



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José dos Campos  
Instituto de Ciência e Tecnologia

**JÉSSICA DIAS SANTOS**

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA DE NANOFIBRAS DE  
POLICAPROLACTONA-NISTATINA PRODUZIDAS POR  
ELETROFIAÇÃO**

2020

**JÉSSICA DIAS SANTOS**

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE  
NANOFIBRAS DE POLICAPROLACTONA-NISTATINA PRODUZIDAS  
POR ELETROFIAÇÃO**

Tese apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA.

Área: Prótese Dentária. Linha de pesquisa: Desenvolvimento de Biomateriais e Novas Tecnologias em Odontologia

Orientador: Prof. Assoc. Alexandre Luiz Souto Borges

São José dos Campos

2020

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2020]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Santos, Jéssica Dias

Síntese, caracterização e atividade antimicrobiana de nanofibras de policaprolactona - nistatina produzidas por eletrofiação / Jéssica Dias Santos. - São José dos Campos : [s.n.], 2020.  
90 f. : il.

Tese (Doutorado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação em Odontologia Restauradora - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2020.

Orientador: Alexandre Luiz Souto Borges.

1. Fibras. 2. Candida albicans. 3. Eletroquímica. I. Borges, Alexandre Luiz Souto, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

## **BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Assoc. Alexandre Luiz Souto Borges** (Orientador)

Universidade Estadual Paulista(Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**Prof(a) Drª Cristiane Campos Costa Quishida**

Universidade Santo Amaro (Unisa)

Campus de Interlagos

**Prof(a) Drª Aline Lins de Lima**

Faculdade Sete Lagoas (FACSETE)

Campus de Recife

**Prof Assoc César Rogério Pucci**

Universidade Estadual Paulista(Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**Prof(a) Drª Nathália de Carvalho Ramos**

UNESP

Campus de Bragança Paulista

São José dos Campos, 16 de janeiro de 2020.

## DEDICATÓRIA

*A minha mãe, Rosana Aparecida Dias, por todo apoio ao longo dessa vida, pois em alguns momentos fomos apenas nós por nós e nos bastamos!! Obrigada por todo esse carinho, amor e atenção, se busco sempre seguir em frente e em frente é porque sei que posso contar com você mãe. Muito obrigada, eu te amo!*

*Ao meu pai, José Maria dos Santos, por toda base que me proporcionou. Pai, levo você comigo sempre!*

*Aos meus avós, Paulo Ulirajara Dias e Lenice Theodoro Dias, por todo amor e carinho. Vocês são meus amores !!!*

*A minha tia, Roseli Cristina Theodoro Dias, por ser essa super- mulher. Tia te adiro e te amo muito.*

*A toda minha família, vocês são extremamente importantes nessa minha trajetória!!*

*As minhas amigas- irmãs. Camila Girondi obrigada por essa amizade, você é muito importante pra mim. Aline Fabbri, amiga você é sensacional, amo você!*

*Ao meu orientador, Alexandre Luiz Souto Borges, que sempre me apoiou em minhas conquistas, sempre deu força e se importou comigo. Professor te admiro muito profissionalmente mas além disso, você é um ser humano sensacional! Obrigada pela oportunidade de conviver com você durante esses 5 anos, tenho a certeza que o aprendizado foi enorme!!*

*A minha coorientadora do mestrado, Cristiane Campos Costa Zuishida, que me mostrou todo esse caminho da eletrofiação e deu início a todo esse trabalho. Cris muito obrigada ! Admiro muito você.*

*As minhas queridas Borgetes!!! Meninas foi um prazer enorme fazer parte desse time, vou levar vocês sempre comigo, vocês são maravilhosas!*

*Em especial às Borgetes Aline Lins de Lima e Natália Inês Gonçalves. Alininha você é muito especial, só tenho a agradecer o nosso convívio. Jamais vou esquecer todo seu apoio durante o*

*mestrado, horas e horas em laboratório e você do meu lado, tenho um orgulho imenso da mulher que você se torna a cada dia! Natália, sou muito feliz com a nossa amizade, muito obrigada por estar do meu lado sempre, me ouvir e me apoiar! Você foi essencial nesse caminho!*

*A minha amiga, Nathália de Carvalho Ramos, por todo apoio em especial nesse ano de 2019. Nathi obrigada pela companhia e pelo companheirismo nessa nossa nova jornada. Sua companhia tornou tudo mais leve!!*

*Ao meu amigo, Emanuel da Silva Rouai, assim como a Nathi, estreitamos nossa amizade devido ao novo rumo de nossas vidas. Emanuel muito obrigada por todo apoio, tenho muito orgulho de você!*

*Tendo a certeza de que não chegamos a lugar nenhum apenas com as próprias pernas, agradeço a todos que passaram por minha vida, levo muito de vocês comigo e desejo o melhor da vida para vocês! Obrigada pela companhia, apoio e incentivo.*

*A vida segue seu rumo... e temos a obrigação de seguir na direção dos nossos sonhos.*

## **AGRADECIMENTOS**

**Ao meu orientador, Alexandre Luiz Souto Borges, por todo apoio e  
confiança durante esses 5 anos.**

**Ao Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos -  
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”-  
UNESP**

**Ao Departamento de Materiais Odontologia e Prótese do Instituto de  
Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP**

**Ao Laboratório de Física do Instituto Tecnológico de Aeronáutica - ITA, na  
pessoa do Dr Tiago Campos**

**A Profa. Luciane Dias de Oliveira por todo auxílio no desenvolvimento  
deste trabalho.**

**Meus sinceros agradecimentos.**

*" Tudo o que acontece no universo tem uma razão de ser; um objetivo. Nós como seres humanos temos uma só lição na vida: seguir em frente e ter a certeza de que apesar de as vezes estar no escuro, o sol vai voltar a brilhar. "* Santa Dulce dos Pobres

## SUMÁRIO

|                                                                                    |           |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>LISTA DE FIGURAS.....</b>                                                       | <b>9</b>  |
| <b>LISTA DE TABELAS.....</b>                                                       | <b>11</b> |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....</b>                                        | <b>12</b> |
| <b>RESUMO .....</b>                                                                | <b>13</b> |
| <b>ABSTRACT .....</b>                                                              | <b>14</b> |
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>                                                           | <b>15</b> |
| <b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                                                | <b>18</b> |
| <b>2.1 Candidíase oral.....</b>                                                    | <b>18</b> |
| <b>2.1.1 Estomatite Protética .....</b>                                            | <b>19</b> |
| <b>2.2 Desenvolvimento de materiais.....</b>                                       | <b>22</b> |
| <b>2.3 Eletrofiação .....</b>                                                      | <b>26</b> |
| <b>2.3.1 O Processo de Eletrofiação .....</b>                                      | <b>28</b> |
| <b>2.3.2 Os parâmetros envolvidos .....</b>                                        | <b>30</b> |
| <b>2.3.3 Liberação lenta de fármacos .....</b>                                     | <b>33</b> |
| <b>3 PROPOSIÇÃO .....</b>                                                          | <b>35</b> |
| <b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                                  | <b>36</b> |
| <b>4.1 Produção de Nanofibras: Processo de eletrofiação .....</b>                  | <b>36</b> |
| <b>4.1.1 Preparo das soluções .....</b>                                            | <b>36</b> |
| <b>4.1.2 Síntese das Nanofibras .....</b>                                          | <b>37</b> |
| <b>4.2 Testes para caracterização das NFs sintetizadas .....</b>                   | <b>38</b> |
| <b>4.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....</b>                        | <b>39</b> |
| <b>4.2.2 Análise dos diâmetros médios das fibras.....</b>                          | <b>40</b> |
| <b>4.2.3 Espectroscopia por energia dispersiva (EDS).....</b>                      | <b>40</b> |
| <b>4.2.4 Análise de difratometria de raios- X (DRX) .....</b>                      | <b>41</b> |
| <b>4.2.5 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier .....</b>     | <b>41</b> |
| <b>4.2.6 Análise da molhabilidade utilizando a técnica do ângulo de contato ..</b> | <b>42</b> |
| <b>4.3 Atividade antimicrobiana .....</b>                                          | <b>43</b> |

|                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.3.1 Microorganismo e condições de crescimento.....                        | 43 |
| 4.3.2 Ensaio da concentração inibitória mínima (CIM) .....                  | 44 |
| 4.3.3 Ensaio da concentração microbicide mínima (CMM).....                  | 44 |
| 4.4 Análise Estatística .....                                               | 45 |
| 5 RESULTADO .....                                                           | 46 |
| 5.1 Testes para caracterização das nanofibras sintetizadas .....            | 46 |
| 5.1.1 Microscopia eletrônica de varredura .....                             | 46 |
| 5.1.2 Análise do diâmetro médio das fibras .....                            | 50 |
| 5.1.3 Espectroscopia por energia dispersiva .....                           | 59 |
| 5.1.4 Análise por difratometria de raios- X.....                            | 63 |
| 5.1.5 Espectroscopia por transformada de Fourier .....                      | 65 |
| 5.1.6 Análise da molhabilidade utilizando a técnica do ângulo de contato .. | 68 |
| 5.2 Atividade Antimicrobiana .....                                          | 69 |
| 5.2.1 Ensaio da concentração inibitória mínima (CIM) .....                  | 69 |
| 5.2.2 Ensaio da concentração microbicide mínima (CMM).....                  | 71 |
| 6 DISCUSSÃO .....                                                           | 72 |
| 7 CONCLUSÃO .....                                                           | 79 |
| REFERÊNCIAS* .....                                                          | 80 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                      |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Figura 1 - Divisão do jato eletrofiado .....</b>                                                                                  | <b>29</b> |
| <b>Figura 2 - Preparo das amostras de NFs para análise em MEV.....</b>                                                               | <b>39</b> |
| <b>Figura 3 - Análise das NFs em Goniômetro. ....</b>                                                                                | <b>42</b> |
| <b>Figura 4- Micrografias de NFs de PCL sintetizadas .....</b>                                                                       | <b>46</b> |
| <b>Figura 5- Micrografias de NFs sintetizadas a partir da solução A (PCL/<br/>NYS) .....</b>                                         | <b>47</b> |
| <b>Figura 6- Micrografias de NFs sintetizadas a partir da solução B (PCL/<br/>NYS) .....</b>                                         | <b>48</b> |
| <b>Figura 7- Micrografias de NFs sintetizadas a partir da solução C (PCL/<br/>NYS) .....</b>                                         | <b>49</b> |
| <b>Figura 8 - Histogramas de frequência dos diâmetros (<math>\mu\text{m}</math>) das NFs do<br/>grupo da solução PCL.....</b>        | <b>51</b> |
| <b>Figura 9 - Histogramas de frequência dos diâmetros (<math>\mu\text{m}</math>) das NFs do<br/>grupo da solução A.....</b>          | <b>53</b> |
| <b>Figura 10 - Histogramas de frequência dos diâmetros (<math>\mu\text{m}</math>) das NFs do<br/>grupo da solução B.....</b>         | <b>55</b> |
| <b>Figura 11 - Histogramas de frequência dos diâmetros (<math>\mu\text{m}</math>) das NFs do<br/>grupo da solução C.....</b>         | <b>57</b> |
| <b>Figura 12 - Fotomicrografias em MEV e histogramas das amostras<br/>escolhidas como padrão para os grupos: PCL, A, B e C .....</b> | <b>58</b> |
| <b>Figura 13 - Análise por EDS da amostra PCL.....</b>                                                                               | <b>59</b> |

|                                                                                  |           |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Figura 14 - Análise por EDS da amostra A.....</b>                             | <b>60</b> |
| <b>Figura 15 - Análise por EDS da amostra B.....</b>                             | <b>61</b> |
| <b>Figura 16 - Análise por EDS da amostra C.....</b>                             | <b>62</b> |
| <b>Figura 17 – Gráfico representativo da análise de DRX para PCL.....</b>        | <b>63</b> |
| <b>Figura 18 – Gráfico representativo da análise de DRX para o grupo A .....</b> | <b>64</b> |
| <b>Figura 19 – Gráfico representativo da análise de DRX para o grupo B .....</b> | <b>64</b> |
| <b>Figura 20 – Gráfico representativo da análise de DRX para o grupo C .....</b> | <b>65</b> |
| <b>Figura 21 – Gráfico representativo da análise de FTIR, PCL.....</b>           | <b>66</b> |
| <b>Figura 22 – Gráfico representativo da análise de FTIR para o grupo A ....</b> | <b>67</b> |
| <b>Figura 23 – Gráfico representativo da análise de FTIR para o grupo B ....</b> | <b>67</b> |
| <b>Figura 24 – Gráfico representativo da análise de FTIR para o grupo C ....</b> | <b>68</b> |
| <b>Figura 25 –Amostra A absorvendo a gota de água destilada .....</b>            | <b>69</b> |
| <b>Figura 26 – Distribuição das amostras de NFs para o ensaio de CIM .....</b>   | <b>69</b> |
| <b>Figura 27 – Análise por inspeção visual para CIM.....</b>                     | <b>70</b> |
| <b>Figura 28 – Espécimes que turvaram durante a CIM .....</b>                    | <b>70</b> |
| <b>Figura 29– Plaqueamento das amostras para a CMM.....</b>                      | <b>71</b> |

## **LISTA DE TABELAS**

|                                                                                                                                                                                                                                                                    |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Tabela 1- Materiais e fabricante .....</b>                                                                                                                                                                                                                      | <b>36</b> |
| <b>Tabela 2– Medida de tendência central (Mean) em micrômetros (<math>\mu\text{m}</math>),<br/>número de medições (N),desvio padrão (SD), (<math>\mu\text{m}</math>) e análise de comparação<br/>dos fatores de Tukey para as NFs do grupo da solução PCL.....</b> | <b>50</b> |
| <b>Tabela 3 – Medida de tendência central (Mean) em micrômetros (<math>\mu\text{m}</math>),<br/>número de medições (N),desvio padrão (SD), (<math>\mu\text{m}</math>) e análise de comparação<br/>dos fatores de Tukey para as NFs do grupo da solução A.....</b>  | <b>52</b> |
| <b>Tabela 4 – Medida de tendência central (Mean) em micrômetros (<math>\mu\text{m}</math>),<br/>número de medições (N),desvio padrão (SD), (<math>\mu\text{m}</math>) e análise de comparação<br/>dos fatores de Tukey para as NFs do grupo da solução B .....</b> | <b>54</b> |
| <b>Tabela 5– Medida de tendência central (Mean) em micrômetros (<math>\mu\text{m}</math>),<br/>número de medições (N),desvio padrão (SD), (<math>\mu\text{m}</math>) e análise de comparação<br/>dos fatores de Tukey para as NFs do grupo da solução C .....</b>  | <b>56</b> |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|      |                                                                     |
|------|---------------------------------------------------------------------|
| PCA  | Àcido Polilático                                                    |
| PLA  | Àcido Poliglicólico                                                 |
| CIM  | Concentração Inibitória Mínima                                      |
| CMM  | Concentração Microbica Mínima                                       |
| DRX  | Difração de Raios- X                                                |
| DMF  | Dimetilformamida                                                    |
| EDS  | Espectroscopia por Energia Dispersiva                               |
| EP   | Estomatite Protética                                                |
| FTIR | Espectroscopia de Infravermelho por Energia Transformada de Fourier |
| MEV  | Microscopia Eletrônica de Varredura                                 |
| NFs  | Nanofibras                                                          |
| NYS  | Nistatina                                                           |
| PCI  | Policaprolactona                                                    |
| PMMA | Polimetilmetacrilato                                                |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute                                     |
| TCE  | Tetracloroetano                                                     |

Santos JD. Síntese, caracterização e atividade antimicrobiana de nanofibras de policaprolactona - nistatina produzidas por eletrofiação [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2020.

## RESUMO

O objetivo desse estudo foi sintetizar um scaffold de nanofibras (NFs) de Policaprolactona (PCL) com adição de nistatina (NYS), caracterizar e avaliar a atividade antimicrobiana. NFs foram sintetizadas pela técnica da eletrofiação, utilizando-se solução de PCL puro e PCL adicionado de NYS. Para a síntese das NFs de PCL, o polímero foi dissolvido em Dimetilformamida (DMF) e 1,1,2,2 Tetracloroetano (TCE), logo após foram adicionadas três concentrações de NYS (Grupos A, B e C). As amostras foram analisadas em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia por energia dispersiva (EDS), Análise de molhabilidade, Análise de Difractometria de Raios-X (DRX) e Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). Após a análise em MEV foi realizada a média dos diâmetros das fibras com Software ImageJ. As atividades antimicrobianas foram avaliadas por meio dos testes de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração microbicida mínima (CMM). As NFs de PCL com NYS (A) apresentaram diâmetro de  $0,99\mu\text{m} \pm 0,29$ , o padrão do grupo B apresentou uma média de diâmetro de  $1,3\mu\text{m} \pm 0,56$  e o grupo C  $1,24\mu\text{m} \pm 0,48$ . O DRX e o EDS comprovaram a presença de PCL e de NYS nas amostras. A CIM e a CMM comprovaram a ação fungicida e fungistática das NFs A, B e C.

Palavras-chave: Fibras. *Candida albicans*. Eletroquímica.

*Santos JD. Synthesis, characterization and antimicrobial properties of nanofibers polycaprolactane - nystatin produced by electrospinning [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2020.*

## **ABSTRACT**

*The aim of this study was to synthesize a scaffold of polycaprolactane (PCL) nanofibers (NFs) with addition of nystatin (NYS), to characterize and evaluate the antimicrobial activity. NFs were synthesized by the electro-spinning technique, using pure PCL and NYS and PCL solutions. For the synthesis of PCL NFs, the polymer was dissolved in Dimethylformamide (DMF) and 1,1,2,2-Tetrachloroethane (TCE), after which three concentrations of NYS (Groups A, B and C) were added. The samples were analyzed in Scanning Electron Microscopy (SEM), Dispersive Energy Spectroscopy (EDS), Goniometer, X-ray Diffraction Analysis (XRD) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). After SEM analysis, the mean fiber diameter was performed with ImageJ Software. The antimicrobial activities were evaluated through the tests of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum microbicidal concentration (MMC). The NFs of PCL with NYS (A) had a diameter of  $0.99\ \mu\text{m} \pm 0.29$ , the standard of group B presented a mean diameter of  $1.3\ \mu\text{m} \pm 0.56$  and group C  $1.24\ \mu\text{m} \pm 0.48$ . The DRX and the EDS verified the presence of PCL and NYS in the samples. CIM and CMM proved the fungicidal and fungistatic action of NFs A, B and C.*

*Keywords: Fibers. Candida albicans. Electrochemistry.*

## 1 INTRODUÇÃO

A estomatite protética (EP) é uma patologia que acomete a mucosa de suporte das próteses, totais ou parciais removíveis. Esta patologia se apresenta como uma das mais prevalentes e com relevante recidiva dentre as lesões bucais, necessitando ser corretamente diagnosticada e tratada de forma eficaz (Scalercio et al., 2007). A EP apresenta sinais como hiperemia, edema, congestão, acompanhados algumas vezes por petéquias hemorrágicas. A etiologia mostra-se extremamente variável, sendo considerada multifatorial (Webb et al., 1998). Dentre os fatores que podem desencadear a patologia destacam-se: a incorreta higienização, tanto bucal quanto da prótese removível, a utilização noturna das próteses, suas condições de armazenamento e a idade. Dentre esses fatores destaca-se o uso contínuo da prótese dentária (Neville et al., 2009; Ercalik-Yalcinkaya, Özcan, 2015).

A região da mucosa que está continuamente em contato com a superfície interna das próteses se torna susceptível ao crescimento e a colonização de vários microrganismos (Chow et al., 1999). Dentre estes microrganismos, o patógeno oportunista mais comumente encontrados na EP é a *Candida albicans* (Mujica et al., 2008; Lavaee et al., 2018; Talattof et al., 2018).

O tratamento da EP inclui condutas de higiene bucal e da prótese, como remoção da prótese durante a noite, identificação e correção de fatores predisponentes, reembasamento ou confecção de nova prótese e terapia antifúngica auxiliar (Arnaud et al., 2012). A escolha de um tratamento ou associação de mais de um deles é um aspecto a ser considerado individualmente. Se a terapia antifúngica tópica for instituída, fármacos podem ser utilizados (Lombardi, Budtz-Jorgensen, 1993). Dentre eles a nistatina (NYS) apresenta-se como tratamento padrão associada a correta higienização tanto bucal quanto da prótese (Hilgert et al., 2016). Apesar de esses medicamentos serem eficazes no

alívio dos sinais e sintomas clínicos da estomatite associada à *Candida ssp.*, muitas vezes não eliminam completamente esses microrganismos (Banting, Hill, 2001). O sucesso da aplicação tópica de fármacos na cavidade oral pode ser comprometido por vários fatores, dentre os quais a falta de percepção da infecção pelos pacientes, necessidade de gastos com medicação, uso contínuo das próteses, sabor desagradável do medicamento e posologia rigorosa. Além disso, é difícil manter a concentração efetiva da medicação nos tecidos infectados em decorrência do fluxo salivar, dos movimentos da língua e da deglutição, que rapidamente dissolvem e eliminam qualquer fármaco da cavidade bucal (Lemos et al., 2003).

Diversas incorporações de antifúngicos estão sendo estudadas considerando a liberação lenta de fármacos um método promissor para o tratamento. Apresenta como vantagens um custo reduzido, não necessitando da adesão do paciente tendo em vista que, em sua grande maioria, são geriátricos e podem apresentar redução da capacidade motora e redução do sistema cognitivo podendo resultar na diminuição da frequência de aplicação do fármaco (Chow et al., 1999). Um meio utilizado para a liberação lenta de fármacos são as nanofibras (NFs), pois apresentam superfície porosa e fibrosa, uma grande área de superfície, morfologia ajustável e desempenho flexível (Kim, Yoo, 2009).

Adicionalmente, a técnica da eletrofiação vem sendo bastante utilizada por se tratar de uma técnica simples que permite a obtenção de nanofibras a partir de materiais poliméricos pois consegue obter modificações na morfologia, porosidade e composição da membrana sintetizada, possibilitando o controle da liberação do agente ativo empregado ou impregnação de fármacos nas nanofibras, permitindo graduar a dosagem e o tempo (Li et al., 2004; Kim et al., 2004; Del Valle et al., 2011). A eletrofiação utiliza a diferença de potencial elétrico para produzir fibras cujos diâmetros podem ir desde algumas dezenas de nanômetros a alguns micrômetros. Esta técnica tem sido utilizada nos últimos anos em diversas áreas tais como a indústria têxtil, aplicações biomédicas e

farmacêuticas, biotecnologia, Engenharia Ambiental, Engenharia dos Tecidos entre muitas outras (Bhardwaj, Kundu, 2010).

O policaprolactano (PCL) é um polímero sintético de custo reduzido, biocompatível e reabsorvível, cuja aplicação já vem sendo estudada desde os anos 70 (Chong et al., 2007), visto apresentar vantagens em relação a outros biopolímeros utilizados na época, tal como a facilidade de fabricação. O polímero possui ponto de fusão entre 55 e 60°C (Santos et al., 2003) e, sendo um polímero sintético, a sua natureza semicristalina e hidrofóbica atribui-lhe uma taxa de degradação mais lenta do que os polímeros naturais (Kanani, Bahrami, 2011). Este tempo de degradação é de cerca de dois anos (Middleton, Tipton, 2000), fato pelo qual foi originalmente utilizado em dispositivos de liberação controlada de fármacos que permanecessem ativos no organismo por um tempo superior a um ano. O PCL apresenta ainda propriedades reológicas e viscoelásticas que permitem a sua utilização em várias técnicas de fabricação de matrizes, incluindo a eletrofiação (Cipitria et al., 2011).

