



TAIS HELENA COSTA SALLES

**ELETROFIAÇÃO DE NANOFIBRAS DE
BLENDAS DE GELATINA/PVP (POLI (VINIL
PIRROLIDONA)) A PARTIR DE SOLUÇÕES
DE ÁGUA E ÁCIDO ACÉTICO**

13/2013

CAMPINAS

2013



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA**

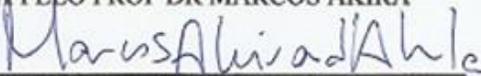
TAIS HELENA COSTA SALLES

**ELETROFIAÇÃO DE NANOFIBRAS DE
BLENDAS DE GELATINA/PVP A PARTIR DE
SOLUÇÕES DE ÁGUA E ÁCIDO ACÉTICO**

Orientador: Prof. Dr. Marcos Akira d'Ávila

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Engenharia Mecânica, na área de Materiais e Processos de Fabricação.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA TAIS HELENA COSTA SALLES E
ORIENTADA PELO PROF DR MARCOS AKIRA
D'AVILA.


ASSINATURA DO ORIENTADOR

**CAMPINAS
2013**

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

Salles, Tais Helena Costa

Sa34e Eletrofiação de nanofibras de blendas de gelatina/PVP (poli (vinil pirrolidona)) a partir de soluções de água e ácido acético / Taís Helena Costa Salles. --Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Marcos Akira d'Ávila.

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

1. Eletrofiação. 2. Gelatina. 3. Engenharia de tecidos. 4. Biopolímeros. 5. Biomateriais. I. d'Ávila, Marcos Akira. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Mecânica. III. Título.

Título em Inglês: Electrospinning of nanofibers of gelatin/PVP (poly (vinyl pyrrolidone)) blends from water/acetic acid solutions.

Palavras-chave em Inglês: Electrospinning, Gelatin, Tissue engineering, Biopolymers, Biomaterials

Área de concentração: Materiais e Processos de Fabricação

Titulação: Mestra em Engenharia Mecânica

Banca examinadora: Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia, Christiane Bertachini Lombello

Data da defesa: 15-02-2013

Programa de Pós Graduação: Engenharia Mecânica

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

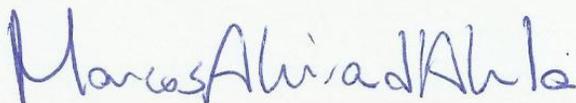
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO

**ELETROFIAÇÃO DE NANOFIBRAS DE
BLENDAS DE GELATINA/PVP (POLI (VINIL
PIRROLIDONA)) A PARTIR DE SOLUÇÕES
DE ÁGUA E ÁCIDO ACÉTICO**

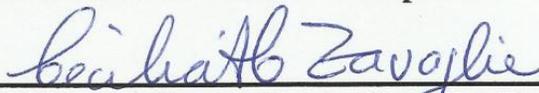
Autor: Tais Helena Costa Salles

Orientador: Prof. Dr. Marcos Akira d'Ávila

A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Dissertação:



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



Prof Dra Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia
Universidade Estadual de Campinas



Prof Dra Dra Christiane Bertachini Lombello
Universidade Federal do ABC

Campinas, 15 de fevereiro de 2013

Dedico este Mestrado aos meus pais Luís e Maria Aparecida; pelo esforço, dedicação, compreensão e amor, em todos os momentos desta e de outras caminhadas. Meus agradecimentos por terem aceitado se privar de minha companhia pelos estudos, concedendo a mim a oportunidade de me realizar ainda mais.

A Vitória desta conquista dedico com todo o meu amor, unicamente a vocês! Parabéns!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas oportunidades que me foram dadas na vida, principalmente por ter conhecido pessoas e lugares interessantes, mas também por ter vivido fases difíceis, que foram matérias-primas de aprendizado, e por ter iluminado o meu caminho durante esta caminhada.

Aos meus pais Luiz Anilton de Salles e Maria Aparecida de Salles, sem os quais não estaria aqui, e por terem me fornecido condições para me tornar a profissional e mulher que sou e sempre me apoiaram em tudo que fiz. Obrigada pela vida maravilhosa que me proporcionaram, pelas diversas coisas que me ensinaram desde pequena, pelo amor incondicional, carinho, amizade, compreensão, apoio, afeto, reconhecimento, compreensão por tantos momentos de ausência, pela importância e influência na minha vida. Eles são meus heróis a quem eu rogo todas as noites a minha existência. E merecem meus agradecimentos, o meu amor e muito obrigado!

À alma gêmea de minha'alma Fernando Bertini Sartori ouvinte, atento de algumas dúvidas, paciente nos momentos de inquietação, cansaço, desânimos e sucessos, pelo apoio, pela confiança e pela valorização sempre tão entusiasta do meu trabalho, dando-me, desta forma, coragem para ultrapassar a culpa pelo tempo que a cada dia lhe subtraía. Com você exercito o amor... Luz eterna dos meus amores!

À minha família, pelo acompanhamento, apoio, compreensão de que a minha vida em um curso de Mestrado não tem tempo nem para respirar, que dirá para acompanhar todos os eventos. Também as conversas e o interesse, as dúvidas e os estímulos. A todos que estiveram presentes na longa caminhada desta graduação, que torceram e rezaram por mim nesta nova etapa de minha vida. Meu obrigada e meu carinho a todos.

Ao Prof. Dr. Marcos Akira d'Ávila pela disponibilidade manifestada para orientar este trabalho, pela preciosa ajuda na definição do objetivo do estudo, pela exigência de método e rigor, pela incansável orientação científica, pela revisão crítica do texto, pelos profícuos comentários, esclarecimentos, opiniões e sugestões, pela cedência e indicação de alguma bibliografia relevante para a temática em análise, pelos oportunos conselhos, pela acessibilidade, cordialidade e simpatia demonstradas, pela confiança que sempre me concedeu e pelo permanente estímulo que, por vezes, se tornaram decisivos em determinados momentos da elaboração desta dissertação, pelo interesse evidenciado, incluindo o benéfico acompanhamento ao longo do meu percurso acadêmico, contribuindo de forma ímpar para minha formação profissional. Obrigado por sempre acreditar nas minhas potencialidades, pelo seu profissionalismo, convivência, paciência, palavras de conforto e incentivo, enfim por toda a atenção desde o início. Parabéns, pelo muito apreciado papel de professor exercido no dia-a-dia.

À Prof. Dra Christiane Bertachini Lombello, pelo auxílio, pela importância e influência na conclusão desse trabalho, disponibilidade de tempo, sempre com uma simpatia contagiante, pelo estímulo, paciência, amizade e ensinamentos. Obrigada pela ajuda.

À Prof. Dra Christiane Bertachini Lombello e Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia por aceitarem participar da Banca de Defesa desta Dissertação, proporcionando discussões e sugestões que servirão para crescimento, aprendizado e incentivo à pesquisa.

À minha Professora do primário e tia Maria Inês Pereira Salles que descobriu os deslizos e incoerências do meu texto, corrigindo tantos erros de concordância e trocas de palavras por antônimos, pela atenção, paciência e dedicação. Mas acima de tudo pela força, pelo sorriso e pelo carinho e amizade com que sempre me ajudou desde os meus primeiros passos da minha alfabetização.

Ao Prof. Mestre e primo Helton Sales de Oliveira por esclarecer as minhas dúvidas, pela paciência, disponibilidade, carinho, incentivo e amizade.

A todos os professores e mestres que passaram por minha vida, que foram muitos, que me introduziram no universo fabuloso da Ciência. Agradecer àqueles idealistas que, além da pesquisa, dedicam-se ao ensino e acreditam em seus discípulos.

A todas as pessoas do Laboratório de Polímeros do Programa de Pós Graduação em Engenharia Mecânica da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) – Rosimeire dos Santos Almeida, Geraldine Perea e Nicolao Lima que eu fiz amizade e que me ajudaram direta ou indiretamente, pois estas fizeram ser um ótimo lugar para trabalhar. Meus agradecimentos pelas conversas, o interesse, as dúvidas, os estímulos, o auxílio nas dificuldades e o carinho.

À Rafaella Costa Souza Bicudo obrigada pelo conhecimento, ensinamento, pela ajuda, pelo auxílio nas dificuldades, pelo apoio, pela orientação nesse trabalho e principalmente pela Amizade. Muito obrigada.

Ao Thiago Heiji Ito pela dedicação, paciência, pelos ensinamentos e pela ajuda técnica disponibilizada ao uso de equipamentos da Faculdade de Química. Muito Obrigada.

À Claudenete Vieira Leal pela ajuda técnica personalizada nas inúmeras pesquisas efetuadas, pelos esclarecimentos de dúvidas e pelas conversas de laboratório. Obrigada pela ajuda e atenção.

Aos meus queridos amigos (as) de perto e de longe, que me acompanharam por dois anos nesta luta do Mestrado, com quem compartilhei tanto preocupações, aflições, quanto descobertas e conquistas durante essa caminhada. Que nossas vidas seguirão para um lado bonito e estaremos juntos por muito mais tempo ainda. Citar nomes, aqui, me levaria a uma obrigatória omissão ou esquecimento, portanto fica a mensagem. Obrigada por terem crescido comigo. Foi bom conviver com vocês, Minha Eterna Gratidão!

Às novas amizades. Muito obrigada!

A todos que contribuíram e doaram um pouco de si de alguma forma para a elaboração e conclusão deste trabalho ser possível, por serem muitos, foram omitidos, meus sinceros agradecimentos.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, acreditam no meu potencial, na minha profissão, nas minhas ideias e me incentivam a correr atrás dos meus ideais e sonhos. A vocês, minha profunda gratidão.

A convivência só faz crescermos enquanto seres humanos.

“Se as coisas são inatingíveis... Ora, não é motivo para não querê-las... que tristes os caminhos que não fora a presença distante das estrelas...”. Mário Quintana

“Renda-se como eu me rendi. Mergulhe no que você não conhece, como eu mergulhei. Pergunte, sem querer, a resposta, como estou perguntando. Não se preocupe em ‘entender’. Viver ultrapassa todo o entendimento”.

Clarice Lispector

RESUMO

A eletrofiação é reconhecida como uma técnica eficiente para a fabricação de microfibras e nanofibras de polímero, devido à sua versatilidade e potencial para aplicações em diversos campos. As aplicações notáveis incluem engenharia tecidual, biossensores, filtração, curativos, liberação controlada de fármacos e imobilização de enzimas. As nanofibras são geradas através da aplicação de um campo elétrico em uma solução polimérica. As fibras fiadas por este processo oferecem várias vantagens, como elevada área de superfície em relação ao volume, alta porosidade e a capacidade de manipular a composição de nanofibras, a fim de obter as propriedades e funções desejadas. Neste trabalho, a eletrofiação de blendas de gelatina com polivinilpirrolidona (PVP) para a fabricação de nanofibras foi investigada. Os polímeros foram fiados a partir de soluções contendo diversas concentrações de água e ácido acético. As soluções foram fiadas a uma tensão positiva de 29,0-29,2 kV, uma distância da ponta da agulha ao coletor de 10 cm, e uma vazão de 1 mL / h. Todas as soluções foram avaliadas quanto ao pH, condutividade elétrica, tensão superficial e viscosidade. Foram investigados os efeitos da concentração de ácido acético nas propriedades das soluções que por sua vez, influenciaram no processo de obtenção de fibras por eletrofiação. Foi observado que há uma correlação entre a concentração de ácido acético e a formação de fibras desse sistema, assim como a influência no diâmetro final das fibras. No presente estudo, uma matriz de nanofibras uniformes com diâmetro aproximado de 519, 355 e 154 nm foram produzidas via eletrofiação. A morfologia das membranas foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Foi realizada a análise térmica termogravimétrica (TGA) e avaliação de citotoxicidade, visando futuras aplicações em engenharia tecidual.

Palavras-chave: Eletrofiação, Gelatina, PVP, Engenharia de Tecido, Biomateriais.

ABSTRACT

The electrospinning is recognized as an efficient technique for the fabrication of polymeric microfibers and nanofibers due to its versatility and potential for applications in many fields. Notable applications include tissue engineering, biosensors, filtration, wound dressings, controlled drug release and enzyme immobilization. The nanofibers are generated by applying an electric field in a polymer solution. The fibers spun by this process offers several advantages such as high surface area relative to volume, high porosity and the ability to manipulate the composition of nanofibers in order to obtain the desired properties and functions desired. In this work, the electrospinning blends of gelatin with polyvinylpyrrolidone (PVP) to fabrication nanofibers was investigated. The polymers were electrospun from solutions containing various concentrations of water and acetic acid. The solutions were electrospun at a positive voltage of 29.0 to 29.2 kV, a distance from the needle tip to the collector of 10 cm and a flow rate of 1 mL / h. All solutions were analyzed as your pH, electrical conductivity, surface tension and viscosity. We investigated the effects of acetic acid concentration on the properties of the solutions, on the other hand, influenced the process of obtaining fibers by electrospinning. It was observed that there was a correlation between the concentration of acetic acid and formation of fibers of that system, as well the influence on the final diameter of the fibers. In the present study, an matrix of nanofibers uniform with diameters of approximately 519, 355 and 154 nm had been produced by electrospinning. The morphology of the membranes was evaluated by Scanning Electron Microscopy (SEM). We made thermal analysis (TGA) and assessment of cytotoxicity, aiming future applications in tissue engineering.

Keywords: Electrospinning, Gelatin, PVP, Tissue Engineering, Biomaterials.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	OBJETIVOS	5
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	6
2.1	BIOMATERIAIS	6
2.2	BIOPOLÍMEROS	8
2.3	COLÁGENO	9
2.4	GELATINA	11
2.5	POLI (N-VINIL-2-PIRROLIDONA) – PVP	14
2.6	ELETROFIAÇÃO	16
2.6.1	<i>PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM O PROCESSO DE ELETROFIAÇÃO.....</i>	<i>17</i>
2.6.2	<i>PARÂMETROS DA SOLUÇÃO</i>	<i>18</i>
2.6.2.1	Viscosidade da Solução	18
2.6.2.2	Tensão Superficial	20
2.6.2.3	Condutividade Elétrica	21
2.6.3	<i>OS PARÂMETROS DO PROCESSAMENTO.....</i>	<i>22</i>
2.6.3.1	Tensão Aplicada	22
2.6.3.2	Vazão	22
2.6.3.3	Distância da Agulha à Placa Coletora	23
2.6.3.4	Parâmetros Ambientais	24
2.6.4	<i>OS SOLVENTES UTILIZADOS PARA ELETROFIAÇÃO.....</i>	<i>24</i>
2.6.5	<i>APLICAÇÕES BIOMÉDICAS</i>	<i>26</i>
2.6.5.1	Próteses Médicas	27
2.6.5.2	Engenharia Tecidual	28
2.6.5.3	Curativo	28
2.7	ELETROFIAÇÃO DE GELATINA	29

3	MATERIAIS	32
3.1	MATERIAIS.....	32
3.2	PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES POLIMÉRICAS DA BLENDAS: GELATINA/PVP .	32
3.3	CARACTERIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES POLIMÉRICAS DE GELATINA/PVP.....	33
3.4	ELETROFIAÇÃO DAS SOLUÇÕES	34
3.5	CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS ELETROFIADAS DE GELATINA/PVP 35	
3.6	CITOTOXICIDADE.....	36
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	37
5	CONCLUSÕES.....	58
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: CONCENTRAÇÕES DE ÁGUA/ÁCIDO ACÉTICO (% EM MASSA).....	33
TABELA 2: PROPRIEDADES DAS SOLUÇÕES E DIÂMETROS MÉDIOS DAS FIBRAS OBTIDAS POR ELETROFIAÇÃO.....	52

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MONTAGEM TÍPICA NA TÉCNICA DE ELETROFIAÇÃO.	2
FIGURA 2: ESTRUTURA PRIMÁRIA, SECUNDÁRIA E TERCIÁRIA DO COLÁGENO (PORTO, 2007).....	10
FIGURA 3: ESTRUTURA PRIMÁRIA DA GELATINA (POPPE, 1997).....	12
FIGURA 4: ESTRUTURA QUÍMICA DO PVP (HASSOUNA <i>ET AL</i> , 2009).....	14
FIGURA 5: APLICAÇÕES DE FIBRAS ELETROFIADAS EM DIFERENTES SETORES (BHARDWAJ, KUNDU, 2010).	27
FIGURA 6: APLICAÇÕES DE FIBRAS ELETROFIADAS EM DIFERENTES SETORES.	35
FIGURA 7: ALTERAÇÕES NO PH DAS SOLUÇÕES DE GELATINA/PVP EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁGUA/ÁCIDO ACÉTICO.	37
FIGURA 8: ALTERAÇÕES NA TENSÃO SUPERFICIAL DAS SOLUÇÕES DE GELATINA/PVP EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁGUA/ÁCIDO ACÉTICO. MEDIDAS DE TENSÃO SUPERFICIAL REALIZADAS PELOS APARELHOS KRUSS E SIGMA.....	38
FIGURA 9: ALTERAÇÕES NA CONDUTIVIDADE ELÉTRICA DAS SOLUÇÕES DE GELATINA/PVP EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁGUA/ÁCIDO ACÉTICO.....	40
FIGURA 10: CURVAS DE VISCOSIDADE EM FUNÇÃO DA TAXA DE CISLHAMENTO DAS SOLUÇÕES COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO ACÉTICO EM % DE PESO	41
FIGURA 11: ALTERAÇÕES NA VISCOSIDADE DAS SOLUÇÕES DE GELATINA/PVP EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁGUA/ÁCIDO ACÉTICO.....	41
FIGURA 12: CURVAS TERMOGRAVIMÉTRICAS (TGA) DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA DA GELATINA PURA E DO PVP PURO	42
FIGURA 13: CURVAS TERMOGRAVIMÉTRICAS (TGA) DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA DA BLENDAS POLIMÉRICA GELATINA/PVP.	44
FIGURA 14: MICROGRAFIA E MORFOLOGIA DOS DIÂMETROS DAS FIBRAS DE GELATINA/PVP ELETROFIADAS, COM AUMENTO DE 5000 VEZES. COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO ACÉTICO EM (%) DE PESO: (A) SOLUÇÃO 1 (9,3), (B) SOLUÇÃO 2 (18,6), (C) SOLUÇÃO 3 (27,8), (D) SOLUÇÃO 4 (37,0), (E) SOLUÇÃO 5 (46,3), SOLUÇÃO 6 (55,5), SOLUÇÃO 7 (64,8%).....	48

FIGURA 15: MICROGRAFIA, MORFOLOGIA (COM AUMENTO DE 20000 VEZES) E HISTOGRAMA DOS DIÂMETROS DAS FIBRAS DE GELATINA/PVP ELETROFIADAS. COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO ACÉTICO EM (%) DE PESO: (A-B) SOLUÇÃO 4 (37,0), (C-D) SOLUÇÃO 6 (46,3), (E-F) SOLUÇÃO 7 (64,8%).	51
FIGURA 16: ASPECTO MACROSCÓPICO DAS MEMBRANAS. A) DURANTE O PROCESSO DE ELETROFIAÇÃO. B) APÓS O PROCESSO DE ELETROFIAÇÃO	54
FIGURA 17: TESTE DE CITOTOXICIDADE, CONTROLES. A).CONTROLE NÃO CITOTÓXICO, MONOCAMADA CONFLUENTE DE CÉLULAS. B) CONTROLE CITOTÓXICO, POUCAS CÉLULAS PRESENTES, COM NÚCLEO BASTANTE DENSO, PROLONGAMENTOS CELULARES E PRESENÇA DE DEBRIS. CÉLULAS CORADAS COM AZUL DE TOLUIDINA, AUMENTO 200 X.	55
FIGURA 18: TESTE DE CITOTOXICIDADE, BIOMATERIAL. A) CITOTOXICIDADE INDIRETA, CONTRASTE DE FASE; B) CONTATO DIRETO DAS CÉLULAS COM O BIOMATERIAL, CONTRASTE DE FASE. C) CITOTOXICIDADE INDIRETA, CÉLULAS CORADAS COM AZUL DE TOLUIDINA; D) CONTATO DIRETO DAS CÉLULAS COM O BIOMATERIAL, CÉLULAS CORADAS COM AZUL DE TOLUIDINA. PODE SER OBSERVADA A MONOCAMADA DE CÉLULAS BASTANTE ESPALHADAS, COM MORFOLOGIA TÍPICA DE FIBROBLASTOS, MESMO NO LIMITE DE CONTATO COM O BIOMATERIAL GELATINA/PVP. AUMENTO: 200 VEZES X.	56

1 INTRODUÇÃO

A substituição artificial de tecidos danificados e doentes constitui uma promissora via de pesquisa na área de medicina regenerativa. A engenharia tecidual é um campo multidisciplinar que visa a regeneração dos tecidos através do uso de biomateriais (Kulkarni *et al*, 2010).

Recentemente, o estudo de micro e nanofibras tem despertado grande interesse devido às suas atrativas propriedades como alta área superficial e capacidade de formar fibras na escala de micrômetros e nanômetros. O processo de eletrofiação desempenha um papel importante para a fabricação de *scaffolds* fibrosos de biomateriais para aplicação de engenharia tecidual com diâmetro das fibras a partir de alguns microns para menos de 100 nm. Tais materiais, como proteínas (gelatina, colágeno e fibroína de seda) e polissacarídeos (quitosana, ácido hialurônico e celulose) visam imitar componentes da matriz extracelular, sendo considerado como uma arquitetura promissora no sentido de apresentar uma estrutura fibrosa com diâmetros em escala micrométrica e nanométrica (Garg; Bowlin, 2011, Kulkarni *et al*, 2010).

