

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A REDAÇÃO FINAL DA  
TESE DEFENDIDA POR Sergio Lopes  
Fernandes Ramos E APROVADA  
PELA COMISSÃO JULGADORA EM 14.03.2011  
Marcos Alirad Alca  
ORIENTADOR

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

Sergio Lopes Fernandes Ramos

**Membranas de Policaprolactona Obtidas por  
Eletrofição para Utilização em Engenharia  
Tecidual**

Campinas, 2011.

Sergio Lopes Fernandes Ramos

# **Membranas de Policaprolactona Obtidas por Eletrofição para Utilização em Engenharia Tecidual**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado da Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade Estadual de Campinas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Mecânica.

Área de concentração: Materiais e Processo de Fabricação

Orientador: Marcos Akira d'Avila

Co-orientadora: Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia

Campinas

**2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

R147m Ramos, Sergio Lopes Fernandes  
Membranas de polycaprolactona obtidas por eletrofição para utilização em engenharia tecidual / Sergio Lopes Fernandes Ramos. --Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientadores: Marcos Akira d'Ávila, Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia.

Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica.

1. Engenharia tecidual. 2. Poli (caprolactona). 3. Biomateriais. I. d'Ávila, Marcos Akira. II. Zavaglia, Cecília Amélia de Carvalho. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Mecânica. IV. Título.

Título em Inglês: Electrospun polycaprolactone membranes for tissue Engineering

Palavras-chave em Inglês: Tissue engineering, Polycaprolactone, Biomaterials

Área de concentração: Materiais e Processos de Fabricação

Titulação: Mestre em Engenharia Mecânica

Banca examinadora: Manoel Ribeiro da Silva, Maria Clara Filippini Ierardi

Data da defesa: 14/03/2011

Programa de Pós Graduação: Engenharia Mecânica

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

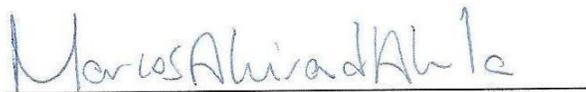
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADEMICO

**Membranas de Policaprolactona Obtidas por  
Eletrofição para Utilização em Engenharia  
Tecidual**

Autor: Sergio Lopes Fernandes Ramos

Orientador: Marcos Akira d'Ávila

A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Dissertação:



Prof. Dr. Marcos Akira d'Ávila

Universidade Estadual de Campinas - FEM/DEMA



Prof. Dr. Manoel Ribeiro da Silva

Universidade Federal de Itajubá – DFQ/ICE



Prof. Dr. Maria Clara Filippini Ierardi

Universidade Estadual de Campinas - FEM/DEMA

Campinas, 14 de Março de 2011

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho aos meus pais e irmãos, Marcelo, Clarisa, Daniel e Mariana e ao meu avô João, por tantas laranjas descascadas.

## **Agradecimentos**

Primeiramente agradeço aos meus pais e amigos, pelo apoio, compreensão e conselhos dados para esta nova etapa em minha vida.

Agradeço também meu orientador, Marcos, pela ajuda prestada e conhecimentos transmitidos, e todas as pessoas que me ajudaram e se envolveram neste estudo, aos professores e doutores Cecília A. C. Zavaglia, Sara T. O. Saad, Carlos Lenz Cesar, Manoel R. da Silva, Carmem Gilda Barroso, e a todos os integrantes do LABIOMECC pelo incentivo e idéias.

Agradeço o apoio financeiro da CAPES, através do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) BIOFABRIS da Unicamp. Também, a colaboração dos INCTs do Sangue (HEMOCENTRO-Faculdade de Ciências Médicas) e da Fotônica.

*Pesquisa não é competição, é cooperação.*

## Resumo

O uso e pesquisa do polímero Policaprolactona (PCL) como biomaterial vem sendo amplamente difundido nas últimas décadas. Sua capacidade de interagir com o organismo, propriedades mecânicas e capacidade de reabsorção são as principais características que levaram a escolha deste material para o desenvolvimento de uma estrutura que aja como suporte celular para uso em Engenharia Tecidual. Neste trabalho, o objetivo foi produzir e caracterizar membranas de PCL obtidas pelo processo de eletrofição ou “*electrospinning*”. Este processo, que utiliza uma diferença de potencial para extrair “fios” a partir de uma solução polimérica eletricamente carregada, é relativamente novo e versátil, sendo capaz de produzir redes macrométricas a partir de um emaranhado de “fios” que variam de diâmetros nano até micrométricos. As amostras foram devidamente analisadas e caracterizadas utilizando Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), Termogravimetria (TG), Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Análise Dinâmico Mecânica (DMA) e ensaio *in vitro* com células tronco mesenquimais de tecido adiposo (MSCs). As membranas exibiram propriedade de biocompatibilidade, o que levou à crer que a porção de solvente utilizada para fabricação dos fios foi eliminada, possibilitando adesão, penetração e proliferação celular através da estrutura.

***Palavras-chave:*** Eletrofição, Policaprolactona, Biomateriais, Engenharia Tecidual.

## **Abstract**

The Polycaprolactone polymer has been widely investigated as cellular support for tissue engineering purposes. Its biocompatibility, adequate mechanical properties and resorption capability are the main aspects that has led to the choice of this material for a possible use as tissue engineering scaffolds. In this work, the objective was to prepare and characterize PCL non-woven fibrous networks obtained through the electrospinning process. This process, which uses electrical potential in order to extract fibers from a electrically charged polymer solution is relatively new and versatile, being capable to produce a macroscopic structure composed of non-woven networks of fibers varying from the nanoscale to the microscale range. The samples were characterized using Scanning Electron Microscopy (SEM), Scanning Differential Calorimetry (DSC), Thermogravimetry (TG), Infrared Fourier Transform (FTIR), Dynamic Mechanical Analysis (DMA) and in vitro tests with Mesenchymal Stem Cells (MSCs). The membranes were considered biocompatible, which led to believe that the solvent portion was eliminated during the process, enabling adhesion, penetration and cellular proliferation within the structure.

**Keywords:** *Electrospinning, Polycaprolactone, Biomaterials, Tissue Engineering.*

## Lista de Ilustrações

Figura 1: Esquema básico da Engenharia Tecidual autóloga.....	6
Figura 2: Composição atômica do polímero PCL .....	17
Figura 3: Polimerização por abertura de anel (NATTA, 1958).....	18
Figura 4: Cone de Taylor (KAMEOKA, 2003).....	22
Figura 5: Regiões de instabilidade e “chicotes” (KAMEOKA, 2003) .....	24
Figura 6: Modelo para montagem do aparato de eletrofiação .....	29
Figura 7: Equipamento montado: a. Fonte de alta tensão b. Bomba de infusão c. Alvo coletor. .	38
Figura 8: Principais forças resultantes e funcionamento do sistema. ....	38
Figura 9: Membrana após o processo de eletrofiação.....	39
Figura 10: Microestrutura com uma visão mais ampla.....	41
Figura 11: Microestrutura da membrana visualizando a alta dispersão de diâmetro dos fios .....	41
Figura 12: Microestrutura da membrana evidenciando a interconectividade e espaçamento da porosidade .....	42
Figura 13: Curvas de DSC (azul) e TG (verde) do material após eletrofiação .....	43
Figura 14: Curvas de Módulo de armazenamento ( $E'$ ) e $\tan \delta$ , onde 1, 2, 3, 4, 5, 6 são referentes às frequências 0,5/1,0/2,0/3,3/5,0 e 10,0Hz, respectivamente. ....	44
Figura 15: Espectros de FTIR para amostras de PCL.....	46
Figura 16: Vista 3D da membrana por Microscopia Confocal.....	47
Figura 17: Microscopia mais ampla após 3 dias de cultura celular.....	49
Figura 18: Microscopia mais ampla após 6 dias de cultura celular.....	49
Figura 19: Etapa de penetração e proliferação celular no suporte.....	50
Figura 20: Maior recobrimento celular sobre o suporte.....	50
Figura 21: Detalhe da penetração e ancoramento por entre os fios da estrutura.....	51
Figura 22: Recobrimento praticamente total de uma seção do suporte com células. ....	51
Figura 23: Núcleos e estrutura celular dispostos sobre a estrutura.....	52
Figura 24: Detalhe de momento em que se sugere uma divisão celular. ....	53

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1: Principais parâmetros de processo.....	33
--	----

## SUMÁRIO

Capítulo 1: .....	1
INTRODUÇÃO .....	1
Capítulo 2: .....	5
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	5
2.1. Engenharia Tecidual .....	5
2.2. Células tronco mesenquimais .....	7
2.2.1. MSCs de tecido adiposo.....	7
2.3. Biomateriais.....	8
2.4. Suporte celular ( <i>Scaffolds</i> ) .....	11
2.5. Polímeros bioreabsorvíveis .....	14
2.5.1. Policaprolactona (PCL).....	16
2.6. Processo de Eletrofiação .....	19
2.6.1. Estágio I - Geração da gotícula .....	21
2.6.2. Estágio II - Formação do cone de Taylor.....	21
2.6.3. Estágio III - Lançamento do filamento .....	22
2.6.4. Estágio IV - Alongamento do fio .....	22
2.6.5. Estágio V - Regiões de instabilidade .....	23
2.6.6. Estágio VI - Solidificação e formação do fio/fibra.....	24
2.7. Parâmetros básicos de processo.....	24
2.7.1. Voltagem aplicada .....	25
2.7.2. Taxa de infusão de material .....	25
2.7.3. Distância do alvo coletor.....	26
2.7.4. Concentração e composição da solução.....	26
2.7.5. Tipo de alvo.....	27
Capítulo 3: .....	28
MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1. Sistema de Eletrofiação.....	28
3.2. Solução polimérica .....	29

3.3.	Produção das membranas de PCL .....	30
3.4.	Ensaio Visuais .....	31
3.4.1.	Microscopia Eletrônica de Varredura .....	31
3.4.2.	Microscopia Confocal .....	31
3.4.3.	Imunofluorescência .....	32
3.5.	Ensaio Térmicos .....	33
3.5.1.	Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e Termogravimetria (TG) .....	33
3.6.	Ensaio Físicos .....	34
3.6.1.	Análise Dinâmico-Mecânica (DMA) .....	34
3.6.2.	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) .....	34
3.7.	Ensaio Biológicos .....	35
3.7.1.	Testes <i>in vitro</i> .....	35
Capítulo 4:	.....	37
RESULTADOS E DISCUSSÕES	.....	37
4.1.	Processo de Eletrofiação .....	37
4.2.	Aspecto Macroscópico das Membranas .....	39
4.3.	Microscopia Eletrônica de Varredura das Membranas .....	40
4.4.	Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e Termogravimetria (TG) .....	42
4.5.	Análise Dinâmico-Mecânica (DMA) .....	43
4.6.	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) .....	45
4.7.	Microscopia Confocal .....	46
4.8.	Ensaio <i>in vitro</i> : .....	47
4.8.1.	Microscopia Eletrônica de Varredura .....	47
4.8.2.	Imunofluorescência .....	52
Capítulo 5:	.....	54
CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS	.....	54
Capítulo 6:	.....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	.....	56

# Capítulo 1:

## INTRODUÇÃO

O intenso desenvolvimento de novos materiais e processos para obtenção de estruturas aptas a serem utilizadas para substituir, regenerar ou assistir tecidos e órgãos humanos fez com que a área de biomateriais e engenharia de tecidos obtivessem um grande reconhecimento nos dias atuais. Esta área de pesquisa, estimulada por diversos motivos, dentre eles as doenças provenientes do aumento da expectativa de vida do ser humano, doenças relacionadas ao trabalho intenso e casos relacionados a acidentes trágicos, toma seus passos em busca de processos e materiais de ponta para sanar e melhorar a condição de vida humana.

Desta forma, produtos não biológicos, sejam materiais ou equipamentos, vem sendo desenvolvidos desde o início dos tempos para ajudar a sanar problemas relacionados à saúde humana, quando o próprio corpo não é totalmente capaz. Partindo desde bandanas para ossos quebrados, uso de plantas medicinais, e objetos cirúrgicos egípcios, a trajetória humana vem sempre em uma busca paralela de evitar o sentimento de dor ou até mesmo a morte do próximo. Dentro deste contexto, conclui-se que os chamados biomateriais, que são tidos como qualquer substância (que não seja uma droga) ou combinação de substâncias, de origem sintética ou natural, que pode ser utilizada por um período de tempo, como um todo ou parte de um sistema que trata, regenera ou substitui qualquer tecido, órgão ou função corpórea (WILLIAMS, 1987), podem ser provenientes de qualquer classe ou combinação de classes de materiais: metálicos, cerâmicos ou poliméricos.

Ainda no contexto de evitar o sentimento de dor ou até mesmo a morte do próximo, ou seja, melhorar a condição de vida do ser humano, o avanço que houve na área médica e de materiais médico-hospitalares é realmente notável. Em especial, o uso das chamadas células tronco (CT), que tem características pluripotentes, sendo capazes de se diferenciar em diversos tipos de células específicas do corpo humano, vem sendo cada vez mais investigado neste sentido. Terapias para regeneração da medula espinhal (BARNABÉ-HEIDER, 2010), utilização de células tronco para terapias cardíacas (PITTENGER, 2004), estudos pré-eliminarem em ratos para reconstrução de defeitos femurais (TSUCHIDA, 2003) e reparo de defeitos cartilagosos em ratos (IM, 2001) são alguns poucos exemplos da capacidade de utilização destas células para reconstruir e recuperar funções vitais de tecidos e órgãos humanos.

A partir da necessidade de obtenção destas células em grande quantidade, novas investigações foram e ainda estão sendo realizadas para localizar outras fontes. Dentre estas, as fontes que estão provendo as maiores quantidade de CT são: cordão umbilical, medula óssea e tecido adiposo. Em específico, do tecido adiposo (gordura) é possível isolar as chamadas Células Tronco Mesenquimais de Tecido Adiposo (MSCs).

Como a aplicação destas células pluripotentes está para se tornar uma realidade nas terapias médicas atuais fica a necessidade de produzir estruturas em que estas células possam aderir, serem transportadas e alocadas nos sítios defeituosos com a máxima eficácia. Desta forma, o material celular poderá ser oferecido ao sítio defeituoso de forma focalizada, a fim de minimizar riscos de descontrole de diferenciação e proliferação ou diferenciação em tecidos celulares não eficientes para o tratamento em questão.

Sendo assim, neste trabalho foi dada atenção a produção de uma estrutura que fosse capaz de oferecer um suporte propício a estas células. Neste suporte, as características físicas que foram evidenciadas a se obter foram: alta porosidade superficial, porosidade interconectada, estrutura moldável (flexibilidade) e resistência. Para isso, e baseado em investigações anteriores, foi decidido utilizar um material polimérico, mais especificamente, a Policaprolactona (PCL). Este polímero termoplástico já vem sendo investigado nos últimos anos e diversos estudos foram realizados comprovando sua viabilidade como biomaterial (THOMSON,1995; OH, 2007; BRUDER, 1998). Quando denso, possui propriedades mecânicas relativamente boas (módulo de

armazenamento na ordem de 300MPa) além de exibir biocompatibilidade e capacidade de reabsorção pelo organismo (ROSA, 2004)

Para fabricar tal estrutura desejada, foi necessário montar um equipamento de *electrospinning* ou eletrofiação. Este processo utiliza uma solução polimérica (polímero mais solvente) que é eletricamente carregada e direcionada a um alvo metálico aterrado. Desta forma, um campo elétrico é gerado e, como consequência disto, a solução polimérica é atraída e depositada no alvo em forma de fios contínuos. Estes fios, que podem ter diâmetros nas faixas nanométricas até micrométricas, são coletados no alvo até formar uma membrana macrométrica. Esta técnica é extremamente interessante devido ao fato de que, quando coletados os fios em um alvo fixo, forma uma membrana de fios dispostos e sobrepostos aleatoriamente. Além disso, a técnica permite criar membranas compostas de fios com diâmetro controlado, apenas variando os parâmetros de processo.

Para comprovar que estas membranas porosas são capazes de atingir as propriedades esperadas, diversas caracterizações e análises foram realizadas. Primeiramente foram realizados ensaios visuais: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Confocal; ensaios térmicos: Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e Termogravimetria (TG); ensaios físicos: Análise Dinâmico-Mecânica (DMA) e Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR); e finalmente ensaios *in vitro*, que foram, em seguida, caracterizados visualmente (MEV e microscópio de fluorescência e microscopia óptica).

Desta forma, os ensaios físicos, térmicos e visuais caracterizaram inicialmente o material e a estrutura para verificar se havia possibilidade de se prosseguir com os testes mais específicos, de natureza biológica. Fatores como presença de solvente pós processamento, porosidade interconectada, porosidade e resistência à tensões cíclicas em temperatura corpórea foram verificados e aprovados. Vale ressaltar que a estrutura obtida bem como a desejada, com porosidade realmente interconectada e de tamanhos variados, permitindo um “caminho” de penetração das células para dentro da estrutura e também o emaranhado de fios aleatórios fornecem uma boa capacidade de adesão para a estrutura celular. Esta propriedade foi de fato facilitada pela alta dispersão de diâmetros dos fios obtidos, que variaram de 500nm a 5 $\mu$ m. Outro fator que ficou evidente é que se pôde considerar que a porção de solvente utilizada foi eliminada durante o processo de eletrofiação, remanescendo somente o material biocompatível captado em

forma de membrana no alvo coletor. Os ensaios *in vitro* demonstraram a capacidade da estrutura em oferecer adesão, sendo que as células ficaram visivelmente entrelaçadas aos fios havendo penetração e proliferação celular.

## Capítulo 2:

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 2.1. Engenharia Tecidual

O intenso desenvolvimento dos biomateriais e, conseqüentemente, das técnicas, das aplicações atuais e do potencial das futuras aplicações destes, gerou um termo que engloba ainda mais o uso dos biomateriais para aplicação médica.

A engenharia tecidual pode ser definida como “a aplicação dos princípios e métodos da engenharia e ciências da vida visando o entendimento fundamental das correlações envolvendo estrutura e função em tecidos de mamíferos normais ou patologicamente afetados e desenvolvimento de substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar as funções tissulares” (ORÉFICE, 2006).

Desta forma, além do uso dos biomateriais, sintéticos ou naturais, a própria estrutura celular e seu desenvolvimento sobre o material, acabam sendo tratados como materiais passíveis de construção. Na engenharia tecidual, o biomaterial é utilizado como estrutura tridimensional com características e propriedades capazes de guiar e controlar a proliferação celular dentro do tecido a ser reparado.

