

UNIVERSIDADE BRASIL – CAMPUS ITAQUERA
INSTITUTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO DA UNIVERSIDADE
BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

***ATIVIDADE ANTIBIOFILME DE NANOFIBRAS DE
POLICAPROLACTONA/POLIETILENOGLICOL/GELATINA-
METACRILAMIDA***

NARA SILVA SOARES

Orientadora: Prof. Dra. Fernanda Roberta Marciano

Co-orientador: Prof. Dr. Anderson de Oliveira Lobo

São Paulo, SP
2020

***POLYCAPROLACTONE / POLYETHYLENE GLYCOL / GELATINE-
METHACRYLAMIDE NANOFIBER ANTIBIOFILM ACTIVITY***

NARA SILVA SOARES

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de pós-graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Brasil, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Área de concentração: Nanobiomateriais

Orientadora: Prof. Dra. Fernanda Roberta Marciano

Co-orientador: Prof. Dr. Anderson de Oliveira Lobo

São Paulo, SP
2020

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Universidade Brasil, com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

S655a SOARES, Nara Silva
Atividade antibiofilme de nanofibras de policaprolactona / polietilenoglicol / gelatinametacrilamida / Nara Silva Soares. -- São Paulo: Universidade Brasil, 2020.
37 f. : il.

Orientadora: Prof. Dr. Fernanda Roberta Marciano.
Coorientador: Prof. Dr. Anderson de Oliveira Lobo.
Dissertação de Mestrado defendida no Programa de Pós-graduação do Curso de Engenharia Biomédica da Universidade Brasil.

1. Fibras ultrafinas. 2. Engenharia de tecidos. 3. Propriedades bactericidas. 4. Biofilme. 5. Arcabouços. I. Marciano, Fernanda Roberta. II. Lobo, Anderson de Oliveira. III. Título.

CDD 620.82

TERMO DE APROVAÇÃO

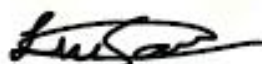
NARA SILVA SOARES

**"ATIVIDADE ANTIBIOFILME DE NANOFIBRAS DE
POLICAPROLACTONA/POLIETILENOGLICOL/GELATINA-METACRILAMIDA"**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica** da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:



Prof.(a). Dr.(a) Fernanda Roberto Marciano (presidente-orientador)



Prof.(a). Dr.(a) Laurita dos Santos (UNIVERSIDADE BRASIL)



Prof(a). Dr(a) Jancineide Oliveira de Carvalho (UNINOVAFAP1)

São Paulo, 17 de abril de 2020

Presidente da Banca Prof(a). Dr(a) Fernanda Roberto Marciano

Houve alteração do Título: sim () não (X):



Termo de Autorização

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respeetivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://www.universidadebrasil.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

Título do Trabalho: "ATIVIDADE ANTIBIOFILME DE NANOFIBRAS DE POLICAPROLACTONA/POLIETILENOGLICOL/GELATINA-METACRILAMIDA"

Houve alteração do Título: sim () não

Autor(es):

Discente: **Nara Silva Soares**

Assinatura: Nara Silva Soares

Orientador(a): **Profa. Dra. Fernanda Roberta Marciano**

Assinatura: Fernanda Marciano

Coorientador(a):

Assinatura: [Assinatura]

Data: 17/04/2020

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é fruto de muitas horas de dedicação e muito sacrifício. Não poderia deixar de exprimir meus sinceros e verdadeiros agradecimentos a muitas pessoas que estiveram presentes nestes dois últimos anos. Primeiramente aos meus pais Edson Basílio e Selma Luna pelo apoio e afeto durante toda essa jornada além da compreensão e ajuda de todas as formas. Essa conquista só foi possível graças ao seu suporte incondicional. À minha orientadora, co-orientador e colaboradores por todos os ensinamentos pontuais e decisivos, que fizeram este trabalho possível. Serei sempre muito grata. Aos amigos e parentes que sempre me ajudaram de suas formas impares e que com suas crenças, palavras e fé em mim, me motivaram a continuar e a não desistir nos momentos mais difíceis. Meu muito obrigada a todos.

RESUMO

Um dos maiores desafios em relação à cicatrização de feridas crônicas é a infecção microbiana causada por biofilmes resistentes a antibióticos que pode aumentar o custo na saúde pública. Nesse estudo relatamos o efeito antibacteriano da união dos três biomateriais poliméricos como policaprolactona (PCL), polietilenoglicol (PEG) e gelatina-metacrilamida (GelMA), por eletrofiação. O PCL:PEG:GelMA foi modificado pela primeira vez com cloreto de glicidil trimetil amônio (GTMAC) na tentativa de adicionar um grupo amina quaternária. A morfologia e a estrutura química das fibras foram caracterizadas. Os biofilmes de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* avaliaram a atividade antibacteriana das fibras. A adição deste grupo de amina quaternária aumentou a carga positiva disponível para reagir com as células bacterianas carregadas negativamente, causando mais interrupções nas células bacterianas e, portanto, aumentando sua atividade antibacteriana.

Palavras-chave: Fibras ultrafinas; Engenharia de Tecidos; Propriedades bactericidas; Biofilme; Arcabouços.

ABSTRACT

One of the biggest challenges in relation to the healing of chronic wounds is the microbial infection caused by biofilms resistant to antibiotics that can increase the cost in public health. In this study we report the antibacterial effect of the union of the three polymeric biomaterials such as polycaprolactone (PCL), polyethylene glycol (PEG) and gelatin-methacrylamide (GelMA), by electrospinning. PCL:PEG:GelMA was first modified with glycidyltrimethyl ammonium chloride (GTMAC) in an attempt to add a quaternary amine group. We characterize the morphology and chemical structure of the fibers. The biofilms of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* evaluated the antibacterial activity of scaffolds. The addition of this group of quaternary amines increased the positive charge available to react with the negatively charged bacterial cells, causing further disruption in the bacterial cells and therefore increasing their antibacterial activity.

Keywords: Ultrathin fibers, Tissue engineering; Bactericidal properties; Biofilm; Scaffolds.

DIVULGAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE CONHECIMENTO

A contagem de colônias é responsável por analisar em que medida o material inibiu ou retardou o crescimento de bactérias. No material sem tratamento o número das colônias foi superior ao dos materiais tratados. Isso ocorre porque o material contém agentes antibacterianos que fizeram com que as mesmas não desenvolvessem completamente. Observou-se que o biomaterial GelMA, por exemplo, não teve um bom resultado quando usado de forma isolada, já que ele precisa ser usado com outro material, conhecido como peptídeo anfifílico para reduzir o crescimento de bactérias. Dessa forma, acrescentando uma molécula quaternária no grupo biomateriais composto de PCL:PEG:GelMA, o efeito antibacteriano é mais visível. As amins quaternárias são moléculas anfifílicas, iguais aos peptídeos que o GelMA precisa para inibir o crescimento bacteriano, contendo grupos hidrofóbicos ("caudas") e grupos hidrofílicos ("cabeça"). Assim, resultou-se no aumento da carga positiva disponível para reagir com as células bacterianas carregadas negativamente e, portanto, aumentando a atividade antibacteriana no grupo PCL:PEG:GelMA*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Vista esquemática de um equipamento de eletrofição: fonte de alta tensão, uma agulha de diâmetro pequeno, um coletor, uma bomba de infusão e um tubo capilar com a solução polimérica.....	19
Figura 2: (a) Síntese e (b) modificação do GelMA.....	22
Figura 3: Fibras eletrofiadas (manta).....	23
Figura 4: Representação da placa com suspensões	25
Figura 5: (a) Representação esquemática de uma molécula anfifílica em que a cauda representa a parte hidrofóbica da molécula e a cabeça o grupo hidrofílico (b) tensoativo catiônico (molécula anfifílica)	27
Figura 6: (a) Espectros de ¹ H-RMN de GelMA e GelMA* e suas respectivas estruturas químicas; (b) Espectros ATR-FTIR das superfícies do PCL/PEG/GelMA e PCL/PEG/GelMA*	28
Figura 7: Micrografias obtidas por MEV das amostras de (a) PCL, (b) PCL:PEG, (c) GelMA, (d) GelMA*, (e) PCL:PEG:GelMA e (f) PCL:PEG:GelMA*. Ampliação de 15,0kx	29
Figura 8: Atividade bactericida do PCL, PCL:PEG, GelMA, GelMA*, PCL:PEG:GelMA, e PCL:PEG:GelMA* na presença de (a) <i>Escherichia coli</i> , (b) <i>Staphylococcus epidermidis</i> e (c) <i>Staphylococcus aureus</i>	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Unidades formadoras de colônias (UFCs) encontradas em cada grupo de amostras.....	26
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

PCL	Policaprolactona
PEG	Poli(etil)enoglicol
GELMA	Gelatina-Metacrilamida
GTMAC	Cloreto De Glicidiltrimetilamônio
GELMA*	Gelma Modificado
LIMAV	Laboratório De Materiais Avançados
UFPI	Universidade Federal Do Piauí
ITP	Instituto De Tecnologia E Pesquisa
PBS	Solução Salina
GTMAC	Cloreto De Glicidiltrimetilamônio
AM	Anidrido De Metacrilato
HFIP	Hexafluoroisopropanol
IRGACURE	Fotoiniciador 2-Hidroxi-L-[4- (Hidroxietoxi)Fenil]-2-Metil-L-Propanona
ÁGUA DI	Água Desionizada
MEV	Microscopia Eletrônica De Varredura
FTIR	Espectroscopia Infravermelho Com Transformada De Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)
ATR	Reflectancia Total Atenuada Universal (Attenuated Total Reflection)
BHI	Coração Cerebral (Brain And Heart Infusion)
TSB	Ágar Nutriente (Trypic Soy Broth)
E. Coli	Escherichia Coli
S. Aureus	Staphylococcus Aureus
S. Epidermidis	Staphylococcus Epidermidis
UFCS	Unidades Formadoras De Colônias

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	13
2- OBJETIVOS.....	15
3- REVISÃO TEÓRICA.....	16
4- METODOLOGIA.....	21
5- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
6- CONCLUSÃO.....	32
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

1- INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado de terapias antimicrobianas existentes no mercado levou muitas bactérias patogênicas a adquirirem resistência aos tratamentos em feridas crônicas (FREIRE et al., 2018), sendo *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp.*, *Enterobacter sp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa*, as bactérias mais comuns (VEIGA, SCHNEIDER; 2013).

