fabrication of Electrospun Nanofibers for drug delivery applications. *Journal of Nanomaterials*, 1-22.

[32] Teo, W-E, Inai, R; Ramakrishna, S. (2011) Electrospinning jets and nanofibrous structures. *Science and Technology of Advanced Materials*, 12, 1-19.

[33] Franco, PQ. (2009) Produção de Fibras de Hidroxiapatite por Electrofição. *Tese de Mestrado*, 13-21.

[34] Alves, A. (2008) Obtenção de micro e nanofibras de TiO₂ por electrospinning: caracterização de propriedades e atividade fotolítica. *Tese de Mestrado*, 5-42.

[35] Stanger, J; Turker, N; Nick. (2005) *Electrospinning*, Published in Shawbury by Smithers Rapra, Vol. 6.

[36] He, J-H; Liu, Y; Mo, L F; Yu-Quin, W; Xu, L. (2008) Electrospun nanofibres and their applications. *iSmithers*.

[37] Ramakrishna, S; Fujihara, K; Teo, W-E; Lin, T C; Ma. (2005) An Introduction to electrospinning and nanofibers. *Singapore: World Scientific Publishing*.

- [38] Taylor, G. (1969) Electrically driven jets. *Proceedings of the Royal Society of London A*, 313, 453-475.
- [39] Rodoplu, D; Mutlu, M. (2012) Effects of electrospinning setup and process parameters on nanofiber morphology intended for the modification of quartz crystal microbalance surfaces. *Journal of Engineered Fibers and Fabricas.*, 7, 118-123.
- [40] Baumgarten, P K. (1971) Electrostatic spinning of acrylic microfibers. *Journal of Colloid Interface Science.*, 36, 75-79.
- [41] Doshi, J; Reneker, D H. (1995) Electrospinning process and application of electrospun nanofibers. *Journal of Electrostatics*, 35, 151-160.
- [42] Fong, H; Chun, I; Reneker, D H. (1999) Beaded nanofibers forming during electrospinning. *Polymer*, 40, 4585-4592.
- [43] Hayati, I; Bailey, A I; Tadros, T F. (1987) Investigations into the mechanisms of electrohydrodynamic spraying of liquids. *Journal of Colloid Interface Science*, 117, pp. 21-205.
- [44] Jiang, H; Fang, D; Hsiao, B S; Chu, B; Chen, W. (2004) Optimization and characterization of dextran membranes prepared by electrospinning. *Biomacromolecules*, 5, 33-326.
- [45] Zong, X; Kim, K; Fang, D; Ran, S; Hsiao, B S; Chu, B. (2002) Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes. *Polymer*, 43, 4403-4412.
- [46] Ki, C S; Baek, D H; Gang, K D; Lee, K H; Um, I C; Park, I H. (2005) Characterization of gelatin nanofiber prepared from gelatin-formic acid solution. *Polymer*, 46, 5094.
- [47] Geng, X Y, Knwon, O H; Jang, J H. (2005) Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution. *Biomaterials*, 26, 5427.
- [48] Bucko, C J; Chen, L C; Shen, Y; Martin, D C. (1999) Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films. *Polymer*, 40, 7397.
- [49] Deitzel, J M; Kleinmeyer, J M; Harris, D; Tan Beck, N C. (2001) The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer*, 42, 261-272.
- [50] Sill, T J; von Recum, H A. (2008) Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*. 9, 1989-2006.