Uma variedade de técnicas pode ser utilizada para a criação de nanofibras poliméricas tais como a rotofiação, auto-montagem e separação de fases (Garg; Bowlin, 2011). Dentre essas se destaca a eletrofiação (*electrospinning*) termo derivado de “fiação eletrostática” que é um processo de fabricação de fibras nanométricas contínuas. O interesse nesta técnica cresceu nos últimos anos, pois permite a fabricação de fibras com potencial para uma ampla variedade de aplicações nas áreas biomédicas, como *scaffolds* (suportes porosos tridimensionais), sistemas de liberação controlada de fármacos, em processos industriais, como meios filtrantes de alta eficiência, vestuários de proteção, catalisadores, materiais adsorventes e sensores (Garg; Bowlin, 2011).

Basicamente quatro componentes são necessários para o processo: uma fonte de alta tensão; um tubo capilar, que pode ser uma agulha de pequeno diâmetro; uma bomba de infusão; e uma placa coletora aterrada. A alta voltagem é necessária para criar um jato de solução de polímero eletricamente carregado para fora do capilar. O campo elétrico aplicado induz o carregamento sobre a superfície do líquido, que gera um campo de tensões eletrostáticas no fluido, induzindo à formação do jato polimérico. A característica do jato formado a partir de forças eletrostáticas e o seu diâmetro reduzido devido à formação do cone de Taylor na saída do capilar e às instabilidades de escoamento durante a trajetória do jato até a placa coletora. Antes do jato atingir a placa coletora, ocorre a evaporação do solvente e o polímero na forma de fibras é recolhido como uma rede de fibras não-tecido (*non-woven*) (Kulkarni *et al*, 2010). A **Figura 1** mostra um esquema de um sistema de eletrofiação.

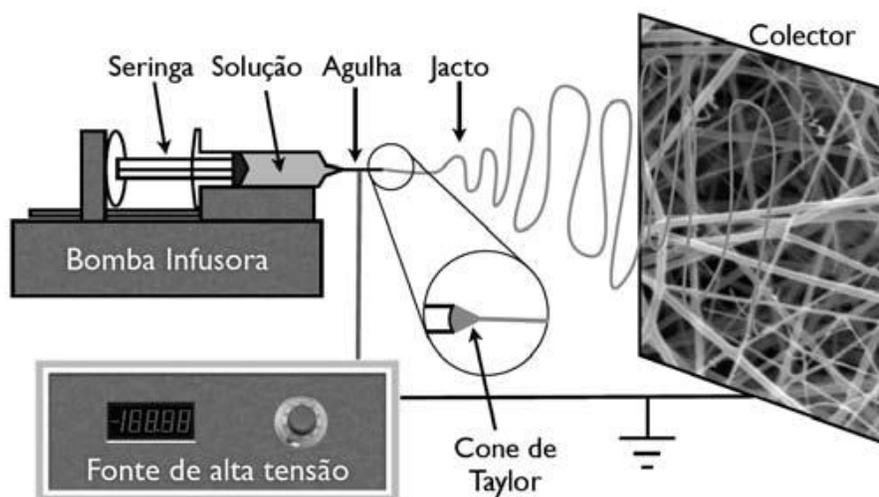


Figura 1: Representação esquemática da montagem típica na técnica de eletrofiação

(Franco *et al*, 2009).

O processo de eletrofiação é promissor na engenharia de tecidos, pois permite a fiação de uma ampla gama de polímeros, tanto naturais como sintéticos, bem como na combinação desses polímeros (Chew *et al*, 2006). Neste trabalho, a eletrofiação de blendas de gelatina com polivinilpirrolidona (PVP) para a fabricação de nanofibras foi investigada.

A maioria dos trabalhos desenvolvidos na área dos polímeros para a medicina é baseada em polímeros sintéticos, pela maior facilidade no processamento e controle das suas propriedades mecânicas, físicas e químicas. Os polímeros de origem natural, por outro lado, apresentam a vantagem de maior biocompatibilidade. Como exemplo, fibroína da seda e a gelatina são dois dos polímeros naturais mais utilizados em investigação na área dos biomateriais (Yamazaki *et al*, 2010).

A gelatina é um derivado do colágeno, adquirida pela desnaturação da estrutura da tripla hélice. Existem dois tipos de gelatina extraídos a partir de tecido colagenoso: a gelatina do tipo A, processado por um pré-tratamento ácido, e a gelatina do tipo B, processado por um pré-tratamento alcalino. A principal diferença entre os dois é que o tipo B tem maior conteúdo de ácido carboxílico do que o tipo A. Devido às semelhanças entre gelatina e colágeno e também de sua origem natural, este se tornou um polímero atraente para aplicações na engenharia de tecidos. Vários estudos foram reportados detalhando a sua eficácia. *Scaffolds* de gelatina eletroafiados têm sido utilizados para tais aplicações como a cicatrização de feridas, aplicações dérmicas na engenharia de tecidos e regeneração de tecidos nervosos, cartilagosos e ósseos (Yamazaki *et al*, 2010).

Polivinil-pirrolidona (PVP) é um polímero sintético, solúvel em água, biocompatível, hemocompatível e há muitos anos tem sido aplicado como biomaterial. O PVP é notável pela sua capacidade de interagir com uma grande variedade de materiais hidrofílicos e hidrofóbicos, tem propriedades semelhantes às de uma proteína devido à sua estrutura de pirrolidona. Este material apresenta pouca imunogenicidade e antigenicidade, toxicidade muito baixa e tem capacidade favorável na utilização no campo de liberação de fármacos. O PVP é usado em uma ampla variedade de aplicações, onde materiais revestidos com este polímero podem ser usados como dispositivos médicos destinados à implantação no corpo humano. Uma vez que o PVP é fisiologicamente inativo, ele tem sido utilizado como um substituto do plasma sanguíneo (Hassouna *et al*, 2009).

No processo de eletrofiação o PVP é utilizado na preparação de membranas e fibras para ajustar o tamanho e distribuição do tamanho dos poros, aumentar a permeabilidade da

membrana, melhorar a hidrofiliçidade da solução e evitar a formação de grânulos (Simone *et al*, 2010).

Neste estudo, foi investigada eletrofiao de blendas de gelatina/PVP a partir de soluções de ácido acético/água. Foi avaliado o efeito da concentração de ácido acético nas propriedades das soluções e na morfologia das fibras. O uso do ácido acético nas soluções garantiu a obtenção de soluções com propriedades adequadas para eletrofiao. Verificou-se que os diâmetros médios das nanofibras resultantes variam em função da composição do solvente. As propriedades das soluções avaliadas foram viscosidade, tensão superficial, condutividade elétrica e pH. A morfologia das membranas foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As membranas eletrofiadas foram analisadas termicamente por Termogravimetria (TGA) e biologicamente por citotoxicidade.

1.1 OBJETIVOS

Estudar e otimizar o processo de eletrofição para a produção de nanofibras de blendas de gelatina/PVP e avaliar *in vitro* a eficácia dessas nanofibras.

As etapas e aspectos abordados em seu desenvolvimento foram:

1- Avaliação da influência das propriedades das soluções na eletrofição de soluções de gelatina/PVP;

2- Estudo da influência das diferentes concentrações de água/ácido acético na formação e morfologia das fibras;

3 - Caracterização das soluções poliméricas através da análise pH, tensão superficial, condutividade elétrica, viscosidade e tempo de relaxação.

4 - Avaliação térmica das membranas por TGA.

5-Avaliação de citotoxicidade das membranas para confirmar sua biocompatibilidade.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 BIOMATERIAIS

Em 1986, pesquisadores da Sociedade Européia de Biomateriais elaboraram um documento definindo o conceito de biomaterial como sendo “todo material viável usado em aparato médico, desenvolvido para interagir com sistemas biológicos” (Willians, 1986).

Os biomateriais são utilizados desde o tempo em que o homem dava os passos iniciais na Medicina e na Odontologia. Os primeiros registros do uso de um material como prótese ortopédica datam de 3000 anos atrás. Já os implantes odontológicos que se têm notícia datam de 2000 a.C., mas somente depois da Segunda Guerra Mundial houve um avanço significativo nesse ramo da engenharia de materiais (Santos Jr, 2005).

O paradigma da natureza dos biomateriais tem sido intensamente estudado nas últimas décadas. O desenvolvimento de biomateriais para melhorar a qualidade de vida humana tem como objetivo a substituição e reparação de tecidos moles e/ou duros, como ossos, dentes, cartilagem, vasos sanguíneos ou órgãos. As aplicações destes materiais podem ser por razões médicas, na substituição de tecidos doentes ou lesados para aumentar a qualidade de vida ou por razões estéticas. Uma procura crescente de biomateriais surge devido ao envelhecimento da população com maiores expectativas de vida (Franz *et al*, 2011).

Durante os anos 1960 e 1970, uma primeira geração de biomateriais foi desenvolvido para uso rotineiro como implantes médicos e dispositivos. A indústria biomédica evoluiu e, até agora, a qualidade de vida de milhões de pacientes pode ser melhorada. Há uma série de exemplos de dispositivos médicos que melhoram muito o atendimento ao paciente, tais como articulação artificial, implantes dentários, lentes oculares ou *stents* vasculares (Franz *et al*, 2011).

O biomaterial é um material destinado a interagir com o sistema biológico para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer órgão, tecido ou função do corpo. Este material pode ser

de origem sintética ou natural. No entanto, é necessário que ele apresente propriedades físicas, químicas e biológicas compatíveis com os tecidos, estimulando uma resposta adequada (Sepúlveda *et al*, 1999, Franz *et al*, 2011).

Conforme a resposta biológica dos tecidos vivos, os biomateriais classificam-se em bioinertes, biotoleráveis e bioativos (Vallet-Regí, 1997). A primeira geração de biomateriais foi baseada na busca de materiais bioinertes. Estes materiais não induzem resposta local do sistema imunológico, mas tendem a ser envolvidos por uma cápsula fibrosa isolando-os do meio biológico (Castner, Ratner, 2002). Um material biotolerável induz uma resposta mínima, sendo aceito pelo organismo receptor (Rigo *et al*, 1999, Santos Jr, 2005).

Existem diferentes grupos de biomateriais: os metais e as ligas metálicas; os cerâmicos; os polímeros que podem ser sintéticos ou naturais e os compósitos. Os materiais poliméricos estão sendo investigadas no desenvolvimento de dispositivos terapêuticos tais como, próteses temporárias, *scaffolds*, liberação de fármacos, aplicações biomédicas como parafusos ósseos, placas ósseas, realização de suturas ou malhas de estruturas porosas multifilamentosas para aplicação em engenharia de tecido (Nair, Laurencin, 2007).

O pré-requisito essencial para qualificar um material como um biomaterial é a biocompatibilidade, que é a capacidade de um material realizar com o hospedeiro uma resposta apropriada a um dispositivo específico (Willians, 1986). Os biomateriais devem ter a capacidade de imitar a função da matriz extracelular (ECM), a fim de estimular a invasão e proliferação celular (Franz *et al*, 2011).

No caso de materiais biodegradáveis, sua biocompatibilidade deve ser demonstrada com o tempo. Algumas das propriedades importantes de um biomaterial biodegradável são: o material não deve provocar uma resposta inflamatória ou intoxicação após a implantação no corpo, o tempo de degradação do material deve combinar com o processo de cura ou de regeneração do hospedeiro, o material deve ter propriedades mecânicas adequadas para a aplicação indicada e a variação de propriedades mecânicas e degradação devem ser compatíveis com o processo de regeneração, os produtos de degradação não devem ser tóxicos e capazes de serem metabolizados

e eliminados do corpo e deve ter permeabilidade adequada e processabilidade para a aplicação pretendida (Nair, Laurencin, 2007).

2.2 BIOPOLÍMEROS

Materiais poliméricos são amplamente aplicados na área biomédica, embora seja muito mais fácil de usar polímeros sintéticos no campo biomédico, os polímeros naturais são também necessários devido à sua biocompatibilidade e biodegradabilidade. Pode-se utilizar a mistura de polímeros sintéticos e naturais, conhecidos como blendas poliméricas, que são misturas físicas de dois ou mais polímeros, visando o desenvolvimento de novos materiais com propriedades intermediárias ou mesmo superiores às aquelas observadas nos constituintes puros. (Sionkowska, 2011).

Polímeros naturais são geralmente biocompatíveis, ao passo que os polímeros sintéticos podem conter resíduo e outros compostos/impurezas que não permitem o crescimento celular. Polímeros sintéticos têm boa propriedade mecânica e estabilidade térmica, muito melhor do que vários polímeros que ocorrem naturalmente. Há também uma limitação no desempenho de vários polímeros naturais em comparação com os polímeros sintéticos. Polímeros sintéticos podem ser transformados em uma ampla variedade de formas, enquanto que para o polímero natural diversos formatos não são facilmente obtidos, por exemplo, altas temperaturas impostas no processamento podem destruir a sua estrutura nativa (Nair, Laurencin, 2007).

Os principais polímeros naturais utilizados na preparação de materiais para aplicações biomédicas são o colágeno, quitina, quitosana, queratina, fibroína e elastina, que são derivados de animais. Polímeros derivados de plantas também são utilizados tais como amido, celulose e pectina (Sionkowska, 2011).

Polímeros naturais, como o colágeno e a gelatina são normalmente insolúveis em água e em solventes orgânicos. O colágeno é extraído do tecido de animais, sendo este solúvel em ácido acético, a solubilidade de colágeno em ácido acético fornece a possibilidade de misturá-los com polímeros solúveis em água. As misturas de polímeros sintéticos com colágeno, bem como com outros polímeros naturais tem sido amplamente estudada como materiais biomédicos (Sionkowska, 2011).

2.3 COLÁGENO

O colágeno é a proteína mais abundante em animais, que proporciona o principal suporte estrutural e mecânico dos tecidos humano. É uma proteína estrutural, formada por fios moleculares que fortalecem os tendões e suportam a pele e os órgãos internos. O colágeno fornece proteção e apoio aos tecidos moles e auxílio para conectá-los com o esqueleto (Sionkowska, 2011) e possui biocompatibilidade e biodegradabilidade (Franz *et al*, 2011).

Existem 20 membros geneticamente distintos de proteínas da família do colágeno. Em todos os tipos há um predomínio dos aminoácidos prolina, glicina, hidroxiprolina, ácido glutâmico, alanina, ácido aspártico e arginina (Cheow *et al*, 2007, Gómez-Guillén, *et al*, 2011). Os principais são colágenos formadores de fibrila: tipo I (da pele, tendões e ossos), tipo II (da cartilagem) e tipo III (pele e vasos). Estes tipos de colágeno podem ser encontrados como parte de estruturas fibrilares que formam uma parte essencial da arquitetura e integridade do tecido. Cada cadeia de colágeno contém aproximadamente 1000 aminoácidos. Uma estrutura resistente é formada por uma sequência repetida de três aminoácidos. O papel de ligações cruzadas do colágeno que ocorrem naturalmente é também importante para a formação de uma estrutura fibrilar estável. Na molécula de colágeno os átomos das cadeias individuais são mantidas juntas por ligações covalentes, enquanto as três cadeias são organizadas na estrutura helicoidal, essas ligações fracas são: pontes de hidrogênio, dipolo-dipolo, ligações iônicas e as interações de van der Waals (Nair, Laurencin, 2007; Franz *et al*, 2011; Sionkowska, 2011; Chen *et al*, 2012).

A molécula de colágeno existe na forma de tripla hélice, a qual é composta de três cadeias denominadas α . Estas cadeias se posicionam em uma estrutura tridimensional, que pode ser vista na Figura 2.3. As cadeias α de colágeno são compostas por uma sequência específica de aminoácidos, na qual a glicina é o aminoácido em maior concentração na cadeia, cerca de 1/3 do total, seguido pela prolina e hidroxiprolina, com cerca de 1/5 do total cada uma, sendo a sequência que mais aparece na cadeia é a glicina-prolina-hidroxiprolina. No geral, a cadeia é constituída por sequências de peptídeos contendo predominantemente aminoácidos neutros alternados com sequências em sua maioria polares contendo aminoácidos ácidos e básicos. No entanto, estudos de microscopia eletrônica mostraram áreas alternadas com aminoácidos polares e apolares (Porto, 2007). **Figura 2:** Estrutura do colágeno.

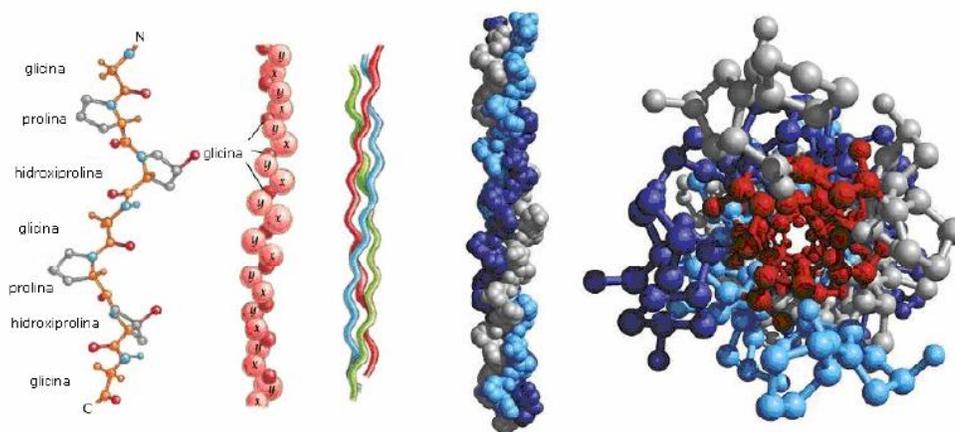


Figura 2: Estrutura primária, secundária e terciária do colágeno (Porto, 2007)

A estabilidade da tripla hélice do colágeno depende das ligações de hidrogênio. A temperatura de desnaturação térmica do colágeno depende do teor de água, o pH do meio ambiente e o grau de ligações cruzadas (*cross-linking*). Pode-se dizer que o colágeno, como a maioria das proteínas, perde toda a sua estrutura durante o aquecimento. A tripla hélice desenrola-se e as cadeias são separadas. Em seguida, quando este desnaturado de massa de cadeias emaranhadas esfria, absorve toda a água circundante como uma esponja, formando gelatina. Assim, a gelatina é uma mistura de proteínas solúveis em água derivados principalmente a partir do colágeno. Gelatina normalmente liga-se mais água do que o colágeno, uma vez que é parcialmente degradada do colágeno e mais grupos ativos são expostos a interações com a água através de ligações de hidrogênio. Com base em suas funções estruturais e de compatibilidade no

interior do corpo, o colágeno e a gelatina são os biomateriais mais usados na área médica, farmacêutica e indústrias de cosméticos (Sionkowska, 2011).

2.4 GELATINA

Os primeiros relatos de tentativas de produzir misturas com propriedades de gel remontam ao século XVII. Desde 1700 que a palavra “gelatina” (do latim: *gelatus* – duro, congelado) é utilizada nas línguas europeias. No final do séc. XIX a gelatina começou a ser utilizada nas placas de fotografia, que antecederam os filmes fotográficos. Desde então a indústria da gelatina tem sofrido um enorme desenvolvimento fortemente impulsionado pelo crescente número de aplicações (Li *et al*, 2005).

A gelatina é uma proteína natural que apresenta uma composição quase idêntica e propriedades biológicas similares as do colágeno. Infelizmente, a eletrofição do sistema de gelatina/água não pode ser processada por eletrofição à temperatura ambiente. Além disso, quando dissolvido em água a uma temperatura de cerca de ou acima de 37, 8°C, a gelatina torna-se uma espécie de um sol coloidal (Huang *et al*, 2004, Cheow *et al*, 2007, Sell *et al*, 2009). **Figura 3** Estrutura primária da gelatina (Poppe, 1997).

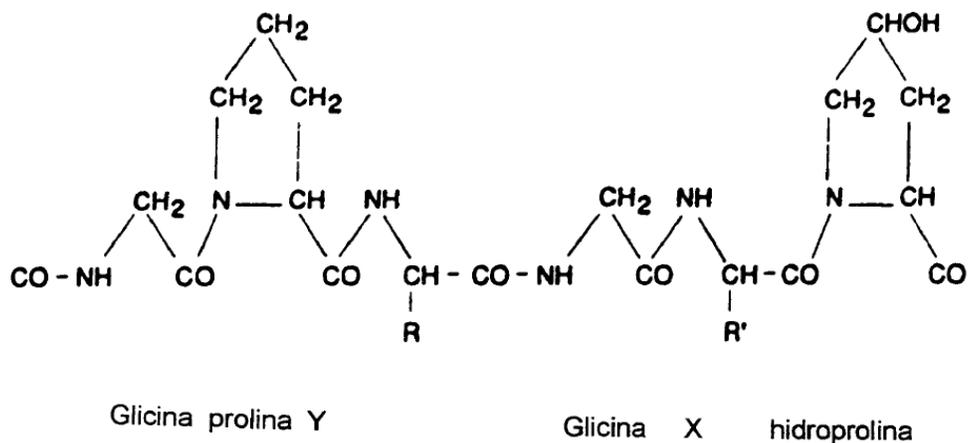


Figura 3: Estrutura primária da gelatina (Poppe, 1997).