O desenvolvimento de dispositivos nanométricos, que utilizem polímeros como base, pode promover o encapsulamento de agentes antimicrobianos tornando - se um sistema carreador de fármaco. Tais sistemas podem aumentar a biodisponibilidade dos antimicrobianos potencializando sua atividade biológica (Wani et al., 2014). A síntese de nanofibras a base de PCL com adição do antifúngico NYS aparenta ser uma interessante alternativa para o tratamento da EP, atuando no tratamento de forma efetiva.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Candidíase oral

As infecções causadas por *Candida* se manifestam em mucosas úmidas frequentemente em indivíduos que apresentam alguma debilitação imunológica, algum comprometimento motor ou doença sistêmica. Em caso de pacientes imunocomprometidos pode ocorrer a infecção sistêmica, associada a alta taxa de mortalidade (Williams, Lewis, 2011). A candidíase oral pode se apresentar clinicamente como: pseudomembranosa, eritematosa ou hiperplásica, podendo estar associada outras lesões (Lakshman et al., 2009).

Candidíase pseudomembranosa é caracterizada por manchas brancas que podem confluir formando placas removíveis por raspagem, abaixo das placas se apresentam eritematosas. Na região bucal acomete mucosa labial, língua e palato mole. Paciente apresenta sintomas como queimação, sensibilidade e disfagia (Lakshman et al., 2009).

Candidíase eritematosa pode se manifestar após persistente candidíase pseudomembranosa aguda ou em casos onde a infecção por HIV precede a pseudomembranosa. Em grande parte dos casos se apresenta assintomática, como manchas vermelhas em dorso de língua, palato ou mucosa bucal (Jorge, 1998).

Clinicamente, a candidíase hiperplásica apresenta um pequeno relevo que pode variar de pequenas áreas palpáveis a placas densas e opacas com superfícies duras, rugosas que não são removidas por raspagem. Ocorrem em mucosa jugal e em bordo lateral de língua (Jorge, 1998).

### 2.1.1 Estomatite Protética

A forma mais prevalente das infecções por *Candida* ssp. é a EP. Black (1885) se referiu a EP como “boca dolorida sob placas” , outras terminologias são utilizadas como: estomatite induzida por próteses, boca dolorida por próteses, palafita crônica por próteses e candidíase relacionada a próteses (Nikawa et al., 1998; Webb et al., 1998).

A EP apresenta sinais clínicos como a presença de múltiplos pontos hiperêmicos concentrados na região que mantém íntimo contato com a superfície interna da prótese, devido a ausência de tratamento ou a este não ser efetivo, pode evoluir para um quadro com áreas eritematosas difusas e hiperplasia papilar do palato (Wilson, 1998). A EP é classificada em três estágios, de acordo com os sinais clínicos, podendo evoluir do estágio I para o II ou até mesmo o III se o tratamento não for efetivo. Segundo a literatura os estágios consistem em: (I) Hiperemia puntiforme: caracteriza-se pela presença de múltiplos pontos hiperêmicos nos ductos das glândulas salivares palatinas menores; (II) Hiperemia difusa: refere-se à inflamação generalizada sobre a mucosa recoberta pela prótese, que se apresenta lisa e atrófica e (III) Hiperemia granular: a mucosa encontra-se hiperêmica, com aparência nodular, que pode estar presente em toda a região recoberta pela prótese ou, mais frequentemente, restrita à região central do palato (Newton, 1962).

A estomatite por prótese é considerada de alta prevalência acometendo cerca de dois terços dos usuários, sendo a maioria idosos do sexo feminino. Alguns pacientes podem se apresentar assintomáticos, porém a maioria relata sintomas como: dor, desconforto, hemorragia, alteração do paladar e halitose, sintomas que muitas vezes impossibilitam o uso da prótese (Olsen, Stenderup, 1990; Wilson, 1998; D’avila, 2006; Silva et al., 2011).

A presença da prótese é um fator local iniciante para a doença, visto que,

os organismos da *Candida* ssp. possuem habilidade para colonizar sua superfície porosa, contribuindo para o desenvolvimento da doença. O biofilme formado na superfície dessa prótese funciona como um reservatório de micro-organismos, expondo a mucosa a sua contínua presença (Gendreau, Loewy, 2011).

A presença da prótese é considerada um fator local pois pode dificultar o contato das substâncias antimicrobianas e dos anticorpos presentes na saliva com a mucosa bucal (Budtz-Jorgensen E, 1990). A etiologia da EP é considerada multifatorial, segundo autores é iniciada em conjunto com um fator predisponente local como trauma, xerostomia, medicamentos, quimioterapia de cabeça e pescoço e desordens sistêmicas. Além desses, está diretamente relacionada com a higienização bucal e da prótese, o uso noturno da prótese, idade do usuário e idade da prótese (Arendorf, Walker, 1979; Budtz-Jorgensen, 1974; Emami et al., 2008).

Os patógenos oportunistas mais encontrados são os fungos do gênero *Candida* que são bastante comuns na microbiota do organismo humano. A espécie mais prevalente é a *Candida albicans*, sendo considerada o principal fator etiológico, porém outras espécies podem estar associadas como *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* (Dorko et al., 2001; Gendreau, Loewy., 2001; He et al., 2006; Mímica et al., 2009; Salerno et al., 2011; Webb et al., 1998). São fungos leveduriformes e oportunistas, especialmente quando a resistência do hospedeiro é superada pela virulência dos microrganismos (Pereira-Cenci et al., 2008).

A EP pode ser controlada por meio da abordagem medicamentosa antifúngica além da criteriosa higienização tanto bucal quanto da prótese. Porém, em pacientes imunologicamente comprometidos a EP pode se tornar crônica e causar risco a vida (Salerno et al., 2001; Webb et al., 1998). A higienização das próteses deve ser eficiente sendo indicada a imersão em agentes de limpeza como a clorexidina, ácido benzóico e enzimas. Os antifúngicos podem ser administrados de forma tópica ou sistêmica, porém a

utilização de medicamentos tópicos apresenta como desvantagem a fácil eliminação pela saliva (Banting et al., 1995; Kulak et al., 1994).

A anfotericina B e a NYS pertencem ao grupo dos antifúngicos poliênicos. A anfotericina B pode ser administrada via intravenosa ou como agente tópico, no entanto, pode produzir efeitos hepatotóxicos e náuseas. A NYS é considerada o antifúngico padrão no tratamento da EP, por ser um antifúngico poliênico age ligando-se ao ergosterol da membrana plasmática dos fungos, altera sua permeabilidade com consequente perda de conteúdo e morte celular (Gallis et al., 1990; Webb et al., 1998). No entanto esse medicamento quando administrado de maneira tópica apresenta gosto amargo podendo produzir efeitos colaterais como náuseas e intolerância nos pacientes.

O grupo dos antifúngicos azólicos são caracterizados por um anel pentagonal em sua estrutura molecular, compreende drogas como miconazol e o cetoconazol, fluconazol, itraconazol. Os azólicos agem bloqueando a síntese do ergosterol e modificando a síntese de lipídeos, apresentando apenas ação fungistática (Tavares, 2001). O miconazol a 2%, que por sua apresentação na forma de gel, permite uma maior exposição à lesão, refletindo uma melhor e mais rápida regressão do quadro quando aplicado três vezes ao dia, mas em virtude da alta recidiva da doença irá sempre ter sua ação limitada (Arendorf, Walker, 1997). O cetoconazol é administrado via sistêmica em casos mucocutâneos e pode reduzir a ação de alguns antibióticos (Lombardi T, Budtz-Jørgensen E, 1993).

A caspofungina, micafungina e anidulafungina são equinocandinas chegaram à fase de investigação clínica, onde somente a primeira esta licenciada para uso clínico. As equinocandinas apresentam como diferencial o alvo pela parede celular e sua ação é apenas fungistática. Os efeitos adversos são menos frequentes do que a Anfotericina B e a interação com outros fármacos é menor do que as drogas azólicas, porém sua administração exclusivamente endovenosa limitam seu uso clínico (Diakema et al., 2003; Espinel-Ingroff, 1998).

Em relação à utilização dos antifúngicos sistêmicos a grande desvantagem é a possibilidade das espécies fúngicas desenvolverem resistência a esses fármacos. Além disso, a terapia medicamentosa não atua erradicando os microorganismos que colonizam a prótese, sendo frequente a recorrência da infecção (Mishra et al., 2007).

A *Candida* ssp. apresenta alguns fatores de virulência como adesão em superfícies, transformação morfológica e a produção de enzimas extracelulares. O polimetilmetacrilato (PMMA), material base das próteses totais, apresenta porosidade, carga positiva e alta energia de superfície o que acaba por atrair as glicoproteínas salivares formando uma película na base das próteses. Os microorganismos se aproximam dessa película por meio de forças de *Van der Waals* e se unem por meio de adesinas e pontes de hidrogênio (Jorge, 1998). A transformação morfológica da *Candida* ssp., formando hifas, torna-as mais resistentes ao processo de fagocitose e com maior capacidade de aderência às superfícies das próteses totais e maior habilidade em invadir os tecidos do hospedeiro (Williams, Lewis, 2011).

Além disso, esses organismos possuem a habilidade de produzir enzimas extracelulares como as fosfolipases e as proteinases (Arendorf, Walker, 1979; Scully et al., 1994). As proteinases produzidas por *C. albicans* induzem danos às células do hospedeiro, facilitam a produção de hifas e aumentam a aderência por meio da exposição dos receptores. As fosfolipases atuam na lise celular apresentando um efeito citotóxico (Williams, Lewis, 2011).

## 2.2 Desenvolvimento de materiais

A elevada prevalência e recidiva da EP levam ao estudo de novos materiais com ação antimicrobiana que atuem de forma efetiva não só na

prevenção como no tratamento (Gendreau, Loewy, 2011). Devido a isso diversos agentes antimicrobianos vêm sendo incorporados seja nas resinas acrílicas ou nas resinas reembasadoras.

Truhlar et al. (1994) avaliaram a atividade antimicrobiana do material reeembasador Viscogel e do Lynal impregnados com várias concentrações de nistatina, durante 14 dias. A concentração mais elevada de NYS resultou na maior inibição do crescimento de *C. albicans*, porém houve liberação rápida do antimicrobiano durante os primeiro e segundo dias. Urban et al. (2006) compararam a resistência à tração de um condicionador de tecido sem a incorporação de nistatina com o mesmo condicionador de tecido modificado pela adição de nistatina em duas concentrações diferentes (500.000 UI e 1.000.000 UI). Após o preparo, os espécimes foram imersos em água destilada por 24 horas e 7 dias. Os valores de resistência à tração obtidos para os grupos armazenados durante 7 dias foram estatisticamente menores do que os valores dos grupos armazenados por 24 horas. Os resultados deste estudo sugerem que a adição de NYS no condicionador de tecido investigado em concentrações inferiores a 1.000.000 UI não afetaram sua resistência à tração.

Matsuura et al. (1997) realizaram um estudo cuja finalidade foi elucidar o efeito antimicrobiano, *in vitro*, da adição de zeólito de prata aos condicionadores de tecido. Os micro-organismos utilizados foram a *C. albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Foram selecionados cinco condicionadores de tecido disponíveis comercialmente: Visco-gel, GC Soft-Liner, Fitt, SR-Ivoseal e Shofu Tissue Conditioner. A atividade antimicrobiana foi avaliada por meio do teste de porcentagem de células viáveis. Os condicionadores de tecido contendo zeólito de prata mostraram possuir efeito antimicrobiano durante 4 semanas para a *C. albicans* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Chow et al. (1999) realizaram um estudo *in vitro* no qual incorporou agentes antimicrobianos em condicionadores de tecido. Utilizou como agentes antimicrobianos a nistatina, fluconazol e o itraconazol nos reembasadores Coe

soft e Viscogel. Foram testadas as concentrações: 1,3,5,7,9 e 11% com e sem saliva ,para cada grupo. O teste de difusão em ágar foi realizado, utilizando o micro- organismo *C. albicans*, e o diâmetro do halo inibitório foi avaliado durante 14 dias. Espécimes com saliva apresentaram os melhores resultados antifúngicos. Itraconazol alterou as propriedades físicas do Viscogel, esta combinação não é recomendada para uso clínico. A incorporação de 5% de itraconazol com Coe Soft apresentou- se eficaz, tendo seu pico antifúngico durante 3 dias.

Sampaio- Maia et al. (2012) investigaram a efetividade dos adesivos para próteses sobre o crescimento de *C. albicans* in vitro. Os adesivos para próteses dentárias testados foram Corega creme, Kukident creme, Novafix creme, Polident creme, Protefix creme, Steradent creme, Aderyn em pó, Corega pó ultra, pó Protefix e tira Corega. Alterações morfológicas macro e microscópicas em *C. albicans* foram analisadas, assim como a contaminação microbiana do adesivo para próteses dentárias. A maioria dos adesivos para próteses dentárias estudados induziu alterações morfológicas nas células e colônias de *C. albicans*, mas apenas duas tiveram algum efeito inibitório significativo sobre o crescimento das leveduras. Kukident creme inibiu o crescimento de *C. albicans* de uma forma dependente da concentração, ao passo que Corega creme também inibiu mas de uma maneira dependente da concentração. Além disso, os adesivos para próteses dentárias disponíveis como pós tinham contaminação microbiana detectável.

Salim et al. (2013) investigaram a eficácia de um sistema de entrega polimérico impregnado com clorexidina ou fluconazol contra espécies de *Candida*. A quantidade de fármacos liberados e a atividade antifúngica foram mensurados por um bioensaio. A concentração inibitória mínima (CIM) de cada fármaco foi determinada e comparada com as concentrações libertadas. Tanto a clorexidina como o fluconazol tornam-se facilmente liberados a partir do polímero até quatro semanas e a polimerização do acrílico não afetou a atividade

antimicrobiana dos agentes. É importante ressaltar que a quantidade de drogas liberadas excedeu as CIMs da maioria dos isolados também durante a quarta semana de incubação.

Salim et al. (2013) investigaram a eficácia de um polímero impregnado com fluconazol e clorexidina. As concentrações de clorexidina e fluconazol foram fugincidas. O grupo com clorexidina mostrou uma atividade antimicrobiana satisfatória para até 4 semanas, o que pode ser uma alternativa em casos de resposta não satisfatória aos antifúngicos convencionais. Lefebvre et al. (2001) objetivaram determinar se a adição de Triclosan na resina reembasadora Permasoft impede o crescimento de *C. albicans* e se afeta a citotoxicidade do material. O efeito citotóxico foi avaliado pelo ensaio de MTT. Não houve diferença estatisticamente significativa entre Permasoft com ou sem Triclosan quanto ao crescimento de *C. albicans*, a citotoxicidade do material também não foi alterada.

Nomura et al. (2019) estudaram os efeitos de adesivos para próteses totais no crescimento e na transformação morfológica relacionada à adesão de *C. albicans*. Para este propósito, os números de *C. albicans* aderentes, expressões gênicas específicas de hifas, e as imagens em microscopia eletrônica de varredura foram examinadas. As taxas iniciais de adesão em todos os grupos não foram estatisticamente significantes. Os adesivos para próteses dentárias utilizados neste estudo aceleraram o crescimento de *C. albicans*.

Diversos estudos apresentados demonstram o interesse em desenvolver um material que trate de forma efetiva a EP, no entanto ainda existe a dificuldade em manter a liberação do agente antifúngico por um maior período de tempo.

## 2.3 Eletrofiação

A eletrofiação é um processo conhecido desde o início do século XX, embora existam poucos relatos em literatura neste período. Inicialmente o conhecimento se limitava aos físicos, o marco no desenvolvimento do processo está associado as patentes geradas nas décadas de 1930 e 1940 (Burger et al., 2006; Deitzel et al., 2001; Huang et al., 2003). Em 1969, Taylor publicou um trabalho no qual detalhou o estudo do jato da solução produzido durante o processo a partir da diferença de potencial do campo elétrico o denominado cone de Taylor (Taylor, 1969).

Posteriormente os parâmetros envolvidos no processo começam a ser investigados e é destacada a relação direta entre o diâmetro da fibra e a concentração da solução e a tensão injetada no sistema, independente do polímero utilizado (Baumgarten, 1971; Yoshi, Reneker, 1995).

A eletrofiação consiste em um processo simples para a produção de NFs que são de grande interesse devido ao seu amplo campo de aplicação. As mantas de NFs podem ser eletrofiadas a partir de soluções poliméricas e podem ser utilizadas em processos de filtração, nanocatálises, suporte de crescimento de tecido, roupas de proteção, nanoeletrônicos, encapsulação de aditivos alimentícios, membranas de separação, produtos farmacêuticos e reforço de materiais compósitos (Borges et al., 2015; Cacciotti et al., 2014; Cheng et al., 2008; Shukla et al., 2005; Teo, Ramakrishna, 2006).

As NFs produzidas por meio desse processo apresentam características como: porosidade e grande superfície de contato, quanto menor o diâmetro interno da fibra melhor as propriedades mecânicas (Tan et al., 2005). A eletrofiação é um dos métodos mais simples para a preparação de NFs e oferece uma nova perspectiva para os biopolímeros frente a liberação lenta de fármacos, pois aumenta a relação entre superfície, volume e massa, além de possibilitar

alterações nas propriedades mecânicas do polímero em questão (Hiep, Lee, 2010).

O processo ocorre a partir de soluções poliméricas, podendo utilizar como base polímeros como o PCL, poli (álcool vinílico), poli (ácido láctico), poli (acrilonitrila) (Lee et al., 2005; Wang et al., 2009; Zhang et al., 2005). Utilizando essas soluções poliméricas como base é possível incorporar outros materiais obtendo NFs cerâmicas e metálicas, por exemplo, amplamente utilizadas na nanoeletrônica, ou ainda incorporar outros polímeros e até mesmo fármacos (Picciani et al., 2010).

PCL é um polímero semicristalino, e pode ser sintetizado através da polimerização de abertura de anel de  $\epsilon$ -caprolactona, para a obtenção da unidade repetitiva. O PCL é hidrofóbico e solúvel em vários solventes orgânicos, apresenta ponto de fusão entre 59 °C a 64 °C e temperatura de transição vítrea por volta de -60 °C, tendo a capacidade de formar misturas miscíveis com uma grande variedade de polímeros (Middleton et al., 2000). Devido à sua excelente biocompatibilidade, o PCL tem também sido extensivamente investigado como suporte para a engenharia de tecidos (Woodruff et al., 2010). Em função de inúmeros estudos realizados com a policaprolactona, incluindo testes de biocompatibilidade in vitro e in vivo, a Food and Drug Administration aprovou o uso deste material para fins médicos e farmacêuticos (Khor, 2002).

Podemos dizer que a PCL é reconhecida por sua biocompatibilidade com tecidos moles e duros, por ser promissora como material de liberação controlada de fármacos e matrizes de suporte de crescimento tecidual, que pode ser uma aplicação na área de engenharia tecidual (Williams, 2005).

### 2.3.1 O Processo de Eletrofiação

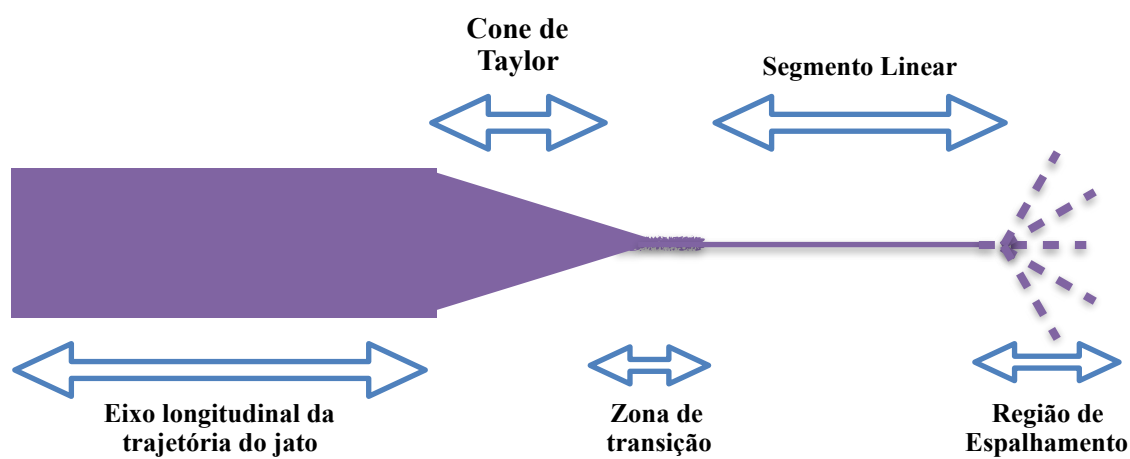
O processo de eletrofiação consiste basicamente em três elementos: uma fonte de alta voltagem, uma seringa com agulha de pequeno diâmetro e um coletor. A fonte de alta tensão se interliga ao sistema por meio de um eletrodo positivo que é conectado na ponta da agulha da seringa e o eletrodo neutro é conectado no coletor, uma bomba ejatora se encarrega de empurrar a solução a uma velocidade constante. A eletrofiação ocorre por meio da aplicação de alta tensão na solução, onde, quando a diferença de potencial gerada no campo elétrico supera a energia de superfície da solução, esta é então alongada e ejetada de encontro ao anteparo coletor, formando as fibras (Costa et al., 2012).

A primeira etapa da eletrofiação consiste na solubilização do material em questão no solvente apropriado, resultando em uma solução com concentração e viscosidade adequadas. A concentração e a viscosidade são grandezas interligadas no processo, sendo que uma solução mais concentrada gera consequentemente uma solução mais viscosa, essa viscosidade é essencial para a extrusão da solução. Uma solução muito fluida pode levar a formação de gotas (*beads*) ao invés das fibras. Após a homogeneização da solução esta pode ser depositada em uma seringa e o processo será iniciado a injeção da tensão (Huang et al., 2003; Rutledge, Fridrikh, 2005).

O contato da ponta da agulha com o cátodo positivo permite a passagem de cargas elétricas, carregando a solução. Conforme a bomba ejatora empurra a solução uma gota se forma em sua extremidade, inicialmente essa gota é mantida pelas forças coesivas da tensão superficial da solução. A medida que a diferença de potencial aumenta no campo elétrico a gota começa a sofrer uma deformação. Um fenômeno ocorre durante o estiramento da solução ao anteparo, a solução vai se alongando na medida que a diferença de potencial gerada se eleva, até que assume um formato cônico, conhecido como cone de

Taylor. O jato eletrificado é dividido em 5 regiões: o eixo longitudinal da trajetória, o cone de Taylor, a zona de transição, o segmento linear e a região de espalhamento (Figura 1) (Reneker, Yarin, 2008).

Figura 1 - Divisão do jato eletrofiado



Fonte: Elaborado pelo autor.