Estima-se que grande parte dos microorganismos resistentes exista sob a forma de biofilmes, caracterizados por um mecanismo de ação em que colônias microbianas bióticas e abióticas cresçam envoltas por material viscoso aderido em superfície, constituindo uma complexa matriz extracelular de substâncias poliméricas, juntamente com água, partículas retidas e substâncias dissolvidas e adsorvidas, onde os microorganismos passam da forma planctônica para a vida sésil (CLUTTERBUCK et al., 2007; CERI; MORCK; OLSON, 2001).

A estimativa é de que a formação de biofilme esteja associada com 90% das infecções microbianas, contribuindo para a cronicidade de muitas delas (BARSOUMIAN et al., 2015) e que as bactérias podem ser mil vezes mais resistentes aos agentes antimicrobianos em biofilmes do que as células planctônicas, transformando-se em um problema crucial para tratamento de infecções crônicas, prolongando ou prejudicando o processo de cicatrização de feridas (JENSEN et al., 2014).

Diante desse cenário são frequentes os estudos para o desenvolvimento de antimicrobianos que busquem controlar ou eliminar este tipo de resistência o que levou à evolução da engenharia médica nas tecnologias baseadas em biomaterial como os hidrogéis, polímeros biocompatíveis e biodegradáveis com propriedades mecânicas, biológicas e químicas, também chamadas de mantas ou arcabouços, produzidos por processo de eletrofiação (CLUTTERBUCK et al., 2007; GULER, OZSEKER, AKKAYA; 2016; EATEMADI et al., 2016).

O processo de eletrofiação ou *electrospinning* é a técnica mais popular, simples, rentável e capaz de produzir diversos materiais a partir de polímeros de diâmetro reduzido, sendo o único método que pode ser desenvolvido em larga escala de produção para aplicações industriais (CABRAL et al., 2009).

A união de três biomateriais poliméricos como policaprolactona (PCL), polietilenoglicol (PEG) e gelatina-metacrilamida (GelMA), mesclados

(PCL:PEG:GelMA), mostraram-se biocompatíveis e com baixa suscetibilidade ao crescimento de alguns tipos de bactéria. O PCL é um polímero extensivamente empregado em aplicações de engenharia biomédica e tecidual devido à sua baixa toxicidade, biocompatibilidade, alta resistência mecânica, viscoelasticidade e biodegradabilidade (YOSHIMOTO et al., 2003; WILLIAMS et al., 2005; FARES et al., 2018; DE PAULA et al., 2018).

O PEG é um material sintético não tóxico e inerte, biocompatível, hidrofílico, tendo a capacidade de reduzir a adsorção de proteínas do plasma e, portanto, tem despertado o interesse em aplicações biomédicas tais como liberação controlada de biomoléculas, cicatrização de feridas, liberação de medicamentos e plataformas para medicina regenerativa (GUIMARÃES et al., 2018; ZHU, 2010). O GelMA é um biomaterial que se assemelha aos componentes naturais da matriz extracelular apresentando várias propriedades como biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa antigenicidade (SHU et al., 2003).

Entretando, o efeito bactericida contra biofilmes resistentes de bactérias ainda não havia sido investigado. Além disso, o cloreto de glicidiltrimetilamônio (GTMAC) foi usado pela primeira vez para modificar o GelMA (GelMA*), adicionando o grupo amina quaternária (CHEAH et al., 2019). Dessa forma, o efeito antibacteriano das fibras de PCL:PEG:GelMA e PCL:PEG:GelMA* foi investigado na presença de diferentes tipos de biofilmes bacterianos.

Nesse presente trabalho, as combinações dos polímeros PCL, PEG e GelMA e PCL, PEG e GelMA* serão eletrofiados e avaliados com relação ao potencial bactericida desses biomateriais em biofilmes de: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, a fim de utilizá-los como bandagem em feridas crônicas.

2- OBJETIVOS

O objetivo geral é avaliar a ação bactericida de biofilmes de nanofibras de PCL, PEG e GelMA e PCL, PEG e GelMA* em presença de bactérias.

Os objetivos específicos dessa dissertação são:

- Desenvolver um biomaterial polimérico de PCL, PEG e GelMA pelo processo de eletrofiação;
- Modificar o GelMA adicionando o grupo amina quaternária e produzir biomateriais de PCL, PEG e GelMA*;
- Caracterizar química e morfologicamente os biomateriais produzidos;
- Avaliar a atividade bactericida do biomaterial produzido na presença de biofilmes de bactérias resistentes.

3- REVISÃO TEÓRICA

3.1 FERIDA CRÔNICA E BIOFILME

O termo “ferida crônica” é utilizado para classificar feridas consideradas difíceis de curar ou que não seguiram um processo de cicatrização normal. Nesse sentido, consideram-se como feridas crônicas e complexas os seguintes tipos de lesões: úlceras por pressão, úlceras do pé diabético, feridas com tecido necrótico extenso, feridas crônicas relacionadas à vasculite ou terapia imunossupressora, queimaduras e infecções cirúrgicas não cicatrizadas (KYAW et al., 2017; JONES; ROTHEMEL; MACKAY, 2017).

As feridas crônicas são consideradas um crescente problema de Saúde Pública, uma vez que provocam alta morbidade, além do elevado custo no tratamento e na reabilitação dos pacientes portadores destas lesões. No mundo inteiro, casos de feridas crônicas e complexas estão fortemente relacionados a fatores de risco como obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares. A falta de medidas preventivas causam 85% de perda não traumática de membros (amputação) e 8% de letalidade (AMMONS, 2010; CLINTON; CARTER, 2015; KIRKETERP-MØLLER; ZULKOWSKI; JAMES, 2011; MISIC; GARDNER; GRICE, 2014).

Segundo Rhoads et al. (2008), todas as feridas crônicas têm bactérias na sua superfície, e elas não estão uniformemente distribuídas no leito da ferida dentro do biofilme. Foi realizado um estudo de referência por James et al. (2008), através de microscopia eletrônica de varredura à 50 feridas crônicas e 16 agudas, no qual os autores verificaram que 60% das feridas crônicas possuíam biofilme e apenas 6% das feridas agudas o apresentavam, sugerindo que, não só as feridas crônicas apresentavam biofilme, como, também, a sua presença pode prejudicar a cicatrização, contribuindo para sua cronicidade (STEINBERG, 2011; JAMES et al., 2008; WIDGEROW, 2008).

Um biofilme bacteriano pode ser definido como uma comunidade de microrganismos envoltos num material polissacarídeo extracelular aderido a superfícies bióticas e abióticas conferindo proteção contra os antimicrobianos e contra a resposta imunológica humoral e celular do hospedeiro (VAN HOUTDT et al., 2004).

Fatores genéticos e ambientais podem contribuir para a formação de um biofilme microbiano cujo processo ocorre em cinco etapas consecutivas: fase de aderência inicial e reversível das bactérias a superfícies; fase de transição da aderência reversível para a irreversível, mediada por adesinas e/ou por produção de substâncias poliméricas extracelulares pela bactéria; fase de desenvolvimento inicial da arquitetura do biofilme; fase de formação de microcolônias dentro do biofilme maduro e; fase de dispersão de células do biofilme para o ambiente ao redor, com retorno ao estado planctônico e possibilidade de colonização de novo ambiente (MONROE, 2007; CHENG et al., 2010).

A redução da susceptibilidade a antimicrobianos é uma das principais características da formação de biofilmes devido à baixa atividade metabólica das células presentes na parte interna de um biofilme, uma vez que estas enfrentam condições de escassez de oxigênio e de nutrientes. Dessa forma, os microrganismos se tornam menos sensíveis aos mecanismos de ação de antibióticos amplamente utilizados e seu uso inadequado pode acarretar em insucesso terapêutico, persistência da infecção e agravamento da situação clínica do paciente (KIM; STEINBERG, 2012; LEBEAUX; GHIGO; BELOIN, 2014; SOTO, 2013).

