



ROSEMEIRE DOS SANTOS ALMEIDA

**Eletrofição em Corrente Alternada / Corrente  
Contínua de Nanocompósitos de Poli(caprolactona)  
com Óxido de Grafeno e Nanotubos de Carbono  
Visando Aplicações como Biomateriais**

*Campinas – SP*

*Fevereiro, 2014*



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA

ROSEMEIRE DOS SANTOS ALMEIDA

**Eletrofiação em Corrente Alternada / Corrente  
Contínua de Nanocompósitos de Poli(caprolactona)  
com Óxido de Grafeno e Nanotubos de Carbono  
Visando Aplicações como Biomateriais**

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutora em Engenharia Mecânica, na Área de Materiais e Processos de Fabricação.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Akira d'Ávila.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO  
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA  
ROSEMEIRE DOS SANTOS ALMEIDA, ORIENTADA  
PELO PROF. DR. MARCOS AKIRA D'ÁVILA.

A handwritten signature in blue ink, reading "Marcos Akira d'Ávila", is written over a horizontal line.

ASSINATURA DO ORIENTADOR.

*Campinas – SP  
Fevereiro, 2014*

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura  
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

AL64e Almeida, Rosemeire dos Santos, 1974-  
Eletrofição em corrente alternada / corrente contínua de nanocompósitos de poli( $\epsilon$ -caprolactona) com óxido de grafeno e nanotubos de carbono visando aplicações como biomateriais / Rosemeire dos Santos Almeida. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Marcos Akira D' Ávila.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica.

1. Poli( $\epsilon$ -caprolactona). 2. Nanocompósito poliméricos. 3. Eletrofição. 4. Nanotubo de carbono. 5. Grafeno. I. D' Ávila, Marcos Akira, 1972-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Mecânica. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Electrospinning for alternating current / direct current of nanocomposites of poly ( $\epsilon$ -caprolactone) with graphene oxide and carbon nanotubes aiming applications as biomaterials

**Palavras-chave em inglês:**

Poly( $\epsilon$ -caprolactone)  
Polymeric nanocomposites  
Electrospinning  
Carbon nanotube  
Graphene

**Área de concentração:** Materiais e Processos de Fabricação

**Titulação:** Doutora em Engenharia Mecânica

**Banca examinadora:**

Marcos Akira D' Ávila [Orientador]  
Guilherme Mariz de Oliveira Barra  
Fernando Jorge Mendes Monteiro  
Diego Stéfani Teodoro Martinez  
Cecilia Amelia de Carvalho Zavaglia

**Data de defesa:** 21-02-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Engenharia Mecânica

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA  
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA  
DEPARTAMENTO DE MATERIAIS

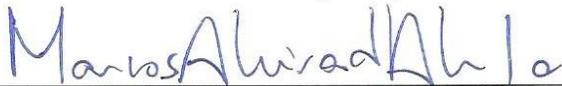
TESE DE DOUTORADO

**Eletrofiação em Corrente Alternada / Corrente  
Contínua de Nanocompósitos de Poli(caprolactona)  
com Óxido de Grafeno e Nanotubos de Carbono  
Visando Aplicações como Biomateriais**

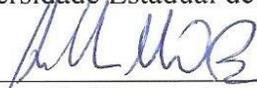
Autora: Rosemeire dos Santos Almeida.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Akira d'Ávila.

A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Tese:



Prof. Dr. Marcos Akira d'Ávila, Presidente  
Universidade Estadual de Campinas.



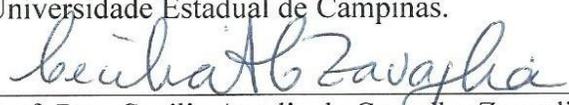
Prof. Dr. Guilherme Mariz de Oliveira Barra  
Universidade Federal de Santa Catarina .



Prof. Dr. Fernando Jorge Mendes Monteiro  
Universidade do Porto



Prof. Dr. Diego Stéfani Teodoro Martinez  
Universidade Estadual de Campinas.



Prof. Dra. Cecilia Amelia de Carvalho Zavaglia  
Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 21 de Fevereiro de 2014.

## Dedicatória

*À minha querida avó Senhorinha, mesmo com  
seus lapsos de memória jamais me esqueceu.*

*Com todo meu amor.*

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus por sua bondade pela oportunidade de me dedicar neste momento a um projeto de vida que sempre sonhei, por abençoar sempre minha vida, concedendo-me mais uma vitória.

Aos meus pais José Rodrigues e Carolina dos Santos que apesar de todas as dificuldades sempre me apoiaram, mostrando o caminho real do amor, responsabilidade e dedicação.

À minha mãe agradeço por todo seu amor, pois mesmo com a distância me fez sentir sua presença e todos os seus cuidados.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcos Akira d'Ávila pela orientação, humildade, oportunidade, por ter tornado meu sonho realidade, ter depositado em mim confiança para execução do presente trabalho, pelo seu otimismo, ensinamentos transmitidos, pela paciência e pelo apoio sempre atuante no desenvolvimento deste trabalho, dedicação incansável, por sua grande competência como professor, orientador e pesquisador que me servem de exemplo e estímulo. Sempre mais que um orientador um grande amigo nos momentos mais difíceis que com certeza fez todo o diferencial. Ao Senhor, muito obrigada!

À Claudinete Vieira Leal do Laboratório de Caracterização de Materiais da FEM, pela ajuda técnica e científica prestada, sempre atuante sem medir esforços, pela paciência, amizade, encorajamento durante todo tempo de preparação deste trabalho. A você muito obrigada!

Aos meus amigos do Laboratório de Biopolímeros e eletrofição Geraldine, Ana Flávia, Tais Salles, Rafaella Bicudo, Marcella, Paula Kaneco, Nicolao, João segundo, José Luiz, Josias, pela paciência, amizade, momentos de descontração, pela ajuda técnica, científica e com os experimentos, cada um colaborando com diferentes etapas ao longo deste trabalho. Em especial não poderia deixar de agradecer a Rafaella Bicudo, João Segundo e José Luiz, pela ajuda nos momentos mais críticos.

A todas as Pessoas dos Laboratórios, Empresas, Instituições, Órgãos de Fomentos que de forma valiosa e fundamental, contribuíram para execução nas diversas etapas deste trabalho de forma direta ou indireta, os meus sinceros agradecimentos.

Á Profa Dra. Cecilia Amelia Zavaglia, pelo apoio na busca de uma oportunidade para meu crescimento acadêmico e os momentos de descontrações.

Ao Prof. Dr. Fernando Jorge Monteiro, Dra. Maria Helena Fernandez, parceria fundamental nos testes in vitro, os ensinamentos transmitidos o carinho e a excepcional recepção, a qual me foi dada em seus Laboratórios na Universidade do Porto.

Á Profa Dra. Carmen Dias, pelos ensinamentos transmitidos e o carinho sempre atuante. O meu muito Obrigado!

Um agradecimento muito especial a algumas pessoas que sem elas digo que este projeto não sairia: Professor de físico Luiz Antônio Feijó Junior, Sr. Lucas Guedes Leão, Sr. João Polis, Prof. Dr. Guilherme M. O. Barra, Pesquisador Dr. Diego Stéfani Teodoro Martinez, Pesquisador Dr. Helder Ceragioli, A todos vocês o muito obrigada!

Ao Thiago Ito e o Rafael Ungrato pela dedicação, paciência, disposição e pela ajuda técnica prestada durante uso de equipamentos do Laboratório do Instituto de Química da Unicamp. A vocês muito obrigada!

Agradeço à Sabina da Memória, Aline Coretha, Guinéa Cardoso, Lonetá Lima, Ricardo Cecci, Patricia Nakagome, pela ajuda já na reta final deste trabalho, mas que fez toda a diferença para o pronto atendimento. Muito obrigada!

Agradeço aos meus colegas e amigos que sempre estão de pronto atendimento para qualquer desespero, caso citasse nomes poderia esquecer alguém, o que seria injusto, às novas amizades que aqui fiz na Unicamp e às que fiz durante minha estadia na Universidade do Porto no Instituto de Engenharia Biomédica. Em especial a Pesquisadora Liliane Grenho, pela ajuda técnica e

científica prestada, pelo carinho, atenção e momentos inesquecíveis de descontrações. Espero um dia poder retribuir um pouco deste carinho a todos.

Aos membros da banca por aceitarem o convite para participação e pelas contribuições fornecidas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica da Unicamp pela oportunidade do doutorado. A todo o corpo técnico administrativo da Pós-graduação da FEM por estarem sempre prontos a ajudar. A vocês o meu agradecimento especial.

A todos os Funcionários do Laboratório de Sistemas de informática SIFEM da FEM, pela paciência e disposição em ajudar. Á vocês muito obrigado!

A Maria José Rodrigues Garcia, Roberto Rodrigues e Marcela Garcia pelo, carinho dedicação e companheirismo inesquecível que me foi dado em todos os momentos. Sou eternamente grata.

Agradeço aos meus irmãos João Paulo, Rosangela, Henrique e Elianay e aqueles que são muito especiais para mim, Adriano Assis, Ana Cristina, Elisabeth, Hildo Sena, Ignácio Guillamon, Joana D'Arc, Lucineide Carvalho, Marilia Barbosa, Silvia Rosa, Xilô, pela paciência, pela amizade, compreensão e por acreditar que tudo daria certo e torcerem pelo meu sucesso. E não poderia esquecer o sorriso contagiante e abraços gostosos da minha linda sobrinha Maria Eduarda.

Ao CNPq, CAPES e ao Biofabris pelo apoio financeiro.

*“Quem tem amigo tem um tesouro, agradeço a Deus que em minha caminhada pude contemplar a dádiva de encontra-los.”*

## RESUMO

O polímero Poli(caprolactona) (PCL) tem sido amplamente usado como biomaterial nas últimas décadas. Sua biocompatibilidade e boas propriedades termo-mecânicas são as principais características que levam a seleção desse material para aplicação nas áreas biotecnológica, farmacêutica e têxtil. Neste trabalho, montou-se um equipamento para realizar o processamento de eletrofiação e caracterização de mantas formadas por fibras de PCL e nanocompósitos de PCL/nanotubos de carbono (NTC). Recorreu-se à eletrofiação com a aplicação de um campo elétrico gerado por uma corrente alternada (CA) e por uma corrente contínua (CC) simultaneamente (CA/CC) visando o controle da estabilidade do escoamento do jato polimérico durante o processamento a fim de determinar os parâmetros de processo e comparar os efeitos das diferentes frequências durante o processamento. Foram obtidos também nanocompósitos de PCL/óxido de grafeno (GO) com aplicação de um potencial elétrico em corrente contínua (CC), a fim de determinar os parâmetros de processos em diferentes concentrações de óxido de grafeno. As soluções/suspensões utilizadas no processo foram caracterizadas através de medições de condutividade elétrica, tensão superficial e propriedades reológicas. As fibras obtidas na forma de mantas porosas não-tecidos (*non woven*) foram caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTI-R), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Análise Termogravimétrica (TGA), Resistividade, Ângulo de contato, ensaios mecânicos de tração e ensaios biológicos *in vitro* com células tronco mesenquimais humanas (hMSCs) e células (MG63). Observou-se que o diâmetro médio das fibras depende da frequência CA aplicada durante a eletrofiação. A análise por FTI-R mostrou que houve a interação entre o PCL e o NTC, e as análises biológicas indicaram que as mantas de PCL/GO e PCL/NTC são promissoras para uso como biomaterial.

**Palavras-chave:** Poli(caprolactona); Nanocompósito; Eletrofiação; Nanotubo de Carbono; Óxido de grafeno

## ABSTRACT

Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) has been widely used as biomaterial in the last decades. Its biocompatibility and good thermomechanical properties are the main features that lead to the selection of this material for applications in biotechnological, pharmaceutical and textile areas. In this work, an equipment was set up to perform electrospinning; characterization of fibrous mats formed by pure PCL fibers and nanocomposites of PCL/carbon nanotubes (CNT). Electrospinning based on the application of an electric field generated by an alternating current (AC) and a direct current (DC) simultaneously (AC/DC) was performed aiming to control the stability of the jet flow of the polymer during processing in order to determine the process parameters and compare the effects of different frequencies during processing. Nanocomposites of PCL/graphene oxide (GO) with application of a DC electrical potential were also obtained in order to determine the process parameters at different concentrations of graphene oxide. Solutions/suspensions employed in the process were characterized by measurements of electrical conductivity, surface tension and rheological properties. The fibers obtained in the form of non-woven porous mats were characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), Differential scanning Calorimetry (DSC), Thermogravimetric Analysis (TGA), resistivity, contact angle and mechanical properties was measured, and in vitro biological assays with human mesenchymal stem cells (hMSCs) and (MG63) was evaluated. It was observed that the average diameter of the fibers depends on the AC frequency applied during electrospinning. The FT-IR analysis showed that there was interaction between the PCL and the CNTs, and biological analysis indicated that the mats of PCL/CNT and PCL/GO are promising for use as a biomaterial.

**Keywords:** Poly ( $\epsilon$ -caprolactone); Nanocomposite; Electrospinning; Carbon nanotube; Graphene oxides.

# CONTEÚDO

<b>CONTEÚDO.....</b>	<b>XIX</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>XXIII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>XXV</b>
<b>ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E NOMENCLATURAS.....</b>	<b>XXIX</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 OBJETIVOS .....	4
1.2 ESTRUTURA DO TRABALHO .....	6
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>7</b>
2.1 ELETROFIAÇÃO .....	7
2.2 FORMAÇÃO DAS FIBRAS POR ELETROFIAÇÃO .....	8
2.3 PARÂMETROS QUE INFLUÊNCIAM NA ELETROFIAÇÃO .....	11
2.3.1 Parâmetros da Solução .....	12
Concentração.....	12
Viscosidade .....	12
Tensão superficial .....	13
Condutividade elétrica.....	13
2.3.2 Parâmetros de Processo.....	13
Tensão Aplicada.....	13
Vazão.....	14
Distância do Alvo Coletor.....	14
2.3.3 Parâmetros do Ambiente .....	14
Umidade e Temperatura .....	14
2.4 ELETROFIAÇÃO POR CORRENTE ALTERNADA - (CA).....	15
2.5 BIOMATERIAIS.....	16
2.6 POLI(CAPROLACTONA) - (PCL).....	18

2.7	NANOTECNOLOGIA DE COMPÓSITOS .....	19
2.8	NANOTUBOS DE CARBONO - NTC .....	20
2.9	ÓXIDO DE GRAFENO - GO .....	21
2.10	CÉLULAS MESENQUIMAIS .....	22
<b>3.</b>	<b>MONTAGEM DO EQUIPAMENTO DE ELETROFIAÇÃO .....</b>	<b>25</b>
3.1	ESQUEMA DE LIGAÇÃO DO SISTEMA .....	28
3.2	TESTE PRELIMINAR .....	31
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
4.1	MATERIAIS .....	35
4.2	PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES.....	36
4.3	PROCESSO DE ELETROFIAÇÃO .....	37
4.3.1	Parâmetros de Processo para CA/CC .....	37
4.3.2	Parâmetros de Processo para CC.....	37
4.4	CARACTERIZAÇÕES .....	38
4.4.1	Caracterização das Soluções .....	38
	Tensão Superficial.....	38
	Condutividade Elétrica.....	38
	Propriedades reológicas.....	39
4.4.2	Caracterização das Fibras Eletrofiadas .....	39
	Morfologia das Fibras .....	39
	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i> .....	39
	<i>Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)</i> .....	39
4.4.3	Caracterização das Mantas Formadas Pelas Fibras.....	40
	Resistividade das Mantas .....	40
	Ângulo de Contato .....	40
4.4.4	Propriedades Térmicas .....	41
	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) .....	41
	Análise Termogravimétrica (TGA).....	41
4.4.5	Propriedades Químicas.....	42
	Espectroscopia de Absorção na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTI-R) .....	42

4.4.6	Propriedades Mecânicas .....	42
	Tração .....	42
4.4.7	Avaliação Biológica <i>In Vitro</i> das Mantas Eletrofiadas .....	43
	Mantas de PCL/NTC .....	43
	<i>Protocolo Experimental</i> .....	43
	<i>Atividade da Fosfatase Alcalina</i> .....	44
	Mantas de PCL/GO .....	44
	<i>Protocolo Experimental</i> .....	45
	<i>Microscopia Confocal</i> .....	45
	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i> .....	46
	<i>Conteúdo de ADN</i> .....	46
	<i>Atividade da Fosfatase Alcalina</i> .....	46
	<i>Expressão de Genes Osteoblásticos por RT-PCR</i> .....	47
	<i>Análise Estatística</i> .....	47
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES - NANOCOMPÓSITOS DE PCL/NTC.....</b>	<b>48</b>
5.1	ELETROFIAÇÃO DE CORRENTE CA/CC.....	48
5.1.1	Parâmetros Preliminares.....	48
5.1.2	Eletrofiação e obtenção das mantas de PCL e PCL/NTC .....	53
5.1.3	Caracterização por Espectroscopia de Absorção na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) .....	56
5.1.4	Propriedades Térmicas .....	58
	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) .....	58
	Análise Termogravimétrica (TGA).....	61
5.1.5	Caracterização Mecânica.....	63
	Tração.....	63
5.1.6	Resistividade .....	64
5.2	AVALIAÇÃO BIOLÓGICA IN VITRO DAS MANTAS ELETROFIADAS DE PCL/NTC.....	65
	Atividade de Fosfatase Alcalina .....	66
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES – NANOCOMPÓSITOS DE PCL/GO .....</b>	<b>67</b>
6.1	CARACTERIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE PCL/GO.....	67

6.2	ELETROFIAÇÃO E OBTENÇÃO DAS MANTAS DE PCL/GO POR APLICAÇÃO DE POTENCIAL CC	70
6.3	INTERAÇÃO ENTRE PCL E GO .....	72
6.4	CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES TÉRMICAS .....	73
	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) .....	73
	Análise Termogravimétrica (TGA) .....	76
6.5	CARACTERIZAÇÃO MECÂNICA .....	78
	Tração .....	78
6.6	AVALIAÇÃO BIOLÓGICA IN VITRO DAS MANTAS ELETROFIADAS DE PCL/GO .....	80
	Adesão Celular .....	80
	Proliferação Celular .....	81
	ADN Total .....	83
	Atividade de Fosfatase Alcalina .....	84
	Expressão de Genes Osteoblásticos .....	85
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>87</b>
7.1	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	89
<b>8.</b>	<b>REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>90</b>
<b>ANEXO -1</b>	<b>.....</b>	<b>100</b>
<b>ANEXO -2</b>	<b>.....</b>	<b>102</b>

## LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1: CONDIÇÕES DE PROCESSAMENTO PARA OBTENÇÃO DAS FIBRAS. ....	31
TABELA 4.1: SOLUÇÕES PREPARADAS PARA PCL PURO E PCL/NTC.....	36
TABELA 4.2: SOLUÇÕES REALIZADAS PARA PCL/GO. ....	36
TABELA 4.4: CONDIÇÕES DE PROCESSAMENTO DE OBTENÇÃO DAS FIBRAS. ....	38
TABELA 5.1: MÉDIA DAS MEDIDAS DE CONDUTIVIDADE ELÉTRICA, TENSÃO SUPERFICIAL E PH DAS SOLUÇÕES DE PCL E PCL/NTC 0,5%. ....	49
TABELA 5.1: DIÂMETROS MÉDIOS DAS FIBRAS FORMADAS PELAS FIBRAS ELETROFIADAS. ....	55
TABELA 5.3 – DADOS TERMOGRAVIMÉTRICOS OBTIDOS NAS CURVAS DE TGA DO PCL TAL COMO RECEBIDO E DAS MANTAS ELETROFIADAS DE PCL E PCL/NTC.....	62
TABELA 5.4: MÉDIA DOS VALORES OBTIDOS NAS ANÁLISE DAS PROPRIEDADES MECÂNICAS.....	63
TABELA 5.5: VALORES DE RESISTIVIDADE OBTIDOS PARA AS MANTAS DE PCL E PCL/NTC.....	64
TABELA 6.1: VALORES MÉDIOS DE CONDUTIVIDADE ELÉTRICA, TENSÃO SUPERFICIAL E PH DAS SOLUÇÕES DE PCL E PCL/GO.....	67
TABELA 6.2: DIÂMETROS MÉDIOS DAS FIBRAS E RESISTIVIDADE DAS MANTAS FORMADAS PELAS FIBRAS PCL/GO.....	70
TABELA 6.3: RESULTADOS OBTIDOS DE ÂNGULO DE CONTATO DAS MANTAS FORMADAS PELAS FIBRAS DE PCL/GO E PCL.....	71
TABELA 6.5 – DADOS TERMOGRAVIMÉTRICOS OBTIDOS NAS CURVAS DE TGA DAS MANTAS ELETROFIADAS DE PCL E PCL/GO. ....	77
TABELA 6.6: MÉDIA DOS VALORES OBTIDOS NAS ANÁLISE DAS PROPRIEDADES MECÂNICAS.....	79

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1: ZONA DO CONE DE TAYLOR MODIFICADO COM A ZONA DE TRANSIÇÃO, COMEÇO DO UM JATO FINO E UM JATO ELETRICAMENTE DIRIGITDO (HAN <i>ET AL.</i> , 2008).....	9
FIGURA 2.2: ILUSTRAÇÃO DO PROCESSO DE ELETROFIAÇÃO NA REGIÃO DE INSTABILIDADE DO JATO (FONTE: ADAPTADO: SARKAR <i>ET AL.</i> , 2009) E UM JATO MOSTRANDO A REGIÃO DE INSTABILIDADE (FONTE: XIE <i>ET AL.</i> , 2008).....	10
FIGURA 2.3: ILUSTRAÇÃO ELETRIFICADA DURANTE A ELETROFIAÇÃO CA/CC: ALTERNÂNCIA POSITIVA E NEGATIVA NAS REGIÕES DAS FIBRAS (ADAPTADO DE OCHANDA, <i>ET AL.</i> , 2011).....	15
FIGURA 2.4: ESTRUTURA QUÍMICA DO PCL (PARK, <i>ET AL.</i> , 2004). ....	19
FIGURA 3.1: ESQUEMA ILUSTRATIVO DA CAIXA DE ACRÍLICO .....	26
FIGURA 3.2: FOTO QUE COMPÕE O CONJUNTO DA FONTE DE ALTA TENSÃO: A) TRANSFORMADOR; B) CONTROLADOR DE FREQUÊNCIA; C) FONTE DE ALTA TENSÃO .....	26
FIGURA 3.3: FOTO DO: A) OSCILOSCÓPIO; B) PONTEIRA DE ALTA TENSÃO; C) MÚLTI-METRO .....	27
FIGURA 3.4: DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO CIRCUITO DA FONTE DE ALTA TENSÃO. ....	27
FIGURA 3.5: ESQUEMA DE LIGAÇÃO DO CIRCUITO. ....	29
FIGURA 3.6: DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO EQUIPAMENTO MONTADO. ....	30
FIGURA 3.7: MICROGRAFIAS DAS FIBRAS DE PVDF PROCESSADAS EM DUAS CONDIÇÕES DE PROCESSAMENTO: AMOSTRA (1A) PROCESSADO EM POTENCIAL CA/CC SIMULTANEAMENTE A 60HZ DE FREQUÊNCIA; (1B) AMPLIAÇÃO DA IMAGEM(1A); AMOSTRA (2A) PROCESSADO EM POTENCIAL CC; (2B) AMPLIAÇÃO DA IMAGEM(2A).....	32
FIGURA 3.8: FOTO DO EQUIPAMENTO MONTADO NO LABORATÓRIO DE BIOPOLÍMEROS E ELETROFIAÇÃO DA FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA DA UNICAMP.....	33
FIGURA 4.1: ESQUEMA DO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL. ....	34
TABELA 4.3: CONDIÇÕES DE PROCESSAMENTO DE OBTENÇÃO DAS FIBRAS EM CA/CC. ....	37
FIGURA 4.2: ENSAIO DE TRAÇÃO .....	43
FIGURA 5.1: MÓDULO DE ARMAZENAMENTO ( $G'$ ) E DE PERDA ( $G''$ ) DAS DIFERENTES SOLUÇÕES DE PCL E PCL/NTC.....	50

FIGURA 5.2: VISCOSIDADE EM FUNÇÃO DA TAXA DE CISALHAMENTO DAS SOLUÇÕES DE (A) PCL E (B) PCL/NTC.....	50
FIGURA 5.3: IMAGENS OBTIDAS POR MEV DAS FIBRAS DE PCL OBTIDAS POR ELETROFIAÇÃO APLICANDO POTENCIAL ELÉTRICO CA/CC SIMULTANEAMENTE, (A) 350 Hz, (B) 205 Hz, (C) 60 Hz, E (D) APLICANDO CORRENTE CONTINUA CC.....	53
FIGURA 5.4: IMAGENS OBTIDAS POR MEV DAS FIBRAS DO SISTEMA PCL/NTC ELETROFIADAS APLICANDO POTENCIAL ELÉTRICO CA/CC SIMULTANEAMENTE (A) 305 Hz, (B) 205Hz, (C) 60Hz E (D) APLICANDO CORRENTE CONTINUA (CC).....	54
FIGURA 5.5: FOTOGRAFIA DAS MANTAS OBTIDAS POR ELETROFIAÇÃO: A) PCL E B) PCL/NTC. ....	56
FIGURA 5.6: ESPECTROS DE FT-IR DO (A) PCL COMO RECEBIDO E DAS MANTAS PCL; B) MANTAS DE PCL/NTC. ....	57
FIGURA 5.7: CURVAS DE DSC PARA OS SISTEMAS PCL, PCL/NTC E PCL TAL COMO RECEBIDO DO FORNECEDOR.....	59
FIGURA 5.8: CURVAS DE TGA DO PCL EM GRANULO, DA MANTA ELETROFIADA DE PCL E PCL/NTC. ....	62
FIGURA 5.9: CURVA TRAÇÃO VERSUS DEFORMAÇÃO DAS MANTAS DE PCL E PCL/NTC. ....	63
FIGURA 5.10: VIABILIDADE/PROLIFERAÇÃO CELULAR EM OSTEOBLASTOS HUMANOS (MG63) CULTIVADAS NA SUPERFÍCIE DAS MANTAS DE PCL E PCL/NTC (OS VALORES SÃO A MÉDIA E DESVIO PADRÃO) .....	65
FIGURA 5.11: ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA (FA) DAS CULTURAS DE MG63 CULTIVADAS NA SUPERFÍCIE DAS MANTAS DE PCL E PCL/NTC.....	66
FIGURA 6.1: MÓDULO ELÁSTICO ( $G'$ ) E VISCOSO ( $G''$ ) DAS SOLUÇÕES DE PCL/GO NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES E PCL PURO. ....	68
FIGURA 6.2: VISCOSIDADE EM FUNÇÃO DA TAXA DE CISALHAMENTO DA SOLUÇÃO DE PCL E DAS SOLUÇÕES DE PCL/GO NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES. ....	69
FIGURA 6.3: IMAGENS DAS MANTAS DE PCL/GO OBTIDAS POR MEV A) 0,15%; B) 0,3%; C) 0,5% 70	
FIGURA 6.4: ESPECTROS DE FT-IR DAS MANTAS ELETROFIADAS DE PCL/GO, PCL, DO PCL COMO RECEBIDO E DO ÓXIDO DE GRAFENO (GO).....	72
FIGURA 6.5: MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DA MANTA DE PCL/GO 0,5%.....	73
FIGURA 6.6: CURVAS DE DSC DAS MANTAS ELETROFIADAS DE PCL E PCL/GO. ....	74
FIGURA 6.7: CURVAS DE TGA: PERDA MASSA DAS MANTAS ELETROFIADAS DE PCL E PCL/GO....	76

FIGURA 6.8: CURVAS DE TGA: PERDA DE MASSA COM PICO DE DECOMPOSIÇÃO DAS MANTAS DE PCL E PCL/GO.....	77
FIGURA 6.9: CURVA TRAÇÃO VERSUS DEFORMAÇÃO DAS MANTAS DE PCL E PCL/GO. ....	78
FIGURA 6.10: FOTOGRAFIAS DE MICROSCOPIA CONFOCAL DE CULTURAS COM 1 DIA DE CÉLULAS MESENQUIMIAIS HUMANAS CULTIVADAS NA SUPERFÍCIE DAS MANTAS DE PCL E PCL/GO, APÓS COLORAÇÃO DAS CÉLULAS PARA O CITOESQUELETO DE F-ACTINA (COLORAÇÃO VERDE) E NÚCLEO (COLORAÇÃO VERMELHA). ....	80
FIGURA 6.11: IMAGENS DE MEV DE CULTURAS COM 1 DIA DE CÉLULAS MESENQUIMIAIS HUMANAS CULTIVADAS NA SUPERFÍCIE DAS MANTAS DE PCL E PCL/GO.....	81
FIGURA 6.12: IMAGENS DE MEV DE CULTURAS COM 4, 7 E 14 DIAS DE CÉLULAS MESENQUIMIAIS HUMANAS CULTIVADAS NA SUPERFÍCIE DAS MANTAS DE PCL E PCL/GO (BARRA DE AMPLIAÇÃO:100 MM). ....	82
FIGURA 6.13: CONTEÚDO DE ADN DAS CULTURAS DE CÉLULAS MESENQUIMIAIS HUMANAS CULTIVADAS NA SUPERFÍCIE DAS MANTAS DE PCL E PCL/GO (0,15%; 0,3%; 0,5%). ....	84
FIGURA 6.14: ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA (FA) DAS CULTURAS DE CÉLULAS MESENQUIMIAIS HUMANAS CULTIVADAS NA SUPERFÍCIE DAS MANTAS DE PCL E PCL/GO (0,15%; 0,3%; 0,5%). ....	85
FIGURA 6.15: EXPRESSÃO DE GENES OSTEOBLÁSTICOS NAS CULTURAS DE CÉLULAS MESENQUIMIAIS HUMANAS CULTIVADAS NA SUPERFÍCIE DAS MANTAS DE PCL E PCL/GO: A) BANDAS REPRESENTATIVAS DOS GENES ANALISADOS, NO GEL DE AGAROSE; B) ANÁLISE SEMI-QUANTITATIVA DAS BANDAS. ....	86

## ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E NOMENCLATURAS

PCL	Poli(caprolactona)
PVDF	Poli(fluoreto de vinilideno)
$\mu$ L	microlitro
ADN	Ácido desoxirribonucleico
alfa -MEM	Meio de cultura celular MEM
ALP	Atividade de Fosfatase Alcalina
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
BMP	Proteínas morfo-genéticas
BMP-2	Proteínas morfo-genética óssea 2
CA	Corrente Alternada
Col-I	Colageno tipo I
CC	Corrente contínua
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DMF	N.N - Dimetilformamida
EHD	Eletrohidrodinâmico
FA	Fosfatase Alcalina
FBS	Soro fetal bovino
FT-IR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
G'	Módulo de armazenamento
G''	Módulo de perda
GAPDH	<i>Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase</i>
GO	Óxido de Grafeno
hMSCs	Células-tronco mesenquimais humanas .
Hz	Hertz
kV	Medida de Tensão Elétrica (1000 Volts)
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MG63	Linhagem celular osteoblasto de osteosarcoma humano
MSCs	Células-tronco mesenquimais humanas .
mL	mililitro
NTC	Nanotubo de carbono
MWNTs	<i>Multi-walled carbon nanotubes</i> (nanotubos de carbono de múltiplas camadas)
Nm	Nanômetro ( $10^{-9}$ metros)
NTCs	Nanotubos de carbono
OPG	Osteoprotegerina
OC	Osteocalcina
Pa.s	Pascal – Segundo
pH	(Potencial hidrogênico) = $-\log [H^+]$ . É o log negative de base 10 da concentração molar de íons hidrogênio ( $H^+$ )
RNA	Ácido ribonucleico
Runx-2	<i>Runt-related transcription fator 2</i>
Sol.	Solução
SWNTs	<i>Single-walled carbon nanotubes</i> (nanotubos de camada única)
Tc	Temperatura de cristalização
Tg	Temperatura de transição vítrea
TGA	Análise Termogravimétrica
Tm	Temperatura de fusão
Xc	Grau de cristalização
$\Delta H$	Entalpia
$\Delta H_C$	Entalpia de cristalização
$\Delta H_f$	Entalpia de cristalização
$\eta$	Viscosidade

# Capítulo 1

## 1. INTRODUÇÃO

*Neste capítulo será feita uma breve introdução ao processo de eletrofiação, apresentando suas principais características quanto aos parâmetros de processamento. Também serão expostos os objetivos deste trabalho.*

Eletrofiação é uma técnica de produção de fibras poliméricas que vem despertando interesse em diversas áreas tecnológicas devido à sua capacidade de produzir fibras na faixa submicrométrica e nanométrica. O processo consiste na aplicação de um forte campo elétrico em uma solução polimérica ou um polímero fundido o qual pode ser aplicado em uma variedade de polímeros, algo difícil de atingir utilizando outras técnicas de fiação. Além disso, é uma técnica relativamente robusta e simples, que permite o controle sobre a morfologia (Maheshwari e Chang 2009, Bhardwaj e Kundu, 2010; Leung e Ko, 2011). Uma desvantagem oferecida por esta técnica é seu baixo rendimento, que limita sua aplicação. No entanto, vários grupos de pesquisa têm desenvolvido sistemas de eletrofiação mais sofisticados para aumentar a taxa de produção de nanofibras (Bhardwaj e Kundu, 2010).