O objetivo da engenharia tecidual é a utilização de células para o crescimento de tecidos, guiada por uma estrutura tridimensional: os suportes porosos. A maioria dos suportes é produzida com materiais biodegradáveis ou bioreabsorvíveis para que após a implantação do conjunto

célula/suporte não haja a necessidade de uma nova intervenção cirúrgica para a retirada do material de suporte. Ao final, são estes novos tecidos reconstruídos e repostos que irão aliviar dores, restaurarem mecanicamente a estabilidade, além de recuperar a função biológica (LANGER, 1993).

Existem duas linhas principais por onde a engenharia tecidual pode ser aplicada para a regeneração de órgãos e tecidos vivos: na primeira, e mais importante e representada na figura 1, há a coleta de material celular de um indivíduo, que é dissociado em células específicas do tecido ou órgão em questão, em seguida cultivadas sobre um suporte biológico ou sintético, para então serem implantadas neste mesmo paciente. Em outra linha, o suporte celular é apenas introduzido no paciente, sem uma cultura celular implantada previamente, desta forma, essa estrutura implantada necessita conter fatores de indução e proliferação para gerar atração e adesão celular para o tecido em questão ser reparado com eficiência (KAIGLER, 2001).

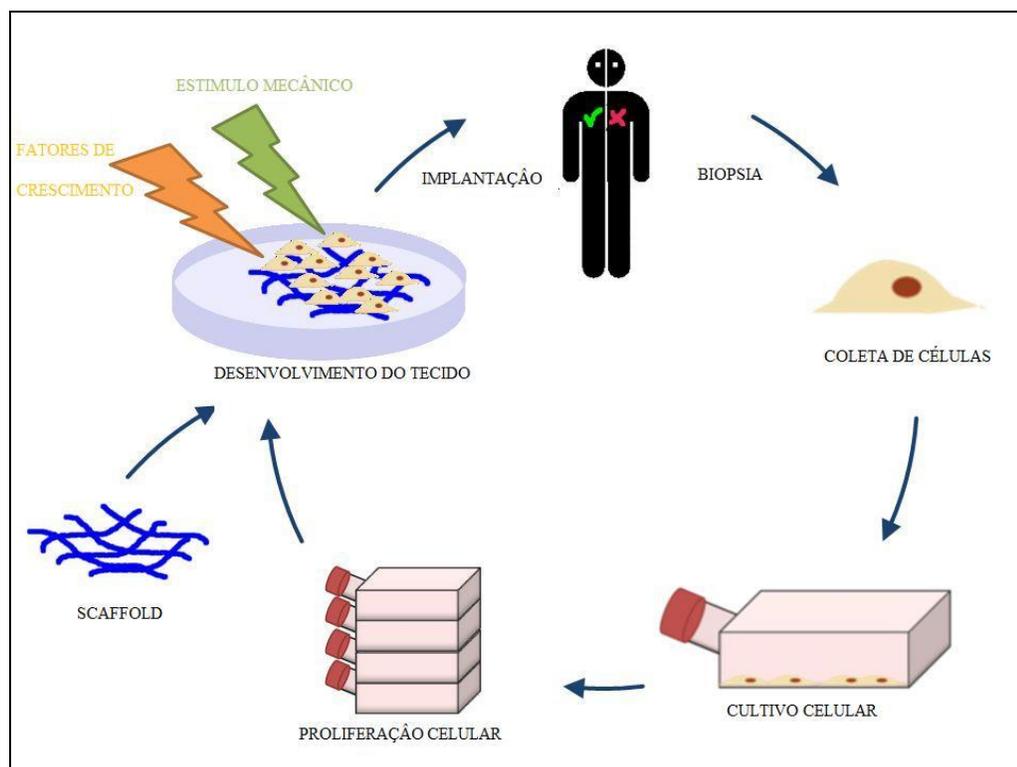


Figura 1: Esquema básico da Engenharia Tecidual autóloga.

## 2.2. Células tronco mesenquimais

As células tronco do estroma de medula óssea atualmente são conhecidas como células tronco mesenquimais (mesenchymal stem cell - MSC) e foram primeiramente descritas por Friedenstein (1980) e colaboradores na década de 80. As células tronco mesenquimais possuem a capacidade de diferenciar-se 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, diferenciação e hormônios específicos (CASTRO-MALASPINA, 1980; BARRY, 2004; PITTENGER, 1999), mas atualmente, vem se descobrindo que também possuem a capacidade de se diferenciarem em células de tecidos de outras origens, tais como células neuronais e hepáticas (BANAS, 2008; FRANCHINI, 2003). Além disso, as células tronco mesenquimais possuem outras características tais como: efeito imunomodulador, fácil obtenção, grande capacidade de proliferação, grande aderência e comportamento migratório (NASEF, 2008; GNECCHI, 2006; CHAMBERLAIN, 2007). A primeira e principal fonte de obtenção das MSCs foi a medula óssea, no entanto, são poucas, e geralmente correspondem a 1 em cada 10.000 células nucleadas da medula. Em seguida, outras investigações levaram a descoberta de outras fontes de MSCs, como: sangue de cordão umbilical, fígado fetal, líquido amniótico, polpa dentária e tecido adiposo (CAMPAGNOLI, 2001; ERICES, 2000; INT'N ANKER, 2004; LEE, 2004; WANG, 2004 e YOSHIMURA, 2006).

### 2.2.1. MSCs de tecido adiposo

O tecido adiposo possui uma organização complexa, formado basicamente por adipócitos maduros, adipócitos imaturos, fibroblastos, células da musculatura lisa vascular, células endoteliais, macrófagos, linfócitos e células tronco mesenquimais (WEISBERG, 2003 e XU, 2003). Atualmente não existe consenso na literatura sobre a denominação das células tronco de tecido adiposo (CTTA), mas neste projeto usaremos o termo “células tronco derivadas de tecido adiposo”, pois esta nomenclatura vem sendo utilizada com maior frequência em trabalhos publicados recentemente. As CTTA também possuem o potencial de se diferenciar em adipócitos, osteócitos e condrócitos (SHI, 2005; IM, 2005; HUI, 2005 e HONG, 2006), em

células endoteliais e vasculares (URBICH, 2004; PLANT-BENARD, 2004; BOQUEST, 2007), hepatócitos (SEO, 2005), células pancreáticas (TIMPER, 2006), progenitores hematopoéticos (CORRE, 2006), entre outras, que são células extremamente especializadas do organismo humano. Estas células, são caracterizadas principalmente por serem células que passaram por várias passagens em cultura a fim de se obter uma população homogênea, morfologicamente apresentam grande capacidade de diferenciação em diversas linhagens (principalmente a adipócita, cartilaginosa e óssea) e apresentam características moleculares iguais às outras células tronco.

Atualmente, a lipoaspiração é um processo bastante rotineiro na medicina estética e, além de ser um procedimento cirúrgico bastante simples, propicia a obtenção de grande quantidade de tecido adiposo. O isolamento de MSCs do tecido adiposo (CTTA) é realizado através de um processo enzimático simples, o que demonstra que este tecido é uma fonte de MSC bastante atrativa para pesquisadores e clínicos em terapia (CASTEILLA, 2005 e OEDAYRAJSINGH-VARMA, 2006). Análises comparativas de célulastronco isoladas de sangue de cordão umbilical, medula óssea e tecido adiposo (fontes mais utilizadas para obtenção destas células) demonstram que as CTTA não são diferentes nem em relação à morfologia, fenótipo imune, frequência na formação de colônias e nem na capacidade de diferenciação em outras células mais específicas (KERN, 2006). Em um estudo comparativo, Wagner (2005) analisa a expressão global dos genes de células tronco obtidas de medula óssea, tecido adiposo e cordão umbilical através de microarranjos. Os resultados demonstraram que quando as células foram cultivadas em meios de cultura idênticos a expressão de genes envolvidos na produção de proteínas da matriz extracelular, morfogênese e desenvolvimento foi semelhante, sugerindo que as células de diferentes fontes, do ponto de vista de expressão gênica, são semelhantes (WAGNER, 2005).

### 2.3. Biomateriais

Os biomateriais ou materiais biomédicos existem há muito tempo, praticamente, desde quando um ser humano prestou qualquer tipo de assistência médica a outro, que tenha sido necessário a utilização de uma ferramenta qualquer. Começaram a ser utilizados principalmente

para fabricar ferramentas auxiliares como bisturis, pinças, agulhas, serras e outros, que apenas permaneciam em contato com o corpo humano por um curto período de tempo. Depois disso, e utilizando este pouco conhecimento prévio de materiais que interagem com o organismo humano, foram desenvolvidos novos instrumentos e equipamentos médicos (assim como técnicas de esterilização) capazes de uma maior permanência do material/equipamento, desempenhando determinada função.

Hoje em dia, com o grande avanço da área médica e na área de novos materiais, diversos materiais foram descobertos, desenvolvidos ou adaptados para que uma gama muito maior de aplicações, que incluem até materiais para estruturas de implantação definitiva, fosse possibilitada. Dentro destas, estão sistemas para liberação controlada de drogas, operações cirúrgicas minimamente invasivas e próteses para substituição total de quadril.

Desta forma, pode-se definir os biomateriais de acordo com diversos pontos de vista. Segundo Bruck (1980), biomateriais são “materiais de origem sintética ou natural em contato com tecido humano, sangue e fluidos biológicos, destinados para uso em diagnóstico, terapia, prosthetic ou armazenamento, que não afeta negativamente o organismo vivo e seus componentes”. O *Consensus Development Conference* define biomaterial como “qualquer substancia (que não sejam drogas) ou combinação de substancias, de origem sintética ou natural, que pode ser utilizada por qualquer período de tempo, como um todo ou uma parte de um sistema que cura, auxilia o desenvolvimento ou substitui, qualquer órgão, tecido ou função corporal” (WILLIAMS, 1987). Segundo Black (1992): “um material usado em um dispositivo médico, destinado a interagir com sistemas biológicos”. De acordo com o *Clemson Advisory Board for Biomaterials*, “biomaterial é uma substância sistêmica e farmacologicamente inerte designada para implante ou para incorporação em sistemas vivos” (PARK, 2007). Desta forma, o termo biomaterial engloba todos os materiais usados para aplicações médicas que estejam em interfaces com sistemas vivos ou outros sistemas desenvolvidos para usos extracorpóreos.

Atualmente, tanto os biomateriais que são produzidos industrialmente ou os que ainda estão na fase de pesquisa e desenvolvimento englobam todos os grupos de materiais: metais, cerâmicas, polímeros naturais, polímeros sintéticos e compósitos. Apesar disso, o uso ainda permanece restrito a aplicações estruturais, de auxílio vascular e de auxílio regenerativo de pequeno grau. Isto se deve à imensa complexidade do sistema biológico humano, necessitando que propriedades

químicas, elétricas e eletroquímicas específicas sejam ainda pesquisadas e desenvolvidas em novos materiais, principalmente quando se trata de regeneração e recuperação de tecidos nervosos, do fígado e musculares (MEYER, 2009).

Para que um biomaterial seja eficiente, ele necessita apresentar a propriedade de biocompatibilidade, ou seja, não pode gerar uma resposta imunológica significativa do organismo frente ao material. Assim, um biomaterial e seus produtos de degradação devem ser tolerados pelos tecidos envoltórios e não podem acarretar prejuízo ao organismo a curto, médio e longo prazo. Atualmente, para afirmar que um material é biocompatível, existem normas padronizando testes e análises que testam as respostas dos biomateriais no organismo. Os danos são observados e classificados, segundo os conceitos de algumas normas como a *American Society for Testing Materials* (ASTM), a *International Standards Organization* (ISO) e a *United States Pharmacopeia* (USP).

Tendo em vista que a biocompatibilidade é uma propriedade intrínseca para o uso humano dos biomateriais em contato com o corpo humano, fica evidente a necessidade de estudo prévios regulamentadores, *in vitro* (submetendo o material\estrutura em culturas celulares controladas) e *in vivo* (implantação do material\estrutura em animais de laboratório). São estes estudos que irão avaliar o comportamento simulado da estrutura orgânica frente ao que está se desenvolvendo. Dentro deste contexto, a norma ISO 10093, sob o título geral de avaliação biológica de dispositivos médicos, apresenta como o principal objetivo a preservação da saúde dos seres humanos, com a sua função de servir como uma armação para o planejamento das avaliações biológicas que minimizem o número e exposição de animais (ISO, 1992).

Outra propriedade importante relacionada à utilização dos biomateriais em seres humanos é a biofuncionalidade, que é a capacidade que biomaterial\estrutura tem de realizar a função (dentro do organismo humano) que lhe foi atribuída quando foi projetado. Um exemplo dessa propriedade é quando um material é selecionado e tem sua estrutura projetada para fixar uma fratura. Desta forma, para esta aplicação específica, deve ser dada mais atenção às propriedades mecânicas da “peça” e do material, para que se possa obter um produto eficiente em todos os aspectos.

O sucesso de um biomaterial e/ou de sua implantação está relacionado diretamente às propriedades de biocompatibilidade e biofuncionalidade, e não menos importante, à condição do

sítio receptor e à competência do cirurgião que implanta e monitora a preservação. Os biomateriais são utilizados em diferentes aplicações, sendo destinados à substituição de tecidos moles, duros e aplicações no sistema cardiovascular. Segundo Hench (1993), os biomateriais podem ser classificados de acordo com o seu comportamento fisiológico em: biotoleráveis, bioinertes, bioativos e bioreabsorvíveis.

Muitas vezes, ao substituir o tecido ósseo, são utilizados materiais denominados de bioativos, ou seja, promovem ligações de natureza química entre material e tecido ósseo, em função da similaridade química entre estes materiais e a parte mineral óssea natural, ocorrendo osteocondução e osteoindução. Exemplos de materiais bioativos são: a hidroxiapatita e suas fases de fosfato de cálcio, vidros bioativos e vitro-cerâmicas.

Materiais biotoleráveis são materiais apenas tolerados pelo organismo, ou seja, em sua presença ocorre apenas a formação de uma camada de tecido fibroso ao redor do implante. De acordo com a espessura desta camada será definida a toxicidade do material. Exemplos destes são grande parte dos polímeros sintéticos e dos metais.

No entanto, quando essa camada fibrosa formada ao redor do implante é extremamente fina e praticamente inexistente, o material é classificado como bioinerte, ou seja, o material não estimula resposta imunológica e o organismo “aceita” sua presença como se ignorasse-o. Os mais comuns são a alumina, zircônia, titânio, ligas de titânio e carbono pirolítico.

Os materiais classificados como bioreabsorvíveis são aqueles que, após certo período de tempo em contato com o tecido e fluidos biológicos, são degradados, solubilizados ou fagocitados pelo próprio organismo. Estes materiais são de grande interesse em aplicações onde não são desejáveis intervenções cirúrgicas subsequentes, como para a engenharia tecidual ou suturas para cirurgias muito internas. Dentre estes, temos apoli ( $\epsilon$ -caprolactona), o  $\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP) o  $\alpha$ -fosfato tricálcico ( $\alpha$ -TCP).

## 2.4. Suporte celular (*Scaffolds*)

Nos dias de hoje constata-se uma grande procura para transplantes de órgãos e sistemas biológicos em funcionamento. Apesar de o transplante ser uma solução eficiente, em muitos

casos ocorrem rejeições severas. Além disso, a própria área de reconstrução facial, estética, e corretiva relaciona à acidentes vem sendo cada vez mais solicitada. Assim, o campo da engenharia tecidual abre novas possibilidades para pacientes que necessitam com urgência de substituição ou reparação de tecidos e órgãos. Sabendo que na engenharia tecidual faz-se uso de suportes celulares, também conhecidos como *scaffolds*, eles acabam tendo como principal objetivo de mimetizar ao máximo todos os aspectos e propriedades do tecido e estrutura base para que ocorram adesão e proliferação celular, e logo, crescimento e reconstrução do tecido lesado tendo como base o biomaterial/scaffold (MURPHY, 2000).

Desde 1980, pesquisadores desenvolvem diversas técnicas de fabricação destes suportes, o que acabou resultando em suportes com propriedades específicas para cada tipo de tecido ou órgão a ser tratado (MURPHY, 2000). As características dos suportes devem ser analisadas de acordo com sua aplicação, assim deve ser selecionado o polímero, os componentes adicionais e as técnicas de fabricação. A superfície do material e seus produtos de degradação devem ser biocompatíveis e o processo de fabricação não deve afetar a biocompatibilidade e a biodegradabilidade dos suportes.

Para que o suporte seja eficiente, na maior parte das vezes, é desejável que este apresente uma estrutura tridimensional que seja capaz de suportar migração celular, proliferação celular, transporte de nutrientes, transporte de resíduos metabólicos e vascularização do tecido ou órgão que vem sendo reconstruído. Desta forma, a capacidade de controle do tamanho, homogeneidade e interconectividade e porosidade da estrutura é essencial para um bom desenvolvimento e formação da nova área biológica, o que irá permitir vascularização, transporte de nutrientes e resíduos metabólicos durante todo o processo de regeneração tecidual.

As propriedades mecânicas dos suportes variam de acordo com as propriedades do polímero utilizado, da geometria da matriz tridimensional, da incorporação de materiais que atuam como reforços mecânicos e das técnicas de fabricação. Por exemplo, polímeros bioreabsorvíveis com alta cristalinidade exibem maior resistência a esforços mecânicos e apresentam taxa de degradação mais lenta. Já os métodos de fabricação podem alterar a cristalinidade do polímero e logo, alteram a vida útil do suporte conseqüentemente suas propriedades mecânicas.

Em conseqüência disto, para se decidir qual ou quais materiais que deve-se levar em conta não só a processabilidade do polímero, mas também os custos de matéria prima e do próprio processo. A maior parte destas técnicas envolve a aplicação de calor e/ou de pressão ao polímero, ou a dissolução por solventes orgânicos ou inorgânicos. Desta forma, o material poderá ser conformado na estrutura desejada. As principais técnicas de fabricação de suportes poliméricos relatadas são: evaporação de solvente com adição de sal (*solvent-casting particule-leaching*) (MIKOS, 1993), injeção de gás (*gas foaming*) (HARRIS, 1998), inversão de fases (*phase separation*) (PEZZIN, 2002), deposição por fusão (*melt moulding*) (HUTMACHER, 2004) e *freeze drying* (PATIST, 2004). Apesar disso, técnicas mais atuais estão sendo desenvolvidas e testadas para este fim, como a eletrofição (*electrospinning*), rotofiação (*forcespinning*) e métodos de prototipagem rápida (*Fused Deposition Modeling – FDM*).