A solução polimérica sofre um estiramento significativo na zona de transição entre o cone de Taylor, onde a zona de estiramento ainda é pequena, e o segmento linear, onde o fluido já está pré estirado. Consequentemente o diâmetro inicial do jato é diminuído no segmento linear. A tensão longitudinal é atenuada ao longo do jato, com isso foi proposto que a estabilidade do jato é mantida a curtas distâncias do cone de Taylor, porém em maiores distâncias as tensões causadas pelas forças elétricas na superfície do jato se comparam à tensão longitudinal, causando assim uma instabilidade no jato e levando à região de espalhamento. Conforme o jato percorre sua trajetória de encontro ao coletor, o solvente evapora e o polímero é solidificado. Nesse instante as cadeias poliméricas se estendem na direção do filamento, originando as fibras. As fibras

se acumulam no coletor, formando as mantas (Feng, 2002; Han, Reneker, 2007; Reneker, Yarin, 2008; Yarin et al., 2001).

O processo de eletrofiação apresenta diversos parâmetros que, ao serem alterados, geram modificações morfológicas no material produzido. Esses parâmetros pode ser divididos em três categorias: alterações nos parâmetros de eletrofiação, que permitem otimizar as dimensões e qualidade das fibras, alterações nas estratégias de eletrofiação e alterações do tipo de coletor, que permite ajustar a disposição das fibras coletadas.

### **2.3.2 Os parâmetros envolvidos**

A eletrofiação apresenta diversos parâmetros envolvidos no processo, estes são no geral divididos em três campos: condições ambientais ( temperatura e umidade), propriedades intrínsecas das soluções (viscosidade, concentração, condutividade elétrica, tensão superficial) e os parâmetros de processamento (tensão aplicada, distância da ponta da agulha ao anteparo coletor, diâmetro da agulha e razão de fluxo da solução) (Costa et al., 2012; Huang et al., 2003).

As temperatura e a umidade do ambiente afetam de forma direta o comportamento da solução, principalmente durante a homogeneização e durante o processo. Dessa forma, para se manter uma produção em escala fiel é recomendado que a eletrofiação seja realizada em laboratórios com condições ambientais controladas, com ar condicionado, desumidificador e com sistema de exaustão , devido aos vapores de solvente emanados da solução (Feng, 2002; Han, Reneker, 2007; Reneker, Yarin, 2008).

As propriedades intrínsecas da solução também afetam de modo direto no processo, a viscosidade apresenta um papel fundamental, existe uma faixa de viscosidade em que a eletrofiação ocorre que está associado de forma direta ao

polímero utilizado (Reneker, Yarin, 2008). A viscosidade está associada não somente a concentração do soluto mas também a massa molar deste, polímeros com baixa massa molar podem ser eletrofiados desde que apresentem fortes interações moleculares (Bhardwaj, Kundu, 2010; Collins et al., 2012). A tensão superficial da solução influencia na estabilidade do processo, se a solução apresentar baixa tensão superficial existe uma maior tendência a eletropulverização do que a eletrofiação (Rayleigh, 1882).

É necessário uma concentração mínima da solução para que a eletrofiação ocorra. Caso uma solução extremamente fluida seja utilizada pode não haver material suficiente no jato para que se forme uma fibra contínua podendo gerar uma amostra descontínua ou com *beads*. Caso a solução seja muito concentrada também pode haver problemas relacionados ao entupimento da agulha ou a bomba ejetora não ter força suficiente para empurrar a solução (Gupta et al., 2005; Tan et al., 2005). A condutividade elétrica está associada a carga da solução e ao diâmetro final das fibras. Soluções de maior condutividade geralmente produzem fibras de menor diâmetro. Para otimizar esse fator pode-se utilizar uma mistura de solventes, adicionando solventes com alta condutividade dielétrica como o dimetilformamida (DMF), metanol ou etanol. Outra alternativa seria ainda a adição de sais tensoativos iônicos que afetam a tensão superficial da solução (Bhardwaj, Kundu, 2010; Kenneth et al., 2007; Tan et al., 2005; Yang et al., 2005; Zhu et al., 2009).

A bomba ejetora controla a velocidade com que a solução é ejetada, para que a solução seja enviada ao sistema de forma contínua. Caso o fluxo esteja muito elevado pode não haver tempo para a evaporação do solvente gerando fibras úmidas e um fluxo maior tende a formar fibras com diâmetros maiores (Bhardwaj, Kundu, 2010; Huang et al., 2003).

Heikkilä e Harlin (2008) concluíram que existe uma relação entre o diâmetro das fibras, a tensão aplicada e a distância entre a agulha e o coletor. A tensão aplicada pode ser considerada como o principal fator, pois é a

responsável pela formação do jato de solução polimérica que vai da agulha para o coletor, se essa for muito baixa, não haverá uma diferença de potencial suficiente para superar a tensão superficial da solução polimérica e ocorrerá o gotejamento da solução na ponta da agulha, caso a tensão aplicada seja muito alta, o jato formado não será uniforme e as NFs geradas terão diâmetros variados podendo ocorrer a formação de defeitos (*beads*).

Já a distância da ponta da agulha ao coletor foi considerada o segundo fator mais importante, se for muito grande o campo elétrico será fraco e com isso muitas fibras poderão não alcançar o coletor e acabarão ficando no caminho o que diminuirá a produtividade e haverá desperdício da matéria-prima. Se a distância for pequena não haverá espaço para a evaporação do solvente o que também poderá acarretar na formação de fibras deficientes.

A formação de *beads* pode ser ocasionada devido a instabilidades no jato que podem ser agravados por soluções com baixa viscosidade, a redução da tensão superficial leva a uma tendência do rompimento do jato (Khor et al., 2002; Middleton, Tipton, 2000; Woodruff et al., 2010). Os *beads* são defeitos estruturais apresentados nas fibras em forma de pérolas. Ao se obter fibras muito finas estas podem conter *beads*, o que diminui a área de superfície e deteriora a função das fibras (Costa et al., 2012).

A manta de fibras eletrofiadas possui características como grande área superficial específica, alta porosidade e interconectividade, tornando-as adequadas para transporte de nutrientes e comunicação celular, sendo possível sua utilização em várias aplicações biomédicas.

As formas de administração de fármacos sempre foram um ponto importante para as áreas da saúde, a liberação de fármacos por NFs na cavidade oral torna-se um ponto de grande interesse visto que por meio da cavidade oral é possível obter efeitos tópicos e sistêmicos. A mucosa oral é altamente vascularizada e a liberação lenta de fármacos por essa via apresenta vantagens como: evita o metabolismo pré-sistêmico do trato gastrointestinal e a via de

eliminação hepática, apresenta facilidade de administração do dispositivo, sem dor, com ação de início rápido, ótima aceitabilidade pelo paciente o que aumenta a sua adesão ao tratamento aumentando assim a taxa de sucesso (Rossi et al., 2005).

### **2.3.3 Liberação lenta de fármacos**

A cavidade bucal é revestida por uma membrana mucosa que apresenta uma área de superfície em torno de 100 cm<sup>2</sup> e histologicamente pode ser classificada como: mucosa mastigatória, de revestimento e especializada. A mucosa mastigatória reveste a gengiva e o palato duro. Está firmemente aderida, por intermédio da lamina própria, ao osso subjacente e seu epitélio é altamente queratinizado. A mucosa de revestimento apresenta um epitélio não queratinizado, sua lamina própria é estruturada de modo a permitir mobilidade e não está firmemente aderida as estruturas subjacentes, recobre os lábios, a mucosa jugal, palato mole, ventre lingual e assoalho bucal. Já a mucosa especializada reveste a superfície da língua, embora funcionalmente seja mucosa mastigatória, este tecido contém papilas e botões gustativos que exercem funções especiais (Ten Cate, 2013). As regiões da cavidade oral onde a liberação lenta de fármacos pode ocorrer são: mucosa palatina, jugal, gengival e sublingual (Scholz et al., 2008).

O estudo da liberação lenta de fármacos torna-se notável pelo conhecimento do sucesso das terapias medicamentosas não somente pela farmacodinâmica adequada da molécula, mas também pela forma que a droga é liberada e a manutenção da dose efetiva nos locais de ação (Hilt, Peppas, 2005). Os sistema de liberação controlada de fármacos visa manter a concentração dos fármacos em níveis terapêuticos por maior período de tempo, resultando em um

aumento nos intervalos de administração e redução dos efeitos colaterais (Meng et al., 2011).

A eletrofiação proporciona uma grande flexibilidade na escolha dos materiais para aplicação no processo de liberação lenta de fármacos. Materiais biodegradáveis ou não-degradáveis podem ser utilizados para a liberação de fármacos por livre difusão ou sobre auto-degradação. Um grande número de drogas pode ser utilizado como: antibióticos, proteínas e fármacos de combate ao câncer (Sill, Recum, 2008).

### 3 PROPOSIÇÃO

O objetivo desse estudo foi sintetizar mantas de Nanofibras de PCL com adição do antifúngico NYS, caracterizar e avaliar a atividade antifúngica.

Objetivos específicos:

- Avaliar a influência dos parâmetros da eletrofição (voltagem, distância e fluxo), no diâmetro das fibras do polímero PCL /NYS obtidas;
- Caracterizar a superfície da manta de PCL e da blenda de PCL/NYS por meio de testes físico/químicos;
- Avaliar a influência das mantas de PCL com NYS na inibição de crescimento nas colônias de *C. albicans*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais utilizados são citados na Tabela 1.

Tabela 1- Materiais e fabricante

| Material                | Descrição                                   | Fabricante       |
|-------------------------|---------------------------------------------|------------------|
| PCL                     | Polímero a base de policaprolactona (Éster) | Sigma-Aldrich    |
| Dimetilformamida        | Dimetilformida puro                         | Sigma-Aldrich    |
| 1,1,2,2 Tetracloroetano | Tetracloroetano puro                        | Produção própria |
| Nistatina               | Nistatina Pura (pó)                         | Sigma-Aldrich    |

Fonte: Elaborado pelo autor.

### 4.1 Produção de Nanofibras: Processo de eletrofiação

#### 4.1.1 Preparo das soluções

A solução polimérica foi preparada dissolvendo 1.8 g de PCL em 4.05 mL de Dimetilformamida e em 4.05 mL de 1,1,2,2- Tetracloroetano. Ficou em agitação magnética (IKA RH Basic, Staufen, Alemanha) durante 24 horas.

Em seguida a nistatina foi adicionada a solução de PCL, nas seguintes proporções, resultando nos grupos:

Solução A: 0.045 g de NYS foram adicionados a 2 mL da solução de

PCL

Solução B: 0.090 g de NYS foram adicionados a 2 mL da solução de

PCL

Solução C: 0.225 g de NYS foram adicionados a 2 mL da solução de

PCL

As soluções permaneceram em agitação magnética (IKA RH Basic, Staufen, Alemanha) durante 24 horas.

#### **4.1.2 Síntese das Nanofibras**

Para a síntese das NFs experimentais, o equipamento de eletrofiação é constituído por uma fonte de alta tensão, uma seringa plástica de 5 mL com agulha de ponta reta e diâmetro do orifício de 0,7 mm<sup>2</sup> e uma bomba ejetora (equipamento obtido por meio do processo FAPESP 2014/00668-4).

A eletrofiação possui algumas variáveis a fim de se otimizar o processo, como a tensão, a distância da ponta da seringa ao anteparo e o fluxo da solução. O processo de sintetização foi realizado no laboratório de Bioengenharia e Biomateriais do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – UNESP.

Quatro soluções foram eletrofiadas:

- Solução de PCL
- Solução A (PCL/NYS)
- Solução B (PCL/NYS)
- Solução C (PCL/NYS)

Para esse estudo foram geradas 6 amostras de NFs para cada solução acima, variando a tensão em 10, 13 e 15 KV, a distância da ponta da agulha ao anteparo alternou entre 8 e 12 cm, o fluxo da solução foi mantido em 0,5 mL/h (Quadro 1).

Quadro 1- Representação das variações dos parâmetros das amostras de NFs testadas

| Distância (cm) | Tensão (kv) |           |           |
|----------------|-------------|-----------|-----------|
|                | 10          | 13        | 15        |
| 8              | Amostra 1   | Amostra 2 | Amostra 3 |
| 12             | Amostra 6   | Amostra 5 | Amostra 4 |

Fonte: Elaborado pelo autor.

Após a realização da eletrofiação, variando os parâmetros exemplificados acima foi preciso determinar qual foi o parâmetro que otimizou a produção de NFs, ou seja, que resultou em NFs uniformes, sem defeitos (*beads*), para tal análise se fez necessário a caracterização físico/química dos grupos obtidos, para isto, na parte seguinte do estudo serão realizados os testes para caracterização das NFs sintetizadas.

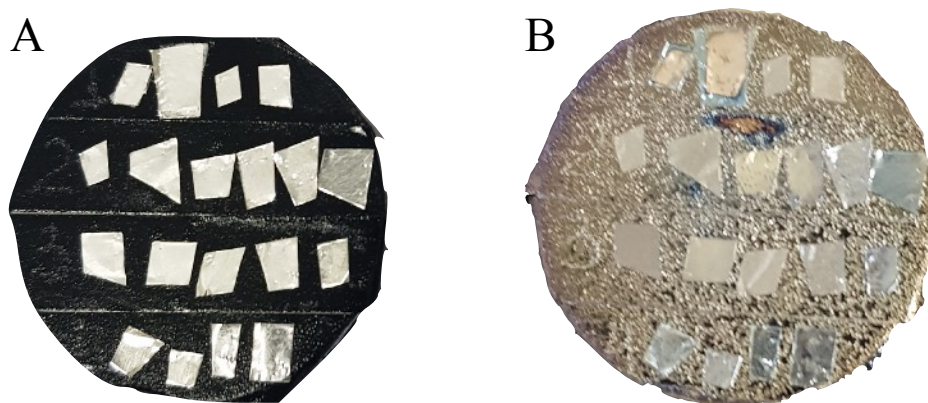
## 4.2 Testes para caracterização das NFs sintetizadas

Uma caracterização microestrutural desejável das NFs envolve a determinação da estrutura cristalina, composição química, quantidade, tamanho, forma e distribuição das fases.

#### 4.2.1 Microcopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para verificar a qualidade das amostras sintetizadas, foram realizadas análises da morfologia em MEV (Inspect S 50, FEI Company, Brno, República Tcheca). No ensaio de MEV, as amostras foram fixadas no suporte e recobertas por fina camada de ouro (Figura 2). Este teste visa analisar a orientação e morfologia das nanofibras, bem como mudanças superficiais por detecção de elétrons secundários.

Figura 2 - Preparo das amostras de NFs para análise em MEV



Legenda: A: amostras de NFs posicionadas em *stub*. B: amostras de NFs posicionadas em *stub* após recobrimento de ouro.

Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.2.2 Análise dos diâmetros médios das fibras

O diâmetro das NFs foi calculado com o auxílio do software computacional, ImageJ (Versão 1.44, National Public of Health) por meio das micrografias obtidas em MEV. Para tal foram analisadas as 6 micrografias de cada um dos quatro grupos, onde foram realizadas 10 mensurações de diâmetros em 10 diferentes regiões, sendo 100 análises para cada imagem. As médias das variáveis avaliadas foram comparadas pela Análise de Variância (ANOVA) 1-fator, seguida pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Foi escolhida 1 amostra para cada grupo (PCL, A, B, C) para análises posteriores. A escolha foi baseada em uma análise comparativa seguindo a ordem: ausência de defeitos (beads), menor diâmetro das fibras, menor coeficiente de variação, menor tensão utilizada para a síntese das fibras e menor distância utilizadas.

#### 4.2.3 Espectroscopia por energia dispersiva (EDS)

Para realização de análise qualitativa da composição química dos elementos químicos das NFs, foi utilizado um espectrômetro por dispersão de energia (EDS) (Bruker Nano GmbH 410, Berlin, Alemanha) associado ao *software* Espirit 1.9 (Bruker, Berlin, Alemanha) no MEV (Inspect S50, FEI Company, Brno, República Tcheca).

#### **4.2.4 Análise de difratometria de raios- X (DRX)**

Representa o fenômeno de interação entre o feixe de raios- x incidente e os elétrons dos átomos componentes de um material. Essa análise foi utilizada para realizar a caracterização microestrutural, estudar a estrutura cristalina e seu índice de cristalinidade (relação entre as partes cristalinas e não cristalinas do material).

As fases cristalinas foram identificadas por meio de um padrão de difração que depende do material em questão. Cada material, ao receber o feixe de raios- x, acaba por difratá- lo pela trama cristalina presente.

Amostras dos quatro grupos em questão (PCL, A, B e C) foram analisadas. Foram preparadas no formato 3x3 cm e posicionadas no aparelho de DRX (Shimadzu XRD7000, radiação  $\text{CuK}\alpha$ ,  $2\theta = 20\text{-}80^\circ$ , 30 mA, 40 kV).

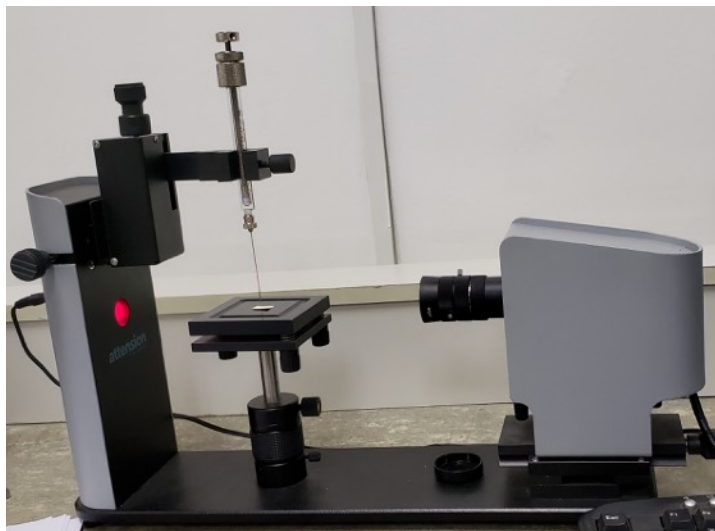
#### **4.2.5 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier**

A técnica FTIR é considerada uma análise padrão, muito utilizada para caracterizar a estrutura dos polímeros. É utilizada para verificar a presença das bandas de absorção dos grupos funcionais presentes nas amostras, esse espectro é obtido pela pesagem da radiação que fornece os comprimentos de onda dos grupos funcionais presentes. A referida análise foi realizada utilizando o equipamento de FT-IR (Spotlight 400 – Perkin-Elmer) no modo ATR na região de  $4000 - 500 \text{ cm}^{-1}$ , 32 varreduras e resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.2.6 Análise da molhabilidade utilizando a técnica do ângulo de contato

Para a análise da molhabilidade foi preparada amostra das 4 fibras escolhidas. Foram cortadas 3 amostras em formato regular (2 cm X 2 cm). O ângulo de contato das superfícies será analisado por meio de um Goniômetro Óptico (TL 1000 – Invoiced freight, Theta Lite, Attension, Lichfield, Staffordshire, RU), onde uma seringa de vidro do sistema (Gastight Syringes #1001 – 1 ml, Hamilton, Reno, Nevada, EUA) deposita uma gota de água destilada sobre a superfície da amostra (Figura 3). Uma série de imagens foi gravada pela câmara do equipamento pelo período de 15 segundos. O software OneAttension (Biolin Scientific, Lichfield, Staffordshire, RU) calculou os valores médios para a amostra a partir das imagens obtidas.

Figura 3 - Análise das NFs em Goniômetro.



Fonte: Elaborado pelo autor.

### 4.3 Atividade antimicrobiana

#### 4.3.1 Microorganismo e condições de crescimento

Previamente à realização dos ensaios microbiológicos foi realizado o crescimento da *C. albicans*. Desta forma, para o preparo do inóculo, o micro-organismo *C. albicans* (American Type Culture Collection - ATCC 18804, Manassas, EUA), mantido em freezer a menos 80°C, foi semeado sobre o meio de cultura ágar *Sabouraud* Dextrose (SDA - Himedia Laboratories, Mumbai, Índia) e incubado a 37°C por 48 horas.

Após o período de incubação, duas alçadas da levedura, recém-cultivada, foram adicionadas em um frasco contendo Caldo *Sabouraud* Dextrose (Difco, Detroit, EUA) e incubados a 37°C por 24 horas e sob agitação de 75 rpm (estufa orbital). Decorrido o período de incubação os micro-organismos foram centrifugados a 2000 rpm a 21°C por 10 minutos e lavados duas vezes com solução fisiológica tampão fosfato estéril (PBS) (NaCl 100 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, pH 7,2) por meio de agitação e centrifugação. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi suspenso em 10 mL de solução fisiológica tampão fosfato (PBS). Esse procedimento foi repetido novamente. A densidade óptica da suspensão foi determinada e padronizada utilizando-se espectrofotômetro com filtro de 530 nm a um valor de  $1 \times 10^6$  células/ mL. A partir da padronização das células fúngicas foi realizado o ensaio microbiológico descrito abaixo.

#### **4.3.2 Ensaio da concentração inibitória mínima (CIM)**

Inicialmente foi realizada a análise da atividade antifúngica das amostras de NFs de PCL com NYS em três diferentes concentrações (A, B e C) para verificar por estimativa da CIM para a inativação de *Candida albicans* utilizando o ensaio de microtitulação em caldo de cultura. Para isto, foram dispensadas alíquotas de 200µL de suspensão de *C. albicans* padronizada a  $10^{-6}$  células/ml, em espectrofotômetro, em placas de cultura de 24 compartimentos. Essas células fúngicas foram expostas as mantas de NFs obtidas como padrão (3 concentrações) A, B e C e também a manta somente com o polímero PCL. Em seguida, essa placa de cultura foi armazenada em estufa por 48 horas a 37°C.

Após esse período a CIM foi definida como a menor concentração para a qual não houve crescimento visível por meio de inspeção visual (Wady et al., 2012). Este ensaio foi realizado em triplicata, ou seja, para cada concentração foram destinados três compartimentos da placa, além disso, o experimento foi realizado em três ocasiões diferentes, com a finalidade de aumentar a confiabilidade dos dados obtidos.

#### **4.3.3 Ensaio da concentração microbicida mínima (CMM)**

Para determinar a CMM das NFs, ou seja concentração capaz de promover a morte do micro-organismo, foi necessário inocular em RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 10 µL de alguns poços da microplaca. Os poços eleitos para a semeadura se basearam a partir da CIM, onde foram semeados o poço da CIM, assim como um anterior e outro posterior a ela. Após

incubação de 48 horas foi avaliado se as placas apresentaram crescimento de colônias, determinando a CMM de cada NF.

#### **4.4 Análise Estatística**

Para os dados obtidos pelos testes de DRX, MEV, e FTIR, foram realizadas análises descritivas, com cálculos de média e desvio padrão. Para as variáveis em análise, os dados foram submetidos a análise estatística por meio de programas computacionais : MINITAB (Minitab, version 17.2.1, 2015) e Origin (Mi-crocal origin®, 6.0, USA).

