

ESCOLA POLITÉCNICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA METALÚRGICA E DE MATERIAIS

BIANCA BEATRIZ BASSO

**Fabricação de membranas a base de policaprolactona por eletrofiação para
medicina regenerativa**

São Paulo
2020

BIANCA BEATRIZ BASSO

**Fabricação de membranas a base de policaprolactona por eletrofiação para
medicina regenerativa**

Monografia apresentada ao Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo para obtenção do título de bacharel em Engenharia de Materiais.

Orientadores:

Prof.^a Dr.^a Elizabeth Grillo Fernandes
Prof.^a Dr.^a Maria Ascensão F. S. Lopes
Prof.^a Dr.^a Maria Helena F. V. Fernandes

São Paulo
2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação-na-publicação

Basso, Bianca Beatriz

Fabricação de membranas a base de policaprolactona por eletrofiação para medicina regenerativa / B. B. Basso -- São Paulo, 2020.
99 p.

Trabalho de Formatura - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais.

1.eletrofiação 2.policaprolactona 3.medicina regenerativa I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais II.t.

Nome: BASSO, Bianca Beatriz

Título: Fabricação de membranas a base de policaprolactona por eletrofiação para medicina regenerativa

Monografia apresentada ao Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo para obtenção do título de bacharel em Engenharia de Materiais.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento:

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento:

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento:

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente às minhas orientadoras Elizabeth Grillo Fernandes, Maria Ascensão Lopes e Maria Helena Fernandes e ao professor José Domingos por toda a sua atenção comigo. Todos sempre foram extremamente solícitos e me ensinaram muito neste período.

Segundo, gostaria de agradecer à Andreia por ter me ensinado a utilizar o equipamento de eletrofiação e por ter me ajudado durante todas as etapas deste trabalho. Com certeza o trabalho não ficaria pronto sem a sua ajuda.

Também queria agradecer a todos os técnicos de laboratório que me ajudaram na realização dos testes e ensaios: Martha, Tiago, Daniela e Celeste.

À Escola Politécnica da Universidade de São Paulo e à Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, obrigada por me proporcionarem um ensino de qualidade que me garantiu uma boa base para realizar este trabalho.

Agradeço a meu namorado por sempre me fazer companhia nas horas de estudos.

E por último, mas não menos importante, agradeço à minha família pelo apoio constante, mesmo com a distância física, e a todos os meus amigos que de alguma forma me ajudaram a perseverar mesmo nos momentos mais difíceis.

RESUMO

BASSO, Bianca Beatriz. **Fabricação de membranas a base de policaprolactona por eletrofiação para medicina regenerativa.** São Paulo: Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2020.

A medicina regenerativa é um campo interdisciplinar que aplica conceitos de engenharia e ciências biológicas para promover a regeneração de tecidos e órgãos lesionados. Recentemente, dentro deste contexto, o interesse na utilização da policaprolactona (PCL) como matéria-prima para dispositivos, implantes, e membranas, vem crescendo. Isso se deve às suas propriedades reológicas e viscoelásticas superiores em comparação a outros poliésteres alifáticos, o que confere maior facilidade de manufatura e manipulação do material. Neste trabalho foram produzidas membranas fibrosas em PCL por eletrofiação verde, focando na sua morfologia e propriedades mecânicas necessárias para ser utilizada na regeneração tecidual e óssea guiada (RTG e ROG, respectivamente). Foram avaliados parâmetros relativos à solução polimérica, como a sua concentração, e ao seu processamento, como distância de trabalho e velocidade de rotação do coletor, com o intuito de encontrar a formulação que apresentasse um melhor grau de alinhamento e menor diâmetro médio das fibras, sem a presença de defeitos. Estas características morfológicas contribuem para as melhorias nas propriedades mecânicas das membranas e mimetizam de forma mais eficiente a matriz extracelular. Encontrados os parâmetros de melhor desempenho, foram produzidas mais duas membranas para verificar a reprodutibilidade da técnica, caracterizá-las e, finalmente, avaliar se atingiu a finalidade pretendida. Os valores dos parâmetros da solução e da eletrofiação que conduziram aos melhores resultados foram: velocidade de rotação de 2000 rpm, distância de trabalho de 18 cm e concentração polimérica de 14% m/V. Apesar dos diâmetros das fibras estarem dentro dos valores pretendidos, e o seu alinhamento ser satisfatório, as membranas produzidas apresentaram valores de porosidade muito elevados. A sua caracterização mecânica indicou valores de tensão de ruptura adequados à sua aplicação como membrana de barreira para RTG e ROG. No entanto, o módulo de Young apresenta valores inferiores àquelas comerciais reabsorvíveis.

Palavras-chave: Medicina Regenerativa. Policaprolactona. Membranas. Nanofibras. Eletrofiação.

ABSTRACT

BASSO, Bianca Beatriz. **Fabricação de membranas a base de policaprolactona por eletrofiação para medicina regenerativa.** São Paulo: Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2020.

The regenerative medicine is an interdisciplinary field that applies engineering and biological science concepts to promote the regeneration of injured tissues and organs. Recently, in this context, the interest in using polycaprolactone (PCL) as raw material to dispositive, implants and membranes is growing, due to its superior rheological and viscoelastic properties in comparison with others aliphatic polyesters, which offers more facility to manufacture and manipulate the material. In this thesis PCL, fibrous membranes were produced by green electrospinning, focusing on get the right morphology and mechanical properties to be used as a barrier membrane for guided tissue and bone regeneration (GTR and GBR, respectively). Solution and processing parameters, such as polymer concentration, work distance and rotation speed, were varied with the purpose of finding the formulation that presents the best alignment level and smallest average fibers diameter, with a lack of defects. Those morphologic characteristics promote best mechanical properties of the membranes and mimic in a more efficient way the extracellular matrix. After finding the most appropriate parameters, two more membranes were produced to evaluate the technique reproducibility, to do a characterization of the nanofibers and, finally, to evaluate if they are suitable for the intended aim. The values of the electrospinning parameters that conducted to the best results were: rotation speed of 2000 rpm, work distance of 18 cm and PCL concentration of 14% m/V. The average fiber diameter and the alignment of the two membranes produced with the optimized parameters were identical, both of them showed a desirable value for the rupture strength, but their porosity was too high and the Young's Modulus was lower than the ones from the membranes on the market.

Keywords: Regenerative Medicine. Membranes. Nanofibers. Polycaprolactone. Electrospinning.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Evolução do processo inflamatório conforme a capacidade de proliferação das células.	23
Figura 2 - Membrana de RTG é posicionada sob o defeito periodontal, de forma a separar tecidos gengivais e epitélio da área afetada, possibilitando a regeneração dos tecidos.	25
Figura 3 - Representação do equipamento de eletrofiação em posição: a) Vertical, b) Horizontal.	33
Figura 4 - Representação das três fases geométricas do fluido polimérico durante processo de eletrofiação: Cone de Taylor, jato contínuo e região de instabilidade...34	
Figura 5 - Montagens de coletores alternativas para eletrofiação: a) cilindro rotativo, b) elétrodos paralelos, c) coletor de rotação constituído por cilindro de fios, d) lâminas em linha, e) conjunto de contra elétrodos, f) anéis em paralelo, g) cilindro com fio enrolado sobre a superfície, h) disco, i) tubo rotativo com elétrodos tipo “facas”, j) fios fibrosos em banho de água e k) múltiplos capilares.	35
Figura 6 - Imagens retiradas no MEV da morfologia das fibras eletrofiadas de PEO com contas em função da viscosidade da solução.	42
Figura 7 – Equipamento de eletrofiação.....	47
Figura 8 - Arame de cobre enrolado ao redor do cilindro coletor.	48
Figura 9 – Montagem do coletor e modificações adotadas por Gobheira et al. em seu experimento.....	49
Figura 10 - Papel celofane com tiras de folha fina de alumínio colocado sobre o coletor, como tentativa de aumentar o grau de alinhamento das fibras.	50

Figura 11 - Equipamento MMT-101N, da Shimadzu, para ensaios mecânicos com micro materiais	54
Figura 12 - Membrana de PCL sendo submetidas ao ensaio de tração, antes e após o início da sua ruptura.....	55
Figura 13 - Representação de Curva Tensão x Deformação de um material.	55
Figura 14 - Espectro FTIR obtido para os grânulos de PCL na região de 500-4000 cm-1.	58
Figura 15 - Curva de DSC do grânulo de PCL após aquecimento até 120 °C e posterior resfriamento.	60
Figura 16 - Imagens tiradas no MEV de: a) Amostra 10 (49% de umidade); b) Amostra 9 (58% de umidade). Com aumentos de 1.000x e 6.000x.	63
Figura 17 - Presença de contas observada na amostra 10. Imagem tirada no MEV com aumento de 1.000x.	64
Figura 18 - Nanofibras coalescidas na amostra 14 devido a à alta umidade. Imagem tirada no MEV com aumento de 6.000x.	64
Figura 19 - Imagem da microestrutura, obtida no MEV com aumento de 6.000x e histograma com a distribuição do diâmetro das nanofibras da amostra 10 (14C18D1000V12P).	66
Figura 20 - Imagem da microestrutura, obtida no MEV com aumento de 6.000x e histograma com a distribuição do diâmetro das nanofibras da amostra 11 (14C18D2000V12P).	66
Figura 21 - Espectro da TRF e histograma do comportamento direcional das nanofibras da amostra 10 (14C18D1000V12P).....	67

Figura 22 - Espectro da TRF e histograma do comportamento direcional das nanofibras da amostra 11 (14C18D2000V12P).....	68
Figura 23 - Microestrutura com nanofibras grudadas na amostra 4 (distância agulha-coletor de 10 cm). Imagem tirada no MEV com aumento de 6.000x.....	70
Figura 24 - Imagem da microestrutura, obtida no MEV com aumento de 6.000x e histograma com a distribuição do diâmetro das nanofibras da amostra 5 (14C13D2000V12P).	71
Figura 25 - Imagem da microestrutura, obtida no MEV com aumento de 6.000x e histograma com a distribuição do diâmetro das nanofibras da amostra 13 (14C20D2000V12P).	71
Figura 26 - Fibras descontínuas observadas na amostra 13 (14C13D2000V12P). As descontinuidades encontram-se assinaladas com círculos.....	72
Figura 27 - Espectro da TRF e histograma do comportamento direcional das nanofibras da amostra 5 (14C13D2000V12P).....	73
Figura 28 - Imagem da microestrutura, obtida no MEV com aumento de 6.000x e histograma com a distribuição do diâmetro das nanofibras da amostra 1 (12C13D2000V12P).	75
Figura 29 - Imagem da microestrutura, obtida no MEV com aumento de 6.000x e histograma com a distribuição do diâmetro das nanofibras da amostra 14 (15C13D2000V12P).	75
Figura 30 - Espectro da TRF e histograma do comportamento direcional das nanofibras da amostra 1 (12C13D2000V12P).....	76
Figura 31 - Espectro da TRF e histograma do comportamento direcional das nanofibras da amostra 14 (15C13D2000V12P).....	76

Figura 32 - Fibras descontínuas encontradas na amostra 14. As descontinuidades encontram-se assinaladas com círculos.	77
Figura 33 - Solução escorrendo na extremidade da agulha devido à baixa viscosidade das soluções com 12% de PCL.	78
Figura 34 - Imagem da microestrutura tirada no MEV com aumento de 6.000x, Espectro da TRF e histograma do comportamento direcional das nanofibras das amostras: a) 2 (12C13D2000V12P) e b) 3 (12C13D2000V12PM1).	79
Figura 35 - Imagem da microestrutura tirada no MEV com aumento de 6.000x, Espectro da TRF e histograma do comportamento direcional das nanofibras das amostras: a) 6 e b) 7.	80
Figura 36 - Imagem da microestrutura tirada no MEV com aumento de 6.000x, Espectro da TRF e histograma do comportamento direcional das nanofibras das amostras: a) 17 e b) 18.	81
Figura 37 - Imagens da microestrutura da amostra 19, obtidas no MEV com aumentos de: a) 1.000x e b) 6.000x.	83
Figura 38 - Imagens da microestrutura da amostra 20, obtidas no MEV com aumentos de: a) 1.000x e b) 6.000x.	83
Figura 39 - Imagens da microestrutura da Amostra A, obtidas no MEV com aumento de 6.000x.	85
Figura 40 - Imagens da microestrutura da Amostra B, obtidas no MEV com aumento de 6.000x.	85
Figura 41 - Histograma com a distribuição do diâmetro das nanofibras da amostra A.	86

Figura 42 - Histograma com a distribuição do diâmetro das nanofibras da amostra B.	86
Figura 43 - Espectro da TRF e histograma do comportamento direcional das nanofibras da amostra A.	87
Figura 44 -Espectro da TRF e histograma do comportamento direcional das nanofibras da amostra B.	88
Figura 45 - Espectro FTIR obtido para a membrana de PCL na região de 500-4000 cm-1.	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Membranas poliméricas não absorvíveis disponíveis comercialmente para RTG e ROG.....	27
Tabela 2 - Membranas de colágeno absorvíveis disponíveis comercialmente para RTG e ROG.....	28
Tabela 3 - Membranas poliméricas sintéticas absorvíveis disponíveis comercialmente para RTG e ROG.	29
Tabela 4 - Tabela comparativa entre as principais técnicas de fabricação de nanofibras.....	37
Tabela 5 - Membranas produzidas por eletrofação e seus respectivos parâmetros de processamento e da solução.....	51
Tabela 6 – Espessura dos corpos de prova das membranas A e B.....	54
Tabela 7 - Bandas na região do Infravermelho Características do PCL.....	59
Tabela 8 - Parâmetros ambientais durante produção das amostras 9 e 10.	62
Tabela 9 - Diâmetro médio das fibras, desvio padrão e velocidades de rotação e linear do cilindro, utilizados na fabricação das membranas 10 e 11.	66
Tabela 10 - Dados referentes ao alinhamento das nanofibras das amostras 10 e 11.	68
Tabela 11 - Diâmetro médio das fibras, desvio padrão e distância de trabalho do coletor para as amostras 5, 11 e 13.	70
Tabela 12 - Dados referentes ao alinhamento das nanofibras das amostras 5 e 11.	73

Tabela 13 - Diâmetro médio das fibras, desvio padrão e concentração de PCL para as membranas 1, 11 e 14.....	74
Tabela 14 - Dados referentes ao alinhamento das nanofibras das amostras 1, 11 e 14.	76
Tabela 15 - Dados referentes ao alinhamento das nanofibras das amostras 2 e 3... 80	
Tabela 16 - Dados referentes ao alinhamento das nanofibras das amostras 5, 6 e 7.	81
Tabela 17 - Dados referentes ao alinhamento das nanofibras das amostras 17 e 18.	82
Tabela 18 - Parâmetros utilizados para produção das amostras A e B, por eletrofiação.....	84
Tabela 19 - Diâmetro médio das fibras e desvio padrão para as amostras A e B.....	87
Tabela 20 - Dados referentes ao alinhamento das nanofibras das amostras A e B..	88
Tabela 21 - Módulo de Young e tensão de ruptura das amostras.....	89
Tabela 22 - Resultado da pesagem de três amostras das membranas A e B.	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido Acético
AF	Ácido Fórmico
c	Comprimento
d-PTFE	Politetrafluoretileno de alta densidade
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial (do inglês Differential Scanning Calorimetry)
E	Módulo de Young
e	Espessura
e-PTFE	Politetrafluoretileno expandido
FDA	Food and Drug Administration
h	Altura (do inglês height)
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (do inglês Fourier Transform Infrared Spectroscopy)
I	Largura
MEC	Matriz Extracelular
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
Mn	Massa molar numérica média
m/V	Percentagem em massa/volume
P	Porosidade
PCL	Policaprolactona
PDO	Polidioxanona
PGA	Ácido Poli (ácido glicólico) (do inglês Polyglycolic Acid)
PLA	Ácido Poli (ácido lático) (do inglês Polylactic Acid)
PTFE	Politetrafluoretileno
r	Raio
ROG	Regeneração Óssea Guiada
RTG	Regeneração Tecidual Guiada
TRF	Transformada Rápida de Fourier
Tc	Temperatura de cristalização
Tm	Temperatura de Fusão
V	Volume total
v	Velocidade linear

V_p	Volume de poros
V_s	Volume do conteúdo sólido
ω	Velocidade angular
ξ	Deformação
σ	Tensão
ρ_{aparente}	Densidade aparente
ρ_s	Densidade do conteúdo sólido

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
2.1 MEDICINA REGENERATIVA.....	22
2.2 REGENERAÇÃO ÓSSEA E TECIDUAL GUIADA	24
2.3 MEMBRANAS DE POLICAPROLACTONA (PCL)	30
2.4 O PROCESSO DE ELETROFIAÇÃO.....	32
2.4.1 O equipamento de eletrofiação e o seu princípio de funcionamento ..	32
2.4.2 Vantagens e desvantagens da técnica de eletrofiação.....	36
2.4.3 Análise do efeito dos parâmetros no processo de eletrofiação.....	39
2.4.3.1 Condições ambientais	39
2.4.3.2 Propriedades intrínsecas das soluções	40
2.4.3.3 Parâmetros de processamento.....	43
2.4.4 O uso de solventes benignos no processo de eletrofiação	45
3 MATERIAIS E MÉTODOS	47
3.1 MATERIAIS	47
3.2 PRODUÇÃO DE FIBRAS POR ELETROFIAÇÃO	47
3.3 CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS	51
3.3.1 Análise microestrutural por Microscopia Eletrônico de Varredura (MEV)	51
3.3.2 Avaliação do diâmetro médio das fibras	52
3.3.3 Avaliação do alinhamento das fibras	52
3.3.4 Avaliação química por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	53
3.3.5 Análise térmica por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	53
3.3.6 Avaliação mecânica por ensaios de tração	53
3.3.7 Estimativa da porosidade das membranas	56

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA PARA AS AMOSTRAS.....	58
4.1.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	58
4.1.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	59
4.2 APERFEIÇOAMENTO DOS PARÂMETROS DE ELETROFIAÇÃO	61
4.2.1 Parâmetros ambientais	62
4.2.2 Parâmetros operacionais.....	65
4.2.2.1 Velocidade de rotação do cilindro coletor.....	65
4.2.2.2 Distância de trabalho do dispositivo coletor	69
4.2.3 Parâmetros intrínsecos da solução	74
4.2.3.1 Concentração do PCL em solução	74
4.3 MODIFICAÇÕES NO DISPOSITIVO COLETOR PARA MELHORIA DO ALINHAMENTO DAS NANOFIBRAS.....	78
4.3.1 Modificação 1: Arame de cobre enrolado na superfície do cilindro coletor	78
4.3.2 Modificação 2: Folha de papel celofane, com tiras de alumínio, enrolada na superfície do cilindro coletor	82
4.4 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA SELECIONADA	84
4.4.1 Microestrutura das membranas	84
4.4.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	88
4.4.3 Ensaio de tração.....	89
4.4.4 Estimativa da porosidade das membranas	90
5 CONCLUSÃO	91
REFERÊNCIAS.....	93

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, as técnicas de medicina regenerativa, como Regeneração Óssea Guiada (ROG) ou Regeneração Tecidual Guiada (RTG), são cada vez mais eficientes e bem-sucedidas. Um dos principais fatores deste sucesso é o desenvolvimento de dispositivos médicos que mimetizam com excelência a matriz extracelular (MEC), conhecida por governar boa parte das atividades celulares do corpo humano (GHOBEIRA *et al.*, 2018).

Existem diversos métodos conhecidos para produção de fibras similares à MEC, porém um deles se destaca devido à rentabilidade, simplicidade de manuseio, e capacidade de produzir nanofibras contínuas em larga escala: a eletrofiação (NAYAK *et al.*, 2012; SANTOS, 2015). Esta técnica baseia-se na produção de filamentos artificiais a partir do uso de intenso campo elétrico (NAYAK *et al.*, 2012). A eletrofiação também é muito versátil e pode gerar fibras a partir de diferentes materiais como os poliméricos, cerâmicos, ou compósitos. Contudo, nem todos materiais são adequados para aplicação na medicina regenerativa. Assim, para a produção de membranas de barreira para ROG e RTG, especificamente, a escolha do material deve ser baseada em diversas propriedades como: biocompatibilidade, biodegradabilidade, rigidez necessária para manutenção do espaço de regeneração do tecido, oclusão celular, integração com o tecido hospedeiro, maneabilidade clínica e capacidade de absorção pelo corpo humano (WANG *et al.*, 2016).

A policaprolactona (PCL) é um polímero que atende bem as propriedades necessárias para a produção das membranas de barreira na ROG. Consequentemente, ele tem sido amplamente utilizado em biomedicina, medicina regenerativa, engenharia de tecidos e outras aplicações industriais (LIVERANI; BOCCACCINI, 2016). Como características de relevância apresentadas pelo PCL, destacam-se as propriedades reológicas e viscoelásticas favoráveis, taxa de degradação baixa em meios aquosos com a formação de produtos não tóxicos, fácil preparação e modificação das propriedades mecânicas (ADRIANO, 2014). Outro ponto positivo do PCL é a boa solubilidade em diversos solventes, sendo que alguns são benignos ou com baixos potenciais tóxicos fundamentais na produção de dispositivos relacionados à saúde e/ou medicina. Van der Schueren *et al.* (2011) comprovaram, por exemplo, que a combinação de ácido acético (AA) e ácido fórmico

(AF) poderia ser uma excelente escolha de solventes para o processo de eletrofiação da policaprolactona.

As abordagens de “eletrofiação verde”, e o uso de solventes benignos, ainda não são significativamente explorados. Entretanto, estas considerações vêm ganhando força na última década no que diz respeito ao processamento de polímeros para a biomedicina, pois apresentam vantagens no quesito segurança no ambiente de trabalho e gestão de resíduos (BONGIOVANNI *et al.*, 2019).

No contexto da produção de membranas para medicina regenerativa por eletrofiação verde, o foco deste trabalho é o desenvolvimento de amostras eletrofiadas de PCL, o qual foi dissolvido em diferentes proporções da mistura binária de solventes AA e AF. Além disso, consideraram-se outras variáveis que atuam diretamente no desempenho do processo de eletrofiação, o qual depende diretamente do controle de fatores que a influenciam os parâmetros ambientais, intrínsecos da solução, e de processamento. Tais fatores foram variados, a fim de se encontrar a melhor combinação para produção de membranas com estrutura similar à matriz extracelular humana; também foram testadas pequenas modificações no dispositivo coletor. Com a escolha de tais fatores, pretende-se um perfil de fibras alinhadas, já que esta morfologia fornece propriedades mecânicas e biológicas anisotrópicas, adequadas para guiar topograficamente as células (XU *et al.*, 2004), com o menor diâmetro médio possível, estrutura constante e sem a presença de defeitos. Finalmente, após a obtenção da melhor combinação de fatores, a reproduzibilidade da técnica é analisada, além da porosidade das membranas formadas, suas propriedades mecânicas e a presença ou ausência de resquícios de solventes por meio da Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MEDICINA REGENERATIVA

A perda parcial de órgãos e tecidos devido a doenças e lesões, ou até mesmo ao desgaste natural causado pelo envelhecimento, serviu como motivação para o desenvolvimento de terapias que tivessem a capacidade de regenerá-los. Com essa premissa, surgiu então a medicina regenerativa, um campo interdisciplinar que aplica conceitos de engenharia e ciências biológicas para promover a regeneração de tecidos e órgãos lesionados, diminuindo, assim, a necessidade de realização de transplantes (MAO; MOONEY, 2015).

A medicina regenerativa abrange uma gama de estratégias, incluindo o uso de biomateriais, arcabouços e células, e suas combinações, para promover a recuperação dos tecidos que foram perdidos, de modo a suprir suas funções e contribuir para a sua regeneração (MAO; MOONEY, 2015).

Para compreender melhor como a medicina regenerativa funciona, é necessário entender primeiro como ocorre o processo de regeneração dos tecidos do corpo humano. Desta forma, pode-se dizer que a regeneração tecidual depende de três fatores: do tipo de tecido, da intensidade da lesão e da manutenção da estrutura prévia do tecido (SCHMITT, 2006).

Segundo Schmitt (2006), os tipos de tecidos podem ser identificados e classificados de acordo com a capacidade que as suas células possuem de proliferarem durante a vida adulta. As células lábeis, como a epiderme, mucosa intestinal e medula óssea, apresentam uma alta taxa de mitose e, portanto, encontram-se sempre em replicação.

As células estáveis, por sua vez, só proliferam se forem expostas a uma lesão. São exemplos de tecidos com células estáveis os ósseos e hepático. Já as células permanentes, representadas pelos neurônios, por exemplo, não apresentam potencial proliferativo (MIRONOV; VISCONTI; MARKWALD, 2014; SCHMITT, 2006).

Portanto, se um tecido for constituído por células lábeis ou estáveis pode haver regeneração, desde que a lesão tecidual não seja muito intensa. No caso de agressões mais graves, a sua reparação deve acontecer por cicatrização, assim como nos tecidos permanentes (SCHMITT, 2006).

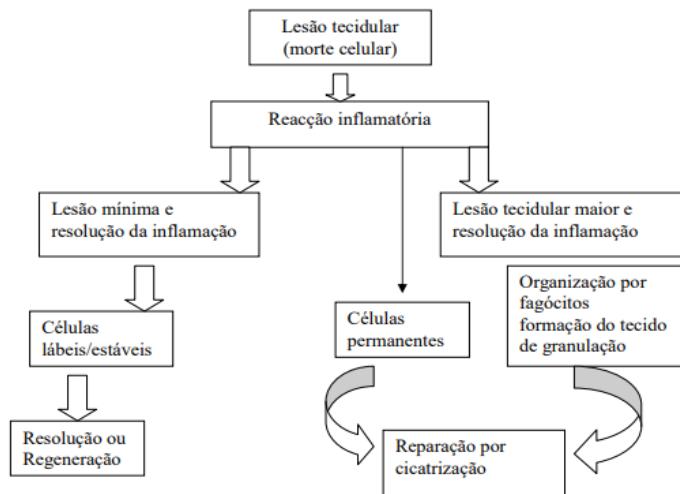
O terceiro fator importante para determinar se a regeneração é possível, é a matriz extracelular, que contribui para a sustentação e conexões da célula com o tecido conjuntivo (SCHMITT, 2006). Se esta matriz for extensamente lesionada, a reparação só se torna possível por cicatrização.

O processo de regeneração tecidual pode ser dividido em três fases principais: inflamatória, proliferativa e de remodelamento, ou maturação (PIMENTA; OLIVEIRA; GOMES, 2014). Assim, uma lesão causa inicialmente danos nos vasos capilares e hemorragia, então, como resposta imediata ao trauma, um coágulo sanguíneo é formado na região. Este coágulo possui duas funções essenciais: proteger temporariamente os tecidos danificados e servir como matriz provisória para migração e proliferação de células (OSATHANON *et al.*, 2017; POLIMENI; XIROPAIDIS; WIKESSJO, 2006).

A formação do coágulo é seguida pela etapa inflamatória. Nesta fase, as células de inflamação – em sua maioria neutrófilos e monócitos – atuam na região, ajudando na destruição bacteriana e eliminação de tecidos necrosados (POLIMENI; XIROPAIDIS; WIKESSJO, 2006). Após aproximadamente três dias a reação inflamatória alcança seu estágio final, os macrófagos migram para a área lesionada e, caso o tecido seja formado por células lábeis ou estáveis, inicia-se a fase de proliferação.

Na Figura 1 encontra-se um esquema sobre a diferença na evolução do processo inflamatório das células lábeis, estáveis e permanentes, segundo gravidade da lesão.

Figura 1 – Evolução do processo inflamatório conforme a capacidade de proliferação das células.