3.2 BIOMATERIAIS POR ELETROFIAÇÃO

O projeto de materiais com a capacidade de reduzir significativamente a administração de antibióticos e evitar infecções por bactérias altamente resistentes no ambiente hospitalar são altamente desejáveis e abordagens na engenharia de tecidos fazem uso de biomateriais, células e fatores, isoladamente ou em combinação, para restaurar, manter ou melhorar a função do tecido, criando materiais que sejam compatíveis uns com os outros, promovendo propriedades sinérgicas, reduzindo a adesão e o crescimento de microrganismos usando a nanotexturização (PRAMANIK; PINGGUAN-MURPHY; ABU, 2012; ZHU, 2010; LANGER; VACANTI, 1993).

Atualmente, existem três técnicas disponíveis para a síntese de nanofibras: eletrofiação, automontagem e separação de fases. Destas, a eletrofiação é a técnica mais amplamente estudada e parece apresentar os resultados mais promissores para aplicações de engenharia de tecidos.

A técnica de separação de fase é usada há muito tempo em preparação de membranas poliméricas. Arcabouços feitos por essa técnica contêm três escalas de tamanho: macroporos, que têm algumas centenas de micrômetros de diâmetro e são controlados pela forma e tamanho do porogênio; distância entre as fibras, que é determinada pela concentração de polímero utilizada; e o diâmetro da fibra. Outras vantagens da separação de fases incluem pouco equipamento necessário e um procedimento bastante simplificado comparado com os outros dois métodos, produzindo uma rede de fibra contínua fornecendo boas propriedades mecânicas (LI et al., 2002; SMITH; MA, 2004 ; KHIL et al., 2005 ; ZUWEI et al., 2005).

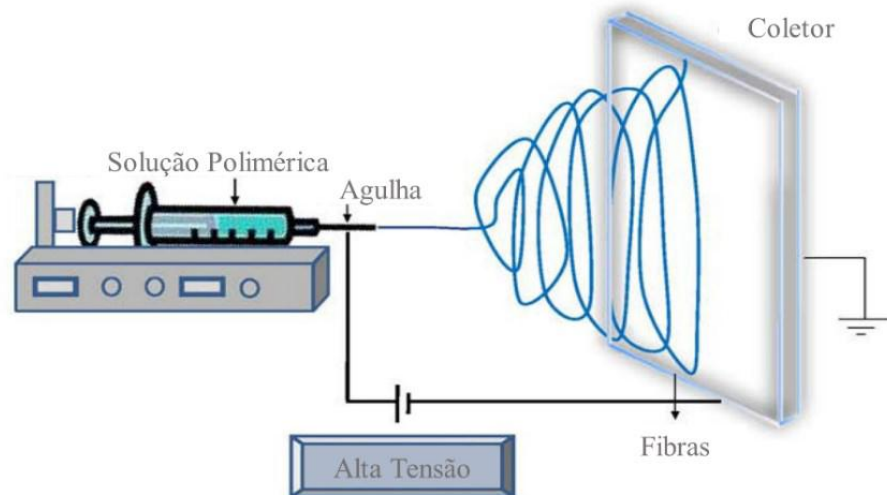
Na automontagem, as multicamadas resultantes consistem na imersão de um substrato sólido de carga contrária à do substrato para que ocorra adsorção por atração eletrostática, cujo conjunto é lavado e então imerso numa solução contendo outro sal, agora de carga contrária à do sal inicialmente depositado, de maneira a resultar numa espécie de "sanduíche" formado por camadas moleculares catiônicas e aniônicas, alternadamente adsorvidas (PATERNO; MATTOSO; OLIVEIRA JR., 2001).

A técnica de eletrofiação utiliza um campo elétrico para produzir micro e nanofibras a partir de uma solução polimérica oferecendo controle sobre a espessura e a composição das nanofibras, juntamente com a porosidade das telas, usando uma configuração experimental relativamente simples, hidrofiliabilidade, não toxicidade e biocompatibilidade, que os torna vantajosos em muitas aplicações, face aos polímeros sintéticos. Estes compostos apresentam ainda a vantagem de serem, normalmente, menos poluentes e provenientes de fontes renováveis (LI et al., 2002; SMITH; MA, 2004 ; KHIL et al., 2005 ; ZUWEI et al., 2005).

No processo de eletrofiação, um polímero em solução é transformado numa matriz fibrosa por aplicação de uma diferença de potencial muito elevada. As fibras formadas distinguem-se das fibras obtidas pelos processos convencionais devido ao seu diâmetro reduzido. Durante o processo de eletrofiação, uma corrente de alta tensão é aplicada para criar um jato eletricamente carregado de uma solução polimérica. À medida que este jato passa da ponta da agulha para o coletor, as moléculas de polímeros são esticadas e o solvente evapora-se, gerando a fibra. Os instrumentos básicos de eletrofiação incluem uma fonte de alta tensão, uma agulha de diâmetro pequeno, um coletor, uma bomba de infusão e um tubo capilar com a

solução polimérica, como apresentado na Figura 1 (BUTTAFOCO et al.,2006; KWANKHAO, 2013).

Figura 1 - Vista esquemática de um equipamento de eletrofiação: fonte de alta tensão, uma agulha de diâmetro pequeno, um coletor, uma bomba de infusão e um tubo capilar com a solução polimérica



Fonte: VENTURELLI, R.B; GRIPA, S. Eletrofiação: uma alternativa para a produção de não tecidos. *Revista da UNIFEBE*, v. 1, n. 22, 2017.

Uma fonte de alimentação de alta tensão é utilizada para criar um campo elétrico entre a solução polimérica e o coletor. Quando a diferença de potencial é aplicada entre a agulha e o coletor, a gota adquire a forma de um cone, formando uma estrutura denominada por cone de Taylor. Sob condições apropriadas, ocorrerá a formação de um jato de solução eletricamente carregado, que se dirige para o coletor. Durante a trajetória deste jato, as moléculas de polímeros sofrem estiramento e o solvente é evaporado, formando fibras que são recolhidas no coletor (VELEIRINHO; REI; LOPES-DA-SILVA, 2008).

O PCL é hidrofóbico e apresenta longo tempo de degradação, o que restringe suas aplicações. Uma maneira de resolver essa limitação é fundindo com outros biomateriais para melhorar suas propriedades, tais como hidrofilicidade, degradabilidade e propriedades mecânicas (ZUPANČIČ et al., 2018; NICHOL et al., 2010). Suas aplicações são diversas, como: em sistemas para liberação controlada de fármacos, recobrimento de cânulas uretrais e na engenharia tecidual, em tecido epidérmico, muscular, ósseo e cartilaginoso (SASMAZEL et al., 2008).

O PEG é um polímero solúvel na maioria dos solventes orgânicos, possui boa estabilidade térmica. No entanto, ainda tem limitações em que não pode ser usado sozinho, mas precisa ser combinado com outros polímeros (ABD ALLA, 2004; CHAKRAPANI et al., 2012).

O GelMA é um hidrogel semi-sintético que permite a exploração dos sinais biológicos inerentes à molécula de gelatina, permitindo o controle das propriedades mecânicas apresentando várias propriedades de importância biológica, além de baixo custo (RUEDINGER et al., 2015).

Utilizando a eletrofiação da combinação de PCL, PEG e GelMA, será avaliado o potencial dos biomateriais como agente bactericida de biofilmes de bactérias.

4- METODOLOGIA

4.1 Local

A produção e caracterização desses biomateriais foi realizada no Laboratório de Materiais Avançados (LIMAv) do Centro de Tecnologia da Universidade Federal do Piauí (UFPI) em Teresina/PI. Os testes bactericidas foram realizados no Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP) em Aracaju/SE.

4.2 Materiais e métodos

Os seguintes reagentes químicos foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA): PCL (peso molecular Mw 80.000), PEG (Mw 8.000), Gelatina (Tipo A, 300 bloom de pele de porco), solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco (PBS), cloreto de glicidiltrimetilamônio (GTMAC), anidrido de metacrilato (AM), hexafluoroisopropanol (HFIP) e fotoiniciador 2-hidroxi-1-[4- (hidroxietoxi)fenil]-2-metil-1-propanona (Irgacure 2959).

As lâminas de microscópio pré-limpas foram obtidas da Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA). A fonte de UV (modelo Obenluxmodel OVM-1365) foi fornecida pela EXPO Photonic Solutions Inc. (Ontário, Canadá) e os tubos de diálise 12-14k da MWCO, Spectrum Lab Inc. As seringas foram da BD Yale e as agulhas da Inbras.