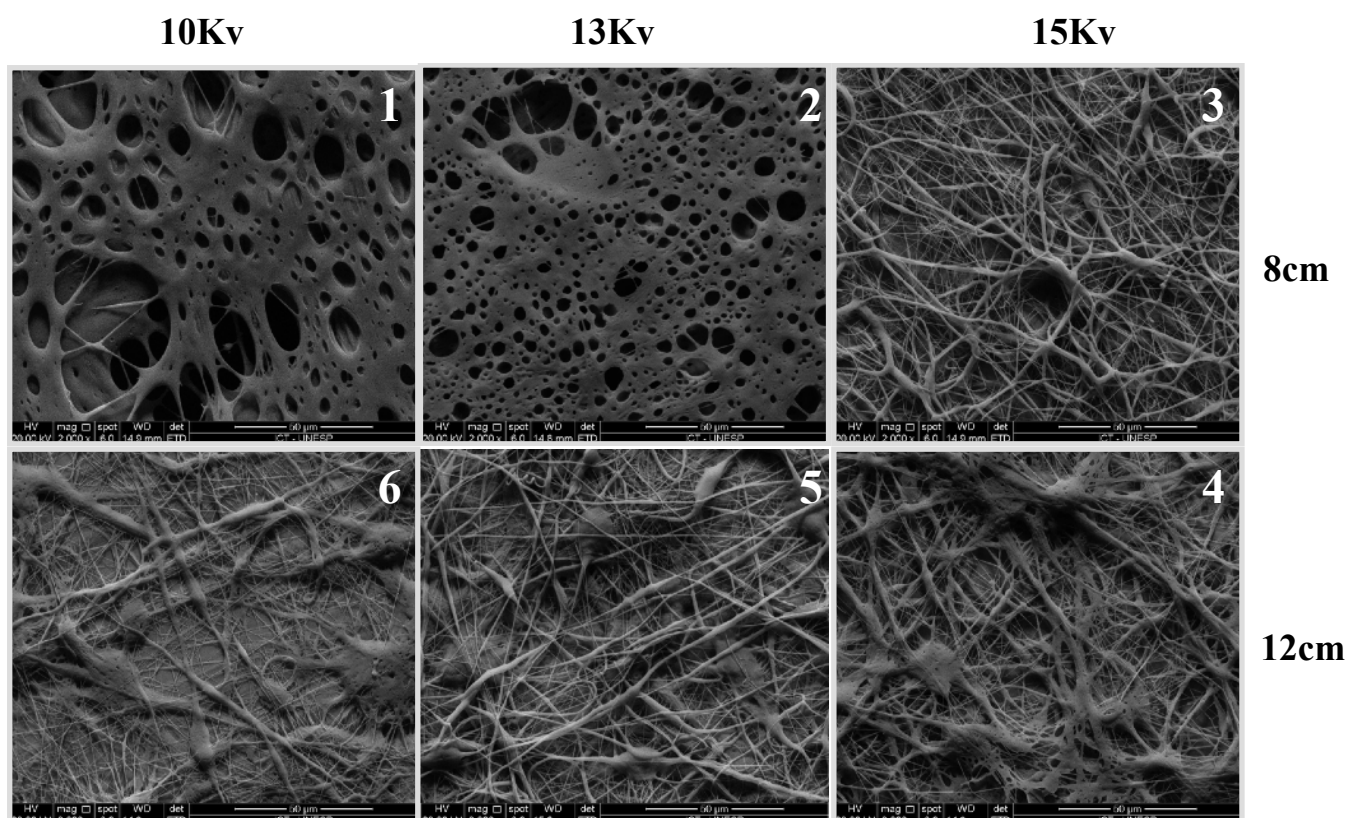
## 5 RESULTADO

### 5.1 Testes para caracterização das nanofibras sintetizadas

#### 5.1.1 Microscopia eletrônica de varredura

Por meio da análise em MEV foram obtidas 6 micrografias para as NFs de PCL (Figura 4) , 6 micrografias para as NFs obtidas a partir da solução A, B e C (PCL com NYS), representadas nas figuras 5, 6 e 7.

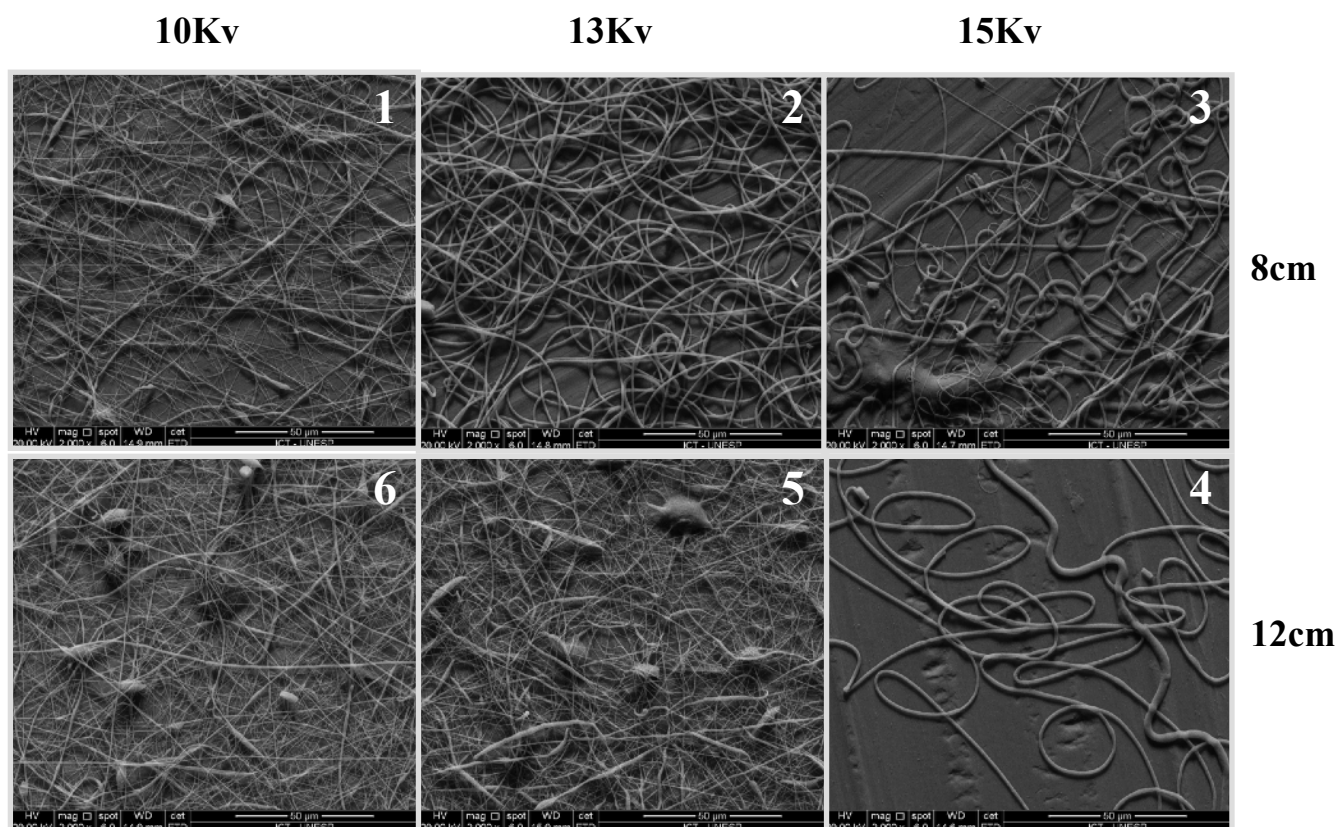
Figura 4- Micrografias de NFs de PCL sintetizadas



Legenda: 2000x aumento  
Fonte: Elaborada pelo autor.

As micrografias das NFs sintetizadas demonstram uma formação mais reticular nas amostras 1 e 2, enquanto que nas amostras 3, 4, 5 e 6 demonstraram morfologia fibrilar, sendo a amostra 3 a mais volumosa (Figura 4).

Figura 5- Micrografias de NFs sintetizadas a partir da solução A (PCL/NYS)

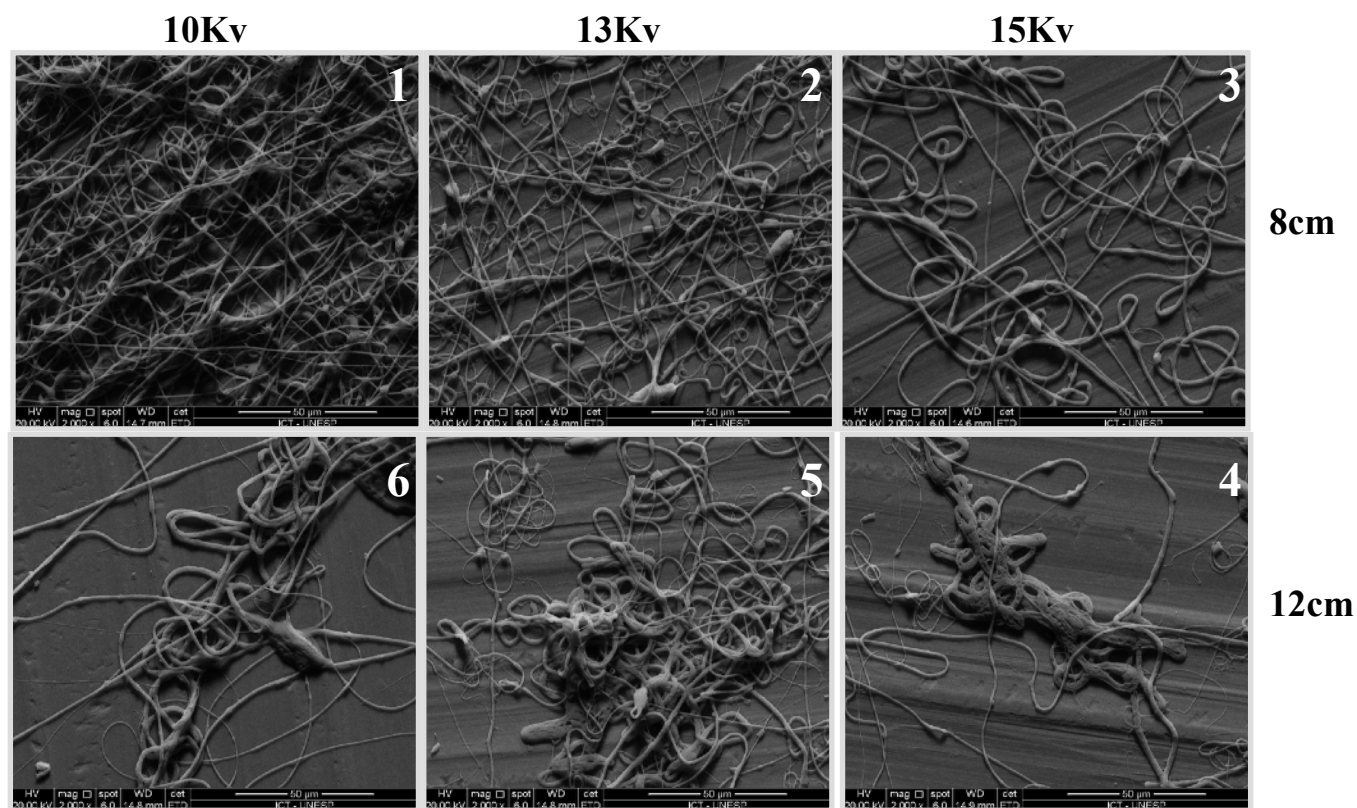


Legenda: 2000x aumento

Fonte: Elaborada pelo autor.

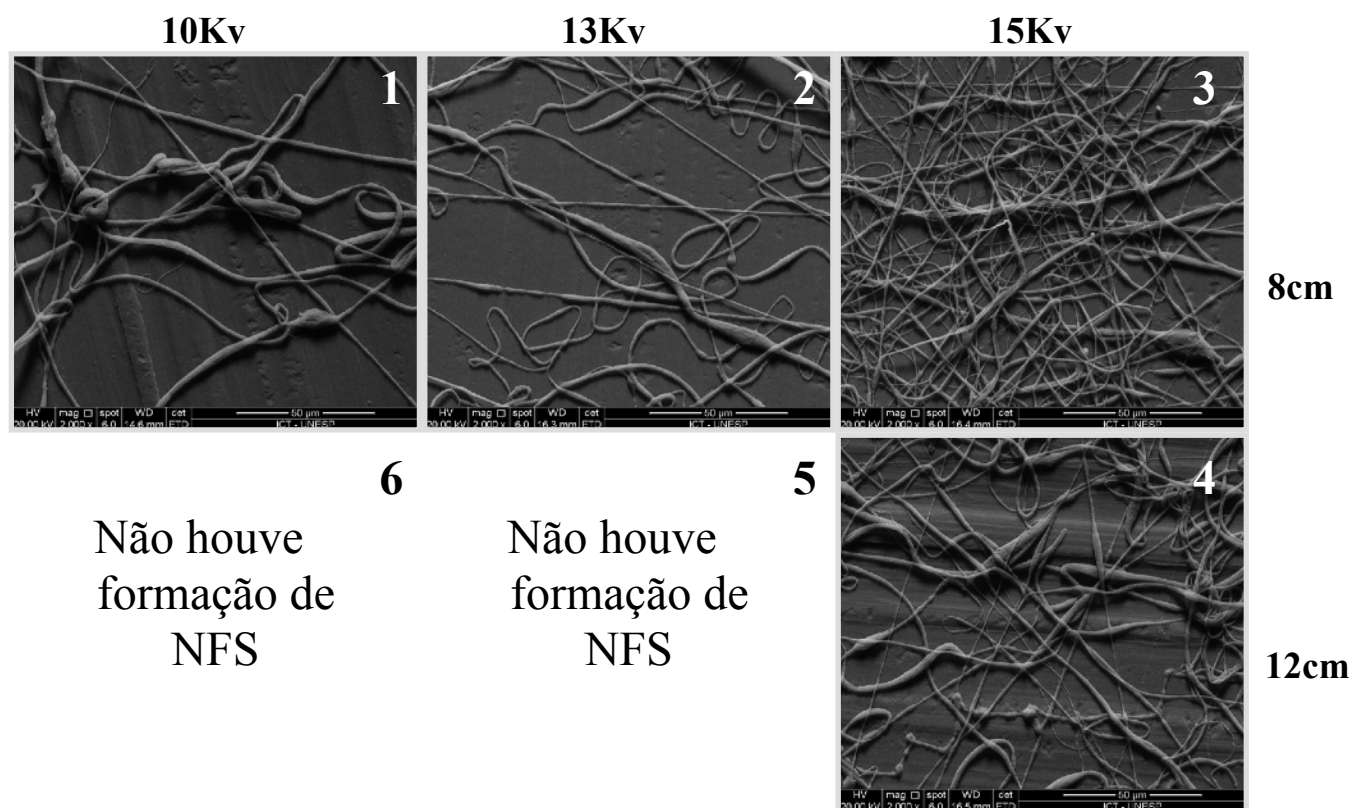
As micrografias para a solução A demonstram a formação efetiva de NFs para todas as amostras (Figura 5). A amostra 2 apresenta-se mais volumosa e uniforme, vale ressaltar que as amostras foram coletadas durante o mesmo período de tempo (1 minuto), após formação observada em coletor. A amostra 4 apresentou a menor produção em volume, as amostras 5 e 6 apresentaram algumas discontinuidades (*beads*).

Figura 6- Micrografias de NFs sintetizadas a partir da solução B (PCL/NYS)



Legenda: 2000x aumento  
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 7- Micrografias de NFs sintetizadas a partir da solução C (PCL/NYS)



Legenda: 2000x aumento  
 Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 6 demonstra as micrografias para o grupo B, onde todas as amostras resultaram em NFs. As amostras 1 e 2 foram consideradas as mais volumosas. As micrografias para o grupo C demonstraram formação efetiva de NFs para as amostras de 1 a 4, sendo que a amostra 3 se demonstrou mais volumosa e uniforme (Figura 7).

### 5.1.2 Análise do diâmetro médio das fibras

A estatística dos valores médios dos diâmetros das fibras para os grupos A, B e C estão apresentados na Tabela 2, 3, 4 e 5.

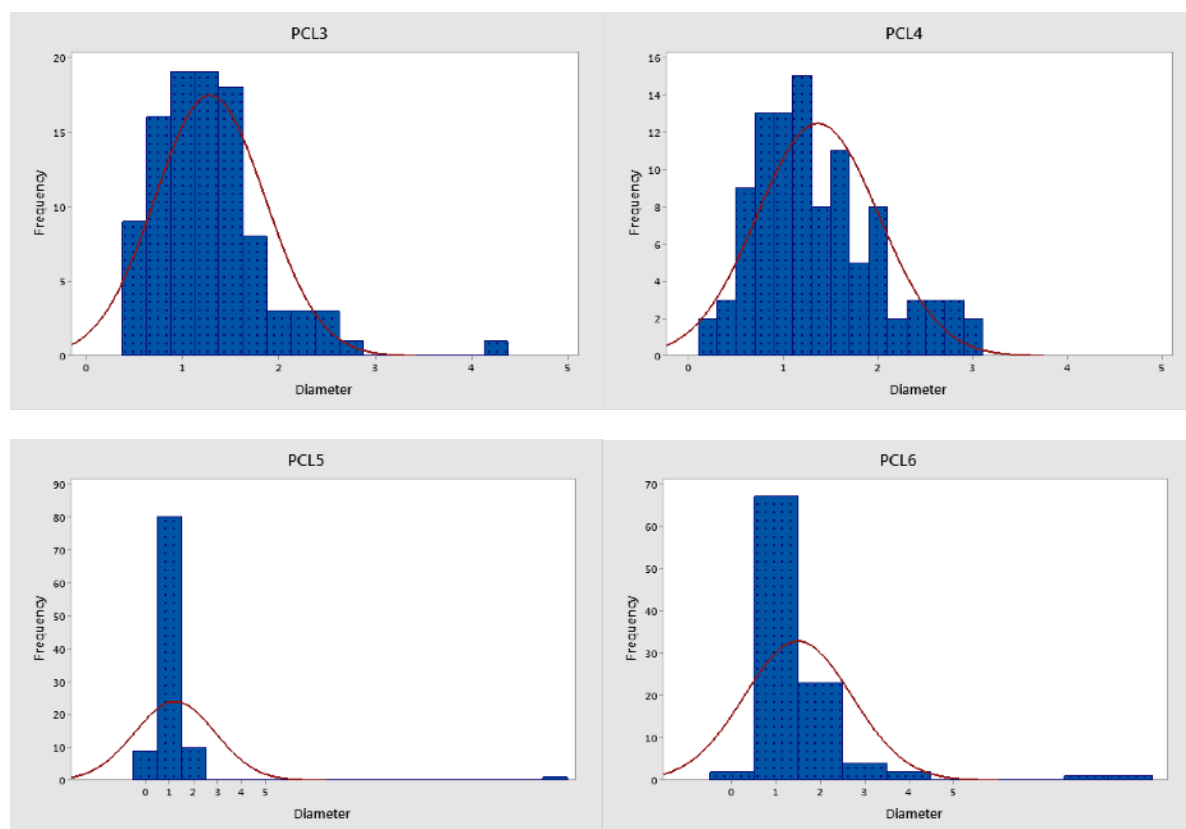
As Figuras 8, 9, 10 e 11 mostram a distribuição do diâmetro das fibras poliméricas obtidas por eletrofiação. Os histogramas apresentam a distribuição e a frequência dos tamanhos das fibras e a gaussiana sobre os histogramas mostra como ocorreu à distribuição normal dos diâmetros próximo ao valor médio. Os resultados mostraram que para as amostras eletrofiadas, a maior quantidade das fibras está distribuída próxima ao ponto médio da gaussiana, isto ocorre devido à boa homogeneidade das fibras produzidas pelo processo de eletrofiação.

Tabela 2– Medida de tendência central (Mean) em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ), número de medições (N), desvio padrão (SD), ( $\mu\text{m}$ ) e análise de comparação dos fatores de Tukey para as NFs do grupo da solução PCL

| <b>Group</b> | <b>N</b> | <b>Mean</b> | <b>SD</b> | <b>Tukey</b> |
|--------------|----------|-------------|-----------|--------------|
| PCL6         | 100      | 1,495       | 1,216     | A            |
| PCL4         | 100      | 1,3645      | 0,641     | A            |
| PCL3         | 100      | 1,2839      | 0,572     | A            |
| PCL5         | 100      | 1,229       | 1,670     | A            |

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 8 - Histogramas de frequência dos diâmetros ( $\mu\text{m}$ ) das NFs do grupo da solução PCL



Fonte: Elaborado pelo autor.

Foram eletrofiadas algumas amostras para cada grupo estudado com a finalidade de, por meio da variação dos parâmetros, otimizar a produção resultando em NFs uniformes, volumosas e confiáveis para a reprodução em larga escala. Logo, dentre as amostras de cada grupo, foi selecionada apenas uma considerada padrão. Para essa seleção os seguintes tópicos foram levados em consideração: ausência de defeitos (*beads*), menor diâmetro das fibras, menor tensão utilizada para síntese das fibras, menor distância utilizada.

Para a solução PCL a amostra PCL3 foi escolhida como padrão, pois apresentou o menor diâmetro  $1,28 \mu\text{m} \pm 0,57$ , a maior quantidade de fibras produzidas para o mesmo tempo de coleta para todas as amostras (Tabela 2). A tensão injetada foi de 15 kv e a distância da ponta da agulha ao anteparo foi de 8

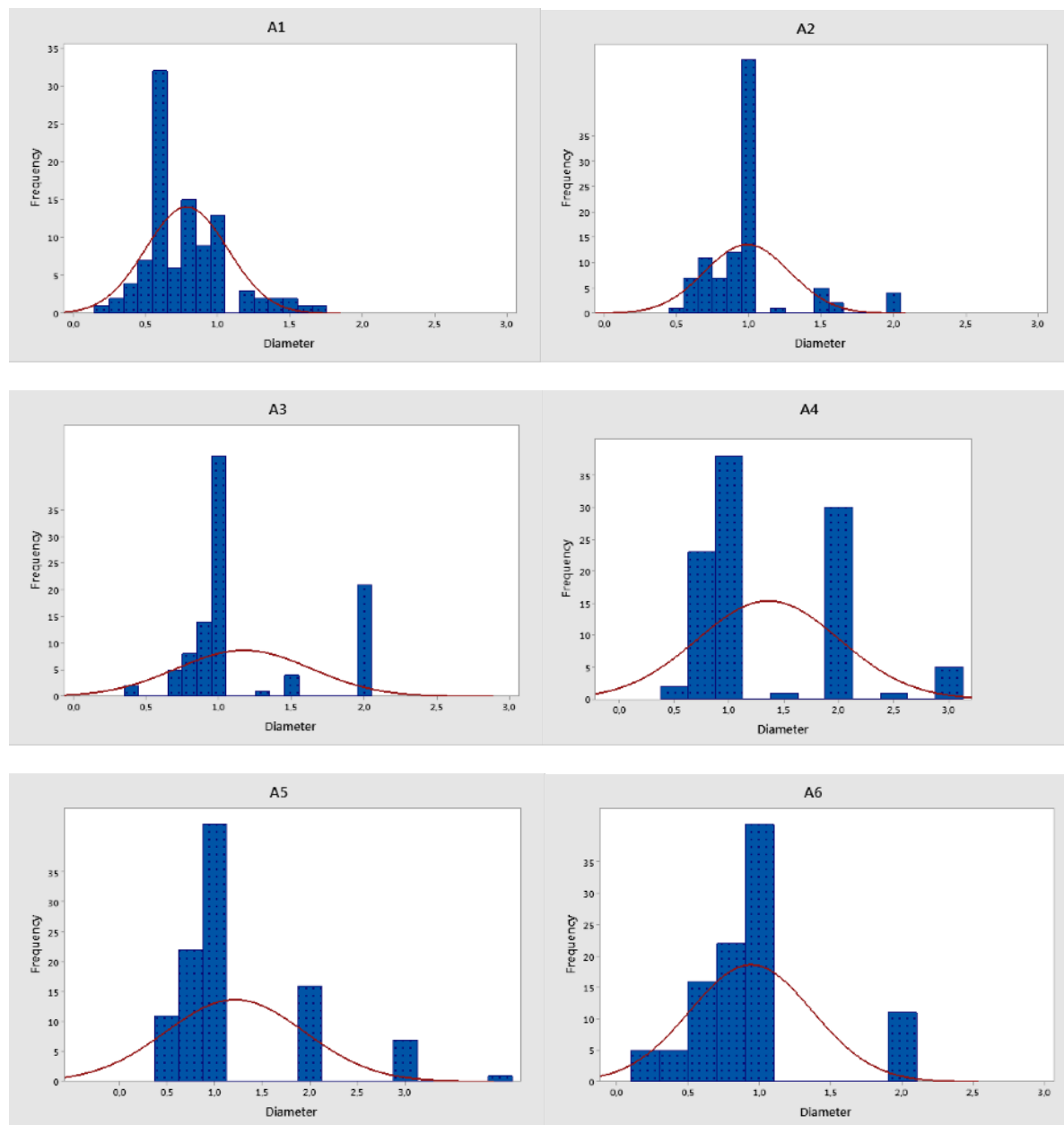
cm. A mostra PCL3 será denominada apenas PCL para as etapas seguintes de caracterização e durante as análises antimicrobianas.