Fonte: Schmitt (2006)

Os macrófagos possuem o papel importante de fagocitar tecidos desvitalizados e secretar mediadores químicos com o objetivo de atrair para a área lesionada as células envolvidas no processo de regeneração, como fibroblastos, células endoteliais e células musculares lisas, e estimular a proliferação destas (POLIMENI; XIROPAIDIS; WIKESJO, 2006). É nesta fase que ocorre o fechamento da lesão e o início da formação da cicatriz. O tecido de granulação resultante, agora rico em células, passa para o estágio final de remodelamento ou maturação. No período de maturação ocorre o depósito de colágeno e proteoglicanas, com o intuito de tentar recuperar a estrutura tecidual normal (PIMENTA; OLIVEIRA; GOMES, 2014).

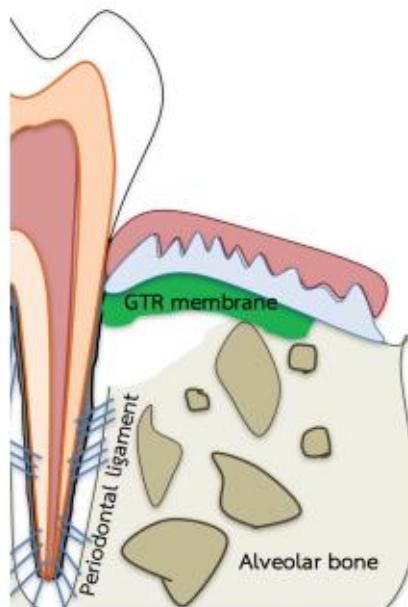
Como mencionado anteriormente, caso a lesão do tecido seja muito grave, o processo de regeneração pode não acontecer de forma natural, sendo necessária uma intervenção cirúrgica. Neste contexto, e no âmbito da medicina regenerativa, procedimentos de regeneração tecidual guiada (RTG) ou regeneração óssea guiada (ROG) são frequentemente realizados para reparar, respectivamente, os tecidos e ossos danificados.

2.2 REGENERAÇÃO ÓSSEA E TECIDUAL GUIADA

A regeneração tecidual guiada (RTG) foi descrita pela primeira vez na década de 1950 por Lloyd Hurley (WANG *et al.*, 2016). Seu experimento consistia em separar fisicamente, por meio de uma membrana de barreira, tecidos moles das áreas de formação ativa óssea na coluna vertebral (HURLEY *et al.*; 1959; WANG *et al.*, 2016).

Em meados dos anos 1980, a RTG foi introduzida para regeneração do tecido periodontal (WANG *et al.*, 2016), que é até hoje uma das mais importantes e difundidas aplicações para esta técnica. No geral, a RTG providencia espaço para repopulação e regeneração das células periodontais ao prevenir a invasão de tecidos gengivais e epitélio na região afetada (OSATHANON *et al.*, 2017), como mostra a Figura 2. O controle do tempo específico para cada tipo de célula diferente poder migrar para a área do defeito periodontal é um parâmetro crítico para determinar o sucesso da regeneração e cura do tecido em questão.

Figura 2 - Membrana de RTG é posicionada sob o defeito periodontal, de forma a separar tecidos gengivais e epitélio da área afetada, possibilitando a regeneração dos tecidos.



Fonte: Osathanon (2017)

Posteriormente, baseado nos mesmos princípios da RTG, surgiu o procedimento de regeneração óssea guiada, tratamento usado para regenerar novo osso em torno de implantes.

Em ambas as técnicas, a utilização de uma membrana especial de barreira é de extrema importância para prevenir que tecidos epiteliais, ou outros tecidos indesejados, migrem para a área lesionada (WANG *et al.*, 2016). Esta medida prolonga o tempo disponível para a regeneração dos tecidos danificados, aumentando a probabilidade de uma recuperação eficiente.

Nos procedimentos de RTG e ROG, a membrana de barreira tem um papel crucial para recuperação adequada da região afetada. Ela ajuda a prevenir o crescimento de tecidos moles na área lesionada, mantendo, assim, espaço suficiente para a regeneração dos tecidos (LEE; KIM, 2014).

A membrana de barreira ideal deve exibir uma série de propriedades, dentre elas: biocompatibilidade, rigidez necessária para manutenção do espaço de regeneração do tecido, oclusão celular, integração com o tecido hospedeiro e maneabilidade clínica (WANG *et al.*, 2016).

Primeiramente, como qualquer outro biomaterial, as membranas para regeneração óssea e tecidual guiada devem exibir biocompatibilidade, propriedade

que, segundo Williams (2003), se refere à habilidade de um material em apresentar uma resposta adequada ao hospedeiro em uma aplicação específica.

Em relação às propriedades físicas e mecânicas, é necessário que estas sejam adequadas para manter o formato da membrana *in vivo* e permitir o manuseio no momento da aplicação – a membrana precisa suportar os esforços mecânicos aos quais é exposta durante a cirurgia. A resistência mecânica das membranas também deve ser suficiente para evitar que ela colapse e para cumprir de maneira eficiente a sua função de barreira (BOTTINO *et al.*, 2012; CARTER; RAHMAN; BHATTARAI, 2016; OSATHANON *et al.*, 2017).

A morfologia da membrana em fibras e sua porosidade, por sua vez, são parâmetros de extrema importância para o crescimento e proliferação celulares eficientes. A porosidade preferível é geralmente de 60 a 90%, para garantir uma troca eficiente de gases e nutrientes. Por outro lado, a estrutura em fibras, e em escala nanométrica é desejável porque confere uma influência positiva sobre o comportamento celular, já que imita de forma eficiente o ambiente em que se encontra (CARTER; RAHMAN; BHATTARAI, 2016). Além do mais, é ideal que a membrana apresente um perfil de fibras alinhadas, já que esta morfologia fornece propriedades mecânicas e biológicas anisotrópicas, adequadas para guiar topograficamente as células (XU *et al.*, 2004).

O colágeno é um componente da matriz extracelular (MEC) encontrado em praticamente todos os tecidos do corpo humano (NORMAN; DESAI, 2006). As classes de colágeno dos tipos I, II e III formam uma rede fibrosa que, além de outras funções, providencia apoio estrutural ao tecido e suporta o crescimento das células. Uma fibra característica de colágeno tipo I da MEC apresenta uma faixa de diâmetro de 50 a 500 nm (NORMAN; DESAI, 2006). Muitos pesquisadores buscam, portanto, imitar a rede de nanofibras de colágeno da melhor maneira possível, a partir da recriação de uma MEC provisória com fibras na mesma escala na qual as células seriam expostas naturalmente, para que estas células possam crescer de forma normal (NORMAN; DESAI, 2006).

O diâmetro das fibras e a arquitetura da superfície também apresentam influência significativa quando se trata da adesão dos fibroblastos. Chen e colaboradores (CHEN *et al.*, 2007) observaram que a fixação dos fibroblastos 3T3 em arcabouços produzidos com nanofibras de policaprolactona era substancialmente melhor em fibras com 428 nm de diâmetro do que em fibras com diâmetros entre 1,6

e 2 µm. Adicionalmente, eles constataram que fibras que apresentam contas ou pérolas (*beads*) em sua estrutura resultam na pior taxa de proliferação celular.

De acordo com o perfil de degradação do material utilizado, é possível categorizar as membranas para RTG e ROG em dois grandes grupos: absorvíveis e não absorvíveis. Ambos os tipos de membranas apresentam resultados clínicos similares, embora as membranas não absorvíveis tenham a grande desvantagem de precisarem ser removidas no final do tratamento por meio de uma nova cirurgia, resultando em mais gastos financeiros, além de provocar dor e desconforto extra nos pacientes (BOTTINO *et al.*, 2012; OSATHANON *et al.*, 2017).

As membranas não absorvíveis mais comuns no mercado são aquelas produzidas com politetrafluoretileno (PTFE), seja ele de alta densidade (d-PTFE), expandido (e-PTFE) ou reforçado com titânio. Na tabela 1 estão listadas as membranas poliméricas não absorvíveis mais comuns disponíveis comercialmente, seus fabricantes, material e propriedades.

Tabela 1 - Membranas poliméricas não absorvíveis disponíveis comercialmente para RTG e ROG

Membranas poliméricas não absorvíveis disponíveis comercialmente			
Nome Comercial	Fabricante	Material	Propriedades
Gore-Tex	W.L.Gore and Associates	e-PTFE	Manuseável, manutenção do espaço eficiente, relativamente rígida
High Density Gore-Tex	W.L.Gore and Associates	d-PTFE	Porosidade menor do que 0.3 micrões cria barreira impermeável contra bactérias
Gore-Tex-Ti	W.L.Gore and Associates	d-PTFE reforçado com titânio	Malha de titânio pode ser moldada para criar espaço adicional para crescimento do osso/tecido
Cytoflex	Unicare Biomedical	PTFE	Microporosa, barreira impermeável contra bactérias
Cyoplast Ti-150 ou Ti-250	Osteogenics Biomedical	d-PTFE reforçado com titânio	Malha de titânio pode ser moldada para criar espaço adicional para crescimento do osso/tecido, espessura de 0.2 mm
Cyoplast TXT200	Osteogenics Biomedical	d-PTFE	Resistente a exposição, impermeável contra bactérias, espessura de 0.2 - 0.25 mm, efeito de barreira prolongado
Open-Tex	Purgo	d-PTFE	Microporosa, minimamente invasiva, espessura de 0.16 mm, resistente à exposição
Open-Tex Titanium Reinforced	Purgo	d-PTFE reforçado com titânio	Eficiente manutenção do espaço, impermeável contra bactérias

Fonte: Adaptado de Bottino *et al.* (2012); Jiménez Garcia *et al.* (2017); Lee e Kim (2014) e Wang *et al.* (2016)

Devido ao fato das membranas não absorvíveis normalmente necessitarem de uma segunda cirurgia para sua remoção, e de apresentarem um risco elevado de exposição ao ambiente externo, aumentando a probabilidade de uma infecção secundária, foram desenvolvidas as membranas absorvíveis (JIMÉNEZ GARCIA et al., 2017; OSATHANON et al., 2017). Tanto polímeros naturais quanto sintéticos foram testados para este propósito, sendo o colágeno e os polímeros alifáticos os mais estudados (SHEIKH et al., 2017).

Os principais fatores que influenciam a segurança e a efetividade das membranas absorvíveis são os seus produtos finais de degradação, que não podem provocar reações inflamatórias no paciente (OSATHANON et al., 2017; SHEIKH et al., 2017). Outra característica importante é que o perfil de degradação da membrana deve conciliar com a taxa de formação do novo tecido (BOTTINO et al., 2012; OSATHANON et al., 2017) de modo que haja tempo suficiente para a regeneração tecidual completa da área em questão.

Atualmente, as membranas absorvíveis mais comuns são produzidas com colágeno, poli(ácido glicólico) e/ou poli(ácido lático), como indicadas nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Membranas de colágeno absorvíveis disponíveis comercialmente para RTG e ROG.

Membranas de colágeno absorvíveis disponíveis comercialmente				
Nome Comercial	Fabricante	Fonte e Tipo de Colágeno	Taxa de Reabsorção	Crosslinking
CollaTape / CollaPlug / CollaCote	Integra LifeSciences Corp	Bovino, tipo I	10-14 dias	Não
Periogen	Collagen Corporation	Bovino, tipos I e II	4-8 semanas	Não
Bio-gide	Geistlich	Porcino, tipos I e II	2-4 semanas	Não
Tutudent	Tutogen Medical GmbH	Bovino, tipo I	8-16 semanas	Não
OsseoGuard	Zimmer Biomet, Inc.	Bovino, tipo I	6-9 meses	Sim
OsseoGuard Flex	Zimmer Biomet, Inc.	Bovino, tipos I e II	6-9 meses	Sim
Ossix Plus	Datum Dental Ltd.	Porcino, tipo I	4-6 meses	Sim
BioMend	Zimmer Biomet, Inc.	Bovino, tipo I	8 semanas	Sim
BioMendExtend	Zimmer Biomet, Inc.	Bovino, tipo I	18 semanas	Sim
RCM6	ACE Surgical Supply Co. Inc.	Bovino, tipo I	26-38 semanas	Sim
Mem-Lok	BioHorizons IPH, Inc.	Bovino, tipo I	26-38 semanas	Sim
Neomem	Citagenix Inc.	Bovino, tipo I	26-38 semanas	Sim
OssGuide	Bioland	Porcino, tipo I	6 meses	Sim
Cytoblast RTM collagen	Osteogenics Biomedical	Porcino, tipos I e II	26-38 semanas	Não
AlloDerm	BioHorizons IPH, Inc.	Humano	16 semanas	Não

Fonte: Adaptado de Bottino et al. (2012); Lee e Kim (2014) e Wang et al. (2016)

Uma desvantagem apresentada pelas membranas de barreira biodegradáveis disponíveis é o fato de que, no geral, elas são incapazes de manter o espaço na região afetada, devido à falta de rigidez, especialmente quando expostas aos fluidos orais ou sangue (SHEIKH *et al.*, 2017). Por este motivo, estas membranas são normalmente usadas em combinação com enxertos ósseos substitutos, que podem ou não vir acompanhados de reforços, suportes ou pinos (SHEIKH *et al.*, 2017).

Tabela 3 - Membranas poliméricas sintéticas absorvíveis disponíveis comercialmente para RTG e ROG.

Membranas poliméricas sintéticas absorvíveis disponíveis comercialmente				
Nome Comercial	Fabricante	Material	Tempo de Funcionamento	Taxa de Absorção
Guidor	Sunstar Americas Inc.	Mistura de poli(d,L - ácido lático) e poli(L- ácido lático) com citrato de acetilbutílico	≥ 6 semanas	13 meses
Resolut Adapt LT	W.L. Gore and Associates	Poli(L,d - ácido lático-co-ácido glicólico)	8-10 semanas	5-6 meses
Resolut Adapt LT	W.L. Gore and Associates	Poli(L,d - ácido lático-co-ácido glicólico)	16-24 semanas	5-6 meses
Epi-Guide	Curasan, Inc.	Poli(L,d - ácido lático)	20 semanas	6-12 meses
Vivosorb	Polyganics	Poli(L,d - ácido lático-co-ε-caprolactona)	10 semanas	24 meses
Vicryl	Ethicon Inc.	Poliglactina 910/Poli(L,d - ácido lático-co-ácido glicólico) (9:1, w/w)	n.d.	cerca de 9 meses
Atrisorb	Atrix Laboratories Inc.	Poli(L,d - ácido lático-co-ácido glicólico) e solvente n-metil-2-pirrolidona	n.d.	6-12 meses

Fonte: Adaptado de Bottino *et al.* (2012) e Wang *et al.* (2016)

O colágeno é o principal polímero utilizado para a fabricação das membranas absorvíveis naturais. As vantagens apresentadas por estas são: a capacidade de degradação por processos fisiológicos e patológicos normais *in vivo*, boa biocompatibilidade, segurança e biodegradabilidade (OSATHANON *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2016). Adicionalmente, estas membranas herdam propriedades biológicas que podem induzir ou manter a atividade biológica das células e tecidos locais (OSATHANON *et al.*, 2017). No entanto, a bioatividade inerente destes polímeros naturais também apresenta algumas desvantagens, incluindo uma intensa resposta imunológica associada à maioria dos polímeros naturais, complexidades associadas ao seu processo de purificação e a possibilidade de transmissão de doenças (WANG *et al.*, 2016). Além disso, existe um grande obstáculo à fabricação

das membranas naturais de colágeno: seu processo de degradação *in vivo* é intenso, o que muitas vezes faz com que o colágeno por si só não apresente a integridade estrutural necessária para regeneração de tecidos ou ossos (WANG *et al.*, 2016).

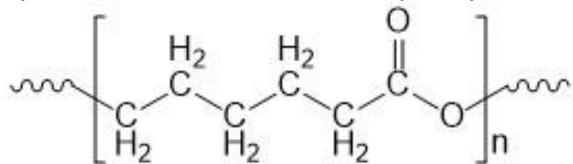
Visando retardar a taxa de degradação das membranas reabsorvíveis de colágeno, processos químicos, físicos e enzimáticos foram desenvolvidos para melhorar a sua durabilidade, a partir da promoção da reticulação nas fibras de colágeno existentes (JIMÉNEZ GARCIA *et al.*, 2017).

As membranas reabsorvíveis feitas a partir de materiais sintéticos apresentam vantagens em diversos aspectos, como a possibilidade de alteração das suas propriedades físicas e químicas por meio de métodos simples, e processos de fabricação acessíveis, de simples manuseio e reproduutíveis (OSATHANON *et al.*, 2017). Materiais sintéticos para membranas de RTG e ROG incluem: poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico) (PLA), polidioxanona (PDO) e policaprolactona (PCL) (OSATHANON *et al.*, 2017).

2.3 MEMBRANAS DE POLICAPROLACTONA (PCL)

Policaprolactona (PCL) é um poliéster linear alifático, e biodegradável, que é amplamente utilizado em biomedicina, medicina regenerativa, engenharia de tecidos, e outras aplicações industriais (LIVERANI; BOCCACCINI, 2016). Sua fórmula estrutural está representada no Esquema 1.

Esquema 1 - Fórmula estrutural da policaprolactona.



Fonte: Autoria própria usando o ChemDraw (2020)

A policaprolactona geralmente apresenta uma taxa de degradação baixa em soluções aquosas, tendo como produto de sua ação degradativa ácidos carboxílicos de massa molecular baixa, não tóxicos, e facilmente excretado e metabolizado pelo corpo humano (ADRIANO, 2014; LIVERANI; BOCCACCINI, 2016). O PCL também apresenta boa solubilidade em diversos solventes, ponto de fusão baixo (59-64°C) e excelente compatibilidade para a formação de misturas poliméricas, motivos estes que

foram responsáveis por estimular o interesse neste material para aplicações no campo da biomedicina (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010).

A vantagem de utilizar o PCL em detrimento a outros polímeros na medicina regenerativa, além dos motivos já citados, vem do seu baixo custo de produção em comparação a outros polímeros alifáticos, e fácil preparação e modificação das propriedades mecânicas (ADRIANO, 2014). No entanto, é necessário prestar atenção ao seu alto grau de hidrofobicidade, que pode dificultar a adesão e crescimento celular na região.

A fim de corrigir isto, é possível fazer um pós-tratamento da membrana para modificar sua superfície sem afetar a estrutura das fibras, a partir de diversos tratamentos já reportados na literatura (MARLETTA *et al.*, 2007; TIAW *et al.*, 2005; ZHU *et al.*, 2015), ou a partir de misturas de PCL com outros polímeros (CHENG; TEOH, 2004; LI *et al.*, 2008).

Estas alterações feitas para melhorar a hidrofilicidade também acabam, consequentemente, melhorando a biocompatibilidade do PCL no corpo humano, fator que deve ser o primeiro a ser considerado na hora de escolher um polímero para aplicação em dispositivos médicos. De acordo com Zhang e colaboradores (ZHANG *et al.*, 2005), embora o PCL suporte a proliferação celular, e seja biocompatível, para que as células cresçam mais e apresentem uma melhor interação com o tecido hospedeiro é interessante que o polímero seja, por exemplo, revestido por moléculas bioativas.

Outro ponto positivo do PCL são as propriedades reológicas e viscoelásticas superiores em relação a muitos dos polímeros reabsorvíveis utilizados para a mesma finalidade na engenharia de tecidos, o que faz com que este seja fácil de produzir e manipular (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010). Além do mais, o PCL já possui aprovação do *Food and Drug Administration* (FDA) para uso em dispositivos, o que facilita sua entrada no mercado (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010).

Apesar de todas as vantagens claras apresentadas, é surpreendente o fato de que poucos dispositivos, membranas e arcabouços feitos de PCL sejam comercializados. Devido a todas as características positivas apresentadas pelas membranas de PCL, especialmente aquelas membranas produzidas com a adição de grupos funcionais, ou revestimentos que tornam o material mais hidrofílico, adesivo e biocompatível, este é um campo muito promissor, que atrai o interesse de muitos cientistas e tem grandes chances de ser expandido em um futuro próximo.

2.4 O PROCESSO DE ELETROFIAÇÃO

A eletrofiação é uma técnica muito utilizada para produção de fibras com diâmetros reduzidos, na faixa de 0,05 a 5 µm (DOSHI; RENEKER, 1995). Isto se deve à sua rentabilidade, simplicidade de manuseio razoável e capacidade para gerar fibras a partir de diferentes materiais como os poliméricos, cerâmicos ou compósitos (SANTOS, 2015). Além disso, a eletrofiação é uma técnica capaz de produzir nanofibras contínuas em larga escala, o que justifica a sua utilização em ambientes industriais (NAYAK *et al.*, 2012).

Em se tratando da produção de biomateriais, mais especificamente da produção de membranas para medicina regenerativa que é o interesse deste trabalho, a capacidade do processo de eletrofiação em gerar fibras de escala nanométrica, e com área de superfície grande, é essencial. Ou seja, este processo permite desenvolver estruturas com ótimas propriedades superficiais e mimetizam de forma mais eficiente a estrutura natural da matriz extracelular, alcançando, portanto, melhores resultados nos quesitos adesão e proliferação das células (SOUSA, 2016; VALENTE, 2011).

O conceito por trás da técnica de eletrofiação foi observado pela primeira vez por Rayleigh no ano de 1897 (SANTOS, 2015); porém, a primeira patente oficial sobre o assunto só foi depositada por Formhals em 1934. No escopo da patente revelavam-se informações sobre a produção de filamentos artificiais a partir do uso de intenso campo elétrico (NAYAK *et al.*, 2012).

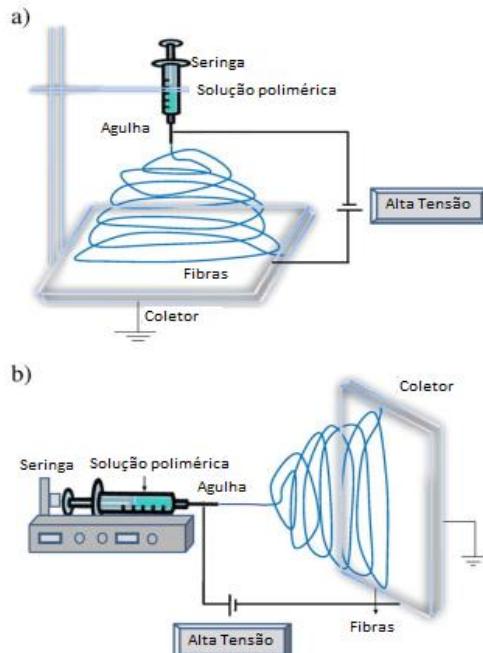
Em seu estudo, Formhals analisou o efeito de forças eletrostáticas sobre líquidos e percebeu que, quando um material adequadamente carregado eletricamente era movido para as proximidades de uma gota de líquido mantida em um capilar fino, a gota assumia o formato cônico e pequenos jatos poderiam ser expelidos de sua ponta caso a densidade da carga elétrica fosse suficientemente alta (NAYAK *et al.*, 2012).

2.4.1 O equipamento de eletrofiação e o seu princípio de funcionamento

O equipamento tradicional para eletrofiação é composto pelos seguintes componentes: fonte de alimentação de alta tensão, seringa, bomba de infusão (para controlar a vazão na seringa), tubo capilar (agulha de metal sem bisel ou ponta

quadrada) e dispositivo coletor (VALENTE, 2011). Ele pode ser montado tanto na posição vertical quanto na horizontal, como mostra a Figura 3.

Figura 3 - Representação do equipamento de eletrofiação em posição: a) Vertical, b) Horizontal.



Fonte: Adaptado de Bhardwaj e Kundu (2010)

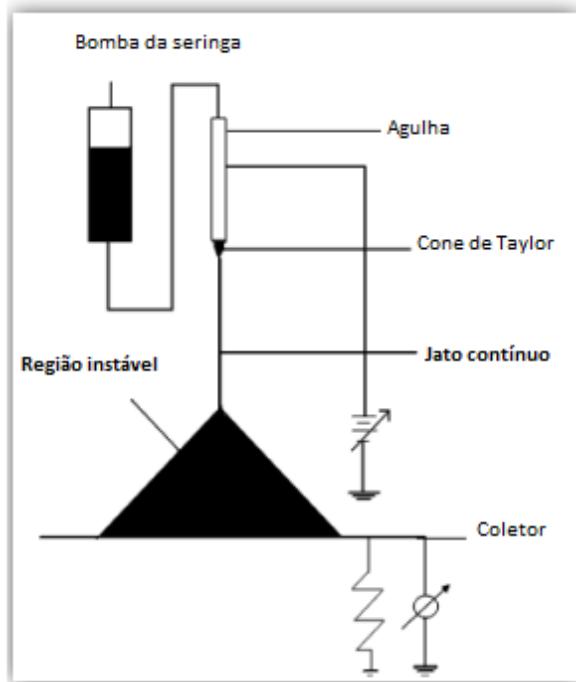
No processo de eletrofiação, o primeiro passo consiste na inserção de um polímero, já solubilizado em solvente adequado, na seringa. Muito embora a técnica possa ser utilizada também com polímeros puros aquecidos acima de sua temperatura de fusão (fundidos), essa opção raramente é utilizada, pois trabalhar nestas condições adiciona algumas complicações, como a preocupação com a degradação térmica do material (ALCOBIA, 2013; NAYAK *et al.*, 2012).

A seringa é então acoplada pelo sistema constituído por um tubo capilar (agulha) e uma bomba. Em seguida, uma diferença de potencial é aplicada no fluido polimérico entre a ponta da agulha e o coletor, criando-se uma separação de cargas no líquido. No momento em que as forças eletrostáticas resultantes ultrapassam o valor da tensão superficial do fluido, este é ejetado da seringa formando um jato, que é submetido à distorção e assume o formato de um cone, denominado Cone de Taylor (SOUSA, 2016).

Uma vez que o jato é altamente carregado, com uma densidade de carga que aumenta progressivamente devido à evaporação do solvente, o caminho em linha reta

é dificultado, ocorrendo perturbações e instabilidade (VALENTE, 2011). Em consequência, o percurso é feito em espiral e a distância percorrida é ampliada várias ordens de grandeza em comparação com a distância disponível entre a seringa e o coletor. O resultado é a produção de fibras muito longas, com diâmetro micro ou nanométrico, que serão coletadas finalmente no dispositivo coletor ligado a terra. As três fases do percurso do fluido polimérico durante processo de eletrofiação estão representadas na Figura 4.