4.2.1 Síntese de GelMA

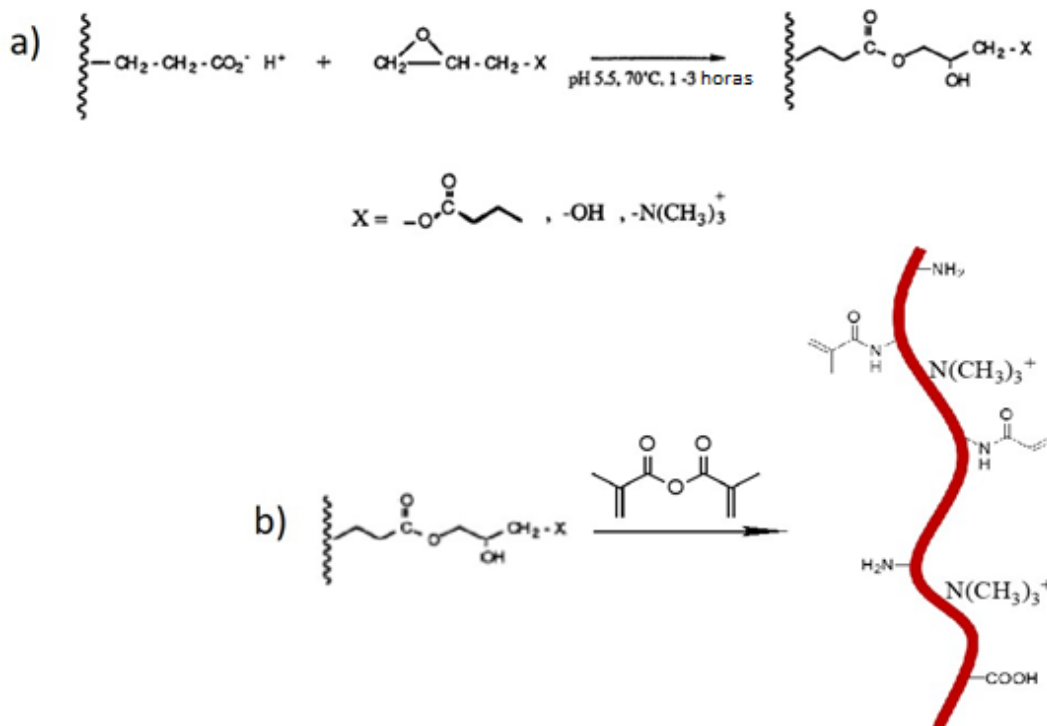
Foram vigorosamente agitados 10 g de gelatina em 100 mL de solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco (PBS) a 50 °C até sua dissolução total. Em seguida, 3 g de GTMAC foram adicionados (temperatura entre 65-75 °C) e agitados por 3 h (Figura 2a).

4.2.2 Funcionalização de GelMA

Após agitação, 3 mL de AM foram adicionados à mistura de reação e agitados por 3 h a 50 °C. Em seguida, a mistura foi diluída em PBS pré-aquecido (50 °C) e

após, agitação por 10 min na temperatura indicada. Posteriormente, o material foi purificado através de tubos de diálise a 40 °C por 7 dias (Figura 2b) (NICHOL et al., 2010). Durante esse período, a água era trocada pelo menos uma vez ao dia. Após diálise, a solução límpida resultante foi liofilizada proporcionando o GelMA* como um sólido branco (~70% de rendimento). O grau de substituição de metacrilóilo foi determinado usando Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear 1H (RMN). Os espectros foram obtidos em um equipamento JEOL JNM-ECZ500R operando a 500 MHz, onde os desvios químicos foram determinados em relação ao CHCl_3 ($\pm 7,26$ ppm) ou CH_2Cl_2 ($\pm 5,32$ ppm).

Figura 2- (a) Síntese e (b) modificação do GelMA



Fonte: Autoria Própria

4.2.3 Preparação das fibras

PCL (0,5 g), PEG (0,5 g) e GelMA (0,5 g) foram dissolvidos separadamente em 5 mL de HFIP. Posteriormente, os frascos foram fechados e dissolvidos sob agitação à temperatura ambiente durante 24 h. As soluções PCL:PEG:GelMA e PCL:PEG:GelMA* foram misturadas usando a razão 6:3:1. Um processo clássico de eletrofiação foi acoplado usando: seringa (3 mL), agulha (23G), fonte de alta tensão positiva (definida em 17 kV, CZE 1000R, Spellman), coletor estático de aço

inoxidável (80 mm x 80 mm x 1 mm) coberto por papel alumínio (placa quadrada 20 cm x 20 cm), distância de 10 cm (ponta da agulha ao coletor), taxa de infusão de 0,2 mL / h (KDS 100), temperatura a 23°C e umidade a 40%.

Figura 3- Fibras eletrofiadas (manta)



Fonte: Autoria Própria

4.2.4 A reticulação de fibras

As mantas de PCL:PEG:GelMA e PCL:PEG:GelMA* (10 mm x 10 mm) foram imersas em glutaraldeído (25% em água desionizada) por 12 h. Após, as mantas foram lavadas cinco vezes em solução de glicina (15 mg/mL de água deionizada). Em seguida, as mantas foram imersas em uma solução fotoiniciadora (1,0 g de Irgacure, 10 mL de etanol, ausência de luz) por 2 h e fotorreceptoras por 10 min (lâmpada UV 365nm, 160 W, Obenluxmodel OVM-1365, 10 cm de trabalho distância). Finalmente, o PCL reticulado: PEG:GelMA foi lavado usando a seguinte sequência: etanol (3x), água DI (3x) e seco durante a noite (vácuo). A Figura 2 resume um possível mecanismo após a foto-ligação.

4.2.5 Caracterização das fibras eletrofiadas

As micrografias das fibras preparadas foram obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura, MEV, Hitachi S-3400n no LIMAV/UFPI. As fibras também foram caracterizadas por Espectroscopia Infravermelho com Transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, FTIR), Perkin Elmer 400 no

LIMAV/UFPI, utilizando um sensor de reflectancia total atenuada universal (*Attenuated Total Reflection*, ATR).

4.3 Teste de bactérias

Para realizar os testes utilizando diferentes culturas de bactérias, primeiro foi necessário cultivar as bactérias em meio de infusão de coração cerebral (*Brain and Heart Infusion*, BHI) (Muller Hinton, TSB, Ágar Nutriente) por aproximadamente 14h. O meio de cultura *Trypic Soy Broth* (TSB) foi posteriormente autoclavado, com composição: triptona (17 g/L), tom de soja (3 g/L), glicose (2,5 g/L), cloreto de sódio (5 g/L), fosfato dipotássico (2,5 g/L) e ágar bacteriológico. Meio utilizado devido à sua composição nutricional que apoiará o crescimento de uma diversidade de microrganismos. As bactérias (*E. coli*, *S. aureus* e *S. epidermidis*) foram solicitadas a testar e identificar o poder antimicrobiano das amostras.

Após 14h, as bactérias foram suspensas em PBS, uma solução salina comumente usada para aplicações biológicas, como lavagem de células, transporte de tecidos e diluição devido ao seu poder de preservação da membrana celular. O PBS é composto de NaCl (8 g/L), KCl (0,2 g/L), Na₂HPO₄ (1,44 g/L) e KH₂PO₄ (0,24 g/L). A ressuspensão foi realizada até $1,5 \times 10^8$ (Escala Nefelométrica de Mc Farland). Subsequentemente, a ressuspensão foi diluída em meio TSB para $1,5 \times 10^4$ por diluição em série. Para atingir essa escala, foi necessário retirar 10µL da ressuspensão e diluir em 30 mL de meio. Esta diluição foi então utilizada para toda a experiência.

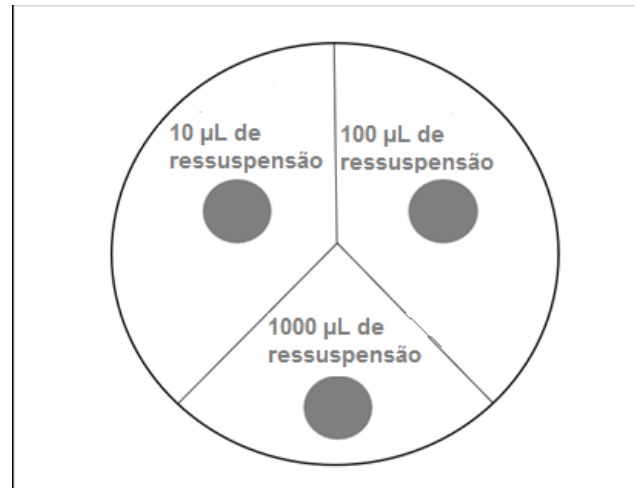
As amostras foram previamente esterilizadas (usando luz ultravioleta) e colocadas em triplicata nas placas de 24 poços. Após, foram cortadas com a ajuda de tesouras estéreis. Em seguida, adicionou-se 1 mL de cada bactéria diluída em suspensão nos materiais em cada poço.

Após a inoculação do meio e do material nos poços, foi incubado por 24 h a 37 °C. Após a incubação, as bactérias foram removidas e descartadas, deixando apenas o material. Em seguida, o material foi lavado com PBS repetidamente até o conteúdo biológico ser removido.

Após a lavagem, as fibras foram removidas das placas e colocadas em microtubos do tipo eppendorf contendo 1 mL de PBS 1x e agitadas em vórtex para remover todas as bactérias aderidas a ele. Esta suspensão foi diluída em série 10X,

100X e 1000X e colocada com 10 μ L de TBS (Figura 4). Depois disso, as placas foram incubadas durante 14 h a 37 °C.