Tabela 3 – Medida de tendência central (Mean) em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ), número de medições (N), desvio padrão (SD), ( $\mu\text{m}$ ) e análise de comparação dos fatores de Tukey para as NFs do grupo da solução A

| <b>Group</b> | <b>N</b> | <b>Mean</b> | <b>SD</b> | <b>Tukey</b> |
|--------------|----------|-------------|-----------|--------------|
| A1           | 100      | 1,36        | 1,2842    | A            |
| A2           | 100      | 0,9877      | 0,2935    | A            |
| A3           | 100      | 1,1714      | 0,4599    | A            |
| A4           | 100      | 1,3569      | 0,6488    | A            |
| A5           | 100      | 1,2149      | 0,7297    | A            |
| A6           | 100      | 0,9411      | 0,4282    | A            |

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 9 - Histogramas de frequência dos diâmetros ( $\mu\text{m}$ ) das NFs do grupo da solução A



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para a solução A os diâmetros das amostras não apresentaram diferença estatisticamente significativa (Tabela 3). O padrão escolhido foi o A2 com

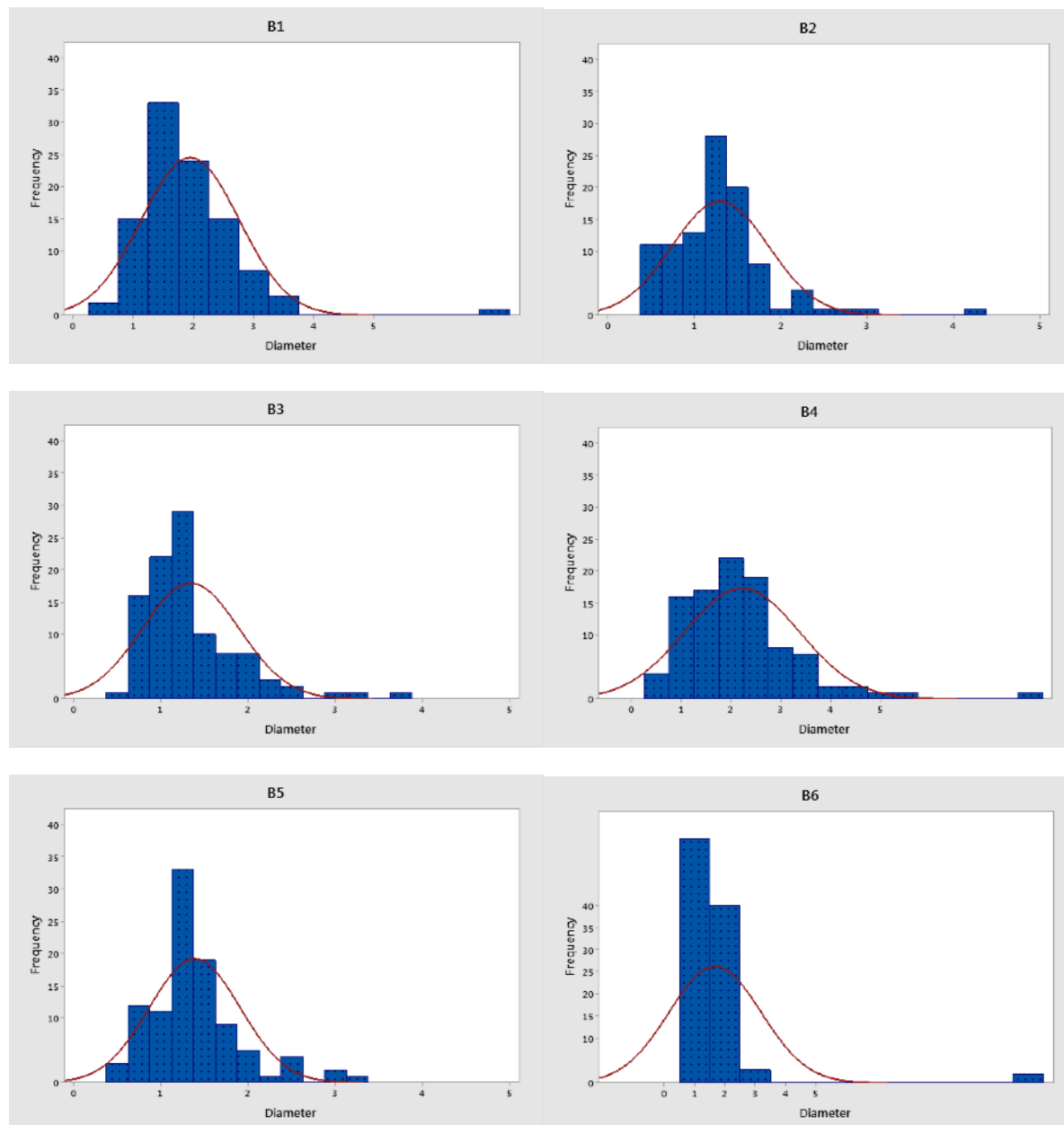
diâmetro de  $0,99 \mu\text{m} \pm 0,29$  , a tensão utilizada foi de 13 kv e a distância da ponta da agulha ao anteparo foi de 8 cm. A amostra A2 foi escolhida por apresentar uma maior quantidade de fibras, ausência de beads, uniformes e com o menor desvio padrão. A amostra A2 será denominada apenas A para as etapas seguintes de caracterização e durante as análises antimicrobianas.

Tabela 4 – Medida de tendência central (Mean) em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ), número de medições (N), desvio padrão (SD), ( $\mu\text{m}$ ) e análise de comparação dos fatores de Tukey para as NFs do grupo da solução B

| <b>Group</b> | <b>N</b> | <b>Mean</b> | <b>SD</b> | <b>Tukey</b> |
|--------------|----------|-------------|-----------|--------------|
| B1           | 100      | 1,9455      | 0,8131    | A B          |
| B2           | 100      | 1,3001      | 0,5601    | C            |
| B3           | 100      | 1,3431      | 0,5560    | C            |
| B4           | 100      | 2,219       | 1,154     | A            |
| B5           | 100      | 1,3887      | 0,5199    | C            |
| B6           | 100      | 1,675       | 1,522     | B C          |

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 10 - Histogramas de frequência dos diâmetros ( $\mu\text{m}$ ) das NFs do grupo da solução B



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para a solução B os diâmetros das amostras B2, B3, B5 e B6 não apresentaram diferença estatisticamente significante (Tabela 4). O padrão escolhido foi o B2 com média de diâmetro de  $1,3 \mu\text{m} \pm 0,56$ , tensão utilizada foi

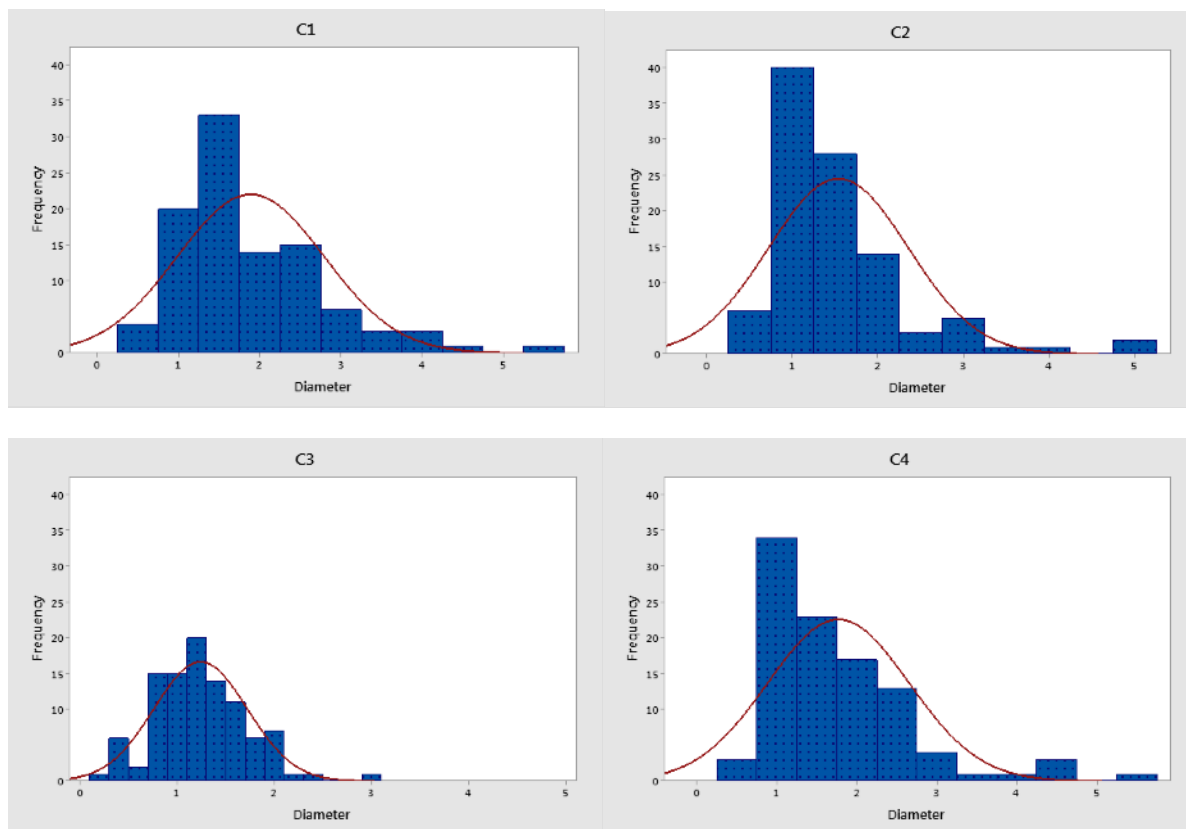
de 13 kv e 8 cm de distância da ponta da agulha ao anteparo. A amostra B2 foi escolhida pois apresentou menor tensão, maior volume de fibras e distribuição uniforme. A mostra B2 será denominada apenas B para as etapas seguintes de caracterização e durante as análises antimicrobianas.

Tabela 5– Medida de tendência central (Mean) em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ), número de medições (N), desvio padrão (SD), ( $\mu\text{m}$ ) e análise de comparação dos fatores de Tukey para as NFs do grupo da solução C

| <b>Group</b> | <b>N</b> | <b>Mean</b> | <b>SD</b> | <b>Tukey</b> |   |
|--------------|----------|-------------|-----------|--------------|---|
| C-1          | 100      | 1,8896      | 0,9064    | A            |   |
| C-2          | 100      | 1,5417      | 0,8151    | B            |   |
| C-3          | 100      | 1,2418      | 0,4795    | C            |   |
| C-4          | 100      | 1,7709      | 0,8843    | A            | B |

Fonte: Elaborado pelo autor.

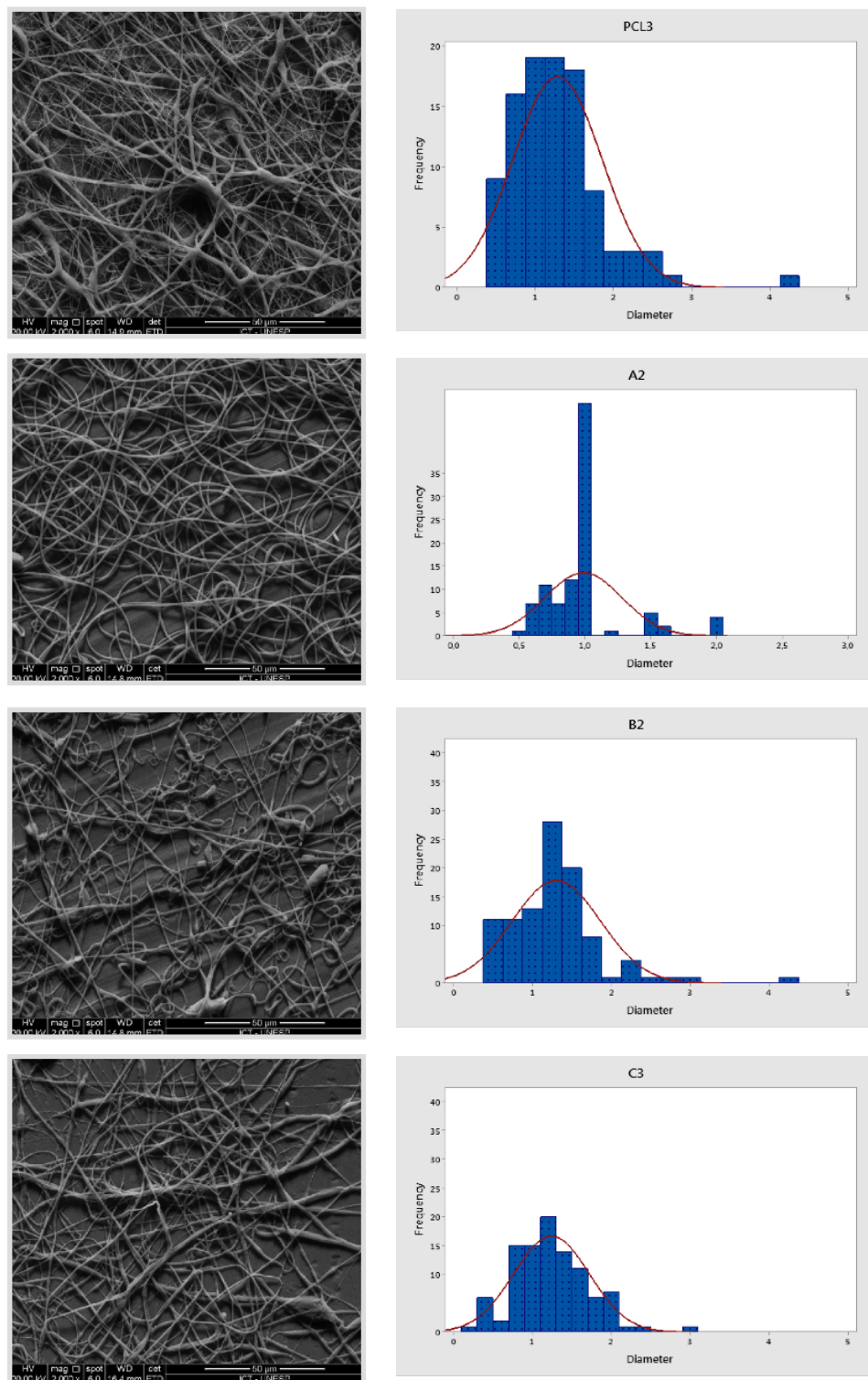
Figura 11 - Histogramas de frequência dos diâmetros ( $\mu\text{m}$ ) das NFs do grupo da solução C



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para a solução C a amostra C3 foi escolhida como padrão, pois apresentou o menor diâmetro  $1,24 \mu\text{m} \pm 0,48$ , a maior quantidade de fibras produzidas para o mesmo tempo de coleta para todas as amostras (Tabela 5). A tensão injetada foi de 15 kv e a distancia da ponta da agulha ao anteparo foi de 8 cm. A mostra C3 será denominada apenas C para as etapas seguintes de caracterização e durante as análises antimicrobianas.

Figura 12 - Fotomicrografias em MEV e histogramas das amostras escolhidas como padrão para os grupos: PCL, A, B e C

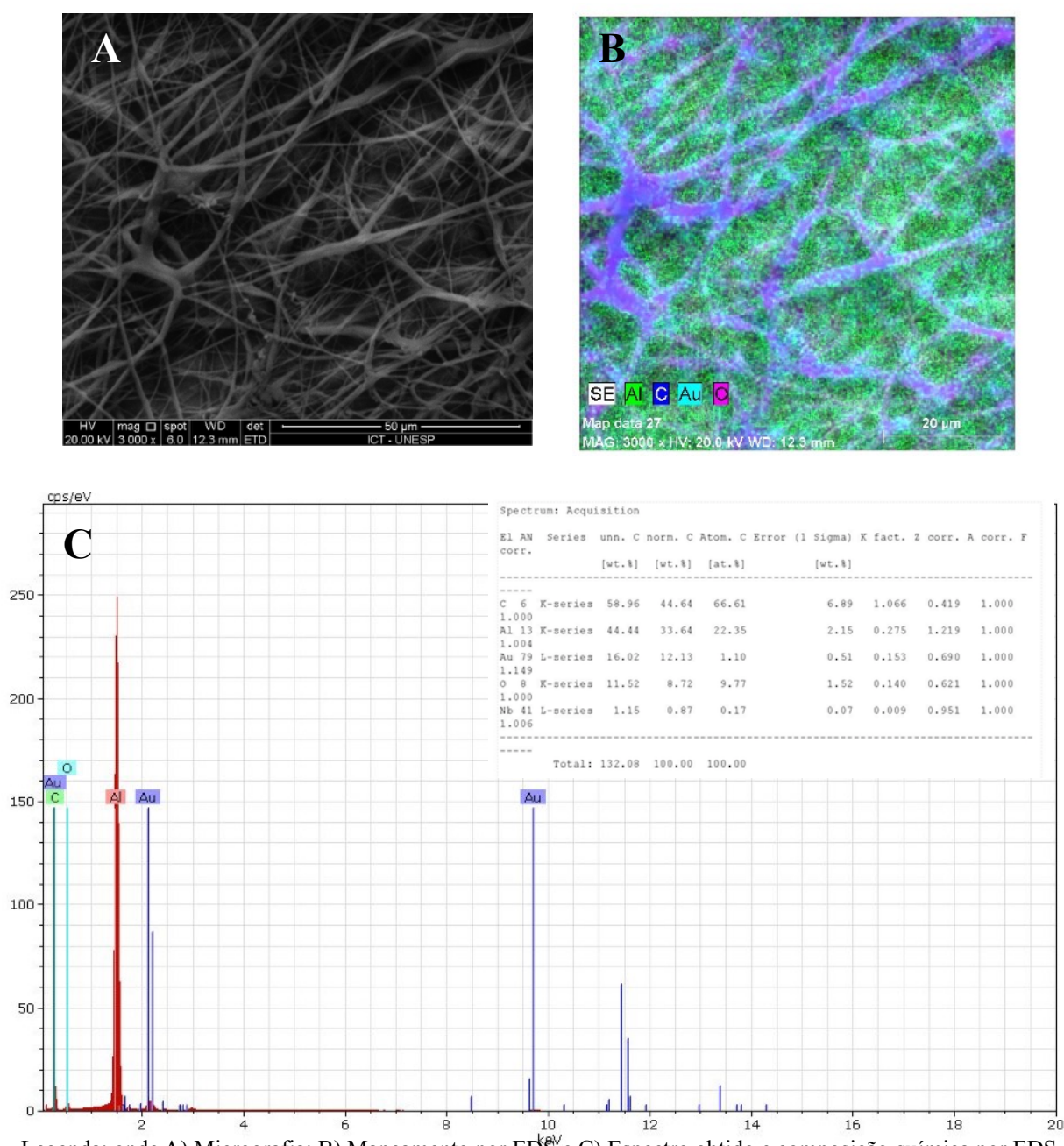


Fonte: Elaborado pelo autor.

### 5.1.3 Espectroscopia por energia dispersiva

A Figura 13 evidencia a presença de elementos químicos que compõem o PCL ( $C_6H_{10}O_2$ ), utilizado neste trabalho. Demonstrando assim, a presença de PCL no *scaffold*.