A qualidade da gelatina para uma aplicação particular depende em grande parte de suas propriedades reológicas e propriedades físico-químicas, tais como os parâmetros de composição, solubilidade, transparência, cor e o dor. Os principais atributos que melhor definem a qualidade comercial global da gelatina são a resistência do gel e estabilidade térmica (temperaturas de gelificação e fusão) (Gómez-Guillén *et al*, 2011). A gelatina exibe baixa antigenicidade e elevada biocompatibilidade e bioabsorbilidade (Estaca *et al*, 2009).

As fontes mais abundantes de gelatina são obtidas a partir da pele de porco (46%), pele bovina (29,4%) e carne de porco e ossos de gado (23,1%). A gelatina de peixe é responsável por menos de 1,5% da produção total de gelatina em 2007, mas esse percentual era o dobro dos dados de mercado para 2002, indicando que a produção de gelatina a partir de alternativas sem ser de espécies de mamíferos havia crescido em importância (Gómez-Guillén *et al*, 2011, Estaca *et al*, 2009).

Existem dois tipos de gelatina, que são classificadas de acordo com o tipo de matéria-prima que as originou: gelatina tipo A, que é produzida através de pele e ossos de suínos; e a gelatina tipo B, produzida através de couro, ossos e aparas bovinas (Schrieber; Gareis, 2007). A distribuição de massa molecular das gelatinas tipo A e B é um pouco diferente. A gelatina tipo B normalmente apresenta uma maior proporção de frações de alta massa molecular, enquanto a tipo A possui uma distribuição mais homogênea, contendo maior quantidade de polipeptídios de baixa

massa molecular. Estas diferenças estão associadas com as diferenças na maturidade do colágeno utilizado na obtenção desses dois tipos de gelatina, no entanto, as condições de processo podem ser alteradas a fim de se obter gelatinas com diferentes perfis de distribuição de massa molecular. Diferenças no perfil de distribuição de massa molecular afetam diretamente a funcionalidade da gelatina. Em termos gerais, uma maior proporção de frações de baixa massa molecular aumenta o tempo necessário para a formação de gel, já a viscosidade, pode ser correlacionada diretamente com a massa molecular média (Reis, 2003).

As propriedades de superfície da gelatina resultam das cadeias laterais que possui grupos carregados e sequencias de aminoácidos tanto hidrofílicos quanto hidrofóbicos, assim como ocorre com as outras proteínas. Essa natureza anfifílica da gelatina permite com que ela se ligue a superfícies de diferentes naturezas químicas. Dessa forma, ambas as partes hidrofílicas e hidrofóbicas tendem a migrar em direção à superfície, consequentemente reduzindo a tensão superficial de soluções aquosas. Ao mesmo tempo, a gelatina possui diversas propriedades para proteger e estabilizar a superfície formada, como a capacidade de formação de gel e/ou aumento da viscosidade da fase aquosa. Esta propriedade multifuncional da gelatina é utilizada na produção e estabilização de espumas e emulsões (Schrieber; Gareis, 2007).

A gelatina comercial é um sólido vítreo cujos grânulos intumescem quando imersos em água. Com o aquecimento essas partículas intumescidas se dissolvem para formar uma solução (Estaca *et al*, 2009).

A formação de géis termicamente reversíveis em solução aquosa é influenciada por vários fatores. O processo inicia com o aumento da viscosidade resultando na formação do gel. A força dos géis formados depende da concentração e da força intrínseca da gelatina usada, que é uma função da estrutura e da massa molecular (Gómez-Guillén *et al*, 2011).

Uma das vantagens do uso da gelatina é o seu baixo custo. Após a desnaturação ou misturado com outro biodegradável polímero (sintético), a gelatina pode ser utilizada isoladamente ou em mistura para preparar membranas de nanofibras de tecidos, *scaffolds* e dispositivos de cuidados para saúde, e outras aplicações biomédicas (Huang *et al*, 2004). Na

medicina a gelatina é utilizada em cápsulas de medicamentos, protegendo-os contra a luz e oxigênio e permitindo que sejam armazenados durante mais tempo, pele artificial, enxerto de substitutos ósseos, implantes dentários, implantes para tendões e vasos sanguíneos artificiais, implantes de córnea, regeneração de pele, cartilagem e órgãos. Após ingestão, a gelatina pode ser utilizada como barreira para libertação controlada do fármaco. Na medicina cirúrgica, a gelatina é utilizada em esponjas que estacam hemorragias e que são posteriormente absorvidas pelo corpo humano. Outra aplicação da gelatina é na medicina de urgência, onde os chamados *plasmas expanders* ou substitutos de volume sanguíneo são utilizados quando o paciente perde muito sangue e é necessário equilibrar o seu volume sanguíneo. Estes substitutos são posteriormente absorvidos pelo organismo sem deixar resíduos (Sell *et al*, 2009).

2.5 POLI (N-VINIL-2-PIRROLIDONA) – PVP

As polivinilamidas são polímeros polares e anfóteros, sendo também conhecidos como polivinilpirrolidona, polidona ou PVP (Karavas *et al*, 2006). Na **Figura 4** está representada a estrutura química do PVP.

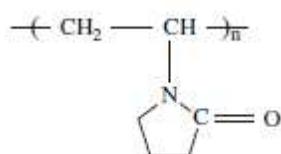


Figura 4: Estrutura química do PVP (Hassouna *et al*, 2009)

O PVP é um polímero sintético, não condutor, pertence à classe dos polímeros solúveis em água e em solventes orgânicos, uma notável capacidade para interagir com uma grande variedade de materiais hidrofílicos e hidrofóbicos, apresenta baixa imunogenicidade, antigenicidade e toxicidade (Karavas *et al*, 2006, Xu *et al*, 2009, Simone *et al*, 2010).

O PVP é usado em uma ampla variedade de aplicações, sendo interessante de um ponto de vista biológico, uma vez que tem características estruturais semelhantes às das proteínas, e tem um grande potencial para aplicações no domínio médico (Xu *et al*, 2009, Simone *et al*, 2010).

Especificamente, o PVP é um biopolímero que apresenta hemocompatibilidade, biocompatibilidade de modo que os materiais revestidos com este polímero podem ser utilizados como dispositivo médico destinado à implantação no corpo humano. Uma vez que o PVP é fisiologicamente inativo, este tem sido utilizado como um substituto do plasma sanguíneo (Xu *et al*, 2009, Simone *et al*, 2010).

A gelatina e o PVP são miscíveis e possuem propriedades biológicas interessantes, pois a mistura de colágeno/PVP dá a possibilidade da produção de novos materiais para o tratamento de cicatrização de feridas, em que as interações fortes entre os componentes sintéticos e biológicos podem ocorrer (Sionkowska *et al*, 2006, Sionkowska *et al*, 2008). O colágeno pode formar diferentes tipos de ligações de hidrogênio com o PVP: (1) entre o grupo carbonila do PVP e um grupo hidroxila do colágeno, (2) entre o hidrogênio a partir da ligação peptídica do colágeno e o grupo carbonila do PVP.

Sionkowska *et al* (2008) e seus colaboradores verificaram que o colágeno e PVP são miscíveis devido às fortes interações entre o componente o sintéticos e biológicos, principalmente por ligações de hidrogênio. O enriquecimento significativo da componente de baixa energia superficial a superfície de blendas poliméricas é frequentemente observado.

PVP é utilizado na preparação de membranas e fibras no processo de eletrofiação para ajustar a morfologia, o tamanho e distribuição do tamanho dos poros, aumentar a permeabilidade da membrana, aumentar a viscosidade da solução, melhorar a hidroflicidade da solução e evitar a formação de defeitos (Simone *et al*, 2010, Zhang *et al*, 2011).

2.6 ELETROFIAÇÃO

A produção de nanofibras relaciona-se diretamente com a nanotecnologia, promovendo o seu desenvolvimento em diversas áreas de pesquisa como a eletrônica, física, química, medicina, biologia e a engenharia de materiais. Motivada pelas aplicações nestas áreas, a comunidade científica tem revelado especial interesse na fabricação de nanofibras poliméricas nos últimos anos (Song *et al*, 2008).

Um dos métodos mais versáteis para a produção de estruturas nanofibrosas é a eletrofiação (Huang *et al*, 2003; Song *et al*, 2008; Garg; Bowlin, 2011). Esta técnica permite produzir fibras de polímeros com diâmetros nanométricos utilizando campos elétricos. Esta técnica de alta magnitude atraiu maior atenção devido à ampla variedade de aplicações biomédicas, vestuários de proteção, *scaffolds* para engenharia de tecido, biotecnologia, compósitos, equipamentos eletrônicos, defesa e segurança, engenharia ambiental e outras áreas (Huang *et al*, 2003; Chronakis, 2005; Bhardwaj, Kundu, 2010; Kulkarni *et al*, 2010; Garg; Bowlin, 2011).

Nanofibras produzidas a partir do processo de eletrofiação apresentam vantagens, tais como alta área superficial, flexibilidade para uma grande variedade de formas e tamanhos e a capacidade de controlar a composição de nanofibras para alcançar os resultados desejados a partir de suas propriedades e funcionalidades. (Huang *et al*, 2003; Bhardwaj, Kundu, 2010; Kulkarni *et al*, 2010; Garg; Bowlin, 2011).

O termo “eletrofiação” é derivado de “fiação eletrostática” (Huang *et al*, 2003; Bhardwaj, Kundu, 2010; Kulkarni *et al*, 2010; Garg; Bowlin, 2011). Três componentes são necessários para o processo: uma fonte de alta tensão, um tubo capilar com uma agulha de pequeno diâmetro e uma placa coletora ligada à terra.

A alta voltagem é necessária para criar um jato carregado eletricamente com solução de polímero para fora da agulha. Um eletrodo está fixado a uma agulha ligado a uma seringa carregada com a solução polimérica e outro está fixado ao coletor ligado a terra. O campo elétrico é aplicado na extremidade do tubo capilar contendo o fluido, isto induz uma carga sobre a

superfície do líquido. Repulsão mútua de carga e a contração das cargas superficiais causam uma força diretamente oposta à tensão superficial. À medida que a intensidade do campo elétrico é aumentada, a superfície do fluido na ponta do tubo capilar alonga para formar uma forma cônica chamada “Cone de Taylor” (Sill, Recum, 2008). O jato é estável somente na ponta da agulha, depois disso, o jato apresenta instabilidade à caminho do coletor, com carga elétrica oposta. No tempo entre a saída da seringa e o depósito no coletor, o solvente apropriado evapora e as fibras secas são depositadas na placa coletora como uma rede interconectada (Schueren *et al*, 2010). A fibra coletada normalmente se apresenta na forma de uma manta (Huang *et al*, 2003, Bhardwaj, Kundu, 2010, Garg; Bowlin, 2011).

O processo de eletrofiação envolve um estiramento rápido do jato eletrificado e uma rápida evaporação do solvente. Deste modo, as cadeias poliméricas emaranhadas experimentam uma forte força de cisalhamento durante o processo de eletrodeposição e solidificam rapidamente quando atingem a placa coletora, impedindo a sua volta às condições de equilíbrio (Ramakrishna *et al*, 2005).

Embora o princípio de funcionamento da eletrofiação seja simples, existem diversos parâmetros de processamento que podem influenciar o formato, o diâmetro e as dimensões das fibras. (Sill; Recum, 2008).

2.6.1 PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM O PROCESSO DE ELETROFIAÇÃO

O processo de eletrofiação depende de muitos parâmetros associados, classificados amplamente em parâmetros de solução, parâmetros de processo, e os parâmetros ambientais. Estes parâmetros podem influenciar a transformação das soluções de polímeros em nanofibras através da eletrofiação (Huang *et al*, 2003; Chronakis, 2005; Thompson *et al*, 2007; Kulkarni *et al*, 2010). Os principais parâmetros da solução são: viscosidades, tensão superficial e condutividade elétrica; os principais parâmetros do processo são: tensão aplicada, a vazão e a distância da ponta da agulha à placa coletora; os parâmetros ambientais englobam a umidade e temperatura do ambiente.

2.6.2 PARÂMETROS DA SOLUÇÃO

As propriedades da solução, incluindo a tensão superficial, peso molecular do polímero, concentração, viscosidade, volatilidade e condutividade elétrica, têm uma importante influência no processo de eletrofição e na morfologia das fibras. A tensão superficial desempenha um papel importante na formação de defeitos ao longo da extensão da fibra. A viscosidade da solução e a condutividade elétrica determinam a extensão do alongamento do jato fibroso que, por sua vez, tem influência sobre o diâmetro das fibras. Contudo, os efeitos das propriedades da solução são difíceis de isolar, uma vez que a alteração de um parâmetro pode afetar as outras propriedades da solução. Por exemplo, a variação da concentração afetará a tensão superficial, como também a viscosidade. (Huang *et al*, 2003; Bhardwaj, Kundu, 2010).

2.6.2.1 Viscosidade da Solução

A viscosidade é a medida da resistência ou fricção interna de uma substância ao fluxo/escoamento quando se encontra sujeito a uma tensão tangencial. No sistema internacional, a unidade de viscosidade η é pascal segundo (Pa.s). Contudo, a unidade de viscosidade mais usada em artigos de investigação é o poise (P), em homenagem ao fisiologista francês Jean Louis Poiseuille (1799 – 1869) (Diarmid *et al*, 2001).

Geralmente, a viscosidade da solução está relacionada com o grau de emaranhamento das cadeias moleculares do polímero na solução. Quando a viscosidade da solução é muito baixa, pode ocorrer *electrospraying* (formação de micro gotas), em vez do jato fibroso. Com baixa viscosidade, onde geralmente as ligações da cadeia polimérica são de menor intensidade, há uma maior probabilidade de obter fibras onduladas, em vez de fibras lisas. Portanto, fatores que afetam a viscosidade da solução também afetarão o processo e as fibras dele resultante (Kulkarni *et al*, 2010).

Uma das condições necessárias para a eletrofiação ocorrer com formação das fibras, é que um polímero em solução tenha um peso molecular adequado, além da viscosidade da solução. A viscosidade da solução desempenha um papel importante na determinação do tamanho e morfologia durante a fiação de fibras poliméricas. Como o jato sai da ponta da agulha durante a eletrofiação, a solução de polímero é estirada e viaja até a placa coletora (Ramakrishna *et al*, 2005).

O peso molecular do polímero reflete no comprimento médio das cadeias poliméricas, tem um efeito direto na viscosidade da solução, já que esta será função do nível de emaranhamento das cadeias poliméricas no solvente. Similarmente ao aumento do peso molecular, um aumento na concentração irá resultar em um maior entrelaçamento das cadeias poliméricas na solução, o que é necessário para manter a continuidade do jato durante o processo de eletrofiação (Ramakrishna *et al*, 2005).

A viscosidade, a concentração de polímero e peso molecular do polímero estão correlacionadas umas com as outras. As soluções de polímero de viscosidade muito altas, geralmente exibem estresse de relaxamento, o que poderia impedir a fratura dos jatos ejetados durante o processo de eletrofiação ou a solução pode secar na ponta da agulha, antes da eletrofiação ser iniciada. Um aumento na viscosidade ou concentração da solução dá origem a uma fibra com maior diâmetro e mais uniforme. Para a solução de baixa viscosidade é comum encontrar contas depositadas ao longo das fibras, devido a uma grande quantidade de moléculas de solvente e poucas cadeias entrelaçadas, o que faz com que a tensão superficial seja um fator dominante do sistema ao longo do jato eletrofiado gerando instabilidade do mesmo e apenas contas ou fibras com contas são formadas, enquanto acima de uma concentração crítica, uma estrutura fibrosa contínua é obtida e a sua morfologia é afetada pela concentração da solução. Em conjunto, os estudos indicam que existem polímero específicos, e valores de viscosidade ótima para eletrofiação e essa propriedade tem uma influência marcante sobre a morfologia das fibras (Ramakrishna *et al*, 2005; Kulkarni *et al*, 2010).

2.6.2.2 *Tensão Superficial*

A tensão superficial refere-se à tensão aproximada na camada superficial de um fluido. Quando a solução se encontra num estado de equilíbrio, as moléculas no interior dessa solução são solicitadas igualmente em todas as direções pelas forças de atração das moléculas vizinhas. As moléculas da superfície do fluido sofrem apenas atração lateral e inferior. Devido à interação conjunta destas forças, existe uma tensão na superfície que faz a mesma comportar-se como uma membrana elástica (Moore, 1976).

As unidades da tensão superficial representam-se pela força exercida numa superfície por unidade de comprimento (N/m). Um fluido em contato com uma superfície sólida toma uma forma, determinada pela relação entre três forças: a força da gravidade, a força da interação entre as suas moléculas (forças de coesão) e a força de interação entre essas moléculas e as partículas da superfície sólida (forças de aderência) (Moore, 1976).

Na eletrofição, as cargas da solução polimérica devem ser altas o suficiente para vencer a tensão superficial da solução. A tensão superficial é uma função da composição dos solventes da solução que desempenha um papel crítico no processo de eletrofição. Com a redução da tensão superficial de uma solução, fibras podem ser obtidas sem grânulos. Diversos solventes podem contribuir com diferentes tensões superficiais. Geralmente, a alta tensão superficial de uma solução inibe o processo de eletrofição por causa da instabilidade dos jatos e a geração de gotas pulverizadas (Bhardwaj, Kundu, 2010).

A formação de gotículas e fibras depende da tensão superficial da solução e uma tensão superficial menor da solução ajuda na fição para ocorrer em um menor campo elétrico no processo de eletrofição. No entanto, não necessariamente uma tensão superficial menor de um solvente será sempre mais adequada para eletrofição. Basicamente, a tensão superficial determina os limites superior e inferior do processo de eletrofição se todas as outras variáveis são mantidas constantes (Bhardwaj, Kundu, 2010).

2.6.2.3 *Condutividade Elétrica*

A condutividade de uma solução é determinada pela capacidade de movimento (em massa) dos íons H^+ presentes na solução ou ainda, a facilidade com que a solução é capaz de conduzir uma corrente elétrica (Moore, 1976). O pH da solução pode ser influenciado pela concentração de íons H^+ presentes, pois gera valores menores de pH, com isso a condutividade elétrica tende a aumentar com a maior concentração de íons dissolvidos (Zillmer, 2007).

Quando uma diferença de potencial é aplicada a um determinado volume de solução, a intensidade da corrente que flui pela solução será proporcional à quantidade de íons presentes. Nota-se que soluções com alta condutividade terão maior capacidade de carga do que soluções com baixa condutividade. No primeiro caso, o jato fibroso, na presença de um campo elétrico, submete-se a uma força eletrostática maior do que no segundo (resultado do somatório de todas as forças de cada carga) (Bhardwaj; Kundu, 2010).

Condutividade elétrica da solução é determinada principalmente pelo tipo de polímero, solvente utilizado, e da disponibilidade de sais ionizáveis. Verifica-se que com o aumento da condutividade elétrica da solução, existe uma diminuição significativa no diâmetro das nanofibras eletrofiadas, enquanto que com baixa condutividade da solução, resulta em alongamento insuficiente do jato pela força elétrica para produzir fibras uniformes e livres de grânulos. Em síntese, geralmente, o aumento da condutividade elétrica da solução ou a densidade de cargas é usado para reduzir e uniformizar o diâmetro das fibras e, ao mesmo tempo, diminuir o número de defeitos (Bhardwaj, Kundu, 2010).

A adição de sal iônico demonstra efeito sobre a morfologia e diâmetro das fibras eletrofiadas. Sais iônicos tais como KH_2PO_4 , NaH_2PO_4 , e $NaCl$ produzem fibras livres de grânulos e com diâmetros relativamente menores que variam de 200 a 1000 nm (Ramakrishna *et al*, 2005; Kulkarni *et al*, 2010).

2.6.3 OS PARÂMETROS DO PROCESSAMENTO

2.6.3.1 *Tensão Aplicada*

Os investigadores têm sugerido que, quando maior tensões são aplicadas, não há mais ejeção de polímero e isto facilita a formação de uma fibra de diâmetro maior (Zhang *et al*, 2005). Outros autores relataram que um aumento na tensão aplicada (isto é, através do aumento da intensidade do campo elétrico), aumenta a força eletrostática repulsiva sobre o jato de fluido que em última análise, favorece a diminuição do diâmetro da fibra. Na maioria dos casos, uma tensão mais elevada provoca um maior alongamento da solução devido à maiores forças eletrostáticas no jato, bem como um forte campo elétrico e estes efeitos conduzem a uma redução no diâmetro da fibra e também uma rápida evaporação do solvente a partir dos resultados da formação de fibras em uma tensão mais alta. Há também uma maior probabilidade de formação de defeitos. Assim, a tensão influencia o diâmetro da fibra, mas o nível de significância varia com a concentração da solução de polímero concentração da solução e da distância entre a ponta e a placa coletora (Bhardwaj, Kundu, 2010).

2.6.3.2 *Vazão*

A vazão da solução determina a quantidade de solução disponível para a eletrofição. Na literatura, o número de estudos relacionados com este parâmetro é muito limitado, contudo, relacionam o fluxo da solução com a dimensão e a morfologia das fibras. Em geral, o aumento da vazão favorece o aumento diâmetro da fibra, muito embora exista um limite do diâmetro para o sucessivo aumento da vazão. Vazões elevadas também podem originar fibras com defeitos, devido à elevada quantidade de solvente que deve evaporar antes de alcançar placa coletora (Megelski *et al*, 2002).

O impacto da vazão da solução é também relatado na morfologia das fibras, nomeadamente a porosidade e a geometria. Além disso, para vazões elevadas, a evaporação revela-se incompleta, conduzindo à formação de fibras achatadas, em vez de fibras com secção circular (Megelski *et al*, 2002).