Figura 4 - Representação da placa com suspensões



Fonte: Autoria Própria

As colônias foram posteriormente contadas para calcular as unidades formadoras de colônias (UFCs). Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos pelo menos três vezes para confirmar a reprodutibilidade.

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para os resultados das interpretações, foi necessário contar as UFCs. A contagem de colônias é responsável por analisar em que medida o material inibiu ou retardou o crescimento de bactérias patogênicas. A partir dessa contagem, foi realizada uma média de quanto às unidades coloniais apresentavam ao final.

Na Tabela 1 observa-se que no material sem tratamento, o número de UFCs foi superior ao dos materiais tratados. Isso ocorre porque o material contém agentes antibacterianos que fizeram com que as colônias não desenvolvessem completamente.

Tabela 1 - Unidades formadoras de colônias (UFCs) encontradas em cada grupo de amostras.

C+: meio com bactérias, mas sem amostra (controle).

Material/ Estirpes	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
PCL:PEG:GelMA	$1,4 \times 10^7 \pm 8,1 \times 10^5$	$2,0 \times 10^6 \pm 1,7 \times 10^5$	$1,9 \times 10^7 \pm 3,8 \times 10^5$
PCL:PEG:GelMA*	$1,5 \times 10^7 \pm 1,1 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6 \pm 2,6 \times 10^4$	$1,6 \times 10^7 \pm 1,1 \times 10^5$
GelMA	$1,4 \times 10^7 \pm 6,7 \times 10^5$	$1,0 \times 10^6 \pm 1,1 \times 10^5$	$1,1 \times 10^7 \pm 1,0 \times 10^5$
PCL:PEG	$1,4 \times 10^7 \pm 2,8 \times 10^6$	$8,0 \times 10^6 \pm 2,5 \times 10^5$	$1,9 \times 10^7 \pm 1,5 \times 10^5$
PCL	$1 \times 10^9 \pm 1,1 \times 10^8$	$5,0 \times 10^6 \pm 1,5 \times 10^5$	$2,0 \times 10^6 \pm 8,1 \times 10^5$
C+	$1 \times 10^9 \pm 4,7 \times 10^7$	$9,0 \times 10^6 \pm 1,5 \times 10^5$	$2 \times 10^9 \pm 1,0 \times 10^4$

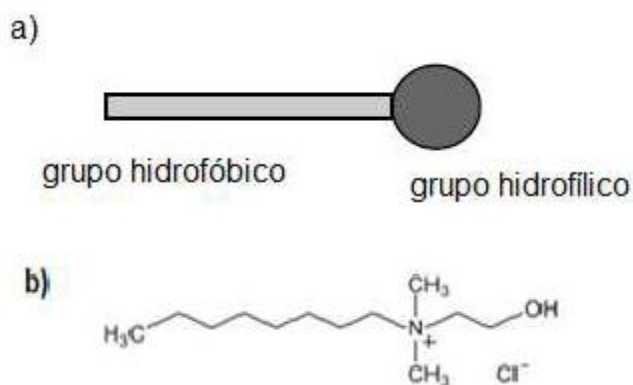
Fonte: Autoria Própria

O uso apenas do GelMA não teve um efeito promissor, visto que ele precisa ser conjugado com um peptídeo anfifílico para reduzir o crescimento de bactérias, segundo Annabi et al. (2017). O mesmo ocorre com o PCL que deve ser fundido o com outro biomaterial para melhorar suas propriedades mecânicas (CHENG et al., 2007) não apresentando assim uma inibição no crescimento das colônias.

Os compostos de amina quaternária são compostos anfipáticos, contendo grupos hidrofóbicos ("caudas") e grupos hidrofílicos ("cabeça") (Figura 5). Pertencem

ao grupo dos tensoativos catiônicos e manifestam a sua atividade antibacteriana agindo como indutores de enzimas autolíticas que causam lises na parede celular, alterando o metabolismo de proteínas, provocando a desnaturação proteica e inibição enzimática (ANDRADE, 2008; SHABAN et al., 2013). Dessa forma, acrescentando o grupo quaternário no grupo PCL:PEG:GelMA, o efeito antibacteriano é mais visível.

Figura 5 – (a) Representação esquemática de uma molécula anfifílica, em que a cauda representa a parte hidrofóbica da molécula, e a cabeça o grupo hidrofílico (b) tensoativo catiônico (molécula anfifílica).

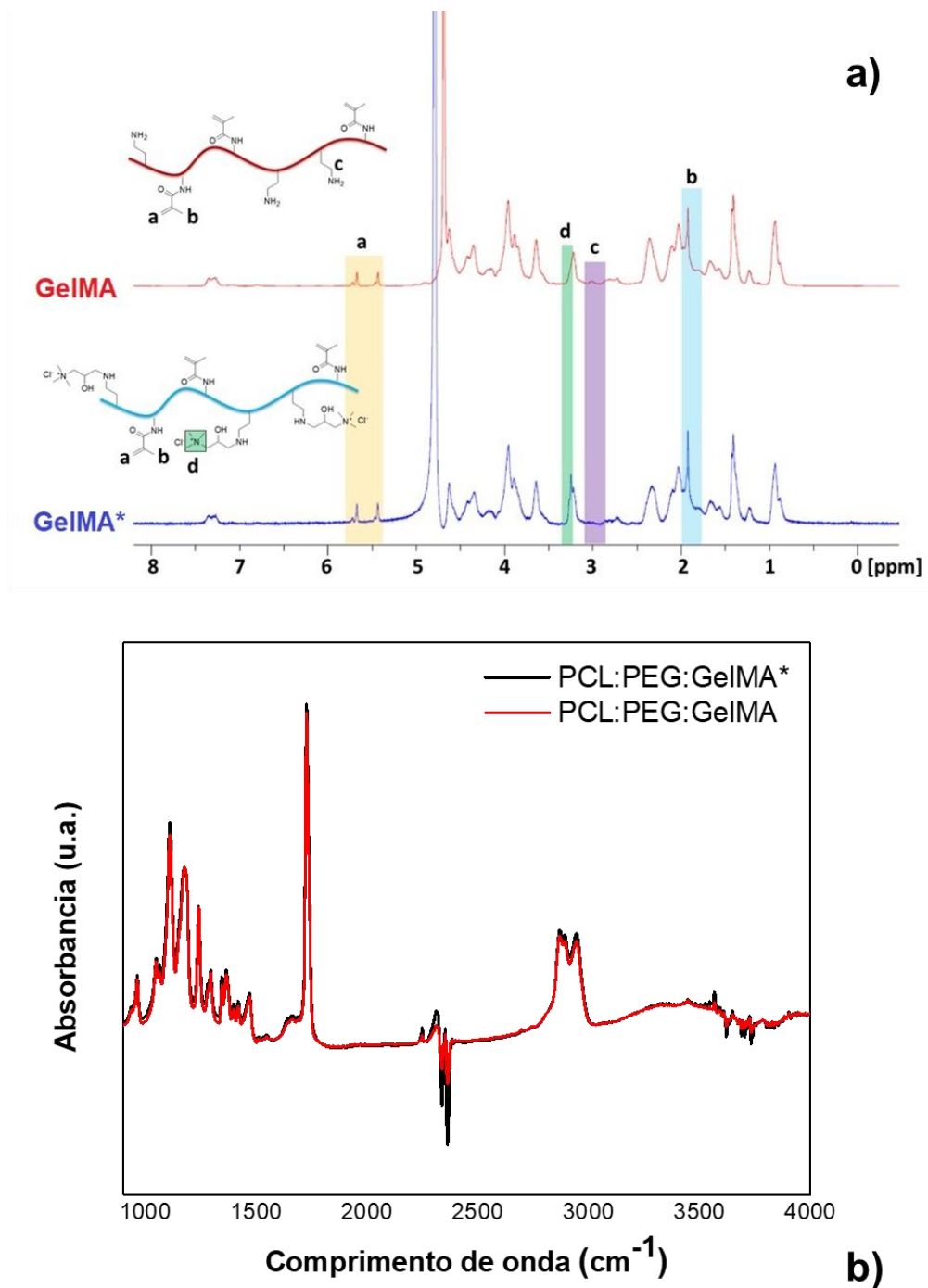


Fonte TADROS, 2005.

As estruturas químicas do GelMA e GelMA* são mostradas na Figura 6. Comparado ao espectro do GelMA, o GelMA* formou um novo grupo funcional marcado como verde em "d", o grupo amina quaternária (Figura 6a). Os picos em torno dos desvios químicos (δ) de 5,3 e 5,6 ppm (amarelo em "a") foram atribuídos aos prótons acrílicos (2H) do grupo metacrilóilo enxertado; o pico em $\delta = 1,9$ ppm (azul em "b") foi atribuído ao grupo metil (3H) do grupo metacrilóil enxertado (ZHOU; LEE; TAN, 2017). O pico em $2,9 \leq \delta \leq 3,1$ ppm (roxo em "c") foi atribuído ao lisina-metileno (2H) e é apresentado apenas no GelMA. Este grupo pode ser utilizado para reticulação enzimática, pois é um aceitador de acil (ZHOU; LEE; TAN, 2017).