O sistema de eletrofiação consiste basicamente em uma bomba de infusão, uma fonte de alimentação de alta voltagem, uma seringa com a solução polimérica ou o polímero fundido, e um sistema coletor (Bhardwaj e Kundu, 2010). O coletor pode apresentar diversas formas como, por exemplo, uma chapa ou um cilindro, que são confeccionados de material condutor para que as cargas possam ser dissipadas, facilitando a deposição contínua das fibras. O tipo de coletor influencia a disposição das fibras na manta. Coletores mais simples como uma chapa metálica

produzem nanofibras com orientações aleatórias na manta. No entanto, estudos relatam que também é possível produzir nanofibras orientadas (Baji *et al.*, 2010).

O processo de eletrofiação em corrente alternada (CA) e corrente contínua (CC) simultaneamente pode ser utilizado para modular o padrão de escoamento do jato durante o processo de eletrofiação. No método, é empregada uma combinação de potências CA/CC, cuja relação entre as variáveis específicas do processo CA é a frequência e a magnitude de deslocamento CC o que possibilita um número maior de parâmetros para o controle do processo (Lee, Yoon e Kim, 2009). Nos últimos anos, alguns trabalhos sobre a aplicação de um campo elétrico alternado (CA) no processo de eletrofiação demonstraram novas estruturas de fibras (Lee, Yoon e Kim, 2009; Ochanda *et al.*, 2012; Sarkar, Deevi e Tepper, 2007). A aplicação de campos elétricos de corrente alternada (CA) pode favorecer a formação de fibras orientadas devido à supressão das instabilidades de escoamento do jato, o que denota a dependência da frequência alternada com os padrões de escoamento e, conseqüentemente, com as características finais da fibra formada (Lee, Yoon e Kim, 2009; Ochanda *et al.*, 2012; Sarkar, Deevi e Tepper, 2007; Ishii, Sakai e Murata, 2008).

As fibras formadas por essa técnica apresentam características únicas como alta área superficial e porosidade controlada, as quais são interessantes para diferentes aplicações. Na área biomédica, as nanofibras estão sendo desenvolvidas para utilização em diversas aplicações como, por exemplo, nanocompósitos, suportes para engenharia tecidual, curativos para feridas e sistemas de liberação de fármacos (Agarwal, Wendorff e Greiner, 2008; Xie, Li e Xia, 2008; Maheshwari e Chang, 2009). Outras áreas em destaque são a de biosensores, de suportes para imobilização de enzimas e de filtração (Bhardwaj e Kundu, 2010; Burger, Hsiao e Chu, 2006).

Tendo em vista o intenso desenvolvimento de novos materiais e processos para obtenção de estruturas aptas a substituir e regenerar tecidos e órgãos humanos, os *biomateriais* (todo material não vivo usado em dispositivos médicos para interação com o sistema) podem desempenhar um papel importante na saúde. Os biopolímeros são os principais tipos de biomateriais e podem, segundo suas propriedades de degradação, ser classificados em biodegradáveis e não biodegradáveis. (Ramos, 2011; Tian *et al.*, 2012).

Dentre os polímeros biocompatíveis, destaca-se a poli( $\epsilon$ -caprolactona) PCL, um polímero sintético hidrofóbico biodegradável, de taxa de degradação lenta (12 a 24 meses), que possui resistência à tração e módulo de elasticidade superiores à de outros biopolímeros, encontrando aplicações em sistemas de liberação controlada de fármacos, recobrimentos de cânulas uretrais e em engenharia tecidual de tecido epidérmico, muscular, ósseo e cartilaginoso (Sasmazel *et al.*, 2008; Schueren *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2013). A eletrofiação de polímeros biocompatíveis e reabsorvíveis faz com que essa técnica seja promissora para o desenvolvimento de fibras nanoestruturadas de nanocompósitos, como indicam artigos recentes publicados na literatura (Kim e Kim, 2011; Kumar *et al.*, 2012).

Atualmente, os nanotubos de carbono (NTCs) vêm despertando interesse por apresentarem diversas aplicações em tecnologias voltadas para área médica, eletrônica, agricultura e meio ambiente, devido à suas exclusivas propriedades físicas e versatilidade química (Martinez, 2011). Estudos também relatam a biocompatibilidade dos NTCs, onde sua presença pode proporcionar crescimento de células (Harrison e Atala, 2007). Um nanocompósito polimérico biocompatível reforçado com NTC pode, potencialmente, ser usado como uma nova geração de materiais para implantes, pois poderia estimular o crescimento celular e a regeneração do tecido pela facilidade da transferência de sinal fisiológico (Zang *et al.*, 2006).

Os óxidos de grafeno (GO) são materiais promissores que vem se destacando em diversas aplicações na área de biomateriais, tais como reforço em compósitos de matriz polimérica proporcionando o aumento das propriedades mecânicas e melhores propriedades elétricas e térmicas. Um nanocompósito polimérico biocompatível reforçado com GO pode apresentar potencial para terapias do câncer e para implantes. Estudos relatam propriedades antibacterianas, biocompatibilidade e biodegradabilidade do GO. (Dong e Chen, 2010; Potts *et al.*, 2011; Tapan e Smita, 2013).

O processo de eletrofiação permite produzir fibras de nanocompósitos para diferentes aplicações, possibilitando a incorporação de nanopartículas, como os nanotubos de carbono (NTC) e óxido de grafeno (GO) na solução polimérica (Costa *et al.*, 2012; Ramaswamy, Clarke e Gorga, 2011).

Células mesenquimais humanas (hMSCs) vêm despertando grande interesse devido ao seu potencial em medicina regenerativa. As hMSCs são células multipotentes com capacidade de diferenciação em várias linhagens celulares, de se auto-renovar e intrinsecamente reparar e regenerar tecidos danificados. Estudos reportam o potencial dos *scaffolds* eletrofiados para engenharia tecidual, que além de fornecerem suporte estrutural para cultura de células tronco, também fornecem sinais topográficos, influenciando na diferenciação celular, facilitada pela arquitetura nanoestruturada fornecida pelas fibras (Chew *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2010).

O processo de eletrofiação é promissor na engenharia tecidual, onde a dificuldade do controle da morfologia e propriedades de fibras obtidas por eletrofiação é um desafio ainda a ser superado (Szentivanyi *et al.*, 2006; Teo e Ramakrishama, 2006). Assim, neste trabalho foram obtidas fibras por eletrofiação de nanocompósitos de PCL/GO e PCL/NTC, aplicando campo elétrico alternado CA/CC e contínuo (CC). Para isso foi necessária a montagem do equipamento de eletrofiação. Foram estudados os efeitos do processo na formação das mantas de fibras, onde essas foram caracterizadas. A biocompatibilidade foi avaliada por testes *in vitro* utilizando hMSCs e MG63. Pelo conhecimento da autora, não há estudos publicados na literatura reportando a obtenção de mantas formadas por fibras eletrofiadas de nanocompósitos de PCL/GO e PCL/NTC pelo processo de eletrofiação, utilizando campo elétrico alternado CA/CC e a avaliação de sua aplicabilidade em hMSCs e MG63.

## 1.1 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi obter fibras de PCL e de nanocompósitos de PCL/NTC e PCL/GO por eletrofiação em corrente contínua e corrente alternada e avaliar a viabilidade desses como biomateriais.

Sendo assim, os seguintes objetivos específicos deste trabalho foram:

- Montagem de um equipamento de eletrofiação para corrente contínua (CC) e corrente alternada (CA) simultaneamente.

- Determinação de parâmetros de eletrofiação para CA/CC simultaneamente com intuito de avaliar o efeito do campo elétrico alternado na morfologia das fibras.
- Caracterização das soluções através de ensaios reológicos, medições de tensão superficial e condutividade elétrica para melhor compreensão dos parâmetros que favorecem processo de eletrofiação.
- Produção de mantas formadas por nanofibras de:
  - ✓ Policaprolactona – PCL;
  - ✓ Nanocompósitos de Policaprolactona / óxido de grafeno - (PCL / GO) e Policaprolactona / Nanotubo de carbono - (PCL/NTC);
- Caracterizações Térmicas por Análise de Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) e Análise Termogravimétrica (TGA) e Análises Químicas por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).
- Avaliação da biocompatibilidade das mantas de PCL, PCL/NTC e PCL/GO através dos seguintes ensaios *in vitro*:
  - ✓ Proliferação celular por Microscopia Confocal e Eletrônica de Varredura frente à cultura de células mesenquimais humanas.
  - ✓ Avaliação da atividade da fosfatase alcalina.
  - ✓ Avaliação/proliferação celular das mantas de PCL e PCL/NTC com células MG63.
  - ✓ Avaliação da influência das diferentes proporções de óxido de grafeno (0,15%; 0,3 % e 0,5%) no crescimento e proliferação de (hSCMs).

## 1.2 ESTRUTURA DO TRABALHO

Este trabalho está organizado em oito capítulos:

No capítulo 1 é abordado uma breve introdução ao processo de eletrofiação, suas principais características quanto aos parâmetros de processamento os materiais e os objetivos deste trabalho.

No capítulo 2, é apresentada uma revisão da literatura sobre a temática aqui discutida, com a necessária fundamentação teórica sobre o processo de eletrofiação, biomateriais, nanofibras, nanocompositos, poli(caprolactona) e suas aplicações.

No capítulo 3, apresenta-se de forma detalhada a fase que compõe a montagem do equipamento de eletrofiação CA/CC e teste preliminares.

No capítulo 4, apresenta-se de forma detalhada a fase experimental que compõe esta pesquisa, após a montagem do equipamento de eletrofiação.

No capítulo 5, estão apresentados os resultados obtidos do sistema PCL/NTC, bem como a análise e discussão dos mesmos.

No capítulo 6, estão apresentados os resultados obtidos do sistema PCL/GO, bem como a análise e discussão dos mesmos.

No capítulo 7, apresentam-se as conclusões do trabalho e as sugestões para trabalhos futuros.

No capítulo 8, apresentam-se as referencias bibliográficas.

# Capítulo 2

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

*Este capítulo apresenta uma revisão da literatura sobre o tema deste trabalho.*

### 2.1 ELETROFIAÇÃO

O processo de eletrofiação foi inicialmente patenteado por J. F. Cooley e W. J. Morton (1902). Nesta patente, foi proposto o método baseado em fontes de alta tensão para produzir filamentos, o qual originou o primeiro processo conhecido como *electrospinning*. Essa técnica permitiu a formação de fibras e indicava que para se obter sucesso nesse processo, três fatores fortemente relevantes deveriam ser cumpridos: i) viscosidade do fluido, ii) escolha de solventes suficientemente voláteis, iii) a intensidade do campo elétrico ideal.

Em geral, o sistema de deposição para eletrofiação consiste em três componentes básicos: uma fonte de alta tensão em corrente contínua (CC) ligada eletricamente a um fluido (solução polimérica), um coletor alvo (ao qual podem ser adicionados substratos) e um dispositivo de infusão (“bomba”) para realizar a injeção do fluido. Para uma eletrofiação bem sucedida, devem ser ajustados diversos parâmetros, tanto de processo quanto de solução. Os principais parâmetros de processo são: vazão, distância do alvo coletor, voltagem aplicada e diâmetro da agulha. Dentre os parâmetros de solução, os principais são tipo de polímero, a concentração e o solvente, que por sua vez determinam as propriedades físicas da solução como viscosidade, tensão superficial,

condutividade elétrica e outras propriedades reológicas do fluido (Teo e Ramakrishna, 2006; Bhardwaj e Kundu 2010).

Nesta técnica, o polímero, solubilizado em algum solvente ou no estado fundido, é introduzido em um tubo capilar. Inicialmente, o fluido polimérico é mantido pela sua tensão superficial na forma de uma gota na extremidade do capilar. Um campo elétrico é aplicado entre o capilar e o coletor, e uma carga elétrica é induzida sobre a superfície do líquido. Com o aumento da tensão elétrica, a superfície da gota se alonga para formar um cone, conhecido como cone de Taylor (Bhardwaj e Kundu, 2010).

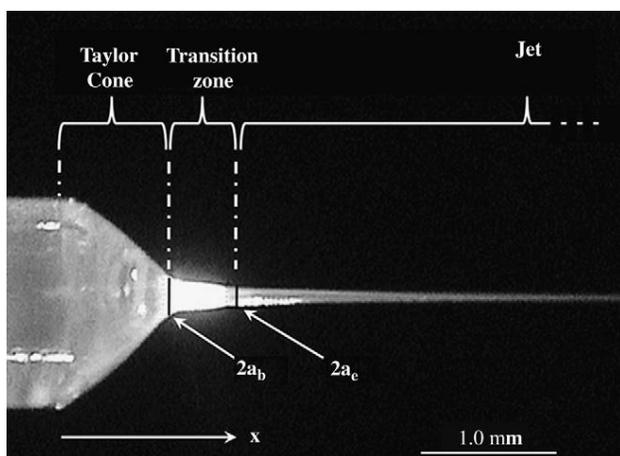
Apesar desta, ser a forma mais conhecida, há trabalhos que mostraram que o cone de Taylor não representa uma forma crítica única, podendo existir outras formas (Reneker *et al.*, 2007). Quando o campo elétrico aplicado atinge um valor crítico, as forças elétricas repulsivas superam as forças da tensão superficial e um jato eletricamente carregado é ejetado da extremidade do capilar. Durante a trajetória do jato, o solvente evapora e o polímero se solidifica, formando fibras que se depositam sobre o coletor metálico (Li e Xia, 2004; Bhardwaj e Kundu, 2010).

## **2.2 FORMAÇÃO DAS FIBRAS POR ELETROFIAÇÃO**

O processo de formação de fibras por eletrofiação pode ser dividido em cinco etapas: carregamento do fluido, formação do cone, afinamento do jato, instabilidade do jato e coleta da fibra (Rutledge e Fridrikh, 2007).

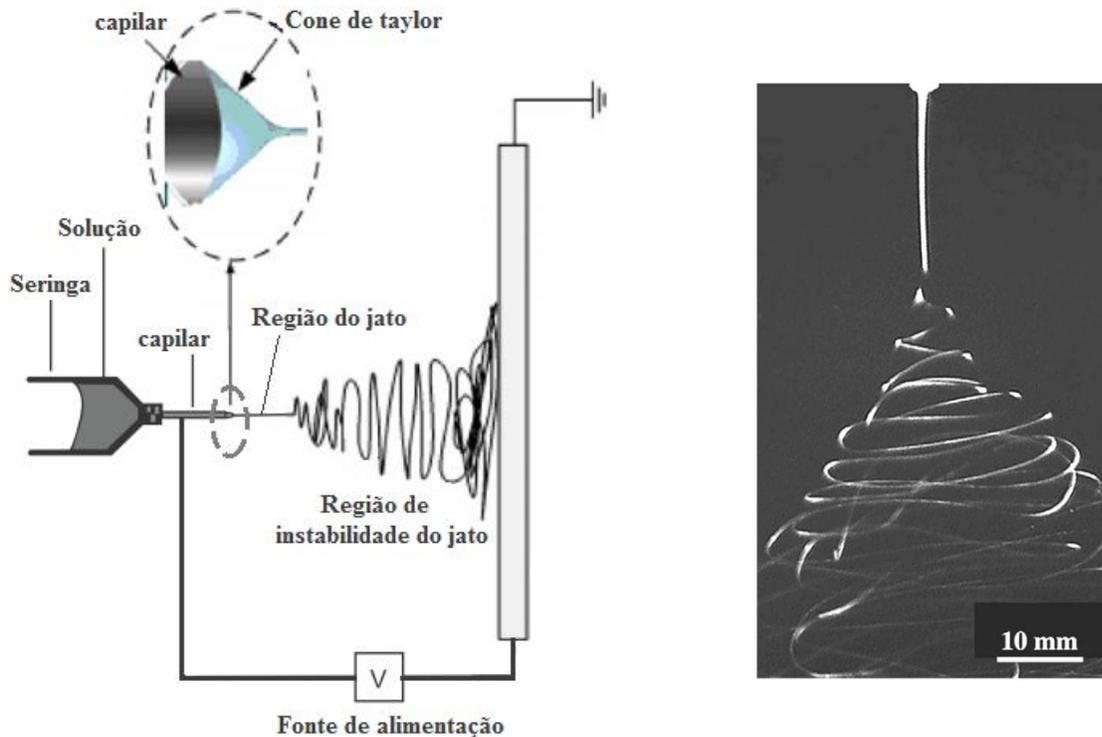
A forma do cone de Taylor é modificada pelo fluxo da solução e pela carga elétrica quando se inicia a formação do jato. Podem-se definir três regiões distintas próximas do início do jato: cone de Taylor, zona de transição e jato fino conforme ilustrado na **Figura 2.1**.

Quando o jato é eletricamente acionado, a solução sofre significativos alongamentos na zona de transição, entre o cone de Taylor modificado, onde a tensão é pequena, e o início da zona de jato fino, onde o líquido já pode ser significativamente pré-esticado. Como resultado deste pré-estiramento, o jato eletricamente carregado pode possuir uma tensão inicial significativa na seção transversal de diâmetro  $2a_e$  (**Figura 2.1**), o qual pode afetar sua evolução posterior. Portanto, os jatos podem ser submetidos a significativas tensões longitudinais na zona de transição. Na eletrofiação de soluções poliméricas viscoelásticas, o comprimento inicial do filamento inicial do jato eletrificado é determinado pelo nível de tensão viscoelástica longitudinal e por forças elétricas (Han, Yarin e Reneker, 2008).



**Figura 2.1:** Zona do cone de Taylor modificado com a zona de transição, começo do um jato fino e um jato eletricamente dirigido (Han *et al.*, 2008)

O alongamento do jato ocorre devido à força eletrostática, ou seja, quando as cargas livres se movem dentro do fluido em resposta ao campo elétrico aplicado, elas rapidamente transferem uma força para o fluido polimérico. Com o alongamento, o diâmetro do jato é reduzido, o que causa acúmulo de carga sobre a fibra, gerando uma região de instabilidade devido à repulsão entre as cargas. A **Figura 2.2** ilustra um processo de eletrofiação na região de instabilidade do jato e uma Figura de um jato típico capturado com uma câmera de alta velocidade mostrando a região de instabilidade (Han, Yarin e Reneker, 2008; Xie *et al.*, 2008; Sarkar *et al.*, 2009).



**Figura 2.2:** Ilustração do processo de eletrofição na região de instabilidade do jato (Fonte: Adaptado: Sarkar *et al.*, 2009) e um jato mostrando a região de instabilidade (Fonte: Xie *et al.*, 2008)

Quando aplicado um campo elétrico suficiente na ponta de um capilar, a gota formada é transformada no cone de Taylor. Neste cone há um balanço de forças, tais como, i) força gravitacional e a ii) tensão aplicada pelo campo elétrico as quais tendem a alongar a gota, auxiliadas pela tensão elétrica tangencial presente na superfície do fluido, enquanto a viscosidade desacelera a formação do cone; iii) a tensão superficial, que tenta minimizar a área superficial da gota puxando a superfície para dentro; iv) uma força oposta a tensão elétrica normal, tenta maximizar a distância entre as cargas da superfície, ampliando a área superficial (Sigmund *et al.*, 2006).

Além de fibras, é possível encontrar gotas (*beads*) dependendo das condições experimentais, as quais são resultado da atuação da tensão superficial que favorece formas esféricas com menor área superficial por massa (Reneker e Yarin, 2008). De fato, sabe-se que a condição para a formação de fibra a partir de uma solução polimérica depende da capacidade

desta em formar jatos suficientemente estáveis de modo que os filamentos não quebrem antes que as fibras se formem. No entanto, ainda permanece a questão em relação aos mecanismos precisos que são responsáveis pela estabilidade de um jato (Chen, 2011).

Quando as forças eletrostáticas repulsivas superam a tensão superficial (que tenta manter a gota intacta) um jato fino carregado é ejetado e se move em direção ao coletor. Esta transição eletrohidrodinâmica cone - jato é um fenômeno único, que permite a produção de um jato fino fluido a partir de uma agulha com diâmetro muito maior. A estabilidade dessa transição é de grande importância para as aplicações práticas. (Regev *et al.*, 2010; Chen, 2011). Entretanto, é necessária uma viscosidade extensional suficientemente elevada durante todo o processo de afinamento a fim de evitar o rompimento do filamento em gotas, essa viscosidade extensional pode ter diversas fontes, como a viscosidade do solvente, uma contribuição elástica do polímero dissolvido no jato, ou uma estrutura anisotrópica na qual se desenvolve no jato, dando origem a um espessamento na extensão (Regev *et al.*, 2010).

## **2.3 PARAMETROS QUE INFLUÊNCIAM NA ELETROFIAÇÃO**

Estudos relatam que o sucesso desse processo de eletrofiação exige parâmetros que influenciam diretamente na morfologia das fibras produzidas, e podem ser dividido em três classes ( Teo e Ramakrishana, 2006; Bhardwaj e Kundu, 2010):

### **➤ Parâmetros da solução:**

- ✓ Concentração de polímero na solução;
- ✓ Viscosidade;
- ✓ Tensão superficial;
- ✓ Condutividade elétrica;

- **Parâmetros de processamento:**
  - ✓ Tensão aplicada;
  - ✓ Vazão da solução;
  - ✓ Distância do capilar ao coletor;
  
- **Parâmetros de ambiente:**
  - ✓ Umidade e temperatura;

### **2.3.1 Parâmetros da Solução**

#### ***Concentração***

A concentração da solução está relacionada aos limites de formação da fibra devido à variação na viscosidade e tensão superficial da solução. Por sua vez, a concentração crítica é a concentração mínima para formação de fibras, suficiente para criar emaranhamentos entre as cadeias poliméricas. Abaixo da concentração crítica, ocorre a formação de gotas, e acima dela, a alta viscosidade pode restringir a movimentação das cadeias. (Bhardwaj e Kundu, 2010; Qin e Wu, 2012).

#### ***Viscosidade***

A viscosidade está relacionada à extensão do emaranhamento das cadeias poliméricas com a solução. A produção de nanofibras requer uma viscosidade adequada, pois soluções com baixa viscosidade não apresentam emaranhamentos suficientes para formação de fibras e sim de gotas. Soluções altamente viscosas impedem a processabilidade, pois a formação do jato é dificultada. A viscosidade é um dos parâmetros mais importantes no processo de eletrofiação, que por sua vez depende do peso molecular do polímero, da concentração e do solvente da solução (Bhardwaj e Kundu, 2010; Qin e Wu, 2012).

### ***Tensão superficial***

A tensão superficial é uma força contrária ao estiramento do jato da solução polimérica. Uma baixa tensão superficial da solução permite que a eletrofição ocorra com um campo elétrico mais baixo, uma vez que a força necessária para superar a barreira imposta pela mesma é menor. Já uma alta tensão superficial da solução geralmente inibe o processo de eletrofição, pois causa instabilidade nos jatos e gera gotas pulverizadas. Em geral a redução da tensão superficial leva à obtenção de fibras mais uniformes. (Bhardwaj e Kundu, 2010).

### ***Condutividade elétrica***

A condutividade elétrica de uma solução é determinada principalmente pelo tipo de polímero, pelo solvente usado e pela presença de espécies iônicas. Uma baixa condutividade da solução resulta em alongamento insuficiente do jato para produzir fibras uniformes e, portanto, gotas podem também ser observadas. (Bhardwaj e Kundu, 2010). Além de aumentar a uniformidade das fibras por reduzir a geração de gotas, o aumento da condutividade da solução também leva, aparentemente, a uma diminuição significativa no diâmetro das fibras eletrofiadas (Bhardwaj e Kundu, 2010), o que pode ser explicado pelo maior estiramento sofrido pela solução em virtude da maior mobilidade das cargas elétricas.

## **2.3.2 Parâmetros de Processo**

### ***Tensão Aplicada***

Existe uma voltagem mínima a partir da qual a formação de fibras começa a ocorrer, ou seja, uma voltagem capaz de induzir as cargas necessárias sobre a solução para que as forças de repulsão eletrostáticas superem a tensão superficial (Bhardwaj e Kundu, 2010).

Yijun e colaboradores (2012) observaram uma diminuição do diâmetro da fibra polimérica com o aumento da voltagem aplicada. Esse efeito na redução do diâmetro das fibras pode ser explicado pelo fato de o aumento da voltagem causar um aumento na aceleração do jato, resultando em um maior estiramento da solução.

### ***Vazão***

Trata-se do parâmetro que determina a velocidade de ejeção da solução e a taxa de transferência de massa. A vazão utilizada deve permitir um fluxo contínuo de solução para que o solvente tenha tempo suficiente para evaporar. Em geral, uma baixa vazão é mais desejável, uma vez que possibilita mais tempo para a evaporação do solvente (Bhardwaj e Kundu, 2010).

### ***Distância do Alvo Coletor***

É necessária uma distância mínima entre a extremidade do capilar e o coletor para que ocorra a evaporação do solvente para secagem das fibras antes de alcançarem o coletor (Bhardwaj e Kundu, 2010). A distância de trabalho está diretamente relacionada à intensidade do campo elétrico. O aumento na distância de trabalho causa uma diminuição no campo elétrico resultando em uma menor aceleração do jato. Além disso, as fibras sofrem menor estiramento, o que pode levar a um aumento no diâmetro. Quando aumenta o campo elétrico, o jato é estirado rapidamente, o que pode levar à quebra das fibras.

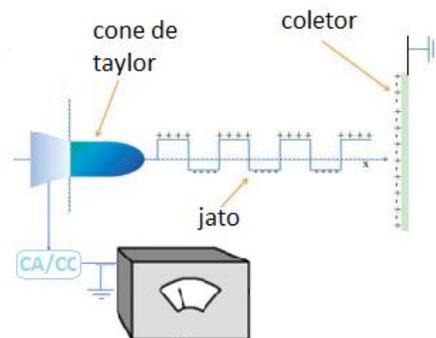
## **2.3.3 Parâmetros do Ambiente**

### ***Umidade e Temperatura***

A temperatura e a umidade são fatores que influenciam as características da formação das fibras durante o processamento. A temperatura altera a viscosidade da solução, influenciando a morfologia final das fibras (Bhardwaj e Kundu, 2010).

## 2.4 ELETROFIAÇÃO POR CORRENTE ALTERNADA - (CA)

Pesquisas realizadas (Kessick, Fenn e Tepper, 2004; Sarkar, Deevi e Tepper, 2007; Maheshwari e Chang, 2009; Lee, Yoon e Kim, 2009) demonstraram novas possibilidades de estruturação de fibras quando o processo é realizado em campo elétrico alternado, método que minimiza a instabilidade inerente do jato durante o processo de eletrofiação. Nesse método, é empregada a combinação de um potencial corrente CA/CC simultaneamente, como variáveis específicas de processamento a amplitude de frequência CA e a magnitude CC visando à estabilidade do jato resultando em fibras uniformes e alinhadas. A tensão alternada aplicada apresenta alternância positiva e negativa nas regiões das fibras, conforme ilustra **Figura 2.3** o que resulta em uma diminuição da repulsão eletrostática e um aumento na estabilidade do jato. (Sarkar, Deevi e Tepper, 2007, Ochanda *et al.*, 2011).



**Figura 2.3:** Ilustração eletrificada durante a eletrofiação CA/CC: alternância positiva e negativa nas regiões das fibras (Adaptado de Ochanda, *et al.*, 2011)

Segundo Kessick, Fenn e Tepper, (2004), a aplicação de campos elétricos de corrente alternada (CA) favorece a formação de fibras orientadas, devido à supressão das instabilidades de escoamento do jato.

As características das fibras tal como a uniformidade e alinhamento requerem dois requisitos a serem seguidos: i) A magnitude CC deve ser inferior à metade da amplitude total do potencial CA; ii) A frequência CA deve estar entre 500Hz à 1000Hz para a estabilidade da fibra ideal.

Lee *et al.*, (2009) relatam que um controle preciso do alinhamento de fibras é um desafio. O processo de eletrofiação com aplicação de um potencial CA/CC com alvo coletor de placa plana apresentou fibras bem alinhadas na direção do campo elétrico. Embora o alinhamento das fibras esteja criticamente relacionado com a frequência aplicada, foi observado que o alinhamento das fibras foi bem sucedido em baixas frequências, porém apresentou menores diâmetros das fibras com frequência acima de 500Hz.