Do mesmo modo, o sucesso da eletrofiação depende também do equilíbrio deste parâmetro, uma vez que quantidades insuficientes ou excessivas impossibilitam a sua realização. No primeiro caso, o Cone de Taylor na extremidade do capilar não se mantém, caso o fluxo se revele insuficiente para substituir a solução projetada ao coletor. No segundo caso, as forças do campo elétrico são impedidas de atuar (na orientação do jato) perante fluxos elevados de solução. Quando isto acontece, a gota que origina o jato desprende-se pela ação da gravidade, sem antes sofrer orientação elétrica (Bhardwaj, Kundu, 2010).

2.6.3.3 *Distância da Agulha à Placa Coletora*

Uma distância mínima é necessária para dar as fibras tempo suficiente para evaporar o solvente antes de atingir a placa coletora, caso contrário, com distâncias que são próximas ou demasiado longe, os grânulos têm sido observados (Sill, Recum, 2008; Kulkarni *et al*, 2010).

Um importante aspecto físico da eletrofiação de nanofibras é a evaporação do solvente utilizado para dissolver o polímero, assim, deve haver distância ótima entre a ponta da agulha e a placa coletora que favoreça este processo para melhorar a produção de nanofibras livres de grânulos (Bhardwaj, Kundu, 2010).

2.6.3.4 Parâmetros Ambientais

Além de parâmetros de solução e de processamento, há também parâmetros ambientais que incluem umidade e temperatura, estes têm sido conduzidos para examinar os efeitos de parâmetros ambientais sobre o processo de eletrofiação. Com o aumento da temperatura, há um rendimento de fibras com diminuição do diâmetro e atribuem esse declínio devido a diminuição da viscosidade das soluções do polímero com o aumento da temperatura. Há uma relação inversa entre viscosidade e temperatura (Bhardwaj, Kundu, 2010).

Aumentando a umidade pode ocorrer um surgimento de pequenos poros circulares na superfície das fibras, aumentando ainda mais a umidade, conduz coalescência aos poros. Verifica-se que em níveis muito baixos de umidade, um solvente volátil pode secar rapidamente como a evaporação do mesmo. Em consequência, o jato necessita de mais tempo para secar. Por outro lado, a liberdade de movimento das cadeias poliméricas é maior perante temperaturas elevadas, resultando na menor viscosidade da solução. Pelo princípio de funcionamento da eletrofiação, a condutividade elétrica aplicada durante o processo é responsável pelo prolongamento e distensão do jato polimérico. Como tal, esta distensão é contrariada pelas forças viscosas, em conjunto com a tensão superficial. Se a viscosidade da solução diminuir em função de uma temperatura mais elevada, a taxa de distensão aumenta e conseqüentemente formam-se fibras de diâmetros menores. Assim, a partir da solução e parâmetros de processamento, os parâmetros ambientais também podem afetar o processo de eletrofiação (Bhardwaj, Kundu, 2010).

2.6.4 OS SOLVENTES UTILIZADOS PARA ELETROFIAÇÃO

O solvente utilizado na preparação de soluções de polímero tem como objetivo influenciar na sua fiação, porque o primeiro passo e mais importante no processo de eletrofiação é a dissolução do polímero num solvente adequado. Os solventes devem ter algumas

propriedades, tais como, boa volatilidade, pressão do vapor do jato, temperatura de ebulição e deve manter a integridade da solução polimérica. Assim, para o sucesso do processo de eletrofiação um sistema de solvente apropriado é indispensável. A interação intermolecular de um sistema polímero-solvente (sistema binário) é e/ou atraente ou repulsivo que depende unicamente do tipo de solvente utilizado (Bhardwaj, Kundu, 2010).

No processo de eletrofiação, a evaporação rápida do solvente e a separação de fases ocorrem devido à pressão do vapor do jato, o solvente desempenha um papel crítico na determinação da taxa de evaporação e do tempo de secagem. A volatilidade do solvente também desempenha um papel significativo na formação de nanoestruturas uma vez que influencia o processo de separação de fases. A morfologia e o tamanho de nanofibras fiadas dependem fortemente das propriedades da solução, tais como, a viscosidade e tensão superficial (Bhardwaj, Kundu, 2010).

Diversos solventes podem contribuir para diferentes tensões superficiais. A viscosidade da solução é determinada pela concentração do polímero, mas o valor de tensão superficial depende tanto do polímero como do solvente, através da redução da tensão superficial de uma solução de polímero, as fibras podem ser obtidas sem grânulos, mas este deve ser aplicado com cautela. Tem-se reconhecido que a tensão superficial parece mais provável numa função de composições de solvente, mas é insignificamente dependente da concentração de polímero. Uma menor tensão superficial do solvente não é necessariamente sempre adequada para eletrofiação (Bhardwaj, Kundu, 2010).

As propriedades de solventes têm um efeito profundo sobre o diâmetro da fibra. Basicamente, o solvente desempenha dois papéis cruciais na eletrofiação: em primeiro lugar, dissolver as moléculas de polímero para formar o jato eletrificado e em segundo lugar para transportar as moléculas de polímero dissolvido em direção à placa coletora (Bhardwaj, Kundu, 2010).

Na eletrofiação espera-se que:

- 1) os diâmetros das as fibras sejam consistentes e controláveis;
- 2) a superfície das fibras sejam livres de defeitos ou com defeitos controláveis e;
- 3) as nanofibras contínuas sejam reproduzíveis.

No entanto, pesquisas têm demonstrado que estes três objetivos não são facilmente obtidos. Uma das propriedades mais importantes relacionadas no processo de eletrofiação é o diâmetro das fibras. Os diâmetros das fibras dependerão principalmente da espessura dos jatos, bem como sobre o conteúdo de polímero nos jatos (Huang *et al*, 2003).

Um problema notório encontrado em eletrofiação são os defeitos, tais como grânulos, isto ocorre em nanofibras de polímero. Verificou-se que a concentração do polímero também afeta a formação dos grânulos, reconheceu-se que maior concentração de polímero resultou em uma redução na presença de grânulos (Huang *et al*, 2003).

2.6.5 APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Do ponto de vista biológico, quase todos os tecidos e órgãos humanos são depositados em forma de nanofibras ou estruturas. Exemplos incluem: ossos, dentina, colágeno, cartilagem, pele. Todos eles são caracterizados por uma matriz organizada hierárquica de estruturas fibrosas realinhadas em escala nanométrica. Nas últimas décadas as pesquisas concentraram-se principalmente na fabricação de nanofibras para aplicações em bioengenharia. (Huang *et al*, 2003). Um diagrama esquemático de aplicações eletrofiação em vários campos é mostrado na **Figura 5**.

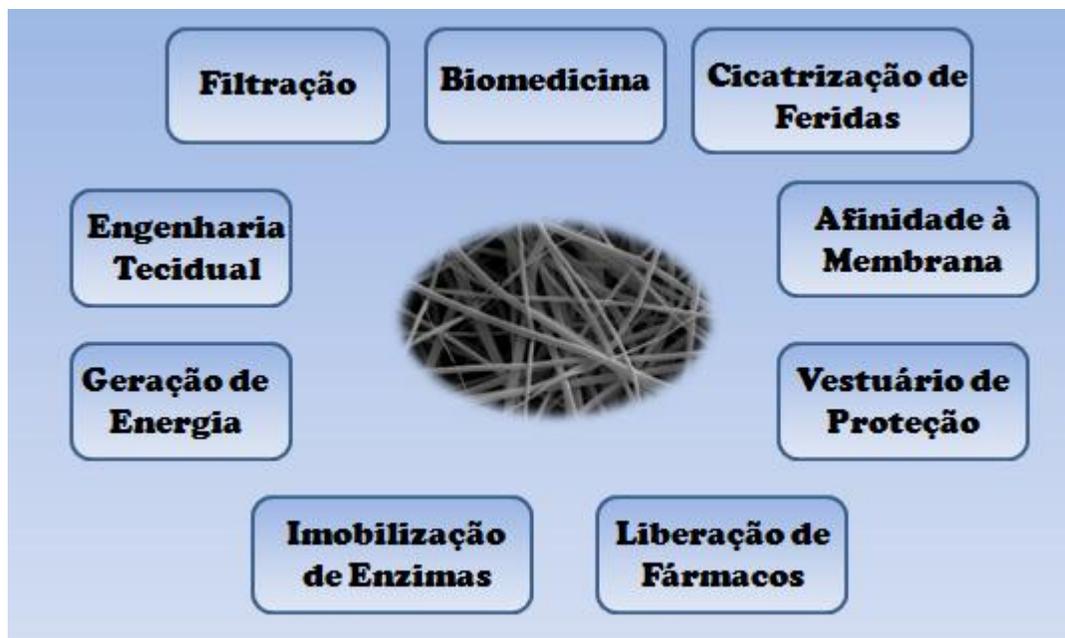


Figura 5: Aplicações de fibras eletrofiadas em diferentes setores (Bhardwaj, Kundu, 2010).

2.6.5.1 *Próteses Médicas*

Nanofibras de polímero fabricadas via eletrofiação têm sido propostas para um número de aplicações em próteses de tecidos moles, tais como vasos sanguíneos, de mama, etc. Além disso, nanofibras fiadas de polímero biocompatível podem ser também depositadas como uma película fina porosa para um dispositivo de tecido duro protético concebido para ser implantado no corpo humano. Esta película de revestimento funciona como um dispositivo de estrutura fibrosa em interface entre a prótese e os tecidos do hospedeiro, e é esperado que reduza eficientemente o desgaste na interface tecido/dispositivo e, conseqüentemente, evite a falha do dispositivo após o implante (Huang *et al*, 2003).

2.6.5.2 *Engenharia Tecidual*

Para o tratamento de tecidos ou órgãos em mau funcionamento no corpo humano, um dos desafios para o campo de engenharia de tecidos/biomateriais é o projeto de *scaffolds*/matrizes sintéticas que podem imitar a estrutura e funções biológicas da matriz extracelular (ECM). As células humanas podem se anexar e organizar em torno de fibras com diâmetros menores do que os das células. Portanto, *scaffolds* fibrosos em nanoescala podem proporcionar um modelo ideal para as células migrarem e crescerem ao seu redor. A regeneração bem sucedida de tecidos e órgãos biológicos chama a atenção para o desenvolvimento de estruturas fibrosas com arquiteturas de fibras benéficas para deposição e proliferação celular. O interesse na engenharia de tecidos é voltado para a criação de *scaffolds* reprodutíveis e biocompatíveis resultando em biocompósitos de matriz para reparação tecidual e vários procedimentos de substituição (Huang *et al*, 2003; Chew, *et al* 2006, Sill, Recum, 2008; Kulkarni *et al*, 2010).

2.6.5.3 *Curativo*

Nanofibras de polímero também podem ser usados para o tratamento de feridas ou queimaduras da pele humana, bem como concebido para dispositivos hemostáticos com algumas características únicas. Com o auxílio do campo elétrico, fibras finas de polímeros biodegradáveis podem ser diretamente colocadas no local da ferida da pele para formar uma densa esteira fibrosa, que pode curar as feridas, incentivando a formação de crescimento normal da pele. Membranas de nanofibras para curativos, normalmente têm tamanhos de poros que variam de 500 nm a 1 mm, suficientemente pequena para proteger a ferida da penetração bacteriana. A eficiência de um filtro aumenta com a diminuição de diâmetro da fibra (Huang *et al*, 2003; Bhardwaj, Kundu, 2010).

2.7 ELETROFIAÇÃO DE GELATINA

A gelatina é conhecida por ter biocompatibilidade e biodegradabilidade semelhantes às do colágeno (Panzavolta *et al*, 2011) e fabricação de nanofibras por eletrofiação tem sido reportadas. *Scaffolds* de gelatina, bem como blendas de gelatina com polímeros sintéticos têm ganhado interesse em engenharia de tecidos. (Sell *et al*, 2009).

O solvente ideal para gelatina para aplicações médicas é a água devido à inexistência de resíduos tóxicos na sua degradação, mas à temperatura ambiente a gelatina é parcialmente solúvel em água e ocorre a formação de um gel não sendo possível obter uma viscosidade que permita a eletrofiação da solução. Isto acontece porque à temperatura ambiente há um aumento na ligação de hidrogênio o que induz uma transição nas hélices individuais que foram separadas no processo de desnaturação do colágeno. As triplas hélices reorganizam-se ao longo do tempo para formar uma rede tridimensional de géis. Nota-se que a formação da tripla hélice é uma parcial renaturação do estado do colágeno de origem, estas transições são físicas (pontes de hidrogênio e ligações de van der Waals) o processo de gelificação é termo-reversível (Paker, Povey, 2012).

Alguns trabalhos sobre eletrofiação de gelatina reportam a obtenção de nanofibras a partir de soluções utilizando solventes como 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFP), 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) que pode ser usado para dissolver polímeros naturais (Zhang *et al*, 2007; Song *et al*, 2008, Panzavolta *et al*, 2011). No entanto, estes solventes são altamente tóxicos, os resíduos destes solventes em que as fibras são eletrofiadas, podem ser lançados no corpo por degradação e ser prejudicial ao hospedeiro. Assim é preferível utilizar sistemas aquosos não tóxicos ou pouco tóxicos para aplicações biomédicas como sistemas água/ácido fórmico e água/ácido acético (Panzavolta *et al*, 2011).

Infelizmente, os sistemas aquosos são conhecidos por serem inadequados para o processo de eletrofiação para polímeros naturais como a gelatina, devido à elevada tensão superficial, baixa volatilidade da solução aquosa, elevada viscosidade e baixa solubilidade em solventes orgânicos em gerais (Song *et al*, 2008). Todavia, o ácido acético, bem como misturas de

água/ácido acético, tem sido proposto como solventes para contornar este problema e por serem menos tóxicos (Panzavolta *et al*, 2011).

Diferentes estudos ilustraram a possibilidade de produzir fibras com gelatina através de eletrofiação. Para obter fibras ótimas sem defeitos, vários parâmetros têm de ser considerados, nomeadamente parâmetros de processo como o campo elétrico aplicado ou as condições ambientais e parâmetros de sistema como as propriedades intrínsecas da solução (Fong *et al*, 1999)

Sabe-se que a viscosidade, a condutividade elétrica e a tensão superficial da solução são fatores determinantes. Por exemplo, uma baixa viscosidade da solução de gelatina está normalmente associada à formação de defeitos. De fato, abaixo de um dado limiar de viscosidade, não se observa eletrofiação, mas sim *electrospraying* (produção de gotas/defeitos e não de fibras). Quando fibras apresentam defeitos significa que esse limiar não foi ultrapassado completamente (Fong *et al*, 1999).

Por outro lado, quando a densidade de carga é elevada os defeitos desaparecem (domínio da eletrofiação), estando este fato relacionado com o campo aplicado e numa menor escala com a condutividade elétrica da solução. A densidade de carga pode ser controlada por cargas de polaridade igual ou oposta à que o jato carrega consoante se queira aumentá-la ou diminuí-la (Fong *et al*, 1999).

A tensão superficial depende dos polímeros e solventes utilizados no processo de eletrofiação (Fong *et al*, 1999). Com um coeficiente maior de tensão superficial o campo aplicado terá ser mais elevado para quebrar o equilíbrio eletrostático.

Estudos recentes têm mostrado que a introdução de polímeros sintéticos tais como poli (ácido L-láctico) (PLLA), poli acetato de polivinila (PVA), poli (óxido de etileno) (PEO) e poli (N-vinil-2-pirrolidona) (PVP) para formação de blendas com gelatina no processo de eletrofiação poderia para melhorar as propriedades físico-químicas das soluções, como hidrofiliabilidade e viscosidade (Lu *et al*, 2006, Yang *et al*, 2007, Kejing *et al*, 2010, Simone *et al*, 2010). Estes

polímeros são biocompatíveis e não tóxicos e melhoram a capacidade de processamento proporcionando um composto de nanofibras uniformes e sem defeito. No presente trabalho, foi utilizada uma solução mista de água/ácido acético, gelatina e PVP a fim de obter soluções adequadas ao processo de eletrofiação, mas sem comprometer as suas propriedades biológicas. O polímero de escolha foi o PVP, pois é um polímero que apresenta ótimas propriedades químicas e biológicas (ver seção 2.5), porém uma blenda polimérica de gelatina/PVP pouco investigado na literatura, sendo um diferencial neste trabalho. Foram avaliadas as propriedades das soluções como pH, condutividade elétrica, tensão superficial e viscosidade e as membranas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura, análise termogravimétrica e citotoxicidade.

3 MATERIAIS

3.1 MATERIAIS

Os materiais utilizados neste trabalho foram: Gelatina (tipo B de pele bovina, Sigma Aldrich), PVP (MM= 360,000, Sigma Aldrich), ácido acético (CH₃COOH, 99,7%, Ecibra) e água deionizada.

3.2 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES POLIMÉRICAS DA BLENDAS: GELATINA/PVP

As soluções foram preparadas em diferentes proporções em massa de água/ácido acético, sem qualquer tratamento ou purificação adicional.

Foram preparadas soluções poliméricas, pela mistura de gelatina/PVP, como descrito a seguir.

Para possibilitar a eletrofição da solução polimérica foram preparados por dissolução 9,2% de peso de gelatina e 7,4 % de peso de PVP, constante em diversas concentrações de água/ácido acético. A composição de cada solução está apresentada na Tabela 1.

Todas as soluções foram agitadas durante 2 horas (agitador Nova Ética, Modelo 114), a 26 °C e eletrofiadas no mesmo dia do preparo. Todas as soluções foram preparadas na mesma

ordem, sendo adicionado o ácido acético em água, em seguida a gelatina e posteriormente o PVP gradualmente.

Tabela 1: Concentrações de água/ácido acético (% em massa)

Número	Proporção Água: Ácido Acético	Ácido Acético (% p)
1	1:8	9,3
2	3,5:1	18,6
3	2:1	27,8
4	1:1,25	37,0
5	1,25:1	46,3
6	1:2	55,5
7	1:3,5	64,8

3.3 CARACTERIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES POLIMÉRICAS DE GELATINA/PVP

Todas as soluções poliméricas foram caracterizadas através de medições de pH, viscosidade, tensão superficial e condutividade elétrica.

O pH das soluções foi determinado utilizando um pHmetro digital (Modelo DM-22) e a condutividade elétrica utilizando um condutivímetro digital (Modelo DM-32) ambos da Digimed. A tensão superficial foi medida em duplicata utilizando o Tensiômetro Kruss (Modelo K -12) e o Tensiômetro Sigma (Modelo 701). Para cada solução, valores médios dessas propriedades foram calculados a partir de pelo menos três medições.

As propriedades reológicas foram medidas utilizando o reômetro Haake RS1, com cone e geometria de placas PP35Ti (tamanho da abertura de 35 mm). Todas as medições foram

realizadas a uma temperatura de 25°C. A viscosidade em função da taxa de cisalhamento foi obtida em ensaio em regime permanente para taxa de cisalhamento até 100s⁻¹.

3.4 ELETROFIAÇÃO DAS SOLUÇÕES

As soluções de gelatina/PVP preparadas foram eletrofiadas em temperaturas 26° entre 29°C, utilizando uma seringa descartável de 10 ml, com uma agulha descartável com ponta metálica de 0,55mm de diâmetro interno. O polo positivo de uma fonte de alta tensão, projetada para trabalhar na faixa de 0 a 30 kV, foi conectado a ponta da agulha metálica da seringa, enquanto que o eletrodo terra foi utilizado para aterrar a placa coletora de cobre, com as dimensões de 5,0 x 10,0 cm. A vazão foi controlada por uma bomba de infusão (kdScientific, Modelo KDS-100), conectada a seringa e a tensão foi controlada por uma fonte de alta tensão (Testtech). A distância da ponta da agulha ao coletor foi de 10 cm.

As soluções foram processadas a uma tensão positiva de 29,1-29,2 kV e a uma vazão de 1 mL / h. As amostras das membranas fiadas foram coletadas em folhas de papel alumínio, as quais revestiam a placa de cobre durante os experimentos. Em cada teste foram eletrofiadas aproximadamente 5 ml de solução polimérica. A **Figura 6** mostra uma foto do equipamento de eletrofiação utilizado neste trabalho.

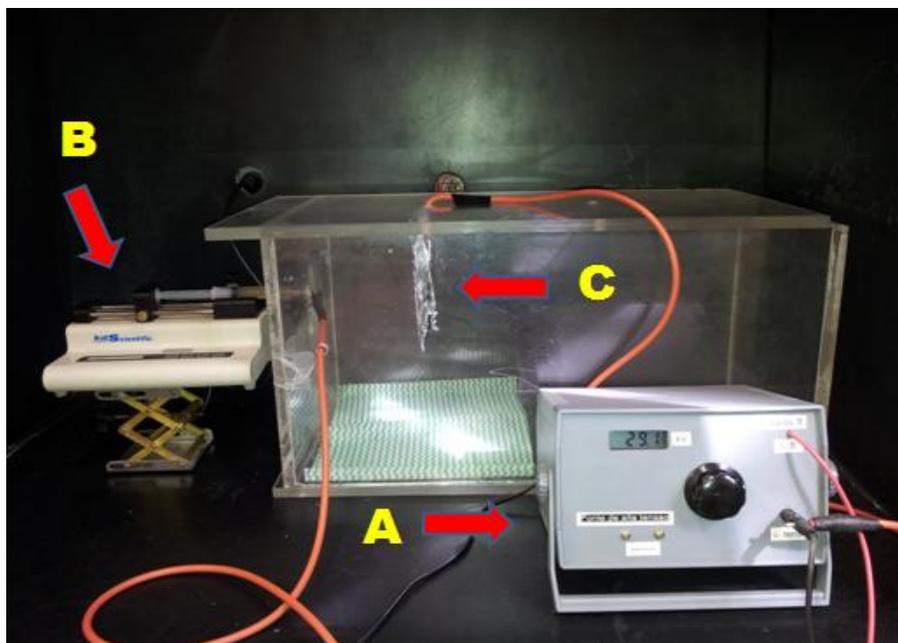


Figura 6: Aplicações de fibras eletrofiadas em diferentes setores. A: Fonte de alta tensão; B: Bomba infusora e C: Placa coletora.