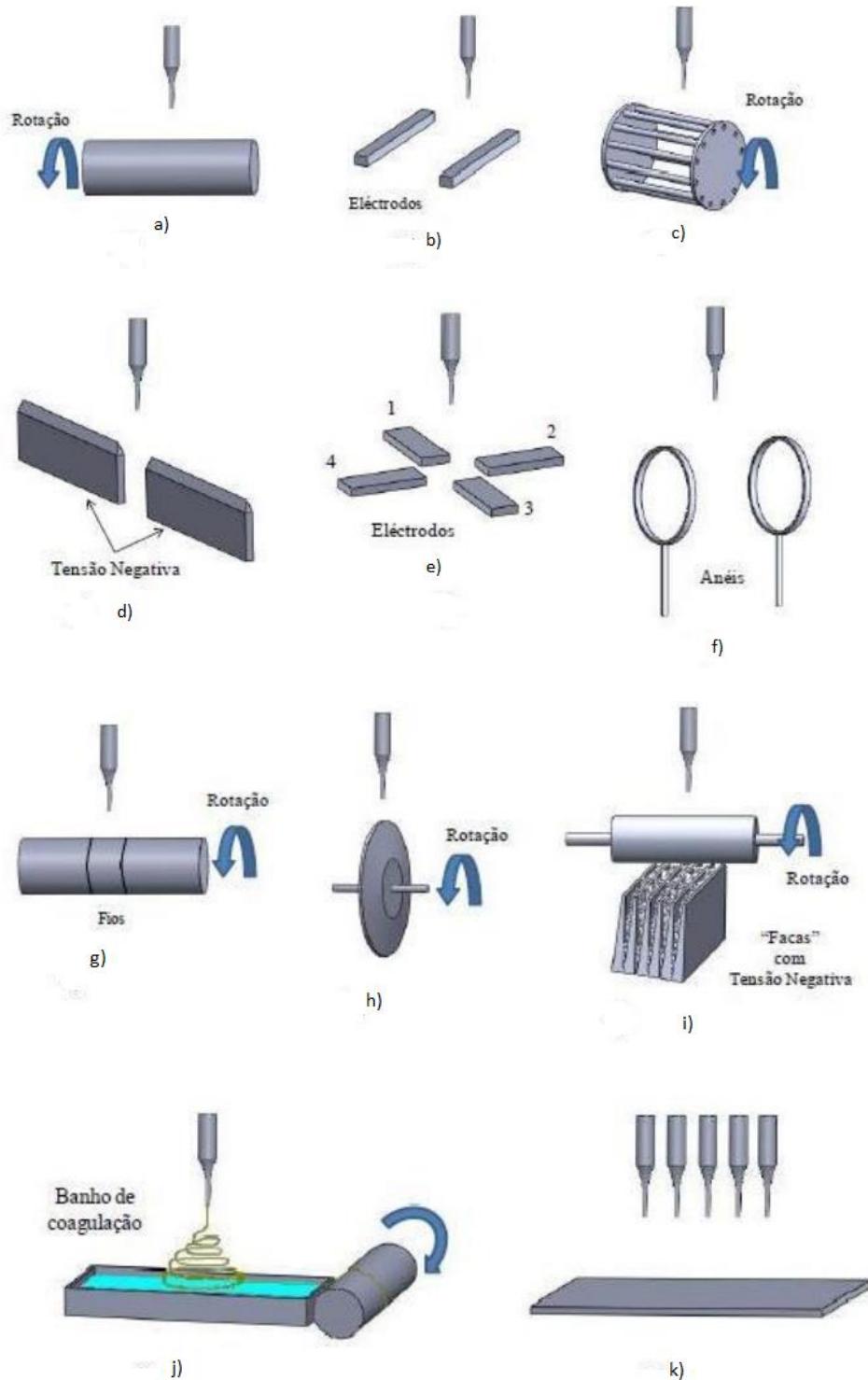
Figura 4 - Representação das três fases geométricas do fluido polimérico durante processo de eletrofiação: Cone de Taylor, jato contínuo e região de instabilidade.



Fonte: Adaptado de Valente (2011).

Determinadas modificações no equipamento tradicional de eletrofiação podem ser feitas a fim de aprimorar a técnica e melhorar o seu desempenho. Uma das mudanças mais usuais é a alteração na montagem ou geometria do dispositivo coletor, que originalmente tem formato plano, com o objetivo de ajudar a minimizar problemas relacionados com a dificuldade de controlar o diâmetro e/ou alinhamento das nanofibras durante o processo (SOARES, 2013). Na Figura 5 é possível observar algumas destas configurações de coletor utilizadas para o processo de eletrofiação.

Figura 5 - Montagens de coletores alternativas para eletrofiação: a) cilindro rotativo, b) elétrodos paralelos, c) coletor de rotação constituído por cilindro de fios, d) lâminas em linha, e) conjunto de contra elétrodos, f) anéis em paralelo, g) cilindro com fio enrolado sobre a superfície, h) disco, i) tubo rotativo com elétrodos tipo “facas”, j) fios fibrosos em banho de água e k) múltiplos capilares.



Fonte: Soares (2013)

Utilizar um dispositivo coletor rotativo, independentemente do seu formato, é a maneira mais simples e antiga de se fabricar fibras mais alinhadas, e com diâmetros

menores (YUAN; ZHOU; ZHANG, 2017), duas características que são imprescindíveis em membranas de barreira para RTG e ROG.

A velocidade de rotação adiciona ao sistema uma força mecânica que leva ao estiramento das fibras e, subsequentemente, à sua deposição no cilindro coletor de maneira mais alinhada (GHOBEIRA *et al.*, 2018). O segredo para o alinhamento das fibras com esta estratégia é, portanto, aumentar a velocidade de rotação até que haja a compatibilização entre a velocidade de coleta das fibras com a velocidade de deposição das fibras que estão sendo formadas.

No entanto, este método ainda está longe de ser perfeito. Primeiramente, materiais muito frágeis não podem ser recolhidos em coletores rotativos, já que eles estão propensos a quebra em velocidades bem menores em comparação a materiais flexíveis ou elásticos (YUAN; ZHOU; ZHANG, 2017). Segundo, este método consome muito tempo e, principalmente, energia elétrica (YUAN; ZHOU; ZHANG, 2017).

Coletores estáticos, por sua vez, também são diversas vezes modificados com o objetivo de controlar a morfologia das fibras. Como a força motriz que transforma a solução em fibras de pequeno diâmetro é a tensão aplicada ao sistema pela fonte de energia de alta voltagem, cargas eletrostáticas são distribuídas ao longo do jato de eletrofiação, e, portanto, um campo elétrico externo pode ser usado para controlar a direção deste jato (LONG *et al.*, 2019). Desta forma, configurações que possuem eletródos auxiliares ou desenhos distintos de coletores vêm sendo desenvolvidas baseadas neste conceito (LONG *et al.*, 2019).

2.4.2 Vantagens e desvantagens da técnica de eletrofiação

A eletrofiação é considerada um dos melhores métodos para fabricação de fibras poliméricas na escala micro e nanométrica, porém não é o único. Técnicas de processamento como estiramento (*drawing*), modelo (*templating*), separação de fases, automontagem (*self-assembly*), fiação por sopro do fundido (*meltblowing*) ou outras técnicas convencionais de fiação (*spinning*) também podem ser empregadas para este fim (NAYAK *et al.*, 2012; SOARES, 2013). Na Tabela 4 apresenta-se uma comparação entre estas técnicas, destacando suas principais vantagens e desvantagens.

Tabela 4 - Tabela comparativa entre as principais técnicas de fabricação de nanofibras.

Nome da Técnica	Comparação entre diversas técnicas de fabricação de nanofibras			Desvantagens
	Controle das dimensões das fibras	Escopo para produção em massa	Vantagens	
Eletrofiação (solução)	Sim	Sim	Fibras longas e contínuas, rentável, versátil, fácil de manusear, vasta seleção de materiais	Condições para recuperação de solventes, instabilidade do jato, baixa produtividade
Eletrofiação (fundido)	Sim	Sim	Fibras longas e contínuas	Degradação térmica dos polímeros, complicações com descargas elétricas
Fiação por sopro do fundido	Sim	Sim	Fibras longas e contínuas, alta produtividade, possível recuperação de solventes	Degradação térmica dos polímeros, limitação de polímeros aptos para a técnica
Modelo	Sim	Não	Alto controle do diâmetro e comprimento das fibras, vasta seleção de materiais	Processo complexo, materiais de sacrifício
Estiramento	Não	Não	Processo simples, vasta seleção de materiais	Processo descontínuo, dificuldade em produzir fibras com diâmetro consistente
Separação de Fases	Não	Não	Requer equipamentos simples	Trabalho somente com polímeros seletivos
Automontagem	Não	Não	Facilidade em obter nanofibras menores	Processo complexo
Fiação por força centrífuga	Sim	Sim	Não são utilizadas voltagens muito altas, eco-friendly	Altas temperaturas são requeridas

Fonte: Adaptado de Nayak *et al.* (2012) e Santos (2015)

O processo de eletrofiação é de longe o mais utilizado para a produção de nanofibras devido à sua simplicidade, versatilidade e acessibilidade (GHOBEIRA *et al.*, 2018). No entanto, a técnica pode apresentar algumas dificuldades quando o assunto é a estabilidade do jato, reproducibilidade, e propriedades das fibras. Isto se deve aos inúmeros parâmetros de processo, suas interações complexas e, frequentemente, condições ambientais não controladas, podem influenciar diretamente na produção das fibras (GHOBEIRA *et al.*, 2018).

A técnica de fiação por sopro do fundido é um processo no qual os polímeros no estado fundido são transformados em fibras superfinais devido ao contato com ar quente e de alta velocidade (GUPTA; EDWARDS, 2019). A principal desvantagem desta técnica é a possibilidade de degradação dos polímeros, uma vez que eles são expostos a temperaturas acima do seu ponto de fusão, o que não acontece no processo de eletrofiação, realizado à temperatura ambiente. Além disso, nem todos os materiais podem ser submetidos a esta técnica, apenas aqueles que podem ser facilmente fundidos (ASMATULU; KHAN, 2019).

A automontagem conta com o auxílio de moldes rígidos porosos para a formação das nanofibras, tanto sólidas quanto ocas (SOARES, 2013). Neste processo, as fibras são montadas molécula por molécula, tendo como resultado estruturas muito bem definidas (SOARES, 2013).

Já no processo de estiramento, o contato entre uma gotícula milimétrica de polímero com uma extremidade pontiaguda forma uma fibra líquida que solidifica por meio da rápida evaporação do solvente devido à grande área de superfície (BAJÁKOVÁ; LUKÁŠ; LACARIN, 2011). No que diz respeito ao método de separação de fases, a fabricação das membranas fibrosas ocorre devido à indução na separação de uma solução polimérica em duas fases, uma com alta e outra com baixa concentração de polímero (KURIMOTO; NIYAMA; EBARA, 2016).

As quatro últimas técnicas citadas acima apresentam uma significativa desvantagem em relação ao eletrofiação: a produção de fibras em massa não é possível (NAYAK et al., 2012), o que dificulta a sua utilização em ambientes industriais.

Por último, a fiação por força centrífuga (*forcespinning*) surge recentemente como uma nova técnica para fabricação de nanofibras, por meio da utilização de força centrífuga (SARKAR et al., 2010). Este processo apresenta vantagens distintas em comparação com as técnicas mais convencionais, pois não requer altas voltagens ou materiais com propriedades elétricas específicas, como acontece no eletrofiação, e elimina a necessidade de ar quente em alta velocidade, como na fiação por sopro do fundido (RAGHAVAN; SOTO; LOZANO, 2013). No entanto, como a técnica é deveras recente, a fiação por força centrífuga não é um processo muito acessível e existe pouca informação disponível sobre o assunto em comparação com os demais métodos.

Devido às razões citadas acima que a técnica de eletrofiação propicia, como a facilidade no manuseio, baixo custo, capacidade de produzir fibras longas e contínuas em escala industrial, e configuração simples, levou a escolha para a produção das membranas de policaprolactona no presente trabalho (NAYAK et al., 2012; SOARES, 2013).

2.4.3 Análise do efeito dos parâmetros no processo de eletrofiação

Um bom desempenho do processo de eletrofiação depende diretamente do controle dos parâmetros que a influenciam. Caso estes não sejam adequados, a formação das nanofibras pode ser prejudicada (SOARES, 2013).

Quando se fala de nanofibra ideal, obtida por eletrofiação, o aspecto principal consiste na ausência de contas. Quando se obtêm fibras com contas, significa que a solução foi sujeita não somente à eletrofiação, mas também ao processo de eletropulverização (*electrospray*) (REDIGUIERI, 2016).

Obtendo-se as fibras sem a presença das contas, um segundo aspecto a ser notado é se as fibras apresentam descontinuidades. É comum que, devido à alta voltagem ou distância de trabalho inadequada, por exemplo, as fibras se rompam, prejudicando as propriedades mecânicas do material (REDIGUIERI, 2016).

Muitos são os parâmetros envolvidos no processo de eletrofiação, de forma que eles são frequentemente subdivididos em três categorias: condições ambientais, tais como temperatura e umidade; propriedades intrínsecas das soluções, como viscosidade, concentração, condutividade elétrica e tensão superficial; e parâmetros de processamento, nomeadamente tensão aplicada, distância entre agulha e dispositivo coletor, fluxo de injeção da solução e velocidade de rotação do anteparo coletor, caso este seja rotativo (ALCOBIA, 2013).

2.4.3.1 Condições ambientais

As condições ambientais, especialmente umidade e temperatura, influenciam de maneira significativa a morfologia e o diâmetro das nanofibras que são obtidas durante o processo de eletrofiação.

A umidade do ambiente pode impactar de diversas formas no processo de eletrofiação. De Vrieze e colaboradores (DE VRIEZE *et al.*, 2009) em seu estudo sobre a influência da temperatura e da umidade na formação de nanofibras de polí(vinil pirrolidona) (PVP) por eletrofiação, chegaram à conclusão que o diâmetro médio das fibras diminui conforme a umidade aumenta. A absorção da água adjacente por parte da solução faz com que o processo de solidificação ocorra de forma mais lenta e, como consequência, o jato projeta-se por uma maior distância e as nanofibras formadas têm diâmetros menores. Porém, este mecanismo só é válido até um

determinado teor de umidade. Como a umidade do ambiente ao redor também determina a taxa de evaporação do solvente em solução, caso esta seja muito elevada o solvente volátil não será capaz de secar antes de atingir o dispositivo coletor, de modo que as nanofibras acabam colando (DE VRIEZE *et al.*, 2009; SANTOS, 2015). Inversamente, caso a umidade esteja demasiadamente baixa, a taxa de evaporação do solvente pode se tornar mais rápida do que a remoção do solvente da ponta da agulha, causando o entupimento do sistema (SANTOS, 2015).

No que diz respeito à temperatura de trabalho, a sua alteração ocasiona dois efeitos opostos no diâmetro médio das nanofibras. O primeiro deles refere-se à diminuição exponencial da taxa de evaporação do solvente com a diminuição da temperatura, o que faz com que o jato demore mais para se solidificar, formando fibras mais finas e alongadas, de alta qualidade (DE VRIEZE *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2017).

Já o segundo efeito é a maior liberdade de movimentos da cadeia polimérica em altas temperaturas, resultando em uma menor viscosidade da solução. Soluções menos viscosas são mais fáceis de serem alongadas pela força elétrica, e, portanto, aumentar a temperatura também pode ser benéfico para o sistema até certo ponto (DE VRIEZE *et al.*, 2009). Entretanto, caso a viscosidade atinja um valor menor do que a faixa ideal, a continuidade das fibras pode ser prejudicada.

Por causa destes efeitos contrários, é necessário encontrar um equilíbrio em relação à temperatura do sistema, que não pode ser nem muito baixa, nem muito elevada.

Visto que as condições ambientais afetam consideravelmente o comportamento da solução durante o eletrofiação, é recomendado que o processo seja realizado em um ambiente com condições controladas, com ar condicionado e desumificador, além de um sistema de exaustão para aspirar os vapores dos solventes emanados da solução (ALCOBIA, 2013).

2.4.3.2 Propriedades intrínsecas das soluções

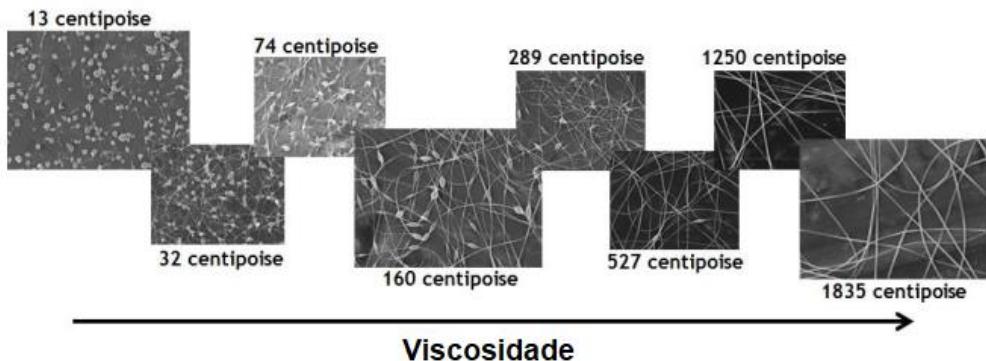
Os parâmetros relacionados às propriedades intrínsecas das soluções, importantes para o processo de eletrofiação, são: viscosidade (diretamente relacionada com a concentração da solução e massa molar do polímero), tensão superficial e condutividade elétrica.

A viscosidade da solução depende fortemente da sua concentração e da massa molar do polímero utilizado. Devido a esta correlação, a influência destes três parâmetros é geralmente discutida em conjunto (SANTOS, 2015). Existe uma faixa de viscosidade ótima na qual o processo de eletrofiação se torna possível (SANTOS, 2015). Caso a solução seja pouco viscosa, a formação de fibras contínuas é dificultada (ALCOBIA, 2013; BHARDWAJ; KUNDU, 2010; SANTOS, 2015). A viscosidade muito baixa pode ser resultado de uma solução muito diluta (concentração insuficiente) ou a utilização de um polímero com massa molar muito baixa, o que faz com que não haja material suficiente no jato para que uma fibra contínua se forme (ALCOBIA, 2013).

Aumentar a viscosidade da solução resulta em maiores tempos de relaxação de tensão, o que pode prevenir a ruptura das fibras ejetadas durante o eletrofiação (BHARDWAJ; KUNDU, 2010). Por outro lado, quando a viscosidade é muito alta, torna-se difícil a ejeção dos jatos da solução polimérica e, consequentemente, há um menor alongamento da solução, resultando em fibras com maiores diâmetros (BHARDWAJ; KUNDU, 2010) ou até mesmo no entupimento da agulha do sistema em casos mais extremos. Para contornar o problema de viscosidade extrema, utilizam-se menores concentrações do polímero na solução ou adota-se uma matéria-prima com menor massa molar.

Fong e colaboradores (FONG *et al.*, 1999) ao trabalharem com fibras eletrofiadas de poli(óxido de etileno) (PEO), com viscosidades entre 1 e 20 Poise, também observaram que as contas são menos prováveis de serem formados naquelas soluções mais viscosas. De acordo com os autores, conforme a viscosidade aumenta, o diâmetro das contas adquire valores maiores, porém a distância média entre as fibras com estes defeitos aumenta consideravelmente. Ao mesmo tempo, o formato das contas também se modifica de maneira gradativa e passa da forma esférica à fusiforme, até finalmente formar fibras uniformes, conforme mostra a Figura 6.

Figura 6 - Imagens retiradas no MEV da morfologia das fibras eletrofiadas de PEO com contas em função da viscosidade da solução.



Fonte: Adaptado de Fong, Chun e Reneker (1999)

O valor da massa molar do polímero em solução afeta a viscosidade do sistema, pois reflete o número de entrelaçamentos das cadeias poliméricas em uma solução, parâmetro que é fundamental para o processo de eletrofiação. Mesmo que a concentração polimérica seja mais baixa que o ideal, uma alta massa molar pode assegurar um nível suficiente de viscosidade na solução para produzir um jato contínuo durante eletrofiação e restringir os efeitos da tensão superficial que levaria à formação de contas nas fibras (BHARDWAJ; KUNDU, 2010; SANTOS, 2015).

Além de encontrar a faixa de viscosidade ideal, superar o valor da tensão superficial da solução carregada é um passo necessário para dar início ao processo de eletrofiação. A tensão superficial depende fortemente da composição dos solventes na solução e deve ser reduzida, através do uso de solventes com baixa tensão superficial, a fim de que obtenham fibras sem a presença de contas (BHARDWAJ; KUNDU, 2010).

Geralmente, uma alta tensão superficial inibe o processo de eletrofiação, porque gera a instabilidade do jato e contribui para a formação de gotas e contas (HOHMAN *et al.*, 2001). Para uma quantidade fixa de fluido, a repulsão coulombiana entre os íons carregados da solução é responsável por criar o formato de jato da solução, enquanto a tensão superficial do fluido favorece formatos esféricos, com menor área de superfície por unidade mássica (RENEKER; YARIN, 2008). Usar solventes com baixa tensão superficial é, então, imprescindível para que as forças eletrostáticas agindo em oposição possam vencer a barreira da tensão superficial da solução e o jato possa ser ejetado de maneira eficaz (RENEKER; YARIN, 2008). Contudo, não necessariamente uma menor tensão superficial vai ser mais adequada

para o processo de eletrofiação. Basicamente, esse parâmetro só determina o limite inferior e superior no qual a eletrofiação acontece quando todas as outras variáveis são mantidas constantes (BHARDWAJ; KUNDU, 2010; SANTOS, 2015).

Em relação à condutividade elétrica, soluções de maior condutividade, ou seja, com maior quantidade de carga na solução, permitem maior fluidez de carga e sofrem uma aceleração eletrostática maior sob a ação de um campo elétrico (ALCOBIA, 2013). Como já mencionado, a repulsão das cargas é a responsável pelo alongamento da solução, portanto, com uma maior condutividade, um maior número de cargas vai causar um alongamento mais extenso do jato, levando à formação de fibras uniformes e livres de contas (BHARDWAJ; KUNDU, 2010; SANTOS, 2015).

Adicionalmente, a condutividade elétrica da solução tem grande influência em relação ao diâmetro das fibras. Se a condutividade de uma solução aumenta, os diâmetros das fibras resultantes podem ser significativamente reduzidos (SANTOS, 2015). Este aumento de cargas também apresenta o benefício de diminuir a tensão crítica necessária para iniciar o processo de eletrofiação (RAMAKRISHNA *et al.*, 2005).

Com o objetivo de aumentar a condutividade elétrica, é muito comum a adição de sais, tensoativos iônicos, ou um sistema binário ou terciário de solventes na solução (ALCOBIA, 2013). Solventes de alta constante dielétrica, como a dimetilformamida, metanol, etanol ou ácido fórmico, são diversas vezes utilizados para esta finalidade (ALCOBIA, 2013; LUO; STRIDE; EDIRISINGHEM, 2012; TAN *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2005; ZHU *et al.*, 2010).

2.4.3.3 Parâmetros de processamento

Os parâmetros de processamento, que são a tensão aplicada, distância entre agulha e dispositivo coletor, fluxo de injeção da solução e velocidade de rotação do anteparo coletor (caso este seja rotativo), exercem grande influência na morfologia das fibras obtidas durante o eletrofiação.

A distância de trabalho é um parâmetro facilmente ajustável que, junto com o formato do alvo, determina a distribuição do campo elétrico aplicado (ALCOBIA, 2013). Encontrar a distância de trabalho ideal é importante, pois é necessário que o solvente tenha tempo de evaporar completamente no percurso entre a ponta da agulha e o coletor. Caso isto não aconteça, as nanofibras podem chegar úmidas e

colarem umas às outras, aumentando seu diâmetro e prejudicando a homogeneidade da membrana (BHARDWAJ; KUNDU, 2010; SANTOS, 2015). Assim, como a concentração do polímero em solução, o caudal influencia a quantidade e o tempo que o polímero leva a chegar à agulha. É necessário que este fluxo seja razoavelmente alto para que seja contínuo, mas não tão elevado a ponto de impedir a evaporação total do solvente (BHARDWAJ; KUNDU, 2010; OSATHANON *et al.*, 2017). Para fins industriais, é desejável que o fluxo seja o maior possível, de maneira que a produção seja mais rápida, porém sem atrapalhar a qualidade do trabalho.

O valor da tensão elétrica aplicada no sistema é o fator que determina a intensidade do campo elétrico. O processo de eletrofiação acontece em campos elétricos da ordem de 1 a 5 kV/cm, de acordo com as propriedades da solução e a distância de trabalho (ALCOBIA, 2013). A aplicação de uma alta voltagem é crucial para iniciar o processo de eletrofiação. Enquanto determinado valor crítico não for atingido, não há formação de fibras (SANTOS, 2015). Em outras palavras, o valor de tensão crítica vai induzir as cargas necessárias na solução para que a força eletrostática supere a tensão superficial (SANTOS, 2015).

Por fim, a velocidade de rotação, quando se utiliza um cilindro rotativo como coletor, é o parâmetro que exerce a maior influência no grau de alinhamento das nanofibras. O maior grau de orientação das fibras é obtido quando a velocidade linear da superfície do cilindro rotativo coincide com as deposições do jato que sofreu evaporação (YUAN; ZHOU; ZHANG, 2017). Assim sendo, são as altas velocidades e/ou as forças de estiramento mecânico as responsáveis pelo alinhamento da membrana, já que elas direcionam as fibras ejetadas em torno da superfície do cilindro (YUAN; ZHOU; ZHANG, 2017).

Dependendo da velocidade, esta pode agir sobre o grau de alinhamento das fibras de três maneiras distintas (YUAN; ZHOU; ZHANG, 2017):

1. Velocidade de rotação é muito baixa para iniciar a orientação das fibras;
2. Velocidade de rotação começa a melhorar o alinhamento das fibras assim que atinge um nível crítico;
3. O alinhamento das fibras é prejudicado devido à fratura das fibras e turbulência do fluxo de ar ao redor do perímetro do cilindro rotativo, ocasionado por velocidades de rotação muito extremas.

Adicionalmente, a velocidade de rotação do coletor pode simultaneamente afetar o diâmetro das fibras. Aumentar a velocidade do dispositivo geralmente origina fibras com diâmetros reduzidos (YUAN; ZHOU; ZHANG, 2017).

2.4.4 O uso de solventes benignos no processo de eletrofiação

De certa forma, o uso intensivo do PCL em eletrofiação é atribuído à sua solubilidade em diversos solventes (GHOBEIRA *et al.*, 2018). No entanto, os sistemas de solventes mais utilizados, como clorofórmio, diclorometano, hexafluoropropanol, trifluoroetanol, dimetilformamida, tetrafluoretíleno, piridina, dicloroetano, ou a combinação destes (GHOBEIRA *et al.*, 2018; VAN DER SCHUEREN *et al.*, 2011), apresentam um alto nível de toxicidade, o que inviabiliza a sua utilização no ramo da bioengenharia, já que a presença de traços de solventes tóxicos nas fibras eletrofiadas prejudica a sua citocompatibilidade (BONGIOVANNI *et al.*, 2019).

Na última década, as abordagens de “eletrofiação verde” e o uso de solventes benignos, como soluções aquosas ou solventes com baixos potenciais tóxicos, ganharam força principalmente no que diz respeito ao processamento de polímeros para a biomedicina (BONGIOVANNI *et al.*, 2019). Este conceito emergente também apresenta vantagens no quesito segurança no ambiente de trabalho e gestão de resíduos (BONGIOVANNI *et al.*, 2019).

Van der Schueren e colaboradores (VAN DER SCHUEREN *et al.*, 2011) comprovaram pela primeira vez que a combinação de ácido acético (AA) e ácido fórmico (AF) poderia ser uma excelente escolha de solventes benignos para o processo de eletrofiação do PCL, pois a mistura era capaz de produzir fibras uniformes, livre de contas, e em escala nanométrica. As fibras produzidas, inclusive, apresentaram valores de diâmetro até dez vezes menores do que as produzidas ao utilizar o clorofórmio como solvente.

O ácido fórmico e o ácido acético, utilizados separadamente, não foram eficientes na produção de nanofibras. O AA, como solvente, não foi capaz de produzir nenhum material fibroso, enquanto a utilização apenas do AF resultou em uma estrutura composta maioritariamente por gotas (VAN DER SCHUEREN *et al.*, 2011). Apesar de ambos apresentarem valores similares de solubilidade da policaprolactona (VAN DER SCHUEREN *et al.*, 2011), torna-se necessária a formação de um sistema binário entre estes dois solventes para que se atinja o valor da constante dielétrica e

ponto de ebulação necessários para a formação de fibras uniformes (GHOBEIRA *et al.*, 2018).

Van der Schueren e colaboradores (VAN DER SCHUEREN *et al.*, 2011) também concluíram em seu estudo que a estabilidade e reprodutividade do sistema são garantidas quando se encontra as condições ideais para que o processo de eletrofiação atinja um estado estacionário. Ao utilizar a composição AA e AF como solventes, estas condições são obtidas com uma concentração mínima de 30%, em volume, de ácido fórmico e 10% de ácido acético.