O escoamento desenvolvido no processo de eletrofiação consiste no chamado escoamento eletrohidrodinâmico (EHD), que é essencialmente o mesmo tipo de escoamento encontrado em processos de spray eletrostático (*electrospraying*). Yeo *et al.*, (2005) desenvolveram estudos preliminares em campos elétricos CA para *electrospraying* e eletrofiação de biomaterias, para a formação de spray no caso de estruturas para encapsulamento de fármacos. Esses autores verificaram que, em corrente alternada, obtém-se um tamanho de gota maior e estabilidade da mesma, além da formação das gotas a uma tensão de ejeção a cerca 1kV, bem menor quando comparado quando produzidas com corrente contínua, que é em torno de 10-30kV.

Os poucos trabalhos publicados sobre eletrofiação em CA mostram que há uma dependência da frequência alternada com os padrões de escoamento do jato e, conseqüentemente, com as características finais da fibra formada, como orientação e diâmetro médio. (Kessick, Fenn e Tepper, 2004; Sarkar, Deevi e Tepper, 2007; Lee, Yoon e Kim, 2009; Ochanda *et al.*, 2011; Khiabani *et al.*, 2012).

## **2.5 BIOMATERIAIS**

Materiais destinados ao uso em organismos humanos requerem um planejamento específico de obtenção para garantir propriedades características dos locais onde serão colocados. Esses materiais são denominados biomateriais. Após a Segunda Guerra Mundial houve um aumento significativo de pesquisas para desenvolvimento de biomateriais.

Helmus e Tweden, (1995) definiram o termo biomaterial como: “parte de um sistema que trata, aumenta ou substitui qualquer tecido, órgão ou função do corpo”. Esta definição surgiu durante o *Consensus Conference of the European Society for Biomaterials*, que descreve biomaterial como todo material não vivo usado em dispositivo médico, objetivando interação desse material não vivo com o sistema biológico (Willians, 1987).

Um biomaterial pode ser definido como um material destinado a interface com os sistemas biológicos para avaliar, tratar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo, desempenhando um papel importante na saúde humana. Os biopolímeros correspondem a um dos principais tipos de biomateriais e, segundo suas propriedades de degradação, podem ser ainda classificados em biodegradáveis e não biodegradáveis.

Uma grande variedade de biomateriais são rotineiramente utilizadas em aplicações médicas como dispositivos para terapias, contraste por diagnóstico de imagens, dispositivos de distribuição controlada de fármacos (Guo, *et al.*, 2010), assim como para estímulo em reparo de nervos ou tecidos.

Um dos principais objetivos do uso de biomateriais é a restauração de funções dos tecidos e órgãos do corpo humano. Quando se trabalha com biomateriais é importante o entendimento da correlação entre propriedades, funções e estruturas dos materiais biológicos e sintéticos e das interações entre estes (Park e Bronzino, 2003).

Os biomateriais podem ser bioinertes, bioativos e reabsorvíveis. Os materiais bioinertes, também conhecidos como biotoleráveis, são materiais tolerados pelo organismo, mas não são capazes de ligar-se a um dado tecido, formando uma cápsula de tecido fibroso entre o biomaterial e o organismo; os materiais bioativos interagem com o corpo humano ligando-se fortemente aos tecidos; os biomateriais reabsorvíveis são aqueles consumidos pelo organismo após um determinado período de tempo característico de cada material, sendo substituídos pelo tecido original (Hench *et al.*, 2004).

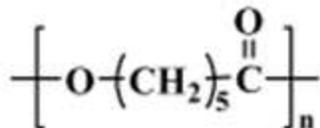
Os biomateriais devem ser purificados, sintetizados e esterilizados utilizando métodos tradicionais. Não devem conter impurezas, aditivos, iniciadores, estabilizadores e poderão seguir conceitos de biofabricação que consistem na aplicação de técnicas de engenharia para viabilizar a obtenção de substitutos biológicos para tecidos vivos ou órgãos humanos (Maia *et al.*, 2010).

## 2.6 POLI(CAPROLACTONA) - (PCL)

Nas últimas décadas, os polímeros biodegradáveis têm recebido significativa atenção devido a questões ambientais e também têm sido amplamente utilizados em aplicações biomédicas. Entre os mais promissores, destaca-se o poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), um polímero sintético com boa biocompatibilidade e biodegradabilidade, muito utilizado em aplicações de liberação controlada de fármacos, *scaffolds* e regeneração óssea. Seu longo tempo de degradação e bioatividade torna-se um candidato apropriado para enxerto vascular e estímulo à regeneração celular (Zang *et al.*, 2006, Argwal, Wendorff e Greiner, 2008; Shueren *et al.*, 2011; Qin e Wu, 2012).

O PCL é um poliéster alifático, com caráter semicristalino e hidrofóbico. Sua cristalinidade tende a diminuir com o aumento do peso molecular e possui temperatura de transição vítrea abaixo da ambiente de  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$  e ponto de fusão entre  $59 - 64\text{ }^{\circ}\text{C}$ . (Sinha, *et al.*, 2004; Woodruff e Hutmacher, 2010).

O PCL é sintetizado por meio de polimerização por abertura de anel, é solúvel em clorofórmio, diclorometano, tetracloreto de carbono, benzeno, tolueno, ciclohexanona e 2-nitropropano em temperatura ambiente. Apresenta baixa solubilidade em acetona, 2-butanona, acetato de etila, demetilformamida, acetonitrila, é insolúvel em álcool, petróleo éter (benzina) e em éter dielítico. A **Figura 2.4** apresenta sua estrutura química (Sinha, *et al.*, 2004).



**Figura 2.4:** Estrutura química do PCL (Park, *et al.*, 2004).

*Scaffolds* para a engenharia tecidual tornaram-se um grande foco de atenção de pesquisa. O PCL é reabsorvível e podem ser utilizados como *scaffolds*, devido à sua versatilidade e facilidade de processamento (Park, *et al.*, 2004; Woodruff e Hutmacher, 2010).

## 2.7 NANOTECNOLOGIA DE COMPÓSITOS

A ciência e a tecnologia em nanoescala têm atraído atenção nos últimos anos, em função da expectativa quanto ao impacto que os materiais nanoestruturados podem causar em diversas áreas tecnológicas. Materiais nanoestruturados apresentam pelo menos uma de suas dimensões em escala nanométrica. Nesta escala de tamanho, esses materiais podem apresentar novas propriedades óticas, elétricas, magnéticas, de transporte, catalíticas, etc., antes não observadas quando em tamanho micro ou macroscópico (Zarbin, 2007; Araki, 2007).

Os compósitos representam uma classe de materiais onde duas ou mais substâncias são combinadas passando a exibir propriedades únicas, que não são possíveis de serem obtidas a partir de seus componentes individuais. O compósito possui uma fase contínua e uma fase dispersa, onde a fase dispersa normalmente responsável pelo aumento de uma ou mais propriedades do compósito. Para formação de um nanocompósito, pelo menos uma das constituintes do compósito deve possuir suas dimensões em escala nanométrica. Os nanocompósitos podem ser formados pela combinação de diferentes materiais do tipo inorgânico-inorgânico ou orgânico-inorgânico (Mano, *et al.*, 2005; José e Prado, 2005).

A possibilidade da combinação das propriedades dos nanomateriais com outros tipos de materiais, formando os chamados nanocompósitos, estão sendo desenvolvidos para as mais diversas aplicações. Para aplicações biomédicas, vêm sendo investigadas novas aplicações a fim de desenvolver novos materiais, com o objetivo de melhorar as propriedades mecânicas, elétricas, taxas de degradação, índices de biocompatibilidade e biodegradabilidade, e que podem funcionar como materiais inteligentes que estimulam a proliferação celular através da aplicação de estímulos elétricos no local. (Mano, *et al.*, 2005; Cheung, *et al.*, 2010).

## 2.8 NANOTUBOS DE CARBONO - NTC

A nanotecnologia tem sido amplamente investigada para aplicações na área biomédica. Após Iijima ter descoberto, em 1991, os nanotubos de carbono (um dos materiais mais representativos em potencialidades exclusivas em propriedades elétricas, mecânicas e de superfície), a nanotecnologia de carbono vem se desenvolvendo rapidamente para uma ampla área de aplicações, incluindo as biomédicas (Souza Filho e Fagan, 2007, Li, Fan e Watari, 2010).

Por causa das muitas propriedades únicas, os nanotubos de carbono têm demonstrado um grande potencial para ser integrado em várias tecnologias existentes. As propriedades elétricas e mecânicas dos nanocompósitos poliméricos reforçados com nanotubos de carbono em baixa concentração podem ser melhorada em alguns casos (Zang *et al.*, 2006; Souza Filho e Fagan, 2007, Maiti *et al.*, 2013).

Os nanotubos de carbono podem ser classificados em duas formas: nanotubos de múltiplas camadas “*multi-walled carbon nanotubes – MWNTs*” e camada simples “*single-walled carbon nanotubes – SWNTs*”. Um tipo especial de nanotubo de carbono é denominado como nanotubo de camada dupla “*double-walled carbon nanotube – DWNTs*”. Os nanotubos funcionalizados apresentam estruturas quimicamente modificadas, as quais podem facilitar o uso na interação dos nanotubos com moléculas orgânicas e espécies biológicas, tais como: fármacos, moléculas

tóxicas, vírus e bactérias. No uso de catalisadores metálicos, tais como níquel, quando utilizado para o crescimento de nanotubos, há uma preocupação quanto à toxicidade do nanotubo de carbono. Faz-se necessária, portanto, a purificação dos nanotubos antes de serem utilizados para aplicações biomédicas (Souza Filho e Fagan, 2007; Harrison e Atala, 2007; Li, Fan e Watari, 2010).

O uso de NTC em aplicações biomédicas teve início em 2004. Na engenharia tecidual, há quatro áreas em que o NTC pode ser utilizado de forma relevante: rastreamento celular e rotulagem, comportamento celular e crescimento celular e reforço em matrizes celulares (Harrison e Atala, 2007). Os NTCs podem também ser incorporados em suportes que oferecem reforço estrutural, de forma a fornecerem novas propriedades únicas tais como condutividade elétrica e ajudar no direcionamento do crescimento celular. Efeitos citotóxicos potenciais (Vila *et al.*, 2012) associados aos nanotubos de carbono podem ser reduzidos quimicamente por funcionalização da superfície. Em geral, os nanotubos de carbono podem desempenhar um papel fundamental como biomaterial para engenharia tecidual (Harrison e Atala, 2007). A funcionalização química pode ser uma maneira eficaz para melhorar o desempenho biológico dos NTCs (Li, Fan e Watari, 2010; Harrison e Atala, 2007; Mata *et al.*, 2012).

Embora alguns estudos tenham sido realizados com diferentes tipos de células, como osteoblastos, mostrando excelente adesão e crescimento celular, existem alguns desafios a serem superados em relação à toxicidade e biodegradação. Deve-se ressaltar que a biocompatibilidade depende da taxa de degradação dos materiais e da concentração dos NTCs utilizados.

## **2.9 ÓXIDO DE GRAFENO - GO**

O grafeno foi descoberto em 2004, na Universidade de Manchester, na Inglaterra, pelos pesquisadores Andre Geim e Konstantin Novoselov, obtido pelo processo de exfoliação de grafite. Em 2010, os pesquisadores ganharam o Prêmio Nobel da Física relacionado ao experimento inovador da obtenção do material bidimensional (Novoselov *et al.*, 2004; 2010).

O grafeno modificado quimicamente (CMG) tem sido estudado nos últimos anos para diversas aplicações, como em compósitos poliméricos, sensores, materiais relacionados com armazenamento de energia e aplicações biomédicas, devido suas excelentes propriedades térmicas e mecânicas (Geim e Novoselov, 2007; Park e Ruoff, 2009).

O óxido de grafeno é proveniente do grafite, e pode ser funcionalizado com grupos como: ácidos carboxílicos, hidroxilos e epóxidos. Estes grupos funcionais de oxigênio reativos torna o óxido de grafeno um bom candidato para utilização nas aplicações citadas acima (Park e Ruoff, 2009).

A incorporação de nanopartículas de óxido de grafeno (GO) na solução polimérica, se adequadamente dispersos, podem resultar na formação de um nanocompósito, aumentando significativamente as propriedades mecânicas do material (Ramaswamy, Clarke e Goga, 2011).

## **2.10 CÉLULAS MESENQUIMAIS**

As células-tronco mesenquimais (MSCs) são multipotentes, têm a capacidade de se auto renovar e intrinsecamente reparar e regenerar tecidos danificados. O transplante de células-tronco mesenquimais humanas (hMSCs) que permite a diferenciação em células da linhagem condrogênica abriu novas abordagens terapêuticas importantes para reparação de defeitos da cartilagem articular. (Pereira *et al.*, 2010).

Descritas primeiramente por Friedenstein e colaboradores na década de 80 (Friedenstein, 1980), as chamadas célula-tronco mesenquimais multipotentes, podem ser originadas de diversos tecidos, como o estroma de medula óssea, cordão umbilical, tecido adiposo, As células-tronco mesenquimais possuem a capacidade de se diferenciar em linhagens de origem mesodérmica, tais como: músculo esquelético, ossos, tendões, cartilagem e tecido adiposo, quando submetidas a

meios de cultura suplementados com fatores de crescimento e hormônios específicos (Castro-Malaspina, *et al.*, 1980; Barry, *et al.*, 2004; Pittenger, *et al.*, 1999).

As células-tronco possuem propriedades essenciais tais como a capacidade de auto renovação e a diferenciação em outras linhagens sob condições apropriadas. As células tronco podem ser classificadas de acordo com o potencial de diferenciação: totipotente, pluripotente, multipotentes, oligotentes e unipotentes. Sendo as células multipotentes derivadas de tecidos já desenvolvidos e do cordão umbilical e podem se diferenciar em vários tipos celulares (Cardoso, 2013).

McCanless *et. al.*, (2012) avaliaram a biocompatibilidade e potencial de diferenciação osteocondral de um compósito alginato/CaPO<sub>4</sub> parcialmente hidratado com liberador de produto concentrado de plaquetas humanas (hCPR) usando MSCs derivadas de medula de rato. Os autores confirmaram culturas MSC, para assumir rapidamente um fenótipo consistente, com não hipertrofia de condrócitos, com base em perfis de expressão gênica e contínua atividade mitogênica

Hu, Y. *et al.*, (2012) realizaram simulação em microambiente extracelular do osso, com estrutura de camadas múltiplas de um par bioativo de gelatina/quitosana, que contém a proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2) e fibronectina (FN). Foi construído em superfície de Ti6Al4V por meio de uma técnica de camada-a-camada do conjunto e observaram que a estrutura de Gel/Chi agiu como um reservatório biomimético, para controlar a entrega local de BMP2 com concentração desejada em torno dos implantes. Por sua vez, Guan, *et. al.*, (2011) construíram tecido imitando nanofibras e estrutura anisotrópica com propriedades mecânicas similares ao do miocárdio para estimular a diferenciação cardíaca de MSCs e concluíram que os resultados representam uma nova abordagem para melhorar MSC em diferenciação cardíaca em uma estrutura 3-D, sem o uso de agentes bioquímicos ou de co-cultura com outras células.

Chew *et al.*, (2006) estudaram a biocompatibilidade, a adesão e proliferação das hMSCs em *scaffolds* formados por nanofibras eletrofiadas de PLGA, fibroina/PEO. Em um estudo mais aprofundado pelo grupo, pesquisou-se o potencial das mantas formadas pelas nanofibras

eletrofiadas de PCL como um suporte para diferenciação em múltiplas linhagens de MSCs, junto as linhagem adipogênica, condrogênicas e osteogênicas, os autores concluíram que as nanofibras eletrofiadas mostraram-se versátil o suficiente para suportar múltiplas linhagens.

## Capítulo 3

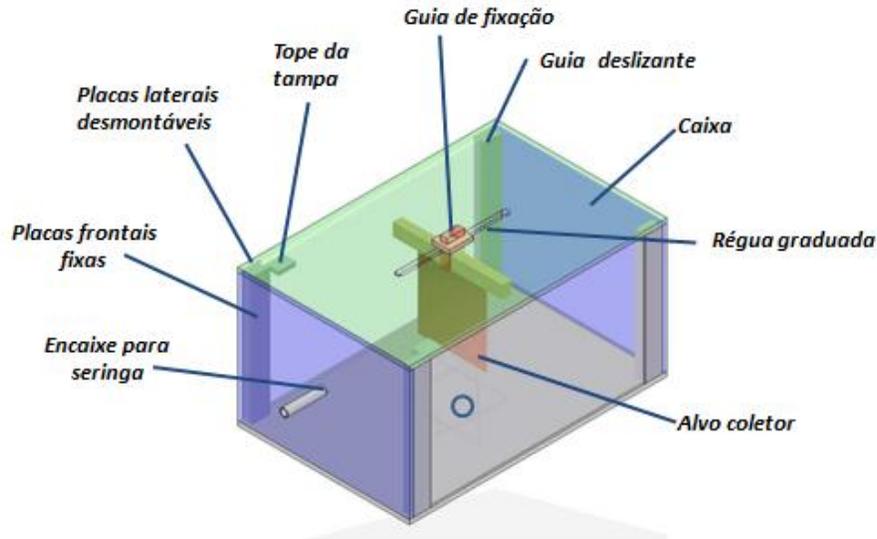
*Este capítulo aborda a montagem do equipamento CA/CC e os testes iniciais de funcionamento do equipamento.*

### 3. MONTAGEM DO EQUIPAMENTO DE ELETROFIAÇÃO

Como mencionado na revisão da literatura, um equipamento básico de eletrofiação necessita de fonte de alta tensão, uma bomba de infusão e um anteparo para a coleta do material.

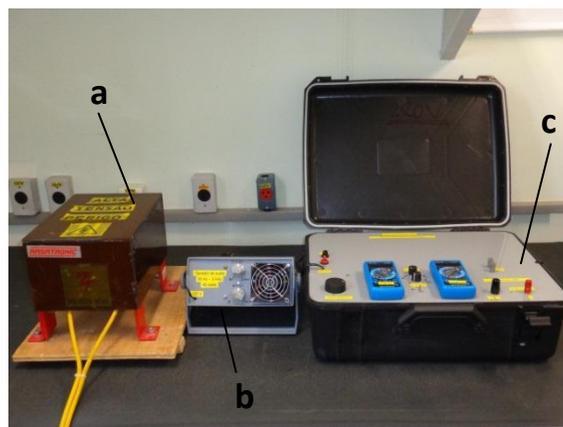
No presente trabalho, o equipamento de eletrofiação foi construído pela autora desta tese. Foi projetada uma caixa em acrílico de 600 x 400 x 300 mm com suas laterais desmontáveis. Há um furo com  $\varnothing$  10 mm na parte frontal para encaixe e apoio da parte final da seringa e um furo com  $\varnothing$  12 mm na lateral da caixa para entrada de cabo. A tampa da caixa é composta por um rasgo e uma régua graduada para controle da distância, um parâmetro importante no processo de eletrofiação.

Como anteparo coletor, foi utilizada uma placa de cobre de 155,5 x 190 x 1,0 mm. Durante o processamento, a placa é coberta por papel alumínio para facilitar a coleta do material eletrofiado. Para fixação da placa coletora, foi confeccionado um guia de fixação em acrílico, no qual a placa é fixada por um pino de PVC e depois encaixada no rasgo da tampa com uma folga deslizante para o controle da distância da eletrofiação. A **Figura 3.1** é um esquema ilustrativo da caixa, ao qual cabe salientar que o projeto foi previsto também para tamanhos de anteparos menores.



**Figura 3.1:** Esquema ilustrativo da caixa de acrílico

A fonte de alimentação com CA/CC simultânea é um equipamento capaz de gerar, ao mesmo tempo, tensão contínua de 0 a +16 kV com corrente de saída de até 15 mA, bem como um gerador de sinal alternado capaz de fornecer tensão alternada de até 7V pico a pico. Ela dispõe de um controlador para ajuste individual da frequência e a amplitude (voltagem) de tensão alternada, que pode ser variada de 50 Hz a 2 kHz continuamente. A fonte alternada é implementada em um transformador externo com ambos os terminais flutuantes em relação ao terra, de tal maneira que podem ser ligadas as duas fontes em série. Isto permite obter tensões somadas, ou seja, uma tensão alternada sobreposta a uma tensão contínua. A **Figura 3.2** mostra o conjunto que compõe o equipamento de fonte de alimentação CA/CC.



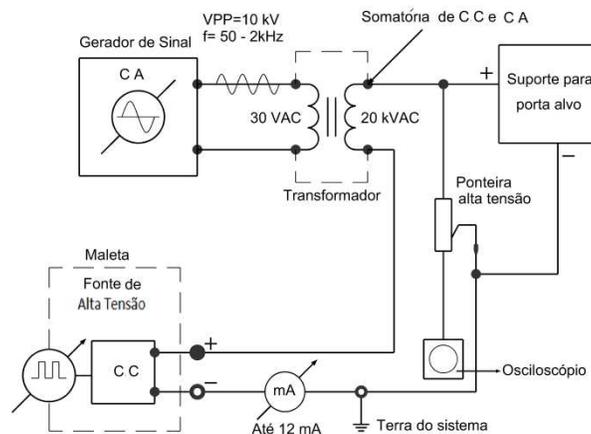
**Figura 3.2:** Foto que compõe o conjunto da fonte de alta tensão: a) transformador; b) controlador de frequência; c) fonte de alta tensão

Existem dois instrumentos de medição no painel frontal da fonte. O da esquerda mede tensão e corrente contínua e o da direita mede tensão alternada. Para evidenciar a operação de medição adequada da fonte, foi utilizado um osciloscópio Tektronix modelo TDS-2002 e uma ponteira de alta tensão P6015A, que através de um programa permite transportar para a tela todos os dados captados durante o processamento por eletrofaiação para monitoramento do processo. A fim de importar dados da corrente trafegada pelo circuito ao longo do tempo, foi utilizado um multímetro ICEL modelo MD6450. A **Figura 3.3** identifica os itens citados.



**Figura 3.3:** Foto do: a) osciloscópio; b) ponteira de alta tensão; c) multímetro

Deve-se ressaltar que as duas fontes podem também ser operadas separadamente. Pode-se manter o transformador desconectado e utilizar apenas a fonte CC (maleta). A **Figura 3.4** mostra um diagrama esquemático do circuito.



**Figura 3.4:** Diagrama esquemático do circuito da fonte de alta tensão.

Como saída do material, utilizou-se uma seringa vidro de 20 mL, conectada a uma agulha com  $\varnothing$  1,0 mm no capilar em aço inox, alocada em uma bomba de infusão KD Scientific, mod. KD-100. Para auxiliar na altura do alojamento da seringa da caixa foi adaptada uma mesa hidráulica.

### 3.1 ESQUEMA DE LIGAÇÃO DO SISTEMA

Um fator importante no equipamento que deve ser ressaltado refere-se às ligações do circuito, que foram projetados de modo a permitir que, fora de funcionamento, pudessem ser desmontados. Por questões de segurança, a ligação do circuito requer um bom isolamento devido à alta tensão. Assim, foram utilizados cabos de ignição com  $\varnothing$  8,0mm para minimizar a perda de cargas ao longo do circuito de todo o sistema. Foram montados 04 cabos com suas extremidades com conectores do tipo banana e jacaré, recobertos com fitas isolantes de alta tensão.

A ligação do sistema tem a seguinte sequência:

- Ligar no terminal terra “*Com*” do multímetro ao terra do sistema; (haste do prédio)
- Conectar um cabo em série do “*Com*” do multímetro para o terminal terra do osciloscópio;
- Conectar um cabo no terminal “*mA*” do multímetro para o terminal terra da maleta (terminal preto);
- Conectar os terminais primários de cor azul e cinza do transformado externo na parte traseira do controlador de frequência;

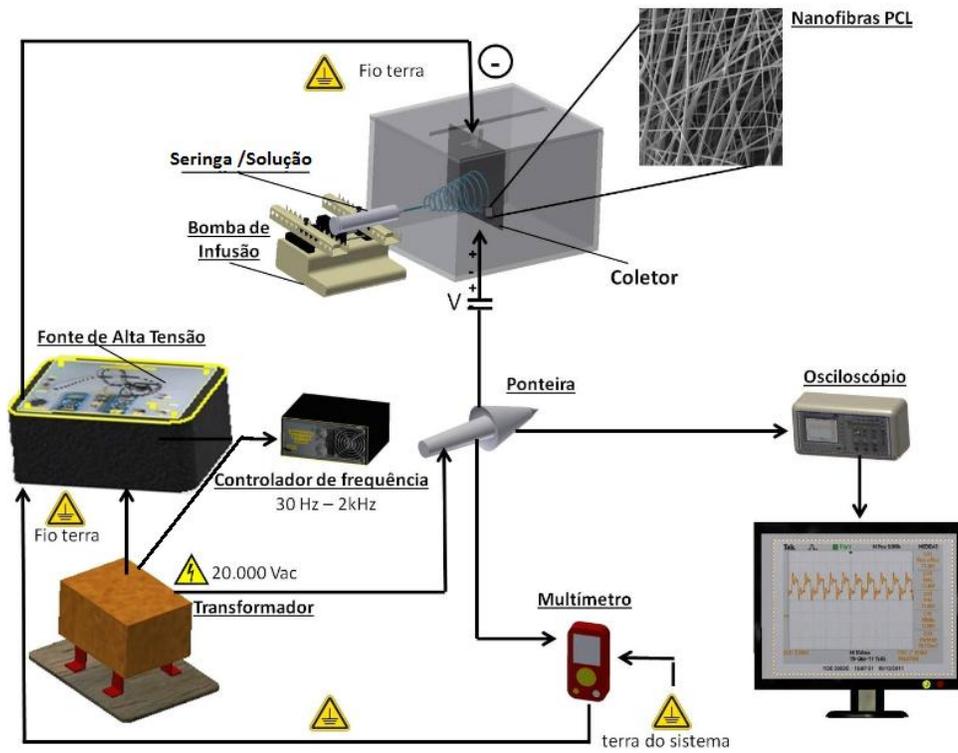
- Conectar um terminal secundário amarelo do transformado externo na fonte de alta tensão (maleta) na saída de CC (conector vermelho) e o outro na ponteira de alta tensão;
- Tomar a saída de tensão para o experimento de um cabo da saída da ponteira até a ponta do capilar (agulha).
- Conectar um cabo do terminal terra da ponteira até o alvo coletor sendo este a saída do terra para o experimento.

A **Figura 3.5** ilustra o esquema de ligação do circuito acima descrito.



**Figura 3.5:** Esquema de ligação do circuito.

Segue na **Figura 3.6** um diagrama ilustrando a sequencia de montagem do equipamento



**Figura 3.6:** Diagrama esquemático do equipamento montado.

## 3.2 TESTE PRELIMINAR

Para teste inicial do equipamento foram preparadas soluções de Poli(fluoreto de vinilideno) (PVDF), Poli(óxido de etileno) (PEO) Sigma Aldrich, PEO/Polipirrol (PPy) estabelecendo condições favoráveis para condução do processo de eletrofiação.

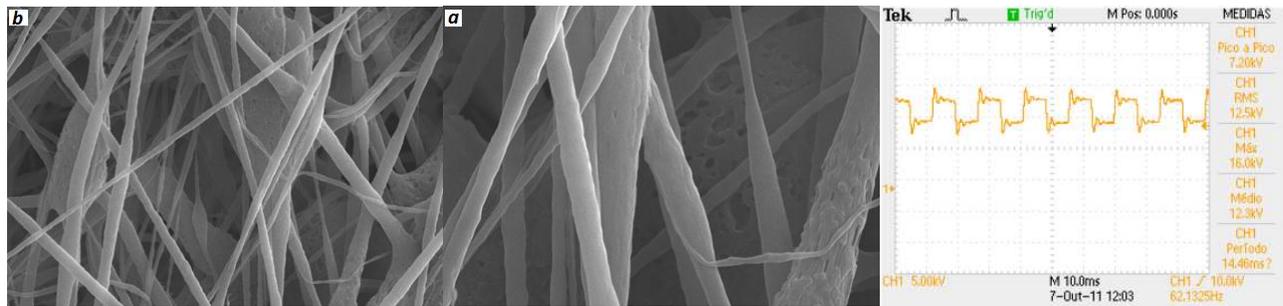
Foi utilizado PVDF (MM 45.000) fornecido pela empresa Sigma Aldrich. Dentre as soluções realizadas e testadas, a solução que obteve a formação de fibras sem a presença de gotas foi uma mistura de DMF/acetona (Synth 99,8%) e (Synth 99,5%), na proporção 75/25 em massa. A adição da acetona como solvente foi realizada para torná-la uma solução mais volátil e facilitar a formação das fibras no processo de eletrofiação.

Uma concentração de 25% em massa de PVDF foi dissolvida inicialmente em DMF sob aquecimento (40 à 60°C) por 4 horas. Em seguida, a solução foi completada com acetona mantida sob agitação em todo o tempo de preparação da solução. A **Tabela 3.1** mostra as condições de processamento.

**Tabela 3.1:** Condições de processamento para obtenção das fibras.

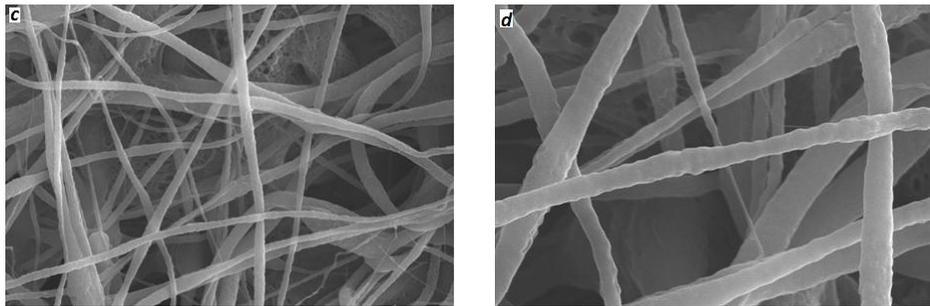
Amostra	Tensão (AC)	Tensão (CC)	Frequência (Hz)	Distância (mm)	Vazão (ml/h)
1- CA/CC	7,2kV	12,5 kV	60~62	240,0	2,5
2- CC	----	15,0 kV	----	170,0	2,5

As condições mostradas na **Tabela 3.1** foram monitoradas por um computador conectado ao osciloscópio, em que a corrente trafegada pelo circuito, conforme medição do multímetro foi de 11 mA. A **Figura 3.7** apresenta micrografias obtidas por MEV das amostras 1a, 1b, 2a e 2b, e indica a morfologia da fibra de PVDF e os diâmetros das fibras após processo de eletrofiação em CA/CC simultaneamente e após processo convencional no mesmo equipamento de CC. Há indicação também de imagens capturadas pelo osciloscópio durante o processamento de ambas as amostras.



1) 60 Hz

Imagem do osciloscópio



2) CC

**Figura 3.7:** Micrografias das fibras de PVDF processadas em duas condições de processamento: amostra (1a) processado em potencial CA/CC simultaneamente a 60Hz de frequência; (1b) ampliação da imagem(1a); amostra (2a) processado em potencial CC; (2b) ampliação da imagem(2a).