3.5 CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS ELETROFIADAS DE GELATINA/PVP

A morfologia das fibras de gelatina/PVP eletrofiadas foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando um equipamento ZEISS (Modelo Evoma-15). Para a observação pelo MEV, às amostras foram revestidas em ouro utilizando um equipamento Sputter Coater, Bal-Tec (Modelo SCD-O50). Os diâmetros médios das fibras foram determinados por análise das imagens de MEV, utilizando o programa de análise de imagens ImageJ, onde foram medidos os diâmetros de 50 fibras de cada amostra escolhidas aleatoriamente.

Análise termogravimétrica TGA foi realizada em um STA 409C (Netzsch, Alemã). Neste trabalho, a massa de cada amostra foi de 10 mg. O gás transportador foi o nitrogênio, a uma taxa

de fluxo de 50 mL/min. As amostras foram aquecidas 18-500 °C em uma única taxa de aquecimento de 10 °C/ min.

3.6 CITOTOXICIDADE

Os testes de citotoxicidade indireta do biomaterial eletrofiado de gelatina/PVP foram realizados segundo a norma ISO10993-5 (2009). As células da linhagem Vero (Instituto Adolfo Lutz) foram cultivadas em meio de cultura 199, com 10% de soro fetal bovino e 10% de solução antibiótica (penicilina/estreptomicina), e foram mantidas a 37 °C e 5% CO₂.

As amostras de biomaterial foram esterilizadas por óxido de etileno segundo a norma ABNT NBR 15245.e incubadas em meio de cultura durante 24 horas, para obtenção da solução de extração. Paralelamente foi realizado o inóculo celular, com densidade de 3×10^3 células/poço, em placas de cultura de 24 poços. As células foram cultivadas durante 24 horas nesta condição, até atingir aproximadamente 80% de confluência da monocamada. Em seguida o meio de cultura foi substituído pelo meio de extração. Como controle negativo (não citotóxico) foi utilizado meio de cultura padrão, e como controle positivo (citotóxico) uma solução de fenol 0,4%, em meio de cultura. Os testes foram realizados em triplicata.

Após 24 horas de incubação foi realizada a observação da morfologia celular, em microscopia de fase. As análises foram complementadas com a fixação das células em glutaraldeído (2,5%), seguida de coloração em Azul de Toluidina 0,1%. As observações foram realizadas ao microscópio de luz invertido (Axiovert A1, Zeiss).

Foi ainda realizada a inoculação de células diretamente em contato com o biomaterial, acrescentando dados à citotoxicidade indireta. As condições de inoculação, cultura e observação da morfologia celular foram as mesmas anteriormente descritas.

Os testes foram realizados na Universidade Federal do ABC, campus Santo André, no Laboratório de Biomateriais e Dispositivos Biomédicos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A **Figura 7** apresenta um gráfico do pH em função da concentração de ácido acético, onde se observa que o pH decresce com o aumento da concentração do ácido acético, ficando na faixa de 3,3 a 1,9 . Essa diminuição do pH com o aumento da concentração do ácido acético é esperada, pois quando um ácido entra em contanto com a água que é considerada um líquido neutro libera uma quantidade de íons de hidrogênio (H^+) muito maior do que está na água, acarretando na redução do pH (Cameron, 2004). O monitoramento do pH da solução é importante, pois a gelatina em meio ácido pode degradar segundo Song *et al.* (2008), o pH deve ser monitorado acima de 1,5. Assim, em todas as soluções estudadas o pH manteve-se dentro de uma faixa admissível de valores.

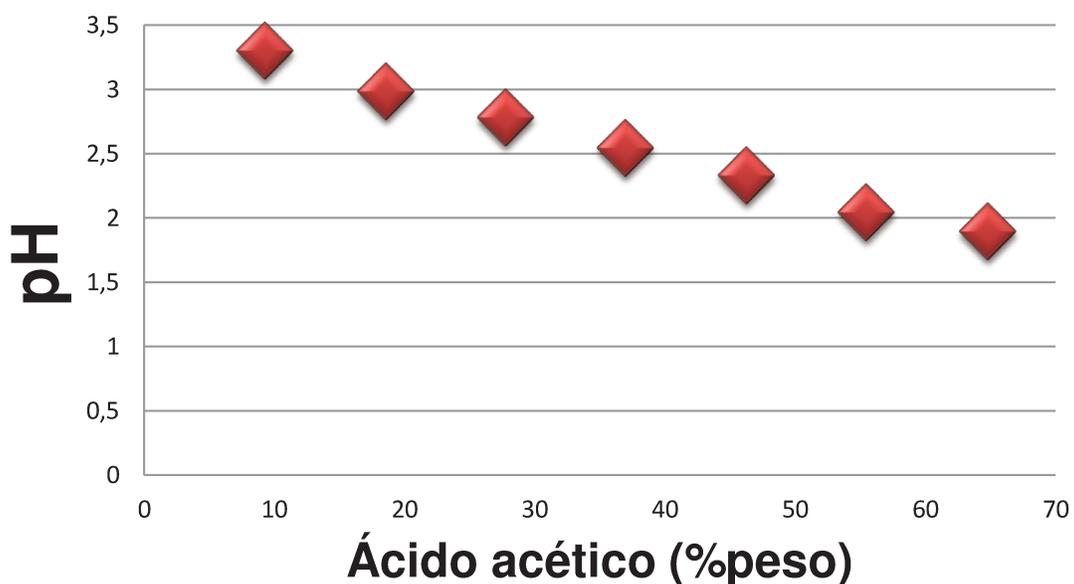


Figura 7: Alterações no pH das soluções de gelatina/PVP em diferentes concentrações de água/ácido acético.

A **Figura 8** apresenta um gráfico dos valores da tensão superficial em função da concentração de ácido acético, avaliados em dois equipamentos, Kruss e Sigma. Para a amostra 7

não foi obtida a medida de tensão superficial no equipamento Sigma, pelo fato do menisco se romper no anel no momento do processo, devido a solução apresentar alta viscosidade **Figura 10**. Pode se observar que a tensão superficial variam entre 33 mN / m e 40 mN / m e que ela tende a diminuir com o aumento da concentração do ácido acético. No entanto, pode se observar que essa tendência não ocorre para todas as faixas de concentrações, pois para uma concentração de 37% de ácido acético pode observar um valor mais elevado da tensão superficial (38 mN / m) foi observado.

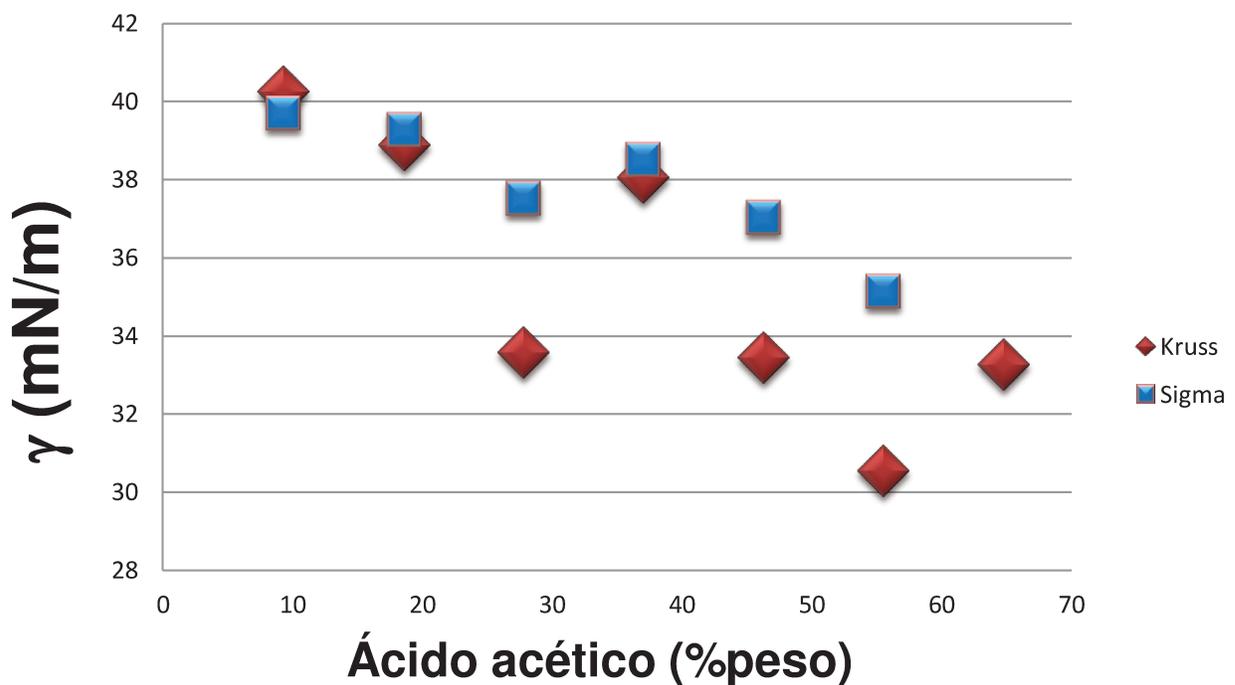


Figura 8: Alterações na tensão superficial das soluções de gelatina/PVP em diferentes concentrações de água/ácido acético. Medidas de tensão superficial realizadas pelos aparelhos Kruss e Sigma.

Essa diminuição da tensão superficial com o aumento da concentração do ácido acético é esperada, pois o ácido acético possui tensão superficial de aproximadamente 28,8 mN / m, enquanto que a água possui tensão superficial aproximadamente 72 mN / m à temperatura

ambiente (Song *et al*, 2008, Gu *et al*, 2009). No entanto, há uma evidência de que os polímeros também contribuem para uma redução na tensão superficial, pois segundo a literatura a tensão superficial de soluções de água/ácido acético com concentração de 10 e 40 % possuem valores aproximados de 55,0 e 41,0, respectivamente (Geng *et al*, 2005). Essa influência dos polímeros na tensão superficial pode ser atribuída ao fato desses agirem como surfactantes, ficando adsorvidos na interface, devido ao fato da gelatina e do PVP terem segmentos moleculares hidrofóbicos e hidrofílicos (ver seções 2.4 e 2.6.).

A **Figura 9** apresenta um gráfico da condutividade elétrica em função da concentração de ácido acético. Pode se observar pela figura que a condutividade elétrica varia entre 658,1 $\mu\text{S}/\text{cm}$ e 2001,9 $\mu\text{S}/\text{cm}$ e que ela tende a diminuir com o aumento da concentração do ácido acético. A diminuição da condutividade elétrica ocorreu de forma contrária ao encontrado na literatura, onde o aumento da condutividade elétrica tende a aumentar com a maior concentração de íons H^+ dissolvidos na solução (Gu *et al*, 2009). Porém, a condutividade iônica diminui a teores mais elevados de ácido acético, a possível redução da condutividade iônica numa concentração de ácido acético maior pode ser atribuída à formação de íons múltiplos (Vieira *et al*, 2007). O ácido acético é um ácido fraco que em contato com a água dissocia-se em acetato, um ânion fraco. A ionização do ácido acético é pequena e o ânion acetato fraco possui grande afinidade pelo próton (H^+), dessa forma, eles reagem e mais ácido acético é formado, inibindo o aumento da condutividade elétrica, pois reduz (H^+) livres na solução (Russell, 1994). No entanto, há também evidência de que os polímeros utilizados influenciam na condutividade elétrica da solução, pois esta propriedade é determinada principalmente pelo tipo de polímero e solvente utilizado (Uyar, Besenbacher, 2008, Bhardwaj, Kundu, 2010).

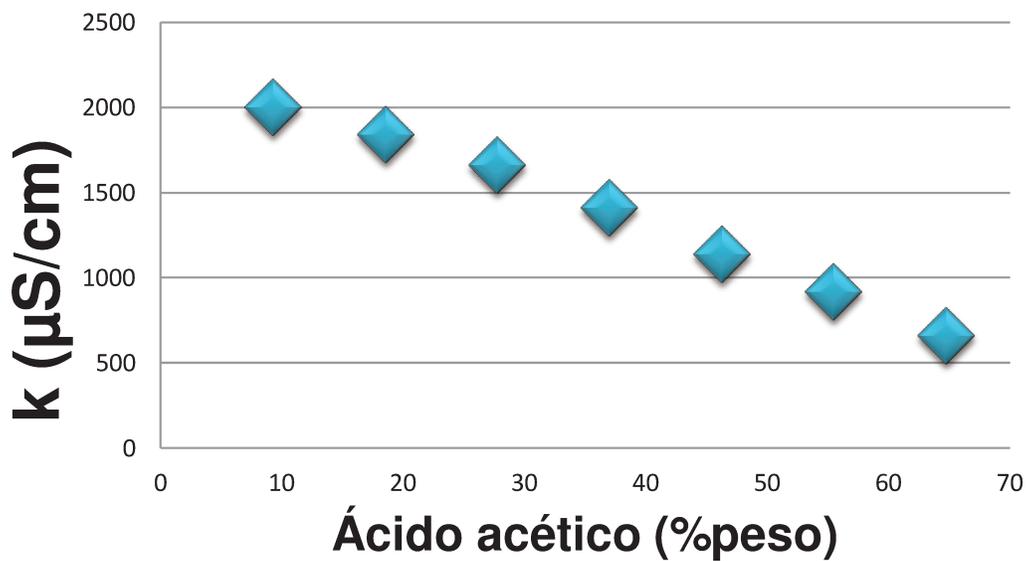


Figura 9: Alterações na condutividade elétrica das soluções de gelatina/PVP em diferentes concentrações de água/ácido acético.

A **Figura 10** mostra um gráfico da viscosidade η em função da taxa de cisalhamento, onde se observa um comportamento Newtoniano, para todas as soluções em função da taxa de cisalhamento em relação à concentração de ácido acético. Assim, a análise da viscosidade das soluções foi realizada utilizando como parâmetro a viscosidade à taxa de cisalhamento zero η_0 , conforme mostra a **Figura 11**.

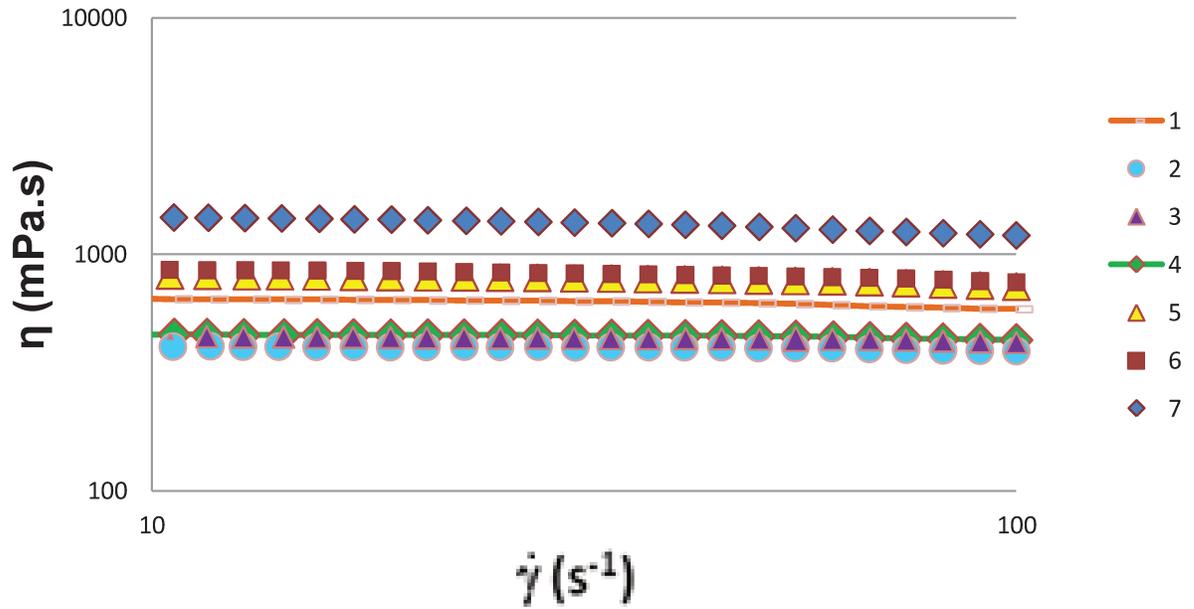


Figura 10: Curvas de viscosidade em função da taxa de cisalhamento das soluções com diferentes concentrações de ácido acético em % de peso

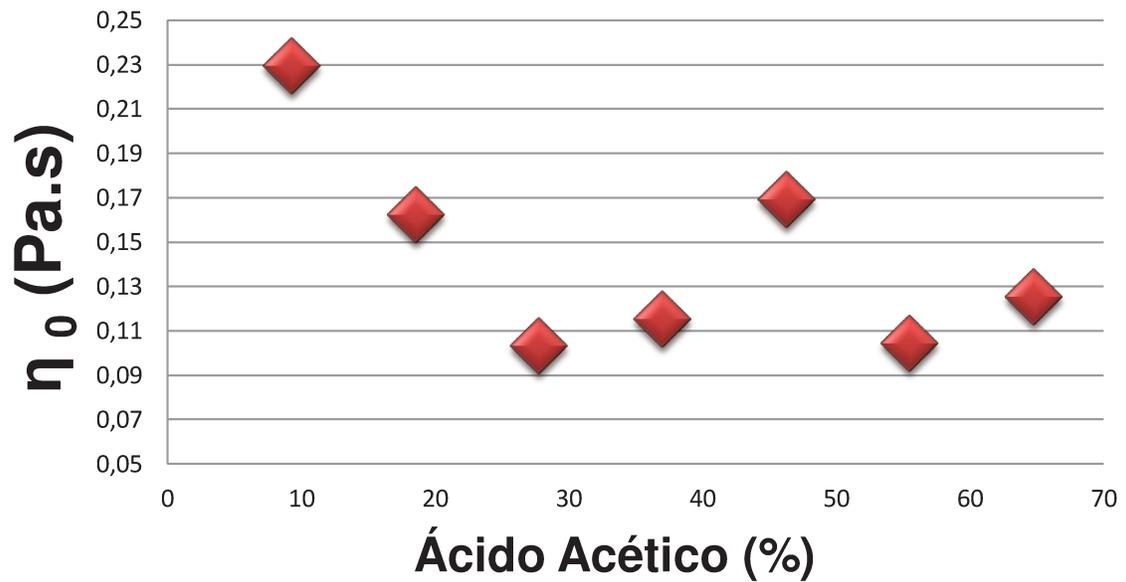


Figura 11: Alterações na viscosidade das soluções de gelatina/PVP em diferentes concentrações de água/ácido acético.

Pode-se observar na **Figura 11** que η_0 varia entre 0,103 (Pa.s) e 0,229 (Pa.s) e que ela tende a aumentar com a diminuição da concentração do ácido acético. No entanto, pode se observar que essa tendência não ocorre para todas as faixas de concentrações, pois as faixas de concentração de 27 a 56% essa tendência não foi observada. Pode-se, portanto verificar que a viscosidade está correlacionada ao pH da solução, pois para maiores valores de pH as cadeias poliméricas comportam-se como suspensões emaranhadas, mas quando o pH diminui elas tendem a se comportarem como um gel fraco (Guerreiro, Meneguelli, 2009).

A **Figura 12** mostra o Termograma TGA que revela o comportamento de degradação térmica da gelatina pura e do PVP puro. Os polímeros em geral, quando submetidos a um tratamento térmico, podem apresentar mudanças estruturais caracterizadas por ruptura de ligações químicas nas suas cadeias moleculares. Essas modificações são evidenciadas pela diminuição na massa molecular, com evolução de produtos voláteis. A análise termogravimétrica realizada em processo contínuo nas amostras dos polímeros envolveu a medida da variação de massa em função da temperatura, pois ao sofrer degradação sob efeito do calor, o material perde massa (Sebio, 2003).