A maior desvantagem em utilizar AA e AF como solventes é a degradação do PCL, que ocorre devido à acidez do meio, resultando na diminuição da massa molecular e, consequentemente, na viscosidade da solução com o passar do tempo (GHOBEIRA *et al.*, 2018). Além disso, os pesquisadores concluíram em seu estudo que utilizar a solução de PCL 24 horas após a sua total dissolução gera fibras demasiadamente finas e quebradiças, com a presença de diversas contas. Esta observação enfatiza a degradação pronunciada, que é confirmada com o declínio significativo na viscosidade da solução de aproximadamente 780 para 240 cP em apenas um dia após a dissolução do PCL (GHOBEIRA *et al.*, 2018). A qualidade inferior das fibras é resultado, portanto, da viscosidade reduzida, pois a solução pouco viscosa não suporta as grandes deformações e esforços a que é submetida durante o processo de eletrofiação.

A utilização do sistema de solventes benignos, composto por ácido acético e ácido fórmico (AA e AF), para solubilização do PCL é o maior ponto de inovação neste trabalho, pois existem poucas referências sobre o processo de eletrofiação do PCL com esta combinação de solventes.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

A policaprolactona (PCL) ($M_n = 80.000$ g/mol) foi fornecida pela Sigma-Aldrich e utilizado da forma que foi recebido, sem nenhuma purificação. Este polímero é solubilizado em uma mistura de ácido acético glacial (AA) e ácido fórmico (AF) 99-100% (nas proporções iniciais de 1:2 e 1:3 v/v, respectivamente) ambos obtidos da VWR Chemicals.

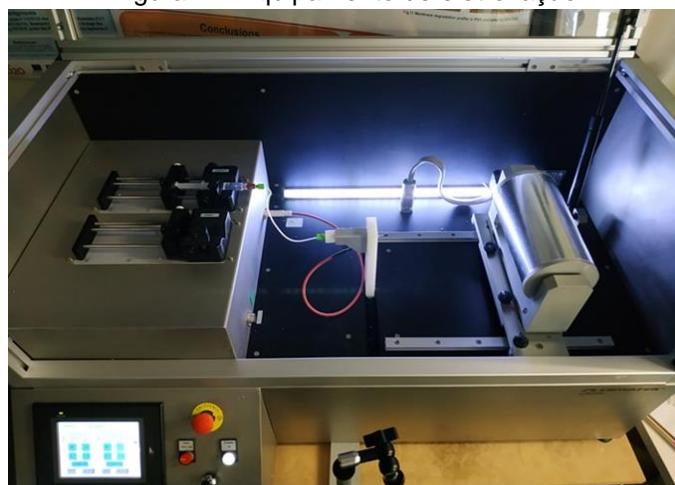
Para as soluções, foram usadas as seguintes concentrações poliméricas: 12%, 14% e 15%. (m/V). A escolha dos teores de PCL foi baseada em artigos (GHOBEIRA *et al.*, 2018; LIVERANI; BOCCACCINI, 2016) e experimentos semelhantes realizados previamente no laboratório.

3.2 PRODUÇÃO DE FIBRAS POR ELETROFIAÇÃO

Durante a primeira etapa da produção de fibras eletrofiadas, correspondente à dissolução do PCL em AA e AF, a solução fica sob agitação durante um período de dezoito horas quando em temperatura ambiente, ou uma hora em banho-maria a 45°C, para otimização do tempo.

Para o processo de eletrofiação propriamente dito, o Fluidnatek LE-10, fabricado pela Biolnicia, foi o dispositivo utilizado para gerar as nanofibras de PCL (Figura 7).

Figura 7 – Equipamento de eletrofiação



Fonte: Autoria própria (2020)

O dispositivo coletor escolhido para a realização dos experimentos foi um cilindro rotativo de 35 cm de comprimento e 10 cm de diâmetro, coberto por uma folha de papel alumínio de mesmas dimensões. Com o intuito de confirmar a sua importância para o alinhamento das fibras, a velocidade de rotação do coletor foi variada de 500 rpm a 2000 rpm, sendo este último o valor máximo atingido pelo equipamento.

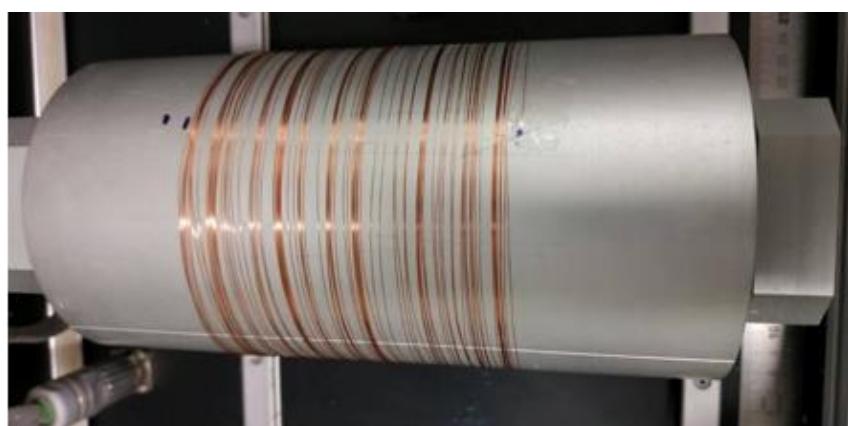
A partir do valor da velocidade angular de rotação, é possível calcular a velocidade linear na superfície do cilindro a partir da Equação 1:

$$v = \omega \cdot r \quad (\text{Eq. I})$$

Onde v = velocidade linear [m/s], ω = velocidade angular [rad/s] e r = raio do cilindro (m).

Algumas modificações foram realizadas no dispositivo coletor, a fim de tentar melhorar o grau de alinhamento das fibras de PCL obtidas. A primeira delas, denominada modificação 1, consistiu em enrolar ao redor do cilindro arame de cobre da marca Velleman, com 0,2 mm de diâmetro, como mostra a Figura 8. A ideia era utilizar o campo elétrico externo produzido pelos fios de cobre para controlar a direção do jato da solução. Para posterior retirada da membrana, o cilindro com fios foi coberto na maioria das vezes com folha de alumínio nas mesmas dimensões do dispositivo coletor. Houve uma exceção na qual se utilizou papel celofane no lugar do papel alumínio.

Figura 8 - Arame de cobre enrolado ao redor do cilindro coletor.

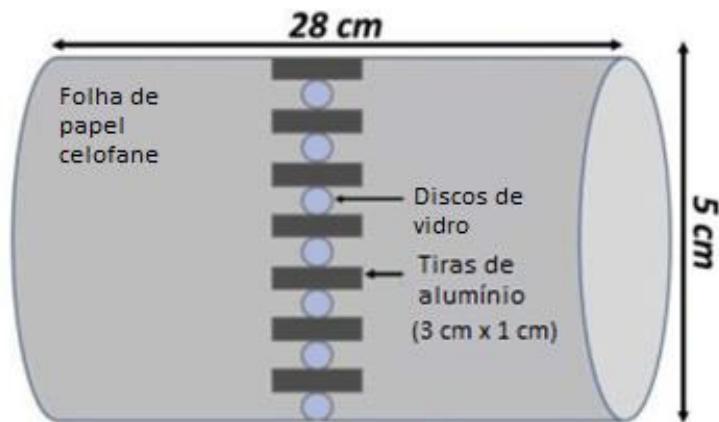


Fonte: Autoria própria (2020)

A segunda alteração, denominada modificação 2, baseia-se no estudo realizado por Gobheira *et al.* (2018), no qual uma considerável melhora no grau de alinhamento foi obtida após utilizarem a combinação do efeito mecânico da rápida velocidade de rotação do cilindro (3000 rpm) com a adição de forças elétricas provenientes de tiras retangulares de alumínio (3 cm x 1 cm) posicionadas em paralelo sobre o cilindro coletor coberto com uma folha de papel celofane. Foram utilizados discos de vidro entre as tiras de alumínio para coletar as nanofibras obtidas.

A montagem utilizada por Gobheira *et al.* (2018) em seu experimento está representado na Figura 9.

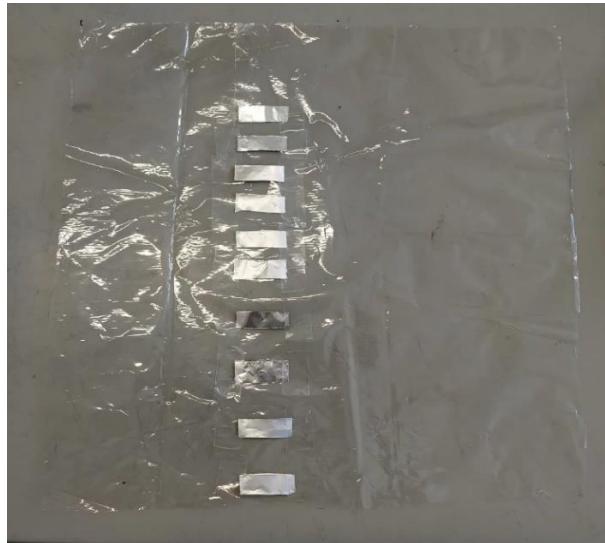
Figura 9 – Montagem do coletor e modificações adotadas por Gobheira *et al.* em seu experimento.



Fonte: Adaptado de Ghobeira *et al.* (2018)

Diferentemente do estudo usado como referência, as tiras retangulares foram recortadas de folhas de papel alumínio de cozinha. Elas foram coladas ao papel celofane com fita adesiva, como mostra a Figura 10. Além disso, não foram utilizados discos de vidro, portanto as amostras da membrana para análise foram retiradas diretamente do próprio papel celofane. As dimensões adotadas no experimento foram preservadas, com exceção da distância entre as tiras de alumínio, na qual foi adotado o valor de 1 cm.

Figura 10 - Papel celofane com tiras de folha fina de alumínio colocado sobre o coletor, como tentativa de aumentar o grau de alinhamento das fibras.



Fonte: Autoria própria (2020)

Diferentes distâncias entre agulha e o cilindro coletor também foram testadas para produção das nanofibras: 10, 13, 18 e 20 cm. Os valores foram escolhidos com base em experiências prévias realizadas no laboratório.

Uma tensão de 18 kV foi mantida constante em todos os experimentos. Este valor escolhido por ser favorável à formação do Cone de Taylor, resultando em uma condição de estado estacionário para todas as concentrações de PCL utilizadas. Já o fluxo de injeção na agulha é levemente variado nos experimentos entre 0,4 e 0,5 mL/h para garantir um jato estável permanente durante todo o período de eletrofiação.

O processo de eletrofiação neste estudo foi realizado à temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2$) e o uso de um desumidificador ajudou a controlar a umidade no laboratório, nos dias que esta se apresentava muito elevada.

As membranas produzidas e os respectivos parâmetros utilizados na fase de aperfeiçoamento dos parâmetros de eletrofiação estão listados na Tabela 5. As amostras foram produzidas de forma aleatória em relação à disposição dos experimentos para reduzir os efeitos dos erros não controlados. No entanto, elas foram numeradas em ordem crescente pela concentração de PCL, seguida da distância de trabalho e, por último, velocidade de rotação para melhorar a organização deste trabalho.

Tabela 5 - Membranas produzidas por eletrofição e seus respectivos parâmetros de processamento e da solução.

Amostra	Sigla	Concentração de PCL (%)	Distância de trabalho (cm)	Velocidade (rpm)	Modificação 1	Modificação 2	Proporção entre os solventes (AA:AF)	Fluxo na agulha (mL/h)	Tensão (kV)
1	12C18D2000V12P	12	18	2000	Não	Não	1:2	0,4	18
2	12C13D2000V12P	12	13	2000	Não	Não	1:2	0,5	18
3	12C13D2000V12PM1	12	13	2000	Sim	Não	1:2	0,5	18
4	14C10D2000V12P	14	10	2000	Não	Não	1:2	0,4	18
5	14C13D2000V12P	14	13	2000	Não	Não	1:2	0,4	18
6	14C13D2000V12PM1	14	13	2000	Sim	Não	1:2	0,4	18
7	14C13D2000V12PM1	14	13	2000	Sim	Não	1:2	0,5	18
8	14C18D500V12P	14	18	500	Não	Não	1:2	0,4	18
9	14C18D1000V12P	14	18	1000	Não	Não	1:2	0,4	18
10	14C18D1000V12P	14	18	1000	Não	Não	1:2	0,4	18
11	14C18D2000V12P	14	18	2000	Não	Não	1:2	0,4	18
12	14C18D2000V12PM2	14	18	2000	Não	Sim	1:2	0,5	18
13	14C20D2000V12P	14	20	2000	Não	Não	1:2	0,4	18
14	15C18D2000V12P	15	18	2000	Não	Não	1:2	0,5	18
15	15C18D2000V12P	15	18	2000	Não	Não	1:2	0,5	18
16	15C18D2000V12P	15	18	2000	Não	Não	1:2	0,5	18
17	15C18D2000V13P	15	18	2000	Não	Não	1:3	0,5	18
18	15C18D2000V13PM1	15	18	2000	Sim	Não	1:3	0,4	18
19	15C18D2000V13PM2	15	18	2000	Não	Sim	1:3	0,5	18
20	15C18D2000V13PM2	15	18	2000	Não	Sim	1:3	0,5	18

Fonte: Autoria própria (2020)

As siglas também foram criadas para facilitar a identificação das amostras. Usando como exemplo a membrana 1 (12C18D2000V12P), tem-se: 12C representa uma concentração de PCL de 12%, 18D é a distância de trabalho de 13cm, 2000V equivale a uma velocidade de rotação de 2000 rpm e 12P significa que a proporção entre os solventes é de 1:2 (AA:AF). As membranas que foram produzidas nos coletores com as modificações 1 e 2 apresentam também, respectivamente, M1 ou M2 no final de suas siglas.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS

3.3.1 Análise microestrutural por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As membranas para análise microestrutural através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram preparadas num disco de alumínio, usando uma fita dupla adesiva de carbono, e recobertas com fina camada de ouro/paládio para aumento da condutividade elétrica da superfície da membrana.

Posteriormente, as amostras foram analisadas usando o Microscópio Eletrônico de Varredura da marca Hitachi S-4100 (Tóquio, Japão), operado a uma tensão de aceleração de 25kV e as imagens foram obtidas em três diferentes ampliações: 500x, 1.000x e 6.000x.

3.3.2 Avaliação do diâmetro médio das fibras

Utilizando o programa de análise ImageJ (*National Institutes of Health, USA*) foi possível medir o tamanho de cada fibra perpendicularmente ao seu eixo longitudinal. A partir de 90 fibras, encontradas em 3 diferentes imagens microfotografadas no MEV de uma mesma amostra (mesmas condições), o diâmetro médio das fibras de cada membrana foi calculado. Após todas as medições, os dados foram traduzidos em um histograma através do programa *SPSS Statistics* (IBM, USA).

3.3.3 Avaliação do alinhamento das fibras

A quantificação do alinhamento das fibras em função das variáveis utilizadas na eletrofiação foi feita pela aplicação da transformada rápida de Fourier (TRF). Para isso, imagens obtidas no MEV foram inicialmente redimensionadas para 351 x 256 pixels e depois processadas com a ajuda do programa de análise ImageJ.

Tal ferramenta aplica na imagem um algoritmo de transformada de Fourier, que transforma as informações de intensidade de pixels da imagem de um domínio espacial para um domínio de frequências, apresentado no espectro de potências. Este por sua vez permite uma melhor interpretação de como as fibras se posicionam espacialmente na imagem.

Por último, entrando no menu “Directionality” do pacote Fiji, extensão do programa ImageJ, construiu-se histogramas que tem a função de indicar a quantidade de fibras em uma determinada direção. Os ângulos do histograma são reportados sendo 0º a direção Leste e a orientação percorrendo o sentido anti-horário.

3.3.4 Avaliação química por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

As análises de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, ou em inglês *Fourier transform infrared spectroscopy* (FTIR), foram conduzidas no equipamento FTIR Tensor 27, fabricado pela Bruker Corporation (USA). Este foi utilizado sob as condições de obtenção de espetros na região de IV-médio (4000 – 350 cm⁻¹), com resolução de 4 cm⁻¹ e 256 varreduras. O espectro foi adquirido em modo de absorbância.

3.3.5 Análise térmica por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise térmica do PCL por calorimetria exploratória diferencial, ou em inglês *differential scanning calorimeter* (DSC), foi realizada com o equipamento DSC-50, da marca Shimadzu (Japão). Foram realizados dois ciclos, um de aquecimento e outro de resfriamento, ambos a uma taxa de 10 °C/min, e a faixa de temperaturas percorrida foi entre 25 – 95 °C.

3.3.6 Avaliação mecânica por ensaios de tração

A avaliação mecânica das membranas foi realizada através de ensaios de tração e utilizou-se uma máquina de ensaios mecânicos para micro materiais, Figura 11, modelo MMT101-N, da marca Shimadzu (Japão). Os ensaios foram realizados com a velocidade de 1 mm/min e força de 0,1 N.

Figura 11 - Equipamento MMT-101N, da Shimadzu, para ensaios mecânicos com micro materiais.



Fonte: Autoria própria (2020)

Durante a fase de caracterização da membrana de PCL selecionada (Seção 4.4), o ensaio de tração foi realizado em 6 corpos de prova obtidos das membranas A e B, com as seguintes dimensões: 7 mm de largura e 15 mm de altura. As espessuras dos corpos de prova foram avaliadas individualmente com o micrômetro e os resultados estão reportados na Tabela 6.

Tabela 6 – Espessura dos corpos de prova das membranas A e B.

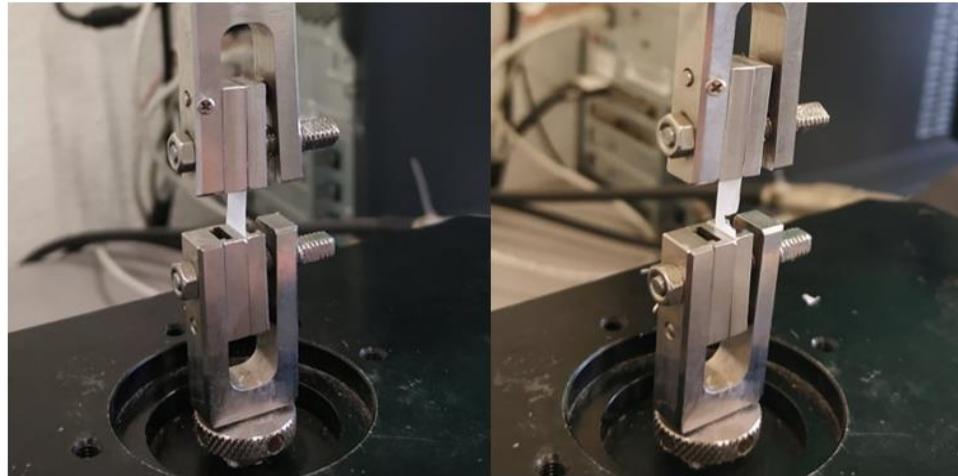
	Corpos de prova	Espessura (μm)
Membrana A	1	52 \pm 5
	2	50 \pm 5
	3	57 \pm 5
Membrana B	1	53 \pm 5
	2	46 \pm 5
	3	52 \pm 5

Fonte: Autoria própria (2020)

A incerteza associada ao valor da espessura de cada um dos corpos de prova equivale à metade da menor divisão da escala do micrômetro, que é de 0,01 mm.

Na Figura 12 consegue-se observar um dos corpos de prova durante o ensaio de tração, antes e após o início da sua ruptura.

Figura 12 - Membrana de PCL sendo submetidas ao ensaio de tração, antes e após o início da sua ruptura.



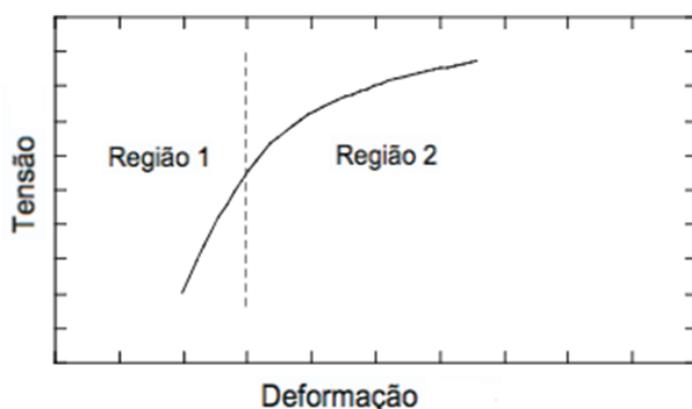
Fonte: Autoria própria (2020)

A Figura 13 representa um gráfico típico, simplificado, da tensão em função da deformação das amostras. A região 1 é denominada como zona elástica e a região 2 é a zona plástica (TAVARES, 2011). A zona elástica é a região da curva em que o material apresenta comportamento linear, ou seja, a força requerida para deformar o material é diretamente proporcional à sua deformação. Esse comportamento é descrito pela Lei de Hooke:

$$F = -k \cdot x \quad (\text{Eq. II})$$

Onde F é a força aplicada [N], x é a deformação [m] e k é uma constante de proporcionalidade conhecida como constante de elasticidade [N/m].

Figura 13 - Representação de Curva Tensão x Deformação de um material.



Fonte: TAVARES (2011)

O módulo de Young (E) é um parâmetro indicativo da resistência de um material à deformação elástica e, portanto, dá uma indicação da rigidez do material (TAVARES, 2011). Seu valor é constante onde a Lei de Hooke é obedecida e geralmente é medido em MPa.

No gráfico de tensão x deformação, o módulo de Young equivale ao declive da curva na região 1 (Figura 13).

3.3.7 Estimativa da porosidade das membranas

Sabe-se que a porosidade (P) de um material é a razão percentual entre o volume de espaços vazios, ou poros (V_p), e o volume total (V) de uma amostra (FERNANDES, 2011). Sendo o volume total constituído pela soma entre V_p e o volume do conteúdo sólido da amostra (V_s) (FERNANDES, 2011), temos:

$$P(\%) = \frac{V_p}{V} \times 100 = \frac{V - V_s}{V} \times 100 = \left(1 - \frac{V_s}{V}\right) \times 100 \quad (\text{Eq. III})$$

A unidade de volume utilizada foi o cm^3 .

A porosidade das membranas de PCL foi estimada a partir da avaliação de 6 amostras com dimensões de $3 \times 3 \text{ cm}$. Com base nos valores de espessura (e), medida com um micrômetro, e da massa (m), medida por meio da balança de precisão, foi possível calcular o valor da densidade aparente dos corpos de prova por meio da fórmula:

$$\rho_{\text{aparente}} = \frac{m}{V} \quad (\text{Eq. IV})$$

Onde: m = massa [g], ρ_{aparente} = densidade aparente [g/cm^3].

Pelo fato das amostras serem pequenos paralelepípedos, o volume destas pode ser calculado pela seguinte fórmula:

$$V = l \cdot c \cdot h \quad (\text{Eq. V})$$

Onde: l = largura [cm], c = comprimento [cm] e h = altura [cm].

Como a massa da amostra é uma medida referente apenas ao seu conteúdo sólido de densidade (ρ_s), então $m = \rho_s \times V_s$. A porosidade é então dada por:

$$P(\%) = \left(1 - \frac{\rho_{aparente}}{\rho_s}\right) \times 100 \quad (\text{Eq. VI})$$

A unidade de densidade utilizada foi g/cm³. Para o ρ_s do PCL considerou-se o valor do fabricante $\rho_{PCL} = 1,145$ g/cm³.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Relativamente à apresentação dos resultados quantitativos, estes são caracterizados com recurso da média e respectivo desvio padrão. As diferenças estatísticas foram determinadas pelo uso do teste de hipótese para diferença de médias seguindo uma distribuição t-Student, com um nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA PARA AS AMOSTRAS

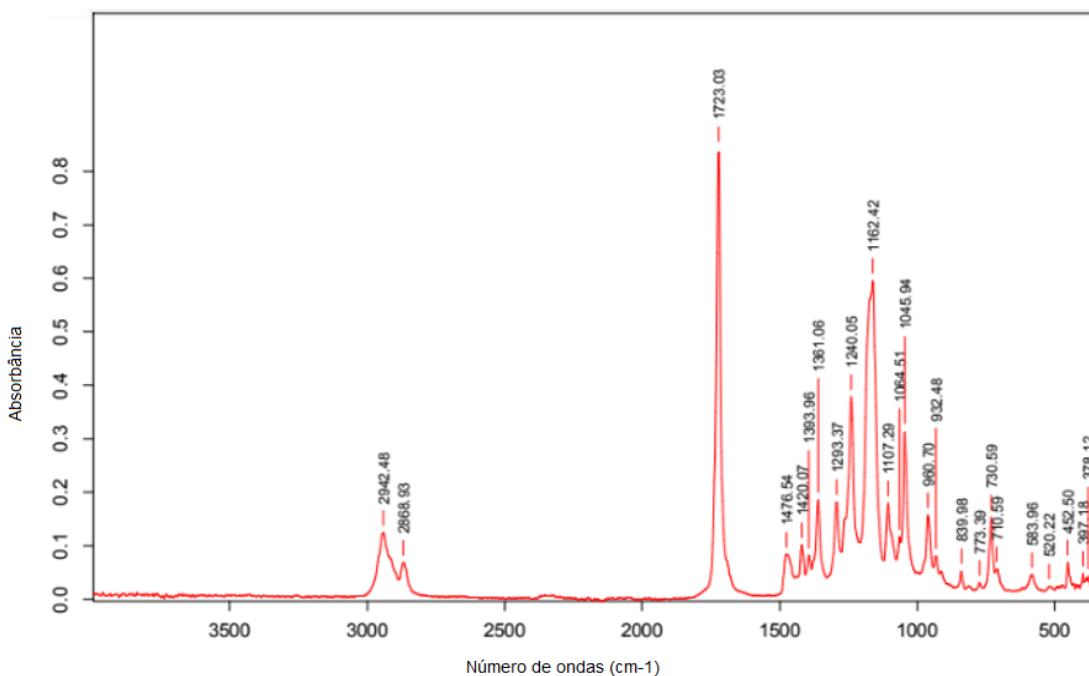
A fim de verificar a conformidade do PCL utilizado como matéria-prima para a produção das nanofibras, foram realizados os ensaios de FTIR e DSC dos grânulos de PCL.

No FTIR especificamente, foi realizada uma análise dos grupos funcionais presentes na amostra, enquanto no DSC buscou-se obter informações sobre a temperatura de fusão e de cristalização do PCL.

4.1.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

O espectro FTIR do grânulo de PCL na região de 500-4000 cm⁻¹ (Figura 14) exibe as bandas de absorção de um poliéster alifático linear e semicristalino, o que é condizente à sua estrutura. A respeito deste espectro, algumas bandas fortes, como o pico característico do grupo carbonila em torno de 1720-30 cm⁻¹ (ELZEIN *et al.*, 2004), são facilmente identificáveis. As bandas mais intensas características do PCL e suas respectivas atribuições encontram-se listadas na Tabela 7.

Figura 14 - Espectro FTIR obtido para os grânulos de PCL na região de 500-4000 cm⁻¹.



Fonte: Autoria própria (2020)

Tabela 7 - Bandas na região do Infravermelho Características do PCL.