As figuras 1a e 1b foram eletrofiadas aplicando um potencial elétrico alternado (CA), a 60Hz as Figuras 1c e 1d a um potencial corrente contínua (CC), ou seja, pelo método convencional evidenciando o funcionamento do equipamento nas duas condições de processamento. A **Figura 3.8** mostra o equipamento montado, o qual foi utilizado para execução deste trabalho.



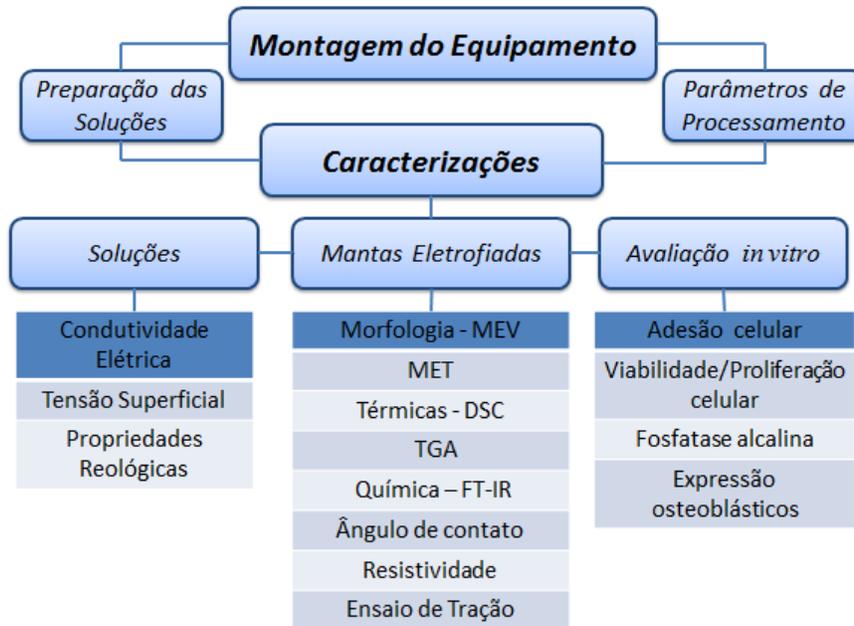
**Figura 3.8:** Foto do equipamento montado no Laboratório de Biopolímeros e Eletrofição da Faculdade de Engenharia Mecânica da Unicamp.

# Capítulo 4

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo, descreve-se a parte experimental do trabalho, o qual foi dividido em duas partes. Inicialmente é abordada a eletrofição em CA/CC dos nanocompósitos de PCL/NTC e caracterização das mantas eletrofiadas. E a seguir, é abordada a eletrofição dos nanocompósitos de PCL/GO eletrofiados em CC, seguidos dos procedimentos de viabilidade celular.

Para execução deste trabalho, os procedimentos experimentais foram realizados conforme o esquema mostrado na **Figura 4.1**.



**Figura 4.1:** Esquema do procedimento experimental.

## 4.1 MATERIAIS

- ✓ Foi utilizado PCL (MM 70.000 - 90.000) fornecido pela empresa Sigma Aldrich; Clorofórmio (Merck 99,0 %); acetona (Synth 99,5 %);
  
- ✓ Nanotubos de carbono de parede múltiplas (CNT Co. Ltda.).  
Os nanotubos foram submetidos a três processos químicos consecutivos sob refluxo convencional: 9M HNO<sub>3</sub> por 3 horas, 0,1 M NaOH por 1 hora e 5M HCl por 6 horas, visando sua funcionalização e purificação. Esse processo foi realizado pelo Laboratório de Química do Estado Sólido do Instituto de Química da Unicamp. Após esses tratamentos, os nanotubos foram denominados de amostra NTC; (Anexo-1)
  
- ✓ Óxido de grafeno a partir de uma conversão catalítica.  
O óxido de grafeno do Laboratório de NanoEngenharia e Diamante – NanoEng. da Faculdade de Engenharia Elétrica e Computação da Unicamp foi preparado a partir de uma conversão catalítica, utilizando um substrato de cobre. Uma solução de 1,0 mL de polianilina diluída em dimetil-formamida foi colocada sobre o substrato seco em temperatura ambiente por duas horas. Sobre o substrato com polianilina, foi colocada uma solução 0,2 mL de nitrato de níquel diluída em acetona. O substrato de cobre foi imerso em um reator de deposição química e, a partir da fase vapor, foi assistido por um filamento quente (HFCVD). O reator é alimentado por uma fonte de carbono formado pela mistura de cânfora, acetona e ácido cítrico e, após sua conversão, foi denominado amostra GO;

## 4.2 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES

Foram realizadas três soluções diferentes para o PCL e para PCL/NTC até chegar à solução ideal para o processamento. Na **Tabela 4.1** são apresentadas as soluções preparadas para PCL e para PCL/NTC.

**Tabela 4.1:** Soluções preparadas para PCL e PCL/NTC.

Mistura	Solução 1	Solução 2	Solução 3
Clorofórmio/acetona	1:1	1:1	1:1
PCL (% massa)	20	13,6	11

\* Para solução PCL/NTC é inserido 0,5 % de NTC nas soluções acima.

As soluções de PCL foram dissolvidas no solvente e mantidas sob agitação mecânica por 24h. Para a solução de PCL/NTC, os NTC foram dispersos na solução em um ultrassom de ponta marca Sonic, modelo Vibra cell a uma amplitude de 35% a temp. de 25°C por 5min. nos solventes e, após dispersão, foram mantidos sob agitação mecânica por 24h.

Na **Tabela 4.2** são apresentadas as soluções realizadas para PCL/GO.

**Tabela 4.2:** Soluções realizadas para PCL/GO.

Mistura	Solução 1	Solução 2	Solução 3
Clorofórmio/acetona	1:1	1:1	1:1
PCL (% massa)	11	11	11
GO (% massa)	0,15	0,30	0,5

Os GO foram dispersos em um ultrassom de ponta marca Sonic, modelo Vibra cell a uma amplitude de 35% a temp. de 25°C por 5min. nos solventes. Após dispersão, a solução foi mantida sob agitação mecânica com a concentração de PCL por 24h.

## 4.3 PROCESSO DE ELETROFIAÇÃO

### 4.3.1 Parâmetros de Processo para CA/CC

Na **Tabela 4.3** são apresentadas as condições de processamento para PCL e PCL/NTC com aplicação de potencial elétrico (CA/CC), potencial elétrico (CC), vazão de infusão da solução, distância entre a saída do capilar até o coletor aterrado. Para controle da vazão, é carregada uma seringa de vidro graduada de 20 mL com um capilar com diâmetro interno de 1,0 mm e comprimento da agulha de 30 mm, utilizando uma bomba de infusão, tal como mencionado no Capítulo 3.

**Tabela 4.3:** Condições de processamento de obtenção das fibras em CA/CC.

Amostra	Tensão (CA) [kV]	Tensão (CC) [kV]	Frequência [Hz]	Distância [mm]	Vazão [ml/h]
PCL/NTC	7,2	12,0	60 /205 /350	120	8,0
PCL	7,2	12,0	60 /205 /350	120	8,0

### 4.3.2 Parâmetros de Processo para CC

Na **Tabela 4.4**, são apresentadas as condições de processamento para PCL e PCL/NTC com aplicação de potencial elétrico (CC), vazão de infusão da solução, distância entre a saída do capilar até o coletor. Para controle da vazão, é carregada uma seringa de vidro graduada de 20 ml com um capilar com diâmetro interno de 1,0 mm e comprimento de 30 mm utilizando uma bomba de infusão, como já indicado no Capítulo 3.

**Tabela 4.4:** Condições de processamento de obtenção das fibras.

<b>Amostra</b>	<b>Tensão (CC) [kV]</b>	<b>Distância [mm]</b>	<b>Vazão [ml/h]</b>
PCL/GO	12,5	120	8,0
PCL	12, 0	120	8,0

## **4.4 CARACTERIZAÇÕES**

### **4.4.1 Caracterização das Soluções**

As soluções foram caracterizadas quanto à tensão superficial, condutividade elétrica, pH e reologia.

#### ***Tensão Superficial***

As medições de tensão superficial foram realizadas em um tensiômetro Kruss modelo K-12 em triplicata no Laboratório de Bioprocessos da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp.

#### ***Condutividade Elétrica***

As soluções foram caracterizadas quanto à condutividade elétrica em um condutivímetro termocompensado automaticamente Analion modelo C 708 – Plus (célula C801/1 Anailon), com célula de condutividade  $K=1\text{cm}^{-1}$  e gama de medição na faixa de 0 - 200 $\mu\text{s}$  e resolução de 0,1 $\mu\text{s}$  com precisão relativa de 1,5% da leitura no Laboratório de Blendas e Compósitos da Engenharia Química da Unicamp.

## ***Propriedades reológicas***

As propriedades reológicas foram analisadas através de um reômetro Haake, RheoStress 1, indicadas pela variação da viscosidade com a taxa de cisalhamento, e pelos módulos elástico e viscoso ( $G'$  e  $G''$ , respectivamente). Os testes reológicos foram realizados empregando-se geometria Double Gap – DG 43 Ti. O sistema foi termostatizado a 25 °C por um banho circulatório modelo Thermo Haake DC-30, com uma variação de temperatura de 0,1 °C. As medições em regime oscilatório foram conduzidas na região viscoelástica linear, com uma tensão de oscilação de 1,0 Pa, em uma faixa de frequência de 0,1 à 100 Hz. As medições em regime permanente foram efetuadas com taxas de cisalhamento entre 0,01 e 100 s<sup>-1</sup>.

### **4.4.2 Caracterização das Fibras Eletrofiadas**

#### ***Morfologia das Fibras***

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

A morfologia das fibras foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando um equipamento ZEISS (Modelo Evoma-15). Para a observação pelo MEV, as amostras foram revestidas em ouro com o uso de um equipamento Sputter Coater, Bal-Tec (Modelo SCD-O50). Os diâmetros médios das fibras foram determinados por análise das imagens de MEV com o programa ImageJ, com o qual foram medidos os diâmetros de 100 fibras de cada amostra aleatoriamente.

##### ***Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)***

As amostras foram observadas em grelhas sem filme pelo equipamento de transmissão modelo Hitachi H-9000-NA a uma voltagem de 200 kV, realizadas no Instituto Politécnico de

Setúbal – Escola Superior de Tecnologia Setubal de Lisboa, seguindo os seguinte procedimento: Foi cortado um pequeno pedaço da membrana e com uma pinça fina de MET foi puxado um pequeno pedaço o suficiente só para ficar na ponta da pinça (pouca amostra e fina), coletada cuidadosamente sem exercer força, para não alterar as características da amostra. Após a amostra na ponta pinça, foi colocado no, porta amostra do tipo grelha e depois foi colocada outra grelha igual por cima.

#### **4.4.3 Caracterização das Mantas Formadas Pelas Fibras**

##### ***Resistividade das Mantas***

A resistividade elétrica das mantas foi determinada pelo método padrão de duas pontas, utilizando-se uma fonte de corrente Keithley 6220 e um eletrômetro Keithley Model 6517A para medir a diferença de potencial. As análises foram realizadas no Laboratório de Polímeros Condutores da Faculdade de Engenharia Mecânica – UFSC.

##### ***Ângulo de Contato***

A medida do ângulo de contato foi realizada para avaliar a hifrofilicidade da superfície das mantas. Foi utilizado para o ensaio o programa de análise acoplado ao equipamento Attension C201. O equipamento libera uma gota de água destilada (10 $\mu$ L, pH=7,4) sobre a superfície e realiza-se a medida do ângulo formado pela gota. As análises foram realizadas em triplicata no Laboratório de Físico-química de Catálise em Sistemas Moleculares e Nanoestruturados do Instituto de Química da Unicamp.

#### **4.4.4 Propriedades Térmicas**

##### ***Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)***

As curvas de DSC foram obtidas conforme a Norma ASTM D 3418, conduzidas em atmosfera inerte de nitrogênio sob fluxo de 50 cm<sup>3</sup>/min., taxa de 10°C/min., em um intervalo de temperatura entre -100 e 25°C em cadinho de alumínio (tampa furada) com massas de corpos de prova aproximadas de 5 mg. Os corpos de prova foram submetidos ao seguinte ciclo térmico: (i) resfriamento de 10 ° C/min. até -100 ° C e mantidos nesta temperatura por 3 min.; (ii) aquecimento com a mesma taxa até 200 °C, isoterma de 3 min. e, resfriamento à mesma razão (10°C/min<sup>-1</sup>) até 100°C, isoterma de 3 min., (iii) aquecimento até 200°C.

Para as mantas eletrofiadas em CA/CC, foi utilizado o aparelho da TA Instruments, mod. DSC 2920 modulated DSC no Laboratório de Análises Térmicas da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp, e para as mantas eletrofiadas em CC, ou seja PCL/GO, foi utilizado o aparelho NETZSCH-Proteus 6.0 nas mesmas condições descritas acima no Laboratório de Multi-Usuários da Faculdade de Engenharia Mecânica da Unicamp.

##### ***Análise Termogravimétrica (TGA)***

As curvas de TGA foram obtidas com um aparelho TA Instruments modelo SDT 2960 Simultaneous DTG – TGA com taxa de aquecimento de 10°C/min., no intervalo entre 25°C a 700°C, sob atmosfera de nitrogênio com vazão de 50 ml/min. em cadinho de alumina, com massas de corpos de prova ±10 mg para as amostras puras (como recebidas) de PCL e das mantas eletrofiadas. As análises foram realizadas no Laboratório de Química do Estado Sólido do Instituto de Química da Unicamp.

#### 4.4.5 Propriedades Químicas

##### *Espectroscopia de Absorção na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTI-R)*

As análises de FTI-R das mantas de PCL e PCL/NTC eletrofiadas em CA/CC foram feitas pela técnica de reflectância. Os espectros obtidos através do acessório PIKE Miracle foram realizados no Centro de Pesquisas de Paulínia – Química Analítica e Físico Química da Rhodia.

Para as mantas PCL/GO e grânulo de PCL as análises foram realizadas nas e nos com resolução 4.0 e 100 corridas do tipo ATR; F=3,0 max absorbância. Para a amostra de óxido de grafeno puro, usou-se o KBr para a produção de pastilhas contendo 0,2 mg de amostra. As análises foram realizadas no Instituto de Pesquisa INEB em parceria com a Universidade do Porto.

#### 4.4.6 Propriedades Mecânicas

##### *Tração*

O ensaio de tração foi realizado conforme a Norma D 882 09. Utilizou-se uma máquina Universal de Ensaio MTS Tensile (Simple Servo) pelo método de garras retangular com uma célula de carga 1500N e velocidade de 50 mm/min. no Laboratório de Multiusuários, da Faculdade de Engenharia Mecânica com ilustrado na **Figura 4.2**.

Foram realizados oito corpos de provas de cada amostra com dimensões retangulares de 130,0 x 12,5 x 0,50 mm.



**Figura 4.2:** Ensaio de Tração

(Fonte: Laboratório de Multiusuários da Faculdade de Engenharia Mecânica da Unicamp)

#### **4.4.7 Avaliação Biológica *In Vitro* das Mantas Eletrofiadas**

##### *Mantas de PCL/NTC*

As mantas eletrofiadas com os nanocompósitos de PCL/NTC e PCL foram avaliadas por viabilidade/proliferação celular por ensaio da rezasurina e a atividade da fosfatase alcalina em culturas de células humanas (MG63) um marcador do fenótipo osteoblástico. As avaliações foram realizadas no Laboratório de Metabolismo e Regeneração Óssea da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto.

##### *Protocolo Experimental*

Para o cultivo das linhagens celulares MG63 (osteoblasto de osteosarcoma humano – ATTCC) foram em meio de cultura alfa-MEM (Minimum Essential Medium Eagle, alpha modification, Sigma) contendo 10% de soro bovino fetal (FBS, Sigma), 50 µg/ml de ácido

ascórbico (Sigma), Penicilina/Estreptomicina (10 unidades/ml e 2,5 µg/ml; solução P/S, Sciencell) e 2,5 µg/ml de fungizona. As culturas foram mantidas numa incubadora a 37°C num ambiente de 5%CO<sub>2</sub>/ar.

As mantas de PCL e PCL/GO foram cortadas em discos de 1 cm de diâmetro e esterilizados com óxido de etileno. Posteriormente, foram semeadas com células MG63 a uma densidade de 5x10<sup>4</sup> células por cm<sup>2</sup> e cultivadas durante 7 dias, nas condições acima descritas.

#### *Atividade da Fosfatase Alcalina*

A atividade da fosfatase alcalina foi determinada em lisados celulares (0.1% Triton, 5 min), pela hidrólise do p-nitrofenilfosfato em tampão alcalino (pH ~10,3; 30 min, 37 °C) e determinação colorimétrica do produto formado (p-nitrofenol) no comprimento de onda de 400 nm, utilizando um leitor ELISA (Synergy HT, Biotek). A atividade da fosfatase alcalina foi normalizada pelo conteúdo em ALP e expressa em nmol/min.µgALP-1.

#### *Mantas de PCL/GO*

As mantas eletrofiadas com os nanocompósitos de PCL/GO e PCL foram avaliadas em culturas de células mesenquimais humanas cultivadas durante 14 dias, nas condições descritas no protocolo experimental a seguir.

As mantas colonizadas foram avaliadas ao longo do tempo de cultura por observação em microscopia confocal e microscopia eletrônica de varredura e também em relação ao conteúdo em ADN. As condições de cultura utilizadas (meio de cultura alfa-MEM suplementado com ácido ascórbico) favorecem o desenvolvimento do fenótipo osteoblástico. Deste modo, as mantas colonizados também foram avaliadas para a atividade da fosfatase alcalina, um marcador precoce do fenótipo osteoblástico, e expressão de alguns genes osteoblásticos. As avaliações foram

realizadas no Laboratório de Metabolismo e Regeneração Óssea da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

### ***Protocolo Experimental***

As células tronco mesenquimais humanas derivadas de medula óssea (*Human Mesenchymal Stem Cells-bone marrow derived, HMSC-bm, Innoprot*) foram cultivadas em meio de cultura alfa-MEM (*Minimum Essential Medium Eagle, alpha modification*, Sigma) contendo 10% de soro bovino fetal (FBS, Sigma), 50 µg/ml de ácido ascórbico (Sigma), Penicilina/Estreptomicina (10 unidades/ml e 2,5 µg/ml; solução P/S, Sciencell) e 2,5 µg/ml de fungizona. As culturas foram mantidas numa incubadora a 37°C num ambiente de 5%CO<sub>2</sub>/ar. As células da 3<sup>a</sup> subcultura foram utilizadas para avaliar o comportamento biológico das mantas.

As mantas de PCL e PCL/GO foram cortadas em discos de 1 cm de diâmetro e esterilizados com óxido de etileno. Posteriormente, foram semeadas com células mesenquimais a uma densidade de 5x10<sup>4</sup> células por cm<sup>2</sup> e cultivadas durante 14 dias, nas condições acima descritas.

### ***Microscopia Confocal***

As mantas colonizadas, após 1 dia de cultura, foram fixadas (3,7% de formaldeído, 15 min), permeabilizadas com uma solução de Triton (0,1%), e incubadas com albumina humana (10 mg/ml em tampão fosfato, 1 h), para bloquear as interações não específicas. Seguidamente, foi efetuada uma coloração imunohistoquímica para o citoesqueleto de F-actina (*Alexa Fluor® 488-conjugated phalloidin*, Invitrogen, 1:100 em tampão fosfato, 20 min.) e núcleos (iodeto de propídeo, 10 mg/ml em tampão fosfato, 5 min.). As amostras foram cobertas com meio de montagem (Vectashield®, Vector laboratories) e observadas num microscópio confocal (Leica SP5 AOBS, Leica Microsystems®).

### ***Microscopia Eletrônica de Varredura***

As mantas colonizadas foram fixadas (1,5% glutaraldeído em 0,14 M tampão de cacodilato de sódio, pH=7,3 - 10 min.), desidratadas em álcoois de graduação crescentes, cobertas com um filme de Au/Pd (SPI Module Sputter Coater equipment) e observadas num microscópio eletrônico de varredura (Environmental Scanning Electron Microscope, Quanta 400 FEG ESEM).

### ***Conteúdo de ADN***

O conteúdo de ADN da camada celular presente nas mantas foi quantificado nos dias 1; 4; 7; 10 e 14, utilizando o Kit *PicoGreen DNA quantification assay* (Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit, Molecular Probes Inc., Eugene), de acordo com as instruções do fabricante. As culturas foram tratadas com uma solução de Triton (0,1%) e a fluorescência foi medida num leitor ELISA (Synergy HT, Biotek) nos comprimentos de onda de excitação de 480 nm e de emissão de 520 nm. O conteúdo de ADN foi calculado por extrapolação numa curva padrão obtida com uma solução standard de ADN presente no Kit. Os resultados são expressos em ng/cm<sup>2</sup>.

### ***Atividade da Fosfatase Alcalina***

A atividade da fosfatase alcalina foi determinada em lisados celulares (0.1% Triton, 5 min), pela hidrólise do p-nitrofenilfosfato em tampão alcalino (pH ~10,3; 30 min, 37 °C) e determinação colorimétrica do produto formado (p-nitrofenol) no comprimento de onda de 400 nm, utilizando um leitor ELISA (Synergy HT, Biotek). A atividade da fosfatase alcalina foi normalizada pelo conteúdo em ADN e expressa em nmol/min.g<sub>ADN</sub><sup>-1</sup>.

### ***Expressão de Genes Osteoblásticos por RT-PCR***

A camada celular presente nas mantas de PCLpuro e PCL/GO foi analisada ao dia 14, por RT-PCR, relativamente à expressão do gene controle GAPDH (*glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase*) e dos genes osteoblásticos RUNX-2 (*Runt-related transcription factor 2*), Col (colagénio tipo I), FA (fosfatase alcalina), BMP-2 (*Bone morphogenic protein-2*), OC (osteocalcina) and OP (osteoprotegerina). O RNA foi extraído com o Kit RNeasy® Mini Kit (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante. A pureza e a concentração do RNA foram determinadas por espectrofotometria ( $A = 260 \text{ nm}$ ). Em seguida, utilizou-se um protocolo standard de RT-PCR. Os *Primers* utilizados estão indicados na Tabela 1. Após a eletroforese, as bandas presentes no gel de agarose foram analisadas por densitometria com o software ImageJ 1.41, para uma análise semi-quantitativa. Os resultados foram normalizados com a banda do gene GAPDH.

### ***Análise Estatística***

Foram efetuadas três experimentos independentes. Em cada experimento, os ensaios quantitativos foram efetuados em triplicata e os ensaios qualitativos em duplicata. Os resultados são apresentados como Média  $\pm$  desvio padrão. As diferenças estatísticas entre os resultados obtidos na manta de PCL puro (controle) e as mantas de PCL/GO foram analisadas pelo teste T-student. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

# Capítulo 5

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES - NANOCOMPÓSITOS DE PCL/NTC

*Neste capítulo, serão apresentados os resultados e discussões da eletrofiação por aplicação de CA/CC simultaneamente dos nanocompósitos de PCL/NTC e PCL assim como as caracterizações das mantas produzidas.*

### 5.1 ELETROFIAÇÃO DE CORRENTE CA/CC

#### 5.1.1 Parâmetros Preliminares

Para as soluções preparadas, diversos testes foram conduzidos visando obter as melhores condições de processamento, ou seja, as condições onde foi possível realizar adequadamente a eletrofiação. Esses parâmetros foram fixados de acordo com os valores apresentados na Tabela 4.3. Para o processamento de PCL, a solução que apresentou melhor resultado de processamento foi a solução denominada solução 2. Para PCL/NTC 0,5% foi a solução denominada solução 3. Essas soluções foram as que não apresentaram problemas como, por exemplo, gotejamento da solução na ponta do capilar durante o processamento e, portanto, foram as únicas condições onde foi possível realizar a eletrofiação de maneira controlada. Isso provavelmente ocorreu devido às propriedades dessas soluções.

Na **Tabela 5.1** estão apresentados os resultados das caracterizações de condutividade elétrica, tensão superficial e pH das soluções de PCL e PCL/NTC 0,5%.

**Tabela 5.1:** Média das medidas de condutividade elétrica, tensão superficial e pH das soluções de PCL e PCL/NTC 0,5%.

<i>Soluções</i>	<i>Condutividade elétrica</i> ( $\mu\text{S/cm}$ )		<i>Tensão superficial</i> ( $\text{mN/m}$ )		<i>pH</i>	
	PCL	PCL/NTC	PCL	PCL/NTC	PCL	PCL/NTC
1	0,5	0,5	25,6	28,0	6	6
2	0,8	0,6	25,0	26,8	6	6
3	0,4	0,9	26,2	23,5	6	6

Para a solução de PCL, observou-se que, embora a tensão superficial e o pH tenham se mantido semelhantes para as três soluções, a condutividade elétrica das soluções 1 e 3 foi menor quando comparada à da solução 2. Uma baixa condutividade pode resultar em alongamento insuficiente do jato para produzir fibras uniformes (Bhardwaj e Kundu, 2010), o que pode ser um fator pelo qual a solução 2 foi a que apresentou melhor processabilidade.

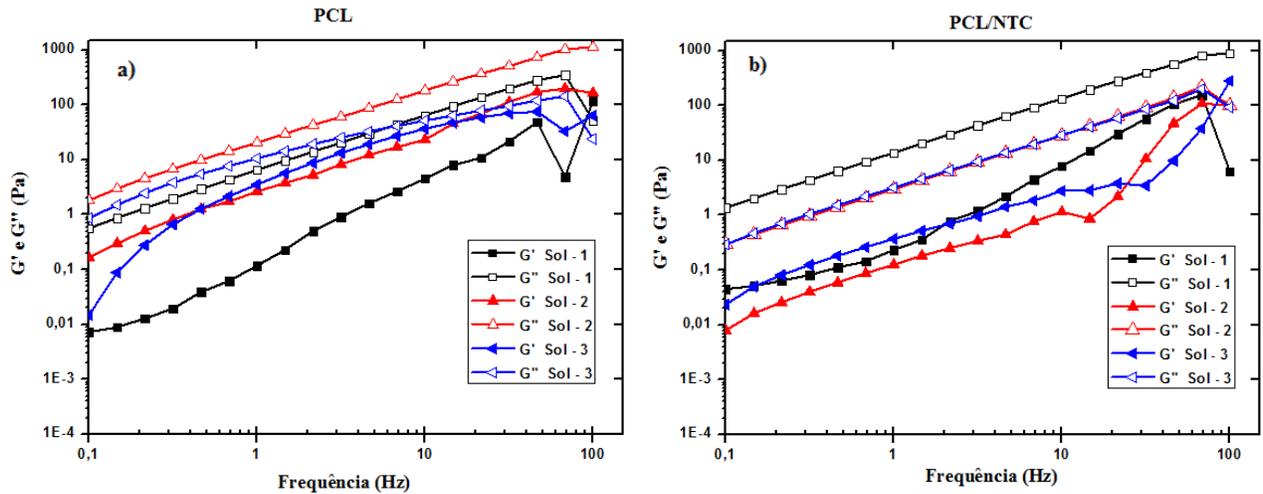
Para PCL/NTC 0,5%, nota-se que nas soluções 1 e 2 a condutividade elétrica foi menor e a tensão superficial foi maior quando comparadas à solução 3. A alta tensão superficial da solução geralmente inibe o processo de eletrofiação causando instabilidade no jato (Bhardwaj e Kundu, 2010), conforme apresentado no Capítulo 2.

Para o sistema PCL/NTC, a solução 3 apresentou maior condutividade elétrica e menor tensão superficial em relação às soluções 1 e 2. Isso indica o fato de que a solução 3 apresentou melhores resultados de processamento.

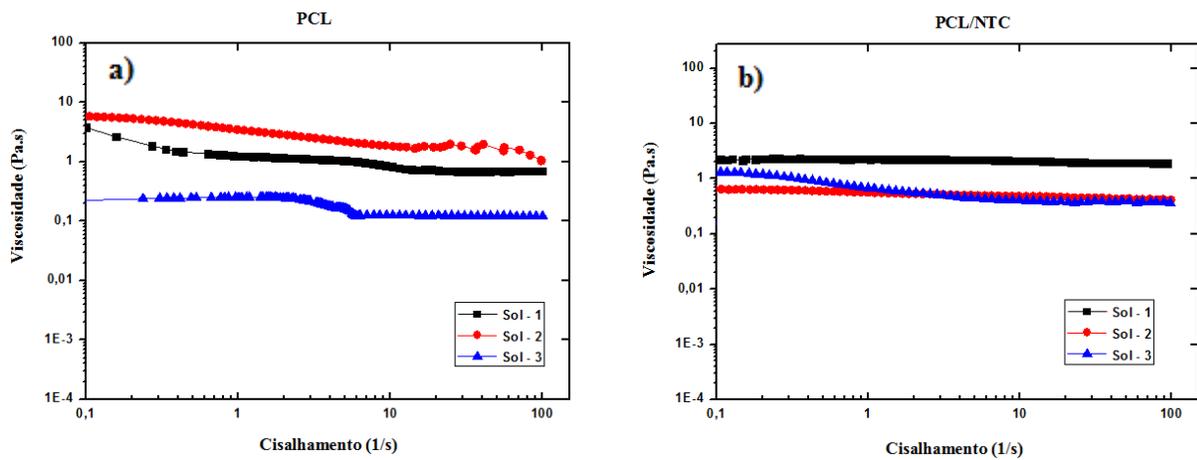
É reportado pela literatura que para a obtenção de um processamento de sucesso, as propriedades da solução são fatores relevantes, tais como, condutividade elétrica, tensão superficial e o comportamento reológico da solução. A concentração da solução define o limite para formação das fibras devido à maior viscosidade. (Bhardwaj e Kundu, 2010, Pekar *et al.*, 2011). Para os nanocompósitos, a reologia é importante, tanto do ponto de vista de processamento, quanto de aplicações, pois está relacionada ao estado de dispersão dos

nanocompósitos, em aspectos como formato, orientação e interações entre as nanopartículas e cadeias poliméricas (Ahmed *et al.*, 2012; Lim e Kyung, 2013).

A **Figura 5.1** mostra o comportamento reológico no ensaio em regime oscilatório de pequena amplitude, onde são apresentados os módulos de armazenamento ( $G'$ ) e perda ( $G''$ ) em função da frequência. A **Figura 5.2** apresenta a variação da viscosidade em função da taxa de cisalhamento, em ensaio de cisalhamento em regime permanente, das diferentes soluções de PCL e PCL/NTC.



**Figura 5.1:** Módulo de armazenamento ( $G'$ ) e de perda ( $G''$ ) das diferentes soluções de PCL e PCL/NTC.



**Figura 5.2:** Viscosidade em função da taxa de cisalhamento das soluções de (a) PCL e (b) PCL/NTC.

O comportamento reológico em regime oscilatório está de acordo com o comportamento viscoelástico esperado para soluções de polímeros flexíveis lineares (Ahmed *et al.*, 2012), ou seja, os valores de  $G'$  em baixas frequências é menor do que  $G''$ , indicando o caráter viscoso da solução. No caso das soluções 1 e 3, pode-se observar o ponto de cruzamento (*crossover*) em frequências intermediárias, indicando que o tempo de relaxação característico (inverso da frequência de *crossover*) das soluções 1 e 3 é maior do que o tempo de relaxação da solução 2.