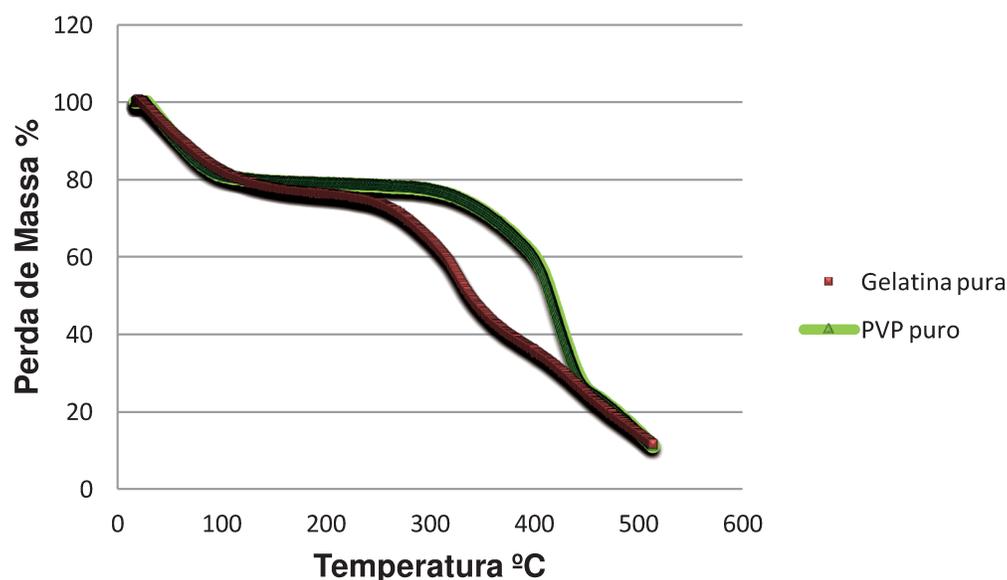


Figura 12: Curvas termogravimétricas (TGA) de degradação térmica da gelatina pura e do PVP puro

Na **Figura 12** observam-se as medições de TGA da gelatina pura que mostra uma perda de massa de 20% na curva da amostra no intervalo de temperatura de 18 a 100 °C antes de iniciar o processo de degradação. Essa etapa corresponde à perda de água retida no interior das amostras. Ao atingir uma temperatura de aproximadamente 250 °C dão início ao processo de degradação que se segue até 420 °C com perda de massa de aproximadamente 70%. Neste processo as amostras passam por reações endotérmicas de hidrólise e oxidação (Mattos, 2011). Na etapa final acima de 420 até 500 °C ocorrem reações exotérmicas originadas do final da pirólise do colágeno com uma perda de massa de 89% restando por volta de 11% de cinzas constituídas pelos resíduos de carbono (Mattos, 2011). É importante destacar que a temperatura máxima atingida pelo equipamento é de 500 °C por isso não houve uma redução maior na massa da amostra.

Na **Figura 12** medições de TGA foram realizadas sobre o PVP puro que foram aquecidas a uma taxa de 18 até 500 °C. O gráfico mostra duas fases distintas de peso observado, uma perda de peso inicial como sendo cerca de aproximadamente 20%, na gama de temperatura de 18 até 80 °C, a perda de peso até esta faixa de temperatura é atribuída a oligómeros de baixo peso molecular, perda de umidade e o solvente residual nesta gama de temperaturas. Na segunda fase a perda de peso indica a degradação de PVP puro acima de 330 °C esta grande perda de peso foi atribuída à decomposição estrutural do polímero. Acima de 500 °C o PVP puro decompõe-se completamente, por isso a presença de resíduo de 11 % de massa a 500 °C (Gasaymeh, 2010).

A **Figura 13** mostra o Termograma TGA que revela o comportamento de degradação térmica das blendas poliméricas de gelatina/PVP das amostras 4 e 7, pois todas as membranas apresentam composição constata de gelatina e PVP, e a amostra 4 é a que foi realizada o teste de citotoxicidade e a amostra 7 é a que contém maior concentração de ácido acético. Na análise gravimétrica térmica da blenda polimérica de gelatina/PVP mostrou perfil de decomposição a partir de aproximadamente 350 °C e continuando até cerca de 480 °C. Isto mostra que a estabilidade térmica da gelatina é melhorada devido à presença do PVP. Esta observação é consistente com os resultados observados na **Figura 12**, onde foi mostrado que a gelatina pura começa a se decompor aproximadamente a 250 °C e com as blendas poliméricas começam a decompor a temperaturas mais elevadas a partir de 350 °C. A estabilidade térmica melhorada da gelatina é atribuída à interação entre gelatina/PVP, conduzindo assim a maior resistência ao calor

da blenda polimérica resultante, em comparação com a gelatina pura, tal como a redução da perda de massa da gelatina e do PVP puro de 11% para aproximadamente 40% da blenda polimérica. Portanto, as curvas de TGA mostraram claramente que o PVP incorporado à gelatina contribuiu para uma substancial melhoria na estabilidade térmica.

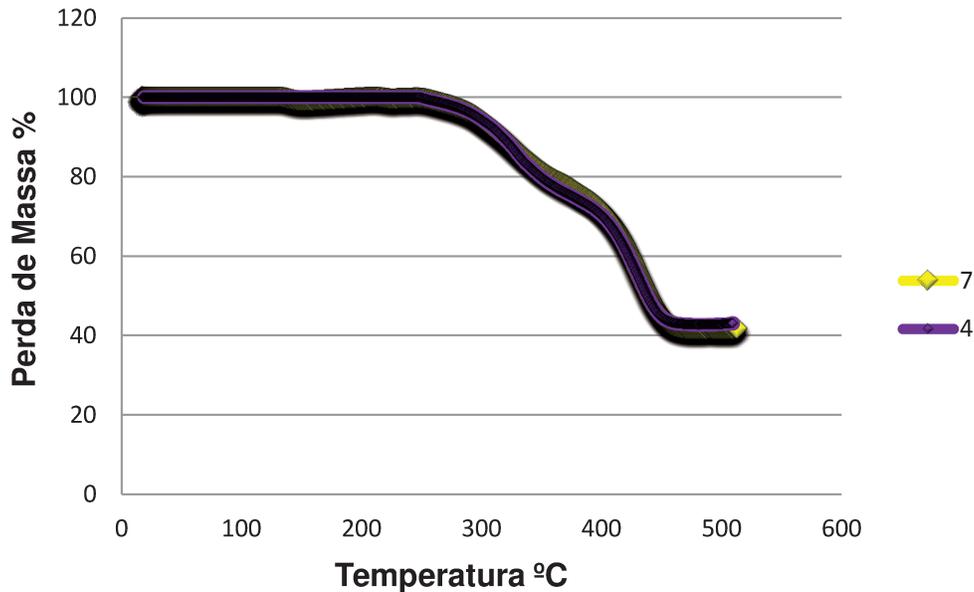
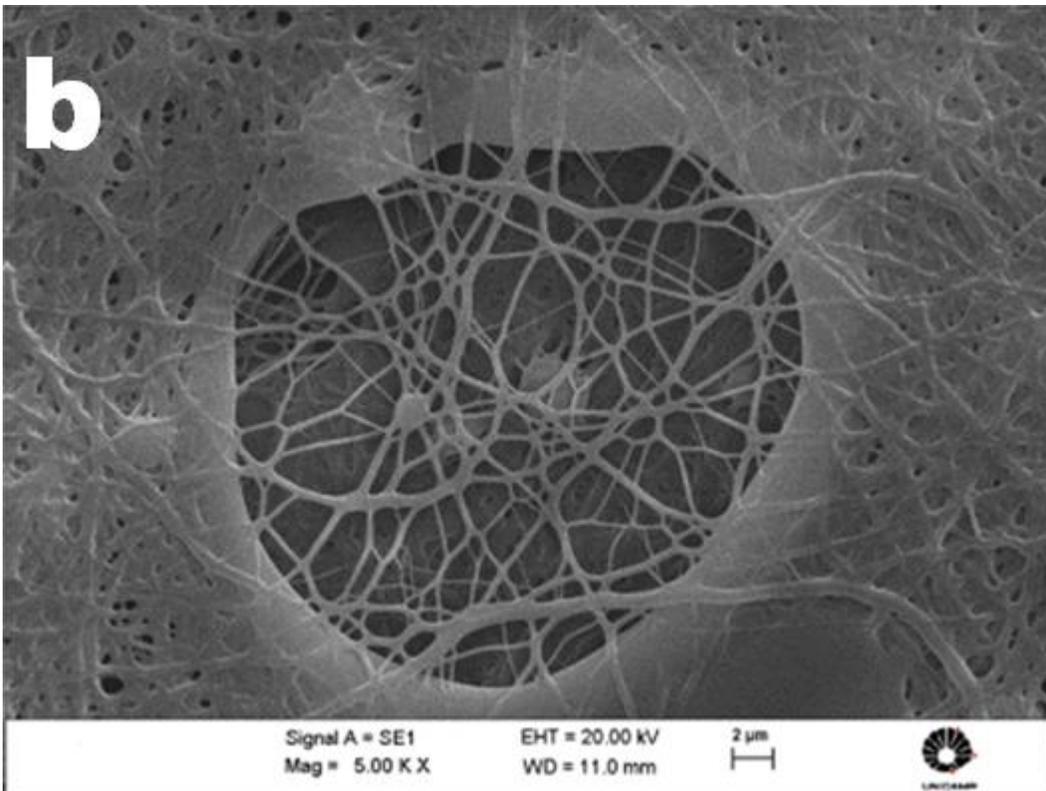
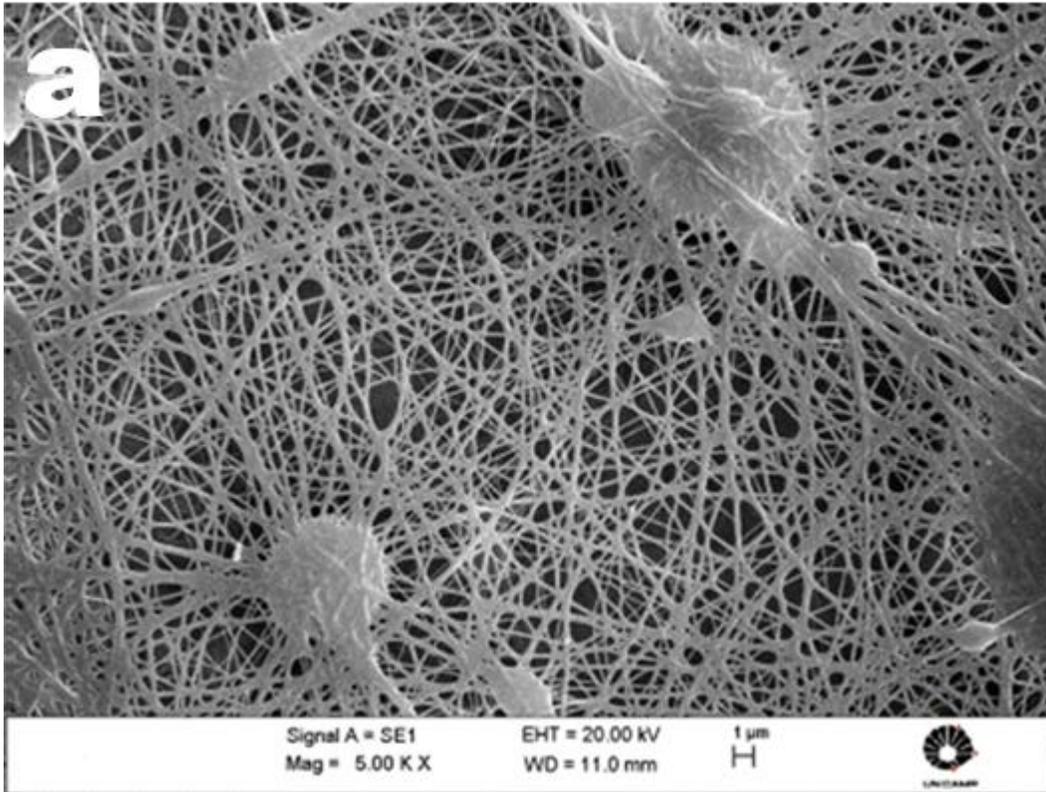
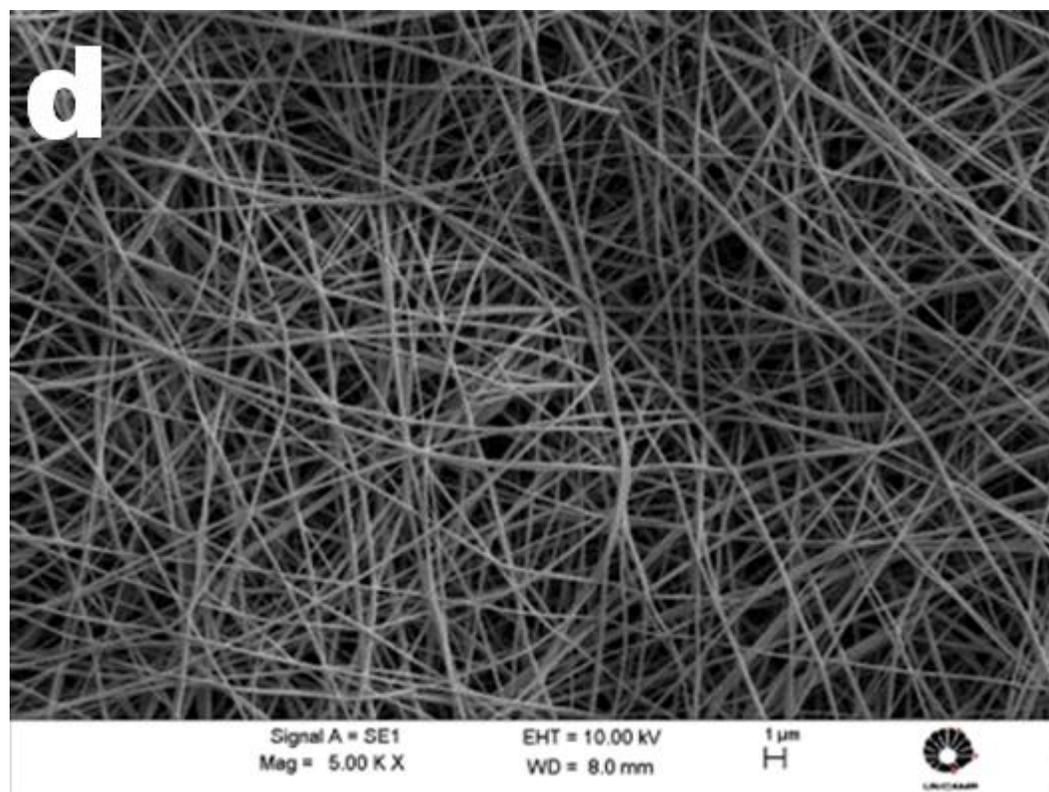
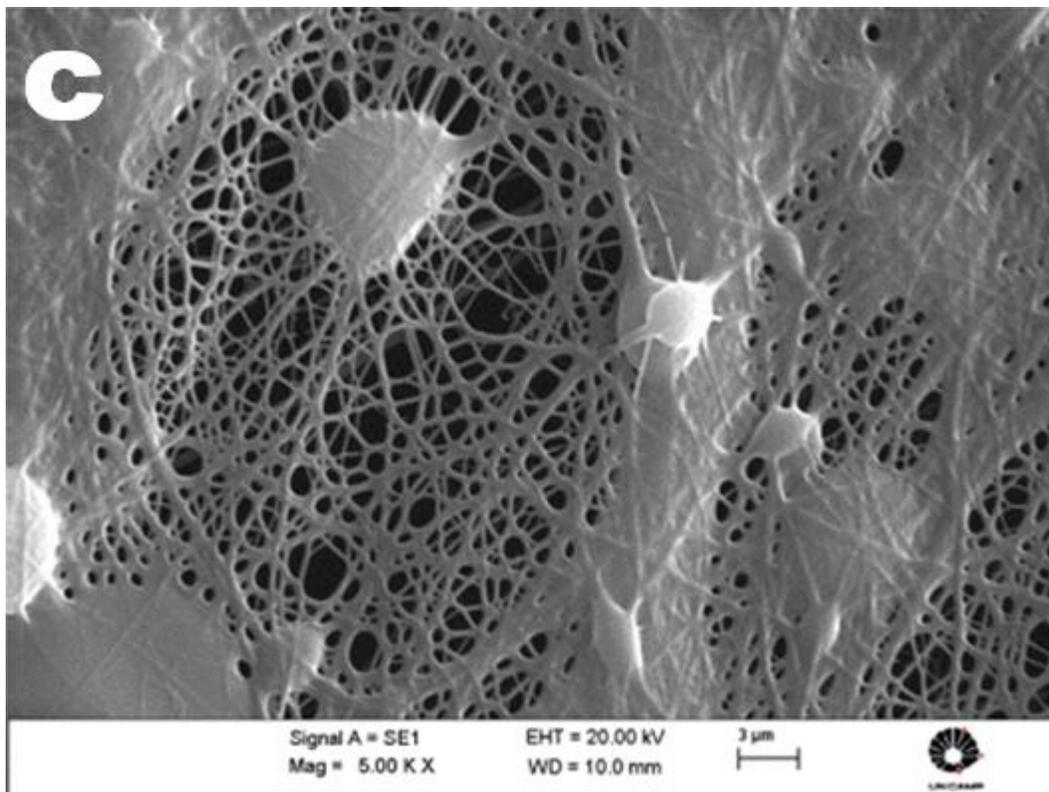
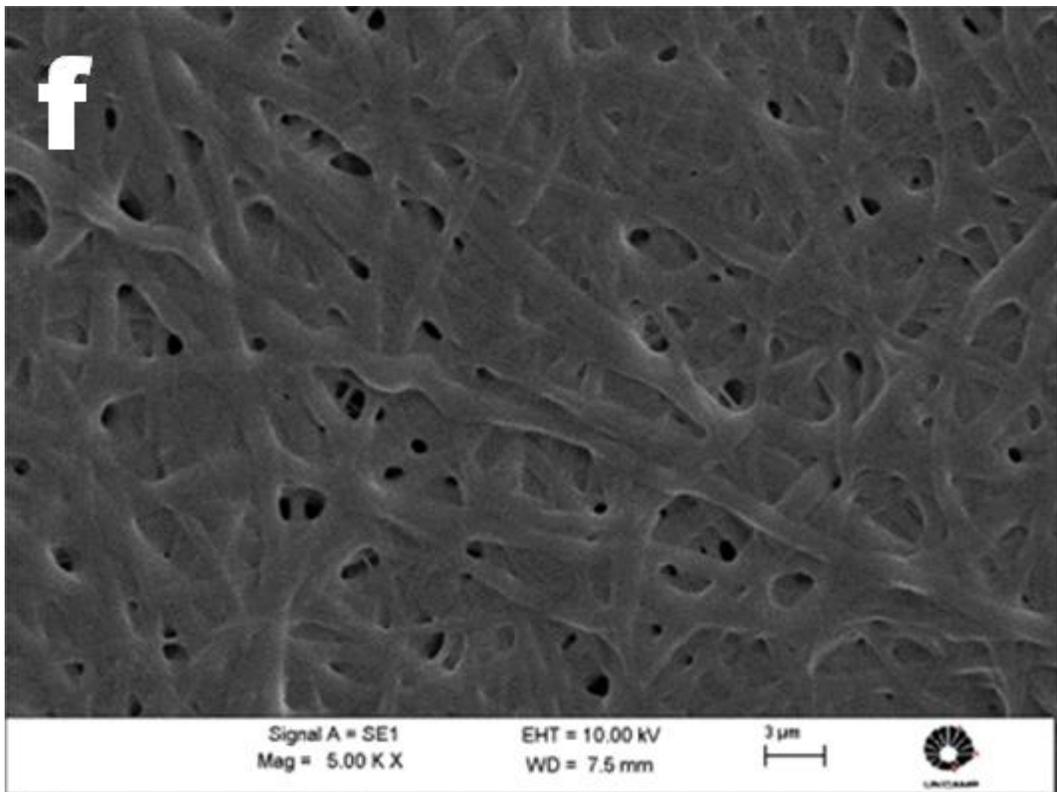
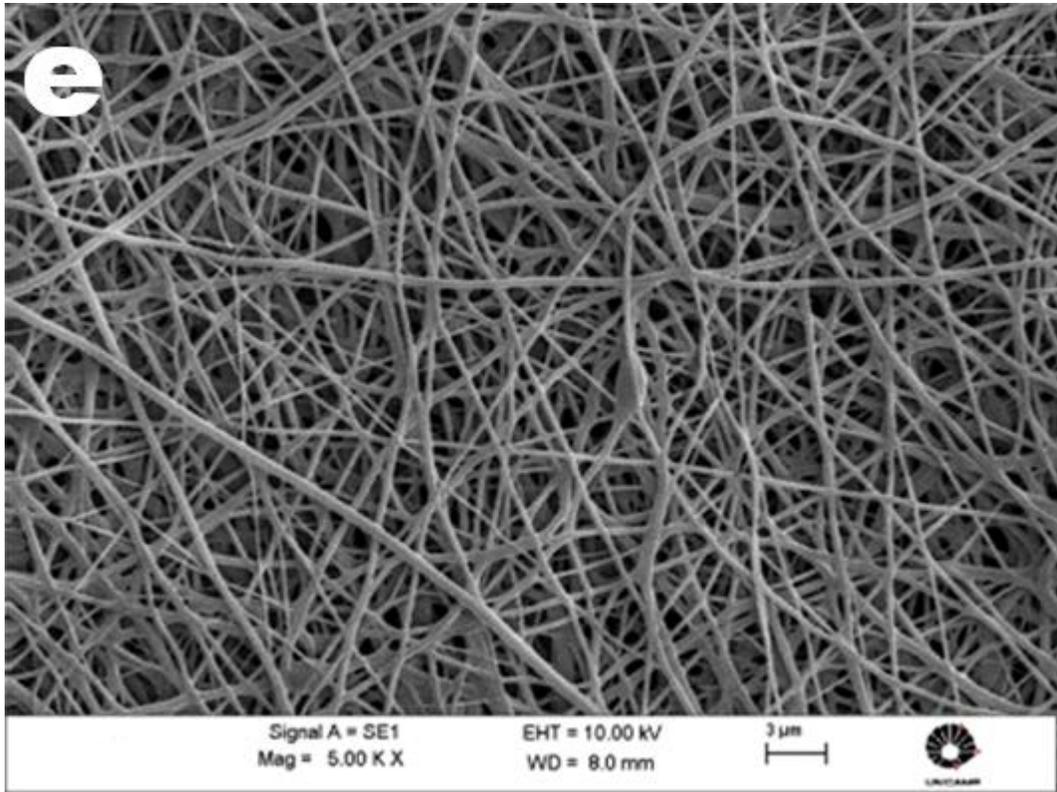


Figura 13: Curvas termogravimétricas (TGA) de degradação térmica da blenda polimérica gelatina/PVP.