A técnica de evaporação de solvente com adição de sal (*solvent-casting and particule-leaching*) foi desenvolvida para aumentar o controle da porosidade e do diâmetro dos poros gerados no suporte. Essa técnica envolve a dissolução do polímero e adição de um agente porogênico (geralmente se utiliza sal de tamanho de cristais controlados), que após a secagem e solidificação do polímero, é retirado (geralmente utilizando passagens em água destilada) permitindo assim a criação de uma rede de poros interconectados (MURPHY, 2000; MIKOS, 1993). Esta técnica permite boa reprodutibilidade, mas a interconexão dos poros nem sempre é total e a estrutura ainda pode reter partículas de sal em seu interior. Para Harris (1998), existem desvantagens nos processos de preparação de amostras porosas que requerem o uso de solventes orgânicos, já que pode deixar resíduos que influenciarão na cultura celular. Já a técnica de eletrofição, permite a produção de estruturas com porosidade totalmente aberta e interconectada, uma vez que a estrutura tridimensional é formada pela sobreposição de fios que vão de diâmetros nano até micrométricos. Estes fios são formados utilizando uma solução polimérica, que é eletricamente carregada através da ação de um campo elétrico formado entre a saída do material (ponta capilar) e um alvo coletor metálico. É justamente durante a sua trajetória até o alvo metálico que a solução polimérica tem efetuado seu controle dimensional (diâmetro de fio) e a porção de solvente utilizada é praticamente evaporada inteiramente. Apesar disso, esta técnica não permite a produção de macroestruturas muito complexas, sendo necessário um pós-

processamento mais adequado caso o formato do alvo não seja suficiente (RAMAKRISHNA, 2005)

Os suportes porosos implantados em tecidos ósseos apresentam discordâncias em relação ao diâmetro ideal da porosidade para que ocorra crescimento e regeneração tecidual. Alguns autores falam em variações de diâmetro entre 300-400  $\mu\text{m}$  (HARRIS, 1998) (MIKOS, 1993), outros dão intervalos ainda mais amplos, na ordem de 200-400  $\mu\text{m}$  (CHOONG, 2004). Assim, o diâmetro ideal dos poros é algo a ser elucidado. Existe a suposição de que quando apresentados poros inferiores a 100  $\mu\text{m}$ , não se permite uma vascularização no suporte e quando superior a 500  $\mu\text{m}$ , não se fornece uma mimetização da estrutura óssea, fazendo com que a superfície não seja adequada para a adesão e proliferação celular.

Para a engenharia tecidual é muito interessante a utilização de suportes bioreabsorvíveis que tenham a taxa de absorção controlada, além de exibirem propriedades mecânicas e físicas controladas de acordo com as condições de aplicação desejadas. Estes suportes são principalmente formados a partir de polímeros bioreabsorvíveis, devido à similaridade química e estrutural destes com algumas proteínas e tecidos humanos. Entretanto, reabsorções de diferentes tipos de polímeros podem ocorrer dependendo das interações das espécies e das adesões intermoleculares, as quais induzem a diferentes aspectos nos ataques hidrolíticos, o que irá caracterizar mudanças nos efeitos do comportamento da degradação final do material.

## 2.5. Polímeros bioreabsorvíveis

Os polímeros são materiais orgânicos ou inorgânicos cujas estruturas são formadas por unidades de repetição, os meros, unidos por ligações covalentes. Dentre os polímeros que são utilizados há mais de duas décadas na área médica, estão os poli ( $\alpha$ -hidróxi ácidos), que são considerados uma das famílias de polímeros mais promissoras na área dos bioreabsorvíveis. Sua grande vantagem está na sua forma de degradação, que ocorre por hidrólise de suas ligações ésteres. Como exemplo de polímeros bioreabsorvíveis, podem ser citados o poli(ácido láctico) (PLLA), o poli(ácido glicólico) (PGA) e o polímero poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), que já obtiveram a aprovação pelo *Food and Drug Administration* (FDA) (SALGADO, 2009).

Como cada polímero possui características distintas, ao utilizar apenas um tipo de polímero para a fabricação dos suportes celulares, muitas vezes não é atingida todas as características necessárias para a determinada aplicação clínica. Desta forma, pesquisas mais atuais têm se direcionado para o estudo de blendas, copolímeros e compósitos que aperfeiçoem as propriedades fundamentais dos suportes, tais como a permeabilidade, taxa de absorção e propriedades elásticas (ZHANG, 1995). Apesar disso, ainda fica a necessidade de se obter o máximo de informações possíveis a respeito do comportamento de um polímero específico, principalmente quando se utiliza em um processo em que as variáveis são diversas, como a eletrofição, para que em outras etapas de investigações o comportamento de blendas e copolímeros possam ser previstos com mais facilidade.

Partindo desta propriedade extremamente interessante, da possibilidade do polímero ser bioreabsorvível, um dos grandes, se não o maior, desafio no uso destes materiais é produzir um suporte que seja degradado e reabsorvido pelo organismo na mesma taxa de formação e reconstrução do tecido novo desejado. Desta forma, com este sincronismo químico-biológico, seria possível que a estrutura mantivesse suas principais propriedades físicas ao longo da restauração, mantendo uma continuidade do suporte para com o tecido orgânico.

Do ponto de vista de degradação do material polimérico dentro do organismo humano, estes podem ser classificados como: biodegradáveis, bioerodíveis, bioreabsorvíveis e bioabsorvíveis (VERT, 1993).

Os polímeros biodegradáveis são aqueles nos quais ocorre degradação macromolecular, porém sem a eliminação dos produtos e subprodutos pelo organismo, ao contrário dos bioerodíveis, que são caracterizados por uma perda de massa, sendo os produtos e subprodutos reabsorvidos pelo organismo.

Já os bioreabsorvíveis são degradados através da redução de tamanho e são reabsorvidos *in vivo*, sendo então eliminados por vias metabólicas. Quando sua dissolução ocorre em fluídos sem qualquer clivagem das cadeias moleculares ou por uma diminuição da massa molecular, podemos chamá-los de bioabsorvíveis.

Dentre os muitos fatores que podem influenciar a degradação polimérica podem ser citados: o local de implantação do implante, solicitação mecânica no local, massa molar do polímero,

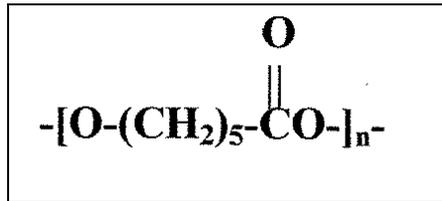
distribuição da massa molar, composição química, cristalinidade, morfologia, pH do meio biológico, entre muitos outros (MIDDLETON, 2000).

Já a cristalinidade dos polímeros é proporcional à velocidade de degradação, devido à disposição espacial das cadeias poliméricas nas regiões amorfas e cristalinas, sendo muito mais difícil ocorrer uma hidrólise em uma estrutura compactada e organizada (cristalina) do que em uma região desorganizada e espaçada (amorfa). Na maior parte dos casos, a degradação polimérica ocorre em duas etapas principais: primeiramente ocorre penetração e difusão das moléculas de água por entre as macromoléculas nas regiões amorfas do polímero, e, subsequentemente ocorre uma cisão hidrolítica das ligações ésteres das cadeias. Posteriormente, quando uma porção considerável da região amorfa está degradada, as regiões cristalinas vão perdendo sua organização espacial, permitindo assim, a ação hidrolítica nos cristais poliméricos e assim sucessivamente. Vale notar, que durante este processo de degradação ocorre um aumento relativo da cristalinidade do material, já que as cadeias de menor massa molar originadas do processo de degradação vão se rearranjando, mas em estruturas muito menos complexas (DUEK, 1999).

O aspecto estrutural do suporte também influi diretamente na taxa de degradação do material. Isto se deve à capacidade de fluxo de fluidos e células através da estrutura (área superficial em contato com fluidos e tecidos), o que é controlado pelos processos de fabricação do próprio suporte. (MIKOS, 1993).

### 2.5.1. Policaprolactona (PCL)

A poli ( $\epsilon$ - caprolactona), ou policaprolactona (PCL) é um polímero sintético biocompatível e que possui composição atômica apresentada na figura 2. Apresenta um caráter hidrofóbico (AMASS, 1998) e pertence à família dos poliésteres alifáticos, sendo sintetizado por meio de polimerização por abertura de anel de  $\epsilon$ - caprolactona, para a obtenção da unidade repetitiva. Este polímero é, por definição, um produto de condensação de um grupo hidroxílico e um carboxílico dentro da mesma molécula.

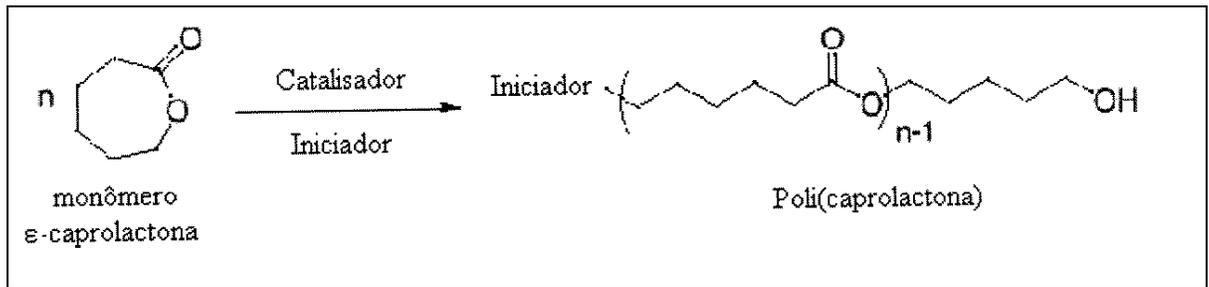


**Figura 2: Composição atômica do polímero PCL**

O polímero é semicristalino e apresenta alta cristalinidade, o que garante um pico de fusão bem definido e intenso. Sua massa molecular pode variar de 5.000 a 80.000 Da. Apresenta como características especiais um caráter hidrofóbico (AMASS, 1998) permitindo que sua estrutura final permaneça inalterável na presença de água, uma baixa ordem de toxicidade, baixo ponto de fusão (50-60 °C), temperatura de transição vítrea abaixo da temperatura ambiente (-60°C), grande miscibilidade ou compatibilidade mecânica com outros tipos de polímeros (SINHA, 2004), baixa viscosidade e densidade no valor de 1.13 g/cm<sup>3</sup> (MOONEY, 1992). As propriedades de baixa viscosidade e grande miscibilidade tornam esse polímero um bom auxiliar de processamento de polímeros, reduzindo assim a temperatura de transição vítrea e o módulo de elasticidade de blendas (MARIANI, 2005).

As aplicações desse polímero são diversas, como: em sistemas para liberação controlada de fármacos, recobrimento de cânulas uretrais e na engenharia tecidual, em tecido epidérmico, muscular, ósseo e cartilaginoso (SASMAZEL, 2008).

Como citado anteriormente, o processo de obtenção da policaprolactona consiste na polimerização por abertura de anel, proveniente do monômero de ε-caprolactona, resultando como produto um poliéster alifático, conforme mostra a figura 3 (JONES, 2004). Em 1958, foi descrita a primeira síntese do PCL, devido à abertura do anel do monômero pela adição de carbonato de potássio, em uma temperatura de 150 °C por 5 horas, sintetizando a primeira poli(ε-caprolactona) (NATTA, 1958).



**Figura 3: Polimerização por abertura de anel (NATTA, 1958)**

O PCL é um polímero solúvel em clorofórmio, diclorometano, tetracloreto de carbono, benzeno, tolueno, ciclohexanona e 2- nitropropano em temperatura ambiente. Além disso, possui uma lenta solubilidade em acetona, 2- butanona, acetato de etila, dimetilformamida, acetonitrila e é insolúvel em álcool, petróleo éter (benzina) e em éter dietílico (SINHA, 2004).

Quando implantado, o PCL sofre um processo de bioreabsorção auto catalítico (PITT, 1990). Os padrões cinéticos da degradação consistem em um processo no qual há liberação do ácido carboxílico havendo hidrólises e clivagem de grupos ésters. A degradação é um pouco mais lenta se estendendo por um período maior de um ano, sendo dividido em três etapas. Na primeira etapa o material sofre um processo de degradação não enzimática que resulta na susceptibilidade da ligação éster à hidrólise. A segunda etapa é caracterizada por um declínio da taxa de cisões das cadeias e um aparecimento de perda de massa molar, formando oligômeros de cadeia curta. A perda de massa tem uma grande probabilidade de ser relacionada às cisões das cadeias de peso molecular mais baixo, as quais irão produzir um fragmento pequeno capaz de difundir para fora do volume do polímero, produzindo partículas menores e aumentando a facilidade de serem fagocitadas por macrófagos. Na terceira e última etapa, o PCL de baixo peso molecular é fagocitado por macrófagos e metabolizado pelo ciclo dos ácidos tricarbóxicos ou eliminado pela excreção renal (TOLLON, 2005).

A degradação de polímeros *in vitro* difere da degradação *in vivo*, principalmente porque no último, o suporte\implante está submetido a diversas influencias como variações de pH, esforços mecânicos, fluxos biológicos e etc. Apesar disso, para simular o comportamento do material\estrutura ensaios *in vitro* são capazes de fornecer informações muito valiosas. Nestes ensaios pode-se alterar diversas propriedades (como composição química, morfologia e aspecto

superficial do implante), principalmente a fim de se ter uma noção da taxa de degradação do polímero antes de implanta-lo. Em etapas anteriores, pode-se ainda utilizar o teste de degradação em solução tampão para avaliar propriedades específicas, como a massa molar inicial, a distribuição de massa molar, o grau de cristalinidade e a taticidade do PCL (ELST, 1996).

## 2.6. Processo de Eletrofiação

O processo de eletrofiação tem a sua origem em 1902 com uma patente do processo depositada por J. F. Cooley (1902) e W. J. Morton (1902), na qual uma deposição de um polímero viscoso induzida por forças eletrostáticas ocorre sobre um eletrodo carregado positivamente, estando perto de um eletrodo de carga oposta. Alguns anos depois, Formhals (1934) patenteou uma seqüência de adaptações ao processo e equipamento de eletrofiação. Ele foi capaz de introduzir um alvo coletor móvel, o que permitiu a obtenção de fibras com um certo grau de orientação. Além disso, ele confirmou a necessidade de “secar” os fios ou fibras ao atingirem o coletor. Também desenvolveu métodos para eletrofiar diferentes materiais ao mesmo tempo, obtendo membranas e fibras compostas de um ou mais materiais. Muitos desenvolvimentos e produtos subseqüentes a partir desta técnica também foram patenteados.

Através desta técnica é possível obter fios e fibras que variam de diâmetros nano até micrométricos a partir de uma diversidade de materiais, principalmente soluções cerâmicas e poliméricas. Diâmetros da ordem de 3 a 5nm já foram obtidos, mas não podem ser obtidos grandes quantidades, nem mesmo em escala laboratorial (ZHOU, 2003)

Até então, este processo tem sido investigado para diversos usos. Na maior parte para cosméticos como mascarar para pele, tratamento e terapia de pele com medicamentos (KUMBAR, 2008). Para aplicação médica mais específica, tem-se utilizado o processo para produzir estruturas para liberação controlada de fármacos, equipamentos hemoestáticos e recobrimento de ferimentos (KIM, 2007). Na engenharia de tecidos, as membranas porosas vem sendo investigadas para regeneração de pele, tubos sanguíneos e tecido nervoso, além de atuarem como *scaffolds* tridimensionais para regeneração nervosa, óssea, cartilaginosa, entre outros (LANNUTTI, 2007 e SILL, 2008). Além disso, pode ser utilizado para uso militar, produzindo

tecidos protetores com mínima impedância ao ar e eficiência em isolar partículas de aerosol e gases anti-bioquímicos. O uso como nanosensores térmicos, sensores piezoelétricos e sensores bioquímicos também vem sendo estudado (DING, 2009 e WANG, 2002).

O equipamento mínimo necessário para obter fibras pelo processo de eletrofiação precisa conter os seguintes componentes:

- Material em estado viscoso armazenado;
- Um eletrodo conectado a uma agulha capilar de saída do material;
- Um gerador de alta tensão conectado ao eletrodo;
- Um alvo metálico com carga oposta a do eletrodo em contato com o material;

Quando o gerador de alta tensão é ligado, um campo elétrico é criado entre o alvo metálico e a agulha de saída do material. Este campo elétrico, quando atinge uma voltagem crítica, é capaz de gerar uma força elétrica na superfície do material viscoso, provocando uma atração do material ao alvo de carga oposta. Esta atração faz com que o material se desloque da ponta da agulha capilar, atingindo o alvo coletor. Ao sair da ponta da agulha, o “fio” ou “fibra” formado, tende a chicotear constantemente ao formando uma trajetória cônica devido às grandes mudanças de densidades de cargas na superfície do fio. Desta forma, as densidades de carga acabam “puxando” e trefilando o fio, formando assim estruturas de diâmetros da ordem de micrômetros e nanômetros ao serem coletadas.

É fácil perceber que este processo envolve uma quantidade significativa de parâmetros que influenciam diretamente na qualidade final do fio obtido no coletor. Estes podem ser divididos em dois grandes grupos: parâmetros relacionados ao material, como concentração de solução, volatilidade e solubilidade do solvente, tensão superficial da solução, condutividade elétrica da solução, temperatura, peso molecular do polímero (para soluções poliméricas), e parâmetros relacionados ao processo, como voltagem aplicada ao sistema, taxa de infusão da solução, distância entre o alvo coletor e a saída do material, ambiente gasoso, tipo de alvo utilizado e propriedades dielétricas do sistema. Alguns destes parâmetros serão melhor detalhados mais adiante na seção 2.9.

Para ser bem estudada, a obtenção dos fios por eletrofiação é dividida em determinadas etapas. Inicialmente ocorre a geração da gotícula, em seguida há a formação do cone de Taylor, alongação do fio contínuo, geração de regiões de instabilidade e finalmente solidificação do fio sobre o coletor (RAMAKRISHNA, 2005 e ANDRADY, 2008).