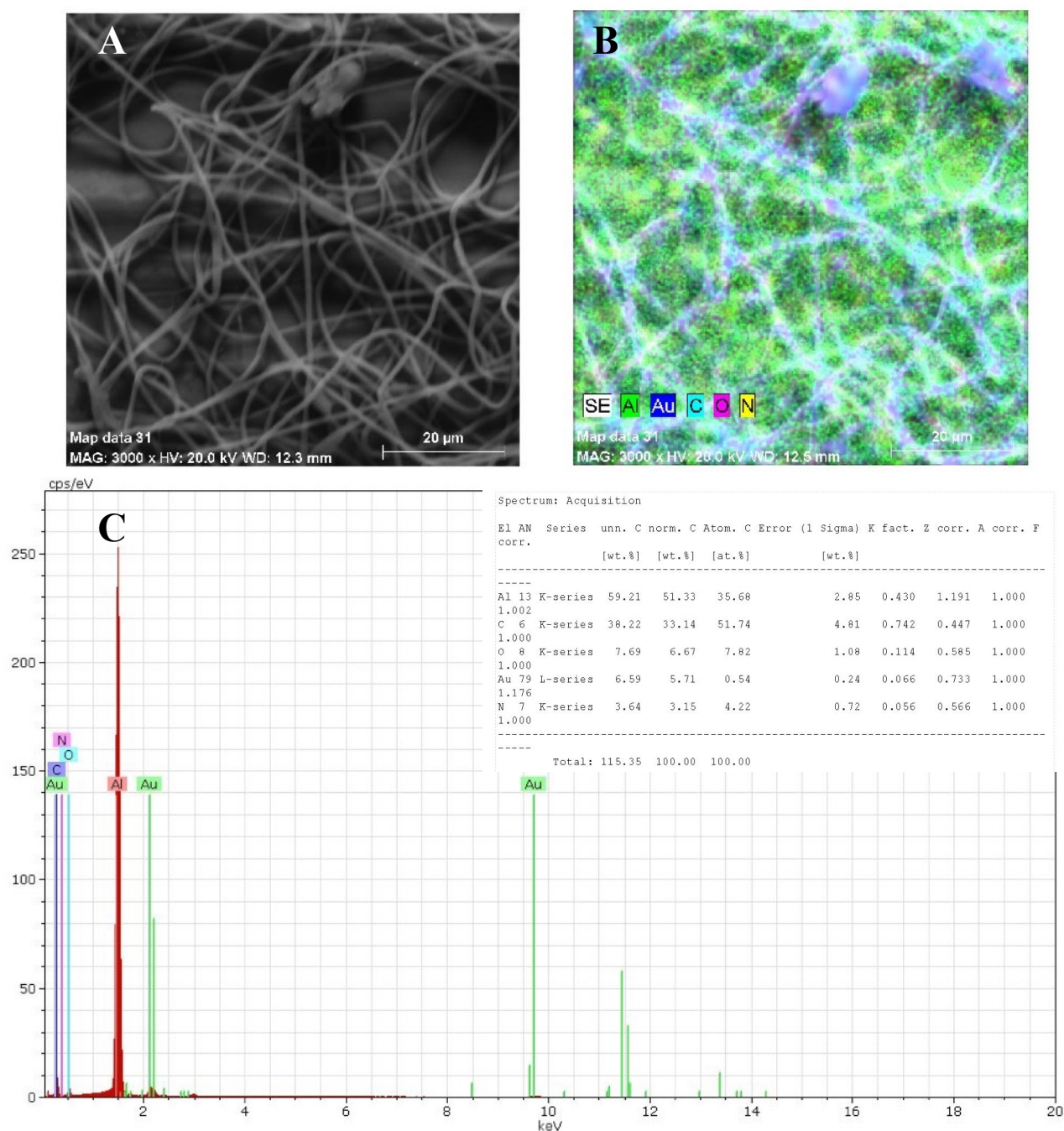
Figura 13 - Análise por EDS da amostra PCL



Legenda: onde A) Micrografia; B) Mapeamento por EDS e C) Espectro obtido e composição química por EDS.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

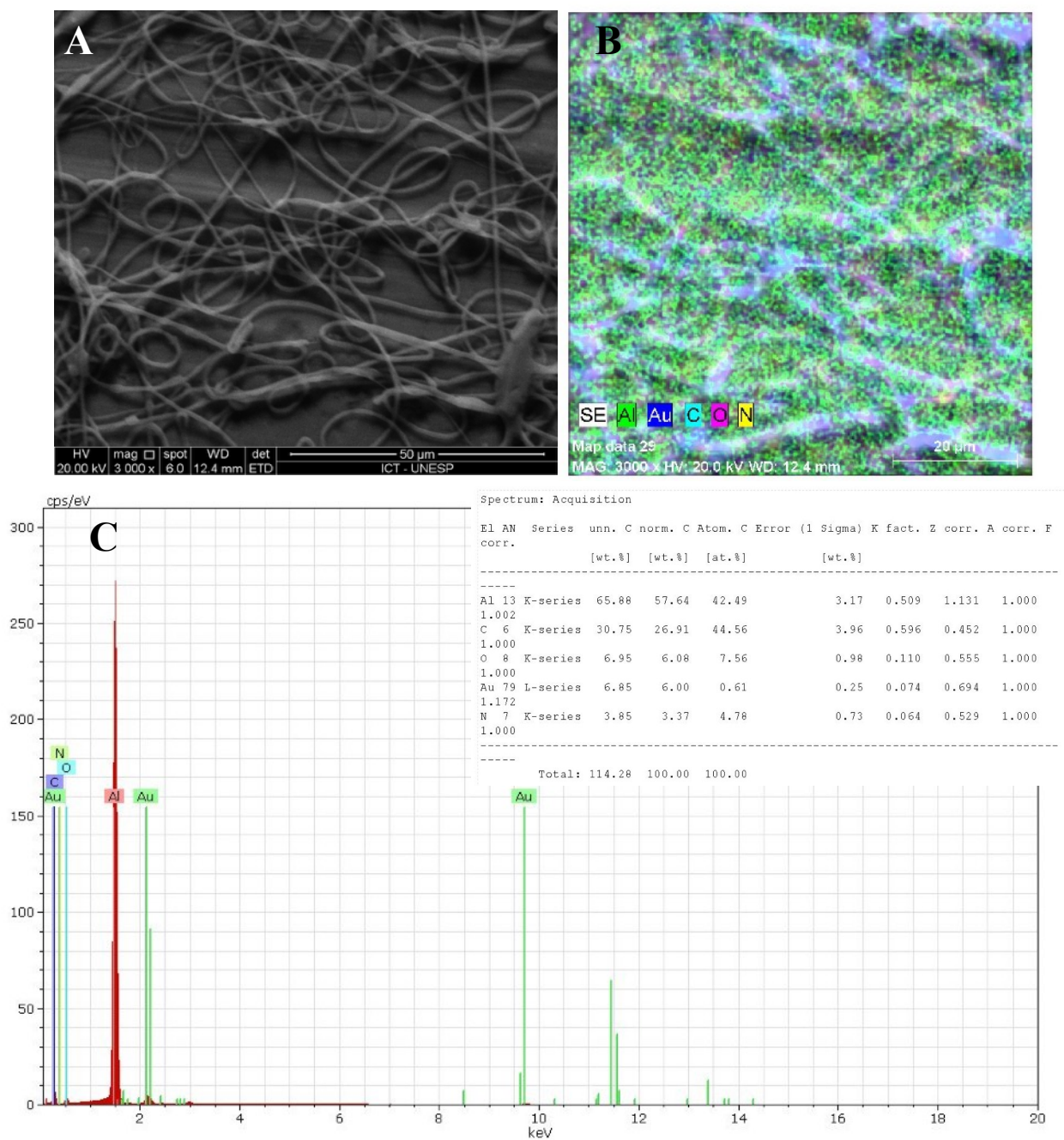
As Figuras 14, 15 e 16 evidenciam a presença de elementos químicos que compõem o PCL ( $C_{32}H_{64}O_2$ ) e a NYS ( $C_{47}H_{75}NO_{17}$ ) utilizados neste trabalho. Demonstrando assim, a presença de PCL e NYS nas mantas dos grupos A, B e C.

Figura 14 - Análise por EDS da amostra A



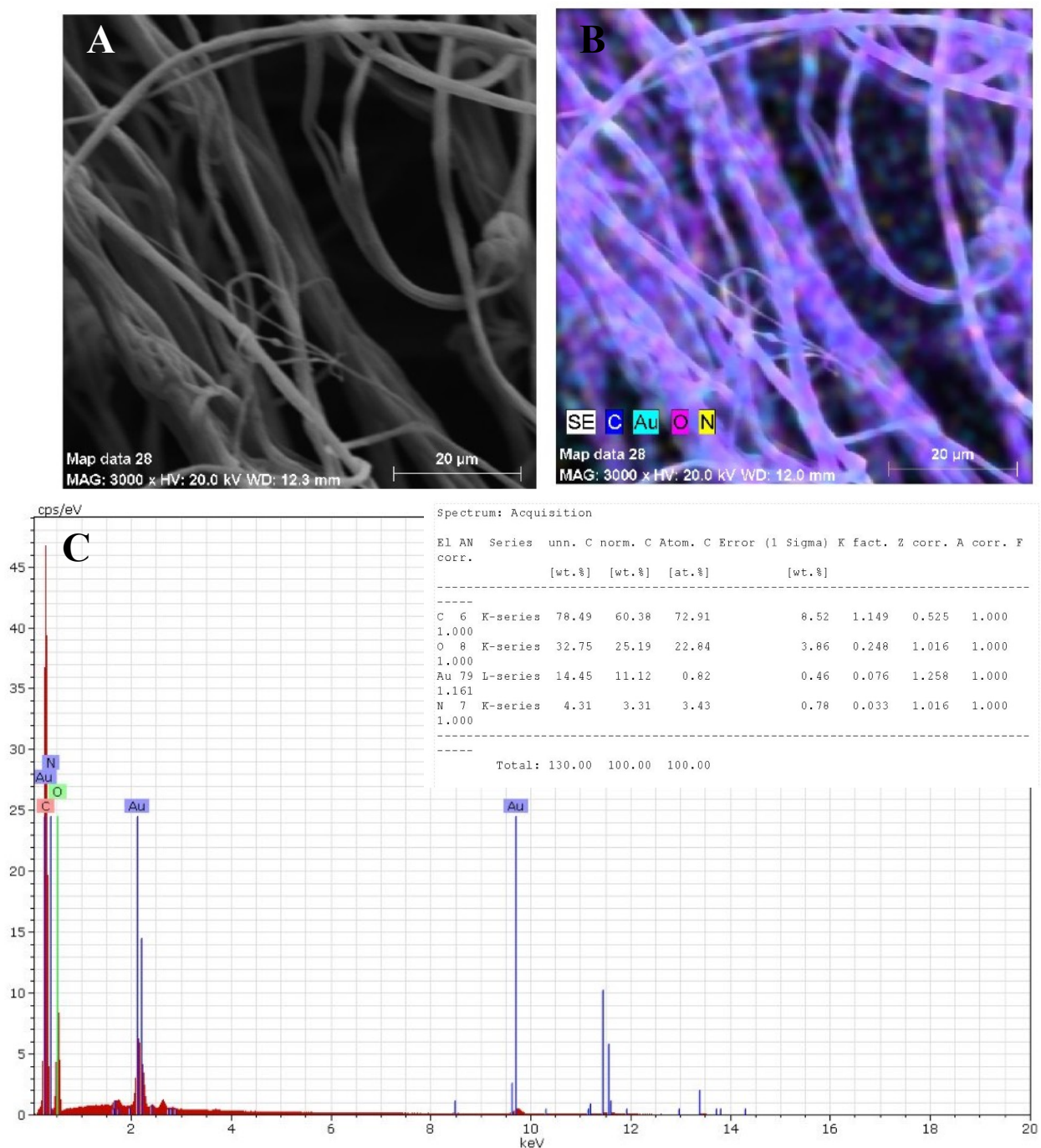
Legenda: onde A) Micrografia; B) Mapeamento por EDS e C) Espectro obtido e composição química por EDS.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 15 - Análise por EDS da amostra B



Legenda: onde A) Micrografia; B) Mapeamento por EDS e C) Espectro obtido e composição química por EDS.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 16 - Análise por EDS da amostra C

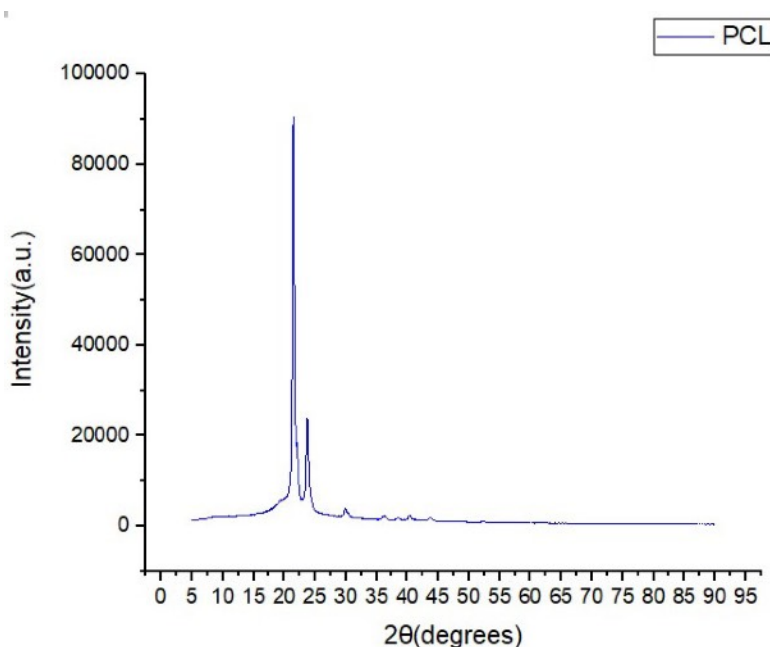


Legenda: onde A) Micrografia; B) Mapeamento por EDS e C) Espectro obtido e composição química por EDS.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

### 5.1.4 Análise por difratometria de raios- X

Os resultados da análise de DRX estão representados nas figuras: 17, 18, 19 e 20. A Figura 17 demonstra um caráter semicristalino com picos em  $22,4^\circ$  e  $24^\circ$ .

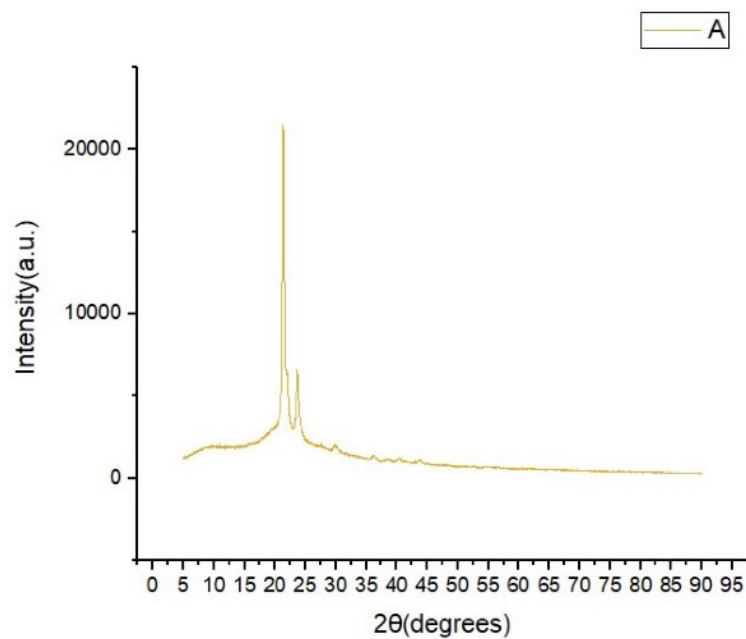
Figura 17 – Gráfico representativo da análise de DRX para PCL



Fonte: Elaborado pelo autor.

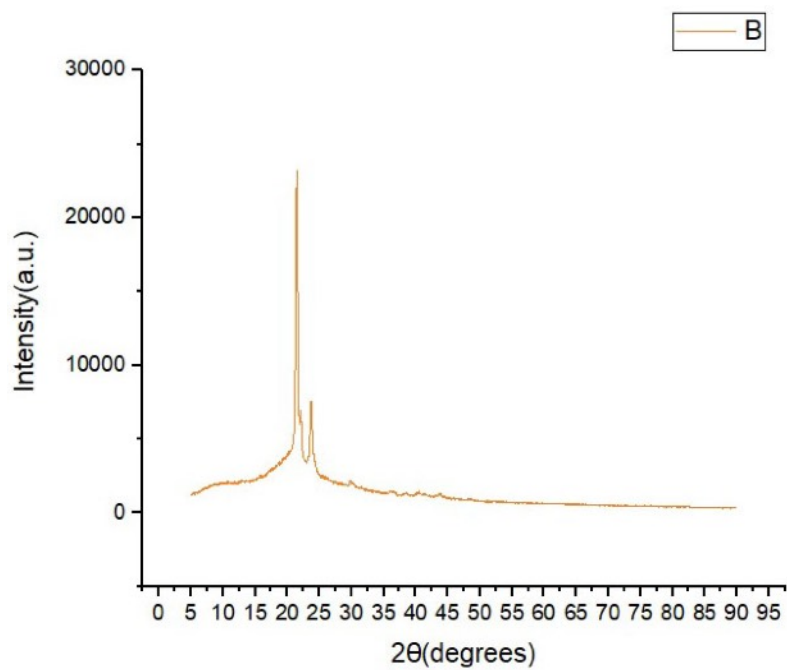
As Figuras 18, 19 e 20 representam os grupos A, B e C respectivamente e apresentam picos em  $22,4^\circ$  e  $24^\circ$  e uma curvatura na região  $8,19^\circ$  e  $8,82^\circ$  sugerindo a presença de NYS.

Figura 18 – Gráfico representativo da análise de DRX para o grupo A



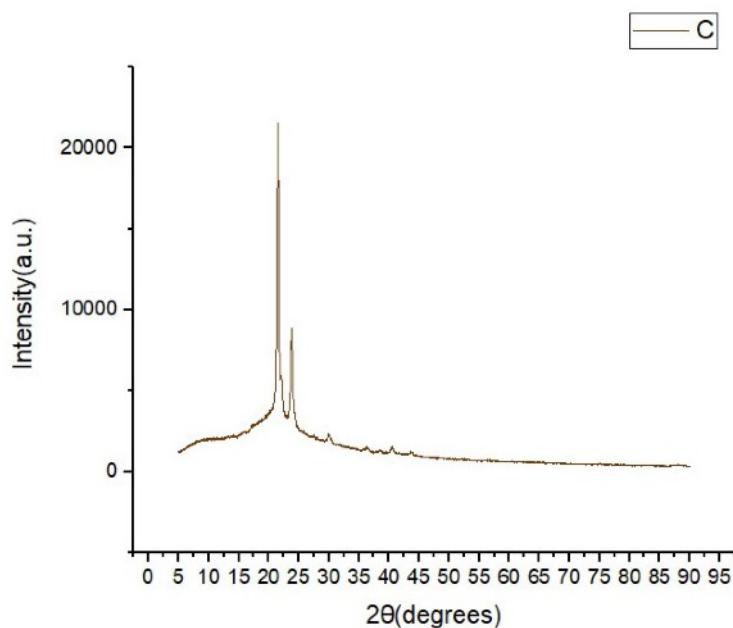
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 19 – Gráfico representativo da análise de DRX para o grupo B



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 20 – Gráfico representativo da análise de DRX para o grupo C

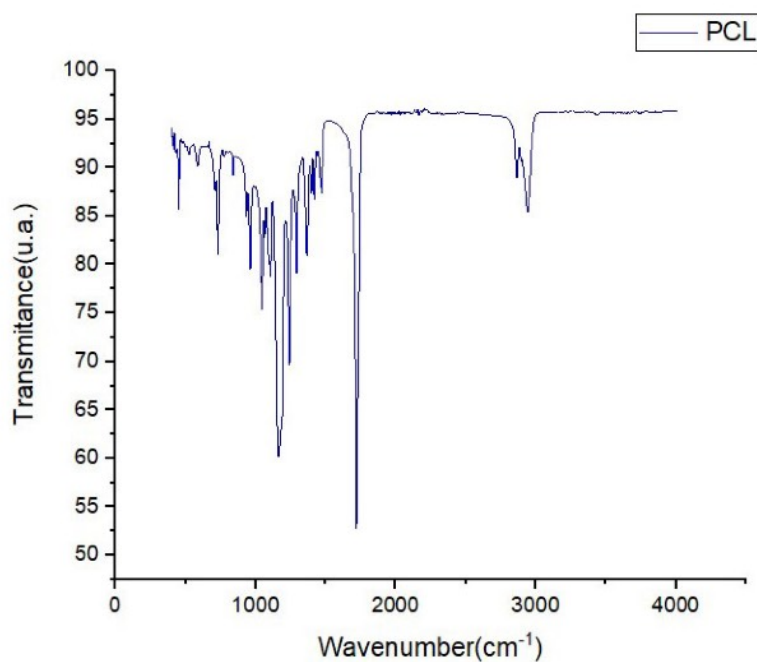


Fonte: Elaborado pelo autor.

### 5.1.5 Espectroscopia por transformada de Fourier

Os resultados obtidos a partir do FTIR estão representados nas figuras 21, 22, 23 e 24. A análise por meio do FTIR para a amostra PCL demonstrou bandas de transmitância em 1160, 1730 e 2940  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 20).

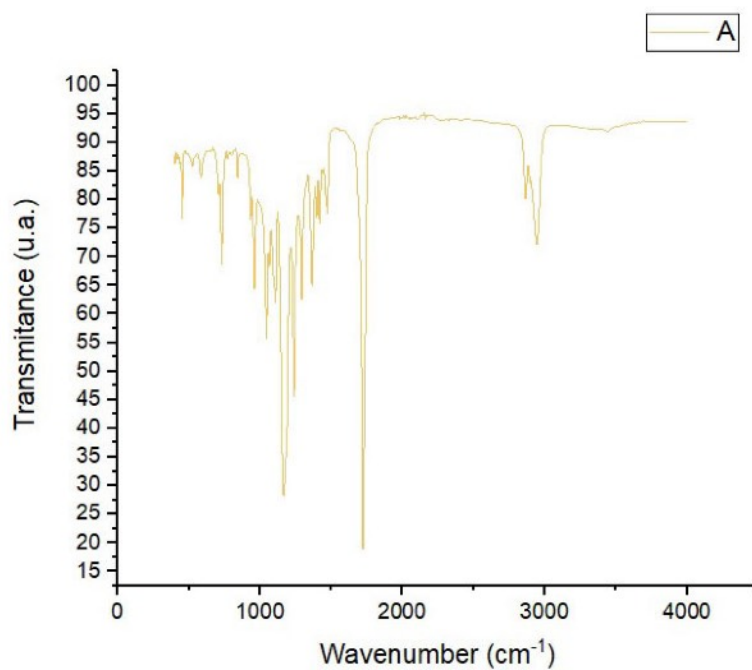
Figura 21 – Gráfico representativo da análise de FTIR, PCL



Fonte: Elaborado pelo autor.

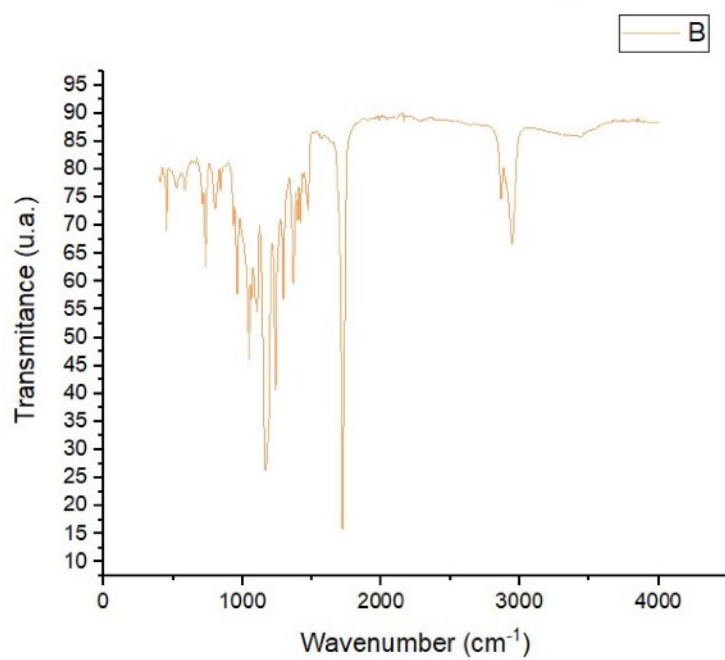
As amostras 22, 23 e 24 também apresentaram as bandas de transmitância em 1160, 1730 e 2940 cm<sup>-1</sup> (Figuras 21, 22 e 23) e um aumento na intensidade da curva na região de 2919 cm<sup>-1</sup>.