- [51] Melgelski, S; Stephens, J S; Bruce Chase, D; Rabolt, J F. (2002). Micro- and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers. *Macromolecules*, 35, 8456-8466.
- [52] Bognitski, M; Hou, H; Ishake, M; Frese, T; Hellwing, M; Schwarte, C; Schaper, A; Wendorff, J W; Greiner, A. (2000) Nanostructured Fibers via Electrospinning. *Advanced Materials.*, 12, 637-640.
- [53] Boland, E D; Telemeco, T A; Simpson, D G; Wneck, G E; Bowlin, G L. (2004) Utilizing acid pretreatment and electrospinning to improve biocompatibility of poly(glycolic acid) for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 71B, 144-152.
- [54] Bhattarai, S R; Bhattarai, N; Yi, H K; Hwang, P H; Cha, D I; Kim, H Y. (2004) Novel biodegradable electrospun membrane: scaffold for tissue engineering. *Biomaterials*, 25, 2595-2602.
- [55] Zhang, Y; Ouyang, H; Lim, C T; Ramakrishna, S; Huang, Z-M. (2005) Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research*, 72B, 156-165.
- [56] Lin, H- Y; Chen, H- H; Chang, S- H; Ni, T S. (2013) Pectin-chitosan-PVA nanofibrous scaffold made by electrospinning and its potential use as a skin tissue scaffold. *Journal of Biomaterials Science*, 24, 470-484.
- [57] Go, Y-F; Shakir, M; Hussain, R. (2013) Electrospun fibers for tissue engineering, drug delivery, and wound dressing. *Journal of Materials Science*, 48, 3027-3054.
- [58] Verreck , G; Chun, I; Peeters, J; Rosenblat, J; Brewster, M E. (2003) Preparation and characterization of nanofibers containing amorphous drug dispersions. *Pharmaceutical Research Journal*, 20, 810-817.
- [59] Huang, C; Soenen, S J; Van Gulk, E; Rejman, J; Van Calenbergh, S; Vervaet, C; Coneye, T; Verstraelen, H; Termman , M; Demeester, J; De Smedt, S C. (2012) Electrospun cellulose acetate phthalate fibers for semen induced anti-HIV vaginal drug delivery. *Biomaterials*, 33, 962- 969.
- [60] Weldon, C B; Tsui, J H; Shankarappa, S A; Nguyen, V T; Ma, M; Anderson, D G; Kohane, DS. (2012) Electrospun drug-eluting sutures for local anesthesia. *Journal of Controlled Release*, 161, 903-909.

- [61] Yang, Y; Li, X; Cui, W; Zhou, S; Tan, R; Wang, C. (2008) Structural stability and release profiles of proteins from core-shell poly (DL-lactide) ultrafine fibers prepared by emulsion electrospinning. *Journal of Biomedical Materials Research*, 86, 374-385.
- [62] Nie, H; Wang, C H. (2007) Fabrication and characterization of PLGA/HAp composite scaffolds for delivery of BMP-2 plasmid DNA. *Journal Controlled Release*, 120, 1-2.
- [63] Zahedi, P; Razaieian, I; Ranaei-Siadat, S O; Jafari, S H; Suphapol, P. (2010) A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandage. *Polymer Advanced Technology*, 21, 77-95.
- [64] Miao, J; Pangule, R C; Paskaleva, E E; Hwang, E E; Kane, R S; Linhardt, R J; Dordick, J S. (2011) Lysostaphin-functionalized cellulose fibers with antistaphylococcal activity for wound healing applications. *Biomaterials*, 36, 9557-9567.
- [65] Schneider, A; Wang, X Y; Kaplan, D L; Garlick, G A; Egges, C. (2009) Biofunctionalized electrospun silk mats as a topical bioactive dressing for accelerated wound healing. *Acta Biomaterial*, 5, 2570-2578.
- [66] Wu, L; Li, H; Li, S; Li, X; Yuan, X; Zhang, Y. (2010) Composite fibrous membranes of PLGA and chitosan prepared by coelectrospinning and coaxial electrospinning. *Journal of Biomedical Material Research*, 92, 563-574.
- [67] Jin, G; Prabhakaren, M P; Kai, D; Annama lai, F K; Arunachalen, K D; Ramakrishna, S. (2013) Tissue engineered plant extracts as nanofibrous wound dressing. *Biomaterials*, 34, 724-734.
- [68] Liu, X; Lin, T; Fang, J; Yao, G; Zhao, H; Dodson, M; Wang, X. (2010) In vivo wound healing and antibacterial performances of electrospun nanofibre membranes. *Journal of Biomedical Material Research*, 94A, 499-508.
- [69] Chung, L Y; Schmidt, M J; Hamlyn, P F; Sagar, B F; Andrews, A M; Turner, T D. (1994) Biocompatibility of potential wound management products: fungal mycelia as a source of chitin/chitosan and their effect on the proliferation of human F1000 fibroblasts in culture. *Journal of Biomedical Research*, 28, 463-469.
- [70] Zhang, H K; Quian, Y F; Wang, H S; Fan, L P; Huang, C; Yin, A L; Mo, X M. (2010) Genipin-crosslinked silk fibroin/hydroxybutyl chitosan nanofibrous scaffolds for tissue-engineering application. *Journal of Biomedical Materials Research*, 95A, 870-881.