Os espectrogramas de ATR-FTIR das superfícies do PCL/PEG/GelMA e PCL/PEG/GelMA* (Figura 6b) foram comparados nos intervalos espectrais do alongamento de OH na região de $3000-3600 \text{ cm}^{-1}$ (KUMAR; BADRINARAYANAN; SASTRY, 2000), CO= alongamento em torno de 1700 cm^{-1} e CO^- em 1300 a 1000 cm^{-1} . Houve uma leve interação evidenciada por alterações nas bandas de ATR-FTIR correspondentes aos respectivos grupos funcionais (MORRO et al., 2017).

Figura 6 –(a) Espectros de ^1H -RMN de GeIMA e GeIMA* e suas respectivas estruturas químicas; (b) Espectros ATR-FTIR das superfícies do PCL/PEG/GeIMA e PCL/PEG/GeIMA*.

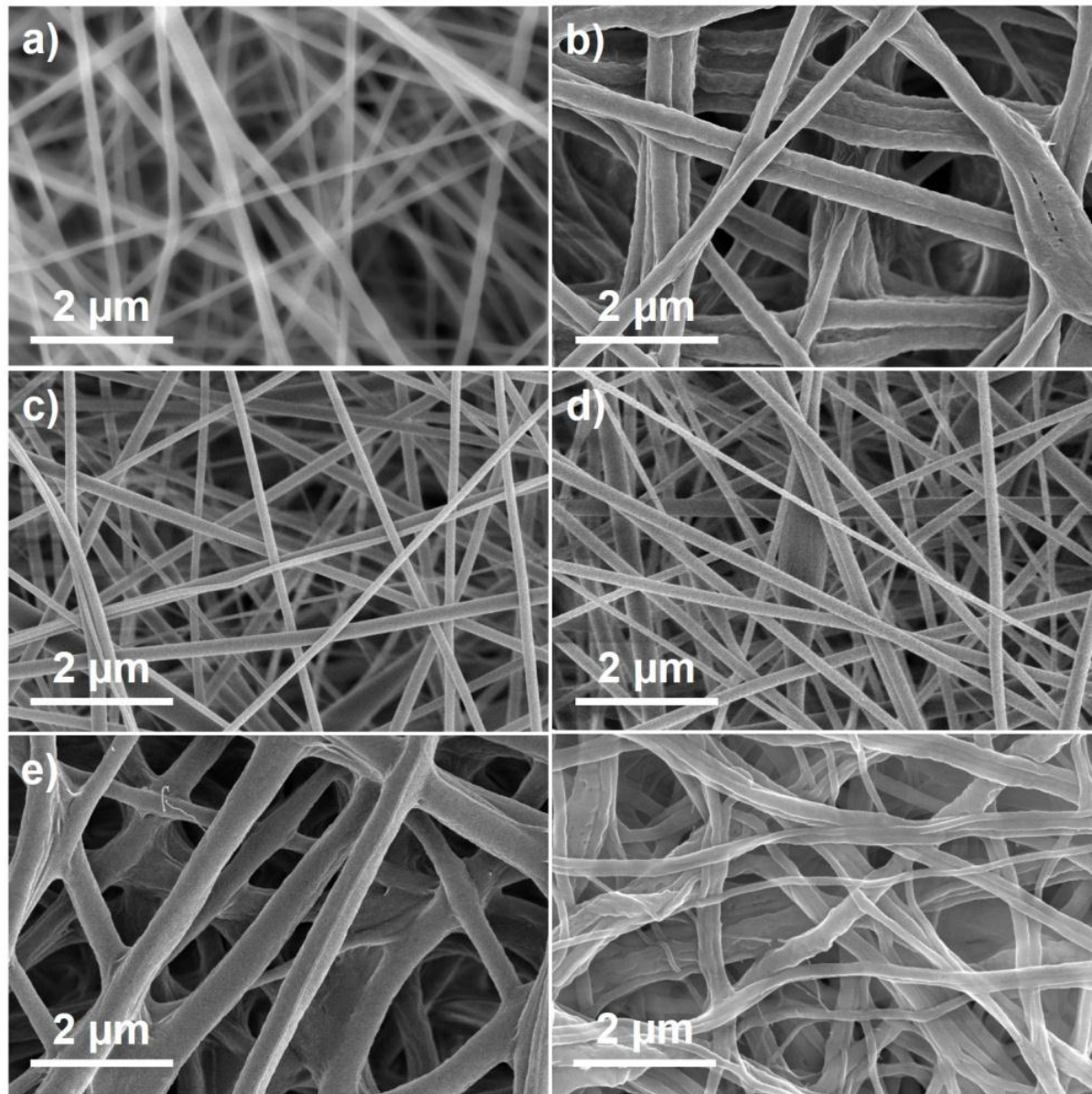


Fonte: Autoria Própria

A Figura 7 mostra imagens obtidas por MEV das amostras analisadas. Todos os grupos apresentaram fibras ultrafinas e microfibras e com ausência de imperfeições. As fibras GeIMA (c) e GeIMA* (d) são ainda mais regulares e isentas

de defeitos. As amostras de PCL:PEG:GelMA (e) e PCL:PEG:GelMA* (f) mantêm as características regulares e sem defeitos, aumentando seu diâmetro.

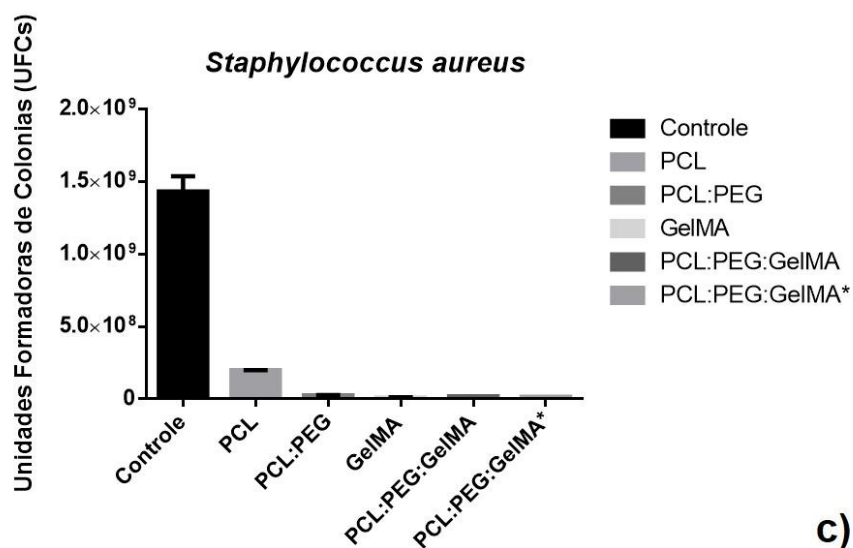
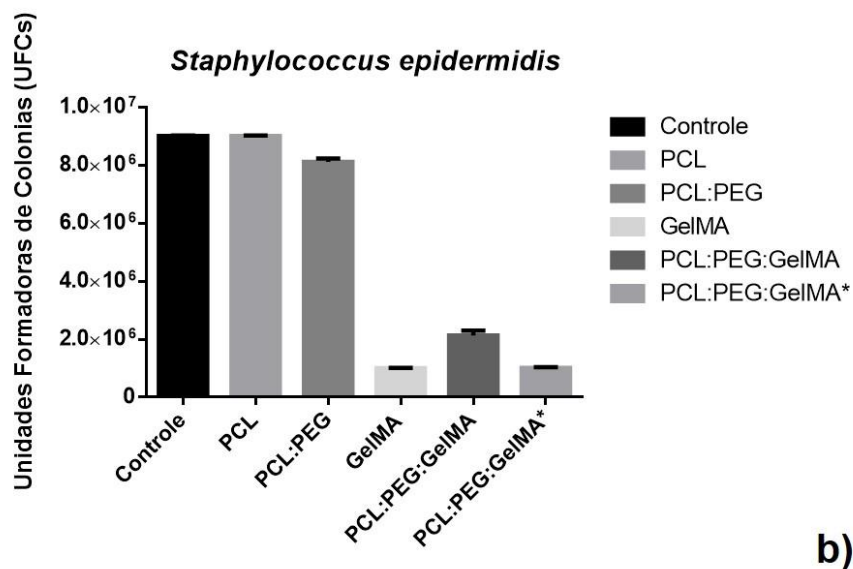
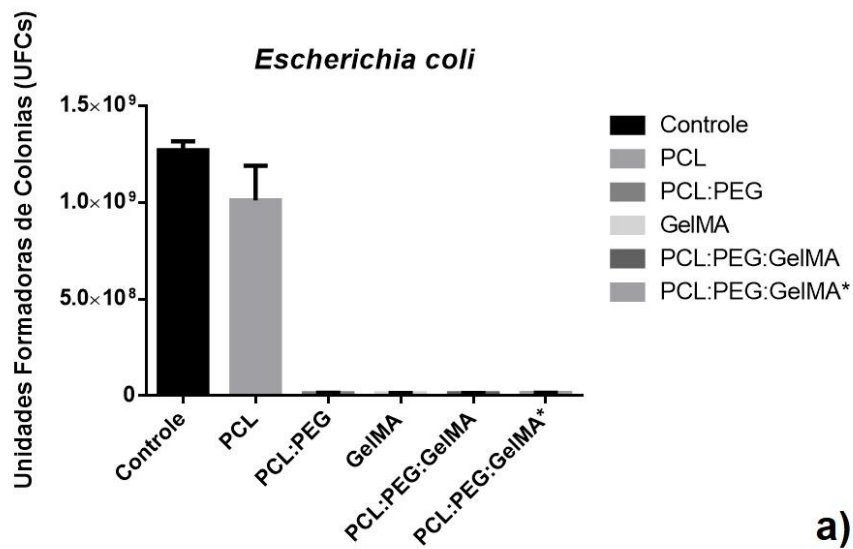
Figura 7 – Micrografias obtidas por MEV das amostras de (a) PCL, (b) PCL:PEG, (c) GelMA, (d) GelMA*, (e) PCL:PEG:GelMA e (f) PCL:PEG:GelMA*. Ampliação de 15,0 kx.