Número de ondas (cm ⁻¹)	Grupo funcional atribuído
2942	Estiramento assimétrico CH ₂
2868	Estiramento simétrico CH ₂
1723	Estiramento carbonila (C=O)
1293	Estiramento C-O e C-C na fase cristalina
1240	Estiramento assimétrico C-O-C
1162	Estiramento simétrico C-O-C

Fonte: Adaptado de Elzein *et al* (2004)

Em adição ao pico característico do grupo carbonila, identifica-se dois picos próximos de 2942 cm⁻¹ e 2868 cm⁻¹ devido ao estiramento da ligação C-H dos grupos metil (ELZEIN *et al.*, 2004; PHILLIPSON; JENKINS, 2014). As demais bandas entre 100-1600 cm⁻¹ são atribuídas à estrutura molecular da cadeia polimérica, dobramento, vibração e estiramento do metileno (PHILLIPSON; JENKINS, 2014).

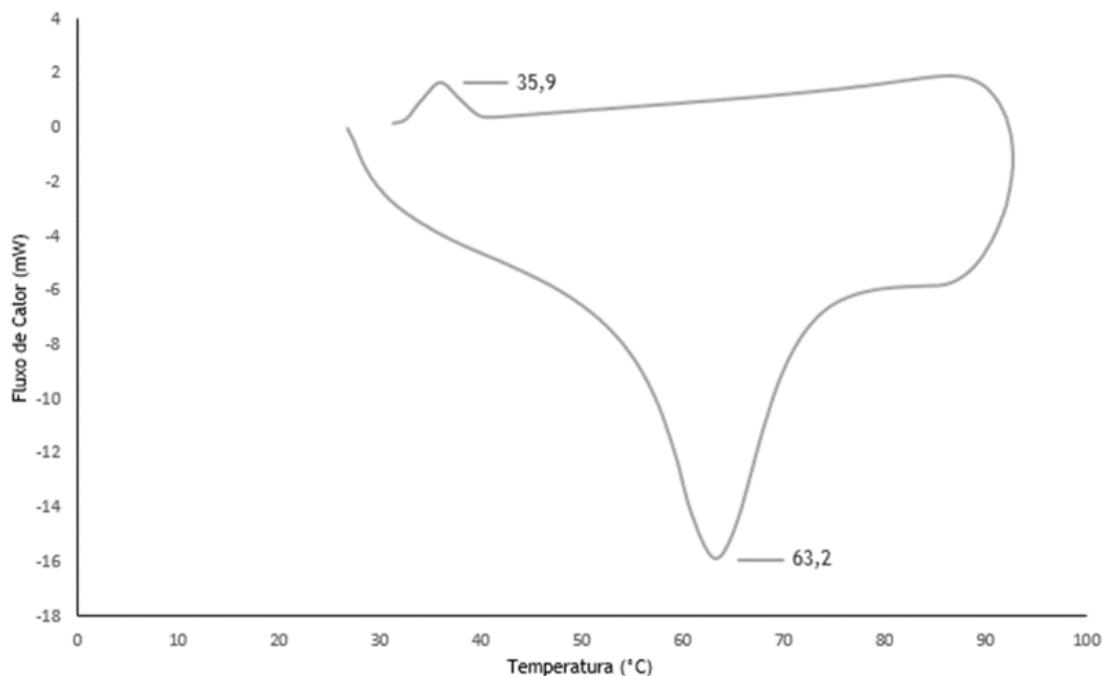
De acordo com Coleman e Zarian (1979), a banda de 1293,37 cm⁻¹ pode ser atribuída ao estiramento das ligações C-O e C-C do PCL na fase cristalina. A presença deste pico indica, portanto, que existe um certo grau de cristalinidade na amostra analisada. Este resultado era esperado, visto que a policaprolactona é um polímero semicristalino, geralmente com alta cristalinidade à temperatura ambiente.

4.1.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A realização do ensaio de calorimetria exploratória diferencial (DSC) é imprescindível para maior entendimento do comportamento do material a diferentes temperaturas.

Na Figura 15 encontra-se a curva de DSC obtida após ensaio de aquecimento e resfriamento dos grânulos de PCL. Nela, observam-se duas temperaturas de transição características de polímeros semicristalinos: a temperatura de cristalização (T_c) e a temperatura de fusão (T_m).

Figura 15 - Curva de DSC do grânulo -de PCL após aquecimento até 120 °C e posterior resfriamento.



Fonte: Autoria própria (2020)

Segundo Canevarolo (2010), é no ponto de fusão que a energia do sistema atinge o patamar necessário para vencer as forças intermoleculares secundárias entre as cadeias da fase cristalina, de forma a destruir o arranjo regular de empacotamento, passando assim do estado borrachoso para o estado viscoso (fundido). Como esta transição só ocorre na fase cristalina, ela é existente apenas para polímeros semicristalinos, como o PCL.

Na curva de DSC (Figura 15), o valor de T_m encontrado para a amostra de PCL foi de 63,2 °C. Este valor é obtido a partir do máximo do pico endotérmico. O fato do pico de fusão estar bem definido e intenso indica que o polímero em questão apresenta um elevado grau de cristalinidade (RAMOS, 2011). Além disso, de acordo com da Paz *et al.* (2016) o ponto de fusão do PCL fica entre 59 e 64 °C, dependendo do seu conteúdo cristalino, valor condizente com o obtido no experimento.

O outro pico visível na curva de DSC, desta vez exotérmico, fornece a temperatura de cristalização do PCL, cujo valor foi de $T_c = 35,9$ °C. Durante o resfriamento de um polímero semicristalino a partir de uma temperatura superior à T_m , este atingirá em determinado momento uma temperatura suficientemente baixa, na qual uma grande quantidade de cadeias poliméricas consegue se organizar

espacialmente de forma regular (FREITAS, 2014). Esta ordenação espacial permite a formação de uma estrutura cristalina naquela região (FREITAS, 2014).

Além destes valores, o PCL apresenta temperatura de transição vítreia (T_g) em torno de -60 °C (DA PAZ *et al.*, 2016; FREITAS, 2014; RAMOS, 2011), valor que está fora da faixa de temperaturas analisada durante o ensaio de DSC e por isso não pode ser registrado. O valor da T_g é importante, pois abaixo dela o polímero não têm energia suficiente para permitir o deslocamento de uma cadeia em relação a outra por mudanças conformacionais e, portanto, encontra-se em estado rígido e quebradiço.

4.2 APERFEIÇOAMENTO DOS PARÂMETROS DE ELETROFIAÇÃO

Após a etapa de caracterização dos grânulos de PCL utilizados como matéria-prima, iniciou-se a produção de uma série de membranas por meio da técnica de eletrofiação e estudou-se o efeito dos parâmetros de processamento e parâmetros intrínsecos da solução na obtenção de membranas adequadas à ROG e RTG.

Atendendo aos parâmetros reportados na literatura com maior influência no diâmetro e alinhamento das nanofibras optou-se por estudar o efeito dos seguintes parâmetros: distância de trabalho, velocidade de rotação do cilindro coletor, concentração da solução. Também, foram anotados os valores da umidade e temperatura no processo.

O que se pretende em membranas de barreira para ROG e RTG é um perfil de fibras alinhadas, já que esta morfologia apresenta propriedades mecânicas e biológicas mais adequadas. Por outro lado, deseja-se uma faixa de diâmetro numa gama entre 50 e 500 nm, já que este intervalo mimetiza de forma mais eficiente a matriz extracelular de colágeno à qual as células são expostas habitualmente.

Além disso, é importante que as nanofibras não apresentem uma grande quantidade de contas em sua estrutura, pois isto prejudica tanto as propriedades mecânicas do material quanto a taxa de proliferação celular.

4.2.1 Parâmetros ambientais

Para compreender a influência dos parâmetros ambientais na morfologia das nanofibras por eletrofiação, foram estudadas quatro amostras: 9, 10, 15 e 16 (Tabela 5).

Analisou-se primeiramente as amostras 9 e 10, ambas com a sigla 14C18D1000V12P, produzidas sobre a mesma formulação e parâmetros, com exceção da temperatura e umidade ambiente. Os parâmetros da solução e do equipamento utilizados estão elencados na Tabela 5 e a temperatura e umidade de trabalho encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8 - Parâmetros ambientais durante produção das amostras 9 e 10.

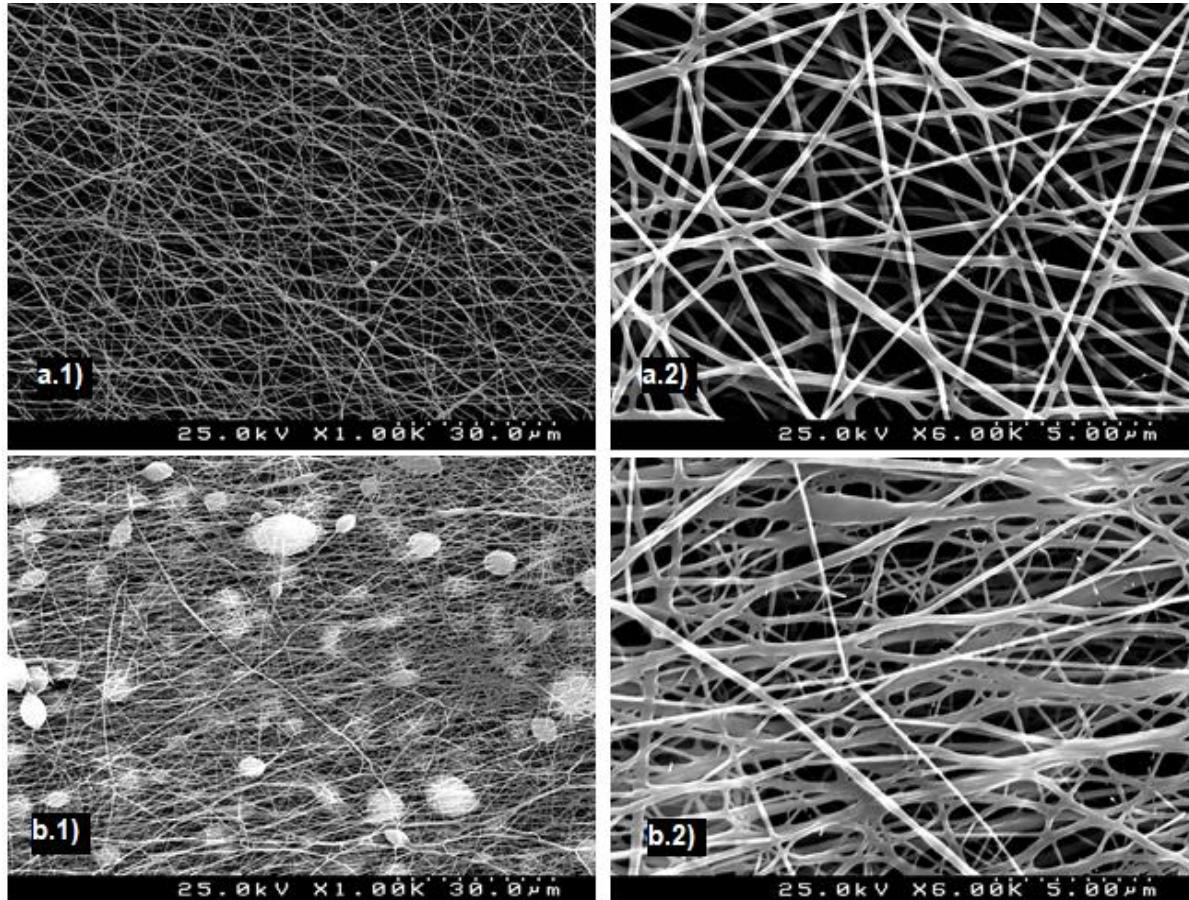
Amostras	Temperatura (°C)	Umidade do ar (%)
9	24,9	58
10	25,8	49

Fonte: Autoria própria (2020)

As imagens obtidas no MEV destas duas amostras revelam microestruturas significativamente diferentes. A amostra 9 (Figura 16b), fabricada em ambiente com menor temperatura, porém maior teor de umidade, revelou uma presença muito maior de contas em sua microestrutura em relação à amostra 10 (Figura 16a), além de fibras de pior qualidade, visualmente coalescidas.

É possível que a umidade elevada tenha removido cargas eletrostáticas em certos pontos da superfície da solução polimérica. Essa quebra de homogeneidade de cargas contribui, portanto, para a geração de contas nas nanofibras produzidas.

Figura 16 - Imagens tiradas no MEV de: a) Amostra 10 (49% de umidade); b) Amostra 9 (58% de umidade). Com aumentos de 1.000x e 6.000x.

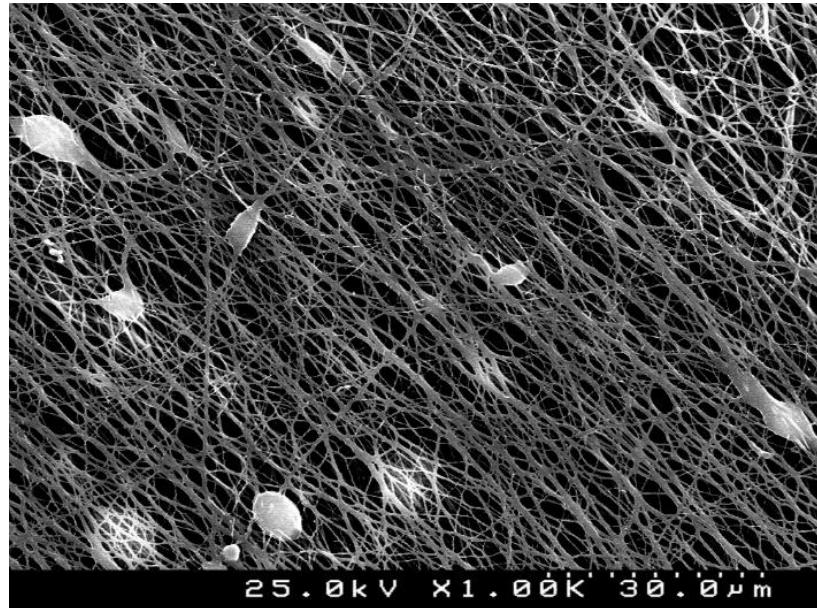


Fonte: Autoria própria (2020)

As amostras 15 e 16, de siglas 15C18D2000V12P, também foram produzidas em ambiente com umidades elevadas, de 62% e 57%, respectivamente. Ambas acabaram por apresentar os mesmos defeitos identificados na amostra 9, o que mais uma vez contribui para a conclusão de que teores de umidades acima de 55% já se tornam prejudiciais ao processo de eletrofição, pois geram nanofibras com maior número de defeitos como o da presença de contas e fibras coalescidas entre si.

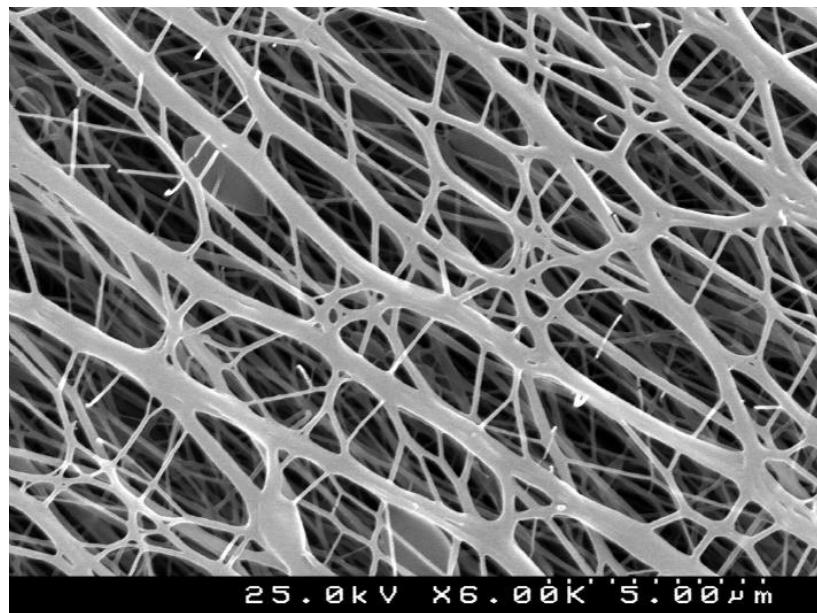
A Figura 17 revela a microestrutura da membrana 15, enquanto a Figura 18 é uma microfotografia do MEV da membrana 16.

Figura 17 - Presença de contas observada na amostra 15. Microfotografia do MEV com aumento de 1.000x.



Fonte: Autoria própria (2020)

Figura 18 - Nanofibras coalescidas na amostra 16. Microfotografia do MEV com aumento de 6.000x.



Fonte: Autoria própria (2020)

Com as amostras produzidas e a faixa de temperaturas de trabalho estudada (22 - 27 °C), não foi possível relacionar nenhuma mudança na microestrutura com alterações na temperatura ambiente. Também, não foi identificada a influência de

teores de umidade muito baixos na qualidade das fibras, uma vez que todos os experimentos foram realizados com uma umidade acima de 36%.

A grande influência da umidade no processo de eletrofiação é um problema relatado em diversos estudos (BHARDWAJ; KUNDU, 2010; CASPER *et al*, 2003; DE VRIEZE *et al*, 2009; HAIDER; HAIDER; KANG, 2018; PELIPENKO *et al.*, 2013). De Vrieze *et al* (2009), por exemplo, conduziram experimentos para analisar justamente de que forma a temperatura e a umidade ambiente afetam a morfologia das fibras, devido à importante influência que os parâmetros ambientais exercem na eletrofiação.

Com a confirmação de que os valores de umidade alteram de forma significativa a morfologia das nanofibras produzidas por eletrofiação, o ideal seria que as membranas fossem todas produzidas a um mesmo teor de umidade e, preferencialmente, sob mesma temperatura ambiente.

No entanto, como no laboratório utilizado este controle dos parâmetros ambientais não era possível, limitou-se apenas a utilizar um desumidificador para fabricar as fibras naqueles dias em que a umidade estava acima de 55%. Por este motivo, a influência dos parâmetros ambientais é desprezada na análise dos demais parâmetros.

4.2.2 Parâmetros operacionais

4.2.2.1 Velocidade de rotação do cilindro coletor

A velocidade de rotação do cilindro coletor, que é tida como o parâmetro de maior influência no alinhamento das fibras no processo de eletrofiação, foi analisada a partir das amostras 10 (14C18D1000V12P) e 11 (14C18D2000V12P). As velocidades utilizadas no processo foram de 1000 e 2000 rpm, respectivamente. Os demais parâmetros são iguais para as duas membranas, como se pode observar na Tabela 5.

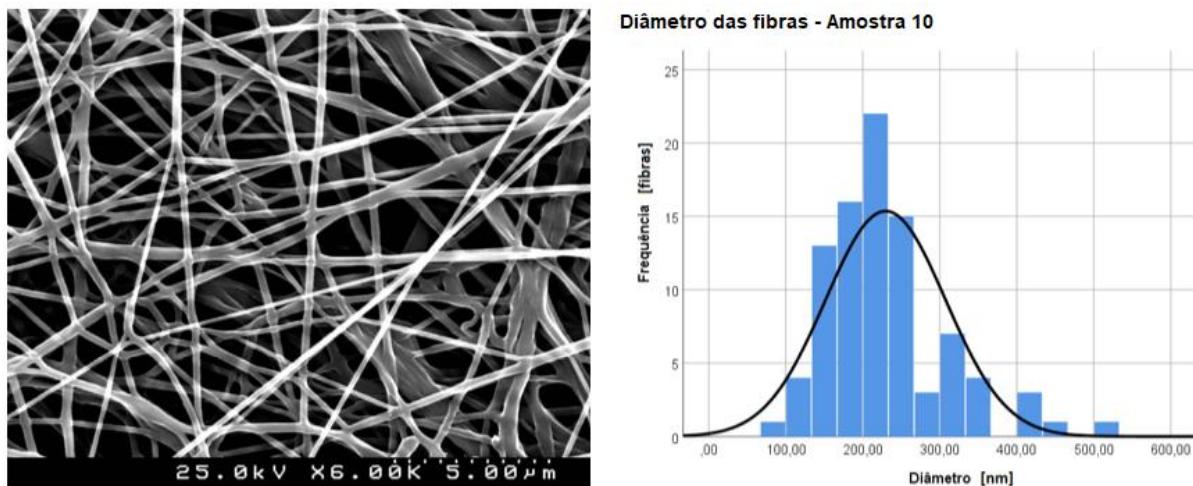
Os resultados encontrados referentes ao tamanho das fibras destas duas amostras, analisadas com ajuda do programa de imagem *ImageJ*, estão reportados na Tabela 9 e nas Figuras 19 e 20.

Tabela 9 - Diâmetro médio das fibras, desvio padrão e velocidades de rotação e linear do cilindro, utilizados na fabricação das membranas 10 e 11.

Amostra	Diâmetro médio das fibras	Desvio padrão	Velocidade de rotação do cilindro	Velocidade linear da superfície do cilindro
10	230 nm	78 nm	1000 rpm	5,23 m/s
11	196 nm	56 nm	2000 rpm	10,47 m/s

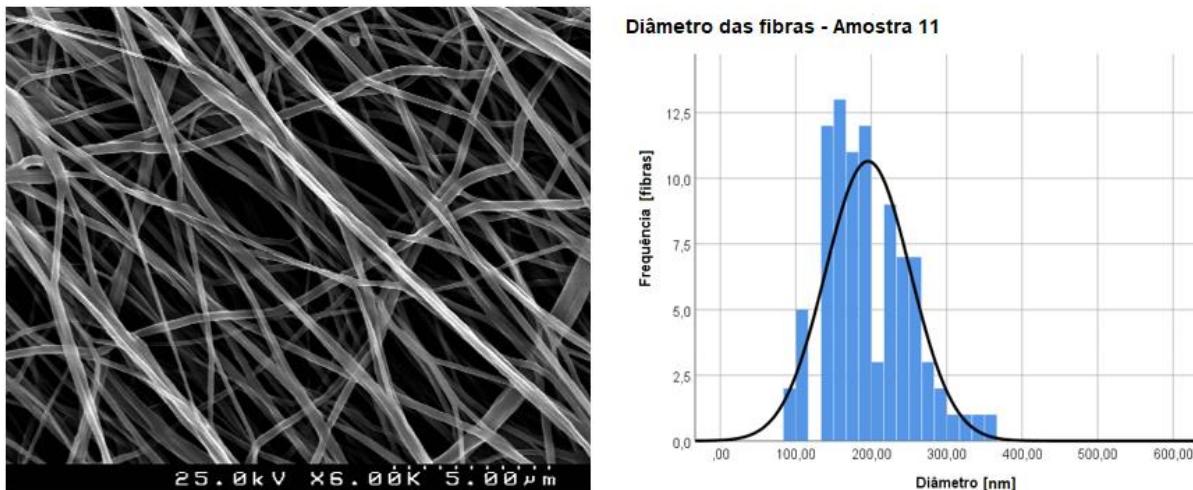
Fonte: Autoria própria (2020)

Figura 19 - Microfotografia do MEV com aumento de 6.000x e histograma com a distribuição do diâmetro das nanofibras da amostra 10 (14C18D1000V12P).



Fonte: Autoria própria (2020)

Figura 20 - Microfotografia do MEV com aumento de 6.000x e histograma com a distribuição do diâmetro das nanofibras da amostra 11 (14C18D2000V12P).



Fonte: Autoria própria (2020)

A importância do conhecimento do valor da velocidade linear na superfície do cilindro, calculado a partir da equação I, está no fato dele corresponder à velocidade na qual as fibras são depositadas no coletor, após aceleração devido ao campo elétrico imposto pela alta tensão.

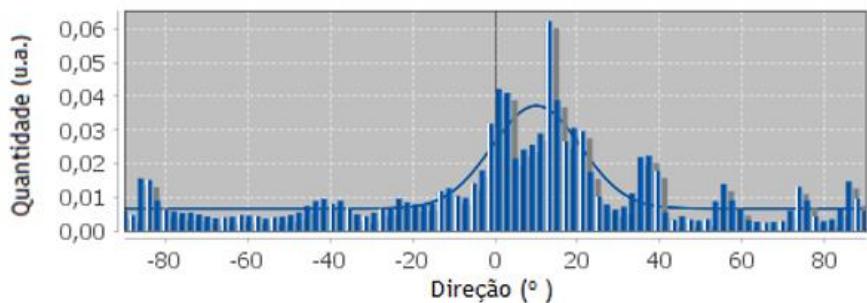
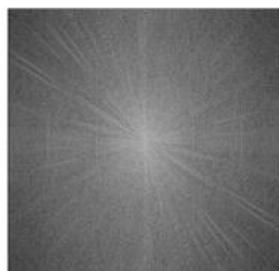
Os resultados apresentados na Tabela 9 mostram que um aumento na velocidade de rotação do cilindro coletor tem um impacto no diâmetro das fibras. Velocidades mais elevadas submetem as fibras a uma força de alongamento maior, provocando uma diminuição no tamanho médio das nanofibras.

No caso analisado, dobrar a velocidade angular de 1000 rpm para 2000 rpm causou uma redução média de aproximadamente 17% no diâmetro médio das fibras. Ao realizar o teste t-Student, confirma-se a hipótese de que as fibras são menores na amostra 11, ao nível de confiança maior do que 95%.

Também se percebe, a partir do valor do desvio padrão, que a variação nos valores do diâmetro é menor para a velocidade de 2000 rpm, ou seja, as fibras são mais uniformes.

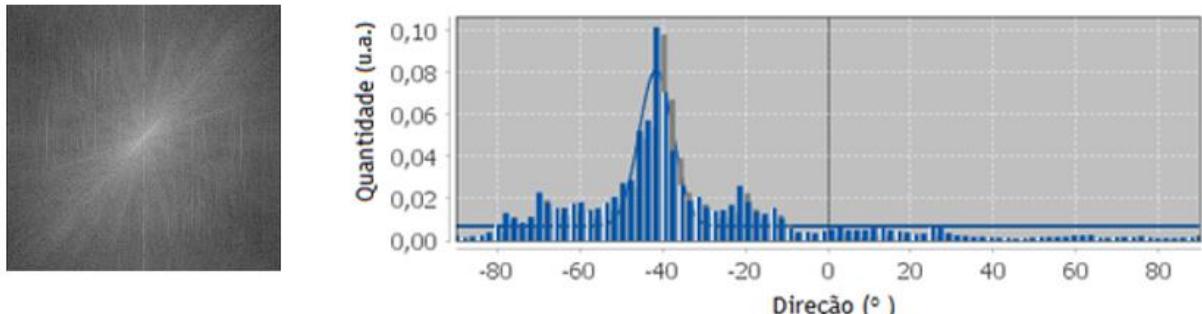
Em relação ao alinhamento das fibras na membrana, as Figuras 21 e 22 mostram o espectro da Transformada de Fourier e o histograma com a distribuição das direções das nanofibras nas amostras 10 e 11, respectivamente. A Tabela 10 também revela, com mais detalhes, informações importantes para análise do grau de alinhamento do sistema, como, por exemplo, a quantificação da dispersão das nanofibras.

Figura 21 - Espectro da TRF e histograma do comportamento direcional das nanofibras da amostra 10 (14C18D1000V12P).



Fonte: Autoria própria (2020)

Figura 22 - Espectro da TRF e histograma do comportamento direcional das nanofibras da amostra 11 (14C18D2000V12P).



Fonte: Autoria própria (2020)

Tabela 10 - Dados referentes ao alinhamento das nanofibras das amostras 10 e 11.

Amostras	Direção Preferencial (°)	Dispersão (°)	Quantidade (%)	Nível de Confiança (%)
10	10,07	10,75	52	69
11	-41,58	4,09	41	81

Fonte: Autoria própria (2020)

O espectro de potências da TRF permite uma melhor interpretação de como as fibras se posicionam espacialmente a partir das imagens obtidas no MEV do que da sua análise visual direta. No entanto, é só por meio dos histogramas com o comportamento direcional das nanofibras que se tem uma análise quantitativa do nível de alinhamento na membrana.