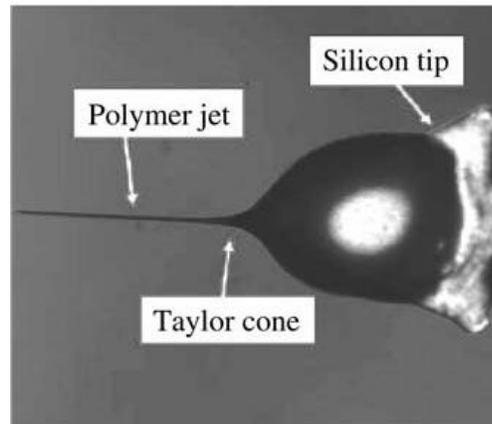
### 2.6.1. Estágio I - Geração da gotícula

Nos processos mais atuais de eletrofiação a solução de material é bombeada através de uma ponta capilar metálica em baixa taxa de infusão. Deste modo, se não for submetida a um campo elétrico, as gotículas simplesmente iriam se formar na ponta do capilar e cair devido à força da gravidade. Já, se o sistema for submetido a um campo elétrico crítico, a força gravitacional será somada à força elétrica dentro do material, contra a energia superficial do material.

Neste caso, a força gravitacional e a força elétrica irão se opor a força superficial capilar, o que irá reduzir significativamente o raio da gota principal, formando um filamento ou fio que será atraído ao alvo de carga oposta no sistema (ANDRADY, 2008).

### 2.6.2. Estágio II - Formação do cone de Taylor

Quando a voltagem é aplicada e o campo elétrico é formado, as gotículas alongadas na ponta do capilar, já a ponto de formação do fio, assumem uma forma tipo cone e assim o jato de filamento é ejetado deste local. Isto acontece devido à alta concentração de cargas na superfície da solução, mais especificamente na ponta do cone formado. Como ilustrado na figura 4, o cone é formado em uma voltagem crítica aplicada na gotícula na ponta do capilar. É esta mudança de gotícula em cone de Taylor que permite a formação dos fios contínuos em direção ao alvo de carga oposta (TAYLOR, 1964 e ANDRADY, 2008).



**Figura 4: Cone de Taylor (KAMEOKA, 2003)**

### 2.6.3. Estágio III - Lançamento do filamento

Idealmente, o filamento do material deve sair pelo cone de Taylor de forma estável e contínua. Infelizmente isso nem sempre ocorre. Devido às diferentes concentrações e constantes alterações de concentração de cargas ao longo da superfície da gotícula ocorre a saída de múltiplos jatos. Nestes casos existe a tendência de um jato primário manter-se contínuo e estável, enquanto os outros perderiam efeito e alongamento após determinado tempo. Além disso, se determinados parâmetros que regem o processo forem exagerados o material ao invés de formar fios contínuos ao final do processo, forma uma espécie de spray, produzindo camadas de pequenas fibras ou gotículas sobre o alvo coletor (ANDRADY, 2008).

### 2.6.4. Estágio IV - Alongamento do fio

O fio contínuo gerado a partir da ponta do cone de Taylor é continuamente estirado durante a sua trajetória em direção ao alvo coletor. Este processo contínuo de redução de diâmetro do fio ocorre devido às forças de atração geradas a partir do campo elétrico no sistema, que vão se alocando e se concentrando na ponta do filamento.

## 2.6.5. Estágio V - Regiões de instabilidade

Diversos tipos de regiões de instabilidade do jato polimérico ao longo de sua trajetória em direção ao alvo coletor sendo estudadas e identificadas ao longo dos anos. Sabe-se que o modo e a intensidade da instabilidade do fio dependem diretamente do campo elétrico aplicado ao sistema, sendo que campos elétricos mais intensos favorecem o desenvolvimento destas instabilidades, e que é durante esta região que ocorrem os maiores decréscimos de diâmetro dos fios, aumentando significativamente sua área superficial, como mostra a figura 5. Neste contexto, diversos estudos buscam explicar matematicamente estas instabilidades e divergências de direção dos filamentos, mas os fatores que influem são diversos e alguns nem são sequer conhecidos (ANDRADY, 2008).

Em geral, o filamento dentro da região de instabilidade é governado por 6 forças:

- Força gravitacional em direção ao chão;
- Força eletrostática, que “puxa” o jato-filamento em direção ao alvo coletor. Esta força é principalmente governada pelo campo elétrico aplicado e pelas características do material;
- Forças de repulsão Coulombianas, que atuam na superfície do jato, introduzindo instabilidade e movimentos do tipo chicote. Estas forças dependem das características do material e do solvente utilizado.
- Forças viscoelásticas, que atuam contra a força de estiramento do filamento;
- Forças de tensões superficiais, que atuam também contra o estiramento do filamento. Dependem do tipo de material, solvente e aditivos utilizados no processo;
- Forças de fricção entre a superfície do jato-filamento e o ar ou gás exterior.

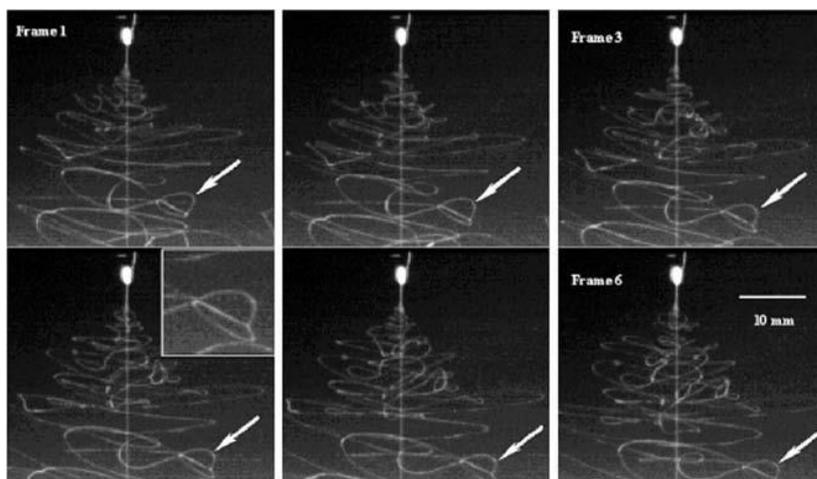


Figura 5: Regiões de instabilidade e “chicotes” (KAMEOKA, 2003)

### 2.6.6. Estágio VI - Solidificação e formação do fio/fibra

Neste estágio, a solução polimérica deixa O grande aumento da área superficial do jato-filamento durante a região de instabilidade promove um aumento significativo da taxa de evaporação do solvente da solução. Por sinal, este é um fator de grande influência da duração, em tempo, do filamento na região de instabilidade, uma vez que se for utilizado um material dissolvido em um solvente muito volátil a viscosidade da solução tende a aumentar muito rapidamente. Isto acaba deixando pouco tempo para que os fios se alonguem o que conseqüentemente fará com que ocorra a geração e captação de fios de diâmetros maiores ao final do processo. Este fator faz com que a escolha do solvente da solução se torne um dos parâmetros essenciais do processo (ANDRADY, 2008)

## 2.7. Parâmetros básicos de processo

Utilizando um processo de eletrofiação simples, e sabendo que a formação dos fios passa por todos esses estágios descritos acima, que são muito sensíveis, ainda pode-se controlar aspectos morfológicos e espaciais dos fios gerados controlando alguns parâmetros básicos de processo:

### 2.7.1. Voltagem aplicada

A voltagem que é submetida ao sistema reflete diretamente na morfologia e dispersão dos fios gerados. Aumentando a voltagem no sistema, deixando os outros parâmetros fixos, aumenta-se a concentração de cargas na superfície da solução e a força elétrica, gerada pelo campo elétrico, também é aumentada. Isso facilita a saída dos fios a partir da gotícula no capilar, iniciando o processo mais rapidamente. O aumento excessivo da voltagem geralmente resulta em uma espécie de jato de spray, em que não se formam fios no coletor, formam-se gotas muito pequenas. Apesar disso, deve-se controlar bem a voltagem a ponto que se obtenha a saída de um único filamento da ponta da gotícula, formando um cone de Taylor ideal. Obtendo um único filamento de saída no processo, é mais provável se obtenha uma menor variação de diâmetros de fios no alvo coletor, tornando o processo mais estável.

### 2.7.2. Taxa de infusão de material

Este parâmetro controla a quantidade de material que é “oferecido” ao sistema. Ele é ajustado na bomba de infusão e deve sempre estar em sintonia com a voltagem aplicada ao sistema. Isto, porque para uma voltagem fixa, se a taxa de infusão for muito alta, o fio de saída altera sua morfologia até certo ponto, no caso o diâmetro do fio aumentaria, e após isso ocorre um excesso de material na ponta da agulha, favorecendo a formação de gotas, e assim a solução acaba “pingando” esse excedente pela força da gravidade. Já, se a taxa de infusão for muito baixa, a força elétrica que acaba “puxando” o material acaba também alterando a morfologia dos fios, reduzindo o diâmetro destes, mas até um ponto em que a quantidade de material oferecida é interrompida, justamente pela falta de fornecimento contínuo de material para esta voltagem específica. Desta forma, a taxa de infusão e a voltagem do sistema devem estar em sintonia, para que a quantidade de material “fiado” seja proporcional à quantidade de material bombeado. Isto facilita a formação de fios contínuos e com pouca variação de morfologia.

### 2.7.3. Distância do alvo coletor

O alvo coletor, que nele está conectado o pólo negativo e saída de aterramento do sistema, deve estar a uma distancia mínima da ponta da agulha capilar. Esta distancia é medida tanto visualmente durante o processo, em que se observa o comportamento da saída ou ejeção do fio através do capilar e a chegada do material no coletor, ou após o processo, em que se faz uso de técnicas de microscopia para verificar a morfologia do fio formado. Essa distância é muito importante no processo, pois é durante este espaço que os fios irão formar sua trajetória, passando por todos os estágios citados acima, de forma a possibilitar que o material chegue ao coletor com praticamente todo o seu solvente evaporado. Caso isso não aconteça, os sinais mais clássicos são: escorrimento do material pelo alvo coletor (pode ser observado a olho nu, e indica que permanece uma grande quantidade de solvente no material coletado) e fusão dos fios no coletor (observado em análises de microscopia, e indica que ainda resta uma quantidade de solvente após o processo suficiente para dissolver a superfície do fio anterior e assim “colarem”).

### 2.7.4. Concentração e composição da solução

Este é um parâmetro que deve ser levado em consideração, pois modifica de forma significativa a morfologia dos fios e alguns aspectos do sistema apenas por alterar as propriedades reológicas do material. Fixando os outros parâmetros de sistema, o aumento ou redução da porção polimérica na solução promove, na maior parte das vezes, aumento e redução de diâmetro dos fios, respectivamente. Isto se deve, em grande parte, devido à alteração das tensões de superfície que a força elétrica deve romper e à maior ou menor “oferta” de material polimérico (em massa) para uma mesma secção transversal do capilar. Além disso, pode-se alterar a composição da solução a fim de produzir efeitos como mudança da tensão superficial da solução e taxa de evaporação de solvente ao longo da trajetória do fio (adicionando dois solventes com volatilidades diferentes).

### 2.7.5. Tipo de alvo

O “design” do alvo também é um fator que influencia diretamente na estrutura final obtida. Formas planas, como chapas metálicas, fazem com que os fios apenas sejam depositados sobre a placa subseqüentemente de forma a preencher a totalidade da área com o material. Caso ocorra uma mudança de alvo, como uso de placas paralelas, os fios irão se depositar tanto nas placas, como também por entre as placas, fazendo uma espécie de “ponte”. Alvos rotatórios, onde um eixo cilíndrico metálico serve de alvo para os fios, geram deposições mais ordenadas, formando uma estrutura final totalmente anisotrópica.

## Capítulo 3:

### MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Sistema de Eletrofiação

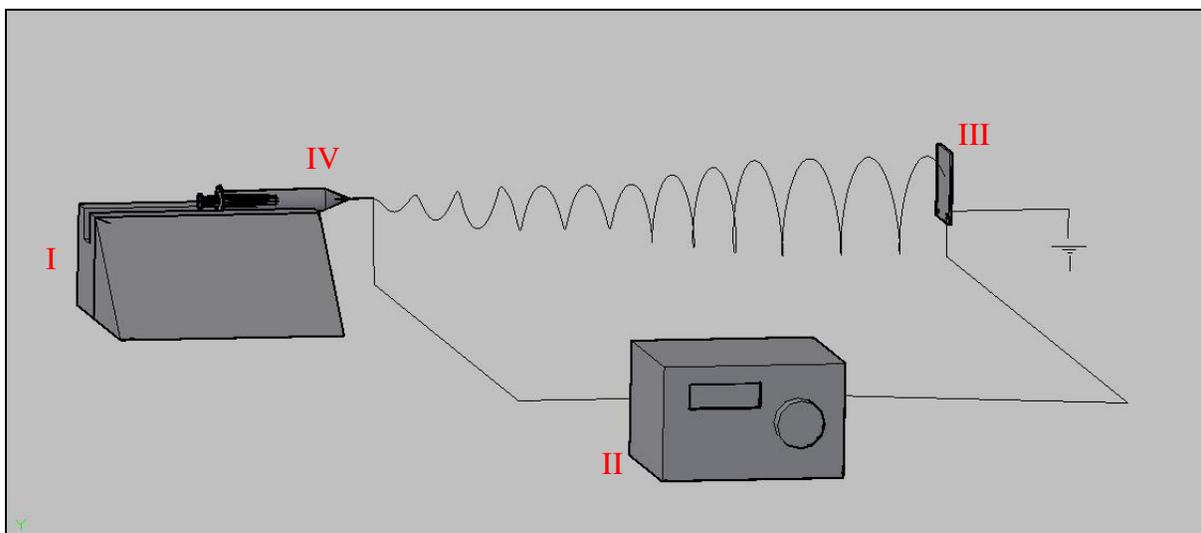
Antes de iniciar qualquer teste prático, foi necessário montar o sistema de eletrofiação. Trata-se de um processo relativamente simples, mas extremamente sensível quando em funcionamento. O sistema foi montado seguindo o modelo (figura 6), que acabou sendo o mais simples possível, composto por:

I - Bomba de infusão (KD Scientific, mod.KD-100);

II - Gerador de alta Tensão (0-30kV);

III - Placa de cobre 90x70mm;

IV - Seringa/agulha.



**Figura 6: Modelo para montagem do aparato de eletrofição**

### 3.2. Solução polimérica

Materiais:

- Policaprolactona (PCL) fornecido pela Sigma-Aldrich de massa molecular média 80,000;
- Clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ) fornecido pela Merck, 99%;
- Acetona ( $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ ) fornecida pela Synth, 99.5%.

Composição e preparação da solução polimérica:

- 20% peso de PCL;
- Proporção de 1:1 de clorofórmio/acetona.

Para preparar a solução polimérica inicialmente foi pesada a quantidade de PCL e em seguida adicionada a quantidade respectiva de clorofórmio. Essa mistura foi deixada sob agitação constante até que a totalidade do polímero fosse dissolvida. Imediatamente após a dissolução em clorofórmio foi adicionada a porção de acetona. Finalmente, toda a mistura foi deixada sob agitação constante por um tempo mínimo de 24h a fim de que fosse obtida uma solução polimérica mais homogênea.

### 3.3. Produção das membranas de PCL

Feita a solução polimérica o próximo passo foi produzir as membranas propriamente ditas através do processo de eletrofiação. Para fazer isso, 15ml de solução foram colocadas em uma seringa de vidro graduada de 20ml e foi acoplada uma agulha, com diâmetro interno de 0.8mm, para promover a ação capilar do sistema.

A seringa carregada de material foi então corretamente alocada na bomba de infusão do sistema e o conector de pólo positivo do gerador de tensão foi devidamente posicionado na ponta da agulha capilar. Em seguida foi preparado o alvo coletor metálico recobrimdo a placa de cobre com uma camada de folha de papel alumínio, tomando o cuidado de deixar com que o papel alumínio ficasse em contato com os terminais de entrada do pólo negativo/aterramento e saída de aterramento. Feito isso, o alvo coletor foi devidamente posicionado dentro do sistema com seu centro alinhado à ponta de saída da agulha capilar e a uma distância de 12 cm.

Na bomba de infusão foi estabelecida uma taxa de 18ml/h e durante alguns momentos, cerca de 2 minutos, foi necessário deixar ela ligada antes de ligar o processo inteiro, para que fosse estabilizada a saída do material na forma de gotas pelo capilar. Finalmente, foi ligado o sistema utilizando uma faixa de voltagem de 16 a 20kV. Esta faixa de voltagem foi utilizada pois um dos objetivos secundários do trabalho foi de produzir membranas compostas de fios com variação de diâmetro. É justamente esta variação de diâmetros, juntamente com a sobreposição dispersa dos fios, que possibilita a formação de espaços vazios e porosidade interconectada ao longo da estrutura. Como o controle da intensidade de voltagem no sistema é manual, a cada tempo, estabelecido em aproximadamente de 20 em 20 minutos, a voltagem foi alterada de 16 para 20 kV e 20 para 16 kV sucessivamente.

**Tabela 1: Principais parâmetros de processo**

<b>Parâmetros</b>	<b>Valores</b>
Voltagem	16-20kV
Distancia alvo	12cm
Taxa de infusão	18ml/h

Após 4 horas de processo uma camada de 1.6mm de espessura foi depositada sobre o alvo coletor. Para retirar a camada do alvo, o papel alumínio foi retirado e a camada polimérica foi destacada inteiramente utilizando pinças.

No total foram produzidas duas membranas de 20x50x1.7mm. Estas membranas foram, em seguida, caracterizadas e testadas utilizando ensaios visuais, térmicos, físicos e biológicos para verificar a viabilidade do material em desempenhar as funções a ele atribuídas.

## 3.4. Ensaios Visuais

### 3.4.1. Microscopia Eletrônica de Varredura

A morfologia e dispersão dos fios nas membranas poliméricas foram observadas e caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura utilizando um microscópio Jeol (JXA 840 A). Todas as amostras utilizaram recobrimento de ouro por meio do Sputer Coater (Bal- Tec-SCD 050) com corrente de 40 mA durante 200 segundos, com tensão de operação em 10 kV.

Para as amostras após ensaio *in vitro*, foi realizada a fixação celular, utilizando uma solução de glutaraldeído em tampão de cacodilato de sódio a 0,1 Molar, para que as células aderidas ao material não sofram nenhum tipo de alteração morfológica e disposicional quando submetidas em ambientes a vácuo.