Deve-se observar, no entanto, que a produção de fibras requer uma viscosidade adequada, uma vez que a baixa viscosidade não apresenta emaranhamentos moleculares suficientes para formação de fibras (Bhardwaj e Kundu, 2010; Qin e Wu, 2012). As curvas de viscosidade apresentadas na **Figura 5.2a**, mostram um comportamento pseudoplástico das soluções de PCL, ou seja, observa-se uma redução na viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento na faixa trabalhada (Bretas e d'Ávila, 2005). Pode-se observar que a viscosidade da solução 3 apresentou valores consideravelmente menores em comparação às soluções 1 e 2. Isso pode ser devido à menor concentração da solução. No entanto, a solução 2 apresentou os maiores valores de viscosidade, apesar de sua concentração ser menor do que a concentração da solução 1. Porém, esses valores são próximos aos valores da solução 1, o que pode indicar que a concentração da solução 3 pode estar abaixo de uma concentração crítica de modos de interações intermoleculares.

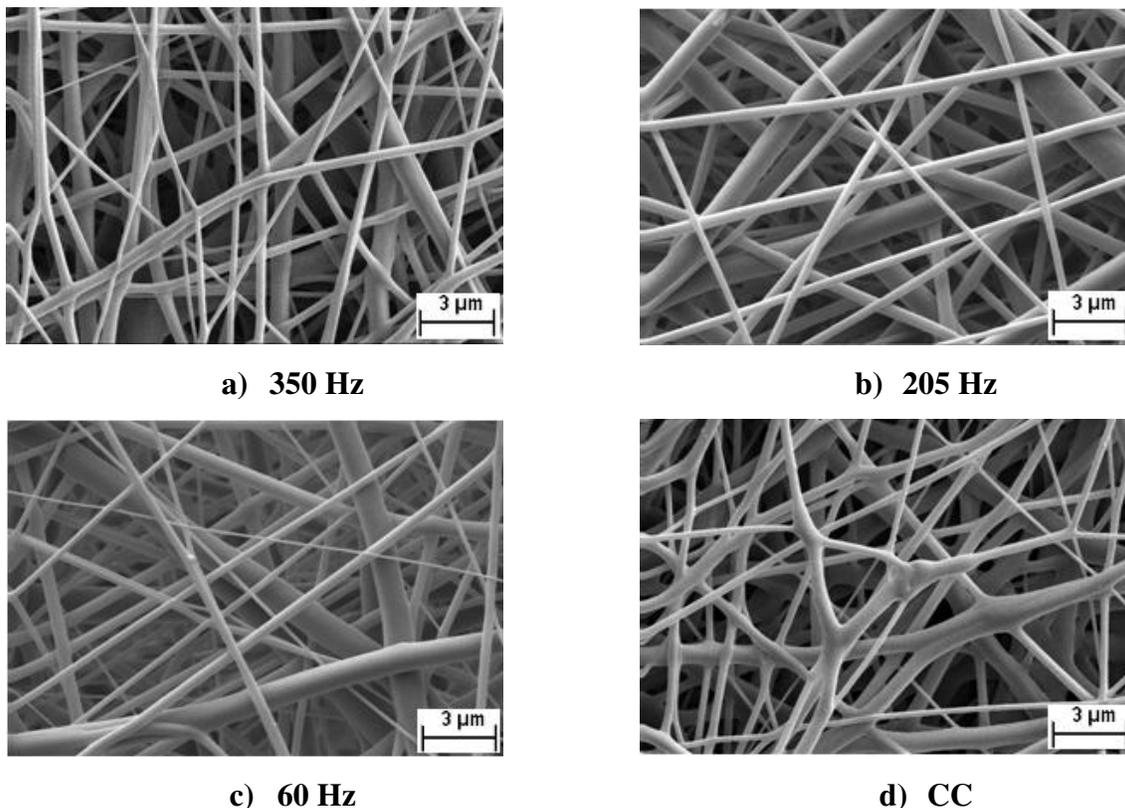
Os resultados obtidos de  $G'$  e  $G''$  apresentado na Figura 5.1b para o sistema PCL/NTC indicou maior predominância da propriedade viscosa ( $G'' > G'$ ) em baixas frequências, sendo que para a solução 2 e 3, pode-se observar o ponto de *crossover*. É reportado pela literatura que  $G'$  em baixas frequências é muito sensível a uma mudança na estrutura interna de compósitos poliméricos (Lim e Kyung, 2013). Em geral, é relatado que os nanocompósitos exibem comportamento predominante de sólido acima do limiar de percolação, onde  $G' > G''$  em baixas frequências, que está relacionado com a formação da rede física da nanopartícula (Ahmed *et al.*, 2012). No caso deste trabalho, esse comportamento não foi observado, mostrando que não houve a formação de uma rede percolada na solução de PCL com NTC disperso.

A presença de nanotubos de carbono nas soluções de PCL/NTC levou a uma redução viscosidade das soluções 1 e 2, que pode ser observado comparando-se os resultados da **Figura 5.2b** com os resultados da figura 5.2a. Ainda, a presença do NTC nas soluções 1 e 2 levou essas a ter comportamento Newtoniano. Estudos sugerem que as partículas anisotrópicas podem ser alinhadas com a direção do fluxo, o que pode acarretar em redução da viscosidade da solução e à menor dependência da viscosidade com a taxa de cisalhamento.

Por outro lado, a presença de NTC na solução 3 acarretou num aumento considerável da viscosidade, indicando um mecanismo diferente de interação entre o NTC e a solução. Esse aumento de viscosidade na solução 3 fez com que essa solução atingisse uma viscosidade adequada para realizar a eletrofiação, sendo que para o caso da solução 3 sem NTC, a baixa viscosidade da solução impossibilitou a realização da eletrofiação.

### 5.1.2 Eletrofiação e obtenção das mantas de PCL e PCL/NTC

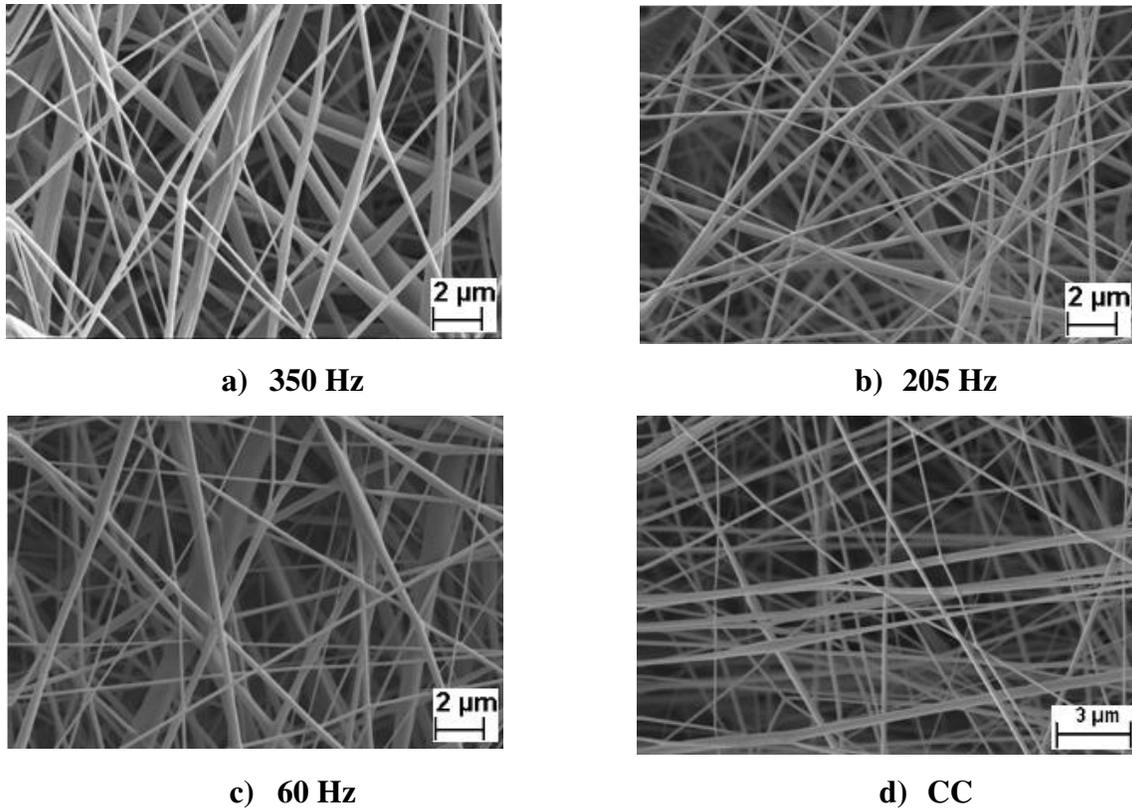
Na **Figura 5.3** são apresentadas as imagens de MEV que indicam a morfologia e os diâmetros das fibras de PCL obtidas por eletrofiação em diferentes frequências a partir da solução 2.



**Figura 5.3:** Imagens obtidas por MEV das fibras de PCL obtidas por eletrofiação aplicando potencial elétrico CA/CC simultaneamente, (a) 350 Hz, (b) 205 Hz, (c) 60 Hz, e (d) aplicando corrente contínua CC.

As **Figura 5.3a - c** revelam que as morfologias das fibras se apresentam de forma contínua quando aplicado um potencial elétrico CA/CC simultaneamente. Tal ocorrência pode ser oriunda da estabilidade do jato com a aplicação do campo elétrico CA (Ochanda, *et al.*, 2012). Na imagem 5.3d, onde as fibras foram obtidas pelo método convencional, aplicando apenas um potencial elétrico CC, ficam evidenciadas ramificações e descontinuidade entre as fibras. Pode-se notar que os diâmetros variam nas figuras apresentadas.

Na **Figura 5.4** são apresentadas as imagens de MEV que indicam a morfologia e os diâmetros das fibras de PCL/NTC 0,5% obtidas por eletrofição a partir da solução 3.



**Figura 5.4:** Imagens obtidas por MEV das fibras do sistema PCL/NTC eletrofiadas aplicando potencial elétrico CA/CC simultaneamente (a) 305 Hz, (b) 205Hz, (c) 60Hz e (d) aplicando corrente contínua (CC).

De maneira diferente às fibras de PCL, pode-se notar que as fibras dos nanocompósitos obtidas, apresentaram continuidade na morfologia para todas as condições. Isso pode ser devido ao fato da solução 3 contendo NTC apresentou o maior valor de condutividade elétrica, menor tensão superficial e viscosidade adequada à realização da eletrofição, conforme discutido na seção 5.1.1.

Na **Tabela 5.1**, são apresentados os diâmetros médios das fibras de PCL e PCL/NTC nas diferentes frequências CA. Os diâmetros médios foram medidos a partir das imagens de MEV, de acordo com o procedimento descrito no Capítulo 4.

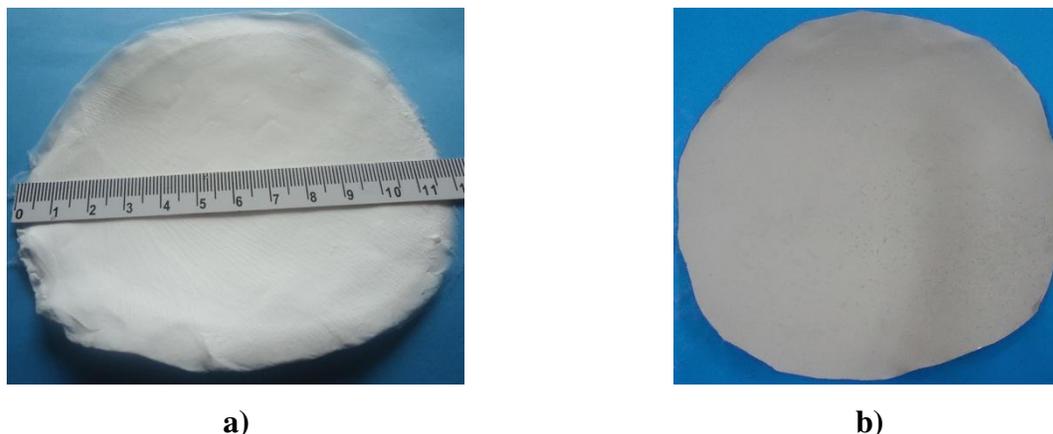
**Tabela 5.1:** Diâmetros médios das fibras formadas pelas fibras eletrofiadas.

<i>Amostras</i>	<i>Diâmetro médio das fibras [nm]</i>	
	PCL	PCL/NTC 0,5%
350 Hz	580 ± 332	576 ± 231
205 Hz	712 ± 328	651 ± 299
60 Hz	819 ± 452	745 ± 354
CC	1354 ± 498	638 ± 215

Pela **Tabela 5.1**, pode-se observar uma diminuição do diâmetro médio das fibras com o aumento da frequência, principalmente para a eletrofição do PCL, onde a dependência do diâmetro médio com a frequência é mais acentuada. O uso do sistema CA/CC tende a diminuir diâmetros médios com a elevação das frequências durante a eletrofição, além de permitir a diminuição da instabilidade inerente ao jato. Estudos anteriores relatam que para melhor controle dos diâmetros pode-se alterar a tensão aplicada do sistema (Ishii, Sakai e Murata, 2008; Yijun, Qinghua e Riguang, 2012). A aplicação de campos elétricos gerados por corrente alternada (CA) propiciou um favorecimento das características morfológicas finais das fibras sem a necessidade do aumento da tensão aplicada. No caso dos nanocompósitos, a dependência do diâmetro das fibras em função da frequência foi menor, sendo que o diâmetro médio obtido pelo método convencional (CC) foi menor do que os diâmetros médios obtidos para as frequências de 60 e 205Hz. Pode-se observar que o diâmetro médio das fibras de PCL são maiores do que o diâmetro médio das fibras de PCL/NTC, quando processados em CC. Por outro lado, quando processados em CA/CC os diâmetros médios do PCL e PCL/NTC apresentaram diâmetros com valores próximos. Essa observação também mostra o efeito da presença do campo elétrico alternado na eletrofição, onde este influencia nos padrões de escoamento e na estabilidade do jato durante o processo (Kessick, Fenn e Tepper, 2004; Lee, Yoon e Kim, 2009).

As fibras eletrofiadas formam mantas com aspecto macroscópico flexível, de fácil manipulação, possibilitando o dobramento e o corte, similar a de um tecido. As dimensões do diâmetro de uma manta podem se aproximar da área do coletor e apresentar espessura de até 0,50 a 0,80 mm dependendo do volume da solução a ser eletrofiada, conforme pode ser visualizado na

**Figura 5.5.** Estudos relatam que, dependendo do tipo de material eletrofiado, como o PCL, mantas com tais características podem ser utilizadas para auxiliar em regeneração tecidual. (Xie, Li e Xia, 2008).

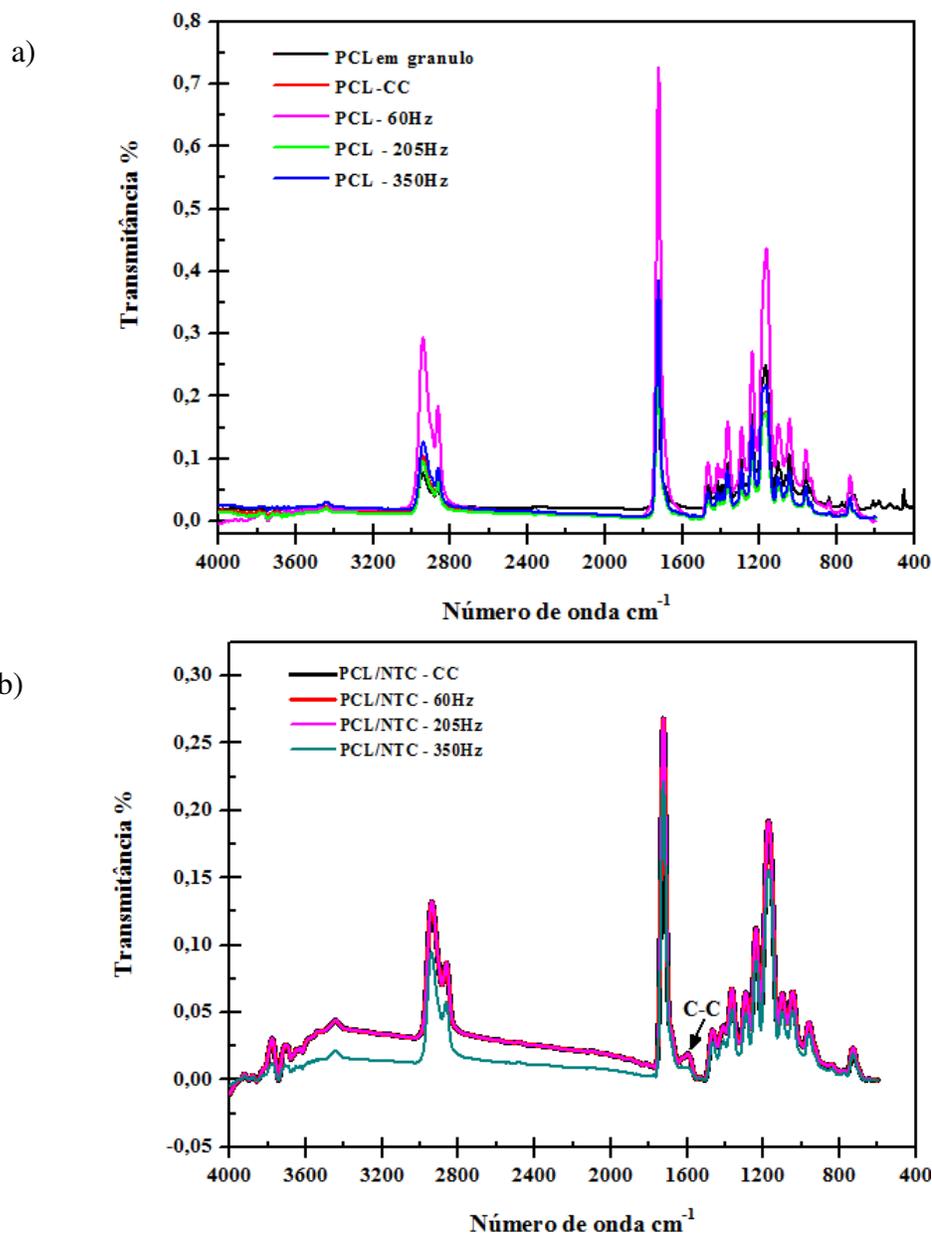


**Figura 5.5:** Fotografias das mantas obtidas por eletrofição: a) PCL e b) PCL/NTC.

### **5.1.3 Caracterização por Espectroscopia de Absorção na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)**

Para investigar a interação entre a composição química do PCL e do NTC nas mantas eletrofiadas, foram analisados os espectros vibracionais obtidos por espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).

Na **Figura 5.6a**, são mostrados os espectros do FT-IR do PCL das mantas eletrofiadas nas diferentes frequências. Na **Figura 5.4b**, estão os espectros das mantas nas diferentes frequências eletrofiadas de PCL/NTC .



**Figura 5.6:** Espectros de FT-IR do (a) PCL como recebido e das mantas PCL; b) mantas de PCL/NTC.

No espectro da **Figura 5.6a**, foram observadas bandas características de ligação C-H alifático a 2942 e 2865  $\text{cm}^{-1}$  (estiramento), a 1467 e 1365  $\text{cm}^{-1}$  (deformação) e a 731  $\text{cm}^{-1}$  (deformação). Também foram observadas bandas características de ligação C=O de ésteres (acrilatos) a 1723  $\text{cm}^{-1}$ , assim como as bandas a 1238, 1164 e 1104  $\text{cm}^{-1}$  são características de ligação C-O, também do grupo funcional éster.

Pela atribuição espectroscópica, nota-se que o espectro da amostra apresenta bandas características da Poli(caprolactona) (PCL), mostrando que não houve alteração da estrutura molecular do polímero durante o processamento.

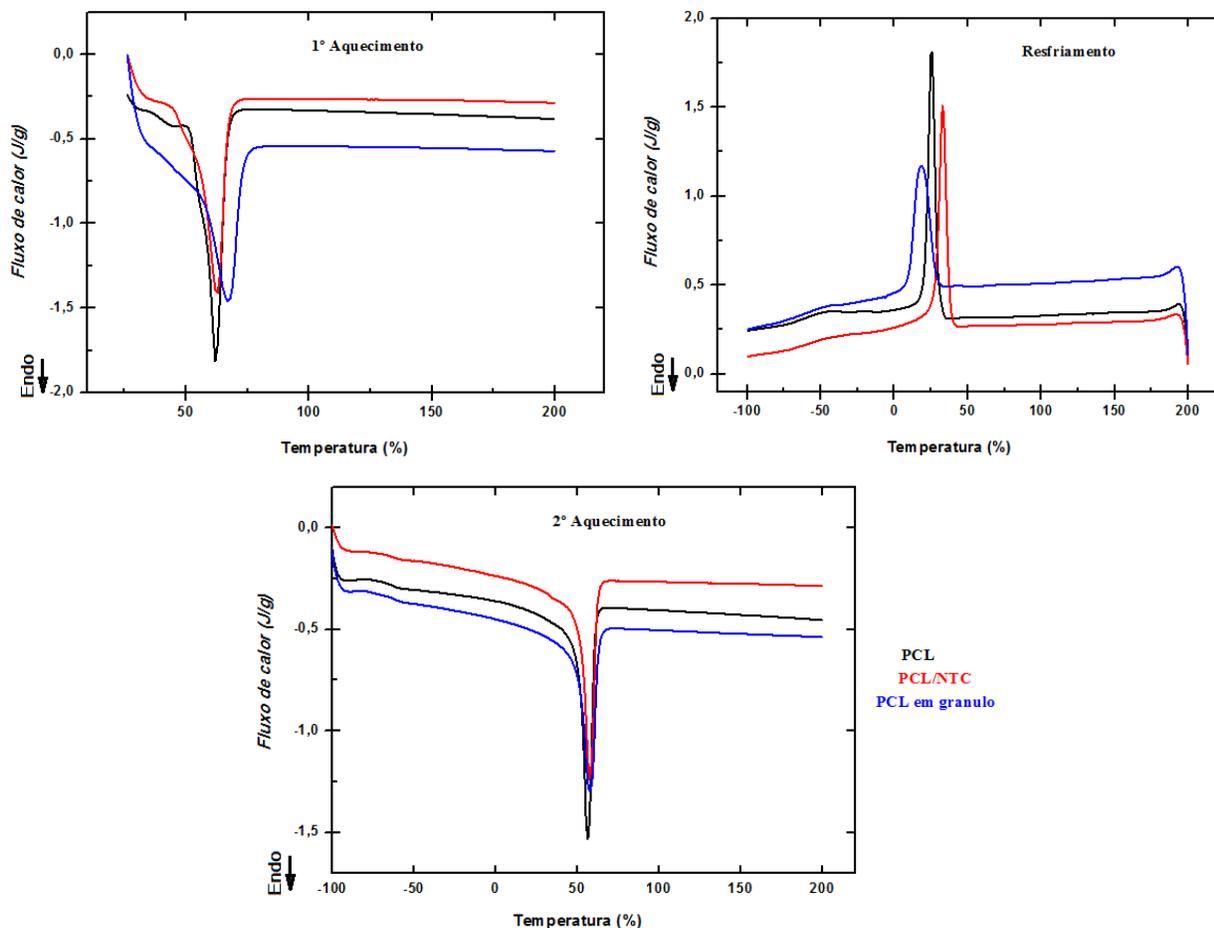
Para as amostras apresentadas nas **Figura 5.6b**, os espectros de infravermelho possuem o mesmo padrão de bandas presentes no espectro das amostras de PC. É possível caracterizar essas amostras como PCL também, exceto pela banda por volta de  $1600\text{ cm}^{-1}$ , observada nas amostras (em relação à amostra de PCL), atribuídas as ligações C-C (Saeed *et al.*, 2006). Esses resultados sugerem a formação do nanocompósito PCL/NTC, em que os NTCs foram incorporados às fibras.

#### 5.1.4 Propriedades Térmicas

##### *Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)*

Utilizou-se o DSC a fim de analisar se houve a ocorrência de alteração nas temperaturas de transições do PCL durante a preparação da solução e processamento das mantas. Nessa técnica, é possível determinar temperaturas de transição características dos materiais estudados, como as temperaturas de transição vítrea ( $T_g$ ), cristalização ( $T_c$ ) e fusão cristalina ( $T_m$ ).

Na **Figura 5.7** estão os termogramas do 1º aquecimento. Na curva de resfriamento, estão indicadas as temperaturas de transições ( $T_g$  e  $T_c$ ) e, no 2º aquecimento, a temperatura de fusão ( $T_m$ ) das mantas de PCL e PCL/NTC. Na **Tabela 5.2** estão apresentadas as temperaturas de transição, assim como as entalpias das respectivas transições e o grau de cristalinidade calculado a partir da entalpia de fusão ( $\Delta H_f$ ).



**Figura 5.7:** Curvas de DSC para os sistemas PCL, PCL/NTC e PCL tal como recebido do fornecedor.

**Tabela 5.2** – Dados obtidos a partir das curvas de DSC do PCL tal como recebido e das mantas eletrofiadas de PCL e PCL/NTC .

Amostra	Primeiro aquecimento			Resfriamento			Segundo aquecimento		
	Tm (°C)	ΔHf (J/g)	Xc (%)	Tg (°C)	Tc (°C)	ΔHc (J/g)	Tm (°C)	ΔHf (J/g)	Xc (%)
PCL em granulo	67,2	74,8	55	-58,5	18,3	53,6	57,5	57,8	42
PCL	62,1	62,4	45,8	-55,4	25,3	57,0	56,4	56,5	41,5
PCL/NTC	62,6	65,7	48	-55,0	33,0	56,8	57,5	63,7	46,6

\* ΔHf do PCL 100% cristalino = 136 J/g (Ruelle *et al.*, 2012).

Na **Figura 5.7**, pode-se observar que para ambas as amostras no primeiro e no segundo aquecimento ocorreu apenas um evento endotérmico, associado à fusão do polímero, o que indica não haver indícios dos solventes utilizados nas mantas. Para um processo de eletrofiação bem sucedido é importante que o polímero seja totalmente dissolvido durante a preparação da solução e o solvente utilizado seja totalmente evaporado durante o processamento (Bahardwaj e Kundu, 2010). Pelo fato de os solventes possuírem propriedades tóxicas, é inviável a presença de tais substâncias no uso biológico das mantas.

As temperaturas  $T_m$  e  $T_g$  mantiveram-se semelhantes, porém a  $T_c$  apresentou um aumento substancial em torno de  $8^\circ\text{C}$ . Algo semelhante foi relatado em outras pesquisas com a incorporação de NTC e outros tipos de nanopartículas. *Mitner et al. (2002)* destacam que tal ocorrência se deve ao alto impacto do NTCs na nucleação de cristais do PCL (*Ahamed et al., 2012; Ruelle et al., 2012*).

Observa-se pela **Tabela 5.2** que no primeiro aquecimento, as amostras de PCL/NTC apresentaram maior grau de cristalinidade, comportamento provável devido ao efeito da nucleação com a interação do NTC (*Trujillo et al., 2012; Ruelle et al., 2012*). Ainda, no segundo aquecimento, após o histórico de processamento ter sido eliminado, é claramente observada a influência da adição de NTC nas fibras. Os resultados obtidos das amostras de PCL como recebido e da amostra de PCL eletrofiada, ambos obtiveram menor grau de cristalinidade no segundo aquecimento com valores semelhantes, o que mostra o efeito nucleante dos nanotubos de carbono.

Comparando-se os graus de cristalinidade  $X_c$  calculados para o primeiro e segundo aquecimentos, pode-se observar um maior grau de cristalinidade das fibras (primeiro aquecimento). Essa observação está de acordo com o esperado, pois o processo de fiação induz uma forte orientação molecular, promovendo a cristalização do polímero.

A literatura reporta que fibras de menor diâmetro ou produzidas a partir de soluções de menor concentração de polímero na solução apresentam maior grau de orientação molecular e cristalinidade (*Lim, Tan e Ng, 2008*). Conforme já mencionado na seção 5.1.2, o diâmetro médio

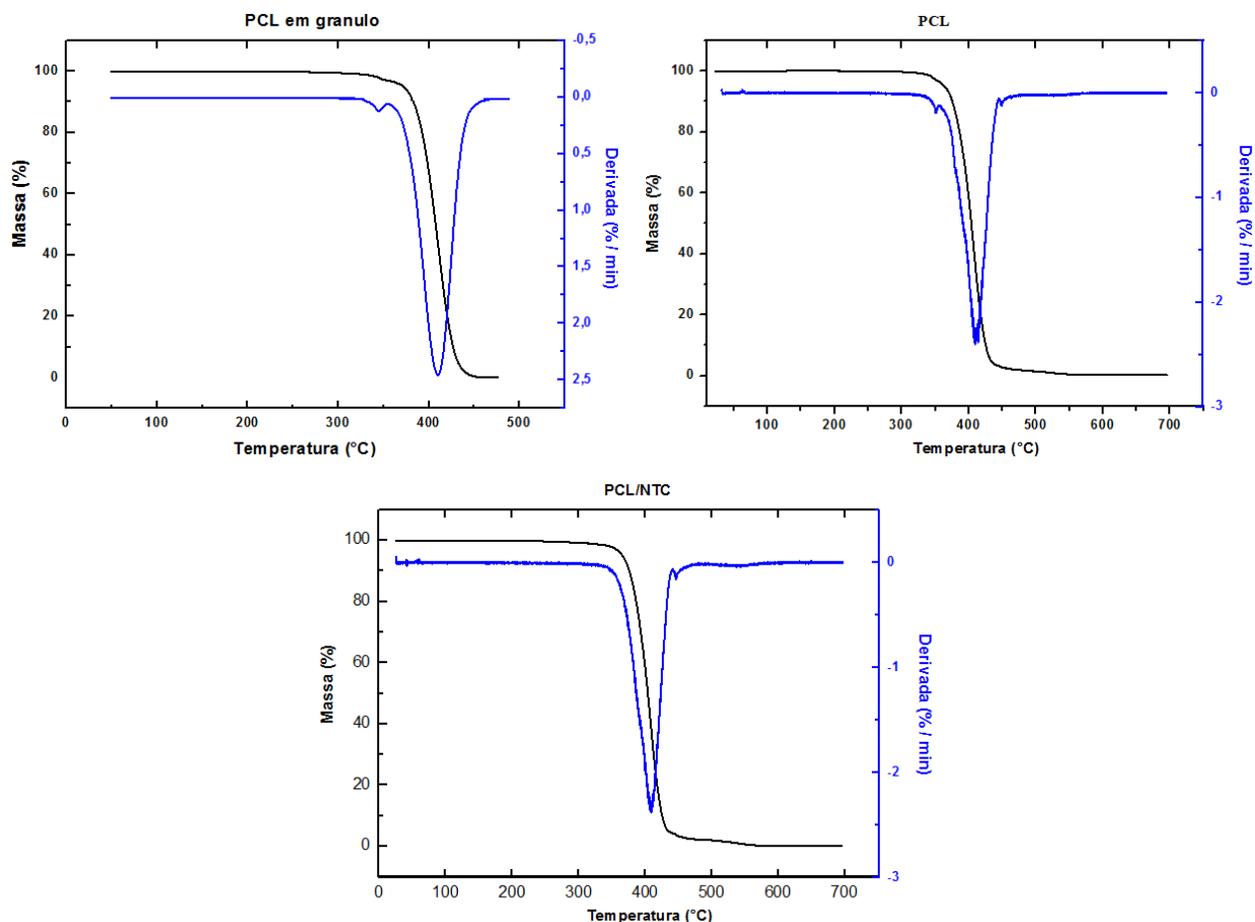
das fibras do sistema PCL/NTC foi menor do que o diâmetro médio da amostra de PCL. No entanto, pode-se observar que esse efeito não foi significativo para o grau de cristalinidade, pois, comparando-se as entalpias de fusão do PCL e do PCL/NTC no primeiro e segundo aquecimentos, pode-se observar que a diferença entre os graus de cristalinidade do PCL/NTC e do PCL foi maior no segundo aquecimento. Isso mostra que o aumento do grau de cristalinidade do nanocompósito foi devido, predominantemente, à presença dos nanotubos de carbono.