- [71] Sriamornsak, P. (1998) Investigation of pectin as a carrier for oral delivery of proteins using calcium pectinate gel beads. *International Journal of Pharmaceuticals.*, 169, 213-220.
- [72] Sudheesh Kumar , P T; Ramya, C; Jayakumar, R; Nair, S K V; Lakshmanan, V-K. (2010) Drug delivery and tissue engineering applications of biocompatible pectin-chitin/nano CaCO₃ composite scaffolds. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 106, pp. 1-36.
- [73] Jamnongkan, T; Wattanakornsiri, A; Pansila, P P; Migliaresi, C; Kaewpirom, S. (2012) Effect of Poly(vinyl alcohol)/Chitosan ratio on electrospun-nanofiber morphologies. *Advanced Materials Research*, 463-464, 734-738.
- [74] Shen, W. (2012) Electrospinning and crosslinking of sodium alginate with Poly (vinyl alcohol). *Master Dissertation*, 1-8.
- [75] Ohkawa, K; Cha, D; Kim, H; Nishida, A; Yamamoto, H. (2004) Electrospinning of chitosan. *Macromolecular Rapid Communications*, 25, 1600-1605.
- [76] Yang, D; Li, Y; Nie, J. (2007) Preparation of gelatin/PVA nanofibers and their potential application in controlled release of drugs. *Carbohydrate Polymers*, 69, 538-543.
- [77] Valizadeh, M; Ravandi, S A H; Ramakrishna, S. (2013) Recent advances in electrospinning of some selected biopolymers. *Journal of Textiles and Polymers*, 1, 70-84.
- [78] Liang, D; Hsiao, B S; Chu, B. (2007) Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 1392-1412.
- [79] Hong, K H. (2007) Preparation and properties of electrospun poly (vinyl alcohol)/silver fiber web as wound dressings. *Polymer Engineering and Science*, 47, 43-49.
- [80] Theron, S A; Zussman, E; Yarin. A L. (2004) Experimental investigation of the governing parameters in the electrospinning of polymer solutions *Polymer.*, 45, 2017-2030.
- [81] Supaphol, P; Chuangchote, S. (2008) On the Electrospinning of Poly(vinyl alcohol) Nanofiber Mats: A Revisit *Journal of Applied Polymer Science*, 108, 969-978.
- [82] Li, J X; He, A H; Zheng, J F; Han, C C. 2006 Gelatin and gelatin-hyaluronic acid nanofibrous membranes produced by electrospinning of their aqueous solution. *Biomacromolecules*, 7, 2243-2247.

- [83] Islam, M S; Karim, M R. (2010) Fabrication and characterization of poly (vinyl alcohol)/alginate blend nanofibers by electrospinning method. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 366, 135-140.
- [84] Alhosseini, S N; Moztarzadeh, F; Mozafari, M; Asgari, S; Dodel, M; Samadikuchaksaraei, A; Kargozar, S; Jalali, N. (2012) Synthesis and characterization of electrospun polyvinyl alcohol nanofibrous scaffolds modified by blending with chitosan for neural tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 25-34.
- [85] Charernsriwilaiwat, N; Opanasopit, P; Rojanarata, T; Ngawhirunpat, T; Supaphol, P. (2010) Preparation and characterization of chitosan hydroxybenzotriazole/polyvinyl alcohol blend nanofibers by the electrospinning technique. *Carbohydrate Polymers*, 81, 675-680.
- [86] Zhou, Y; Yang, H; Liu, X; Mao, J; Gu, S; Xu, W. (2013) Electrospun water-soluble carboxyethyl Chitosan/Poly (vinyl alcohol) nanofibrous membrane as potential wound dressing for skin regeneration. *International Journal of Biological Macromolecules*, 53, 88-92.