### 3.4.2. Microscopia Confocal

A Microscopia Confocal é uma técnica utilizada para a visualização de uma diversidade de materiais, inorgânicos ou orgânicos. Para gerar as imagens digitais, o microscópio utiliza uma fonte de laser que é capaz de promover excitação dos mais diversos tipos de grupos moleculares. Utilizando um conjunto de lentes, o microscópio é capaz de focar um cone de luz laser em uma profundidade predeterminada da amostra a ser estudada. Ao alterar o ponto focal (mantida a profundidade) é possível iluminar todo o plano em estudo, ponto a ponto. Ao retornar pelo

mesmo caminho óptico, a luz devida à fluorescência, gerada a partir das excitações moleculares, é separada por um conjunto de espelhos (divisor de luz). Em seguida, a luz separada passa por um pequeno orifício, chamado pinhole, capaz de separar apenas a luz proveniente do ponto focado, eliminando a luz emitida por pontos fora de foco. Assim, somente a luz de pontos em foco é registrada, utilizando tubos fotomultiplicadores. Estes sinais são processados por um computador e imagens bidimensionais podem ser construídas. Para obter imagens tridimensionais, devem ser tiradas imagens sucessivas de diferentes planos da mesma amostra.

Foi utilizado um equipamento de Microscopia Confocal invertido LSM 510 Axiovert 220M, fabricado pela Carl Zeiss. As imagens foram feitas a partir de amostras de 5x5mm com adição de água.

### 3.4.3. Imunofluorescencia

Para poder visualizar melhor a morfologia e a disposição espacial das células sobre a membrana, a técnica de Imunofluorescencia foi utilizada. Esta técnica parte do principio de que um material emite uma energia detectável como luz visível quando este é irradiado com uma luz de um específico comprimento de onda (laser). O material ou amostra pode ser auto-fluorescente (fluoresce em seu estado natural), como clorofila e outros minerais, ou ser tratado com alguns agentes químicos fluorescentes. Desta forma, esta técnica de análise é aplicada em diversas áreas de pesquisa, principalmente nas áreas médica e biológica, justamente por fazer possível a identificação de células e componentes celulares com alto grau de especificidade. Por exemplo, determinados anticorpos e condições de doenças ou impurezas em materiais inorgânicos podem ser estudados e identificados com a microscopia de fluorescência.

Para as análises neste projeto, as amostras foram “escaneadas” a laser em um LSM-510 (Zeiss) montado sobre um microscópio Axioplan (Zeiss), utilizando objetivas de 40x. As amostras foram tingidas com agentes químicos DAPI (utilizado para revelar os núcleos celulares) e Rodamina-Faloidina (utilizada para revelar o corpo celular).

## 3.5. Ensaios Térmicos

### 3.5.1. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e Termogravimetria (TG)

O funcionamento do DSC parte do princípio da captação de sinais de energia quando um sistema absorve (reações endotérmicas) ou libera (reações exotérmicas) energia. Para realizar as medidas, que são plotadas em um gráfico de energia específica (mW/mg) x Temperatura (°C), uma pequena massa do polímero é colocada em um cadinho, geralmente de alumina, e este cadinho é então alocado dentro do aparelho. Este cadinho fica localizado dentro de um pequeno forno ao lado de outro cadinho, que deve permanecer vazio para que se estabeleça um meio comparativo e assim obter dados de variação de energia.

A técnica de Termogravimetria (TG) foi realizada simultaneamente ao DSC. Na TGA, o que se analisa é a perda de massa da amostra ao ser gradualmente aquecida resultando em uma visualização gráfica de %massa x Temperatura (°C). Para se obter estes dados, o equipamento é dotado de uma balança muito sensível na base de cada cadinho. Desta forma, qualquer composto que durante a faixa de temperatura estabelecida é liberado da amostra, em sua maioria na forma de gases, reflete diretamente na massa da amostra inicial.

Ambas as análises foram realizadas principalmente para verificar se a membrana possui traços de solvente após o processamento. Verificar isso é de extrema importância, pois os solventes que são utilizados devem ser eliminados totalmente durante o processo, uma vez que exibem caráter tóxico se entrarem em contato com material biológico.

Foi utilizado o equipamento NETZSCH (STA 409) para um intervalo de 0 a 200°C e com taxa de aquecimento de 10°C/min.

## 3.6. Ensaios Físicos

### 3.6.1. Análise Dinâmico-Mecânica (DMA)

O DMA é uma técnica utilizada para caracterizar materiais poliméricos através da medida do comportamento mecânico do material em solicitação oscilatória. O equipamento caracteriza o comportamento viscoelástico de um material quando este é submetido a forças dinâmicas (frequência – carga oscilantes) em um sistema capaz de controlar a temperatura. O sistema utiliza um oscilador conectado a uma haste que é acoplada a um dos variados tipos de módulos de operação para esforços mecânicos. Estes módulos, que podem ser de tração, flexão, compressão, fadiga ou cisalhamento, são então fechados por um pequeno forno, que controla a temperatura durante o ensaio.

Este ensaio foi realizado para se ter uma indicação do comportamento físico das membranas quando submetidas a esforços mecânicos cíclicos em diversas frequências. O aparelho NETZSCH (DMA 242) utiliza um porta-amostra semelhante ao de ensaio de tração, com dimensões muito menores, onde amostras de dimensões 5x15mm são devidamente fixadas. Tensões trativas são impostas à amostra com força e conjunto de frequências determinadas. Além disso, foi determinada uma temperatura fixa para o ensaio que procura simular a temperatura que se encontraria dentro do corpo humano. Um total de oito amostras foram testadas utilizando sempre os mesmos parâmetros: Força de 2N, temperatura constante de 36°C , taxa de aquecimento de 3°C/min, frequências 0,5/1,0/2,0/3,3/5,0 e 10,0Hz e tempo de ensaio de 120min.

### 3.6.2. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR permitem a visualização de diversos fatores que envolvem a alteração da estrutura e composição molecular de um polímero ou composto. O equipamento é capaz de captar dados de energia resultantes do estímulo por irradiação com ondas na região do infravermelho, que ao serem incididas no material seja por transmissão ou por atenuação fazem a

estrutura molecular e de compostos químicos presentes vibrar. Deste modo, cada tipo de molécula ou ligação interatômica possui uma respectiva intensidade vibracional quando irradiada por um determinado comprimento de onda no infravermelho, tornando o espectro infravermelho (I.V.) de um composto químico característico de cada material e, por conta disto, a espectroscopia na região do I.V. tem extensa aplicação na identificação dos compostos. Além disso, diversos resultados podem-se ter a partir do espectro I.V. de um composto, dentre eles, orientação molecular, cristalinidade, análises de superfície.

Para este estudo, foi utilizado o aparato Thermo Scientific - Nicolet NR100. Os respectivos espectros das amostras foram realizados utilizando varredura média de comprimento de onda IV de 500 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

Os espectros de FTIR do material foram tirados para quatro tipos de amostras. A primeira é a pcl\_base, que é uma membrana de PCL resultante da evaporação da porção de solvente da solução PCL 20% a temperatura ambiente. A segunda é a pcl\_A, em que se utilizou uma membrana de PCL pós-processamento e foi feito uma separação e estiramentos dos fios manualmente. A terceira amostra, pcl\_B, foi feita utilizando KBr e uma separação simples e delicada, feita com pinças, da membrana pós-processamento. Finalmente, a quarta amostra, pcl\_C, foi feita com pastilha de KBr e um simples pedaço de membrana pós processamento

## 3.7. Ensaios Biológicos

Foram realizados para determinar tanto se o material exibe quaisquer reações tóxicas frente ao sistema biológico, quanto para verificar, em uma etapa inicial, o comportamento de células vivas quando em contato com o suporte celular.

### 3.7.1. Testes *in vitro*

O material foi submetido a uma cultura *in vitro* com células tronco mesenquimais provenientes de tecido adiposo (MSCs). Inicialmente, o material passou por um processo de esterilização com álcool 70% durante duas horas e em seguida foi lavado com solução tampão

salina (PBS) por mais 20 minutos. Em seguida, o material foi cortado em pequenos pedaços de  $1\text{cm}^2$  e colocados em placas de 24 poços. Para cada pedaço foi adicionado pela superfície cerca de  $5 \times 10^5$  células de MSCs diluído em  $30\mu\text{l}$  de meio de cultura DMEM. Para a adesão e infiltração ao material, essas células foram encubadas por uma hora numa estufa a  $37^\circ\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$ . Em seguida, adicionou-se 1ml de meio de cultura DMEM com 10% de soro fetal bovino e as células foram mantidas por 6 dias em cultura.

Para este teste *in vitro*, somente uma análise inicial foi realizada para verificar a adesão e disposição das células ao longo da superfície do material. Foram estipulados dois tempos de cultura para que se pudesse fazer uma comparação de desenvolvimento das células: 3 e 6 dias. Após cada tempo as amostras foram retiradas do meio e passadas por protocolos para análises em microscopia de fluorescência e eletrônica de varredura.

## Capítulo 4:

### RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 4.1. Processo de Eletrofiação

Os componentes do processo foram devidamente conectados segundo as instruções teóricas e de acordo com experiências anteriores com o processo. Na figura 7, o aparato e seus componentes estão identificados.

Desta forma, como pode ser visto na figura 8, o campo elétrico formado fica localizado no espaço entre a entrada de material (conectada ao pólo positivo do gerador de tensão) e o alvo metálico (conectado ao pólo negativo e aterramento do sistema). É justamente este campo elétrico que é responsável pela geração de uma força de atração da solução polimérica ou força elétrica ( $F_e$ ) que somada à força gravitacional da gotícula ( $F_g$ ), acaba rompendo a tensão superficial da solução em direção ao alvo metálico coletor.



Figura 7: Equipamento montado: a. Fonte de alta tensão b. Bomba de infusão c. Alvo coletor.

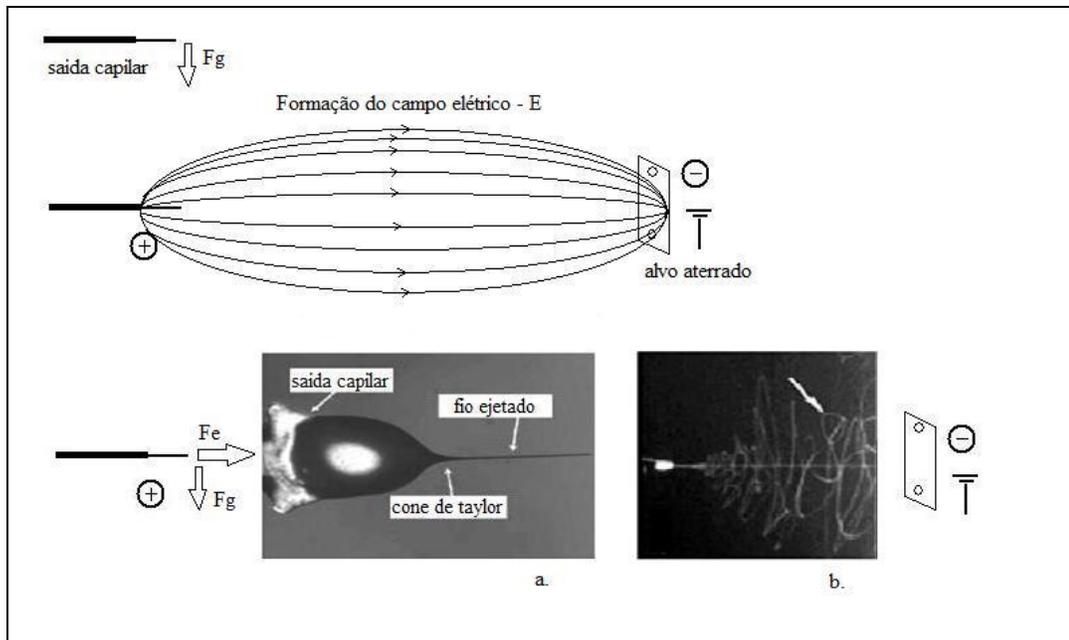
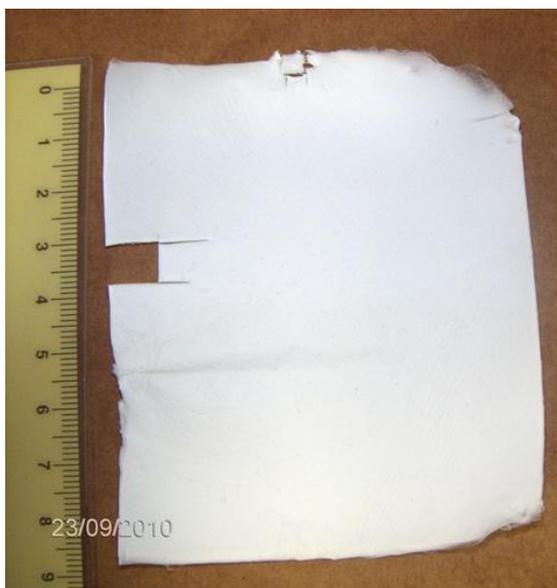


Figura 8: Principais forças resultantes e funcionamento do sistema.

Uma vez produzidas as membranas, diversas análises foram realizadas para verificar a viabilidade de seu uso. Para isso, ensaios térmicos, físicos e biológicos foram feitos e os seus respectivos resultados serão apresentados.

## 4.2. Aspecto Macroscópico das Membranas

Como mostra a figura 9, as membranas possuem um aspecto macroscópico contínuo e denso, similar ao de um tecido convencional. As dimensões da membrana ocuparam a totalidade do alvo metálico coletor, ou seja, 90x70mm e com espessura de 1,3mm.



**Figura 9: Membrana após o processo de eletrofição**

Sua flexibilidade e capacidade de manipulação fazem com que o material seja facilmente cortado e utilizado para os mais diversos casos.

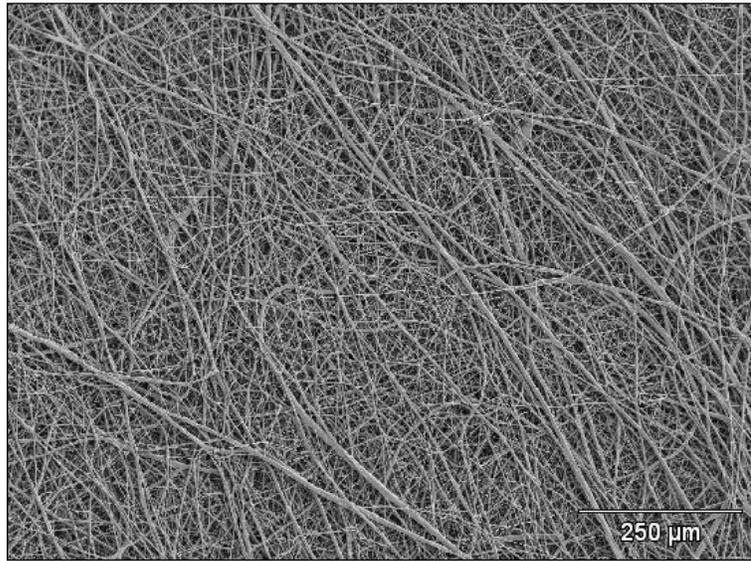
Há casos em que estas membranas são produzidas na forma de tubos, justamente para reconstrução de vasos sanguíneos (RING, 2007), ou então simplesmente utilizadas como membranas em duas dimensões para auxiliar a regeneração tecidual em queimados (LIU, 2010) e até mesmo como bloqueio físico para casos em que não se deseja o contato entre tecidos após cirurgia (ZONG, 2004) .

### 4.3. Microscopia Eletrônica de Varredura das Membranas

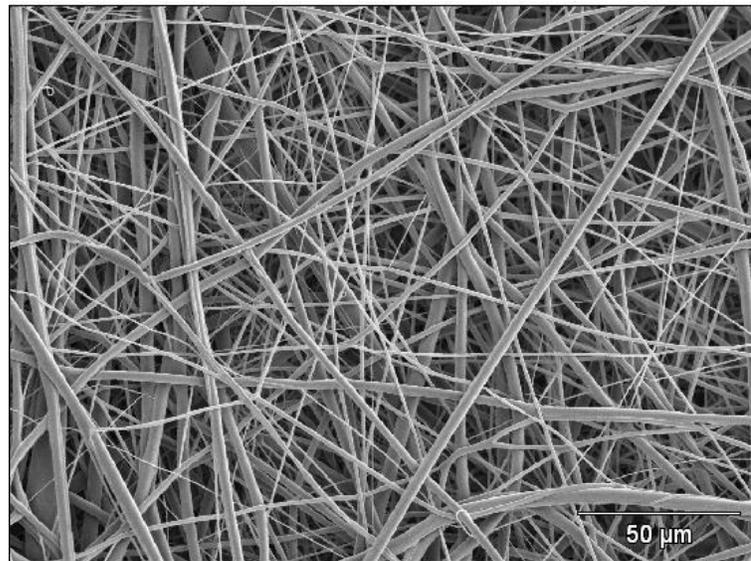
Esta análise foi feita para avaliar tanto a dispersão dos fios formados ao longo da amostra, quanto para verificar a variação de diâmetros de fios obtidos a partir dos parâmetros de processo utilizados. Também foi feita uma análise da porosidade da membrana, mas foi apenas para se ter uma noção qualitativa.

As figuras revelam que realmente as membranas produzidas utilizando os parâmetros estabelecidos são compostas de um emaranhado de fios dispostos aleatoriamente uns sobre os outros, como pode ser visto mais amplamente na figura 10. Fica evidente também a alta porosidade da estrutura, que pode ser notada pelos espaços vazios por entre os fios de material nas figuras 11 e 12. Nestas imagens também se pode notar que os parâmetros estabelecidos no processo fizeram com que os diâmetros dos fios variassem bastante, de valores da ordem nanométrica até micrométrica. Esta capacidade de controle de diâmetro dos fios apenas alterando a voltagem do sistema também é investigada por Fridrikh (2003) e Ishiil (2008). Isso contribuiu bastante para a geração da estrutura porosa. Neste caso, são estes poros e interconexões que irão supostamente promover uma melhor adesão e proliferação das células na membrana, permitindo que o material e células possam ser transportados e alocados de forma mais eficiente.