### ***Análise Termogravimétrica (TGA)***

As **Figura 5.8** mostram as curvas de TGA no intervalo de 25–700 °C, em que se apresenta a temperatura inicial da perda de massa e o pico de máxima velocidade de decomposição das mantas de PCL e PCL/NTC.

Através dessa técnica, foi possível verificar a presença de solventes e aditivos pelo deslocamento dos termogramas. Os solventes clorofórmio e acetona apresentam ponto de evaporação de 56°C e 61°C, respectivamente. Pelas curvas de TG, pode-se observar que não houve nenhuma alteração visível nesses intervalos de temperatura, apenas as variações de massa, indicativas da degradação do polímero, tendo em vista que os polímeros PCL são degradados na faixa de 200 a 350°C (Ruelle *et al.*, 2012).

A **Tabela 5.3** mostra os resultados obtidos de perda de massa e picos de temperaturas de máxima velocidade de decomposição.



**Figura 5.8:** Curvas de TGA do PCL em granulo, da manta eletrofiada de PCL e PCL/NTC.

**Tabela 5.3** – Dados termogravimétricos obtidos nas curvas de TGA do PCL tal como recebido e das mantas eletrofiadas de PCL e PCL/NTC.

Amostra	T <sub>inicial</sub> (°C)	T <sub>final</sub> (°C)	Pico <sub>decomposição</sub> (°C)
PCL em granulo	325	455	410
PCL	310	535	410
PCL/NTC	330	560	410

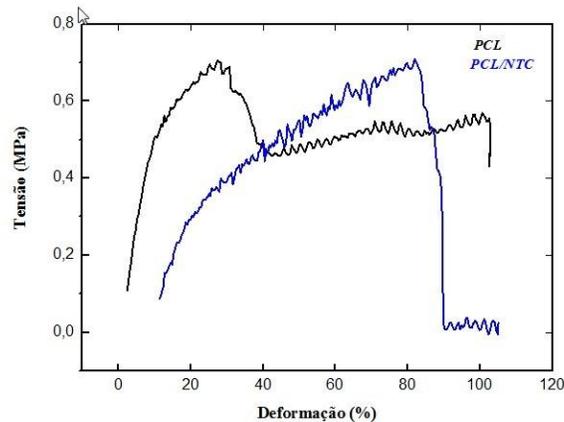
Os termogramas mostram que as mantas de PCL e PCL/NTC apresentaram estabilidade térmica, similares. Porém, a **Tabela 5.3** mostra que a temperatura inicial de massa para PCL/NTC é 20°C superior ao PCL, indicando que a incorporação de NTC no PCL exerce um

efeito na degradação térmica das fibras. Estudos anteriores concluíram que a adição de pequenas quantidades de NTC na matriz de PCL pode influenciar na sua estabilidade térmica (Saeed *et al.*, 2006; Chen e Wu, 2007).

### 5.1.5 Caracterização Mecânica

#### Tração

A **Figura 5.9** apresenta curvas de tensão versus deformação das mantas eletrofiadas de PCL e PCL/NTC processadas a 305 Hz, que foram as amostras que apresentaram o menor diâmetro das fibras. Na **Tabela 5.4**, são apresentados os valores das propriedades relativas aos ensaios de tração, com valores referentes a uma média de oito repetições de cada manta eletrofiada de PCL e PCL/NTC.



**Figura 5.9:** Curva tração versus deformação das mantas de PCL e PCL/NTC.

**Tabela 5.4:** Média dos valores obtidos nas análise das propriedades mecânicas.

Amostra	Tensão na ruptura (MPa)	Módulo de elasticidade (MPa)	Alongamento (%)
PCL	$0,638 \pm 0,109$	$4,376 \pm 0,622$	$< 102,76 \pm 25,68$
PCL/NTC	$0,686 \pm 0,199$	$1,812 \pm 0,408$	$66,40 \pm 18,42$

Para as amostras de PCL, os corpos de provas não chegaram à ruptura total, pois as fibras vão formando camadas umas sobre as outras. Assim, quando se rompe uma camada, a outra continua alongando. Já as amostras processadas com os nanocompósitos de PCL/NTC apresentaram rompimento total, que ocorreu próximo a garras de fixação. Não houve ocorrência de materiais que não chegaram à ruptura dentre as amostras de PCL. Quando uma camada se rompeu, a outra se manteve alongando até o máximo do equipamento.

Pode-se observar que o módulo das mantas de PCL/NTC foram menores do que das mantas de PCL. Apesar de se esperar um aumento do módulo com a adição de NTC nas fibras, fatores como porosidade, orientação das fibras, forma de deposição das camadas das fibras, podem influenciar nas propriedades mecânicas das mantas (Liao *et al.*, 2012).

### 5.1.6 Resistividade

Na análise de resistividade, foi possível observar que as mantas de PCL/NTC na proporção de 0,5% de NTC mantiveram-se isolantes conforme resultados indicados na **Tabela 5.5**,

**Tabela 5.5:** Valores de resistividade obtidos para as mantas de PCL e PCL/NTC.

	PCL	PCL/NTC
<b>Resistividade (ohm/cm)</b>	4,96E+13	2,26E+14
	5,60E+13	1,35E+14
	4,43E+13	1,28E+14
	4,05E+13	2,35E+14
	4,57E+13	1,76E+14

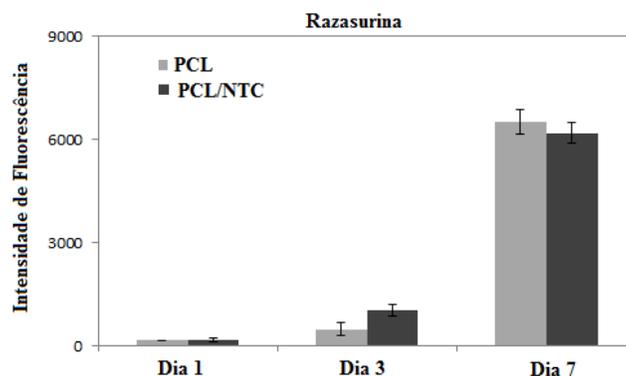
Em nanocompósitos poliméricos, quando ocorre a dispersão de nanopartículas, pode ocorrer à formação de uma estrutura de rede interligada condutora contínua na matriz polimérica

acima de uma concentração crítica das nanopartículas, conhecida por limiar de percolação. Portanto, no caso do nanocompósito de PCL/NTC, o limiar de percolação não foi atingido.

Estudos relatam que para obter o caráter condutivo, a proporção de carga condutora deve atingir a limiar de percolação entre os materiais (Maiti, *et al.*, 2013). A literatura relata também que compósitos poliméricos com nanotubos de carbono apresentam um baixo limiar de percolação para a condutividade elétrica, devido às suas proporções elevadas a limiar de percolação. Nesses casos, a limiar de percolação com a mistura de nanocompósitos se dá acima de 1 a 1,5% em massa entre materiais, (Ramaswamy, Clarke e Gorga, 2011; Maiti, *et al.*, 2013). Lim e Kyung, 2013 observaram em um estudo de nanocompósitos de PCL/NTC que houve um aumento considerável da condutividade em concentrações acima de 0,5% de NTC.

## 5.2 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA IN VITRO DAS MANTAS ELETROFIADAS DE PCL/NTC

A resposta à viabilidade/proliferação das células as mantas de PCL e PCL/NTC foi avaliada em culturas celular em osteoblastos humanos (MG63), por ensaio da Rezasurina e a atividade da Fosfatase alcalina. A Figura 5.10 apresenta atividade metabólica ao longo do tempo de acordo com o procedimento descrito no capítulo 4.

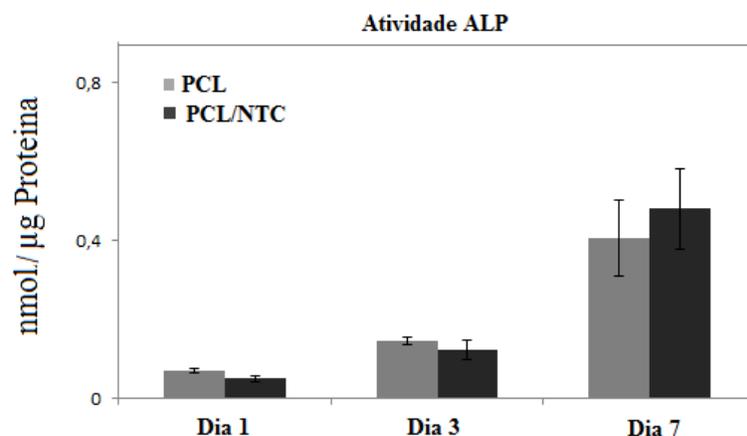


**Figura 5.10:** Viabilidade/proliferação celular em osteoblastos humanos (MG63) cultivadas na superfície das mantas de PCL e PCL/NTC (os valores são a média e desvio padrão)

Os resultados da viabilidade/proliferação celular são expressos em termos de unidades relativas de fluorescência, entretanto mostraram que as células osteoblásticas aderiram as mantas de PCL e PCL/NTC e que proliferaram ao longo do tempo de cultura. A manta de PCL/NTC causou um estímulo no crescimento celular, o qual foi notório no dia 3. No dia 7 de cultura a viabilidade celular foi semelhante para ambos os materiais.

### *Atividade de Fosfatase Alcalina*

Foi analisada a atividade da fosfatase alcalina, uma enzima que constitui um marcador do fenótipo osteoblástico. A **Figura 5.11** apresenta no gráfico os resultados obtidos.



**Figura 5.11:** Atividade de fosfatase alcalina (FA) das culturas de MG63 cultivadas na superfície das mantas de PCL e PCL/NTC.

As células cultivadas nas mantas de PCL e PCL/NTC sintetizaram fosfatase alcalina, não demonstrando diferenças entre os dois materiais, concluindo-se que a manta de PCL/NTC demonstrou induzir o crescimento celular, sem interferir com a atividade funcional das células.

## Capítulo 6

### 6. RESULTADOS E DISCUSSÕES – NANOCOMPÓSITOS DE PCL/GO

*Neste capítulo serão apresentados os resultados e discussões da eletrofiação dos nanocompósitos de PCL/GO, assim como as caracterizações das mantas produzidas, seguidas da avaliação dos procedimentos de viabilidade celular.*

#### 6.1 CARACTERIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE PCL/GO

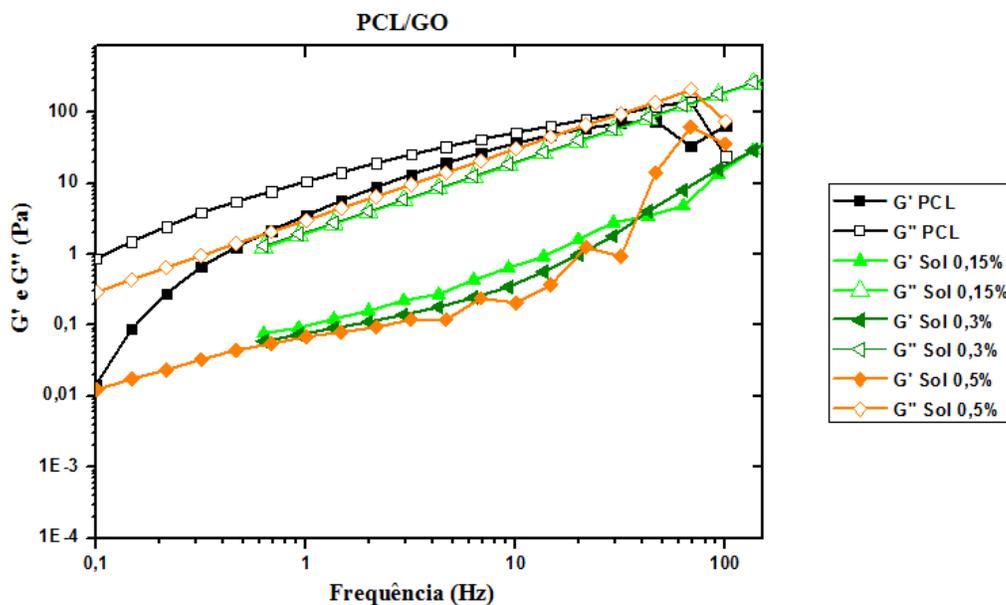
Foram preparadas soluções de PCL em clorofórmio e acetona, onde diferentes concentrações de GO foram dispersas na solução, conforme descrito nas seções 4.2 e 4.3. A **Tabela 6.1** apresenta os valores medidos de condutividade elétrica e tensão superficial para as diferentes soluções preparadas.

**Tabela 6.1:** Valores médios de condutividade elétrica, tensão superficial e pH das soluções de PCL e PCL/GO.

<i>Amostra</i>	<i>PCL</i>	<i>PCL/GO 0,15%</i>	<i>PCL/GO 0,3%</i>	<i>PCL/GO 0,5%</i>
<b>Condutividade elétrica (<math>\mu\text{S/cm}</math>)</b>	0,4	0,5	0,9	0,6
<b>Tensão superficial (<math>\text{mN/m}</math>)</b>	26,2	26,9	26,5	27,5
<b>pH</b>	6	6	6	6

Pode-se observar que os valores de tensão superficial e pH para todos os casos foram similares. Em relação à condutividade elétrica, pode-se observar que a presença de GO acarretou em um aumento desta propriedade, devido ao fato do GO possuir alta condutividade elétrica. No entanto, o maior valor de condutividade foi observado para a solução com 0,3% de grafeno. Tal ocorrência pode ter se dado devido à técnica de sonificação comumente usada para dispersão do GO, o que pode reduzir a proporção de plaquetas esfoliadas, podendo afetar negativamente como reforço nas propriedades elétricas e térmicas. Assim, técnicas de suspensão pode promover um controle da morfologia, ou seja, mais alongada ou alinhada, influenciando nas propriedades do GO (Potts, 2011).

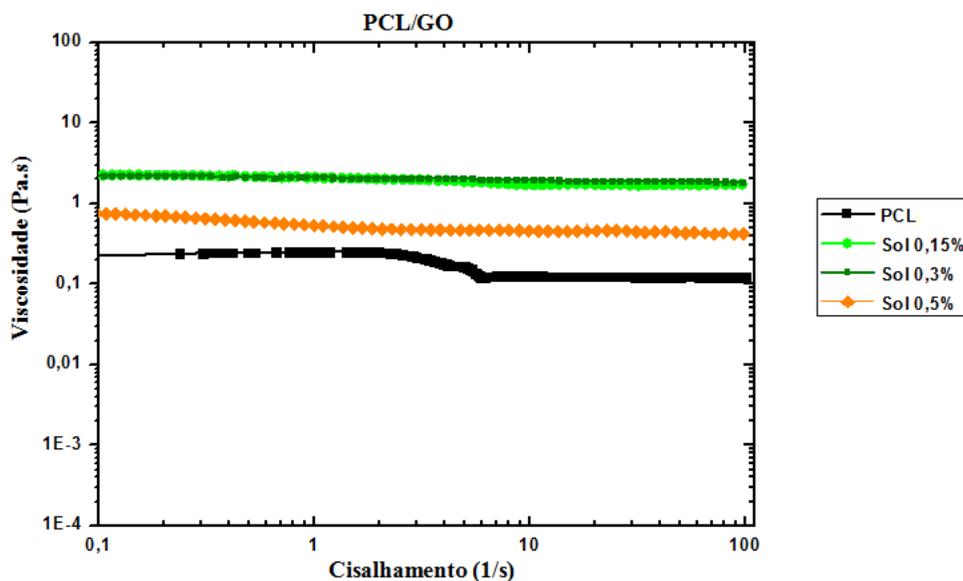
A **Figura 6.1** mostra o comportamento reológico em ensaio em regime oscilatório de pequena amplitude dos módulos de armazenamento ( $G'$ ) e de perda ( $G''$ ) das soluções de PCL e de PCL/GO nas diferentes concentrações de GO.



**Figura 6.1:** Módulo elástico ( $G'$ ) e viscoso ( $G''$ ) das soluções de PCL/GO nas diferentes concentrações e PCL.

Os resultados apresentados na **Figura 6.1** indicam que as soluções/suspensões possuem comportamento predominantemente viscoso a baixas frequências ( $G'' > G'$ ). Pode-se observar

que o comportamento reológico para a solução de PCL é típico do comportamento de soluções poliméricas de polímeros lineares, onde  $G'' > G'$  em baixas frequências e  $G'' < G'$  em altas frequências, indicando o caráter viscoelástico da solução.



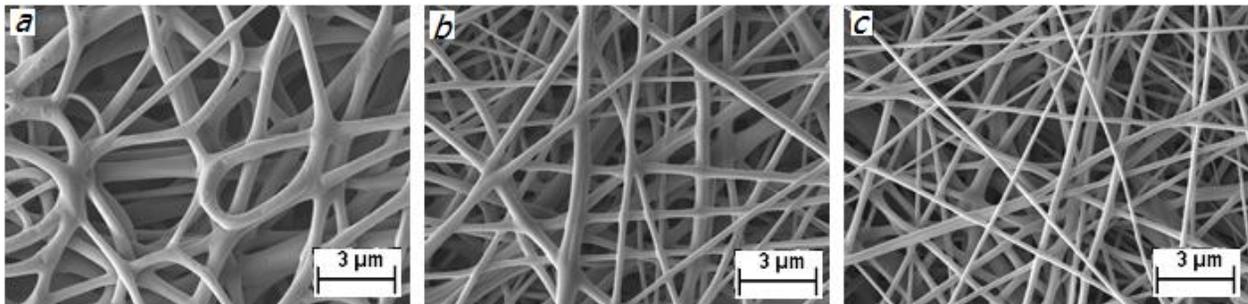
**Figura 6.2:** Viscosidade em função da taxa de cisalhamento da solução de PCL e das soluções de PCL/GO nas diferentes concentrações.

Com a adição do óxido de grafeno na solução de PCL observa-se o aumento da viscosidade da solução. Porém quando comparada entre as diferentes concentrações nas soluções de PCL/GO é possível observar, pela **Figura 6.2**, que com o aumento da concentração de GO na solução (0,5%), ocorre uma diminuição na viscosidade, com comportamento pseudoplástico.

Conforme discutido no Capítulo 5, a solução de PCL não formou fibras, tal ocorrência, pode ter se dado devido à baixa viscosidade da solução, onde esta não apresenta emaranhamentos suficientes para formação de fibras, e sim de gotas. (Bhardwaj e kundu, 2010; Qin e Wu, 2012).

## 6.2 ELETROFIAÇÃO E OBTENÇÃO DAS MANTAS DE PCL/GO POR APLICAÇÃO DE POTENCIAL CC

Na **Figura 6.3** são apresentadas as imagens de MEV que indicam a morfologia e os diâmetros das fibras de PCL/GO obtidas por eletrofiação com aplicação de um potencial CC com diferentes proporções de GO na solução.



**Figura 6.3:** Imagens das mantas de PCL/GO obtidas por MEV a) 0,15%; b) 0,3%; c) 0,5%

É possível visualizar nas figuras acima que com as diferentes proporções de GO na solução, as fibras obtiveram particularidades em sua morfologia, que podem ser atribuídas à diferença de viscosidade das soluções como apresentado pela **Figura 6.2** causada com a adição do GO, assim como o efeito da presença de GO na condutividade elétrica. Na **Tabela 6.2** são apresentados os diâmetros médios das fibras e a resistividade das mantas formadas.

**Tabela 6.2:** Diâmetros médios das fibras e resistividade das mantas formadas pelas fibras PCL/GO.

<i>Amostras</i>	<i>Diâmetro médio [nm]</i>	<i>Resistividade (ohm/cm)</i>
PCL/GO 0,15%	819 ± 453	7,73E+13
PCL/GO 0,30%	712 ± 328	5,08E+13
PCL/GO 0,50%	581 ± 333	6,40E+13

Nota-se pela **Tabela 6.2** que correu um decréscimo nos diâmetros médios das amostras com o aumento da concentração de GO na solução. O menor diâmetro médio observado foi para a amostra com 0,5% de GO, provavelmente, devido ao fato da baixa viscosidade da solução/suspensão para este caso.

Pode-se observar que em todas as amostras a resistividade elétrica foi elevada, mostrando que presença de GO em diferentes proporções não influenciou significativamente nas propriedades elétricas das mantas, que se mantiveram isolantes. Tal ocorrência indica que o limiar de percolação das nanopartículas não foi atingido.

A **Tabela 6.3** apresenta os valores obtidos do ângulo de contato externo de uma gota de água com a superfície das mantas secas em temperatura ambiente.

**Tabela 6.3:** Resultados obtidos de ângulo de contato das mantas formadas pelas fibras de PCL/GO e PCL.

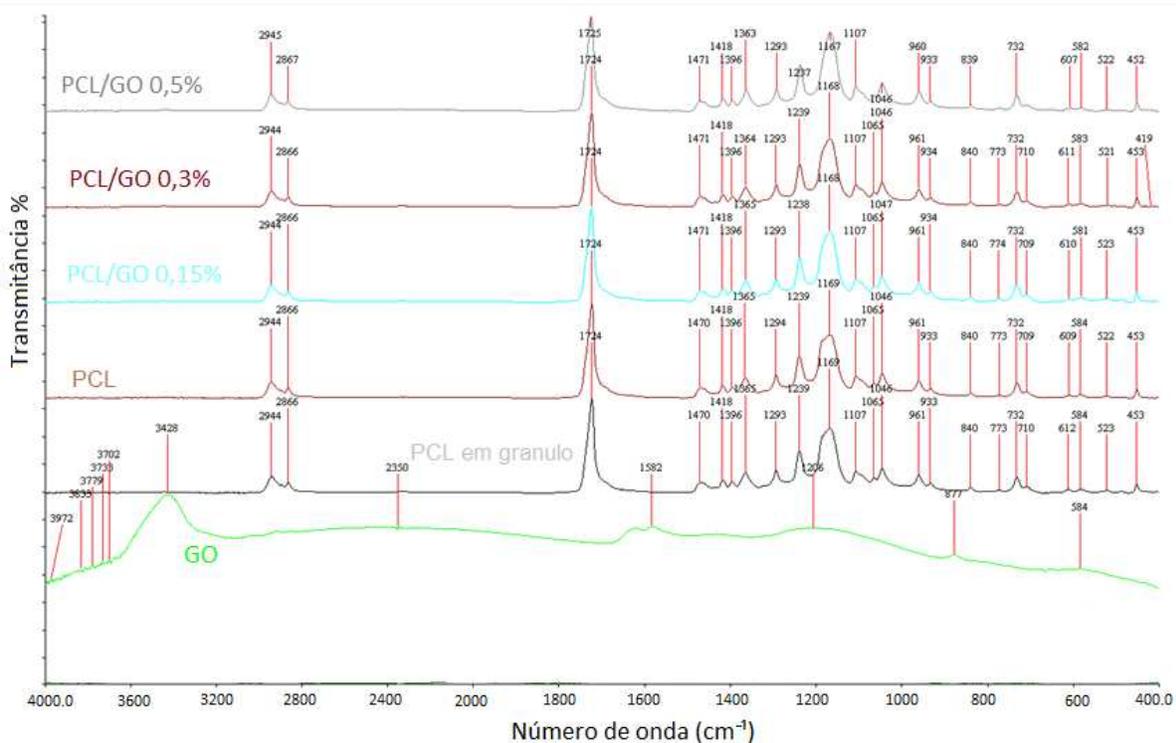
<i>Amostras</i>	<i>Ângulo de Contato (graus)</i>
PCL/GO 0,15%	128,5
PCL/GO 0,30%	119,0
PCL/GO 0,50%	123,3
PCL	138,8

Pode-se observar pela **Tabela 6.3** que todas as amostras apresentaram-se hidrofóbicas, que é uma característica do PCL. No entanto, pode-se observar uma diminuição do ângulo de contato com a presença do GO, sendo que a amostra PCL/GO com concentração de 0,30% apresentou menor ângulo de contato quando comparada com as demais amostras.

### 6.3 INTERAÇÃO ENTRE PCL E GO

Para investigar a interação entre a composição química do PCL e do GO nas mantas eletrofiadas, foram analisados os espectros vibracionais obtidos por espectroscopia no infravermelho por transmitância utilizando-se pastilhas de KBr/GO

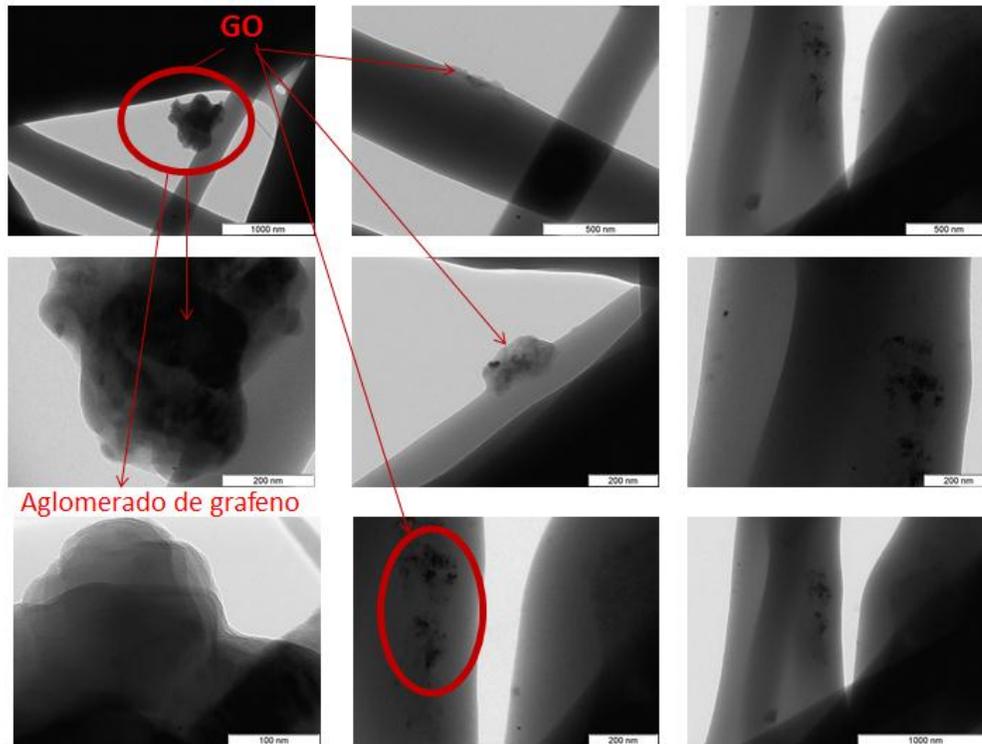
Na **Figura 6.4**, é mostrado os espectros do FT-IR do PCL como recebido do fabricante e das mantas eletrofiadas de PCL PCL/GO e do GO.



**Figura 6.4:** Espectros de FT-IR das mantas eletrofiadas de PCL/GO, PCL, do PCL como recebido e do óxido de grafeno (GO).

Nos espectros da **Figura 6.4** foi possível detectar apenas as bandas que caracterizam o PCL para todas as amostras. Para as bandas características do óxido de grafeno, as mesmas podem ter se ocultado devido sua aproximação de bandas características do PCL (Zanin *et al.*, 2013). Assim, para verificar a presença de GO nas fibras de PCL, foi realizada microscopia eletrônica de

transmissão (MET), onde as imagens obtidas estão apresentadas na **Figura 6.5**. Pode-se observar a presença do óxido de grafeno nas mantas formadas pelas fibras do nanocompósito de PCL/GO. Também pode-se observar a presença de GO aglomerado na superfície das fibras.



**Figura 6.5:** Microscopia eletrônica de transmissão da manta de PCL/GO 0,5%.

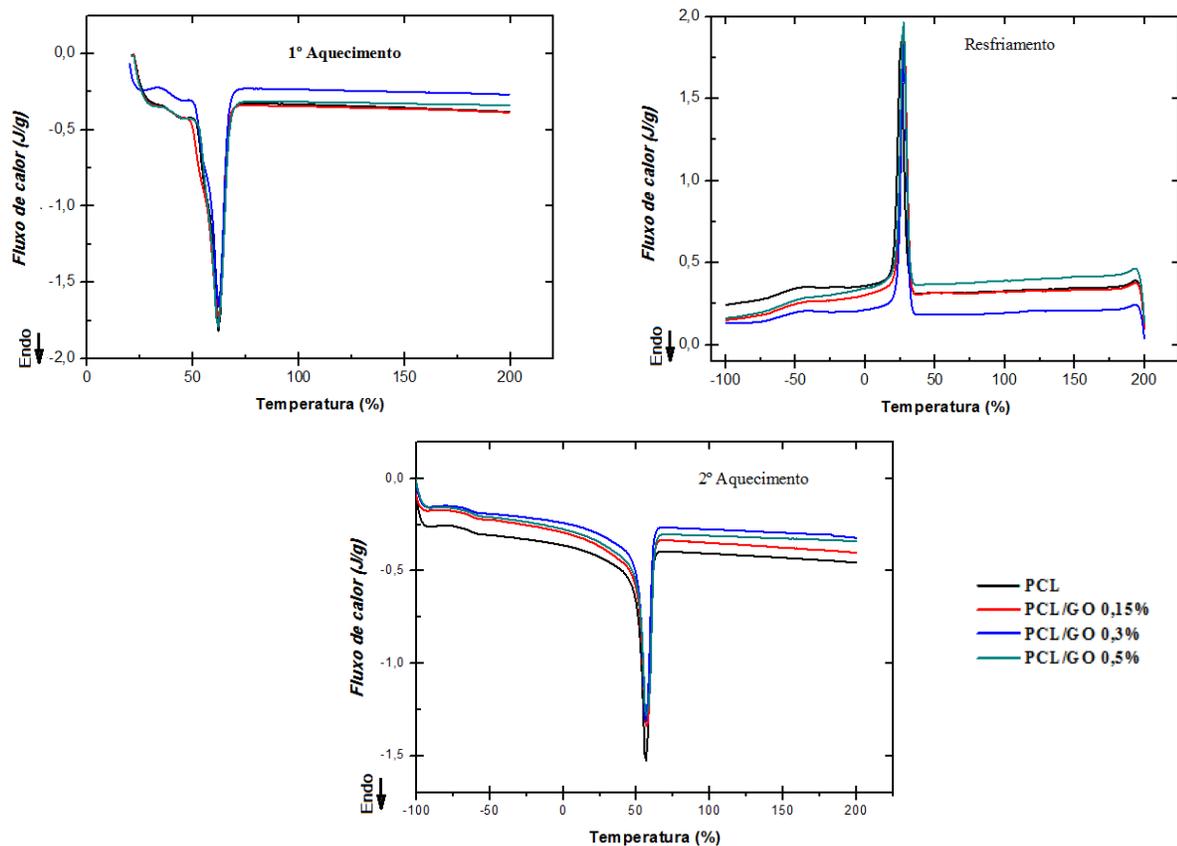
## 6.4 CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES TÉRMICAS

### *Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)*

Utilizou-se o DSC a fim de determinar temperaturas de transições do PCL e o grau de cristalinidade.