O menu *Directionality* do pacote Fiji do ImageJ, utilizado para gerar os histogramas das Figuras 21 e 22, estipula as estatísticas em relação ao maior pico encontrado, que por sua vez é aproximado por uma função Gaussiana, levando em conta a natureza periódica do histograma (FIJI SOFTWARE, 2018).

Na Tabela 10, a coluna “direção preferencial” representa exatamente o valor central da função gaussiana, a “dispersão” reporta o desvio padrão (s) da gaussiana e a “quantidade” é a soma do histograma desde o centro - s até o centro + s, dividido pela soma total do histograma. Por último, o nível de confiança indica o quanto preciso é este ajuste realizado, sendo 100% muito bom e 0 ruim (FIJI SOFTWARE, 2018).

O nível de alinhamento pode ser definido pela distribuição geral dos pontos no histograma: quanto mais alto e mais estreito for o pico, mais rigorosamente alinhadas as fibras estão em relação a um eixo de orientação específico. Quanto menor e mais larga a curva de distribuição for, mais arbitrariamente as fibras estão depositadas nos

eixos de orientação e, portanto, mais aleatória é a sua distribuição (GHOBEIRA *et al.*, 2018).

Assim, um alinhamento mais eficiente é refletido nas informações através de menores valores de desvio padrão, maiores valores na variável “quantidade” e, mais importante, uma menor dispersão. Também, é importante que o valor do nível de confiança seja o mais próximo possível de um, pois isto significa que a aproximação retrata de forma muito exata a realidade apresentada pelas membranas.

É possível concluir, então, a partir das figuras 21 e 22 e da Tabela 10, que aumentar a velocidade do cilindro coletor de 1000 rpm para 2000 rpm realmente melhora o grau de alinhamento das nanofibras.

Entretanto, apesar da melhoria considerável observada na amostra 11 a 2000 rpm, as fibras ainda não estão perfeitamente alinhadas em um eixo específico, um fato que é geralmente observado quando se usa exclusivamente esta técnica do coletor rotativo para melhorar o alinhamento (GHOBEIRA *et al.*, 2018). A literatura reporta que para alcançar um nível de alinhamento melhor é imprescindível uma velocidade de rotação elevada, ou um cilindro com diâmetro maior, de forma que a força de estiramento exercida por ela corresponda à velocidade com que as fibras chegam ao cilindro coletor. Caso contrário, as fibras adotam diferentes orientações (ARRAS *et al.*, 2012).

Como o equipamento utilizado não permite operar a velocidades maiores do que 2000 rpm e o diâmetro do coletor não podia ser alterado, outros parâmetros também foram explorados e modificações ao nível do processo de produção foram introduzidas com o intuito de compensar esta limitação e tentar melhorar a qualidade do alinhamento das nanofibras, mantendo o diâmetro das fibras o mais baixo possível, dentro da faixa desejada de 50 a 500 nm.

4.2.2.2 Distância de trabalho do dispositivo coletor

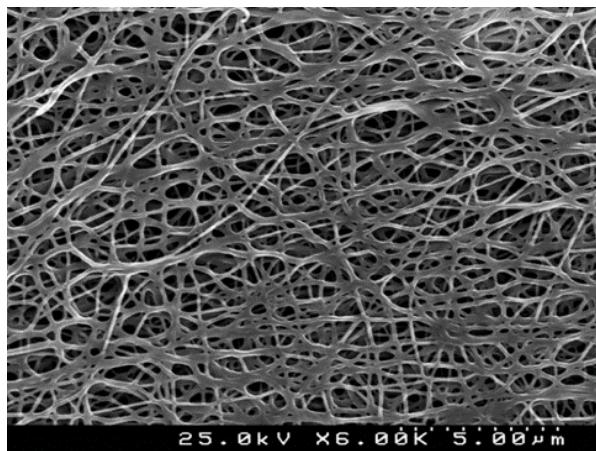
O próximo parâmetro a ser analisado foi a distância de trabalho, ou seja, a distância do dispositivo coletor até a agulha responsável pela ejeção da solução polimérica. Para isto, foram produzidas quatro membranas nas mesmas condições em termos da velocidade de rotação de 2000 rpm que indicou ser mais eficiente, a qual foi usada em todas as produções. Por outro lado, como variável de estudo usou-se as distâncias de trabalho que foram 10, 13, 18 e 20 cm. Estas membranas

correspondem as amostras 4 (14C10D2000V12P), 5 (14C13D2000V12P), 11 (14C18D2000V12P) e 13 (14C20D2000V12P).

A morfologia das nanofibras pode ser facilmente afetada pela distância de trabalho, porque ela é dependente do tempo de deposição, taxa de evaporação e intervalo de instabilidade (MATABOLA; MOUTLOALI, 2013). Desta forma, uma distância crítica precisa de ser mantida para preparar nanofibras uniformes por meio do eletrofiação, e qualquer mudança na distância entre o coletor e a agulha, seja para mais ou para menos, vai afetar a morfologia das fibras (BHARDWAJ; KUNDU, 2010).

A amostra 4 corresponde à membrana produzida com a menor distância entre o coletor e a agulha (10 cm). Ao observar a sua microestrutura na Figura 23, percebe-se rapidamente que as fibras formadas não apresentam uma boa qualidade, pois estas aparentemente estão aderidas umas às outras e de seção transversal não circular. Esta morfologia possivelmente se deve a distância de trabalho reduzida utilizada no processo de eletrofiação, a qual não foi compatível com a taxa de evaporação dos solventes AA e AF, o que fez com que as fibras chegassem ainda úmidas à superfície do coletor.

Figura 23 - Microestrutura com nanofibras grudadas na amostra 4 (distância agulha-coletor de 10 cm). Microfotografia do MEV com aumento de 6.000x.



Fonte: Autoria própria (2020)

Como a morfologia da amostra 4 não se mostrou circular, ela foi descartada na estimativa do diâmetro das suas fibras. Para as demais amostras, os resultados desta análise encontram-se na Tabela 11 e as morfologias apresentadas nas Figuras 20 (amostra 11), 24 (amostra 5) e 25 (amostra 13).

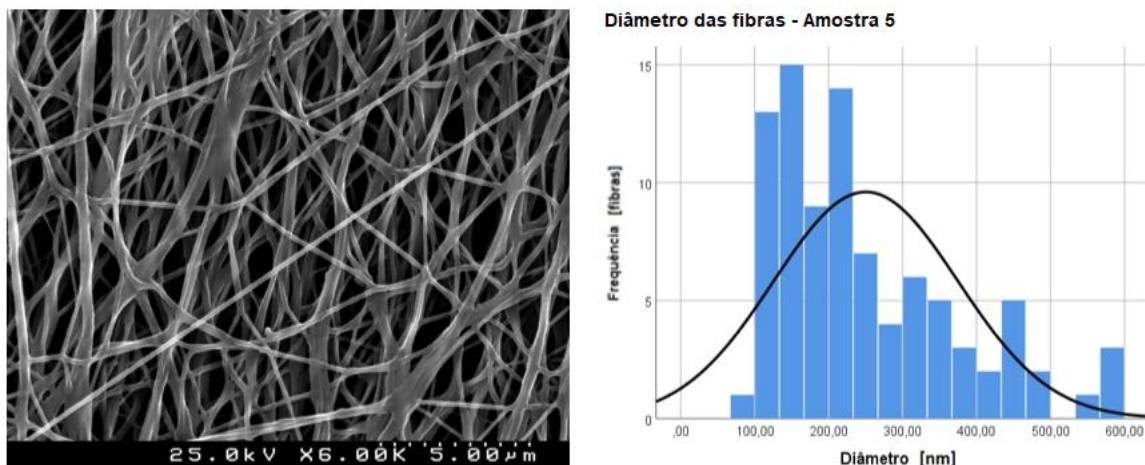
Tabela 11 - Diâmetro médio das fibras, desvio padrão e distância de trabalho do coletor para as

amostras 5, 11 e 13.

Amostra	Diâmetro médio das fibras	Desvio padrão	Distância de trabalho do coletor
5	250 nm	125 nm	13 cm
11	196 nm	56 nm	18 cm
13	134 nm	41 nm	20 cm

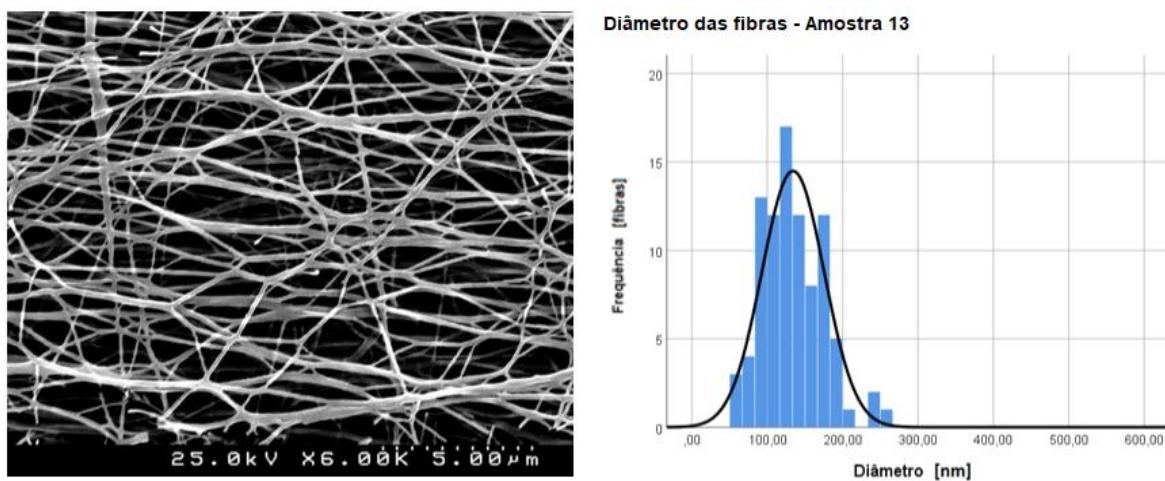
Fonte: Autoria própria (2020)

Figura 24 - Microfotografia do MEV com aumento de 6.000x e histograma com a distribuição do diâmetro das nanofibras da amostra 5 (14C13D2000V12P).



Fonte: Autoria própria (2020)

Figura 25 - Microfotografia do MEV com aumento de 6.000x e histograma com a distribuição do diâmetro das nanofibras da amostra 13 (14C20D2000V12P).



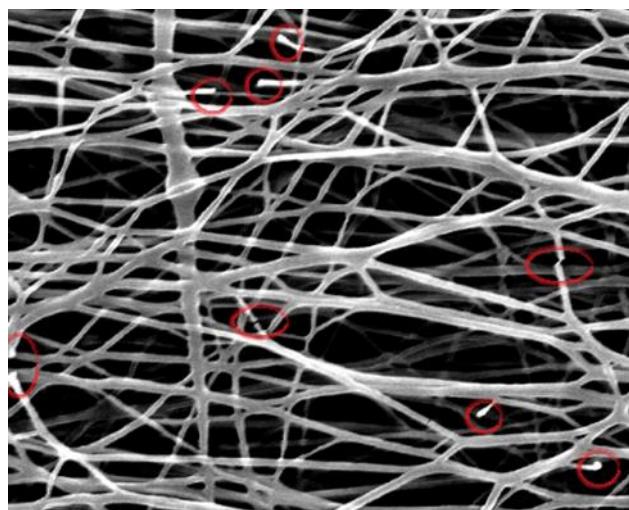
Fonte: Autoria própria (2020)

O teste de hipótese t-Student, realizado ao nível de significância de 5%, comprova que o aumento da distância de trabalho é uma variável favorável à diminuição desta medida nas nanofibras geradas.

A amostra 13, com fibras produzidas a uma distância de trabalho de 20 cm, é a que apresenta o menor valor para o diâmetro médio das fibras. Segundo Wong, Baji e Leng (2008), a tensão de ruptura e a rigidez das membranas de PCL produzidas por eletrofiação aumentam com a redução no diâmetro das fibras. Em seu estudo, foi verificado que a redução do diâmetro das fibras melhora a cristalinidade e a orientação molecular, o que explica as melhores propriedades de tração para fibras com menores diâmetros.

Porém, ao comparar as morfologias das membranas, percebe-se que a amostra 13, apesar de apresentar o menor valor para o diâmetro médio das fibras, possui um grande número de descontinuidades, as quais encontram-se assinaladas com círculos na Figura 26.

Figura 26 - Fibras descontínuas observadas na amostra 13 (14C13D2000V12P). As descontinuidades encontram-se assinaladas com círculos.



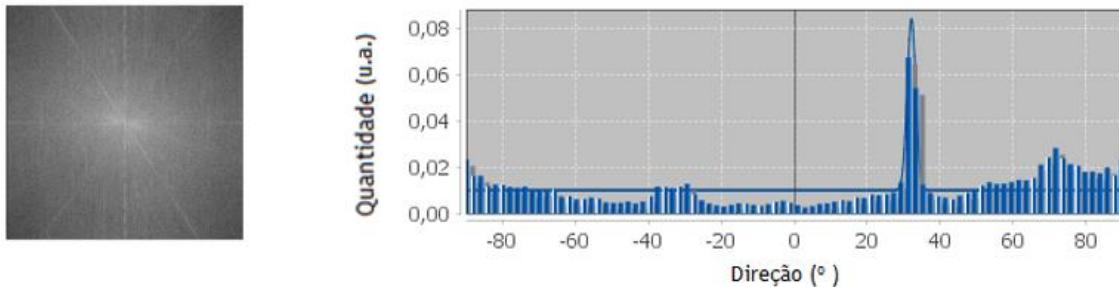
Fonte: Autoria própria (2020)

A continuidade das nanofibras produzidas por eletrofiação deve ter sido prejudicada devido à distância de trabalho adotada de 20 cm, que foi provavelmente elevada e acima do valor crítico ideal. Desta forma, as fibras se tornaram tão finas a ponto de ficarem quebradiças e se romperem em diversos pontos.

A descontinuidade das fibras é um defeito indesejado nas membranas fabricadas para ROG e RTG, visto que elas prejudicam o alinhamento das fibras e, principalmente, as propriedades mecânicas do material.

Por esta razão, as condições usadas na obtenção da amostra 13 não se mostrou adequada para a finalidade desejada e a caracterização da amostra em relação ao alinhamento das fibras não foi realizada. Já o espectro de potência da TRF e o histograma do comportamento direcional das nanofibras da amostra 5 são representados na Figura 27, para comparação com os valores obtidos para a amostra 11 e descritos na Figura 22.

Figura 27 - Espectro da TRF e histograma do comportamento direcional das nanofibras da amostra 5 (14C13D2000V12P).



Fonte: Autoria própria (2020)

Tabela 12 - Dados referentes ao alinhamento das nanofibras das amostras 5 e 11.

Amostras	Direção Preferencial (°)	Dispersão (°)	Quantidade (%)	Nível de Confiança (%)
5	32,18	1,17	12	61
11	-41,58	4,09	41	81

Fonte: Autoria própria (2020)

Analizando as amostras 5 e 11, percebe-se que, apesar da amostra 5 apresentar um valor de dispersão ligeiramente menor, o parâmetro relativo à quantidade é muito baixo, ou seja, existem poucas fibras alinhadas na direção preferencial.

Além disso, ao observar os seus histogramas, vê-se que na amostra 11 a grande maioria das nanofibras está concentrada no intervalo de direções que vai de -80° a -10° , enquanto que na amostra 5 as direções assumidas pelas nanofibras percorrem toda a faixa de -90° a 90° . Este resultado do alinhamento com o do diâmetro

médio das fibras na amostra 11, indica que a distância de 18 cm de trabalho seria a mais adequada para a produção de membranas aplicáveis em medicina regenerativa considerando os limites da variáveis estudadas para o equipamento utilizado.

4.2.3 Parâmetros intrínsecos da solução

4.2.3.1 Concentração do PCL em solução

A concentração de PCL é um dos parâmetros que exerce uma grande influência nas propriedades intrínsecas da solução. Como a massa molar da matéria-prima foi mantida fixa em 80.000 g/mol durante todos os experimentos, encontrar a concentração polimérica ideal se torna essencial para ajustar a viscosidade na faixa ótima, na qual o processo de eletrofiação se torna possível.

Para esta etapa, preparam-se membranas a partir das concentrações de PCL de 12, 14 e 15% (m/V), correspondentes às membranas 1 (12C18D2000V12P), 11 (14C18D2000V12P) e 14 (15C18D2000V12P), respectivamente, cujas características estão elencadas na Tabela 13. Nas Figuras 28 e 29 têm-se as imagens da MEV e os histogramas com a distribuição do diâmetro das nanofibras das amostras 1 e 14, respectivamente. Estas informações referentes à amostra 11 encontram-se na Figura 20.

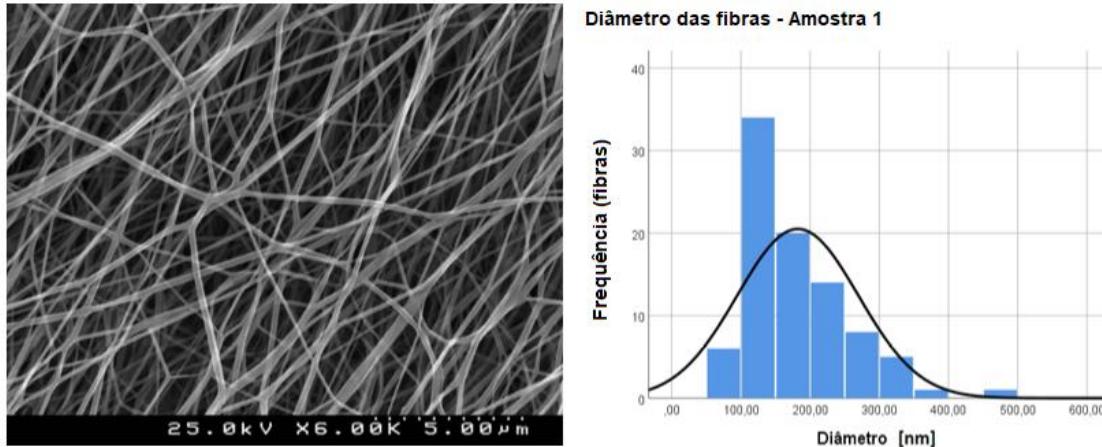
As três amostras apresentam valores estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$). Face aos resultados obtidos, não foi possível estabelecer uma relação direta entre esse parâmetro e as dimensões das fibras, concluindo-se que a concentração de PCL em solução não parece ser um fator decisivo na determinação do diâmetro das fibras.

Tabela 13 - Diâmetro médio das fibras, desvio padrão e concentração de PCL para as membranas 1, 11 e 14.

Amostra	Diâmetro médio das fibras	Desvio padrão	Concentração de PCL (m/V)
1	182 nm	88 nm	12%
11	196 nm	56 nm	14%
14	174 nm	52 nm	15%

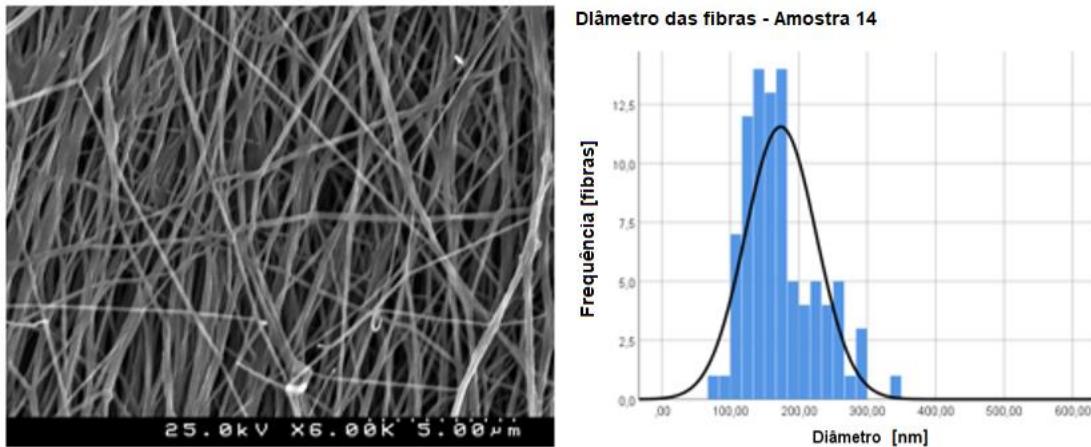
Fonte: Autoria própria (2020)

Figura 28 - Microfotografia do MEV com aumento de 6.000x e histograma com a distribuição do diâmetro das nanofibras da amostra 1 (12C18D2000V12P).



Fonte: Autoria própria (2020)

Figura 29 - Microfotografia do MEV com aumento de 6.000x e histograma com a distribuição do diâmetro das nanofibras da amostra 14 (15C18D2000V12P).

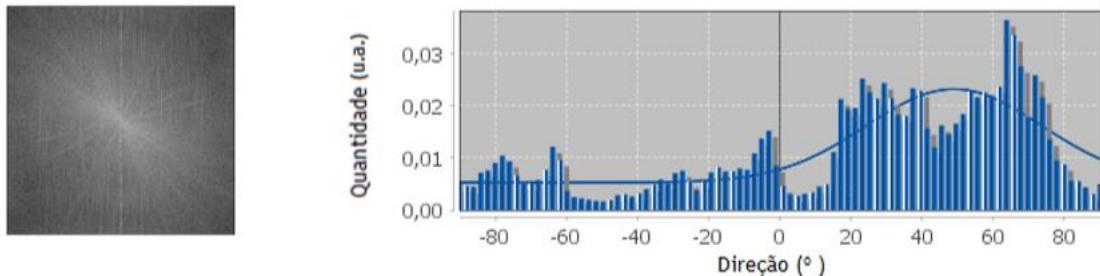


Fonte: Autoria própria (2020)

No que diz respeito ao alinhamento das fibras, alguns estudos demonstram que aumentar a concentração polimérica contribui para uma melhora no grau de alinhamento. Isto se explica pelo fato de que o movimento caótico e instável do jato diminui quando se aumenta a concentração polimérica na solução, de forma que o jato se desloca em uma trajetória mais retilínea até o dispositivo coletor, criando fibras mais alinhadas (GHOBEIRA *et al.*, 2018).

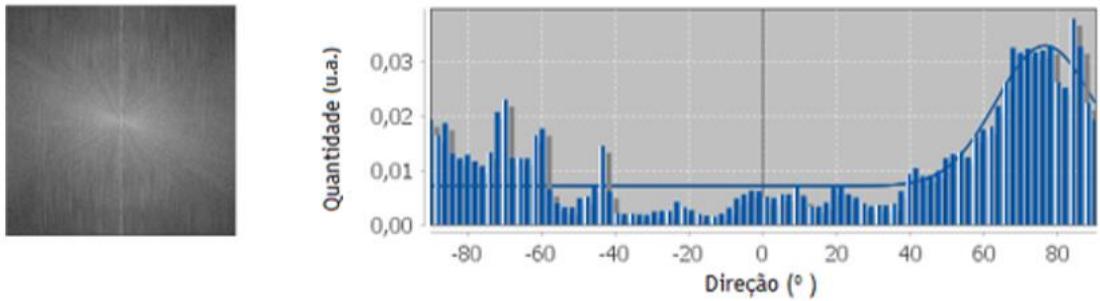
Para avaliar a influência da concentração de polímero na solução, são apresentados nas Figuras 30, 22 e 31 os espectros da TRF e os histogramas do comportamento direcional das nanofibras das amostras 1, 11 e 14, respectivamente.

Figura 30 - Espectro da TRF e histograma do comportamento direcional das nanofibras da amostra 1 (12C18D2000V12P).



Fonte: Autoria própria (2020)

Figura 31 - Espectro da TRF e histograma do comportamento direcional das nanofibras da amostra 14 (15C18D2000V12P).



Fonte: Autoria própria (2020)

Tabela 14 - Dados referentes ao alinhamento das nanofibras das amostras 1, 11 e 14.

Amostras	Direção Preferencial (°)	Dispersão (°)	Quantidade (%)	Nível de Confiança (%)
1	48,95	24,69	72	62
11	-41,58	4,09	41	81
14	76,41	13,2	49	72

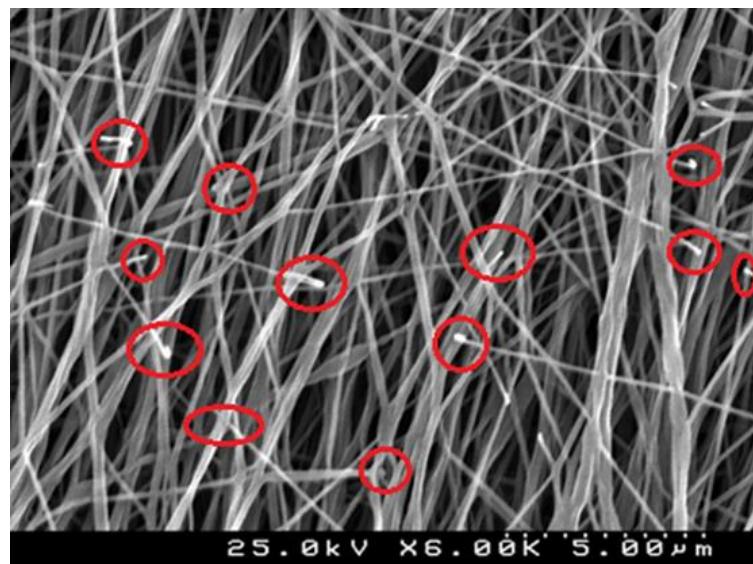
Fonte: Autoria própria (2020)

Sabe-se que a concentração polimérica não deve aumentar acima de um valor crítico; ou seja, acima de certa concentração, na qual nanofibras uniformes e sem contas são formadas, uma vez que haverá uma influência negativa no fluxo da solução que sai pela extremidade da agulha. Desta forma, o que se pode observar é que a solução polimérica pode secar na ponta da agulha metálica e bloquear a sua saída, o que origina fibras com descontinuidades e defeitos (ARRAS et al., 2012).

É muito provável que isto tenha acontecido na amostra 14, em que a concentração muito elevada de PCL tenha sido a responsável pela grande quantidade

de fibras descontínuas (Figura 32). Por este motivo, observou-se a queda na qualidade do alinhamento das fibras na membrana com solução mais concentrada, apesar da literatura referir a sua melhoria com o aumento da concentração das soluções (GHOBEIRA *et al.*, 2018; KISELEV; ROSELL-LLOMPART, 2012; LIU *et al.*, 2013).

Figura 32 - Fibras descontínuas encontradas na amostra 14. As descontinuidades encontram-se assinaladas com círculos.



Fonte: Autoria própria (2020)

Face aos resultados obtidos, restaram como escolhas as amostras 1 e 11 com 12% e 14% m/V de PCL, respectivamente. Ao observar a microestrutura, os histogramas e o valor de dispersão de ambas as amostras, percebe-se que as fibras da amostra 2 apresentam um comportamento direcional mais aleatório. Além disso, durante a fabricação das membranas com concentração de 12%, o processo de eletrofiação precisava ser pausado diversas vezes para limpeza do equipamento.

Como a viscosidade da solução estava demasiadamente baixa, o polímero escorria e gotejava na extremidade da agulha (Figura 33), dificultando o procedimento e a projeção do jato.

Figura 33 - Solução escorrendo na extremidade da agulha devido à baixa viscosidade das soluções com 12% de PCL.



Fonte: Autoria própria (2020)

Portanto, concluiu-se que a concentração de PCL que apresentou o melhor resultado foi a da amostra 11, com 14% do polímero em solução.

Após realização dos vários experimentos descritos, considera-se que os valores dos parâmetros que conduziram aos melhores resultados foram os seguintes: velocidade de rotação de 2000 rpm, distância de trabalho de 18 cm e concentração polimérica de 14%, além da constatação de que o processo de eletrofiação deve ser realizado apenas com valores de umidade inferiores a 55%.