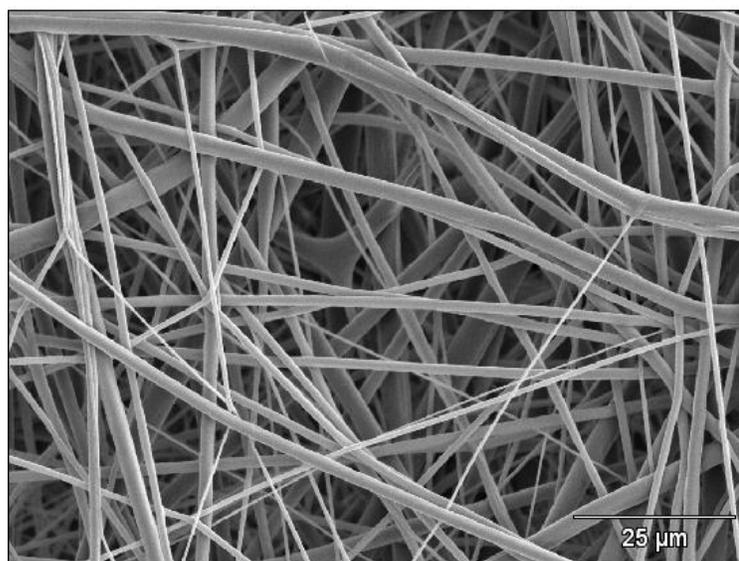
Esta possibilidade de transporte e alocação celular por entre a estrutura de fios também é avaliada por Zhu (2008), em que a membrana produzida promove adesão de células HDFs (Fibroblastos da Derme Humana).



**Figura 10: Microestrutura com uma visão mais ampla**



**Figura 11: Microestrutura da membrana visualizando a alta dispersão de diâmetro dos fios**

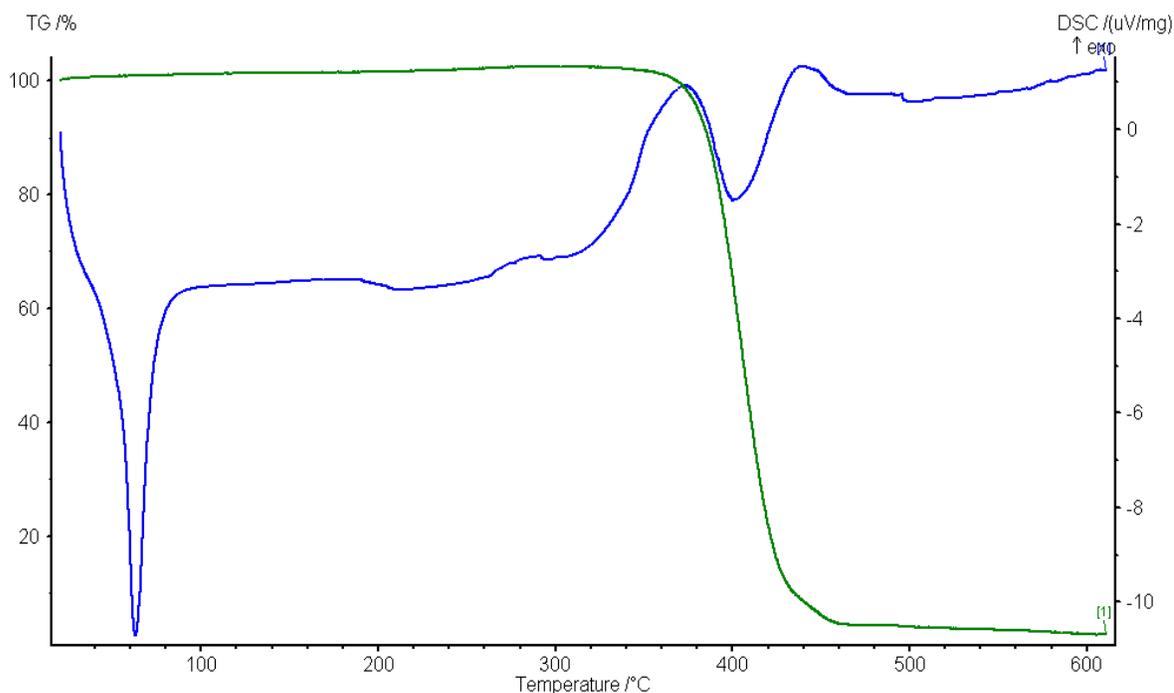


**Figura 12: Microestrutura da membrana evidenciando a interconectividade e espaçamento da porosidade**

#### 4.4. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e Termogravimetria (TG)

A figura 13 mostra os resultados das análises de DSC (curva azul) e TG (curva verde) realizados no material após o processamento. O objetivo principal destes ensaios é demonstrar que a membrana, após o processamento, não possui traços significativos dos solventes utilizados.

Sabendo que os solventes acetona e clorofórmio apresentam pontos de evaporação de 56 °C e 61°C, respectivamente, pode-se notar que na curva de TG, que avalia a perda de massa do material durante o ensaio, não houve nenhuma alteração visível nestas temperaturas. Apenas as variações de massa que representam a degradação do polímero podem ser vistas. Além disso, a curva de DSC também não apresenta variações que significariam pontos de saída de solvente, apenas indicando a temperatura de fusão do polímero PCL e as variações de degradação do polímero. Desta forma, pode-se concluir que houve a eliminação do solvente durante o processo de eletrofiação no trajeto do jato entre a saída do capilar e o alvo coletor.



**Figura 13: Curvas de DSC (azul) e TG (verde) do material após eletrofiação**

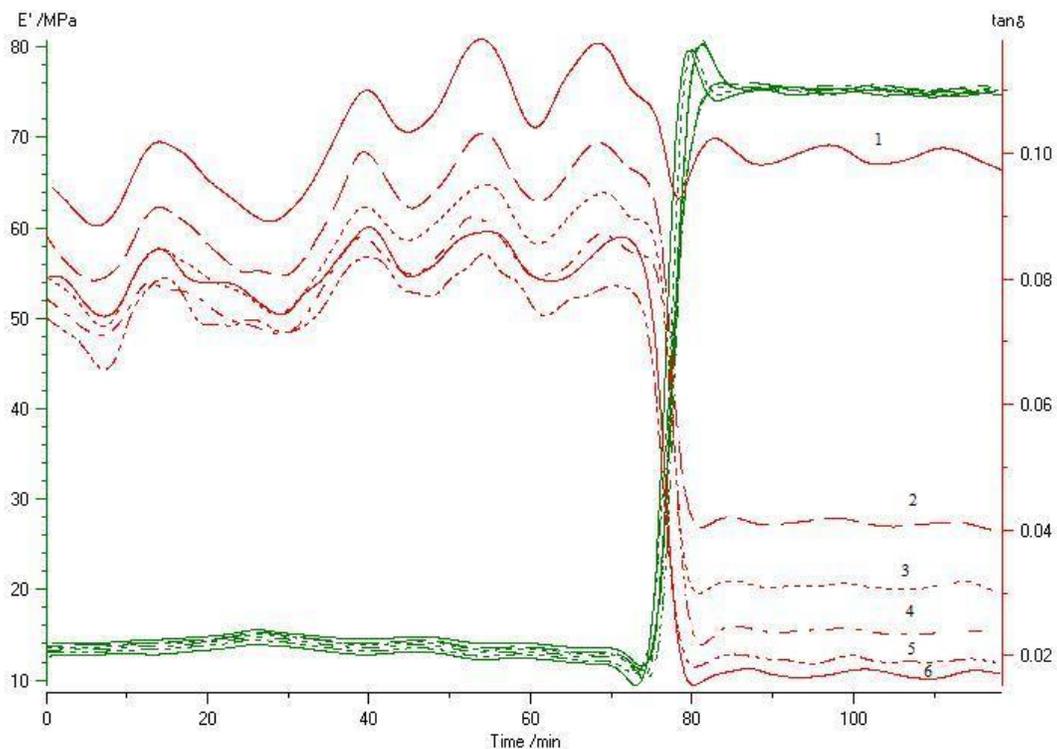
## 4.5. Análise Dinâmico-Mecânica (DMA)

O ensaio de DMA teve como objetivo analisar o comportamento dinâmico-mecânico da membrana ao ser submetida a uma temperatura fixa (que se assemelha à temperatura interna do corpo humano) e solicitada com uma tensão de amplitude fixa, onde variou-se apenas a frequência de solicitações. Na figura 14, é mostrada uma curva base do comportamento da membrana quando submetida a este ensaio. De acordo com os dados obtidos, a propriedade mecânica do material parece melhorar significativamente após um período de 70 minutos de ensaio. O que pode estar ocorrendo, para todas as frequências utilizadas, é que no início do ensaio as membranas apresentam um módulo de armazenamento relativamente baixo. Ao longo do tempo os fios que compõe as membranas vão se reorganizando e até rompendo ou se soltando das garras fixadoras da maquina, até restar apenas uma determinada quantidade de fios que se alinham com a tensão aplicada. É justamente esta área transversal de fios, além do alinhamento

das macromoléculas dentro do próprio fio polimérico, acarretando no aumento do módulo de armazenamento, o que implica no aumento da elasticidade do material.

É importante salientar que o mecanismo apresentado para explicar o aumento no módulo de armazenamento em função do tempo não é conclusivo, sendo necessário realizar estudos mais detalhados deste efeito.

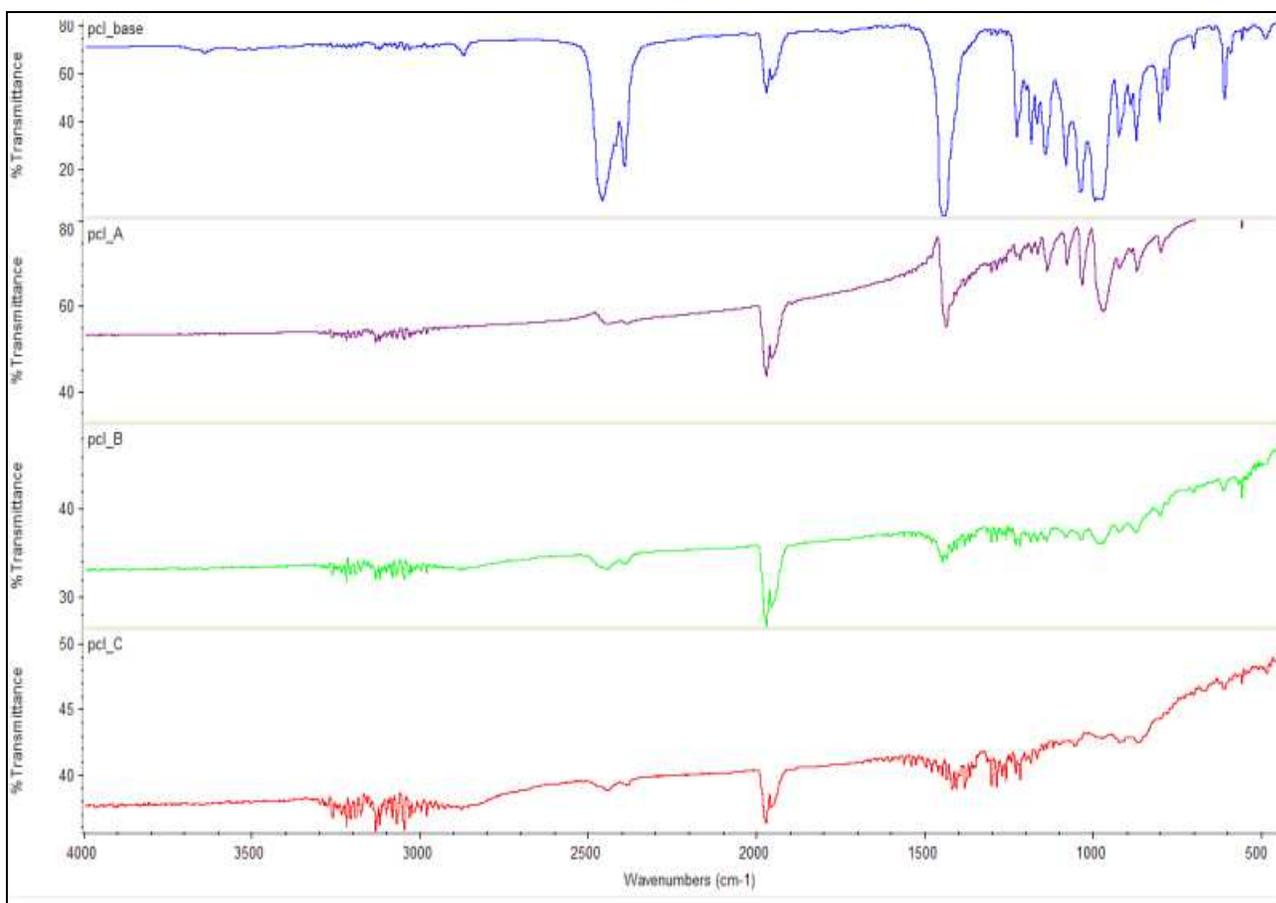
Como os parâmetros utilizados para este ensaio estão fora dos padrões normais para análise de ensaio de DMA em membranas produzidas por eletrofiação fica difícil estabelecer uma análise comparativa de resultados com pesquisas anteriores. Apesar disso, os resultados mostram que quando submetida a tensões uniaxiais e em temperatura de 36°C, o material é capaz de absorver e ainda melhorar sua capacidade de absorção de tensões para uma variedade de frequências de solitação.



**Figura 14:** Curvas de Módulo de armazenamento (E') e tan  $\delta$ , onde 1, 2, 3, 4, 5, 6 são referentes às frequências 0,5/1,0/2,0/3,3/5,0 e 10,0Hz, respectivamente.

## 4.6. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A figura 15 mostra a comparação de espectros para quatro situações de análise do polímero PCL. Baseado na estrutura química das macromoléculas, três faixas de picos característicos podem ser observadas. O primeiro pico está situado na faixa de 2300 a 2600  $\text{cm}^{-1}$  e diz respeito às bandas C-H do material. Na primeira amostra, pcl\_base, este pico está muito claro, pois a amostra está com sua região amorfa muito dispersa, o que faz com que exista bastante espaço para que ocorram estiramentos vibracionais resultantes destas ligações mais fracas. Nas outras amostras pcl\_A, pcl\_B e pcl\_C apenas traços deste pico aparecem, já que o processo de eletrofiação utilizado resulta em organização molecular, o que acaba limitando e não permitindo movimentações destas ligações. Esta condição pode ser ainda melhor verificada na faixa de 1300 a 1600  $\text{cm}^{-1}$  que representa as bandas C-O. Para estas ligações, observa-se um gradiente de redução de detecção nos espectros. No primeiro espectro (pcl\_base) as macromoléculas estão muito espaçadas, permitindo espaço vibracional. Já no espectro seguinte, pcl\_A, ainda ocorre uma detecção vibracional destas ligações, causada principalmente pelo método de preparação da amostra, em que, para poder realizar a transmitância do infravermelho através da amostra, esta foi estirada manualmente, de forma a esticar a estrutura, causando forças de separação das macromoléculas. No espectro da amostra pcl\_B traços de detecção das ligações C-O podem ser observados, pois para realizar a transmitância a amostra pós-processamento teve um desfiamento utilizando pinças, o que permitiu um afastamento das macromoléculas e desarranjo da estrutura final do material. Já na amostra pcl\_C poucos traços da faixa de detecção das bandas C-O puderam ser observados pois a amostra é referente à um pequeno pedaço da membrana após o processo de eletrofiação sem qualquer alteração estrutural. Finalmente, a faixa de comprimento de onda referente às bandas C=O (de 1800 a 2000  $\text{cm}^{-1}$ ) não sofreu nenhuma alteração para quaisquer amostras, uma vez que esta é uma ligação muito forte, que caracteriza o material. Desta forma, as alterações observadas nos espectros levam a crer que apesar de o processo não alterar a cristalinidade do polímero, ele acaba alterando a organização espacial das macromoléculas, orientando e empacotando-as. Em estudo parecido, Hiep (2010) também relaciona estas mudanças estruturais moleculares ao processo de obtenção dos fios.

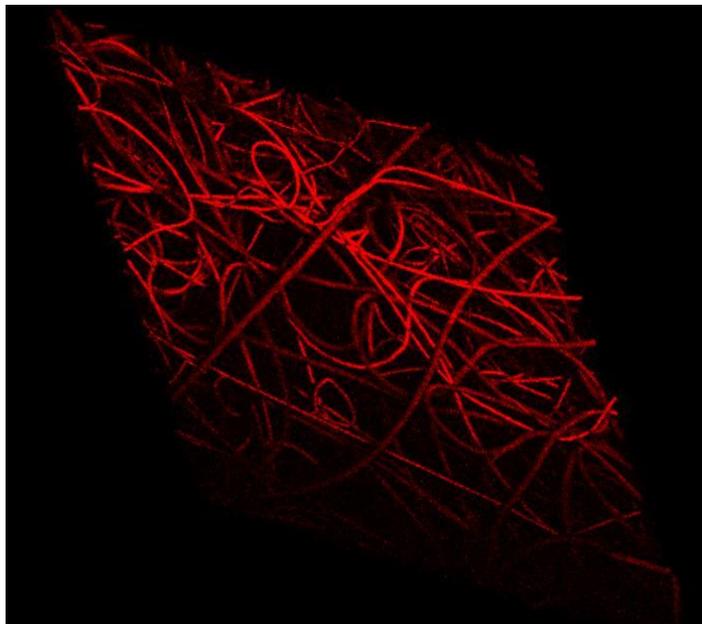


**Figura 15: Espectros de FTIR para amostras de PCL**

## 4.7. Microscopia Confocal

As amostras foram analisadas visualmente utilizando microscopia confocal para avaliar com mais detalhes a porosidade da membrana formada pela sobreposição de fios. Esta análise também é qualitativa, mas é capaz de mostrar regiões da amostra tridimensionalmente. Conforme mostra a figura 16 (vista em perspectiva lateral), a porosidade e espaçamentos dos fios da amostra é bem alta, promovendo regiões tanto de emaranhado, em que fios ficam sobrepostos, quanto regiões de espaçamentos consideráveis. É possível observar também a diferença de diâmetros dos filamentos e que estes não se apresentam ordenados, e sim totalmente aleatórios,

com áreas de entrelaçamentos e “nós”. Esta é uma varredura de um pequeno volume da membrana, cerca de apenas uma faixa do material,



**Figura 16: Vista 3D da membrana por Microscopia Confocal**

#### 4.8. Ensaio *in vitro*:

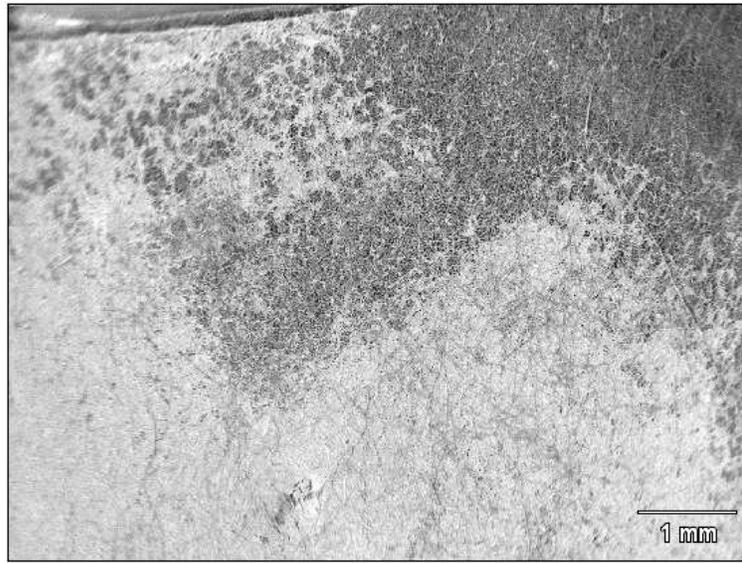
Realizadas as caracterizações físicas e térmicas, em que se procurou obter informações a respeito da viabilidade funcional das membranas, as próximas etapas seguem para avaliações do comportamento do material e sua estrutura quando submetidas à meios biológicos.