Na **Figura 6.6** estão os termogramas do 1º aquecimento. Na curva de resfriamento, estão indicadas as temperaturas de transições ( $T_g$  e  $T_c$ ) e, no 2º aquecimento, a temperatura de fusão ( $T_m$ ) das mantas de PCL e PCL/NTC. Na **Tabela 6.4** estão apresentadas as temperaturas de

transição, assim como as entalpias das respectivas transições e o grau de cristalinidade calculado a partir da entalpia de fusão ( $\Delta H_f$ ).



**Figura 6.6:** Curvas de DSC das mantas eletrofiadas de PCL e PCL/GO.

**Tabela 6.4** – Dados obtidos a partir das curvas de DSC das mantas eletrofiadas de PCL e PCL/GO.

Amostra	Primeiro aquecimento			Resfriamento			Segundo aquecimento		
	T <sub>m</sub> (°C)	ΔH <sub>f</sub> (J/g)	X <sub>c</sub> (%)	T <sub>g</sub> (°C)	T <sub>c</sub> (°C)	ΔH <sub>c</sub> (J/g)	T <sub>m</sub> (°C)	ΔH <sub>f</sub> (J/g)	X <sub>c</sub> (%)
PCL	62,1	62,4	45,8	-55,4	25,3	57,0	56,4	56,5	41,5
PCL/GO 0,15%	61,8	67,3	49,4	-60	27,5	58,6	56,9	65,6	48,1
PCL/GO 0,3%	62	61,6	45,2	-60	27,6	55,2	56,3	61,24	44,9
PCL/GO 0,5%	61,8	64,5	47,2	-60	27,3	58,6	56,8	69,0	50,5

\* ΔH<sub>f</sub> do PCL 100% cristalino = 136 J/g (Ruelle *et al.*, 2012).

Na **Figura 6.6**, pode-se observar que para ambas as amostras no primeiro e no segundo aquecimento ocorreu apenas um evento endotérmico, associado à fusão do polímero, o que indica não haver indícios dos solventes utilizados nas mantas. Conforme discutido na seção 5.1.4, para um processo de eletrofiação bem sucedido é importante que o polímero seja totalmente dissolvido durante a preparação da solução e o solvente utilizado seja totalmente evaporado durante o processamento (Bahardwaj e Kundu, 2010).

Observa-se pela **Tabela 6.4** que as temperaturas  $T_m$ ,  $T_c$  e  $T_g$  mantiveram-se semelhantes, porém no primeiro aquecimento, as amostras de PCL/GO apresentaram maior grau de cristalinidade, comportamento esperado pela literatura devido ao efeito da nucleação com a interação da nanopartícula (Trujillo *et al.*, 2012; Ruelle *et al.*, 2012). Entretanto para a amostra de PCL/GO 0,3% o grau de cristalização foi menor em comparação com as demais concentrações. De acordo com a literatura, dependendo do tipo de polímero, a incorporação de GO na matriz polimérica pode provocar aumentos, diminuição ou nenhuma alteração no grau de cristalinidade (Potts *et al.*, 2011). Ainda, no segundo aquecimento, após o histórico de processamento ter sido eliminado, é claramente evidenciada a influência da adição de GO nas fibras. Os resultados obtidos das amostras de PCL eletrofiada, obteve menor grau de cristalinidade no segundo aquecimento, o que mostra o efeito nucleante do óxido de grafeno.

Comparando-se os graus de cristalinidade  $X_c$  calculados para o primeiro e segundo aquecimentos, pode-se observar que os valores foram próximos, porém, pode-se observar um maior grau de cristalinidade das fibras (primeiro aquecimento) para a amostra de PCL/GO 0,5%. Essa observação está de acordo com o esperado, pois o processo de fiação induz uma forte orientação molecular, promovendo a cristalização do polímero.

A literatura reporta que fibras de menor diâmetro ou produzidas a partir de soluções de menor concentração de polímero na solução apresentam maior grau de orientação molecular e cristalinidade (Lim, Tan e Ng, 2008). Conforme já mencionado na seção 6.2, o diâmetro médio das fibras do sistema PCL/GO 0,5% foi menor do que o diâmetro médio das demais amostras de PCL/GO. No entanto, pode-se observar que esse efeito não foi significativo para o grau de cristalinidade, pois, comparando-se as entalpias de fusão do PCL e do PCL/GO no primeiro e

segundo aquecimentos, pode-se observar que a diferença entre os graus de cristalinidade do PCL/GO e do PCL foi maior no segundo aquecimento. Isso mostra que o aumento do grau de cristalinidade do nanocompósito foi devido, predominantemente, à presença dos óxidos de grafeno.

### *Análise Termogravimétrica (TGA)*

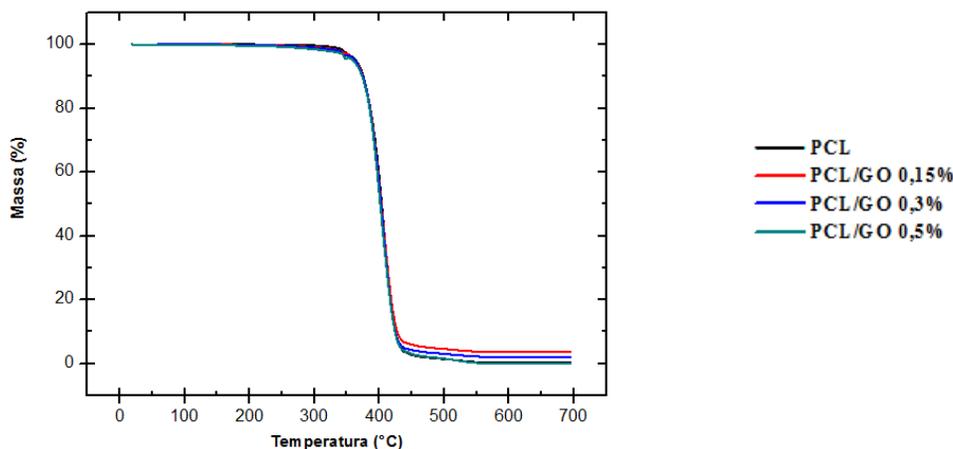
A

Figura 6.7 e 6.8 apresentam as curvas de TGA no intervalo de 25 – 700 °C das mantas de PCL e PCL/GO para as diferentes proporções de GO.

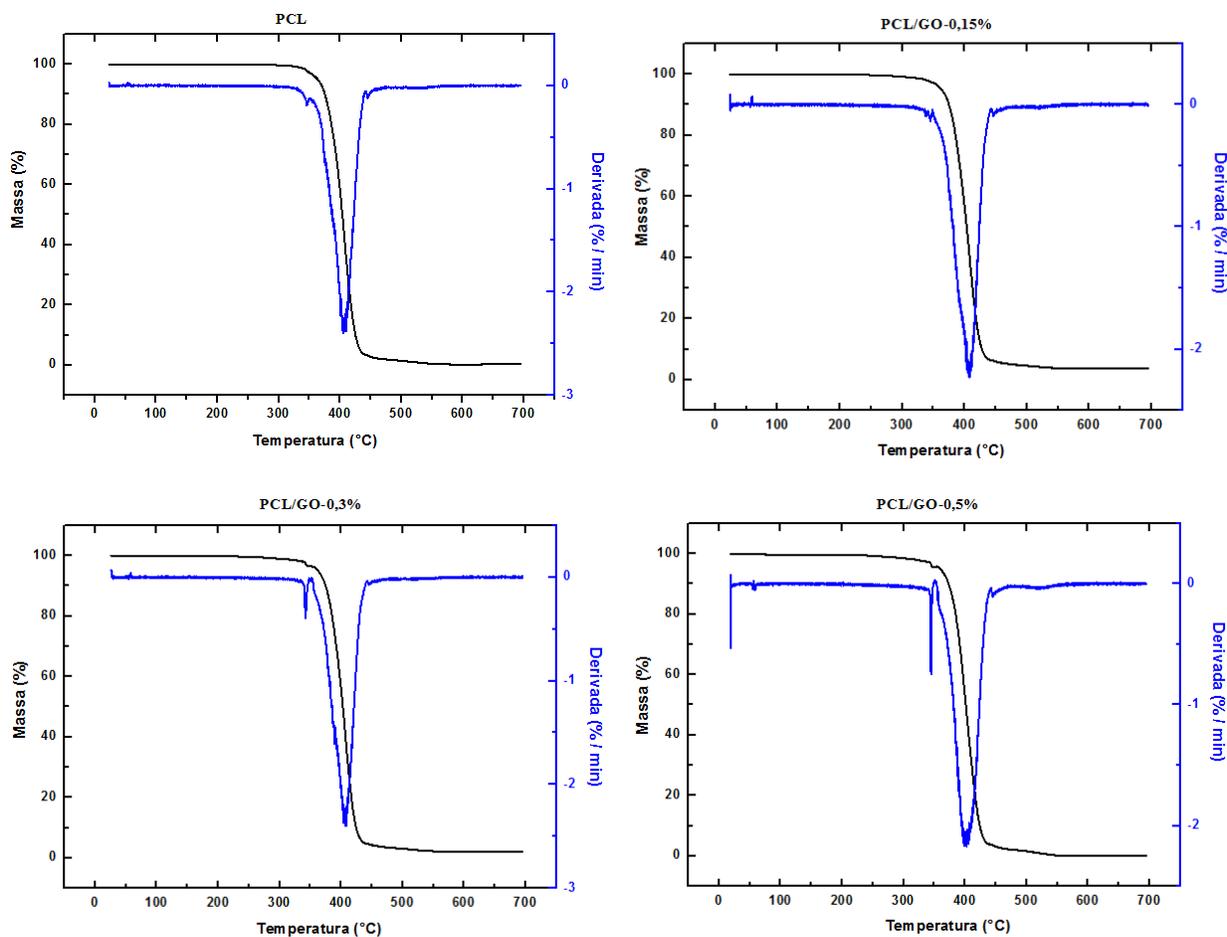
É possível visualizar pelas curvas obtidas na

**Figura 6.7**, que nas variadas proporções a ocorrência apenas de um deslocamento dos termogramas para cada amostra, evidenciando assim a provável evaporação total dos solventes utilizados na preparação da solução das amostras analisadas.

A **Tabela 6.5** mostra os resultados obtidos de perda de massa e picos que indicam as temperaturas de máxima velocidade de decomposição conforme **Figura 6.8**



**Figura 6.7:** Curvas de TGA: Perda massa das mantas eletrofiadas de PCL e PCL/GO.



**Figura 6.8:** Curvas de TGA: Perda de massa com pico de decomposição das mantas de PCL e PCL/GO.

**Tabela 6.5** – Dados termogravimétricos obtidos nas curvas de TGA das mantas eletrofiadas de PCL e PCL/GO.

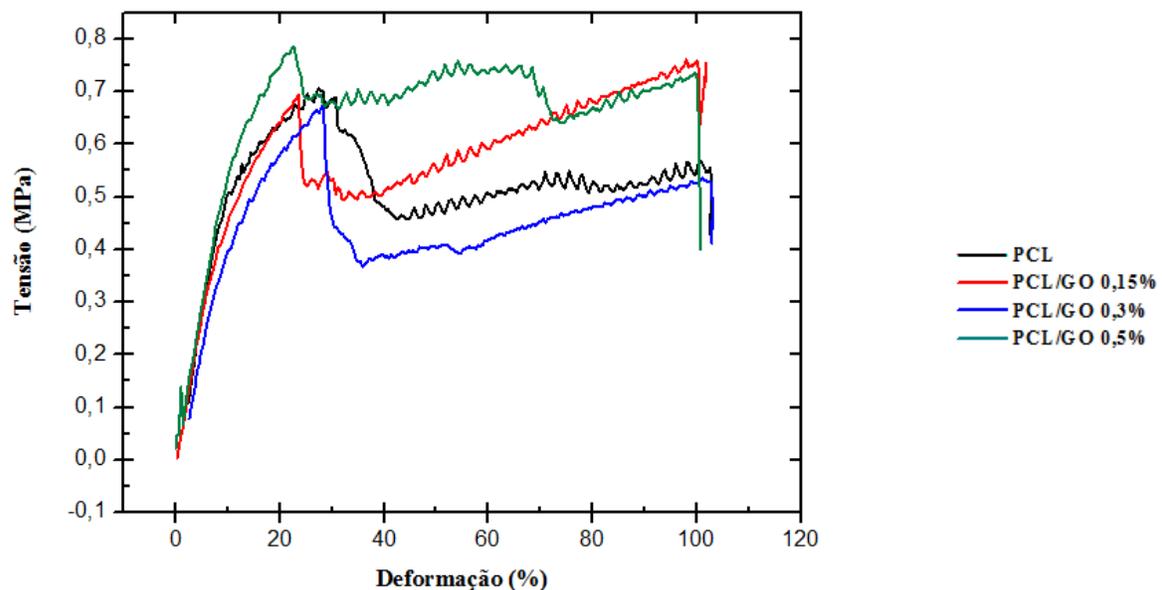
Amostra	T <sub>inicial</sub> (°C)	T <sub>final</sub> (°C)	Pico <sub>decomposição</sub> (°C)
PCL	310	455	410
PCL/GO 0,15%	320	540	410
PCL/GO 0,3%	320	550	408
PCL/GO 0,5%	320	550	402

Através da **Tabela 6.5** é possível verificar que em todas as amostras com a adição de GO apresentam perda de massas iniciais semelhantes, porem superior a 10°C quando comparado com a amostra de PCL, denotando assim maior estabilidade térmica das amostras, o que reforça os resultados das análises de MET a interação entre o PCL e GO (Potts *et al.*, 2011; Pant *et al.*, 2012).

## 6.5 CARACTERIZAÇÃO MECÂNICA

### Tração

A **Figura 6.9** apresenta a comparação das curvas tensão versus deformação das mantas eletrofiadas nas diferentes proporções de PCL/GO e PCL. Na **Tabela 6.6**, são apresentadas as propriedades relativas aos ensaios de tração. Os valores encontrados se referem a uma média de oito repetições de cada manta de PCL/GO e PCL.



**Figura 6.9:** Curva tração versus deformação das mantas de PCL e PCL/GO.

**Tabela 6.6:** Média dos valores obtidos nas análise das propriedades mecânicas.

Amostra	Tensão na ruptura (MPa)	Módulo módulo de elasticidade (MPa)	Alongamento (%)
PCL	0,638 ± 0,109	4,376 ± 0,622	< 100
PCL/GO 0,15%	0,644 ± 0,109	6,950 ± 0,574	< 100
PCL/GO 0,3%	0,793 ± 0,180	4,681 ± 0,798	< 100
PCL/GO 0,5%	0,818 ± 0,117	5,149 ± 0,675	< 100

Assim como nas amostras de PCL, os corpos de prova formados pelos nanocompósitos de PCL/GO não chegam à ruptura total, rompendo apenas uma camada da manta e permanecendo o alongamento até o máximo do equipamento de ensaio. Pode ser considerada, assim, a probabilidade de um alongamento aproximadamente maior que 100% até a ruptura.

De acordo com a **Tabela 6.6** pode ser observado um leve aumento da tensão na ruptura nas diferentes amostras com a adição de GO, porém para o módulo apresentaram algumas particularidades, as quais podem estar relacionadas à dispersão das nanopartículas.

A forma como as nanopartículas são dispersadas na matriz polimérica pode efetivamente reduzir os valores de módulo. As folhas de GO quando tendem a se adaptar, à ação do estiramento, de forma ondulada ou enrugada ou de esfoliação incompleta de plaquetas individuais e como plaquetas que tendem a desdobrar em vez de estiramento no plano sob uma tensão de tração aplicada podem levar a valores de módulo inferior (Singh *et al.*, 2011; Potts, 2011).

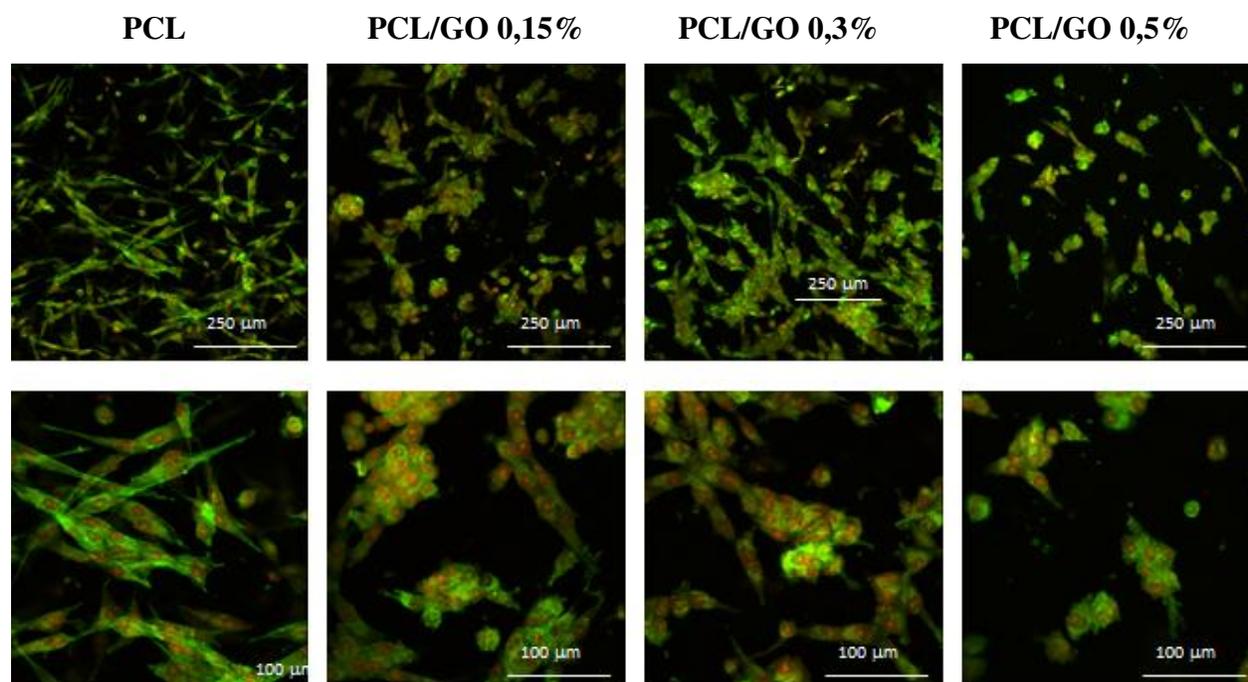
Melhorias nas propriedades mecânicas estão correlacionadas com a dispersão da nanopartícula na matriz polimérica, quando dispersada de forma melhorada, ou seja, alinhada na matriz polimérica. Esta interação entre a nanopartícula e a matriz polimérica pode aumentar a característica como reforço para o nanocompósito. (Potts, 2011)

## 6.6 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA IN VITRO DAS MANTAS ELETROFIADAS DE PCL/GO

### *Adesão Celular*

As mantas de PCL e PCL/GO colonizadas com células mesenquimais foram observados após 1 dia de cultura, por microscopia confocal e microscopia eletrônica de varredura, para avaliação do processo de adesão celular.

As imagens da **Figura 6.10** mostra a microscopia confocal dos materiais colonizados e corados para o citoesqueleto de F-actina e núcleo.



**Figura 6.10:** Fotografias de microscopia confocal de culturas com 1 dia de células mesenquimais humanas cultivadas na superfície das mantas de PCL e PCL/GO, após coloração das células para o citoesqueleto de F-actina (coloração verde) e núcleo (coloração vermelha).

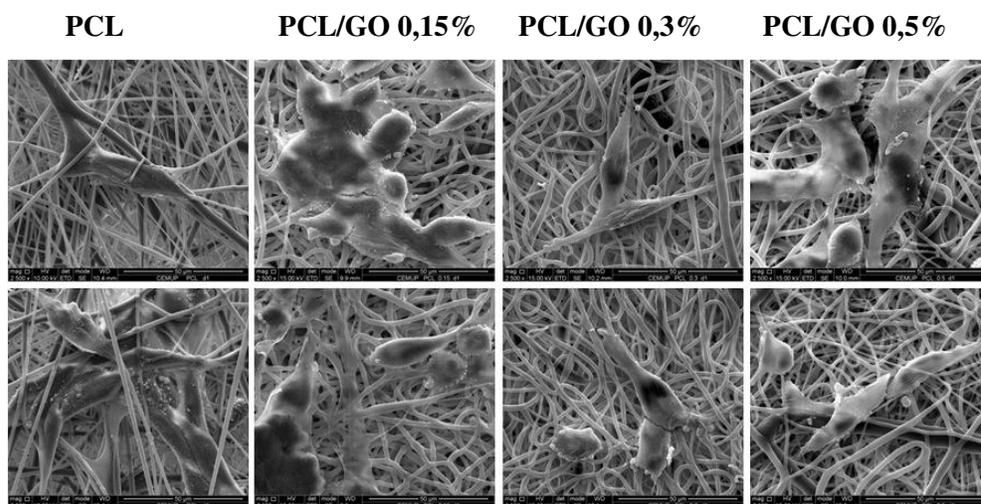
As imagens mostraram que as células aderiram a todas as superfícies, mas observaram-se diferenças de morfologia entre as células cultivadas na manta de PCL e nas mantas de PCL/GO.

Assim, nas mantas de PCL, as células apresentaram uma morfologia alongada e uma organização normal do citoesqueleto (maior intensidade de coloração nos limites da célula) e um núcleo bem definido. Este comportamento é típico das células mesenquimais após 1 dia de cultura.

As mantas de PCL/GO mostraram células alongadas, mas também agrupamentos de células arredondadas que ainda não tinham completado o processo de expansão citoplasmática para aquisição da morfologia normal. As imagens relativas à manta de PCL/GO 0,5% são sugestivas de um menor número de células aderidas à superfície do material.

### ***Proliferação Celular***

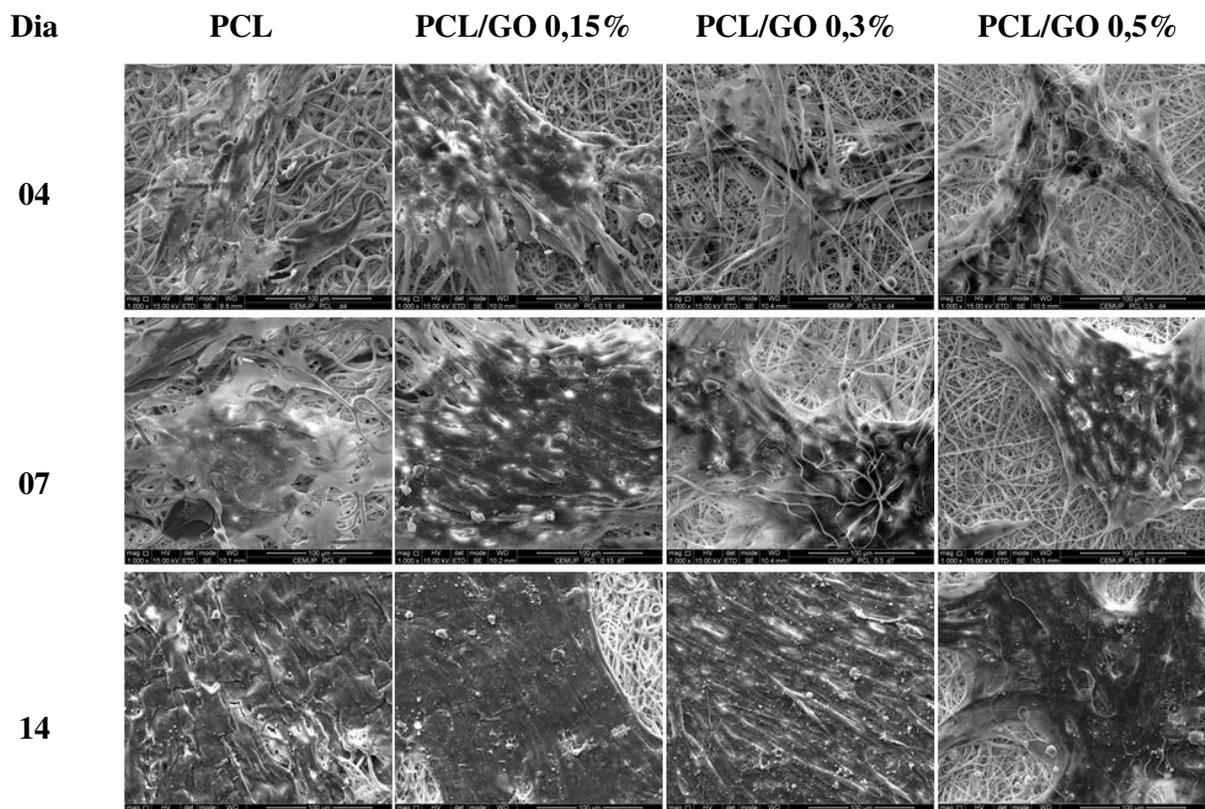
As imagens da **Figura 6.11** mostram as imagens de microscopia eletrônica de varredura – MEV após 01 dia de cultura que permitiram avaliar a interação das células com a estrutura fibrilar das mantas.



**Figura 6.11:** Imagens de MEV de culturas com 1 dia de células mesenquimais humanas cultivadas na superfície das mantas de PCL e PCL/GO.

As imagens de grande ampliação mostram uma interação celular íntima com as fibras de PCL, em que os prolongamentos citoplasmáticos estabelecem um contato perfeito com as fibras. De maneira semelhante ao que foi observado em microscopia confocal, as células presentes nas mantas de PCL mostraram uma morfologia mais alongada quando comparadas com as células presentes nas mantas de PCL/GO, em que se observou a presença de células alongadas, mas também de células com morfologia arredondada, portanto ainda com um processo incompleto de expansão citoplasmática.

As mantas de PCL e PCL/GO foram observadas por microscopia eletrônica de varredura ao longo do tempo de cultura, nos dias 4, 7 e 14, para avaliar a proliferação celular e a organização da camada celular. As imagens da **Figura 6.12** mostra as imagens de microscopia eletrônica de varredura – MEV após 04, 07 e 14 dias de cultura que permitiram avaliar a interação das células com a estrutura fibrilar dos mantas.



**Figura 6.12:** Imagens de MEV de culturas com 4, 7 e 14 dias de células mesenquimais humanas cultivadas na superfície das mantas de PCL e PCL/GO (barra de ampliação:100 mm).

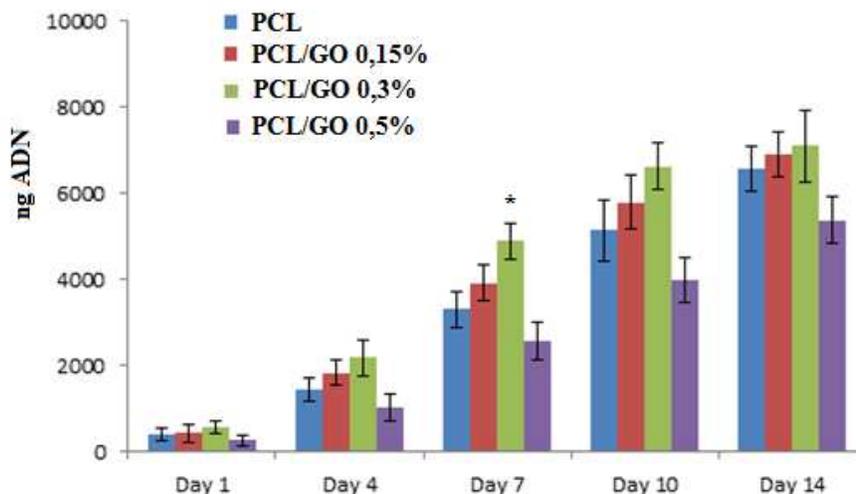
As mantas de PCL e PCL/GO foram observadas por microscopia de varredura ao longo do tempo de cultura, nos dias 4, 7 e 14, para avaliar a proliferação celular e a organização da camada celular. As imagens de baixa ampliação da **Figura 6.12** mostraram proliferação celular em todas as mantas, observando-se um aumento significativo da camada celular ao longo dos 14 dias de cultura. Comparativamente à manta de PCL, a organização da camada celular foi semelhante nas mantas de PCL/GO 0,15% e PCL/GO 0,3% de óxido de grafeno; no dia 14, as mantas apresentavam-se totalmente cobertos por uma camada celular.

No entanto, na manta de PCL/GO 0,5%, observou-se uma camada celular de aspeto mais compacto, que cobria parcialmente a superfície. Este comportamento é também visível na Figura 6.12, que mostra imagens de maior ampliação. As imagens sugerem que as células parecem ter maior dificuldade em proliferar nestas mantas, formando zonas de camada celular densa, mas descontínua.

A maior ampliação permite avaliar a interação celular com a estrutura fibrilar nas mantas durante o processo de proliferação celular. Assim, no dia 4, parece existir uma interação celular estreita com todas as mantas. No entanto, nos dias 7 e 14, esta interação parece estar dificultada na manta de PCL/GO 0,5% comparativamente com as demais mantas.

### ***ADN Total***

A proliferação celular foi também avaliada quantitativamente pela determinação do ADN total ao longo do tempo de cultura. A **Figura 6.13** apresenta o conteúdo ADN ao longo do tempo.