Figura 22 – Gráfico representativo da análise de FTIR para o grupo A



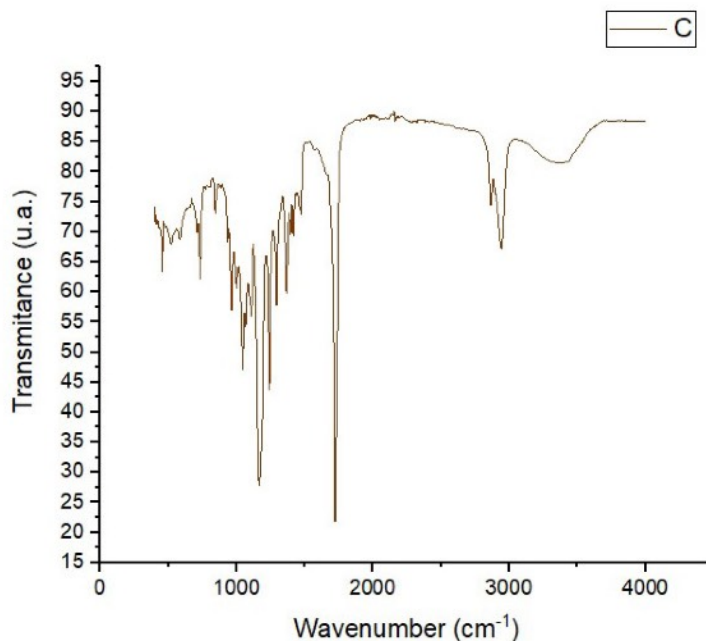
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 23 – Gráfico representativo da análise de FTIR para o grupo B



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 24 – Gráfico representativo da análise de FTIR para o grupo C

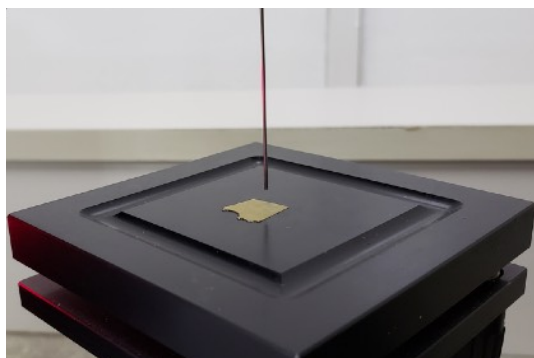
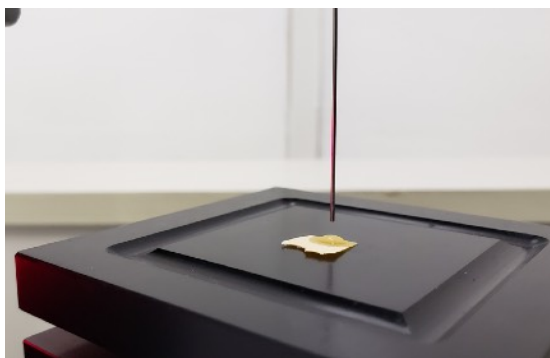


Fonte: Elaborado pelo autor.

### 5.1.6 Análise da molhabilidade utilizando a técnica do ângulo de contato

A análise da molhabilidade foi realizada com água destilada e demonstrou a hidrofobicidade do PCL,  $92,70 \pm 2,90$ , e uma predominante hidrofilia para os grupos A, B e C. Não foi possível realizar a mensuração do ângulo de contato para os grupos A, B e C pois após o gotejamento da água destilada, a gota era completamente absorvida pelas NFs (Figura 25).

Figura 25 –Amostra A absorvendo a gota de água destilada



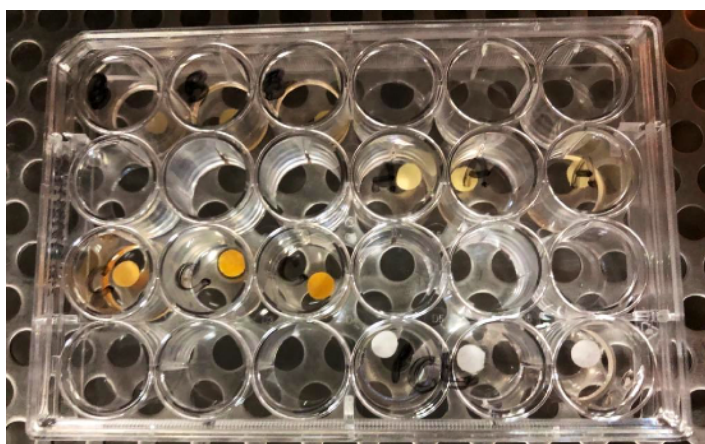
Fonte: Elaborado pelo autor.

## 5.2 Atividade Antimicrobiana

### 5.2.1 Ensaio da concentração inibitória mínima (CIM)

As amostras de NFs (A, B, C e PCL) foram cortadas em discos com 0,5cm de diâmetro e foram dispensadas em placas de cultura de 24 poços em conjunto com as alíquotas de *C. albicans* (Figura 24).

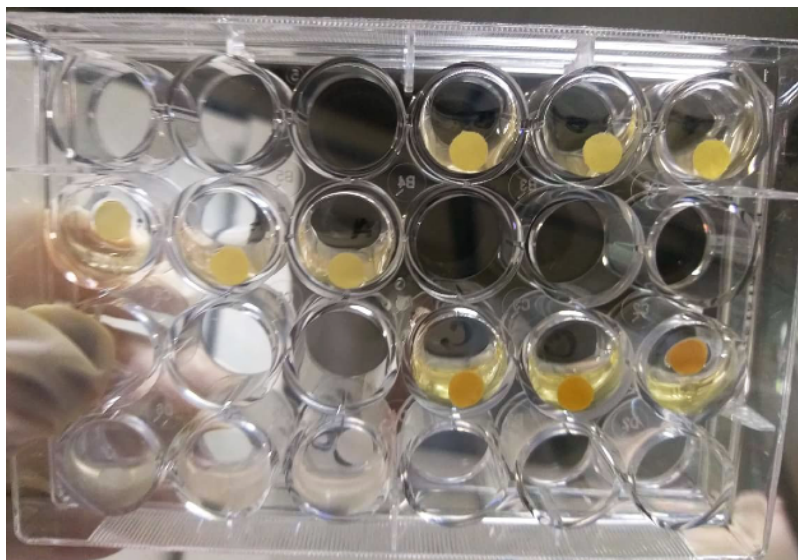
Figura 26 – Distribuição das amostras de NFs para o ensaio de CIM



Fonte: Elaborado pelo autor.

Em seguida, a placa foi armazenada em estufa por 48 horas a 37°C. Após esse período a inspeção visual foi realizada para verificar o crescimento dos microrganismos e consequente turvação do meio. A inspeção visual demonstrou ausência de crescimento dos microrganismos nas amostras A, B e C (Figura 25) enquanto que para as amostras PCL houve turvação do meio (Figura 26). A CIM demonstrou que a menor concentração, encontrada na amostra A, foi capaz de inibir o crescimento da *C. albicans*.

Figura 27 – Análise por inspeção visual para CIM



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 28 – Espécimes que turvaram durante a CIM

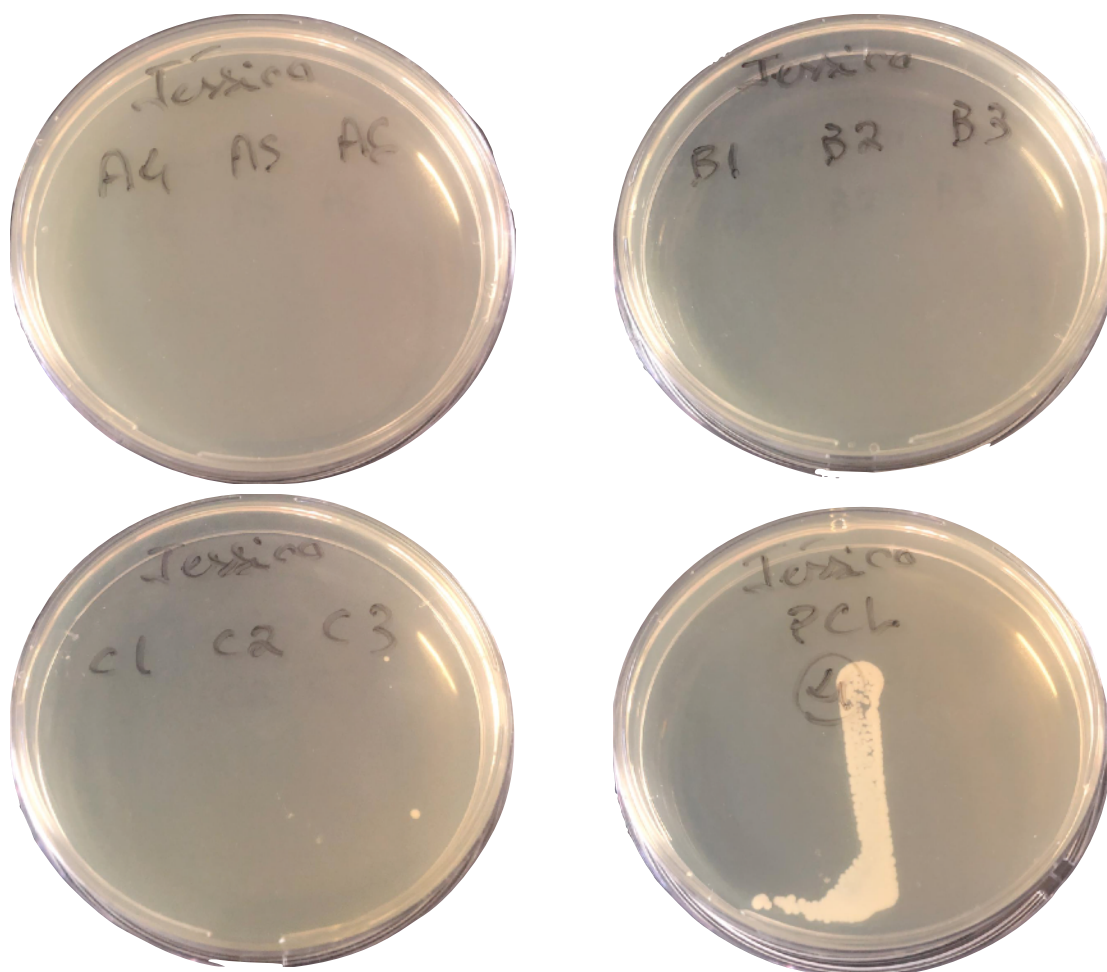


Fonte: Elaborado pelo autor.

### 5.2.2 Ensaio da concentração microbicida mínima (CMM)

Após plaqueamento das amostras, foi possível observar ausência em crescimento da *C. albicans* em meio sólido para os grupos A, B e C, enquanto que para o grupo controle PCL houve formação de colônias (Figura 27). Esse ensaio demonstrou que a amostra menos concentrada, a A, foi considerada a CMM.

Figura 29– Plaqueamento das amostras para a CMM



Fonte: Elaborado pelo autor.

## 6 DISCUSSÃO

A EP é uma lesão da mucosa oral clinicamente relevante em populações idosas, sendo a mais prevalente em portadores de próteses (Petersen, Yamamoto, 2005; Mujica et al., 2008). Um estudo desenvolvido na população adulta, em indivíduos portadores de prótese removível superior com pelo menos 50% do palato recoberto, foi constatado uma prevalência da EP de 43% (Figueiral-Silva, 2000).

A questão central do presente trabalho investiga o desenvolvimento de um método alternativo e eficaz no tratamento de infecções orais decorrentes da EP, onde a frequência das administrações dos fármacos seja reduzida e a adesão do paciente ao tratamento aumentada.

Atualmente o desenvolvimento de biomateriais apresenta uma crescente evolução no campo da pesquisa, pois permite o desenvolvimento de sistemas que realizam a liberação lenta de fármacos no meio de escolha. Deste modo, optou-se por desenvolver e caracterizar um biomaterial que fosse reabsorvível, biocompatível e passível da liberação do princípio ativo, por meio do processo de eletrofição. O processo de eletrofição foi escolhido por apresentar vantagens como o processamento de materiais poliméricos gerando NFs com uma grande área de superfície de contato e maleabilidade o que facilitaria a inserção das malhas na superfície das próteses totais (Burger et al., 2006; Cheng et al., 2008; Reneker, Yarin, 2008).

Nesse sentido, o presente estudo centrou-se na síntese, caracterização e atividade antimicrobiana de NFs de PCL com adição de NYS em três concentrações diferentes. O polímero de escolha para a realização do processo foi o PCL pois juntamente com o ácido polilático (PLA) e com o ácido poliglicólico (PGA) são considerados biodegradáveis e com boa espinalidade, porém durante a degradação o PGA e o PLA favorecem o processo inflamatório,

o que não ocorre com o PCL já que sua degradação ocorre por meio do ciclo de Krebs (Liang et al., 2007). O PCL ainda possui uma degradação mais lenta, 2 a 3 anos, o que torna a liberação do fármaco mais lenta e gradual (Karp et al., 2009; Marques- Curtis et al., 2013; Sawyer et al., 2009).

O antifúngico de escolha foi a NYS, apesar do desenvolvimento de agentes antifúngicos azólicos e equicandinas ter ampliado as opções de fármacos para a EP, a terapia tópica com a NYS ainda é considerada o tratamento padrão por conta de sua alta eficácia, baixo custo e menores efeitos colaterais (Kaur et al., 2017; Lyu et al., 2016; Sklenar et al., 2013).

O primeiro passo foi a síntese das soluções para posterior eletrofiação. O polímero PCL foi dissolvido em DMF e TCE, esses solventes foram escolhidos por um ser polar e o outro apolar, o que trouxe maior estabilidade a solução. Além disso o DMF apresenta alta condutividade elétrica o que otimiza a produção de NFs pelo processo da eletrofiação (Tan et al., 2005; Yang et al., 2005; Zhu et al., 2009). Em seguida a NYS foi adicionada em três concentrações distintas (A, B e C), resultando em soluções com diferentes viscosidades.

O processo de eletrofiação ocorreu com a variação de alguns parâmetros: viscosidade da solução, distância da ponta da agulha ao anteparo e tensão injetada. Essa variação permite a obtenção de algumas amostras onde é possível analisar a morfologia das NFs obtidas e optar pelo parâmetro que mais otimizou o processo. A temperatura e umidade se apresentam como importantes parâmetros na eletrofiação (Costa et al., 2012; Huang et al., 2003). Para este estudo a temperatura efetiva foi de 27°C e a umidade relativa do ar por volta de 40% permitiram a padronização do resultado.

A amostra padrão de cada grupo é escolhida de acordo com alguns fatores. O diâmetro é um parâmetro essencial para as fibras, quanto menor seu diâmetro maior a proporção área- superfície / volume, porosidade mais alta com poros menores (Kong et al., 2012). A tensão injetada e a distância da ponta da agulha ao anteparo exercem influência de maneira direta na formação do campo

elétrico, pois esses fatores irão gerar a diferença de potencial do sistema. A razão entre a distância e a tensão também pode ser definida como a força do campo elétrico (Sukigara et al., 2004). As quatro soluções pareceram mais sensíveis a distância do que à tensão. Diminuir a força do campo elétrico resulta na diminuição da tensão gerada na solução polimérica e na eficiência do estiramento da fibra. No entanto, o aumento brusco da diferença de potencial acelera de maneira demasiada o jato da solução polimérica. Um aumento adicional da força do campos elétrico resultará em uma fiação úmida, ou seja, ao invés da formação de fibras haverá apenas eletropulverização (Kong et al., 2012; Costa et al., 2012).

Durante a eletrofiação a tensão injetada varia de 5 a 25 Kv, sendo as menores tensões ou menores campos gerados, os de escolha para a maior segurança do operador. A análise morfológica das amostras envolve a avaliação do diâmetro das fibras, uniformidade, ausência de defeitos e quantidade produzida. O estudo da análise morfológica em conjunto com a avaliação dos parâmetros como tensão e distância levam à escolha da amostra padrão.

A solução de PCL foi levada a eletrofiação e resultou em 6 amostras de NFs. As micrografias obtidas (Figura 4) demonstram que as amostras PCL1 e PCL2 possuem um aspecto mais reticular, enquanto a PCL3 se apresentou mais uniforme com aspecto fibrilar e volumosa, a PCL4, PCL5 e PCL6 também possuem aspecto fibrilar porem com algumas descontinuidades. O diâmetro variou entre 1,28 a 1,5  $\mu\text{m}$  (Tabela 5) para esse grupo. A solução de PCL era a mais fluida do estudo, pois não apresentava o acréscimo de NYS, logo a amostra que apresentou melhor resultado frente a análise morfológica foi a PCL3 onde o maior campo elétrico foi gerado, com 15 Kv e 8 cm, e diâmetro de 1,28  $\mu\text{m}$  comprovando a influência da viscosidade da solução e tensão injetada no processo (Reneker, Yarin, 2008).

As soluções A e B, menos concentradas que C, também resultaram em 6 amostras de NFs para cada. Para o grupo A as amostras A1, A3, A5 e A6

apresentaram fibras deficientes com algumas inconsistências. O diâmetro variou entre 0,99 a 1,36  $\mu\text{m}$ . A amostra A2 (Figura 5) se apresentou mais uniforme, com menor desvio padrão e com diâmetro de 0,99  $\mu\text{m}$  (Tabela 2), com 13 Kv e 8 cm de distância da ponta da agulha ao anteparo.

O grupo B, (Figura 6), apresentou amostras com menor volume de fibras como a B3, B4 e B6. B1 apresentou fibras deficientes enquanto que a amostra B2 apresentou-se como o melhor parâmetro com 1,3  $\mu\text{m}$  (Tabela 3). Os diâmetros para B variaram de 1,3 a 2,2  $\mu\text{m}$ . A solução C ao ser eletrofiada resultou em apenas 4 amostras, nas quais o diâmetro variou entre 1,24 a 1,9  $\mu\text{m}$ . C3 foi considerada a amostra com melhor morfologia (Figura 6) das apresentadas, com diâmetro de 1,24  $\mu\text{m}$  (Tabela 4). Atribui-se a não formação de NFs para os parâmetros C4 e C5 devido a menor diferença de potencial gerada, sendo a solução C a mais concentrada, a diferença de potencial gerada não foi suficiente para superar a tensão superficial desta solução (Bhardwaj, Kundu, 2010 ; Collins et al., 2012; Rayleigh, 1882).

A análise por EDS demonstra os elementos químicos presentes na amostra, caracterizando que tanto o polímero quanto o fármaco utilizados não sofreram alterações no processo (Cagil et al., 2019). A espectroscopia evidenciou a presença de elementos químicos que compõem o PCL ( $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_2$ ) e a NYS ( $\text{C}_{47}\text{H}_{75}\text{NO}_{17}$ ) utilizados neste trabalho. Comprovando a incorporação de NYS no sistema.

O padrão de análise para a DRX para PCL (Figura 17) demonstra os picos centrados em  $22,4^\circ$  e  $24^\circ$ . O PCL é um polímero semicristalino, com uma célula unitária com forma cristalina ortorrômbica que é responsável pelo aparecimento destes picos (Sadeghianmaryan et al., 2019). As amostras A, B e C também apresentaram os picos  $22,4^\circ$  e  $24^\circ$  característicos do PCL, e uma curvatura mais acentuada na região de  $8,19^\circ$  e  $8,82^\circ$  característico da NYS (Sakeer et al., 2010).

A espectroscopia por FTIR é considerada um método padrão para

caracterização de polímeros e se torna essencial nesta etapa do trabalho para identificar a presença do PCL garantindo que o processo não afetou sua estrutura. A Figura 20 mostra o espectro de FTIR para a amostra PCL onde foi possível identificar bandas de transmitância características deste polímero: 1160, 1730 e 2940  $\text{cm}^{-1}$ . A banda de transmitância 1160  $\text{cm}^{-1}$  representa a ligação C-O do PCL, o alongamento carbônio é observado na região de 1730  $\text{cm}^{-1}$  e a banda 2940  $\text{cm}^{-1}$  representa a ligação  $\text{CH}_2$  (Pawar et al., 2019; Hassangili et al., 2019).

As Figuras 22, 23 e 24 representam os espectros de FTIR para as amostras A, B e C, respectivamente, os picos do polímero são encontrados nas três figuras, sugerindo um predomínio do polímero nas NFs produzidas. A região da banda 3326  $\text{cm}^{-1}$  apresenta um discreto aumento na intensidade na curva A e tende a aumentar em B e ficar ainda mais intenso em C. Essa região é característica da NYS, com o aumento de sua concentração nas NFs nota-se o aumento da intensidade nas curvas (Bassi et al., 2015; Mandru et al., 2011).

A análise da molhabilidade, por meio do ângulo de contato com água destilada, analisa o ângulo formado entre a fase líquida e sólida realizando o cálculo na interface entre o líquido e o ar (Wulf et al., 1999). O valor do ângulo varia de acordo com a composição do material estudado sendo considerado completamente hidrófilo com  $\Theta = 0^\circ$ ,  $\Theta$  entre 0 e  $90^\circ$  é considerado predominantemente hidrófila,  $\Theta$  entre  $90^\circ$  e  $180^\circ$  considera-se predominantemente hidrófobo e  $\Theta = 180^\circ$  totalmente hidrófobo (Kwok, Neumann, 1999).

As imagens captadas pelo goniômetro óptico foram analisadas e o PCL apresentou um ângulo de  $92,7^\circ$ , comprovando o caráter predominantemente hidrofóbico desse polímero conforme relatado em literatura (Hassan et al., 2017; Ranjbarvan et al., 2017; Lin et al., 2019). As amostras A, B e C ao receberem a gota de água destilada rapidamente absorveram (Figura 25) de tal forma que o software não conseguiu analisar o ângulo formado,  $\Theta = 0^\circ$ , indicando uma prevalente hidroflicidade para ambas. A alteração no padrão de hidroflicidade

do grupo PCL para os grupos A, B e C se explica pois os três últimos grupos apesar de apresentarem PCL também como polímero base possuem também a adição da NYS a quem é atribuído esse caráter hidrofílico. A NYS é um antifúngico poliênico e possui um grande anel lactônico macrocíclico semelhante aos macrolídios antibacterianos como a eritromicina, por isso também são chamados macrolídeos poliênicos, sendo a estrutura ativa o anel macrolídeo com suas partes rígida lipofílica e flexível hidrofílica (Sande, Mandell, 1987).

A molhabilidade da superfície da manta de NF é de grande importância pois melhora a ligação celular e pode ser utilizada para adesão e migração celular e consequente biocompatibilidade (Lin et al., 2019). A hidrofobicidade do PMMA favorece a adesão e proliferação da *Candida albicans* sobre a base da prótese, principalmente a região que estabelece contato com a mucosa oral (Murat et al., 2018). A interposição da manta de NFs de PCL com NYS na base da prótese estabeleceria contato manta-prótese e manta-mucosa, e tornaria então a superfície da prótese hidrofílica, o que dificultaria a adesão fúngica.

A análise de concentração inibitória mínima frente a *C. albicans*, foi realizada em triplicata, para avaliar qual das 3 concentrações de NFs, A, B e C, seria efetiva na inativação do fungo. A CIM foi realizada colocando discos de NFs com diâmetro de 1mm na placa de 24 poços. A análise de CIM demonstrou que as três amostras A, B e C, que continham NYS, apresentaram ação inibitória à *C. albicans*. Em complemento a esta análise, a concentração microbicida mínima também foi realizada e demonstrou que as NFs A, B e C apresentam não só um efeito fungistático como também um efeito fungicida frente a *C. albicans*.