##### 4.8.1. Microscopia Eletrônica de Varredura

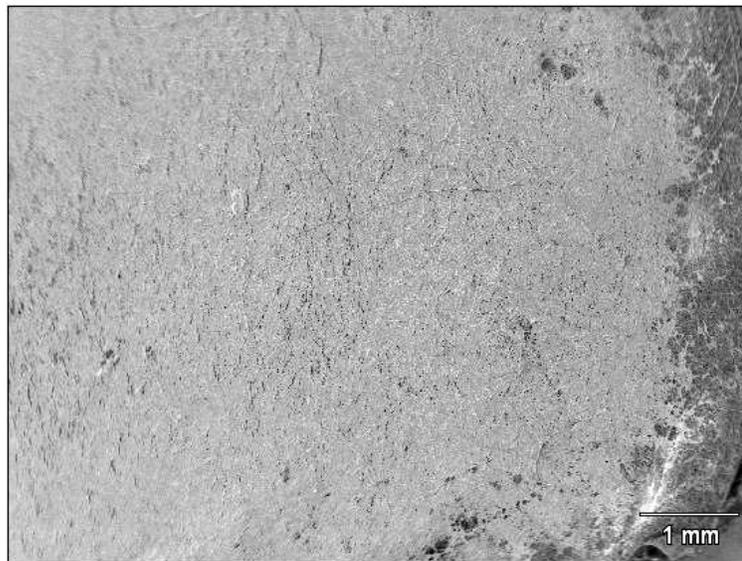
Esta análise visual foi realizada para se obter informações de comportamento das células conforme a estrutura e topografia oferecidas ao material biológico, ou seja, às MSCs de tecido adiposo.

As figuras mostram que as células puderam interagir com a topografia da estrutura e que, principalmente, o material se mostrou biocompatível. Além disso, o material não sofreu nenhuma alteração morfológica dos fios e conseqüentemente da sua estrutura física a curto e médio prazo, já que o material polimérico possui propriedade hidrofóbica. Isso é uma propriedade extremamente positiva, pois se pode prever melhor como a estrutura do material irá se comportar quando em contato com solução líquida. Existem casos em que o material utilizado para suporte celular altera seu aspecto estrutural, geralmente ao absorver água, levando à uma mudança de comportamento frente a solicitações mecânicas e até o comportamento das próprias células frente ao material (SILVA, 2008).

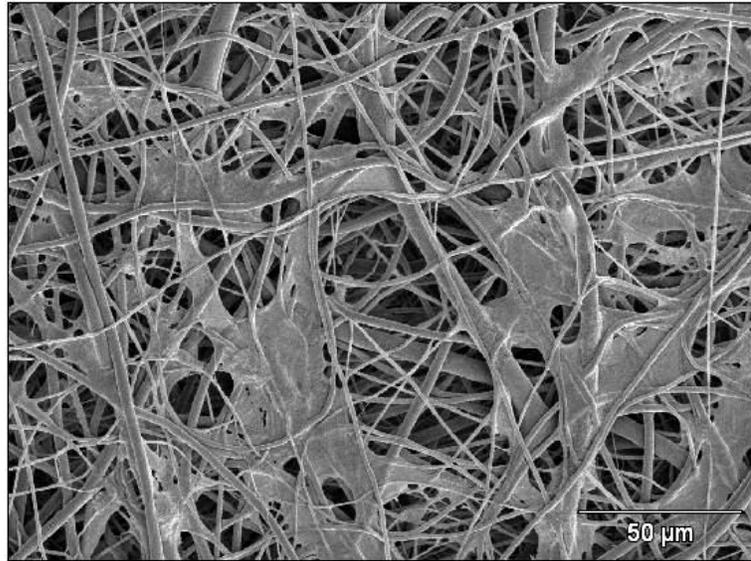
Analisando as imagens obtidas pela Microscopia, podemos tirar conclusões muito importantes a respeito da interação estrutura\células: Nas figuras 17 e 18 podemos ver um comparativo do avanço das células sobre a membrana ao longo do tempo, quase que cobrindo a totalidade da amostra após o tempo final de cultura. Nas figuras 19 e 20 as células estão sobre a estrutura e realmente ancoradas por entre os fios, o que leva a crer que a adesão neste tipo de superfície é mais eficiente e de maior contato célula/material, onde as células interagem tridimensionalmente com a estrutura. Na figura 21 podemos observar claramente que as células penetraram por entre a porosidade da membrana, se alocando no interior da estrutura, aumentando a capacidade de a membrana conter as células, promovendo sua proliferação não somente através da superfície, mas também em seu interior. Finalmente, na figura 22, as células apresentam uma cobertura total da estrutura, deixando um aspecto quase que “liso” da superfície, com células todas conectadas.



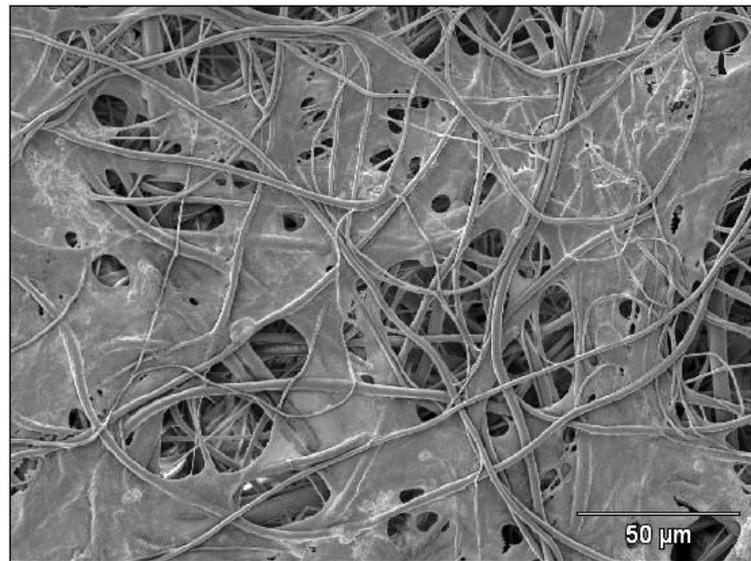
**Figura 17: Microscopia mais ampla após 3 dias de cultura celular.**



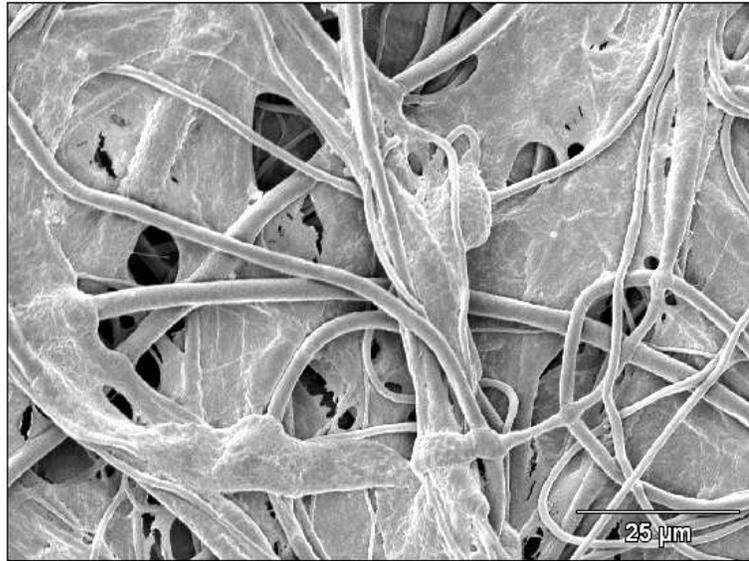
**Figura 18: Microscopia mais ampla após 6 dias de cultura celular.**



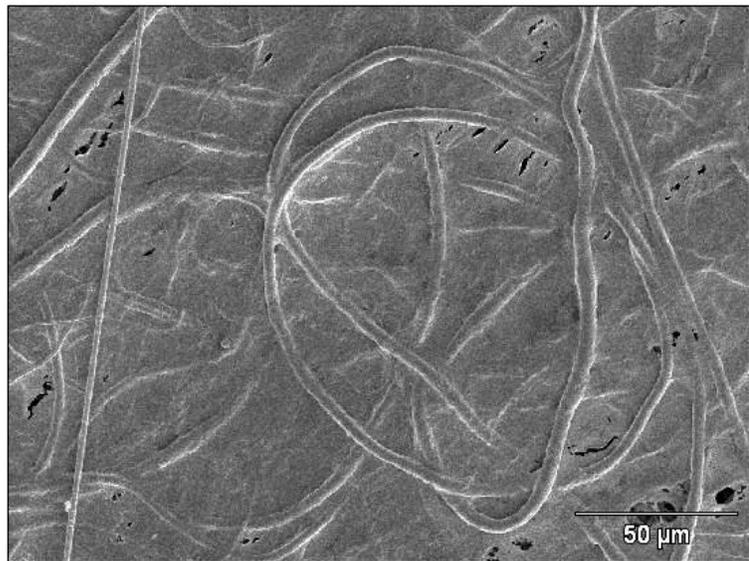
**Figura 19: Etapa de penetração e proliferação celular no suporte.**



**Figura 20: Maior recobrimento celular sobre o suporte.**



**Figura 21: Detalhe da penetração e ancoramento por entre os fios da estrutura.**

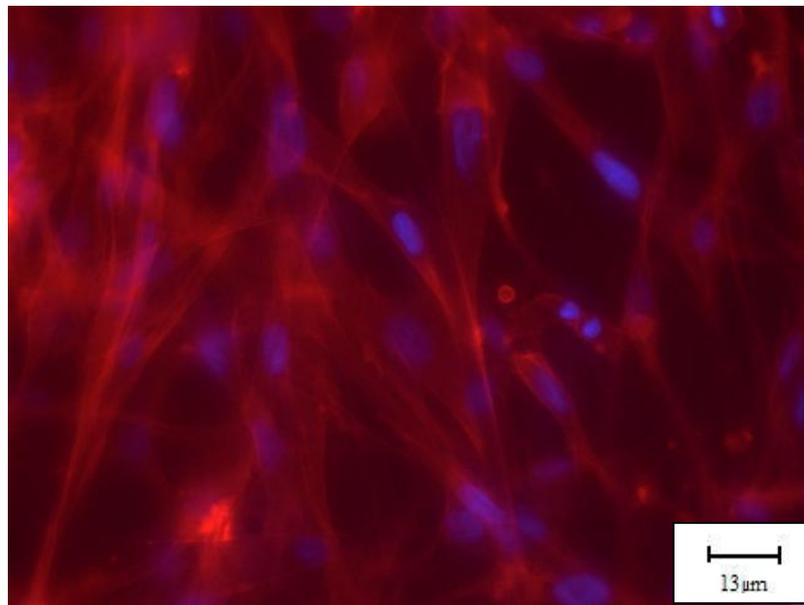


**Figura 22: Recobrimento praticamente total de uma seção do suporte com células.**

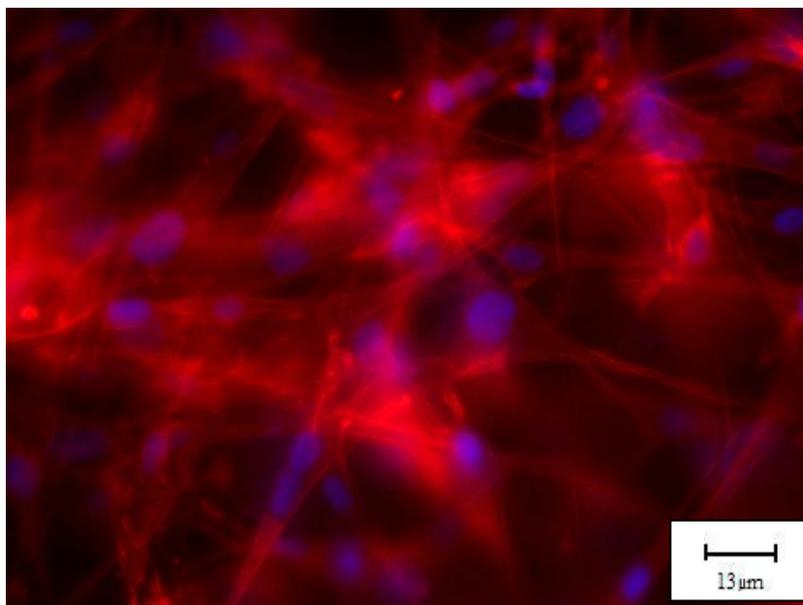
## 4.8.2. Imunofluorescência

As imagens de imunofluorescência foram realizadas não somente para evidenciar que as células estão aderidas a membrana, mas também para se ter uma noção de homogeneidade destas células ao longo da estrutura. Para isso, foi realizado um tingimento com rodamina-faloidina para revelar o corpo celular, e tingimento com DAPI para revelar o núcleo das células.

As imagens mostram qualitativamente que para ambos os tempos de cultura, sendo que a imagem da figura 23 se refere ao tempo de 3 dias e a imagem da figura 24 ao de 6 dias, são encontradas células na superfície da membrana. Os gradientes de tons de azul e vermelho dizem respeito a profundidade em que a célula ou estrutura celular se encontra. Tons mais fortes da coloração se referem à níveis mais superiores, superficiais, da membrana e em contrapartida, tons mais claros se referem à níveis mais interiores da estrutura.



**Figura 23: Núcleos e estrutura celular dispostos sobre a estrutura.**



**Figura 24: Detalhe de momento em que se sugere uma divisão celular.**

Pode-se visualizar também os fios do material, que aparecem como segmentos “transparentes”, mas visíveis na imagem 24.

Outro ponto importante a ser observado é que se sugere que em determinadas células, região inferior esquerda da imagem 24, e região central direita da imagem 23, estaria ocorrendo processos de divisão e multiplicação celular, evidenciado pelo “empescoamento” ou extrema proximidade de núcleos celulares (pontos azuis).

Segundo Alves da Silva (2010) e Yoshimoto (2002), a estrutura de porosidade interconectada, formada a partir da sobreposição dos fios poliméricos, fornece um excelente substrato para adesão e confinamento celular, já que as células penetram em níveis internos do material, sem perda de contato entre elas e, além disso, permitindo o fluxo de fluidos corpóreos.

## Capítulo 5:

### CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS

Com os resultados das análises realizadas foi possível concluir diversos fatores. Primeiramente, o aspecto visual macroscópico das membranas, que apresentaram uma espessura considerável, especificamente para o processo utilizado, foi muito eficiente, possibilitando fácil manuseio. As micrografias de varredura deixaram claras a alta dispersão de diâmetros dos fios e alta porosidade aparente interconectada, o que beneficiou a estrutura como um suporte mais “amigável” para as células. Outro fator de extrema importância foi a evidencia de que, pós-processamento, o material não reteve ou reteve em quantidades insignificantes, porções dos solventes utilizados. Isto fica ainda mais evidente na cultura celular *in vitro*, uma vez que as células puderam aderir e proliferar em sua superfície. Além disso, pôde-se observar que para uma temperatura fixa, que é a temperatura média do corpo humano, a estrutura, quando solicitada mecanicamente, exibe um comportamento típico de estruturas formadas por filamentos desordenados. Pode-se concluir também, que o processo estimulou uma organização e ordenamento das macromoléculas do polímero, não aumentando sua cristalinidade, mas aumentando o seu grau de empacotamento molecular. Quando submetido à cultura celular, a estrutura se comportou como da forma esperada, não havendo modificações morfológicas dos fios e promovendo adesão, proliferação e penetração celular. Finalmente, conclui-se que o material se torna muito eficiente como suporte celular, pois permite que as células fiquem ancoradas e entrelaçadas em meio a sua estrutura, favorecendo seu transporte e alocação em sítios defeituosos (pós-cultura celular). Além disso, como o material possui propriedades de

bioreabsorção, não existe a necessidade de novas intervenções cirúrgicas para retirá-lo do hospedeiro/paciente. Desta forma, fica a possibilidade de uso deste material para: suporte celular em engenharia tecidual, recobrimento de queimaduras e defeitos dérmicos, barreira física entre tecidos, recobrimento de fraturas (como bandanas ósseas) e estrutura de focalização celular em sítios defeituosos, principalmente para que as células sejam oferecidas mais localizadamente.

Tendo em vista a potencialidade apresentada por estas membranas, ficam algumas sugestões de trabalhos futuros. O próximo passo, e mais importante, seria a implantação deste material *in vivo*, em animais, principalmente para verificar sua toxicidade e reabsorção após longo período de implantação. Outro passo seria realizar uma comparativo de testes *in vivo*, em que seriam implantadas membranas sem e com cultura *in vitro* de células tronco derivadas de tecido adiposo do próprio animal, para avaliar a possibilidade de diferenciação e comunicação celular. Além disso, um estudo mais específico das propriedades mecânicas das membranas seria de grande valia, mesmo utilizando o aparelho de Análise Dinâmico Mecânica, para se estabelecer o comportamento do material frente a diversos esforços, além de melhor caracterizá-lo.