A **Figura 14** apresenta as imagens de MEV das membranas de gelatina/PVP produzidas pelo processo de eletrofiação. Observa-se pela **Figura 14** a formação de fibras uniformes utilizando os parâmetros estabelecidos nas soluções 4 (d), 5 (e) e 7 (g). Conforme observação das imagens a, b e c nestas amostras houve a formação de fibras em algumas regiões, porém não apresentaram homogeneidade de fibras interconectadas em toda a área analisada e observou-se a presença de defeitos nas mesmas. Curiosamente na amostra f houve um indício de formação de fibra, mas podemos observar que não ocorreu a total evaporação do solvente o que causou a dissolução das fibras no coletor.







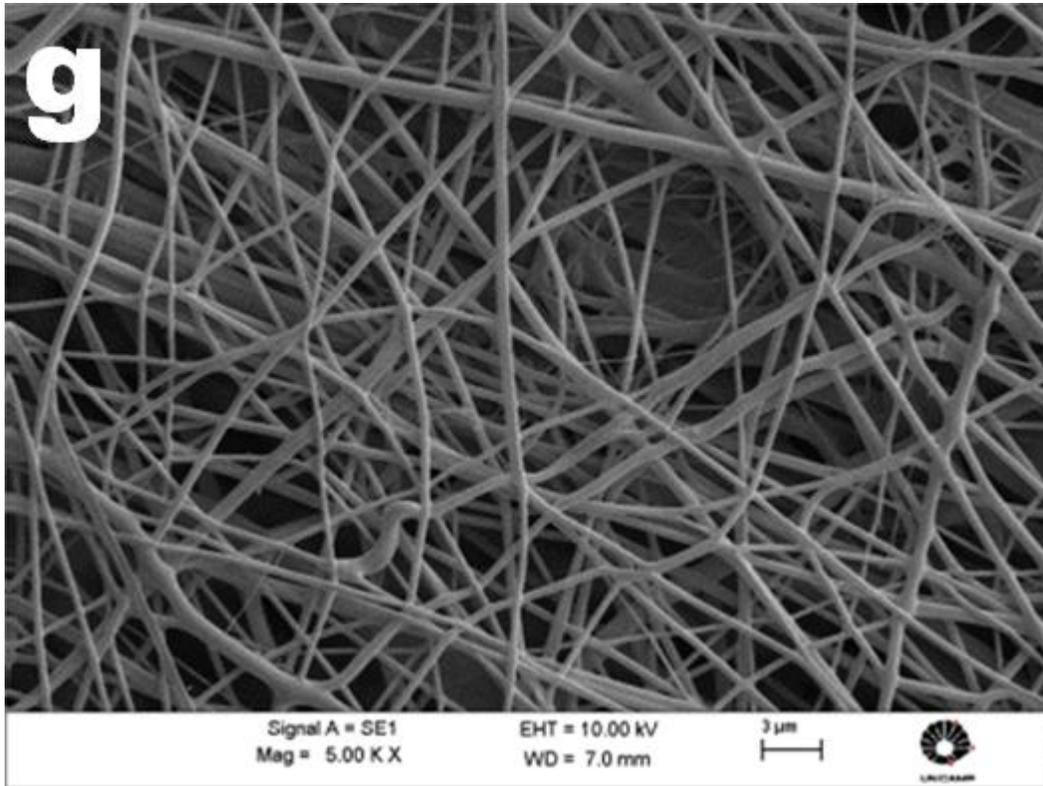
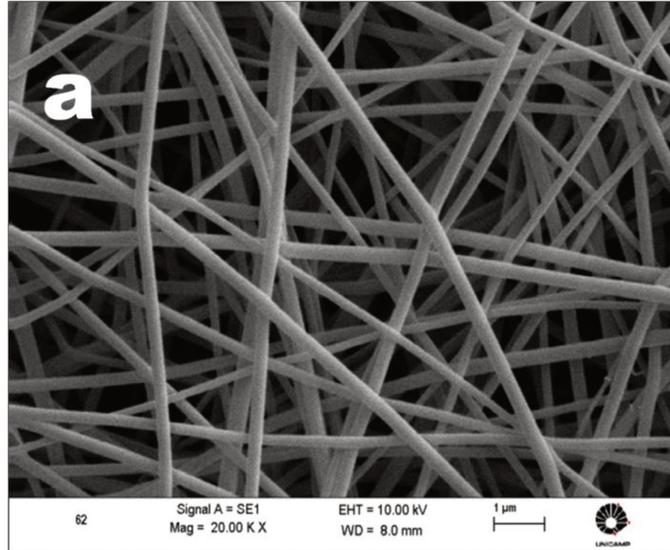
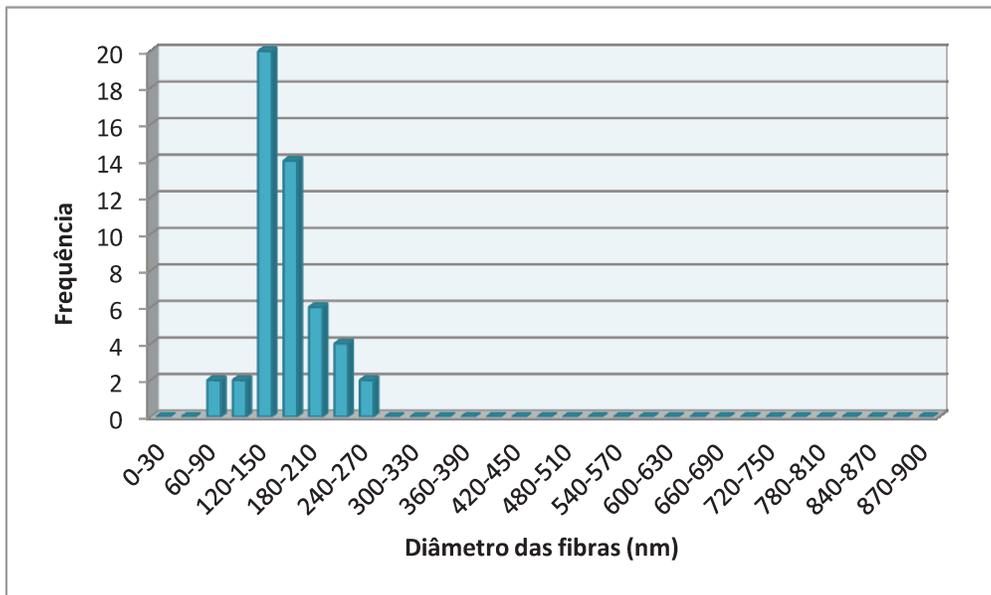


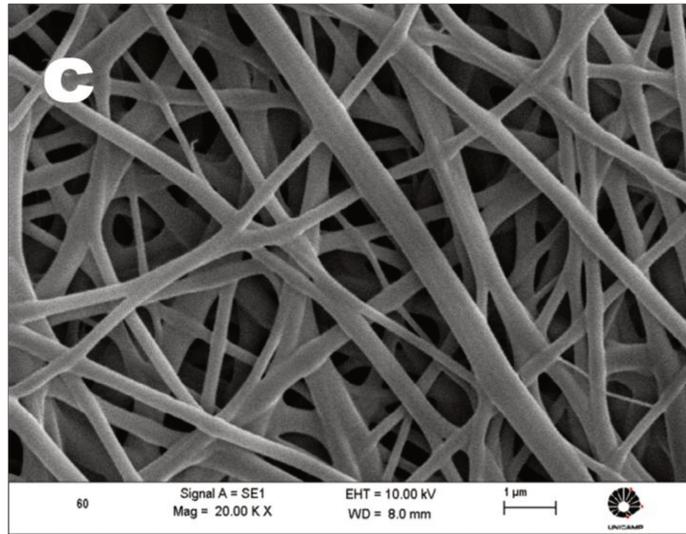
Figura 14: Micrografia e Morfologia dos diâmetros das fibras de Gelatina/PVP eletrofiadas, com aumento de 5000 vezes. Com diferentes concentrações de ácido acético em (%) de peso: (a) Solução 1 (9,3), (b) Solução 2 (18,6), (c) Solução 3 (27,8), (d) Solução 4 (37,0), (e) Solução 5 (46,3), Solução 6 (55,5), Solução 7 (64,8%).

A **Figura 15** apresenta imagens de MEV e dos respectivos histogramas de distribuição dos diâmetros das fibras das membranas de gelatina/PVP fibras obtidas a partir das soluções 4, 5 e 7.

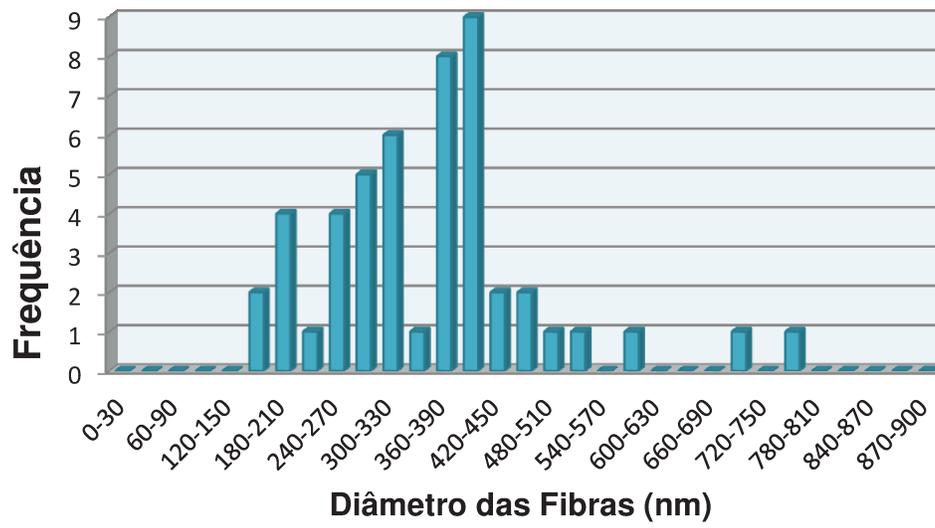


b





d



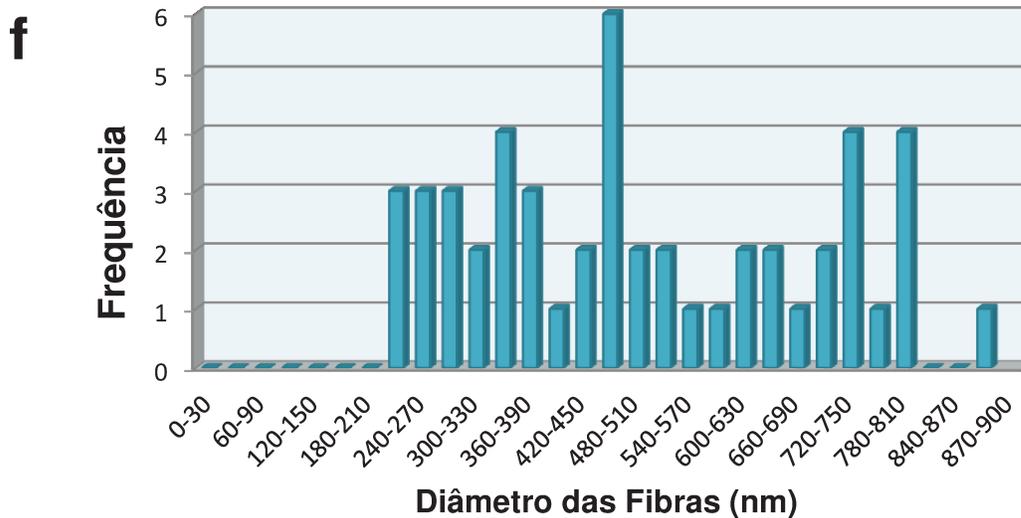
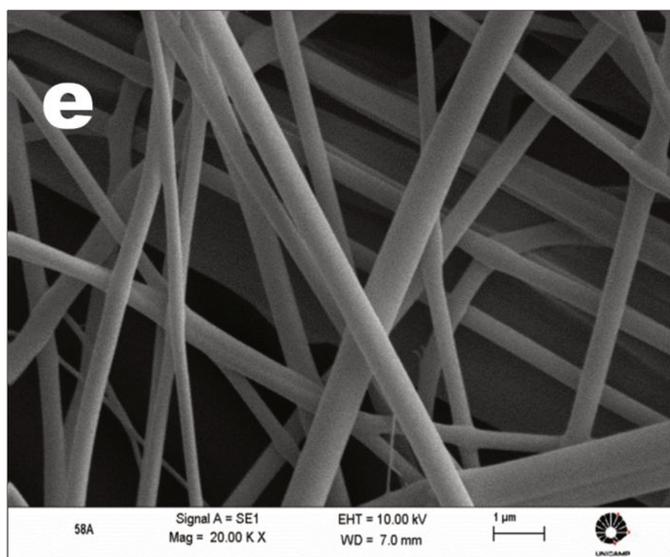


Figura 15: Micrografia, Morfologia (com aumento de 20000 vezes) e Histograma dos diâmetros das fibras de Gelatina/PVP eletrofiadas. Com diferentes concentrações de ácido acético em (%) de peso: (a-b) Solução 4 (37,0), (c-d) Solução 6 (46,3), (e-f) Solução 7 (64,8%).

Pode-se observar a formação de fibras uniformes, livres de defeitos e uma diminuição do diâmetro médio com a diminuição da concentração de ácido acético pelas imagens a, c e e. Os histogramas mostraram a frequência dos diâmetros das fibras obtidos a partir da variação da concentração de ácido acético. Pode-se observar que na figura b (solução 4) os diâmetros das fibras apresentam pico no intervalo de 120-150 nm, a figura d (solução 5) a distribuição dos diâmetros ficaram concentrados nos intervalo de 360-390 e 420-450nm e na figura f (solução 7) ocorreu um pico no diâmetro no intervalo de 480-510nm, assim observa-se que a distribuição do diâmetro das fibras a 37% de ácido acético foi significativamente menor, ver **Tabela 2**.

A **Tabela 2** mostra os valores das propriedades das soluções e dos diâmetros médios das fibras de gelatina/PVP obtidas por eletrofiação

Tabela 2: Propriedades das soluções e diâmetros médios das fibras obtidas por eletrofiação.

Número	pH	γ (mN/m)	k (μ S/cm)	η_0 (Pa.s)	Diâmetro Médio (nm)*
1	3,30	40,24	2001,9	0,229	-
2	2,98	38,88	1839,4	0,162	-
3	2,78	33,56	1661,2	0,103	-
4	2,54	38,04	1409,2	0,115	154 (38)
5	2,33	33,43	1138,5	0,169	355 (121)
6	2,04	30,53	916,1	0,104	-
7	1,89	33,25	658,1	0,125	519 (192)

*O valor entre parênteses corresponde ao desvio padrão.

Sabe-se que a tensão superficial elevada de uma solução inibe o processo de eletrofiação de modo que resulta da instabilidade dos jatos a geração de gotículas pulverizadas formando fibras com defeitos (Han *et al*, 2008). No entanto, pode se observar que foram obtidas fibras para valores elevados de tensão superficial (solução 4). Assim, pode-se concluir que a tensão superficial dentro da faixa de valores obtidos não foi o fator determinante para a formação de fibras.

Nas **Figura 10** e **Figura 11** e **Tabela 2** pode-se observar que a viscosidade depende da concentração água/ácido acético. Observa-se que os valores obtidos de η_0 estão dentro de uma faixa de variação próxima. Estudos indicam que a viscosidade com valores maiores frequentemente dão origem a fibras com diâmetros maiores e mais uniformes, pois as cadeias poliméricas estão mais emaranhadas dificultando o estiramento do jato (Ramakrishna *et al*, 2005, Kulkarni *et al*, 2010). Porém, observa-se na **Tabela 2**, que a solução 7 que possui viscosidade menor resultou, em fibras com diâmetros maiores em comparação com a solução 5 que apresenta valores de viscosidade maior e diâmetros de fibras menores. Portanto, os resultados indicam que a viscosidade não foi o parâmetro significativo para a formação, morfologia e diâmetros médios das fibras obtidas.

A condutividade elétrica é uma propriedade relacionada com o pH da solução (ver seção 2.6.2.3) e esta foi alterada em função da concentração de ácido acético. Na **Tabela 2** verificou-se que com o aumento da condutividade elétrica houve uma diminuição do diâmetro médio das fibras, porém para valores de condutividade elétrica acima de 1661, 2 $\mu\text{S}/\text{cm}$ as fibras obtidas não ficaram uniformes e apresentaram muitos defeitos. Assim, existe um limite para o aumento da condutividade elétrica para obtenção de fibras uniformes, pois ultrapassando este limite pode ocorrer a quebra do jato, devido uma maior mobilidade dos íons livres em solução e a geometria característica do cone de Taylor também é afetada causando instabilidade nos jatos durante o processo de eletrofiação.

A partir dos resultados descritos acima, observou se que a tensão superficial e viscosidade não foram fatores determinantes na obtenção de fibras uniformes de gelatina/PVP. Portanto, as análises revelaram que a diferença na condutividade elétrica das soluções de gelatina/PVP controlada pela concentração de água/ácido acético possui um efeito significativo e decisivo sobre a formação, morfologia e o diâmetro das fibras ver **Figura 14** e **Figura 15**

A **Figura 16 a** revela o aspecto macroscópico da membrana de gelatina/PVP durante o processo de eletrofiação e a **Figura 16 b** mostra a aparência macroscopicamente da membrana obtida após o processo de eletrofiação. Observa-se uma membrana de largura x comprimento de

aproximadamente 3,5 x 3,5 cm, espessura de aproximadamente 3 mm, cor branca e formato irregular.

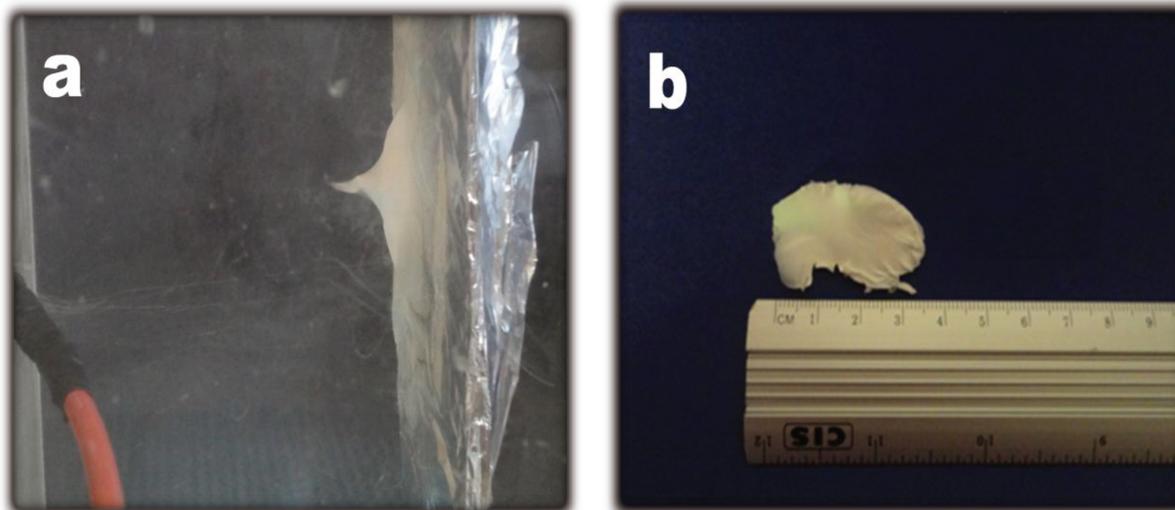


Figura 16: Aspecto macroscópico das membranas. a) Durante o processo de eletrospiação. b) Após o processo de eletrospiação

Os ensaios *in vitro* dentre eles citotoxicidade, são efetuados como um teste inicial na primeira fase da avaliação da biocompatibilidade de materiais visando futuras aplicações em engenharia tecidual. A citotoxicidade é uma técnica *in vitro* que pode ser medida quantitativamente pela lise das células (morte celular), inibição de crescimento celular, e outros efeitos causados nas células pelos dispositivos, materiais e/ou seus extratos (Rogerio *et al*, 2003)

Na **Figura 17a** nota-se que a monocamada de células utilizado como controle citotóxico atingiu a confluência no período do teste, com células bastante espalhadas, citoplasma basófilo, e núcleo contendo de 1 a 3 nucléolos. Na **Figura 17b** observamos que a solução de fenol se mostrou citotóxica, e nesta condição as células se apresentaram pouco aderidas à placa de cultura, com vários prolongamentos, e núcleo bastante denso, não sendo possível identificar os nucléolos. Foram observados debris na solução de cultura e células em processo de degeneração. As análises

da morfologia celular dos controles para o teste de citotoxicidade permitiram observar o padrão de crescimento das células Vero, típico de células fibroblásticas.