Fonte: Autoria Própria

A contagem de colônias é responsável por analisar em que medida o material inibiu ou retardou o crescimento de bactérias patogênicas. A Figura 8 mostra as UFCs presentes nos materiais analisados de acordo com as bactérias mais proeminentes nos biofilmes de bactérias de feridas. Utilizando *E. coli* (Figura 8a) e *S. aureus* (Figura 8c), não foi possível ver nenhuma diferença significativa entre eles. Contra *S. epidermidis*, as amostras de PCL:PEG:GelMA* apresentaram apenas metade do número de UFCs comparada ao grupo em PCL:PEG:GelMA. *Staphylococcus epidermidis* é uma bactéria típica da flora da pele e representa a fonte mais comum de infecções em dispositivos médicos residentes (OTTO, 2009). A formação dos biofilmes torna o tratamento complicado por genes específicos de resistência a antibióticos (COSTERTON; STEWART, 1999). A adição do grupo amina quaternária no PCL:PEG:GelMA aumentou a carga positiva disponível para reagir com as células bacterianas carregadas negativamente (CHEAH et al., 2019). Isso causa mais interrupção das células bacterianas e, portanto, aumenta sua atividade antibacteriana.

Figura 8 - Atividade bactericida do PCL, PCL:PEG, GelMA, GelMA*, PCL:PEG:GelMA, e PCL:PEG:GelMA* na presença de (a) *Escherichia coli*, (b) *Staphylococcus epidermidis* e (c) *Staphylococcus aureus*.



6- CONCLUSÃO

No presente estudo três biomateriais poliméricos clássicos (PCL, PEG e GelMA) foram fundidos para combater biofilmes de bactérias. PCL:PEG:GelMA foi modificado pela primeira vez com GTMAC para adicionar um grupo de amina quaternária na tentativa de aumentar o efeito bactericida das fibras. A adição desse grupo de amina quaternária aumentou a carga positiva disponível para reagir com as células bacterianas carregadas negativamente, causando mais perturbações celulares bacterianas e, portanto, aumentou sua atividade antibacteriana.

Nas estruturas químicas do GelMA e GelMA*, comparando-se o espectro dos dois, o GelMA* formou um novo grupo funcional da amina quaternária e os espectros das superfícies do PCL/PEG/GelMA e PCL/PEG/GelMA* quando comparados, mostraram uma leve interação evidenciada por alterações nas bandas de ATR-FTIR correspondentes aos respectivos grupos funcionais.

Nas imagens obtidas por MEV das amostras analisadas, todos os grupos apresentaram fibras ultrafinas e microfibras e com ausência de imperfeições. As fibras GelMA e GelMA* são ainda mais regulares e isentas de defeitos, mostrando PCL:PEG:GelMA e PCL:PEG:GelMA* com características regulares e sem defeitos, com diâmetros aumentados.

As colônias presentes no material analisado eram de bactérias de acordo com as mais proeminentes nos biofilmes de feridas e o *Staphylococcus epidermidis* foi o biofilme que mais apresentou resultado frente às amostras de PCL:PEG:GelMA*, com apenas metade do número de UFCs comparada ao grupo em PCL:PEG:GelMA.

Staphylococcus epidermidis é uma bactéria típica da flora da pele e que representa a fonte mais comum de infecções no meio da saúde com formação dos biofilmes, o que torna o tratamento difícil quando há resistência aos antibióticos. Dessa forma mostra-se a importância da adição do grupo amina quaternária no PCL:PEG:GelMA aumentando sua atividade antibacteriana.

Essas descobertas sugerem que o biomaterial aqui modificado é um candidato para futuras aplicações biomédicas, como em bandagens de feridas crônicas entre outros tratamentos que incluem resistência aos antibióticos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

- ABD ALLA, S. G. Structural properties of γ -irradiated poly(vinyl alcohol)/poly(ethylene glycol) polymer blends. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 94, p 167–176, 2004.
- AMMONS, M. C. B. Anti-Biofilm Strategies and the Need for Innovations in Wound Care. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v. 5, p 10-17, 2010.
- ANDRADE, N. J. **Higiene na Indústria de Alimentos**. São Paulo, Varela, 2008.
- ANNABI, N.; RANA, D.; SHIRZAEI SANI, E.; PORTILLO-LARA, R.; GIFFORD, J. L.; FARES, M. M.; MITHIEUX, S. M.; WEISS, A. S. Engineering a sprayable and elastic hydrogel adhesive with antimicrobial properties for wound healing. **Biomaterials**, v. 139, p. 229–43, 2017.
- BARSOUMIAN, A. E.; MENDE, K.; SANCHEZ, C. J. JR.; BECKIUS, M. L.; WENKE, J. C.; MURRAY, C. K.; AKERS, K. S. Clinical Infectious outcomes associated with biofilm-related bacterial infections: a retrospective chart review. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, p. 1-7, 2015.
- BUTTAFOCO, L.; KOLKMAN, N. G.; ENGBERS-BUIJTENHUIJS, P.; POOT, A. A.; DIJKSTRAAI, P. J.; VERMES, I.; FEIJEN, J. Electrospinning of collagen and elastin for tissue engineering applications. **Biomaterials**, v. 27, p 724 – 734, 2006.
- CABRAL, E. L.; SIQUEIRA, F. J.; JAHNO, V. D.; VIEZZER, C.; DENISE C. MACHADO, D. C.; DULLIUS, J.; LIGABUE, R.; EINLOFT, S.; ALVES, A. K.; BERGMANN, C. P. **Preparação de nanofibras poliméricas por electrospinning**. Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros. Foz do Iguaçu, PR – Outubro/2009.
- CERI, H.; MORCK, D. W.; OLSON, M. E. Biocide Susceptibility testing of biofilms. *In*: BLOCK, Seymour S. **Desinfection, Sterilization, and Preservation**. 5º ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2001, p. 1429-1437.
- CHAKRAPANI, V. Y.; GNANAMANI, A.; GIRIDEV, V. R.; MADHUSOOTHANAN, M.; SEKARAN, G. Electrospinning of type I collagen and PCL nanofibers using acetic acid. **Journal of Applied Polymer Science**, v.125, p 3221–7, 2012.
- CHEAH, W. Y.; SHOW, P. L.; NG, I. S.; LIN, G. Y.; CHIU, C. Y.; CHANG, Y. K. Antibacterial activity of quaternized chitosan modified nanofiber membrane. **International journal of biological macromolecules**, v. 126, p. 569-577, 2019.
- CHENG, G.; ZHANG, Z.; CHEN, S.; BRYERS, J. D.; JIANG, S. Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation on zwitterionic surfaces. **Biomaterials**, v. 28, p. 4192–9, 2007.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

CHENG, K. C.; DEMIRCI, A.; CATCHMARK, J. M. Advances in biofilm reactors for production of value-added products. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 87, p. 445-456, 2010.

CLINTON, A.; CARTER, T. Chronic wound biofilms: pathogenesis and potential therapies. **Laboratory Medicine**, v. 46, p. 277-284, 2015.

CLUTTERBUCK, A. L.; WOODS, E. J.; KNOTTENBELT, D. C.; CLEGG, P. D.; COCHRANE, C. A.; PERCIVAL, S. L. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, v. 121, p 1-17, 2007.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections, **Science**, v. 284, p.1318, 1999.

DE PAULA, M. M. M.; BASSOUS, N. J.; AFEWERKI, S.; HARB, S. V.; GHANNADIAN, P.; MARCIANO, F. R.; VIANA, B. C.; TIM, C. R.; WEBSTER, T. J.; LOBO, A. O. Understanding the impact of crosslinked PCL/PEG/GelMA electrospun nanofibers on bactericidal activity. **Plos One**, v.13, p. 1-19, 2018.

EATEMADI, A.; DARAEI, H.; ZARGHAMI, N.; MELAT, Y. H.; AKBARZADEH, A. Nanofiber: Synthesis and biomedical applications. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 44, p 111-21, 2016.

FARES; M. M.; SANI, SHIRZAEI, E.; LARA, R. P.; OLIVEIRA, R. B.; KHADEMOSSEINI, A.; ANNABI, N. Interpenetrating network gelatin methacryloyl (GelMa) and pectin-g-PCL hydrogels with properties for tissue engineering. **Biomaterials Science**, v. 6, p 2938-2950, 2018.