## Capítulo 6:

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARNABÉ-HEIDER, F.; GORTIZ, C.; SABELSTROM, H. TAKEBAYASHI, H.; PFRIEGER, F.W.; MELETIS, K.; FRISÉN, J. Origin of new glial cells in the intact and injured adult spinal cord. **Journal Stem Cell**, 2010 DOI: 10.1016/j.stem.2010.07.014

PITTENGER, M. F.; MARTIN, B.J. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. **Circulation Research**, v. 95, p. 9-20, 2004 DOI10.1161/01.RES.0000135902.99383.3f

TSUCHIDA, H.; HASHIMOTO, J.; CRAWFORD, E.; MANSKE, P.; LOU, J. Engineered allogeneic mesenchymal stem cells repair femoral segmental defect in rats. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 21, n.1, p. 44-53, 2003 DOI: 10.1016/S0736-0266(02)00108-0

THOMSON, R. ET AL., Biodegradable polymer scaffolds to regenerate organs, **Biopolymers**. v.2, p. 245–274, 1995.

OH, S.H. ET AL., In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method, **Biomaterials**. v.28, n.9, p. 1664–1671, 2007.

BRUDER, S.P. ET AL., The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects, **J Bone Joint Surg Am**, v. 80, n.7, p. 985–996, 1998.

ROSA, D.S ET AL., Evaluation of the thermal and mechanical properties of poly( $\epsilon$ -caprolactone), low-density polyethylene, and their blends, **J Appl Polym Sci**. v.9, n.6, p. 3909–3914, 2004.

IM, G-I.; KIM, D-Y.; SHIN, J-H.; HYUN, C-W; CHO, W-H. Repair of cartilage defect in the rabbit with cultured mesenchymal stem cells from bone marrow. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 83-B, p. 289-294, 2001.

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.

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.

PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, **Science**, v. 284, p. 143-147, 1999.

BANAS, A.; TERATANI, T.; YAMAMOTO, Y.; TOKUHARA, M.; TAKESHITA, F.; OSAKI, M.; KATO, T.; OKOCHI, H.; OCHIYA, T. Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure. **Journal of Gastroenterol Hepatology**. 2008.

FRANCHINI, M. Mesenchymal stem cells: From biology to clinical applications. **Recenti Prog Med**. v. 94, p. 478-483, 2003.

NASEF, A.; ASHMMAKHI, N.; FOUILLARD, L. Immunomodulatory effect of mesenchymal stromal cells: possible mechanisms. **Regenerative Medicine** v.3, n.4, p. 531-546, 2008.

GNECCHI, M.; HE, H.; NOISEUX, N.; LIANG, O.D.; ZHANG, L.; MORELLO, F.; MU, H.; MELO, L.G.; PRATT, R.E.; INGWALL, J.S.; DZAU, V.J. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. **FASEB Journal**, v. 20, n. 6, p. 661-669.

CHAMBERLAIN, G.; FOX, J.; ASHTON, B.; MIDDLETON J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. **Stem Cells**. v. 25, n.11, p. 2739-2749, 2007.

CAMPAGNOLI, C.; ROBERTS, I.A.; KUMAR, S.; BENNETT, P.R.; BELLANTUONO I.; FISK, N.M. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first trimester fetal blood, liver, and bone marrow. **Blood**, v. 98, p. 2396-2402, 2001.

ERICES, A.; CONGET, P.; MINGUELL, J. J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. **Brazilian Journal of Haematology** v. 109, p.235-242, 2000.

IN'T ANKER, P.S.; SCHERJON, S.A.; KLEIJBURG-VAN DER KEUR, C.; GROOT-SWINGS, G.M.; CLAAS, F.H.; FIBBE, W.E. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. **Stem Cells**. v. 22, p. 1338-1345, 2004.

- LEE, O.K.; KUO, T.K.; CHEN, W.M.; LEE, K.D.; HSIEH, S.L.; CHEN, T.H. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. **Blood**. v. 103, p. 1669-1675, 2004.
- WANG, H.S.; HUNG, S.C.; PENG, S.T.; HUANG C.C.; WEI, H.M.; GUO, Y.J. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. **Stem Cells**. v. 22, p. 1330-1337, 2004.
- YOSHIMURA, K.; SHIGEURA, T.; MATSUMOTO, D.; SATO, T.; TAKAKI Y.; AIBA-KOJIMA, E. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. **Journal of Cell Physiology**. v. 208, p. 64-76, 2006.
- WEISBERG, S.P.; MCCANN, D.; DESAI, M. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **Journal of Clinical Investigation**. v. 112, p. 1796-1808, 2003.
- XU, H.; BARNES, G.T.; YANG, Q. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**. v. 112, p. 1821-1830, 2003.
- SHI, Y.Y.; NACAMULI, R.P.; SALIM, A. The osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal cells is maintained with aging. **Plastic Reconstruction Surgery**. v. 116, p. 1686-1696, 2005.
- IM, G.I.; SHIN, Y.W.; LEE, K.B. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells. **Osteoarthritis Cartilage** v. 13, p. 845– 853, 2005.
- HUI, J.H.; LI, L.; TEO, Y.H. Comparative study of the ability of mesenchymal stem cells derived from bone marrow, periosteum, and adipose tissue in treatment of partial growth arrest in rabbit. **Tissue Engineering**. v. 11, p. 904 –912, 2005.
- HONG, L.; PEPTAN, I.A.; COLPAN, A.; DAW, J.L. Adipose tissue engineering by human adipose-derived stromal cells. **Cells Tissues Organs**. v. 183, n. 3, p. 133-140, 2006.
- URBICH, C.; DIMMELER, S. Endothelial progenitor cells functional characterization. **Trends Cardiovasc Med**. v. 14, p. 318 –322, 2004.
- PLANAT-BENARD, V.; SILVESTRE, J.S.; COUSIN, B. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: Physiologic perspectives. **Circulation**. v. 109, p. 656 – 663, 2004.
- BOQUEST, AC.; NOER, A.; SØRENSEN, A.L.; VEKTERUD, K.; COLLAS, P. CpG methylation profiles of endothelial cell-specific gene promoter regions in adipose tissue stem cells suggest limited differentiation potential toward the endothelial cell lineage. **Stem Cells**. v. 25, n. 4, p. 852-861, 2007.

SEO, M.J.; SUH, S.Y.; BAE, Y.C. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 328, p. 258–264, 2005.

TIMPER, K.; SEBOEK, D.; EBERHARDT, M. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 341, p. 1135–1140, 2006.

CORRE, J.; BARREAU, C.; COUSIN, B. Human subcutaneous adipose cells support complete differentiation but not self-renewal of hematopoietic progenitors. **Journal of Cellular Physiology.** v. 208, p. 282–288, 2006.

CASTEILLA, L.; PLANAT-BENARD, V.; COUSIN, B. Plasticity of adipose tissue: A promising therapeutic avenue in the treatment of cardiovascular and blood diseases. **Arch Mal Coeur Vaiss.** v. 98, p. 922–926, 2005.

OEDAYRAJSINGH-VARMA, M.; VAN HAM, S.; KNIPPENBERG, M. Adipose tissue-derived Mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. **Cytotherapy.** v. 8, p. 166–177, 2006.

KERN, S.; EICHLER, H.; STOEVE, J. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. **Stem Cells.** v. 24, p. 1294–1301, 2006.

WAGNER, W.; WEIN, F.; SECKINGER, A. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. **Exp Hematol.** v. 33, p. 1402–1416, 2005.

BRUCK, S.D. **Properties of biomaterials in the physiological environment.** CRC Press, 1980

WILLIAMS, D.F. **Definitions in Biomaterials, Progress in Biomedical Engineering,** Vol. 4, Elsevier, 1987.

BLACK, J. **Biological performance of materials: Fundamentals of biocompatibility,** 2<sup>nd</sup> edn, Marcel Dekker, 1992.

PARK, J.; LAKES, R. S. **Biomaterials: an introduction,** 3rd edn, Springer, 2007

MEYER, U.; MEYER T.H.; HANDSHEL, J.; WIESMANN, H.P. **Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine.** Springer, 2009.

ISO. 1992. ISO Biological Evaluation of Medical Devices. 1992. ISO 10993.

HENCH, L.L.; Andersson. Bioactive Glasses. In: Hench LL, Wilson J, editors. **Advanced Series in Ceramics,** v. 1: p. 41-62. World Scientific, Singapore, 1993.

ORÉFICE, R.L.; PEREIRA, M.M.; MANSUR, H.S. **Biomateriais: Fundamentos e Aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura médica, 2006.

LANGER, R.; VACANTI, J.P. Tissue engineering. **Science**. v. 260, p. 920-926, 1993.

KAIGLER, D.; MOONEY, D. Tissue engineering's impact on dentistry. **J. Dent. Educ.** v. 65, n. 5, p. 456-465, 2001.

MURPHY, W.L.; KOHN, D.H.; MOONEY, D.J. Growth of bone-like mineral within porous poly(lactide-co-glycolide) scaffolds in vitro. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 50, p. 50-58, 2000.

MIKOS, A.G.; SARAQUINOS, G.; LEITE, S.M.; VACANTI, J.P.; LANGER, R. Laminated three-dimensional biodegradable foams for use in tissue engineering. **Biomaterials**. v. 14, p. 323-330, 1993.

HARRIS, L.D.; KIM, B-S.; MOONEY, D.J. Open pore biodegradable matrices with gas foaming. **Journal of Biomedical Materials Research**. v. 42, n. 3, p. 396-402, 1998.

HUTMACHER, D. W.; HOQUE, M.E.; WONG, Y.S. Design, Fabrication and Physical Characterization of Scaffolds Made from Biodegradable Synthetic Polymers in combination with RP Systems based on Melt Extrusion. **Virtual prototyping and bio manufacturing in medical applications**. p. 261-291, 2008. DOI: 10.1007/987-0-387-68831-2\_12

PEZZIN, A.P.T.; DUEK, A.R. 2002 Hydrolytic degradation of poly(*para*-dioxanone) films prepared by casting or phase separation. **Polymer degradation and stability**. v. 78, n. 3, p. 405-411, 2002.

PATIST, C.M.; MULDER, M.B.; GAUTIER, S.E.; MAQUET, V.; JEROME, R.; OUDEGA, M. Freeze-dried poly(D,L-lactic acid) macroporous guidance scaffolds impregnated with brain-derived neurotrophic factor in the transected adult rat thoracic spinal cord. **Biomaterials**. v. 25, n.9, p. 1569–1582, 2004.

RAMAKRISHNA, S.; FUJIHARA, K.; TEO, W-E.; LIM, T-C.; MA, Z. **An introduction to Electrospinning and nanofibers**. World scientific Publishing, 2005.

CHOONG, C.; TRIFFIT, J.T.; CUI, Z.F.; polycaprolactone scaffolds for bone tissue engineering: effects of a calcium phosphate coating layer on osteogenic cells, **Trans IChemE: Food and Bioproduct Processing**. v. 82C, p 117-125, 2004.

SALGADO, C.L. **Desenvolvimento de matrizes tridimensionais poliméricas para aplicação em engenharia de tecido ósseo**. 2009. 104p. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

ZHANG, L.; XIONG, C.; DENG, X. Biodegradable polyesters blends for biomedical application. **Journal of Applied Polymer Science**. v. 56, p. 103-112, 1995.

VERT, M, et al. 1993. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. **Journal of Materials Science**. v. 3, p. 432-436, 1993.

MIDDLETON, J.C.; TIPTON, A.J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. **Biomaterials**. v.. 21, p. 2335-2346, 2000.

DUEK, E.A.R.; ZAVAGLIA, C.A.C.; BELANGERO, W.D. In vitro study of poly(lactic acid) pin degradation. **Polymer**. v. 40, p. 6465-6473, 1999.

AMASS, W.; AMASS, A.; TIGUE, B. A review of biodegradable polymers: uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradation studies. **Polymer International**. v. 47, p. 89-144, 1998.

MOONEY, D.J. ET AL. Principles of tissue engineering and reconstruction using polymer- cell constructs. **Mater Res Soc Symp Proc**. v. 52, p. 252-345, 1992.

SINHA, V.R, ET AL. Poly-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 278, pp. 1-23, 2004.

Mariani, P.D.S.C. **Estudo da biodegradação da blenda de poli caprolactona e amido modificado em meios sólido e líquido**. 2005. 123p. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SASMAZEL, H.T, ET AL. Comparison of cellular proliferation on dense and porous PCL scaffolds. **Bio-medical materials and engineering**. v. 18, p. 119-128, 2008.

JONES, D.S.; DJOKIC, J.; GORMAN, S.P. The resistance of Polyvinylpyrrolidone-Iodine-poly( $\epsilon$ -caprolactone) blends to adherence of Escherichia coli. **Biomaterials**. v. 26 n. 14, p 2013-2020, 2004.

NATTA, G. Stereospecific polymerizations by means of coordinated anionic catalysis: Introductory Lecture. **Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry**. v. 8, p. 589-611, 1958.

PITT, C.G. **Poly (caprolactone) and its co-polymers**. In: M. Chansin e R. Langer. Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems. Marcel Decker, 1990, p. 71-120.

TOLLON, M.H. **Fabrication of coated biodegradable polymer scaffolds and their effects on murine embryonic stem cells**. 2005. 150p. Dissertação (Mestrado)-University of Florida, Florida, EUA.

ELST, M. VAN DER. The burst phenomenon, an animal model simulating the long-term tissue response on PLLA interlocking nails. **Journal of Biomedical Materials Research**. v.30, p. 139-143, 1996.

KOKUBO, T.; KIM, H.M.; KAWASHITA, M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. **Biomaterials**. v. 24, p. 2161-2175, 2003.

CHOI, D.; MARRA, K.G.; KUMTA, P.N. Chemical synthesis of hydroxyapatite/poly ( $\epsilon$ -caprolactone) composites. **Mater Res Bull**. v. 39, p. 417-432, 2004.

HAE-WON, KIM. Biomedical nanocomposites of hydroxyapatite/polycaprolactone obtained by surfactant mediation. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, p. 169-177, 2007.

HAO, J, ET AL. Investigation of nanocomposites based on semi-interpenetrating network of [L-poly( $\epsilon$ -caprolactone)]/[net-poly ( $\epsilon$ -caprolactone)] and hydroxyapatite nanocrystals. **Biomaterials**. v. 24, p. 1531-1539, 2003.

COOLEY, J.F. US Patent 692,631; 1902.

MORTON, W.J. US Patent 705,691; 1902

ZHOU, 2003

KUMBAR, S. G.; NUKAVARAPU, S.P.; JAMES, R.; NAIR, L.S.; LAURENCIN, C.T. Electrospun Poly(lactic acid-co-glycolic acid) Scaffolds for Skin Tissue Engineering. **Biomaterials**. v. 29, n. 30, p. 4100-4107, 2008.

KIM, T.G.; LEE, D.S.; PARK, T.G. Controlled protein release from electrospun biodegradable fiber mesh composed of poly( $\epsilon$ -caprolactone) and poly(ethylene oxide). **International Journal of Pharmaceutics** v. 338, p. 276-283, 2007.

LANNUTTI, J.; RENEKER, D.; MA, T.; TOMASKO, D.; FARSON, D. Electrospinning for Tissue Engineering Scaffolds. **Materials Science and Engineering**, v. 27, n. 3, p. 504-509, 2007.

SILL, T.J.; HORST A VON RECUM. Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering, **Biomaterials**, 2008

DING, B.; WANG, M.; YU, J.; SUN, G. Gas Sensors Based on Electrospun Nanofibers. **Sensors**. v. 9, p. 1609-1624, 2009.

WANG, X.; DREW, C.; LEE, S-H.; SENEAL, K.J.; KUMAR, J.; SAMUELSON, L.A. Electrospinning technology: a novel approach to sensor application. **Journal of macromolecular science, Part A**. v. 39, n. 10, p. 1251-1258, 2002.

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

TAYLOR, G. Disintegration of water drops in an electricfield. **Proc. R. Soc. A** 280 38, 1964

ANDRADY, A.L. **Science and Technology of Polymer nanofibers**, John Wiley and Sons Publication, 2008.

KAMEOKA, J.; ORTH, R.; YANG, Y.; CZAPLEWSKI, D.; MATHERS, R.; COATES, G.W.; CRAIGHEAD, H.G. A scanning tip electrospinning source for deposition of oriented nanofibres **.Nanotechnology**. v. 14, p. 1124-1129, 2003.

RING, A.; STEINSTRASSER, L.; MUHR, G.; STEINAU, H.U.; HAUSER, J.; LANGER, S. Improved Neovascularization of PEGT/PBT Copolymer Matrices in Response to Surface Modification by Biomimetic Coating. **Eur Surg Res** v. 39, p. 75-81, 2007.

LIU, S-J.; KAU, Y-C.; CHOU, C-Y.; WU, J-C.; YEH, W-L. Electrospun PLGA/collagen nanofibrous membrane as early-stage wound dressing. **Journal of Membrane Science**. v. 355, p. 53-59, 2010.

ZONG, X. ET AL. Prevention of Postsurgery-Induced Abdominal Adhesions by Electrospun Bioabsorbable Nanofibrous Poly(lactide-co-glycolide)-Based Membranes. **Ann Surg**. v.240, p. 910–915, 2004.

FRIDRIKH, S.V.; YU, J.H.; BRENNER, M.P.; RUTLEDGE, G.C. Controlling the Fiber Diameter during Electrospinning. **Physical review letter**. v. 90 n.14 p. 123-130, 2003.

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, n.19, p. 3370-3372, 2008.

ZHU, X.; CUI, W.; LI, X.; JIN, Y. Electrospun Fibrous Mats with High Porosity as Potential Scaffolds for Skin Tissue Engineering. **Biomacromolecules**. v. 9, p. 1795-1801, 2008.

HIEP, N.T.; LEE, B-T. Electro-spinning of PLGA/PCL blends for tissue engineering and their biocompatibility. **Journal of material science: Materials in Medicine**. v. 21, n. 6, p. 1969-1976, 2010.

SILVA, S.S.; MOTTA, A.; RODRIGUES, M.T.; PINHEIRO, A.F.M., GOMES, M.E.; MANO, J.F.; REIS, R. L.; MIGLIARESI, C. Novel genipin cross-linked chitosan-silk sponges for cartilage tissue engineering strategies”.**Biomacromolecules**. 2008.

ALVES DA SILVA, M.L.; MARTINS, A.; COSTA-PINTO, A.R.; COSTA, P.; FARIA, S.; GOMES, M.; REIS, R.L; NEVES, N.M. Cartilage Tissue Engineering Using Electrospun PCL Nanofiber Meshes and MSCs. **Biomacromolecules**. v. 11, p. 3228-3236, 2010.

YOSHIMOTO, H.; SHIN, Y.M.; TERAJ, H.; VACANTI, J.P. A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning an its potential for bone tissue engineering. **Biomaterials**. v. 24, p. 2077–2082, 2003.