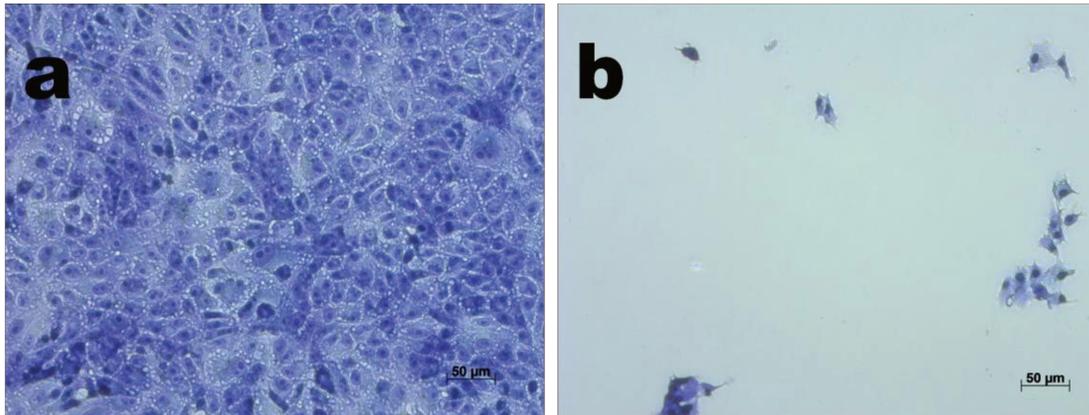


Figura 17: Teste de citotoxicidade, controles. a). Controle não citotóxico, monocamada confluyente de células. b) Controle citotóxico, poucas células presentes, com núcleo bastante denso, prolongamentos celulares e presença de debris. Células coradas com azul de toluidina, aumento 200 x.

Na **Figura 18a** e **Figura 18c** as células cultivadas na condição de citotoxicidade indireta apresentaram o padrão de crescimento esperado para as células Vero, e condizente com o controle não citotóxico. As células apresentaram-se bastante espalhadas, formando uma monocamada confluyente, com aspecto fibroblástico, núcleo bem delimitado e a identificação dos nucléolos, entre 1 a 3 por núcleo. Não foram observados debris celulares ou degeneração celular expressiva. Na **Figura 18b** e **Figura 18d** o mesmo resultado pode ser observado no teste de cultura celular em contato direto com o biomaterial gelatina/PVP. As células presentes na placa de cultura, e mesmo nas áreas de contato direto com o biomaterial, mantiveram o padrão fibroblástico típico, sem sinais expressivos de degeneração e morte celular (Malmonge *et al*, 1999, Senne *et al* 2008).

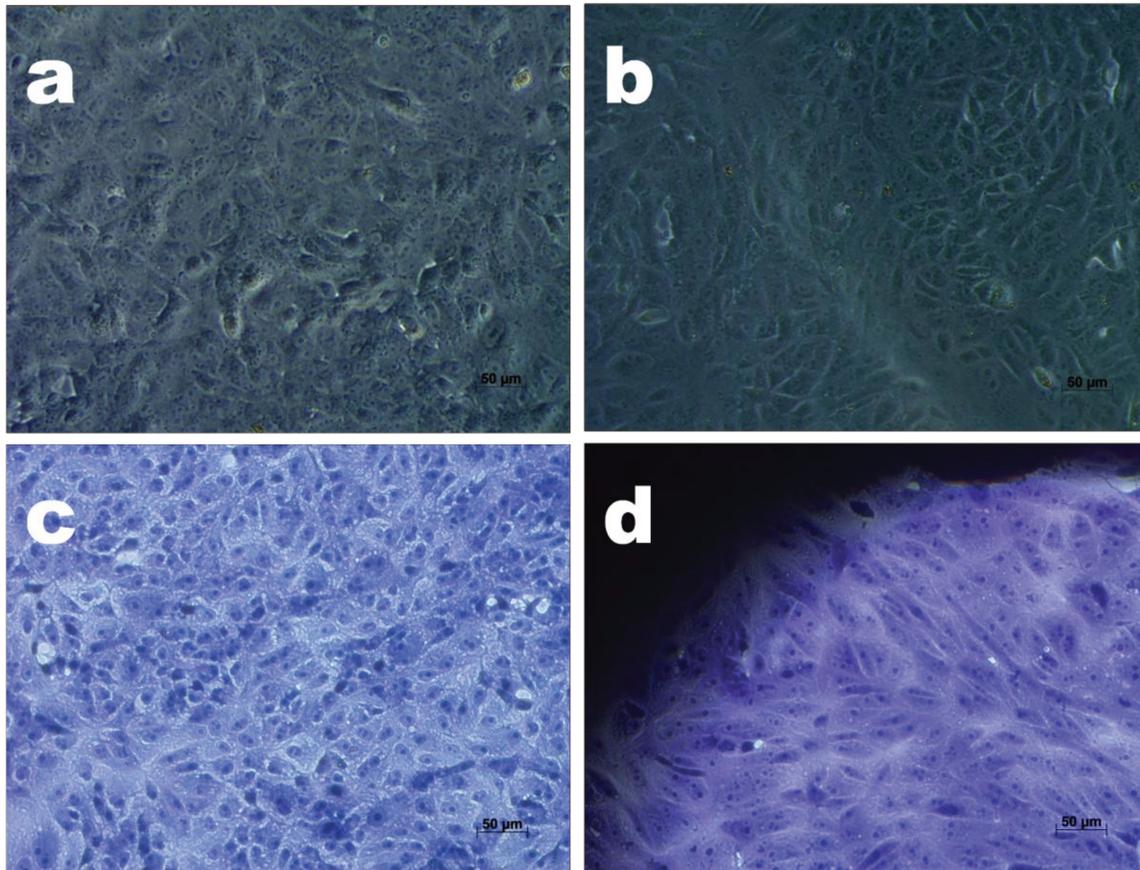


Figura 18: Teste de citotoxicidade, biomaterial. a) Citotoxicidade indireta, contraste de fase; b) Contato direto das células com o biomaterial, contraste de fase. c) Citotoxicidade indireta, células coradas com azul de toluidina; d) Contato direto das células com o biomaterial, células coradas com azul de toluidina. Pode ser observada a monocamada de células bastante espalhadas, com morfologia típica de fibroblastos, mesmo no limite de contato com o biomaterial gelatina/PVP. Aumento: 200 x.

O crescimento das células Vero em monocamada confluyente, com morfologia tipicamente fibroblástica, e semelhante ao controle não citotóxico, permite concluir pela não citotoxicidade do biomaterial gelatina/PVP (Malmonge *et al*, 1999, Senne *et al* 2008). O padrão de crescimento citotóxico, com poucas células, apresentando prolongamentos, núcleo denso, debris em solução e sinais de degeneração celular, não foi observado nas amostras de citotoxicidade indireta do

biomaterial gelatina/PVP. Os resultados obtidos com o cultivo de células diretamente em contato com o biomaterial comprovaram as observações da citotoxicidade indireta. Foi possível observar a monocamada confluyente mesmo na superfície de contato direto com o biomaterial, com células tipicamente fibroblásticas. Estes resultados permitem orientar ensaios futuros do estudo de interação celular com o biomaterial.

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi investigado o efeito da concentração de ácido acético na eletrofição de blendas de gelatina/PVP a partir de soluções aquosas contendo ácido acético. A partir dos resultados obtidos, foi possível constatar que, dentro da faixa estudada, concentrações menores de ácido acético promoveram a formação de fibras com menores diâmetros. Portanto, a presença de ácido acético tem um efeito significativo sobre a morfologia e o diâmetro médio das nanofibras obtidas.

Os parâmetros da solução como tensão superficial e viscosidade não foram fatores determinantes na obtenção de fibras uniformes de gelatina/PVP. A condutividade elétrica foi o parâmetro decisivo sobre a formação, morfologia e o diâmetro das fibras.

De acordo com o esperado, observou-se que soluções com uma condutividade elétrica mais alta produziu fibras com diâmetros menores. As nanofibras exibiram morfologia cilíndrica e foram aleatoriamente distribuídas em uma esteira fibrosa, apresentando estruturas uniformes.

Nas análises termogravimétricas das blendas poliméricas de gelatina/PVP, observou-se que a estabilidade térmica melhorada da gelatina é atribuída à interação entre gelatina/PVP, conduzindo assim a maior resistência ao calor da blenda polimérica resultante, em comparação com a gelatina pura.

Os resultados obtidos para os ensaios de citotoxicidade observou-se que o biomaterial gelatina/PVP apresentou o padrão de crescimento esperado para as células Vero, sem sinais expressivos de degeneração e morte celular, condizente com o padrão não citotóxico.

Concluiu-se que a melhor membrana obtida é a número 4, visando futuras aplicações em engenharia tecidual.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Associação Brasileira de Normas Técnicas. ABNT NBR 15245. *Produtos para saúde - Validação e controle de rotina de esterilização por óxido de etileno*. 2005. 32p

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

Cameron; L. C., Machado, M. *Tópicos Avançados em Bioquímica do Exercício*. Editora: Shape. Data de Publicação, Março – 2004.

Castner DG, Ratner, BD. *Biomedical surface science: foundations to frontiers*. *Surface Science*, 2002;500: 28-60.

Chen,Q., Liang,S., Thouas, G.A. *Elastomeric biomaterials for tissue engineering*. *Progress in Polymer Science* – 2012.

Cheow, C.S., Norizah , M.S., Kyaw, Z.Y., Howell, N.K. *Preparation and characterisation of gelatins from the skins of sin croaker (Johnius dussumieri) and shortfin scad (Decapterus macrosoma)*. *Food Chemistry* 101 (2007) 386–391

Chew,S.Y., Y Wen,Y., Y Dzenis,Y; KW Leong,KW. *The Role of Electrospinning in the Emerging Field of Nanomedicine*. *Curr Pharm Des*. 2006 ; 12(36): 4751–4770.

Chronakis, I.S. *Novel nanocomposites and nanoceramics based on polymer nanofibers using electrospinning process—A review*. *Journal of Materials Processing Technology* 167 (2005) 283–293.

Diarmid, A.M., Jones, W., Norris, I., Gao, J., Johnson, A., Pinto, N., Hone, J., Han, B., Ko, F., Okuzaki, H., Llaguno, M. *Electrostatically-generated nanofibers of electronic polymers*. Synthetic Metals, vol. 119, 2001, pp. 27-30.

Estaca, G.J., Montero, P., Fernández-Martín, F.F., Gómez-Guillén, M.C. *Physico-chemical and film-forming properties of bovine-hide and tuna-skin gelatin: A comparative study*. Journal of Food Engineering 90 (2009) 480–486.

Franco, P.Q., Silva, J.C., Borges, J.P. *Produção de fibras de hidroxiapatite por electrofiação*. Ciência & Tecnologia dos Materiais, Vol. 22, n.º 1/2, 2010.

Franz, S., Rammelt, S., Scharnweber, D., Simon, J.C. *Immune responses to implants e A review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials*. Biomaterials 32 (2011) 6692-6709.

Fong, H., Chun, I., Reneker, D.H. *Beaded nanofibers formed during electrospinning*. Polymer 40 (1999) 4585–4592.

Garg, K., Bowlin, G.L. *Electrospinning jets and nanofibrous structures*. Biomicrofluidics. September, 2011, 013403-1.

Gasaymeh, S.S., Radiman, S., Heng, L.Y., Saion, E., Saeed, G.H.M. *Synthesis and Characterization of Silver/Polyvinilpirrolidone (Ag/PVP) Nanoparticles Using Gamma Irradiation Techniques*. African Physical Review (2010) 4:0006.

Geng, X., Kwon, O.H., Jang, J. *Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution*. Biomaterials 26 (2005) 5427–5432.

Gómez-Guillén, M.C., Giménez, B., López-Caballero, M.E, Montero, M.P. *Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review*. Food Hydrocolloids 25 (2011) 1813-1827.

Gu, S.Y., Wang, Z.M., Ren, J., Zhang, C.Y. *Electrospinning of gelatin and gelatin/poly(L-lactide) blend and its characteristics for wound dressing*. Materials Science and Engineering C 29 (2009) 1822–1828.

Guerreiro, L.M.R., Meneguelli, F.C. *Influência do tratamento térmico e da acidez no comportamento reológico de amidos nativos funcionais de milho cerosos orgânicos comerciais*. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 29(2): 412-419, abr.-jun. 2009.

Hassouna, F., Therias, S., Mailhot, G., Gardette, J.L. *Photooxidation of poly(N-vinylpyrrolidone) (PVP) in the solid state and in aqueous solution*. Polymer Degradation and Stability 94 (2009) 2257–2266.

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

Huang, Z-M; Zhang, Y-Z; Kotaki, M; Ramakrishna, S. Review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. Composites Science and Technology 63 (2003) 2223–2253.

Huang, Z.M., Zhang, Y.Z., Ramakrishna, S., Lim, C.T. *Electrospinning and mechanical characterization of gelatin nanofibers*. Polymer 45 (2004) 5361–5368.

International Standards Organization. ISO 10993-5. *Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*. 2009. p.34.

Karavas, E., Georgarakis, E., Bikiaris, D. *Application of PVP/HPMC miscible blends with enhanced mucoadhesive properties for adjusting drug release in predictable pulsatile chronotherapeutics*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 64 (2006) 115–126.

Kejing,A., Haiying,L., Shidong,G., Kumar, D.N.T. , Qingqing, W. *Preparation of fish gelatin and fish gelatin/poly(l-lactide) nanofibers by electrospinning*. International Journal of Biological Macromolecules 47 (2010) 380–388.

Kulkarni A., Bambole V.A., Mahanwar P.A. *Electrospinning of Polymers, Their Modeling and Applications*. Polymer-Plastics Technology and Engineering, 49: 427–441, 2010.

Li, M.J. Mondrinos, M.R. Gandhi, F.K. Ko, A.S. Weiss, P.I. Lelkes, *Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering*. Biomaterials 26 (2005) 5999–6008.

Lu, J.W., Zhu, Y.L., Guo, Z.X., Hu, P., Yu, J. *Electrospinning of sodium alginate with poly(ethylene oxide)*. Polymer 47 (2006) 8026e8031.

Malmonge, S.M., Zavaglia, C.A.C., Santos Jr, A.R., Wada, M.LF. *Avaliação da citotoxicidade de hidrogéis de polihema: um estudo in vitro*. Revista Brasileira de Engenharia Biomédica, v. 15, n. 1-2, p. 49-54, jan/ago 1999.

Mattos, R.I. *Estudo de condutores protônicos a base de macromoléculas naturais*. São Carlos: USP, 2011. 183 p. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Ciências e Engenharia de Materiais. São Carlos, 2011.

Megelski,S., Stephens,J.S., Chase, D.B., Rabolt,J.F. *Micro and Nanostructured Surface Morphology on Electrospun Polymer Fibers*. Polymer, 2002, pp. 8456-8466.

Moore, W.J. *Físico-Química*. Volume 2 - Tradução da 4ª Edição Americana. Ano de Publicação: 1976.

Nair,L.S., Laurencin, C.T. *Biodegradable polymers as biomaterials*. Prog. Polym. Sci. 32 (2007) 762–798

Panzavolta,S., Gioffrè,M.,Focarete,L.M., Gualandi, C.,Laura Foroni,L., Bigi, A. *Electrospun gelatin nanofibers: Optimization of genipin cross-linking to preserve fiber morphology after exposure to water*. Acta Biomaterialia 7 (2011) 1702–1709.

Parker, N.G., Povey, M.J.W. *Ultrasonic study of the gelation of gelatin: Phase diagram, hysteresis and kinetics*. Food Hydrocolloids 26 (2012) 99 e107.

Poppe, J. Gelatin. In: Imeson, A. *Thickening and gelling agents for food*. 2edição. London: Blackie Academics & Professional. 1997, Cap. 7, p.144-167.

Porto, L.C. *Filmes formados por gelatina e poli(acrilamida-co-ácido acrílico): efeito da composição, do plastificante e agente reticulante nas propriedades térmicas, mecânicas e absorção de água*. Florianópolis: UFSC, 2007. 81 p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 15 de fevereiro de 2007.

Ramakrishna, S., Fujihara, K., Teo, W., Lim, Ma, Z. *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers*. World Scientific, Singapore, 2005.

Reis, C. *Avaliação da capacidade emulsificante de gelatina acilada*. Campinas: UNICAMP, 2003. 128 p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 16 de Junho de 2003

Rigo, ECS, Oliveira LC, Santos LA, Carrodegua RG, Boschi AO. *Implantes Metálicos Recobertos com Hidroxiapatita*. Revista Brasileira de Engenharia Biomédica, 1999;15(1-2): 21-29.

Rogero, S. O.; Lugão, A.B.; Ikeda, T.I.; Cruz, A.S. Teste “in vitro” de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. Mat Research, v. 6, n. 3, p.317-320, jan. 2003.

Russell, J.B. Química Geral. Segunda Edição. Volume 2. Editora Makron Books. 1994.

Santos Junior E. *Anodização de titânio comercialmente puro para aplicações biomédicas* Tese (Doutorado). Rio de Janeiro : Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2005.

Schrieber, R., Gareis, H. *Gelatine Handbook: Theory and Industrial Practice*. Weinheim: Wiley-vch, 334 p, 2007.

Sebio, L. *Desenvolvimento de plástico biodegradável a base de amido de milho e gelatina pelo processo de extrusão: avaliação das propriedades mecânicas, térmicas e de barreira*. Campinas: UNICAMP, 2003. 158 p. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas. Campinas, Agosto de 2003

Sell, S.A., McClure, M.J., Garg, K., Wolfe, P.S., Bowlin, G.L. *Electrospinning of collagen/biopolymers for regenerative medicine and cardiovascular tissue engineering*. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61 (2009) 1007–1019.

Senne, M.I., Lemos, N., Fidel, S.R., Fidel, R.A.S. Avaliação da citotoxicidade dos três cimentos endodônticos empregados na obturação do sistema de canais radiculares. *Revista Sul Brasileira de Odontologia*. V. 6, n. 1, 2009.

Sepúlveda P, Pandolfelli VC, Rogero SO. *Hidroxiapatita porosa produzida através do processo gel casting de espumas visando aplicações biomédicas*. *Cerâmicas*, 1999; 45:1-12.

Sill, T.J., Recum, H. A. *Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering*. *Biomaterials* 29 (2008) 1989-2006.

Simone, S., Figoli, A., Criscuoli, A., Carnevale, M.C., Rosselli, A., Drioli, E. *Preparation of hollow fibre membranes from PVDF/PVP blends and their application in VMD*. *Journal of Membrane Science* 364 (2010) 219–232.

Sionkowska, A. *Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review*. *Progress in Polymer Science* 36 (2011) 1254–1276.

Sionkowska ,A., Wisniewski, M., Kaczmarek, H., Skopinska, J., Chevallier ,P., Mantovani , D., Lazare, S., Tokarev, V. *The influence of UV irradiation on surface composition of collagen/PVP blended films*. Applied Surface Science 253 (2006) 1970–1977.

Sionkowska, A., Kozłowska, J., Płancka, A., Wis'niewska, J.S. *Collagen fibrils in UV irradiated poly(vinyl pyrrolidone) films*. Applied Surface Science 255 (2008) 2030–2039.

Song,J.H., Kim,H.E., Kim, H.W. *Production of electrospun gelatin nanofiber by water-based co-solvent approach*. J Mater Sci: Mater Med (2008) 19:95–102.

Son, W.K., Youk, J.H., Lee, T.S., Park, W.H. *Effect of pH on electrospinning of poly(vinyl alcohol)*. Materials Letters 59 (2005) 1571–1575.

Schueren, L.V., Mollet, T., Ceylan, Ö., Clerck, K.D. *The development of polyamide 6.6 nanofibres with a pH-sensitive function by electrospinning*. European Polymer Journal 46 (2010) 2229–2239.

Thompson , C.J., Chase, G.G., A.L. Yarin, A.L., Reneker, D.H. *Effects of parameters on nanofiber diameter determined from electrospinning model*. Polymer 48 (2007) 6913-6922.

Uyar, T., Besenbacher, F. *Electrospinning of uniform polystyrene fibers: The effect of solvent conductivity*. Polymer 49 (2008) 5336–5343.

Vallet-Regí M. *Introduction to the world of biomaterials*. Anales de Quimica, 1997; 93: S6-S14.

Vieira, D.F., Avellaneda, C.O., Pawlicka, A. *Conductivity study of a gelatin-based polymer electrolyte*. Electrochimica Acta 53 (2007) 1404–1408

Xu, F., Cui, F.Z., Jiao, Y.P., Meng, Q.Y., Wang, X.P., Cui, X.Y. *Improvement of cytocompatibility of electrospinning PLLA microfibers by blending PVP*. *J Mater Sci: Mater Med* (2009) 20:1331–1338.

Yamazaki, C.M., Kadoya, Y., Hozumi, K., Okano-Kosugi, H., Asada, S., K., Kitagawa, K., M. Nomizu, M., Koide, T. *A collagen-mimetic triple helical supramolecule that evokes integrin-dependent cell responses*. *Biomaterials* 31 (2010) 1925–1934.

Yang, D., Li, Y., Nie, J. *Preparation of gelatin/PVA nanofibers and their potential application in controlled release of drugs*. *Carbohydrate Polymers* 69 (2007) 538–543.

Willians, DF. *Definition in biomaterials in proceedings of a consensus conference of European society for biomaterials, Cherter, England, 1986.*

Zhang, P.Y., Wang, Y.L., Xu, Z.L., Yang, H. *Preparation of poly (vinyl butyral) hollow fiber ultrafiltration membrane via wet-spinning method using PVP as additive*. *Desalination* 278 (2011) 186–193.

Zillmer, T.A., Varella, R.F., Rossete, A.N. *Avaliação de algumas características físico-químicas da água do Ribeirão Salgadinho, Nova Xavantina-MT*. *HOLOS Environment*, v.7, n.2, 2007 – 123.