O desenvolvimento desse biomaterial se apresenta promissor para um futuro uso clínico, onde a adesão do paciente ao tratamento não seria um fator primordial, tendo em vista as limitações presentes nos pacientes portadores de próteses removíveis. Esses pacientes, em sua maioria, são geriátricos e podem apresentar comprometimentos quanto a destreza manual, o que limita a

higienização das próteses e da mucosa, fundamental no tratamento da EP. Além disso a administração constante do fármaco não se faz necessária, uma vez que a manta de nanofibra for posicionada o fármaco será liberado de forma gradual. A biodisponibilidade da NYS é reduzida pela diluição da saliva e pela autolimpeza da superfície promovida pelos músculos bucais, o que exige várias administrações diárias (Ellepola, 2005), o que seria dispensando quando do uso desse biomaterial. Visando um futuro uso clínico, o biomaterial poderia ser aderido às bases das próteses e ficaria então em contato com prótese/mucosa exercendo seu efeito antifúngico.

## 7 CONCLUSÃO

Esta pesquisa possibilitou a síntese de três soluções com concentrações distintas de nistatina, que influenciaram de forma direta na viscosidade das soluções. As três soluções passaram pelo processo de eletrofiação, com variação de parâmetros de tensão injetada e distância da ponta da agulha ao coletor, os três grupos resultaram na produção de NFs. As amostras padrão de cada grupo foram caracterizadas comprovando a presença dos materiais estudados e os biomateriais produzidos apresentaram efeito tanto fungistático quanto fungicida.

## REFERÊNCIAS\*

- Arendorf TM, Walker DM. Oral candida populations in health and disease. *Br Dent J*. 1979;147(10):267-72.
- Arnaud RR, Soares MSM, Santos MGC, Santos RC. Estomatite protética: prevalência e correlação com idade e gênero. *Rev Bras de Ciênc Saúde*. 2012;16(1):59-62.
- Banting DW, Greenhorn PA, McMinn JG. Effectiveness of a topical antifungal regimen for the treatment of oral candidiasis in older, chronically ill, institutionalized, adults. *J Can Dent Assoc*. 1995;61(3):199-200.
- Bassi P, Kaur G. Bioadhesive vaginal drug delivery of nystatin using a derivatized polymer: development and characterization. *Eur J Pharm Biopharm*. 2015;96:173-84. doi: 10.1016/j.ejpb.2015.07.018.
- Baumgarten P. Electrostatic spinning of acrylic microfibers. *J Colloid Interface Sci*. 1971; 36:71–9.
- Bhardwaj N, Kundu SC. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnol adv*. 2010;28(3):325-47.
- Borges ALS, Munchow EA, de Oliveira Souza ACO, Yoshida T, Vallittu PK, Bottino MC. Effect of random/aligned nylon-6/MWCNT fibers on dental resin composite reinforcement. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2015;48:134–44. doi: 10.1016/j.jmbbm.2015.03.019
- Budtz-Jorgensen E. The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. *Scan J Dent Res*. 1974;82(2):151-90.
- Budtz-Jorgensen, E. Etiology, pathogenesis, therapy, and prophylaxis of oral yeast infections. *Acta Odontol Scand*. 1990;48:61-9.
- Burger C, Hsiao S, B, Chu, B. Nanofibrous materials and their applications. *Annu Rev Mater Res*. 2006;36:333–68.

---

\* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [cited 2019 Jan 2019]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Available from: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

- Cacciotti I, Fortunati E, Puglia D, Kenny JM, Nanni F. Effect of silver nanoparticles and cellulose nanocrystals on electrospun poly(lactic) acid mats: Morphology, thermal properties and mechanical behavior. *Carbohydr Polym.* 2014;103:22-31. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.11.052
- Cagil EM, Hameed O, Ozcan F. Production of a new platform based calixarene nanofiber for controlled release of the drugs. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019 Jul;100:466-474. doi: 10.1016/j.msec.2019.03.038. Epub 2019 Mar 12. PubMedPMID: 30948082.
- Cheng ML, Lin CC, Su HL, Chen PY, Sun YM. Processing and characterization of electrospun poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) nanofibrous membranes. *Polymer.* 2008;49(2):546-53. doi: 10.1016/j.polymer.2007.11.049\_
- Chong EJ, Phan TT, Lim IJ, Zhang YZ, Bay BH, Ramakrishna S, et al. Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution. *Acta Biomater.* 2007;3(3):321-30.
- Chow CK, Matear DW, Lawrence HP. Efficacy of antifungal agents in tissue conditioners in treating candidiasis. *Gerodontology.* 1999;16(7):110–8. doi: 10.1111/1741-2358.1999.00110.x.
- Cipitria A, Skelton A, Dargaville TR, Dalton PD, Hutmacher DW. Design, fabrication and characterization of PCL electrospun scaffolds—a review. *J Mater Chem.* 2011; 21(26):9419-53.
- Collins G, Federici J, Imura Y, Catalani LH. Charge generation, charge transport, and residual charge in the electrospinning of polymers: A review of issues and complications. *J Appl Phys.* 2012;111:044701.
- Costa RGF, Oliveira JE, Paula GF, Picciani PHS, Medeiros ES, Ribeiro C, et al. Eletrofiacção de polímeros em solução. Parte II: aplicações e perspectivas. *Polímeros.* 2012;22(2):178-85. doi: 10.1590/S0104-14282012005000026
- D'avila S. Avaliação clínica e laboratorial da estomatite por prótese [tese]. Araraquara (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia; 2006.
- Deitzel JM, Kleinmeyer JD, Hirvonen JK, Tan NB. Controlled deposition of electrospun poly(ethylene oxide) fibers. *Polymer.* 2001;42:8163-70.
- Del Valle LJ, Camps R, Díaz A, Franco I, Rodríguez-Galán A, Puiggalí J. Electrospinning of polylactide and polycaprolactone mixtures for preparation of

materials with tunable drug release properties. *J Polymer rRes*. 2011;18(6): 1903-17.

Diakema DJ, Messer AS, Hollis RJ, Jones RN, Pfaller MA. Activities of caspofungin, itraconazole, posaconazole, ravuconazole, voriconazole, and amphotericin B against 448 recent clinical isolates of filamentous fungi. *J Clin Microbiol*. 2003;41(8):3623-6.

Dorko E, Jenca A, Pilipcinec E, Danko J, Svicky E, Tkacikova L. Candida associated denture stomatitis. *Folia Microbiol*. 2001;46:443–6.

Doshi J, Reneker DH. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *J Electrostat*. 1995;35:151-60.

Ellepola AN. Oral candidosis: A brief overview. *Bull of Kuwait Institute Med Specialization*. 2005;4:17-24

Emami E, Grandmont P, Rompré PH, Barbeau J, Pan S, Feine JS. Favoring trauma as an etiological factor in denture stomatitis. *J Dent Res*. 2008;87(5): 440-4.

Espinel-Ingroff A. Comparison of in vitro activities of the new triazole SCH56592 and the echinocandins MK-0991 (L-743,872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeasts. *J Clin Microbiol*. 1998;36(10):2950-6.

Figueiral-Silva MHG. Estomatite protética– Identificação e caracterização dos factores etiológicos e predisponentes [tese]. Porto: Universidade do Porto: Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto; 2000.

Gallis HA, Drew RH, Pickard WW. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. *Rev Infect Dis*. 1990;12(2):308-29.

Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont*. 2011;20(4):251-60. doi: 10.1111/j.1532-849X.2011.00698.x.

Gupta P, Elkinsb C, Longb TE, Wilkes GL. Electrospinning of linear homopolymers of poly(methylmethacrylate): exploring relationships between fiber formation, viscosity, molecular weight and concentration in a good solvent. *Polymer*. 2005;46:4799-810.

Han T, Reneker DH, Yarin AL. “Buckling of jets in electrospinning”. *Polymer*. 2007;48:6064.

Hassan MI, Sultana N. Characterization, drug loading and antibacterial activity of nanohydroxyapatite/polycaprolactone (nHA/PCL) electrospun membrane. *3 Biotech*. 2017;7(4):249. doi:10.1007/s13205-017-0889-0

Hassanajili S, Karami-Pour A, Oryan A, Talaei-Khozani T. Preparation and characterization of PLA/PCL/HA composite scaffolds using indirect 3D printing for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2019;104:109960.doi: 10.1016/j.

He XY, Meurman JH, Kari K, Rautemaa R, Samaranayake LP. In vitro adhesion of *Candida* species to denture base materials. *Mycoses*. 2006;49(2):80-4.

Heikkilä P, Harlin A. Parameter study of electrospinning of Poliamide- 6. *Eur Polymer J*. 2008;44(10):3067-79.

Hiep NT, Lee BT. Electro-spinning of PLGA/PCL blends for tissue engineering and their biocompatibility. *J Comput Surg*. 2010;21(6):1969-78.

Hilgert JB, Giordani JM, de Souza RF, Wendland EM, D'Avila OP, Hugo FN. Interventions for the management of denture stomatitis: a systematic review and meta-analysis. *J Am Geriatr Soc*. 2016;64(12):2539-45. doi:10.1111/jgs.14399.

Hilt JZ, Peppas NA. Microfabricated drug delivery devices. *Int J Pharm*. 2005; 8(306):15-23.

Huang ZM, Zhang YZ, Kotaki M, Ramakrishna S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Compos Sci Technol*. 2003;63:2223–53.

Kanani AG, Bahrami SH. Effect of changing solvents on poly ( $\epsilon$ - caprolactone) nanofibrous webs morphology. *J Nanomater*. 2011;2011:31.

Karp JM, Leng Teo GS. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell*. 2009;4:206–16.

Kaur IP, Kakkar S. Topical delivery of antifungal agents. *Expert Opin Drug Deliv*. 2010;7(11):1303–27.

Kenneth L, Chua K, Christopherson GT, Lim S, Mao H. Reducing electrospun nanofiber diameter and variability using cationic amphiphiles. *Polymer*. 2007;48:6384-94.

Khor HL, Schantz JT, Phan TT, Lim TC, Teoh SH, Hutmacher DW. Poly( $\epsilon$ -caprolactone) films as a potential substrate for tissue engineering na epidermal equivalent. *Mat Sci and Engin*. 2002;20:71-5.

Kim HS, Yoo HS. Therapeutic application of electrospun nanofibrous meshes. *Nanomed. Nanomedicine (Lond)*. 2014;9(4):517-33. doi: 10.2217/nnm.13.224.

Kong L, Ziegler GR. Quantitative relationship between electrospinning parameters and starch fiber diameter. *Carbohydr Polym*. 2013 Feb 15;92(2):1416-22. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.09.026.

Kulak Y, Arikan A, Delibalta N. Comparison of three different treatment methods for generalized denture stomatitis. *J Prosthet Dent*. 1994;72:283-8.

Kwok DY, Neumann AW. Contact angle measurement and contact angle interpretation. *Adv Colloid Interface Sci*. 1999 Sep;81(3):167-249. doi: 10.1016/S0001 - 8686(98)00087 - 6.

Lavaee F, Motaghi D, Jassbi AR, Jafarian H, Ghasemi F, Badiiee P. Antifungal effect of the bark and root extracts of *Punica granatum* on oral *Candida* isolates. *Curr Med Mycol*. 2018;4(4):20-4. doi: 10.18502/cmm.4.4.382.

Lee HK, Jeong EH, Baek CK, Youk JH. One-step preparation of ultrafinepoly(acrylonitrile) fibers containing silver nanoparticles”. *Mater Lett*. 2005;59:2977.

Lemos MMC, Miranda JL, Souza MSGS. Estudo clínico, microbiológico e histopatológico da estomatite por dentadura. *Rev Bras Patol Oral*. 2003;2(1):3-10.

Li D, Xia Y. Electrospinning of nanofibers: reinventing the wheel? *Adv Mater*. 2004;16(14):1151–70. doi: 10.1002/adma.200400719

Liang D, Hsiao BS, Chu B. Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59:1392–412.

Lin WC, Mohd Razali NA. Temporary wettability Tuning of PCL/PDMS micro pattern using the plasma treatments. *Materials (Basel)*. 2019;12(4):644. Published 2019 Feb 20. doi:10.3390/ma12040644

Lombardi T, Budtz-Jørgensen E. Treatment of denture-induced stomatitis: a review. *Eur J Prosthodont Restor Dent*. 1993 Sep;2(1):17-22. Review. PubMed PMID: 8180613.

Lyu X, Zhao C, Yan ZM, Hua H. Efficacy of nystatin for the treatment of oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. *Drug Des Devel Ther*. 2016;10:1161–71

Mandru M, Ciobanu C, Ignat ME, Popa M, Verestiuc L, Vlad S. Sustained release of nystatin from polyurethane membranes for biomedical applications. *Dig J Nanomater Biostruct*. 2011;6( 3):1227-38.

Marquez-Curtis LA, Janowska-Wieczorek A. Enhancing the migration ability of mesenchymal stromal cells by targeting the SDF-1/CXCR4 axis. *Biomed Res Int*. 2013;2013:561098.

Matsuura T, Abe Y, Sato Y, Okamoto K, Ueshige M, Akagawa Y. Prolonged antimicrobial effect of tissue conditioners containing silver zeolite. *J Dent*. 1997;25(5):373-7.

Meng ZX, Zheng W, Ding MH, Zhou HM, Chen XQ, Chen JC, et al. Fabrication and characterization of elastomeric polyester/carbon nanotubes nanocomposites for biomedical application. *J Nanosci Nanotechnol*. 2011Apr;11(4):3126-33.

Middleton JC, Tipton AJ. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials*. 2000;21(23):2335-46.

Mímica LMJ, Ueda SMY, Martino MDV, Na-Varini A, Martini IJ. Diagnóstico de infecção por *Candida*: avaliação de testes de identificação de espécies e caracterização do perfil de suscetibilidade. *J Bras Patol Med Lab*. 2009;45(1):17-23.

Mishra NN, Prasad T, Sharma N, Payasi A, Prasad R, Gupta DK, et al. Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. A review. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2007;54(3):201-35.

Mujica V, Rivera H, Carrero M. Prevalence of oral soft tissue lesions in an elderly venezuelan population. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2008;13:270–4. doi:1111111152.

Murat S, Alp G, Alatalı C, Uzun M. In vitro evaluation of adhesion of *candida albicans* on CAD/CAM PMMA-based polymers. *J Prosthodont*. 2019 Feb;

28(2):e873-e879. doi: 10.1111/jopr.12942. Epub 2018 Jul 1. PubMed PMID: 29962017.

Newton AV. Denture sore mouth, a possible aetiology. *Br Dent J*. 1962;112:357-60.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Oral and maxillofacial pathology. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009.

Nikawa H, Iwanaga H, Kameda M, Hamada T. In vitro evaluation of *Candida albicans* adherence to soft denture-lining materials. *J Prosthet Dent*. 1992;68(5):804-8.

Nomura T, Murakami T, Shimoyama Y, Kobayashi T, Furuya J, Sasaki M, et al. Effects of denture adhesives on growth and morphological transformation of *Candida albicans*. *J Prosthodont Res*. 2019 May 27. pii: S1883-1958(18)30520-6. doi: 10.1016/j.jpor.2019.04.006.

Olsen I, Stenderup A. Clinical-mycologic diagnosis of oral yeast infections. *Acta Odontol Scand*. 1990;48(1):11-8.

Pawar V, Srivastava R. Chitosan-polycaprolactone blend sponges for management of chronic osteomyelitis: a preliminary characterization and in vitro evaluation. *Int J Pharm*. 2019;10(568)118553. doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.118553.

Pereira-Cenci T, Del Bel Cury AA, Crielaard W, Tem Cate JM. Development of candida-associated denture stomatitis: new insights. *J Appl Oral Sci*. 2008;16(2):86-94.

Petersen PE, Yamamoto T. Improving the oral health of older people: the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2005;33:81-92.

Picciani PHS, Medeiros ES, Pan Z, Wood DF, Orts WJ, Mattoso LHC, et al. Structural, electrical, mechanical, and thermal properties of electrospun poly(lactic acid)/polyaniline blend fibers. *Macromol Mater Eng*. 2010;295:618.

Ranjbarvan P, Soleimani M, Samadi Kuchaksaraei A, Ai J, Faridi Majidi R, Verdi J. Skin regeneration stimulation: the role of PCL-platelet gel nanofibrous scaffold. *Microsc Res Tech*. 2017 May;80(5):495-503. doi: 10.1002/jemt.22821.

Rayleigh L. On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity. *Philos Mag.* 1882;14:184–6.

Reneker DH, Yarin AL. Electrospinning jets and polymer nanofibers. *Polymer.* 2008; 49:2387.

Rossi S, Sandri G, Caramella CM. Buccal drug delivery: A challenge already won? *Drug Discov Today Technol.* 2005;2(1):59-65. doi: 10.1016/j.ddtec.2005.05.018.

Rutledge GC, Fridrikh SV. Formation of fibers by electrospinning. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59(14):1384-91.

Sadeghianmaryan A, Yazdanpanah Z, Soltani YA, Sardroud HA, Nasirtabrizi MH, Chen X. Curcumin-loaded electrospun polycaprolactone/montmorillonite nanocomposite: wound dressing application with anti-bacterial and low celltoxicity properties. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2019;14:1-12. doi: 10.1080/09205063.2019.1680928.

Sakeer K, Al-Zein H, Hassan I, Desai S, Nokhodchi A. Enhancement of dissolution of nystatin from buccoadhesive tablets containing various surfactants and a solid dispersion formulation. *Arch Pharm.* 2010;33(11):1771-9.

Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L, et al. Candida- associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011;16(1):139-43.

Salim N, Moore C, Silikas N, Satterthwaite JD, Rautemaa R. Fungicidal amounts of antifungals are released from impregnated denture lining material for up to 28 days. *J Dent.* 2012 Jun;40(6):506-12. doi: 10.1016/j.jdent.2012.02.016.

Salim N, Moore C, Silikas N, Silikas N, Satterthwaite J, Rautemaa R. Candidacidal effect of fluconazole and chlorhexidine released from acrylic polymer. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(3):587–92. doi: 10.1093/jac/dks452.

Sampaio-Maia B, Figueiral MH, Sousa-Rodrigues P, Fernandes MH, Scully C. The effect of denture adhesives on *Candida albicans* growth in vitro. *Gerodontology.* 2012 Jun;29(2):e348-56. doi: 10.1111/j.1741-2358.2011.00478.x.

Sande MA, Manddell GL. Drogas antimicrobianas: drogas antimicóticas e antivirais. In: Goodman L, Gilman AG. As bases farmacológicas da terapêutica. Rio de Janeiro: Guanabara, 1987. p.799-807.

Santos JE, Soares JP, Dockal ER, Filho SPC. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. Polimeros Cienc Tecnol. 2003;13(4):242-9.

Sawyer AA, Song SJ, Susanto E. The stimulation of healing within a rat calvarial defect by mPCL-TCP/collagen scaffolds loaded with rhBMP-2. Biomaterials. 2009;30:2479–88.

Scalercio M, Valente T, Israel MS, Ramos ME. Estomatite protética versus candidíase: diagnóstico e tratamento. RGO. 2007;55(4):395-8.

Scholz AO, Wolff A, Schumacher A, Giannola LI, Campisi G, Ciach T, et al. Drug delivery from the oral cavity: focus on a novel mechatronic delivery device. Drug Discov Today. 2008;13(5-6):247-53. doi: 10.1016/j.drudis.2007.10.018.

Silva HF, Martins- filho PRS, Piva MR. Denture-rela- ted oral mucosal lesions among farmers in a semi-arid Northeastern Region of Brazil. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2011;16(6):740-4.

Shukla S, Brinley E, Cho HJ, Seal S. Electrospinning of hydroxipropyl cellulose fibers and their application in synthesis of nano and submicron tin oxide fibers. Polymer. 2005;46(26):12130-45. doi: 10.1016/j.polymer.2005.10.070

Sklenar Z, Scigel V, Horackova K, Slanar O. Compounded preparations with nystatin for oral and oromucosal administration. Acta Pol Pharm. 2013;70(4):759–62.

Sukigara S, Gandhi M, Ayutsede J, Micklus M, Ko F. Regeneration of bombyx mori silk by electrospinning. Part 2. Process optimization and empirical modeling using response surface methodology. Polymer. 2004;45 (11):3701-8.

Talattof Z, Azad A, Zahed M, Shahradian N. Antifungal activity of xylitol against Candida albicans: an in vitro study. J Contemp Dent Pract. 2018 Feb;19(2):125-9.

Tan SH, Inai R, Kotaki M, Ramakrishna S. Systematic parameter study for ultrafine fiber fabrication via electrospinning process. Polymer. 2005;46(16):6128-34.

Tavares W. Azóis antifúngicos. In: Tavares W, editor. Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos. São Paulo: Atheneu; 2001. p. 869-86.

Taylor G. Electrically driven jets. *Proc R Soc Lond Ser. A*. 1969;313:453-75.

Ten Cate AN. *Histologia oral*. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013.

Teo WE, Ramakrishna S. A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. *Nanotechnology*. 2006;17(14):89-106.

Truhlar MR, Shay K, Sohnle P. Use of a new assay technique for quantification of antifungal activity of nystatin incorporated in denture liners. *J Prosthet Dent*. 1994;71(5):517-24.

Wang C, Chien HS, Yan KW, Hung CL, Hung KL, Tsai SJ, et al. Correlation between processing parameters and microstructure of electrospun poly(D,L-lactic acid). *Polymer*. 2009;50:6100.

Wani KD, Kadu BS, Mansara P, Gupta P, Deore AV, Chikate RC, et al. Synthesis, characterization and in vitro study of biocompatible cinnamaldehyde functionalized magnetite nanoparticles (CPGF Nps) for hyperthermia and drug delivery applications in breast cancer. *PLoS One*. 2014 Sep 30;9(9):e107315. doi: 10.1371/journal.pone.0107315.

Webb BC, Thomas CJ, Willcox MDP, Harty DWS, Knox KW. Candida-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 3. Treatment of oral candidosis. *Aust Dent J*. 1998;43(4):244-9.

Williams D, Lewis M. Pathogenesis and treatment of oral candidiasis. *J Oral Microbiol*. 2011;3:5771.

Wilson J. The aetiology, diagnosis and management of denture stomatitis. *Br Dent J*. 1998;185(8):380-4. doi: 10.1038/sj.bdj.4809821.

Woodruff MA, Hutmacher DW. The return of a forgotten polymer – Polycaprolactone in the 21st century. *Prog Polym Sci*. 2010;35:1217.

Wulf M, Michel S, Grundke K, Del Rio OI, Kwok DY, Neumann AW. Simultaneous determination of surface tension and density of polymer melts using axisymmetric drop shape analysis. *Curr Opin Colloid Interface Sci*. 1999;210(1):172–81.

Yang F, Murugan R, Wang S, Ramakrishna S. Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. *Biomaterials*. 2005;26:2603–10.

Yarin AL, Koombhongse S, Reneker DH. Taylor cone and jetting from liquid droplets in electrospinning of nanofibers. *J Appl Phys*. 2001;90:4836.

Zhang, C, Yuan X, Wu L, Han Y, Sheng J. Study on morphology of electrospun poly(vinyl alcohol) mats. *Eur Polym J*. 2005;423-32.

Zhu Y, Cao Y, Pan J, Liu Y. Macro-alignment of electrospun fibers for vascular tissue engineering. *J Biomedl Mater Res Part B: Applied Biomaterials*. 2009;92:508-16.