Porém, mesmo depois das otimizações realizadas ao nível da solução e dos parâmetros operacionais, as nanofibras não apresentaram um padrão completamente alinhado. Deste modo, procedeu-se à realização de novos experimentos com base em duas modificações no cilindro coletor, a fim de obter resultados ainda melhores.

4.3 MODIFICAÇÕES NO DISPOSITIVO COLETOR PARA MELHORIA DO ALINHAMENTO DAS NANOFIBRAS

4.3.1 Modificação 1: Arame de cobre enrolado na superfície do cilindro coletor

Definidos os melhores parâmetros para realização da eletrofiação no equipamento e condições reportadas neste trabalho, iniciou-se a fase de modificações

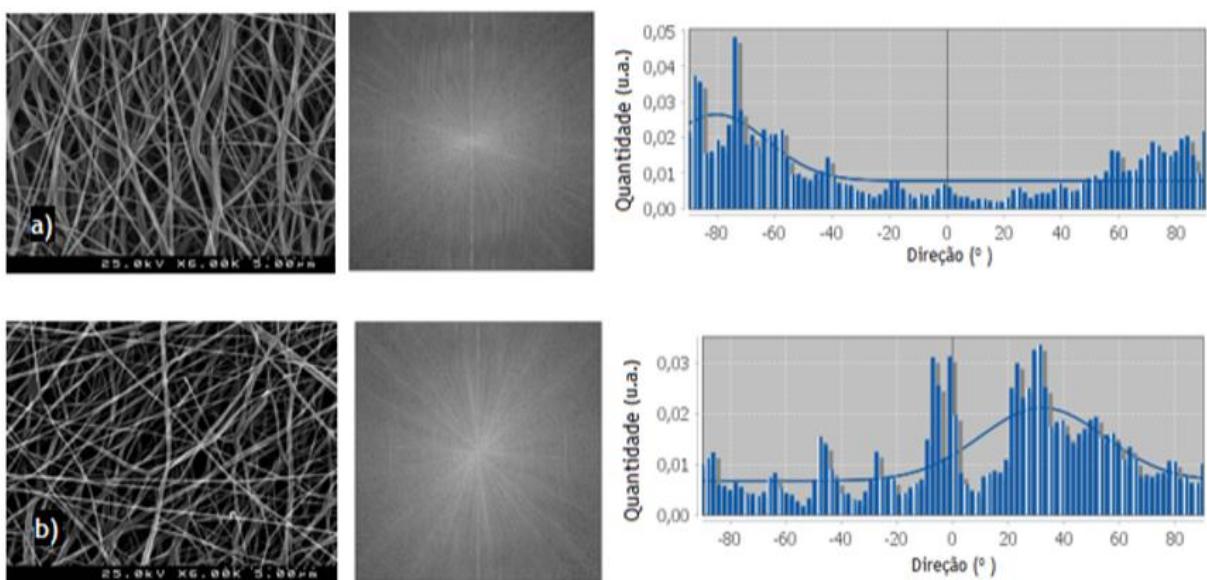
nos dispositivos coletores que pudessem ajudar a melhorar a qualidade das membranas produzidas para medicina regenerativa, conforme descrito na Seção 3.2.

A tentativa de enrolar um fio de arame de cobre na superfície do cilindro coletor, como mostra a Figura 9 (Seção 2.2), foi realizada pensando em melhorar o alinhamento das nanofibras da membrana. A ideia era adicionar um campo elétrico externo à força mecânica exercida pela rotação do cilindro, de forma a direcionar as nanofibras para uma configuração menos aleatória.

Para testar esta modificação no cilindro coletor, denominada neste trabalho como modificação 1, a velocidade de rotação do coletor foi fixada em 2000 rpm, pois foi a que apresentou melhores resultados tanto no quesito alinhamento quanto redução do diâmetro médio das fibras.

Numa primeira tentativa, produziu-se uma membrana (amostra 3 - 12C13D2000V12PM1) com os mesmos parâmetros de uma amostra de referência (amostra 2 - 12C13D2000V12P), como pode-se observar na Tabela 5. Os resultados obtidos em relação ao alinhamento de ambas membranas se encontram nas Figuras 34a e 34b e na Tabela 15.

Figura 34 - Microfotografia do MEV com aumento de 6.000x, Espectro da TRF e histograma do comportamento direcional das nanofibras das amostras: a) 2 (12C13D2000V12P) e b) 3 (12C13D2000V12PM1).



Fonte: Autoria própria (2020)

Tabela 15 - Dados referentes ao alinhamento das nanofibras das amostras 2 e 3.

Amostras	Direção Preferencial ($^{\circ}$)	Dispersão ($^{\circ}$)	Quantidade (%)	Nível de Confiança (%)
2	-80,34	17,75	47	50
3	32,25	22,34	69	42

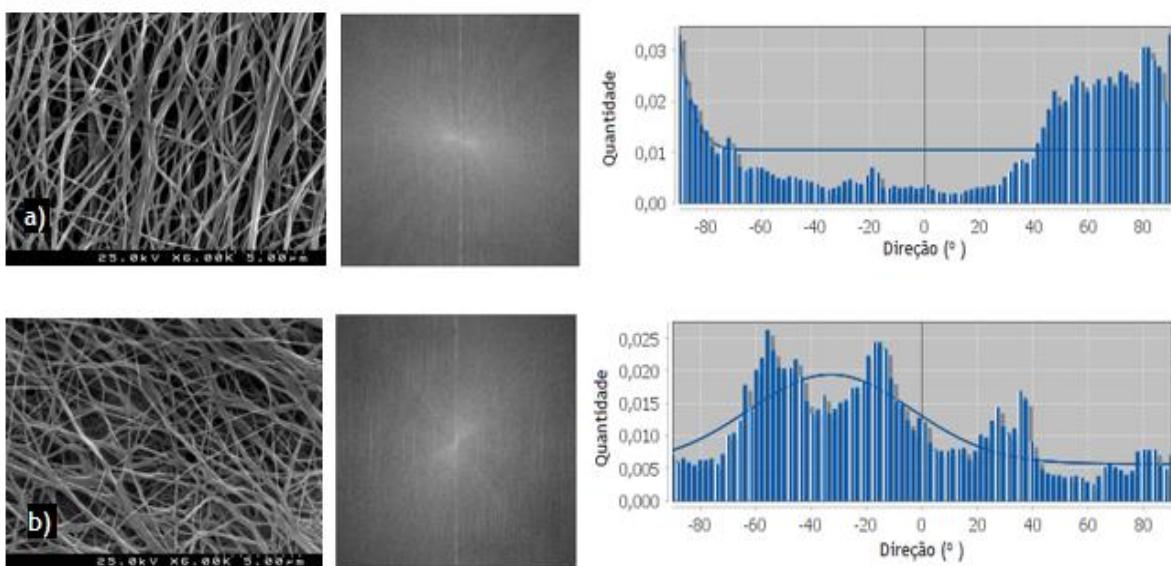
Fonte: Autoria própria (2020)

A membrana número 3, fabricada sobre o cilindro de rotação com o fio de cobre enrolado, apresentou piores resultados que a membrana de controle número 2. Como o resultado foi o oposto do esperado, foram realizadas outras tentativas.

Mais duas membranas foram produzidas a partir da modificação 1, as quais foram denominadas amostras 6 (14C13D2000V12PM1) e 7 (14C13D2000V12PM1). Os resultados obtidos nesta segunda tentativa do experimento para estas membranas estão reportados na Figura 35 e Tabela 16.

A amostra 5 (14C13D2000V12P) foi utilizada como referência. A sua microestrutura, o histograma com seu comportamento direcional e demais informações sob o seu alinhamento encontram-se na Figura 27 e na Tabela 12.

Figura 35 - Microfotografia do MEV com aumento de 6.000x, Espectro da TRF e histograma do comportamento direcional das nanofibras das amostras: a) 6 e b) 7.



Fonte: Autoria própria (2020)

Tabela 16 - Dados referentes ao alinhamento das nanofibras das amostras 5, 6 e 7.

Amostras	Direção Preferencial (º)	Dispersão (º)	Quantidade (%)	Nível de Confiança (%)
5	32,18	1,17	12	61
6	-106,87	10,36	6	7
7	-32,88	29,40	79	62

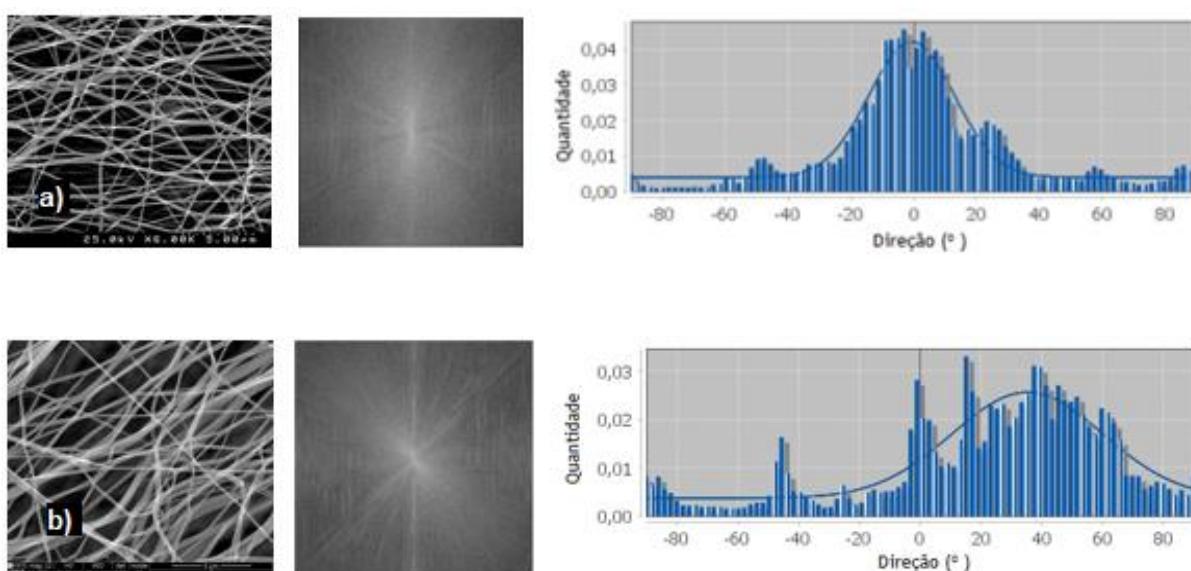
Fonte: Autoria própria (2020)

As amostras 6 e 7 apresentaram resultados menos satisfatórios do que a membrana de referência número 5, com uma distribuição bastante aleatória e um valor de dispersão significativamente maior. Deste modo, não foi conclusivo o uso do arame de cobre enrolado no cilindro coletor como proposta na melhoria das membranas.

Finalmente, após levantar-se a hipótese de que a folha de papel alumínio cobrindo os fios de cobre pudesse estar anulando a influência destes na trajetória das fibras, produziu-se a amostra de número 18 (15C18D2000V13PM1). Neste caso, o cilindro com fios de cobre foi coberto com uma folha de papel celofane, que é um material isolante. A amostra usada como referência foi a membrana 17 (15C18D2000V13P), com os mesmos parâmetros que a amostra 18, com a exceção de que nenhuma modificação foi aplicada ao cilindro coletor.

Os dados obtidos em relação ao alinhamento das nanofibras nas amostras encontram-se na Figura 36a e 36b e na Tabela 17.

Figura 36 - Microfotografia do MEV com aumento de 6.000x, Espectro da TRF e histograma do comportamento direcional das nanofibras das amostras: a) 17 e b) 18.



Fonte: Autoria própria (2020)

Tabela 17 - Dados referentes ao alinhamento das nanofibras das amostras 17 e 18.

Amostras	Direção Preferencial (º)	Dispersão (º)	Quantidade (%)	Nível de Confiança (%)
17	-0,62	13,60	71	93
18	35,26	24,81	82	76

Fonte: Autoria própria (2020)

Novamente, a amostra submetida a esta mudança da cobertura dos fios de cobre apresentou um grau de alinhamento inferior àquele obtido pela amostra de referência.

Analizando o histograma (Figura 36) e a Tabela 17, verifica-se que a dispersão das direções é menor na amostra 17 do que na 18 (13,60º em comparação a 24,81º). Desta modo, esta estratégia foi descartada por não permitir a melhoria do alinhamento das fibras.

4.3.2 Modificação 2: Folha de papel celofane, com tiras de alumínio, enrolada na superfície do cilindro coletor

Como a primeira modificação no cilindro coletor não trouxe os benefícios esperados, especialmente no quesito de alinhamento das fibras, mais uma modificação foi proposta com a mesma finalidade. Esta estratégia, designada por modificação 2, consiste na cobertura do cilindro rotatório coletor com papel celofane e pequenas tiras de alumínio, a qual foi uma adaptação do estudo realizado por Ghobeira *et al* (2018).

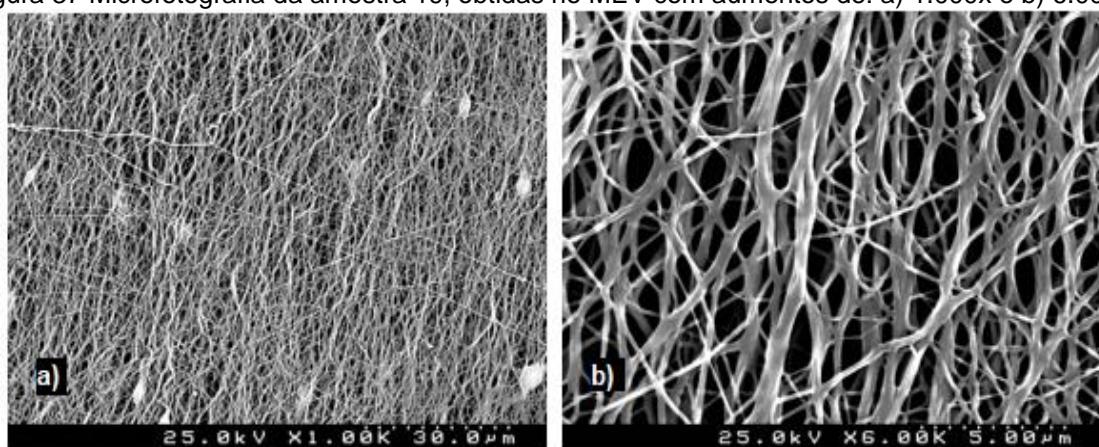
O princípio de funcionamento desta abordagem é muito similar ao da modificação 1, onde um campo elétrico externo é adotado para, em conjunto com a ação mecânica da rotação do cilindro rotatório coletor, gerar fibras paralelas e melhorar o seu nível de alinhamento. Neste caso, são as tiras de alumínio de 3x1 cm, coladas na folha de papel celofane que reveste o cilindro, as responsáveis pelo efeito elétrico do sistema, como mostra a Figura 10 (Seção 3.2).

Neste contexto, foram então produzidas as amostras 19 (15C18D2000V13PM2) e 20 (15C18D2000V13PM2). Foi utilizada como amostra de referência a membrana 17 (15C18D2000V13P).

Após obtenção das membranas 19 e 20, estas tiveram suas microestruturas observadas no MEV. As imagens representadas nas Figuras 37 e 38, revelaram a presença de algumas contas na estrutura fibrilar das membranas. As contas são mais facilmente identificadas nas imagens com menor ampliação e podem exercer uma influência negativa nas propriedades mecânicas da membrana.

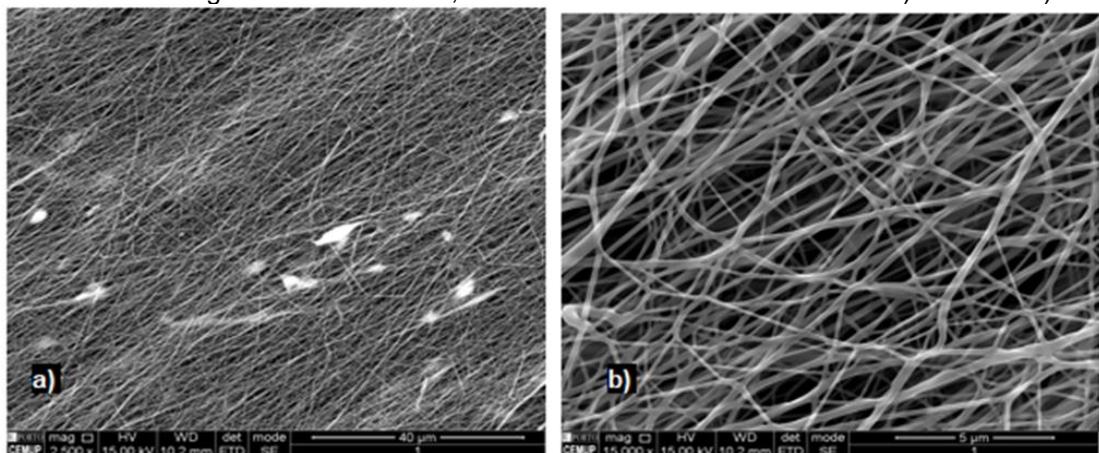
Além disso, observa-se na Figura 38b, que as nanofibras produzidas na amostra 19 mostraram adesão umas às outras em alguns pontos, gerando entrelaçamentos que não são desejados ao padrão de fibras, que deve ser uniforme e alinhado. Por outro lado, observa-se no canto superior da Figura 37b e no canto inferior da Figura 38b, fibras com aspecto encaracolado/ondulado, o que não era desejado.

Figura 37 Microfotografia da amostra 19, obtidas no MEV com aumentos de: a) 1.000x e b) 6.000x.



Fonte: Autoria própria (2020)

Figura 38 - Microfotografia da amostra 20, obtidas no MEV com aumentos de: a) 1.000x e b) 6.000x.



Fonte: Autoria própria (2020)

Devido aos defeitos encontrados na estrutura, não observados anteriormente na amostra de referência número 17, e a microestrutura de má qualidade especialmente na amostra 19, com diversas fibras entrelaçadas e sem melhoria visual significativa ao nível de alinhamento das nanofibras produzidas, esta abordagem também foi descartada.

Como as modificações realizadas nos coletores não foram capazes de produzir membranas de qualidade e com melhor alinhamento, a amostra tida como melhor opção para a finalidade desejada continua sendo a que foi produzida com uma velocidade de rotação de 2000 rpm, distância de trabalho de 18 cm e concentração polimérica de 14%. Foram estes os parâmetros escolhidos para produzir mais membranas e proceder à sua caracterização mais detalhada e analisar a reprodutibilidade da técnica de eletrofiação.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA SELECIONADA

4.4.1 Microestrutura das membranas

Duas novas membranas foram produzidas, denominadas como amostras A e B, fabricadas pelo processo de eletrofiação de acordo com os parâmetros listados na Tabela 18, correspondentes à condição que apresentou os melhores resultados para a finalidade pretendida na medicina regenerativa. Procurou-se fabricar as membranas sob condições ambientais similares, de modo a minimizar os efeitos associados à diferença de temperatura e umidade. O processo de eletrofiação durou um total de 6 horas em ambos os casos e o tempo de solubilização do PCL em AA e FA, foi também o mesmo para as duas amostras.

Os parâmetros ambientais de trabalho no caso das duas amostras também estão elencados na Tabela 18.

Tabela 18 - Parâmetros utilizados para produção das amostras A e B, por eletrofiação.

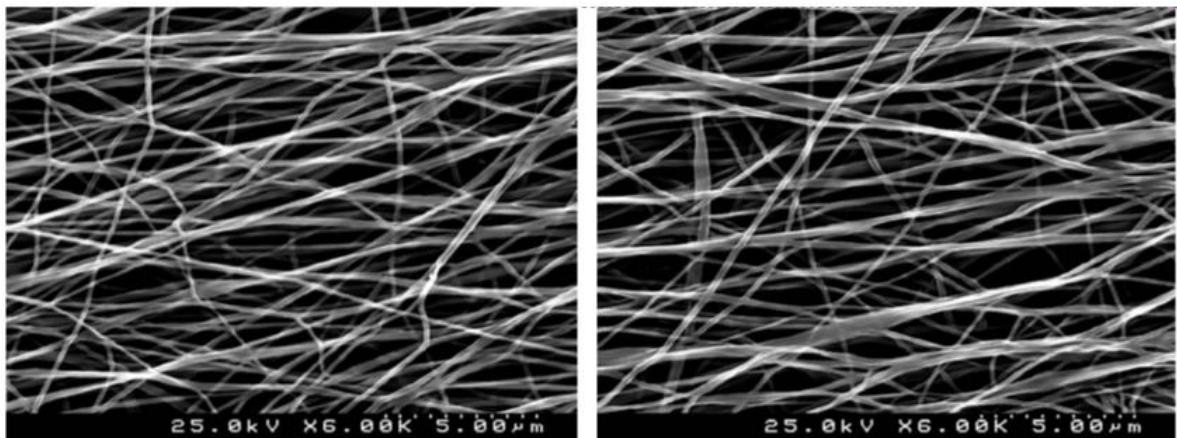
Amostra	Concentração de PCL (%)	Distância de trabalho (cm)	Velocidade (rpm)	Fluxo na agulha (mL/h)	Proporção entre os solventes (AA:AF)	Temperatura (°C)	Umidade do ar (%)
A	14	18	2000	0,4	1 : 2	23,9	49
B	14	18	2000	0,4	1 : 2	24,5	50

Fonte: Autoria própria (2020)

Inicialmente, as amostras foram caracterizadas e analisadas quanto a reprodutibilidade da técnica de eletrofiação através de imagens obtidas por MEV para as amostras A e B representadas nas Figuras 39 e 40, respectivamente.

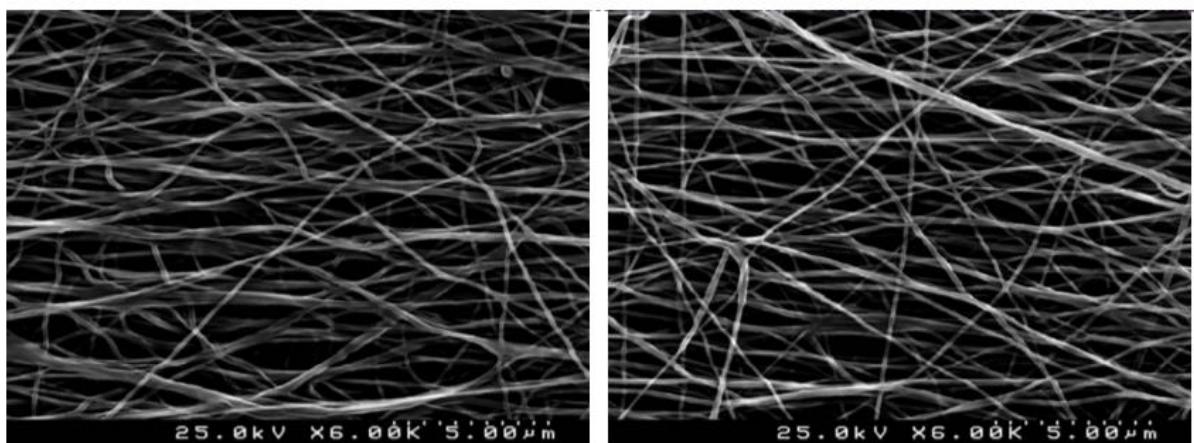
Ambas as amostras apresentam um padrão de fibras visualmente homogêneo e demonstram certo grau de alinhamento, sendo possível identificar facilmente uma direção preferencial de orientação destas nanofibras. No entanto, o alinhamento não é perfeito, especialmente na amostra B, observando-se algumas fibras desalinhadas.

Figura 39 - Microfotografia da Amostra A, obtidas no MEV com aumento de 6.000x.



Fonte: Autoria própria (2020)

Figura 40 - Microfotografia da Amostra B, obtidas no MEV com aumento de 6.000x.

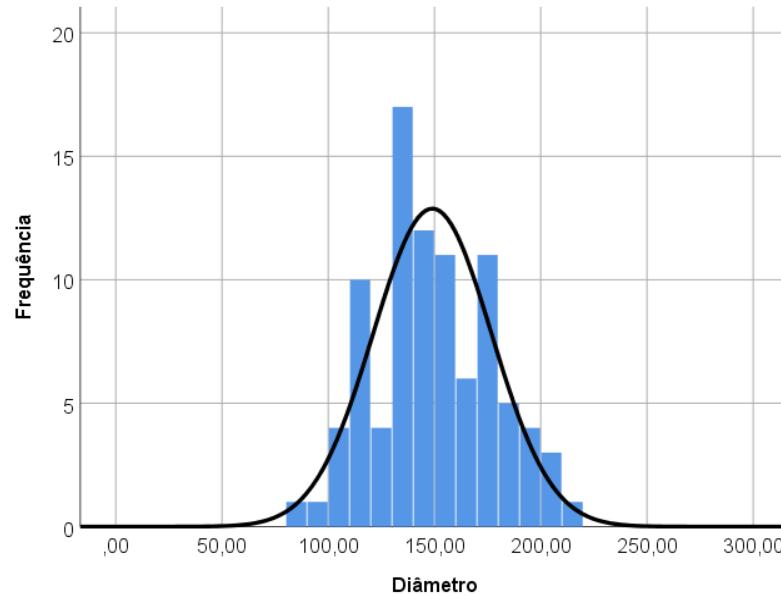


Fonte: Autoria própria (2020)

A quantificação do diâmetro das fibras (Tabela 17 e Figuras 41 e 42) revela que não há uma diferença estatisticamente significativa entre os valores obtidos para as amostras A e B ($p < 0,05$).

Figura 41 - Histograma com a distribuição do diâmetro das nanofibras da amostra A.

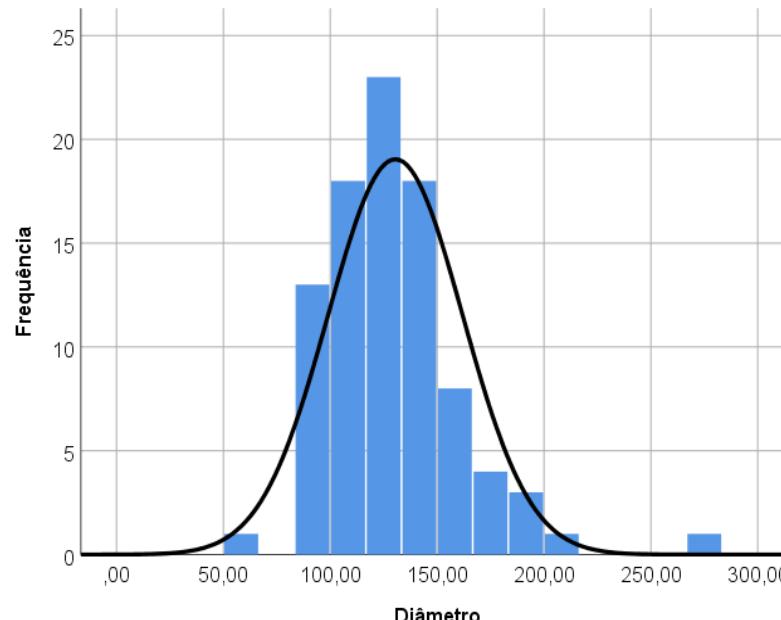
Diâmetro das fibras - Amostra A



Fonte: Autoria própria (2020)

Figura 42 - Histograma com a distribuição do diâmetro das nanofibras da amostra B.

Diâmetro das fibras - Amostra B



Fonte: Autoria própria (2020)

Tabela 19 - Diâmetro médio das fibras e desvio padrão para as amostras A e B.