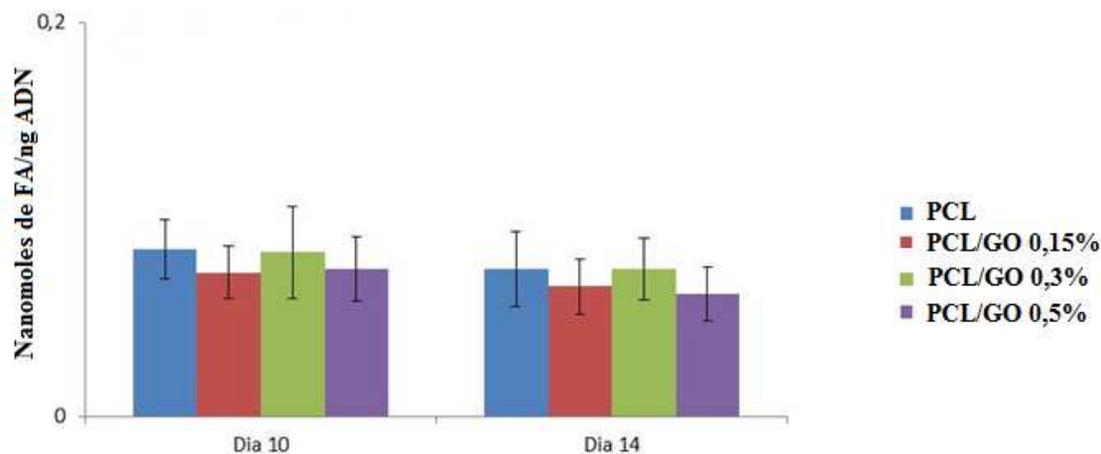


**Figura 6.13:** Conteúdo de ADN das culturas de células mesenquimais humanas cultivadas na superfície das mantas de PCL e PCL/GO (0,15%; 0,3%; 0,5%).

Os resultados estão apresentados de conteúdo de ADN aumentou ao longo do tempo de cultura em todos os materiais. Comparativamente ao filme de PCL, as mantas de PCL/GO 0,15% e PCL/GO 0,3% apresentaram valores superiores em comparação às demais amostras, porem o aumento foi estatisticamente significativo no dia 7 de cultura. A manta de PCL/GO 0,5% apresentou valores aproximadamente 20% mais baixos.

### *Atividade de Fosfatase Alcalina*

As células mesenquimais que foram cultivadas no meio de cultura alfa-MEM que contém ácido ascórbico, uma molécula que favorece a diferenciação osteoblástica o conteúdo ADN ao longo do tempo. Assim as mantas colonizadas foram analisadas para a atividade da fosfatase alcalina, uma enzima que constitui um marcador precoce do fenótipo osteoblástico. A **Figura 6.14** apresenta no gráfico os resultados obtidos.

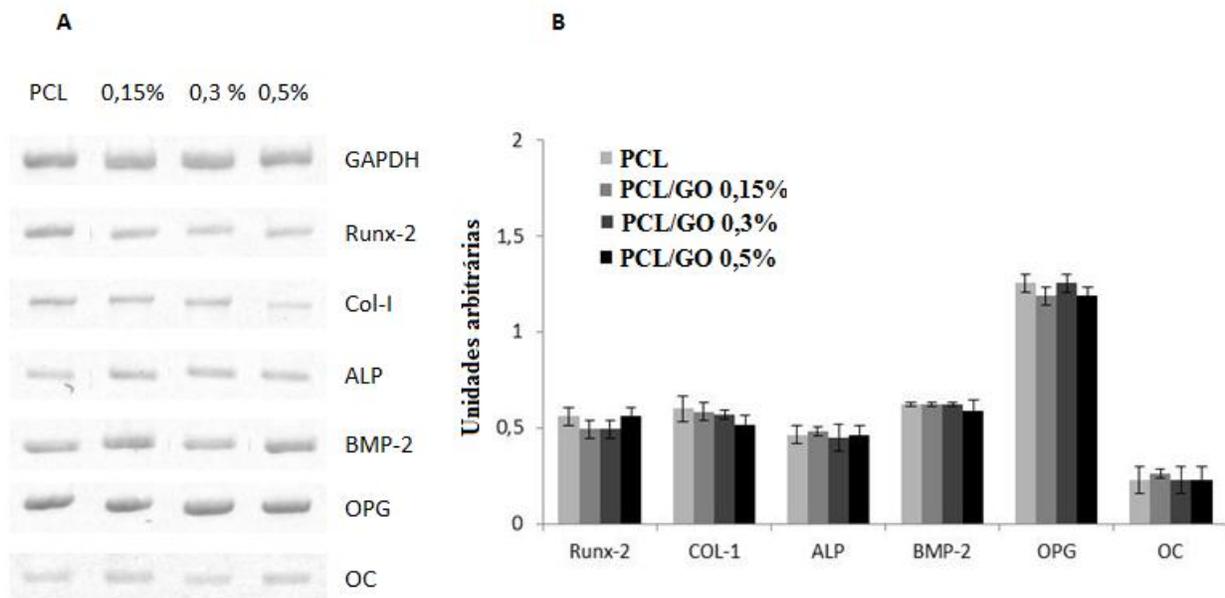


**Figura 6.14:** Atividade de fosfatase alcalina (FA) das culturas de células mesenquimais humanas cultivadas na superfície das mantas de PCL e PCL/GO (0,15%; 0,3%; 0,5%).

As mantas colonizadas foram analisadas para a atividade da fosfatase alcalina, uma enzima que constitui um marcador precoce do fenótipo osteoblástico. A atividade desta enzima, normalizada pelo conteúdo em ADN total ou de proteína total, foi semelhante em todas as mantas. Este resultado sugere que as células mesenquimais presentes nas mantas de PCL e nas mantas de PCL/GO apresentam atividade funcional semelhante.

### *Expressão de Genes Osteoblásticos*

Conforme os resultados discutidos na seção 6.6 as condições de cultura favorecem a diferenciação osteoblástica das células mesenquimais. De acordo com o procedimento descrito no Capítulo 4 seção 4.4.7, assim, avaliou-se também a expressão de alguns genes característicos deste fenótipo, nomeadamente o Runx2, colagénio tipo I, fosfatase alcalina, BMP-2, osteocalcina e OP. A **Figura 6.15**, representa as culturas com 14 dias.



**Figura 6.15:** Expressão de genes osteoblásticos nas culturas de células mesenquimais humanas cultivadas na superfície das mantas de PCL e PCL/GO: A) Bandas representativas dos genes analisados, no gel de agarose; B) Análise semi-quantitativa das bandas.

# Capítulo 7

## 7. CONCLUSÃO

O equipamento de eletrofiação construído mostrou-se adequado para a realização da eletrofiação em corrente alternada.

A eletrofiação do PCL e PCL/NTC com a aplicação de um campo elétrico CA/CC simultaneamente leva a formação de fibras, diminuição dos diâmetros médios com o aumento da frequência e uma tendência a uniformidade das fibras e estabilidade do jato durante o processamento de eletrofiação.

A análise por espectro de FT-IR demonstrou a interação entre o PCL e o NTC e, pelas análises térmicas, que a incorporação do NTC influencia as temperaturas de transição e grau de cristalinidade do PCL e exerce pouca influência na degradação térmica das fibras

As mantas de PCL e PCL/NTC permitiram a adesão e a proliferação das células osteoblásticas – MG63, denotando ainda que as mantas de PCL/NTC propiciou um estímulo notório para o crescimento celular no dia 3, demonstrando ter potencial para induzir o crescimento celular sem interferir com a atividade funcional das células, o que permitirá a continuação de futuras caracterizações para aplicação na área biomédica.

Em relação aos nanocompósitos de PCL/GO, pode-se concluir que com as diferentes concentrações de óxido de grafeno, houve mudanças na morfologia e um decréscimo nos diâmetros das fibras com o aumento da proporção de GO.

As mantas de PCL e PCL/GO permitem a adesão e a proliferação de células mesenquimais humanas. Nas condições experimentais utilizadas, estas células apresentaram características do

fenótipo osteoblástico, nomeadamente, sintetizaram fosfatase alcalina e expressaram genes osteoblásticos. Dentre as amostras estudadas a manta de PCL/GO 0,3% apresentou valores de proliferação celular ligeiramente superior às demais amostras, sendo que a manta de PCL/GO 0,5% apresentou uma proliferação menor. Contudo, a atividade de fosfatase alcalina e a expressão gênica foram semelhantes para todas as amostras de PCL/GO e PCL. Estes resultados sugerem que as mantas de PCL/GO apresentam características biológicas compatíveis com aplicações na área biomédica.

Relativamente às propriedades mecânicas, os testes efetuados mostraram que todas as membranas produzidas apresentaram uma boa flexibilidade e resistência mecânica, pois em nenhum dos testes de tração houve ruptura, porém a adição das nanopartículas não acarretou em reforço mecânico, onde para as mantas de PCL/NTC, o módulo elástico PCL/NTC do apresentou-se bem abaixo das demais amostras.

## 7.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, estão apresentadas algumas sugestões para trabalhos futuros:

- Estudar com maior profundidade a influência da variação da aplicação da tensão AC na morfologia das fibras em diferentes frequências, utilizando outros sistemas poliméricos e nanocompósitos.

- Adaptar o equipamento existente de eletrofição CA/CC simultaneamente de coletor vertical para coletor rotacional em condições intercambiável, de múltiplos diâmetros possibilitando o alinhamento das nanofibras para produção de mantas na forma de tubos e mantas formados pelas fibras eletrofiadas.

- Realizar testes *in vivo* das mantas, para avaliar melhor o desempenho destes como biomaterial.

# Capítulo 8

## 8. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agarwal, S.; Wendorff, J.H.; Greiner, A. *Use of electrospinning technique for biomedical applications*. Polymer, v. 49, p. 5603-562, 2008.

Ahmed, J.; Auras, R.; Kijchavengkul, T.; Varshney, S. K., *Rheological, thermal and structural behavior of poly( $\epsilon$ -caprolactone) and nanoclay blended films*. Journal of Food Engineering. v. 111 p. 580–589, 2012.

Baji, A.; Mai, Y.W.; Wong, S.C.; Abtahi, M.; Chen, P. *Electrospinning of polymer nanofibers: Effects on oriented morphology, structures and tensile properties*. Composites Science and Technology, v.70, p. 703-718, 2010.

Barry, F. P., Murphy, J. M. *Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization*. Int. J. Biochem. Cell Biol. v. 36, p. 568-584, 2004.

Bhardwaj, N., Kundu, S. C., *Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique*. Biotechnology Advances, v. 28, p. 325–347, 2010.

Bretas, R. S., d'Ávila, M. A. *Reologia de Polimeros Fundidos*, 2. Ed. – São Carlos: Editora EdFSCar, 2005. 257p.

Burger, C.; Hsiao, B.S.; Chu, B. *Nanofibrous materials and their applications*. Annual Review of Material Research, v. 36, p. 333-368, 2006.

Chen, Q.; Xu, R.; Yu, D.; *Multiwalled carbon nanotube/polybenzoxazine nanocomposites: Preparation, Characterization and properties*. Polymer, v. 47, p. 7711- 7719, 2006.

Chen, E. C.; Wu, T.-M. *Isothermal crystallization kinetics and thermal behavior of poly(3-caprolactone)/multi-walled carbon nanotube composites*. Polymer Degradation and Stability. v. 92, p. 1009-1015, 2007.

CHEN, C.; *Electrohydrodynamic Stability*, in: Ramos, A. (Ed.), Electrokinetics and Electrohydrodynamics in Microsystems. CISM, 2011. Disponível em: <[http://www.duke.edu/web/uphyl/pubs/Chen\\_11\\_Springer\\_EHD\\_Stability.pdf](http://www.duke.edu/web/uphyl/pubs/Chen_11_Springer_EHD_Stability.pdf)>

Chew, S. Y; Wen, Y.; Dzenis, Y.; Leong, K. W., *The Role of Electrospinning in the Emerging Field of Nanomedicine*. Current Pharmaceutical Design, v. 12, n. 36, 4751-4770, 2006.

Costa, R. G. F., Oliveira, J. E., Paula, G. F., Picciani, P. H.S., Medeiros, E. S., Ribeiro, C., Mattoso, L. H. C. *Eletrofição de Polímeros em solução. Parte II: Aplicações e Perspectivas*. Polímeros, v. 22, n. 2, p. 178-185, 2012.

Cooly, J. F., *Apparatus for Electrically Dispersing Fluids*. U.S. Patent 692,691, (1902).

Dong, L. X.; Chen, Q.; *Properties, Synthesis, And Characterization Of Graphene*. Front. Mat. Sc. China, v. 4, n.1, p. 45-51, 2010.

Friedenstein, A. J. 1980. *Stromal mechanisms of bone marrow: cloning in vitro and retransplantation in vivo*. Haematol Blood Transfus., v. 25, p. 19-29, 1980.

Guan, J., Wang, F., Li, Z., Chen, J., Guo, X., Liao, J., Moldovan, N. I. *The stimulation of the cardiac differentiation of mesenchymal stem cell in tissue constructs that mimic myocardium structure and biomechanics*. Biomaterials, v. 32, p. 5568-5580, 2011.

Cardoso, G. B. C., *Desenvolvimento de uma matriz tridimensional compósita de poli(epsilon-caprolactona) com cerâmica bioativa para aplicação em engenharia tecidual*. Campinas: UNICAMP, 2013. Tese Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica da Universidade Estadual de Campinas. Campinas, Fevereiro de 2013.

Castro-Malaspina, H., Gay, R. E., Resnick, G. *Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny*. Blood., v. 56, p. 289-301, 1980.

Guo, Q., Q., Knight, P. T., Wu, J., Mather, P. T. *Blends of Paclitaxel with POSS Based Biodegradable Polyurethanes: Morphology, Miscibility, and Specific Interactions*. Macromolecules, v. 43, n. 11, p. 4991-4999, 2010.

Han, T.; Yarin, A.L.; Reneker, D.H. *Viscoelastic electrospun jets: Initial stresses and elongational rheometry*. Polymer, v. 49, p.1651-1658, 2008.

Harrison, B. S. & Atala A. *Carbon nanotube applications for tissue engineering*. Biomaterials, v. 28, p. 344–353, 2007.

Helmus, M. N. & Tweden, K.. *Materials Selection* – In: Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering, part A, v.1 p. 27-59, 1995.

Hu, Y., Cai K., Luo Z., Zhang Y., Li L., Lai M., Hou Y., Huang Y., Li J., Ding X., Zhang B., Sung K. L. *Regulation of the differentiation of mesenchymal Stem Cells in vitro and osteogenesis in vivo by microenvironmental modification of titanium alloy surfaces*. Biomaterials, v.33, p. 3515-3528, 2012.

Ishii, Y., Sakai, H., Murata, H. *A new electrospinning method to control the number and a diameter of uniaxially aligned polymer fibers*. Materials. Letters. v. 62, p. 3370 – 3372, 2008.

Kessick, R., Fenn, J. & Tepper, G. *The use of AC potentials in electrospinning and electrospinning processes*. Polymer, v. 45, p. 298 – 2984, 2004.

Khiabani P. S., Hosseinmardi, A., Marzbanrad, E., Ghashghaie, S., Zamani, C., Keyanpour-Rad, Raissi, M., B., *NO 2 gas sensor fabrication through AC electrophoretic deposition from electrospun In 2 O 3 nanoribbons*. Sensors and Actuators B: Chemical, v. 162, p.102–107, 2012.

Kim, B. S., Kim, I. S., *Recent Nanofiber Technologies: A Perspective for a Special Issue of Polymer Reviews*. Polym. Rev., v.51, n.3, p. 235-238, 2011.

Kumar, P.R., Khan N., Vivekanandhan, S., Satyanarayana, N., *Mohanty, A.K., Misra, M., Review: Nanofibers: effective generation by electrospinning and their applications*. J Nanosci Nanotechnol., v.12, n.1, p.1-25, 2012.

Lee, H., Yoon, H. & Kim, G. *Highly orientend electrospun polycaprolactone micro/nanofibers prepared by a field-controllable electrode and rotating collector*. Applied Physics A: Materials Science & Processing, v. 97, p. 559-565, 2009.

Leung, V., Ko F. *Biomedical applications of nanofibers*. Polymer Advanced Technologies. Polym. Adv. Technol, v. 22, p. 350–365, 2011.

Li, D.; Xia, Y. *Electrospinning of nanofibers: reinventing the wheel*. Advanced Materials; v. 16, p. 1151-1170, 2004.

Li, X., Fan, Y., Watari, F. *Current investigations into carbon nanotubes for biomaterial for biomedical application*. Biomed Mater, v. 5, p. 1 -12, 2010.

Liao, G. Y.; Zhou, X. P. ; Chen, L.; Zeng, X.Y.; Xie, X.L.; Mai, Y. W., *Electrospun aligned PLLA/PCL/functionalised multiwalled carbon nanotube composite fibrous membranes and their bio/mechanical properties*. Composites Science and Technology v. 72 p. 248–255, 2012.

Lim, C. T., Tan, E. P. S., Ng S. Y. *Effects of crystalline morphology on the tensile properties of electrospun polymer nanofibers*. Applied Physics Letters, v. 92, p. 141908 – 141908-3, 2008.

Lim, H. T.; Kyung, H. A., *Nonlinear viscoelasticity of polymer nanocomposites under large amplitude oscillatory shear flow*. Journal of Rheology, v. 57, p. 767 – 789, 2013.

Ludueña, L. N.; Alvarez, V. A.; Vazquez, A., *Processing and microstructure of PCL/clay nanocomposites*. Materials Science and Engineering A, v.460–461 p.121–129, 2007.

Maheshwari, S., Chang H.C., *Assembly of Multi-Stranded Nanofiber Threads through AC Electrospinning*. Adv. Mater, v.1, p. 349–354, 2009.

Maia, M., Klein, E. S., Monje, T. V., Pagliosa, C. *Reconstrução da estrutura facial por biomateriais: revisão da literatura*. Rev. Bras. Cir. Plást, v. 25, n. 3, p. 566 - 572, 2010.

Maiti, S., Suin, S., Shrivastava N. K., Khatua, B.B. *Low Percolation Threshold and High Electrical Conductivity in Melt-Blended Polycarbonate/Multiwall Carbon Nanotube Nanocomposites in the Presence of Poly( $\epsilon$ -caprolactone)*. Polymer Engineering and Science, p. 1-14, 2013.

Martinez, D. S. T., *Nanotubos de Carbono: aspecto químico e interação com biosistemas*. Campinas: UNICAMP, 2011. 158 p. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Campinas. Campinas, Setembro de 2011.

Mata, D., Silva, R. M., Fernandes, A.J.S., Oliveira, F.J., Costa P.M.F.J., Silva, R.F. *Upscaling potential of the CVD stacking growth method to produce dimensionally-controlled and catalyst-free multi-walled*. Carbon, v. 50, p. 3585 – 3606, 2012.

Morton, W. J. *Method of Dispersing Fluids*. U.S. Patent 705,631, (1902).

McCanless, D. J., Jennings, L. K., Cole, J. A., Bumgardner, J. D., Haggard, W. O., ***In Vitro Differentiation and Biocompatibility of Mesenchymal Stem Cells on a Novel Platelet Releasate-Containing injectable Composite***. J. Biomed Mater., v.100, p. 220 – 229, 2012.

Novoselov, K. S.; Geim, A. K.; Morozov, S. V.; Jiang, D.; Zhang, Y.; Dubonos, S. V.; Grigorieva, I. V.; Firsov, A. A., ***Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films***. Science, v. 306 p. 666 - 669, 2004.

Ochanda, F. O., Samaha, A. M., Tafreshi, V. H., Gad-el-Hak, M. ***Fabrication of Superhydrophobic Fiber Coatings by DC-Biased AC-Electrospinning***. Journal of Applied Polymer Science, v. 123, p. 1112–1119, 2012.

Pant, H. R.; Park, C. H.; Tijing, L. D.; Amarjargal, A.; Lee, D. H.; Kim, C. S., ***Biomodal fiber diameter distributed graphene oxide/nylon-6 composite nanofibrous mats via electrospinning***. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, v. 407 p. 121-125, 2012.

Park, j. B., Bronzino, J. D. ***Biomaterials – Principles and applications, Boca Raton***. Ed. CRC Press LLC, p. 250, 2003.

Park, S., Ruo, S. R. ***Chemical methods for the production of graphenes – review***. Nature Nanotechnology, v. 58, p.1-8, 2009.

Pereira, I. M, Gomide V., Oréface, L. R., Leite F. M. Zonari, C. A. A., Goes, M. A. ***Proliferation of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Adipose Tissue on Polyurethanes with Tunable Biodegradability***. Polímeros, v. 20, p.280 – 286, 2010.

Pekar, M.; Velebny, V.; Bilerova, H.; ***Hyaluronan-based nanofibers***. Colloids in Biotechnology, v. 19, p. 437-453, 2011.

Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C. *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science.,v. 284, p. 143-147, 1999.

Potts J. R.; Dreyer D. R.; Bielawski C. W.; Ruoff R. S.; *Graphene-Based Polymer Nanocomposites*. Polymer, v. 52, n.1, p. 5 - 25, 2011.

Qin, X., Wu., D. *Effect of Different Solvents on Poly( caprolactone) (PCL) Electrospun Nonwoven Membranes*. J. Therm Anal Calorim., v. 107, p. 1007-1013, 2012.

Ramaswamy, S., Clarke, L. I., Gorga R. E. *Morphological mechanical, and electrical properties as a function of thermal bonding in electrospun nanocomposites*. Polymer, v. 52, p. 183 – 3189, 2011.

Ramos, S. L. F. *Membranas de Policaprolactona Obtidas por eletrofição para utilização em Engenharia Tecedual*. Campinas: UNICAMP, 2011. 158 p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica da Universidade Estadual de Campinas. Campinas, Março de 2011.

Regev, O., Vandebriel, S., Zussman, E., Clasen, C. *The role of interfacial viscoelasticity in the stabilization of an electrospun jet*. Polymer, v. 51, p. 2611-2620, 2010.

Reneker, D.H., Yarin, A. L. *Electrospinning jets and polymer nanofibers*. Polymer . v. 49, p. 2387 - 2425, 2008.

Reneker, D.H.; Yarin, A.L.; Zussman, E.; Xu, H. *Electrospinning of nanofibers from polymer solutions and melts*. *Advances In Applied Mechanics*.; v. 41: p. 43-195, 2007.

Ruelle, B.; Peeterbroeck, S.; Bittencourt C.; Gorrasi G.; Patimo G.; Hecq M.; Snyders R.; Pasquale S.; Dubois P., *Semi-crystalline polymer/carbon nanotube nanocomposites: Effect of nanotube surface-functionalization and polymer coating on electrical and thermal properties*. *Reactive & Functional Polymers* v.72 p.383 – 392, 2012.

Rutledge, G. C.; Fridrikh, S.V. *Formation of fibers by electrospinning*. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 59, p. 1384 -1391, 2007.

Saeed, K.; Park, S. Y.; Lee, H. J.; Baek, J. B.; Huh, W. S., *Preparation of electrospun nanofibers of carbon nanotube/polycaprolactone nanocomposite*. Polymer v. 47 p. 8019 – 8025, 2006.

Sarkar, S., Deevi, S. & Tepper, G. *Biased AC Electrospinning of Aligned Polymer Nanofibers. Macromolecular*. Rapid Communication., v. 28, p.1034–1039, 2007.

Sarkar, K. Ghalia, M. B., Zhenhua, W., Bose S. C. *A Neural net for the numerical prediction of the diameter of electro-spun polyethylene oxide nanofibers*. Journal Materials Processing Technology. v. 209, p.3156–3165, 2009.

Sasmazel, H. T., Gümüsderelioglu, M., Gürpınar 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.

Schueren, V. L., Schoenmaker, D. B., Kalaoglu I. O., Clerck, D. K. *An alternative solvent system for the steady state electrospinning of polycaprolactone*. European Polymer Journal-Macromolecular Nanotechnology, v. 47, p. 1256 – 1263, 2011.

Sigmund, W.; Yuh, J.; Park, H.; Maneeratana, V.; Pyrgiotakis, G.; Daga, A.; Taylor, J.; Nino, J. C., *Processing and Structure Relationships in Electrospinning of Ceramic Fiber Systems*. J. Am. Ceram. Soc., v. 89 n. 2, p. 395 – 407, 2006.

Singh, V.; Joung, D.; Zhai, L.; Das, S.; Khondaker, S. I.; Seal, S., *Graphene based materials: Past, present and future*. Progress in Materials Science, v.56, p. 1178 – 1271, 2011.

Sinha, V.R.; Bansal, K.; Kaushik, R.; Kumria, R.; Trehan, A., *Poly( $\epsilon$ -caprolactone) microspheres and nanospheres: an overview*. International Journal of Pharmaceutics, v. 278, p. 1 – 23, 2004.

Spasova, M.; Mincheva, R.; Paneva, D.; Manolova, N.; Rashkov, I. *Perspectives On: Criteria for Complex Evaluation of the Morphology and Alignment of Electrospun Polymer Nanofibers*. Journal of Bioactive and Compatible Polymers, v. 21, p. 465 – 479, 2006.

Souza Filho, A. G., Fagan, S. B., *Funcionalização de Nanotubos de Carbono*. Quím. Nova, v. 30, n. 7, p. 1695-1703, 2007.

Tapan K. D.; Smita P.; *Graphene-Based Polymer Composites and Their Applications*. Polymer-Plastics Technology and Engineering. v. 52, p. 319 – 331, 2013.

Teo W. E. & Ramakrishna S. *A review on electrospinning design and nanofibre assemblies*. Nanotechnology. v.17, p. 89 – 106, 2006.

Tian, H., Tang, Z., Zhuang, X., Chen, X. J. *Synthetic Polymers: Preparation, Functionalization and Biomedical Application*. Progress in Polymer Science. v. 37, p. 237-280. 2012.

Trujillo, M.; Arnal, M. L.; Müller, A. J.; Mujica, M. A.; Navarro, C. U.; Ruelle; B.; Dubois P., *Supernucleation and crystallization regime change provoked by MWNT addition to poly( $\epsilon$ -caprolactone)*. Polymer v. 53 p. 832 – 841, 2012.

Vila, M.; Cicuendez, M.; Marcos, J. S. ; Miyar, V. F.; Manzano, M.; Prieto, C. Regi, M. V., *Electrical stimuli to increase cell proliferation on carbon nanotubes/mesoporous silica composites for drug delivery*. Journal of biomedical materials research, v. 101a, n. 1 p. 213 – 221, 2013.

Williams, D.F. Definitions in biomaterials. *Progress in Biomedical Engineering*, v. 4, 1987.

Woodruff, A. M., Hutmacher, W. D., *The return of a forgotten polymer-Polycaprolactone in the 21st century*. Progress in Polymer Science, v. 35, p. 1217 – 1256, 2010.

Xie, J.; Li, X.; Xia, Y. *Putting electrospun nanofibers to work for biomedical research*. Macromolecular Rapid Communications, v. 29, p. 1775 - 1792, 2008.

Yeo, Y. L.; Gagnon, Z., Chang, H. C. *AC electro spray biomaterials synthesis. Biomaterials*. v. 26, p. 6122-6128, 2005.

Yijun, L.; Qinghua, D.; Riguang, J. *Effects of processing variables on the morphology and diameter of electrospun Poly(amino acid ester) phosphazene nanofibers*. Journal of Wuhan University of Technology, v. 27, p. 207 - 211, 2012.

Zanin, H.; Saito, E.; Marciano, F. R.; Ceragioli, H. J.; Granato, A. E. C.; Porcionatto, M.; Lobo, A. O., *Fast preparation of nano-hydroxyapatite/superhydrophilic reduced graphene oxide composites for bioactive applications*. Journal of Materials Chemistry B, v.1, p. 4947–4955, 2013.

Zhang D., Kandadai, M. A., Cech, J., Roth, S., Curran S. A. *Poly(L-lactide) (PLLA)/Multiwalled Carbon Nanotube (MWCNT) Composite: Characterization and Biocompatibility Evaluation*. Journal Phys. Chem. B, v. 110, p. 2910-2915, 2006.

Zhang, Y. Z.; Venugopa, J., Huang, Z. M., Lim, C. T., Ramakrishna, S., *Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers*. Polymer v. 47 p. 2911 – 2917, 2006.

## ANEXO -1

### Laboratório de Química do Estado Sólido do Instituto de Química da Unicamp - LQES/IQ/UNICAMP

#### Amostra: NTC-LQES7C (NTCPM-p)

#### Caracterização físico-química dos NTCPM-p

Na Tabela 1 estão representados os principais resultados da caracterização físico-química dos nanotubos de carbono de parede múltipla purificados (NTCPM-p) utilizados neste trabalho. Os nanotubos foram purificados, caracterizados e fornecidos pelo Laboratório de Química do Estado Sólido do IQ-UNICAMP. A distribuição de tamanho dos NTCPM-p foi estimada pelas técnicas de microscopia eletrônica de transmissão [TEM; Carl Zeiss Libra-120] e de varredura [FEG-SEM; FEI NanoLab200]. Área superficial específica foi determinada através de isotermas de adsorção de N<sub>2</sub> [BET method; ASAP 2010 Micromeritics Instruments]. Análise de carga superficial (potencial-zeta) foi determinado (Milli-Q water) utilizando o equipamento Zetasizer nano-ZS [Malvern Instruments] em água deionizada. A temperatura de decomposição foi determinada através de análise termogravimétrica (TGA; STDQ600 TA Instruments). Análise elementar quantitativa foi realizada utilizando a técnica de espectroscopia de energia dispersiva de raios-X [EDS; JEOL 660-LV]. O teor de resíduo metálico final na amostra foi quantificado utilizando microbalança analítica [AD-6; Pekin-Elmer].

**Tabela 1.** Caracterização físico-química dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas purificados (NTCPM-p).

	Propriedades	NTCPM-m
(A)	Diâmetro (nm)	10 - 40
(B)	Comprimento (µm)	< 5.0
(C)	Área Superficial (m <sup>2</sup> /g)	246
(D)	Potencial Zeta (mV)	-24±5.0
(E)	Temperatura de Decomposição (°C)	605±10
(F)	Análise Elementar Qualitativa	C, O, Fe
(G)	Resíduo Metálico [óxido de ferro](%)	< 2.0

## ANEXO -2

### Laboratório de NanoEngenharia e Diamante – NanoEng. da Faculdade de Engenharia Elétrica e Computação da Unicamp

#### Amostra: - Óxido de Grafeno - GO

##### Caracterização físico-química dos - GO

Na Tabela 1 estão representados os principais resultados da caracterização físico-química dos nanosheets de óxido de grafeno – GO utilizados neste trabalho. Os nanosheets, foram caracterizados e fornecidos pelo Laboratório de NanoEngenharia e Diamante – NanoEngenharia da Faculdade de Engenharia Elétrica e Computação da Unicamp.

**Tabela 1.** Caracterização físico-química dos nanosheets - GO

<b>Propriedades</b>		<b>GO</b>
a)	Tamanho da folha (nm)	200 a 300
b)	espessura da folha (nm)	4 a 5
c)	Potencial Zeta (mV)	-22,3
d)	Temperatura de decomposição(°C )	450
e)	Análise quantitativa	C,O,Ni, Cu
f)	Resíduo Metálico (Ni e Cu) %	<1.0