FREIRE, N. B.; PIRES, L. C. S. R.; OLIVEIRA, H. P.; COSTA, M. M. Atividade antimicrobiana e antibiofilme de nanopartículas de prata sobre isolados de *Aeromonas spp.* obtidos de organismos aquáticos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p 244-249, 2018.

GUIMARÃES, P. C. L.; SILVA, J. R.; AZEVEDO, R. B.; MORAIS, P. C.; SILVA, S. W. Fabrication and characterization of glycine-loaded PEG nanoparticles for drug delivering: a comprehensive SERS study. **Applied Surface Science**, v. 450, p. 396-403, 2018.

GULER, S.; OZSEKER, E. E.; AKKAYA, A. Developing an antibacterial biomaterial. **European Polymer Journal**, v. 84, p. 326-337, 2016.

JAMES, G. A.; SWIGGER, E.; WOLCOTT, R.; PULCINI, E. L.; SECOR, P.; SESTRICH, J.; COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S. Biofilms in chronic wounds. **Wound Repair and Regeneration**, v. 16, p. 37-44, 2008.

JENSEN, H. B.; OLSEN, K. E. P.; STRUVE, C.; KROGFELT, K. A.; PETERSEN, A. M. Epidemiology and Clinical manifestations of Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, p. 614-630, 2014.

JONES, C. M.; ROTHEMEL, A. T.; MACKAY, D. R. Evidence-Based Medicine: Wound Management. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 140, p. 201e-216e, 2017.

KHIL, M. S.; BHATTARAI, S. R.; KIM, H. Y.; KIM, S. Z.; LEE, K. H. Novel fabricated matrix via electrospinning for tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research B-Applied Biomaterials**, v. 72, p 117–24, 2005.

KIM, P. J.; STEINBERG, J. S. Wound care: biofilm and its impact on the latest treatment modalities for ulcerations of the diabetic foot. **Seminars in Vascular Surgery**, v. 25, p. 70-74, 2012.

KIRKETERP-MØLLER, K.; ZULKOWSKI, K.; JAMES, G. Chronic wound colonization, infection, and biofilms. **Biofilm Infections**, cap. 2, p. 2-24. 2011.

KUMAR, P. M.; BADRINARAYANAN, S.; SASTRY, M. Nanocrystalline TiO₂ studied by optical, FTIR and X-ray photoelectron spectroscopy: correlation to presence of surface states. **Thin solid films**, v. 358, p.122-30, 2000.

KWANKHAO, B. **Microfiltration membranes via electrospinning of polyethersulfone solutions**. 2013. 111 f. Thesis (Dr. Rer. Nat.) - Department of Chemistry of University of Duisburg, Essen, 2013.

KYAW, B. M.; JÄRBRINK, K.; MARTINENGO, L.; CAR, J.; HARDING, K.; SCHMIDTCHEN, A. Need for improved definition of “Chronic Wounds” in clinical studies. **Acta Dermato-Venereologica**, v.98, p.157-158, 2017.

LANGER, R.; VACANTI, J. Tissue engineering. **Science**. v. 260, p. 920–6, 1993.

LEBEAUX, D.; GHIGO, J. M.; BELOIN, C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, p. 510-543, 2014.

LI, W. J.; LAURENCIN, C. T.; CATERSON, E. J.; TUAN, R. S.; KO, F. K. Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 60, p 613–21, 2002.

ZUWEI, MA.; MASAYA, K.; RYUJI, I.; SEERAM, R. Potential of Nanofiber Matrix as Tissue-Engineering Scaffolds. **Tissue Engineering**, v. 11, p. 101-9, 2005.

MISIC, A. M.; GARDNER, S. E.; GRICE, E. A. The wound microbiome: modern approaches to examining the role of microorganisms in impaired chronic wound healing. **Advances in Wound Care**, v. 3, p. 502-510, 2014.

MONROE, D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. **Plos biology**, v. 5, p. 307-315, 2007.

MORRO, A.; CATALINA, F.; PABLOS, J. L.; CORRALES, T.; MARIN, I.; ABRUSCI, C. Surface modification of poly (ϵ -caprolactone) by oxygen plasma for antibacterial applications. Biocompatibility and monitoring of live cells. **European Polymer Journal**, v. 94, p. 405-16, 2017.

NICHOL, J. W., KOSHY, S. T., BAE, H., HWANG, C. M., YAMANLAR, S. Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. **Biomaterials**, v. 31, p. 5536-5544, 2010.

OTTO, M. Staphylococcus epidermidis--the 'accidental' pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v.7, p. 555-567, 2009.

PATERNO, L. G; MATTOSO, L. H. C; OLIVEIRA, J. R. O. N. Filmes poliméricos ultrafinos produzidos pela técnica de automontagem: preparação, propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 24, p. 228-235, 2001 .

PRAMANIK, S.; PINGGUAN-MURPHY, B.; ABU, O. N. A. Progress of key strategies in development of electrospun scaffolds: bone tissue. **Science and technology of advanced materials**, v. 13, p. 043002, 2012.

RHOADS, D. D.; WOLCOTT, R. D.; PERCIVAL, S. L. Biofilms in Wounds: management strategies. **Journal in Wound Care**, v. 17, p. 502-8. 2008.

RUEDINGER, F.; LAVRENTIEVA, A.; BLUME, C.; PEPELANOVA, I.; SCHEPER, T. Hydrogels for 3D mammalian cell culture: A starting guide for laboratory practice. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 623–636, 2015.

SAŞMAZEL, H. T.; GÜMÜŞDERELIOĞLU, M.; GÜRPINAR, A.; ONUR, M. A. Comparison of cellular proliferation on dense and porous PCL scaffolds. **Bio-medical materials and engineering**, v. 18, p. 119-128, 2008.

SHABAN, S. M.; SAIED, A.; TAWFIK, S. M.; ABD-ELAAL, A.; AIAD, I. Corrosion inhibition and some cationic surfactants based on Schiff base. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 19, p. 2004–2009, 2013.

SHU, X. Z.; LIU, Y.; PALUMBO, F.; PRESTWICH, G. D. Disulfide-crosslinked hyaluronan-gelatin hydrogel films: a covalent mimic of the extracellular matrix for in vitro cell growth. **Biomaterials**, v. 24, p. 3825-3834, 2003.

SMITH, L. A.; MA, P. X. Nanofibrous scaffolds for tissue engineering. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 39, p. 125–31, 2004.

SOTO, S. M. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. **Virulence**, v. 4, p. 223-229, 2013.

STEINBERG, J. The chronic wound and the role of biofilm. In: podiatry. **Journal of Aging and Innovation**, p. 181 -190, 2011.

TADROS, T. F. **Applied surfactants principles and applications**. WILLEY –VCH VERTAG GMBH & Co KGA WINHEIM, 2005.

- VAN HOUTT, R.; AERTSEN, A.; JANSEN, A.; QUINTANA, A. L.; MICHIELS, C. W. Biofilm formation and cell-to-cell signalling in Gram-negative bacteria isolated from a food processing environment. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 177-184, 2004.
- VEIGA, A. S; SCHNEIDER, J. P. Antimicrobial hydrogels for the treatment of infection. **Biopolymers**, v. 100, p. 637-44, 2013.
- VELEIRINHO, B.; REI, M. F.; LOPES-DA-SILVA; J. A. Solvent and concentration effects on the properties of electrospun poly (ethylene terephthalate) nanofiber mats. **Journal of Polymer Science Part B – Polymer Physics**, v. 46, p. 460 – 471, 2008.
- VENTURELLI, R. B; GRIPA, S. Eletrofição: uma alternativa para a produção de não tecidos. **Revista da UNIFEBE**, v. 1, p. 150-165, 2017.
- WIDGEROW, A. D. Persistence of the chronic wound – implicating biofilm. **Wound Healing Southern Africa**, v. 1, p. 5-7, 2008.
- WILLIAMS, J. M.; ADEWUNMI, A.; SCHEK, R. M.; FLANAGAN, C. L.; KREBSBACH, P. H.; FEINBERG, S. E.; HOLLISTER, S. J.; DAS, S. Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering. **Biomaterials**, v. 26, p. 4817-4827, 2005.
- YOSHIMOTO, H.; SHIN, Y. M.; TERAJ, H.; VACANTI, J. P. A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 24, p. 2077- 2082, 2003.
- ZHOU, M.; LEE, B. H.; TAN, L. A dual crosslinking strategy to tailor rheological properties of gelatin methacryloyl. **International Journal of Bioprinting**, v.3, p. 34, 2017.
- ZHU, J. Bioactive modification of poly (ethylene glycol) hydrogels for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 31, p. 4639–56, 2010.
- ZUPANČIČ, Š.; PREEM, L.; KRISTL, J., PUTRINŠ, M.; TENSION, T.; KOCBEK, P.; KOGERMANN, K. Impact of PCL nanofiber mat structural properties on hydrophilic drug release and antibacterial activity on periodontal pathogens. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 122, p. 347–58, 2018.