Amostra	Diâmetro médio das fibras	Desvio padrão
A	149 nm	28 nm
B	130 nm	31 nm

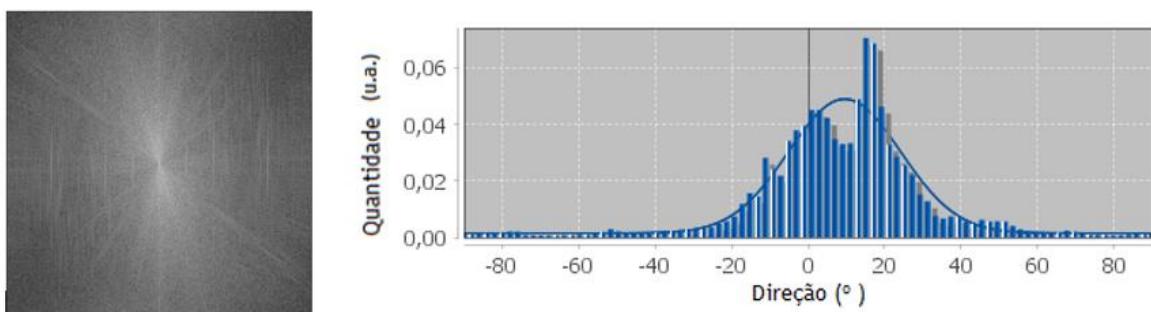
Fonte: Autoria própria (2020)

Nas Figuras 43 e 44 e na Tabela 20, apresentam-se os resultados da análise do alinhamento das fibras nas amostras A e B. À semelhança do observado com o diâmetro das fibras, não foram observadas grandes diferenças ao nível do alinhamento destas.

As fibras encontram-se direcionadas principalmente para -20° e 20° . O alinhamento das nanofibras na amostra B é um pouco inferior ao observado para a amostra A, corroborando com as observações por MEV, onde também aparece a concentração de algumas fibras orientadas entre 40° e 50° . Esta diferença pode ser consequência da pequena variação dos parâmetros ambientais no momento do eletrofiação, que podem ter originado uma maior instabilidade do jato no caso da amostra B.

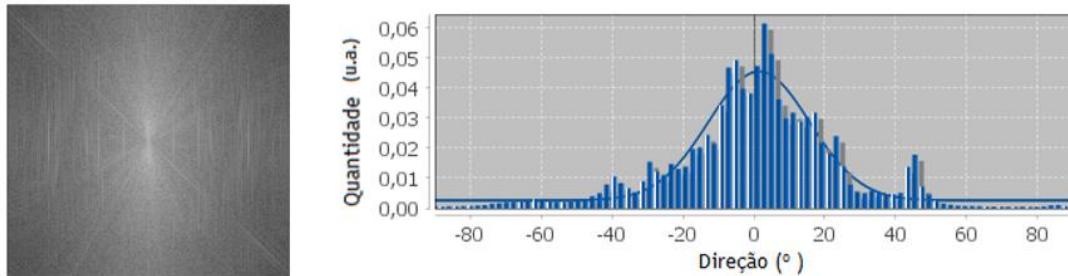
Dos resultados obtidos pode considerar-se que o processo de produção é reproduzível.

Figura 43 - Espectro da TRF e histograma do comportamento direcional das nanofibras da amostra A.



Fonte: Autoria própria (2020)

Figura 44 - Espectro da TRF e histograma do comportamento direcional das nanofibras da amostra B.



Fonte: Autoria própria (2020)

Tabela 20 - Dados referentes ao alinhamento das nanofibras das amostras A e B.

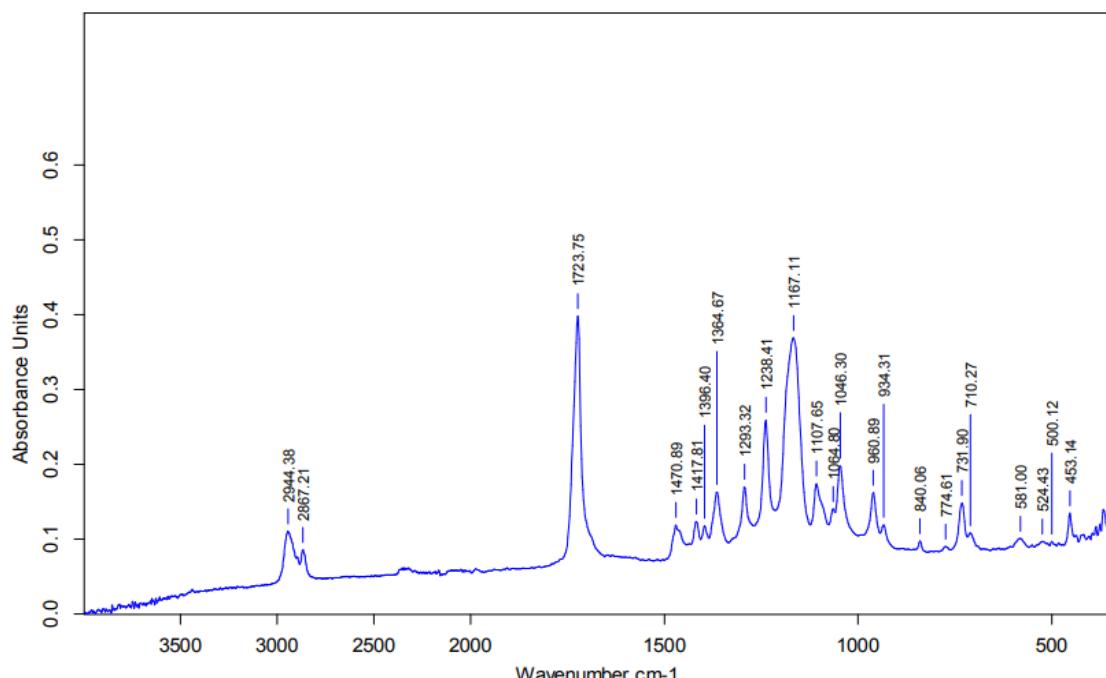
Amostras	Direção Preferencial (°)	Dispersão (°)	Quantidade (%)	Nível de Confiança (%)
A	9,57	14,69	86	89
B	1,48	14,34	79	91

Fonte: Autoria própria (2020)

4.4.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

O espectro FTIR obtido para a membrana A se encontra na Figura 45.

Figura 45 - Espectro FTIR obtido para a membrana de PCL na região de 500-4000 cm⁻¹.



Fonte: Autoria própria (2020)

Comparando o espectro obtido com o espectro da Figura 14, realizado com a matéria-prima em forma de grânulos, consegue-se identificar os mesmos picos dominantes, característicos de um poliéster alifático linear e semicristalino como o PCL. Não foi identificado nenhum pico que sugerisse alteração no arranjo estrutural inicial das macromoléculas do PCL, mesmo com a ação de dois solventes e os efeitos elétricos e mecânicos do processamento por eletrofiação.

A única diferença é na definição dos espectros obtidos, sendo o espectro referente à matéria-prima PCL (Figura 14) mais bem definido que o espectro de uma membrana, obtida a partir do PCL em solução, da qual evaporaram depois os solventes (Figura 41). Esta diferença reflete provavelmente o fato das análises terem sido efetuadas em amostras de formas diferentes: grânulos e membrana, sendo a última muito mais fina e porosa.

4.4.3 Ensaio de tração

Os ensaios de tração foram realizados com 3 corpos de prova da membrana A (amostras 1, 2 e 3) e 3 corpos de prova da membrana B (amostras 4, 5 e 6).

A partir da curva tensão *versus* deformação, determinou-se o módulo de Young e a tensão de ruptura de cada amostra, que se encontram registrados na Tabela 21. O valor médio e o desvio padrão também foram calculados.

Tabela 21 - Módulo de Young e tensão de ruptura das amostras.

Amostras de PCL	Módulo de Young (MPa)	Tensão de Ruptura (MPa)
1	20,7	10,1
2	23,9	12,2
3	16,1	10,8
4	13,9	7,0
5	15,6	13,5
6	12,2	7,0
Média	17,1	10,1
Desvio	4,4	2,7

Fonte: Autoria própria (2020)

De acordo com a literatura, as membranas absorvíveis disponíveis comercialmente apresentam Módulo de Young entre 30,6 e 700 MPa e tensão de

ruptura entre 3,5 e 22,5 MPa (ZHANG *et al.*, 2019) O valor apresentado para tensão de ruptura médio das amostras está dentro do intervalo desejado, entretanto, o valor médio do Módulo de Young é inferior ao das membranas disponíveis comercialmente.

A falta de rigidez do material é um problema, pois prejudica a capacidade da membrana em exercer uma barreira física contra tecidos moles e manter o espaço até a regeneração completa da área afetada, por ser mais difícil a sua adaptação ao local de implantação.

4.4.4 Estimativa da porosidade das membranas

Para determinar a porosidade das membranas, foram produzidos 3 corpos de prova com uma área de 9 cm² e uma espessura que se encontra na Tabela 6.

A porosidade foi estimada a partir da quantificação da densidade volumétrica dos corpos de prova e considerando o valor de 1,145 g/mL como densidade do PCL. Obtiveram-se os valores de 96,0 % e 94,4 % para as amostras A e B, respectivamente.

Tabela 22 - Resultado da pesagem de três amostras das membranas A e B.

Membrana	Medição 1	Medição 2	Medição 3	Média
A	0,0021 ± 0,0001 g	0,0023 ± 0,0001 g	0,0022 ± 0,0001 g	0,0022 ± 0,0002 g
B	0,0030 ± 0,0001 g	0,0027 ± 0,0001 g	0,0029 ± 0,0001 g	0,0029 ± 0,0002 g

Fonte: Autoria própria (2020)

A literatura refere que uma porosidade na gama 60 a 90% é adequada para ROG e RTG (CARTER; RAHMAN; BHATTARAI, 2016), pelo que os resultados obtidos estão acima do valor desejado.

Uma maneira de diminuir a quantidade de poros nas amostras é, por exemplo, utilizar duas seringas simultaneamente para ejeção da solução polimérica. Com a deposição de um número maior de fibras, os espaços vazios vão ser menores, logo menor porosidade, mas as propriedades mecânicas vão ser alteradas.

5 CONCLUSÃO

Este trabalho descreve o processo de fabricação por eletrofiação de membranas de PCL para aplicação em medicina regenerativa. O trabalho experimental foi dividido em três partes: caracterização do PCL usado na produção das membranas, otimização dos parâmetros de eletrofiação e caracterização detalhada da amostra selecionada como a mais adequada para servir como membrana de barreira em RTG e ROG.

Na primeira parte, através do espectro FTIR do grânulo de PCL confirmou-se estar perante um poliéster alifático linear e semicristalino, condizente à sua estrutura. Através da análise térmica, o PCL apresentou uma temperatura de fusão T_m de 63,2°C e uma temperatura de cristalização T_c de 35,9°C.

Na segunda parte do trabalho experimental produziu-se uma série de membranas por meio da técnica de eletrofiação e estudou-se o efeito dos seguintes parâmetros no diâmetro e alinhamento das nanofibras e na ocorrência de defeitos: distância de trabalho, velocidade de rotação do cilindro coletor, e concentração da solução. O registro dos valores da umidade e temperatura ambiente permitiu avaliar também a importância destes parâmetros no processamento. Com base neste estudo, concluiu-se que os valores dos parâmetros que conduziram aos melhores resultados foram os seguintes: velocidade de rotação de 2000 rpm, distância de trabalho de 18 cm e concentração polimérica de 14% m/V, além da constatação de que o processo de eletrofiação deve ser realizado com valores de umidade inferiores a 55% para o sistema de solventes utilizado.

As tentativas de melhoria do processo realizadas ao nível da solução e dos parâmetros operacionais mostraram que as nanofibras não conduziram à produção de um padrão completamente alinhado. Por este motivo, procedeu-se à realização de novos experimentos com base em duas modificações no cilindro coletor. Entretanto, nenhuma destas abordagens provou ser eficiente na melhoria do alinhamento das nanofibras de PCL.

Durante a última etapa do trabalho experimental, verificou-se que o processo de eletrofiação apresenta boa reproduzibilidade ao nível da microestrutura, visto que a análise estatística do alinhamento e da distribuição do diâmetro das nanofibras revelou resultados idênticos para as duas amostras produzidas sob as mesmas condições.

A porosidade estimada para as duas membranas ficou acima de 99%, valor superior à faixa desejável para membranas de barreira, que é de 60 a 90%. A porosidade muito elevada pode prejudicar a resistência do material. O valor apresentado para tensão de ruptura das duas amostras está dentro do intervalo de valores apresentados pelas membranas disponíveis comercialmente. Entretanto, o valor do Módulo de Young de todos os corpos de prova é significativamente inferior. A falta de rigidez do material é um obstáculo à utilização da membrana em RTG e ROG, pois pode prejudicar a capacidade do material em exercer uma barreira física contra a invasão por tecidos moles e manter o espaço até a regeneração completa da área afetada. Portanto, outros ensaios são necessários para melhorar o seu desempenho.

Face aos resultados reportados, e como trabalho futuro, pode-se analisar a influência dos demais parâmetros que não foram estudados no alinhamento e diâmetro das nanofibras. No mais, seria importante explorar a produção de membranas por eletrofiação a partir de misturas poliméricas com PCL, ao invés do PCL singularmente, ou investigar a aplicação de revestimentos, de modo a melhorar sua biocompatibilidade.

REFERÊNCIAS

- ADRIANO, G.F.F. **Scaffolds de nanofibras termo-sensíveis para cultura de células estaminais.** Tese de Mestrado do Departamento de Bioengenharia e Nanossistemas do Instituto Superior Técnico de Lisboa, Lisboa, 2014.
- ALCOBIA, D.d.S. **Produção de nanofibras alinhadas de polímeros biodegradáveis para crescimento e regeneração de células neurais.** Tese de Mestrado para o Instituto de Química da Universidade de São Paulo: São Paulo, 2013.
- ARRAS, M., et al. Electrospinning of aligned fibers with adjustable orientation using auxiliary electrodes. **Science and technology of advanced materials**, v.13, n.3, Jun. 2012. DOI: 10.1088/1468-6996/13/3/035008.
- ASMATULU, R.; KHAN, W.S. Chapter 1 - Introduction to electrospun nanofibers. In: **Synthesis and Applications of Electrospun Nanofibers**, Elsevier, p.1-15, 2019.
- BAJÁKOVÁ, J.C.; LUKÁŠ, D.; LACARIN, M. **"Drawing" - The Production of Individual Nonfibers by Experimental Method.** Technical University of Liberec, Liberec, República Tcheca, 2011.
- BHARDWAJ, N.; KUNDU, S.C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. **Biotechnology Advances**, v.28, n.3, p. 325-347, Jun. 2010. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2010.01.004.
- BONGIOVANNI, A.S., et al. Effect of benign solvents composition on poly (ϵ -caprolactone) electrospun fiber properties. **Materials Letters**, v.245, p.86-89, Jun. 2019. DOI: 10.1016/j.matlet.2019.02.107.
- BOTTINO, M.C. et al. Recent advances in the development of GTR/GBR membranes for periodontal regeneration: A materials perspective. **Dental Materials**, Manchester, v.28, n.7, p. 703-721, Jul. 2012. DOI: 10.1016/j.dental.2012.04.022.
- CANEVAROLO, S. **Ciência dos Polímeros: Um Texto Básico Para Tecnólogos e Engenheiros.** Editor José Roberto Gonçalves, 3^a edição, 2010.
- CASPER, C.L., et al. Controlling Surface Morphology of Electrospun Polystyrene Fibers: Effect of Humidity and Molecular Weight in the Electrospinning Process. **Macromolecules (2004)**, v.37, n.2, p. 573-578, 2003. DOI: 10.1021/ma0351975.
- CARTER, P.; RAHMAN, S.M.; BHATTARAI, N. Facile fabrication of aloe vera containing PCL nanofibers for barrier membrane application. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v.27, n.7, p. 692-708, Mar. 2016. DOI: 10.1080/09205063.2016.1152857.
- CHEN, M., et al. Role of fiber diameter in adhesion and proliferation of NIH 3T3 fibroblast on electrospun polycaprolactone scaffolds. **Tissue engineering**, v.13, n.3, p. 579-87, Mar. 2007. DOI: 10.1089/ten.2006.0205.

CHENG, Z.; TEOH, S.H. Surface modification of ultra thin poly (ϵ -caprolactone) films using acrylic acid and collagen. **Biomaterials**, v.25, n.11, p.1991-2001, Mai. 2004. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2003.08.038.

COLEMAN, M.M.; ZARIAN, J. Fourier-transform infrared studies of polymer blends. II. Poly (ϵ -caprolactone)-poly (vinyl chloride) system. **Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition**, v.17, n.5, p. 837-850, 1979.

DA PAZ, R.A., et al. **Obtenção e Caracterização de Microcompósitos de Polycaprolactona com Nanocelulose**. In: 22º CBECiMat - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais. Brasil, 2016.

DE VRIEZE, S., et al. The effect of temperature and humidity on electrospinning. **Journal of Materials Science**, v.44, n.5, p. 1357-1362, Mar. 2009. DOI: 10.1007/s10853-008-3010-6

DOSHI, J.; RENEKER, D.H. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. **Journal of Electrostatics**, v.35, n.2, p. 151-160, Ago. 1995. DOI: 10.1016/0304-3886(95)00041-8.

ELZEIN, T., et al. FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.273, n.2, p. 381-387, Mai. 2004. DOI: 10.1016/j.jcis.2004.02.001.

FERNANDES, M.d.S. **Membranas de polycaprolactona e quitosano para aplicação estomatológica**. Tese de para a Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa: Lisboa, Portugal, 2011.

FIJI SOFTWARE. **Directionality**, 2018. Disponível em: <https://imagej.net/Directionality>. Acesso em: 10 mai. 2019.

FONG, H.; CHUN, I.; RENEKER, D.H. Beaded nanofibers formed during electrospinning. **Polymer**, v.40, n.16, p. 4585-4592, Jul. 1999. DOI: 10.1016/S0032-3861(99)00068-3.

FREITAS, R.L.M. **Efeito da Temperatura de Resfriamento sobre as Propriedades de Polímeros Amorfos e Semicristalinos**. Tese de Graduação para a Escola Politécnica da Universidade Federal do Rio de Janeiro: Rio de Janeiro, 2014.

GHOBEIRA, R., et al. Wide-ranging diameter scale of random and highly aligned PCL fibers electrospun using controlled working parameters. **Polymer**, v.157, p. 19-31, Nov. 2018. DOI: 10.1016/j.polymer.2018.10.022.

GUPTA, B.S.; EDWARDS, J.V.3 - Textile materials and structures for topical management of wounds. **Advanced Textiles for Wound Care**, Woodhead Publishing. 2ª edição, p. 55-104, 2019.

HAIDER, A.; HAIDER, S.; KANG, I.K. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in

biomedical and biotechnology. **Arabian Journal of Chemistry**, v.11, n.8, p. 1165-1188, Dez. 2018. DOI: 10.1016/j.arabjc.2015.11.015.

HOHMAN, M.M., et al. Electrospinning and electrically forced jets. II. Applications. Physics of Fluids, University of Harvard, Cambridge, Massachusetts, 13(8): p. 2221-2236, 2001.

HURLEY, L.A., et al. The Role of Soft Tissues in Osteogenesis: An Experimental Study of Canine Spine Fusions. **The Journal of bone and joint surgery**, Boston, v. 41-A, p. 1243-1254, Out. 1959.

JIMÉNEZ GARCIA, J., et al. Effect of cross-linked vs non-cross-linked collagen membranes on bone: A systematic review. **Journal of Periodontal Research**, v.52, n.6, p. 955-964, Dez. 2017. DOI: 10.1111/jre.12470.

KISELEV, P.; ROSELL-LLOMPART, J. Highly aligned electrospun nanofibers by elimination of the whipping motion. **Journal of Applied Polymer Science**, v.125, n.3, p. 2433-2441, 2012. DOI: 10.1002/app.36519.

KURIMOTO, R.; NIYAMA, E.; EBARA, M. 5.4 - Fibrous Materials. In: **Biomaterials Nanoarchitectonics**, William Andrew Publishing. p. 267-278, 2016.

LEE, S.W.; KIM, S.G. Membranes for the Guided Bone Regeneration. **Maxillofacial plastic and reconstructive surgery**, v.36, n. 6, p. 239-246, Nov. 2014. DOI: 10.14402/jkamprs.2014.36.6.239.

LI, X., et al. Coating electrospun poly (epsilon-caprolactone) fibers with gelatin and calcium phosphate and their use as biomimetic scaffolds for bone tissue engineering. **Langmuir**, v.24, n.24, p. 14145-14150, Dez. 2008. DOI: 10.1021/la802984a.

LIU, S.L., et al. Assembly of oriented ultrafine polymer fibers by centrifugal electrospinning. **Journal of Nanomaterials**, v.2514103, p. 8-8, 2013. DOI: 10.1155/2013/713275.

LIVERANI, L.; BOCCACCINI, A.R. Versatile Production of Poly (Epsilon-Caprolactone) Fibers by Electrospinning Using Benign Solvents. **Nanomaterials**, Basel, v.6, n.4, p. 75, Abr. 2016. DOI: 10.3390/nano6040075.

LONG, Y.Z., et al. Chapter 2 - Electrospinning: The Setup and Procedure. In: **Electrospinning: Nanofabrication and Applications**. William Andrew Publishing, 1^a edição, p. 21-52, 2019.

LUO, C.J.; STRIDE, E.; EDIRISINGHE M. Mapping the Influence of Solubility and Dielectric Constant on Electrospinning Polycaprolactone Solutions. **Macromolecules**, v.45, n.11, p. 4669-4680, Mai. 2012. DOI: 10.1021/ma300656u

MAO, A.S.; MOONEY, D.J. Regenerative medicine: Current therapies and future directions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.112, n. 47, p. 14452-14459, Nov. 2015. DOI: 10.1073/pnas.1508520112.

MARLETTA, G., et al. Improved osteogenic differentiation of human marrow stromal cells cultured on ion-induced chemically structured poly- ϵ -caprolactone.

Biomaterials, v.28, n.6, p. 1132-1140, Fev. 2007. DOI:
10.1016/j.biomaterials.2006.10.027.

MATABOLA, K.P.; MOUTLOALI, R.M. The influence of electrospinning parameters on the morphology and diameter of poly (vinylidene fluoride) nanofibers: Effect of sodium chloride. **Journal of Materials Science**, v.48, n.16, p. 5475-5482, 2013. DOI: 10.1007/s10853-013-7341-6.

MIRONOV, V.; VISCONTI R.P.; MARKWALD R.R. What is regenerative medicine? Emergence of applied stem cell and developmental biology. **Expert Opinion on Biological Therapy**, Oxfordshire, v.4, n.6, p. 773-781, Jun. 2004. DOI: 10.1517/14712598.4.6.773.

NAYAK, R., et al. Recent advances in nanofibre fabrication techniques. **Textile Research Journal**, v.82, n.2, p. 129-147, Dez. 2011. DOI: 10.1177/0040517511424524

NORMAN, J.J.; DESAI, T.A. Methods for Fabrication of Nanoscale Topography for Tissue Engineering Scaffolds. **Annals of Biomedical Engineering**, Países Baixos, v.34, n.1, p. 89-101, Jan. 2006. DOI: 10.1007/s10439-005-9005-4.

OSATHANON, T., et al. **Polycaprolactone-Based Biomaterials for Guided Tissue Regeneration Membrane**. Periodontitis - A useful reference, InTech, p. 171-188, 2017. DOI: 10.5772/intechopen.69153.

PELIPENKO, J., et al. The impact of relative humidity during electrospinning on the morphology and mechanical properties of nanofibers. **International Journal of Pharmaceutics**, v.456, n.1, p. 125-134, Nov. 2013. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2013.07.078.

PHILLIPSON, K.; HAY J.N.; JENKINS, M.J. Thermal analysis FTIR spectroscopy of poly (ϵ -caprolactone). **Thermochimica Acta**, v.595: p. 74-82, Nov. 2014. DOI: 10.1016/j.tca.2014.08.027

PIMENTA, I.P.; OLIVEIRA, N.M.M.; GOMES, A. C. P. **Processo de reparo tecidual do alvéolo dental**: uso da Boneheal® para Regeneração Óssea Guiada (ROG). Tese de mestrado da Universidade de Franca - UNIFRAN, Franca, Brasil.

POLIMENI, G.; XIROPAIDIS A.V.; WIKESJO U.M. Biology and principles of periodontal wound healing/regeneration. **Periodontology 2000**, Singapura, v.41, p. 30-47, 2006. DOI: 10.1111/j.1600-0757.2006.00157.x.

RAGHAVAN, B.; SOTO, H.; LOZANO, K. Fabrication of Melt Spun Polypropylene Nanofibers by Forcespinning. **Journal of Engineered Fibers and Fabrics**, v.8, n.1, Mar. 2013. DOI: 10.1177/155892501300800106.

RAMAKRISHNA, S.A.F., et al. **An Introduction to Electrospinning and Nanofibers**. Editora World Scientific, v.1, p. 1-382, 2005.

RAMOS, S.L.F. **Membranas de Policaprolactona Obtidas por Eletrofiação para Utilização em Engenharia Tecidual**. Tese de Doutorado para a Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade Estadual de Campinas: Campinas, 2011.

REDIGUIERI, C.F. **Gás ozônio como agente esterilizante de nanofibras eletrofiadas para engenharia tecidual: avaliação da segurança e da eficácia**. Tese de Doutorado para a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo: São Paulo, Brasil, 2016.

RENEKER, D.H.; YARIN, A.L. Electrospinning jets and polymer nanofibers. **Polymer**, v.49, n.10, p. 2387-2425, Mai. 2008. DOI: 10.1016/j.polymer.2008.02.002.

SANTOS, D. **Multifunctional Electrospun Fibre Membranes Associated to Bone Grafts for Bone Regeneration**. Tese de Mestrado para o Departamento de Engenharia Biomédica da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Porto, 2015.

SARKAR, K., et al. Electrospinning to Forcespinning™. **Materials Today**, v.13, n.11, p. 12-14, Nov.2010. DOI: 10.1016/S1369-7021(10)70199-1.

SCHMITT, F. **Aula de Biopatologia: Regeneração e Cicatrização**. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Out. 2006. Disponível em: https://users.med.up.pt/~cc04.10/biopatteoricas/Aula6_RegeneracaoCicatrizacao.pdf Acesso em 26 jun. 2019.

SHEIKH, Z., et al. Natural graft tissues and synthetic biomaterials for periodontal and alveolar bone reconstructive applications: a review. **Biomaterials research**, v.21, n.9, Jun. 2017. DOI: 10.1186/s40824-017-0095-5.

SOARES, L.G. **Obtenção por electrospinning e caracterização de fibras nanoestruturadas de TiO₂ e sua aplicação fotocatalítica**. Tese de Mestrado do Departamento de Engenharia de Minas, Metalúrgica e Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Porto Alegre, Brasil, 2013.

SOUSA, M.B.M.F.d. **Development and Characterization of Poly (Lactic Acid) / Fish Gelatine Electrospun Membranes for Peripheral Nerve Regeneration**. Tese de Mestrado para o Departamento de Engenharia Biomédica da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto: Porto, 2016.

TAN, S.H., et al. Systematic parameter study for ultra-fine fiber fabrication via electrospinning process. **Polymer**, v.46, n.16, p. 6128-6134, Jul. 2005. DOI: 10.1016/j.polymer.2005.05.068.

TAVARES, V.A.C.D.B. **Matrizes de Policaprolactona e Quitosano para aplicação em Engenharia de Tecidos**. Tese de Mestrado para a Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa: Lisboa, Portugal, 2011.

TIAW, K.S., et al. Laser surface modification of poly (ϵ -caprolactone) (PCL) membrane for tissue engineering applications. **Biomaterials**, v.26, n.7, p. 763-769, Mar. 2005. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.03.010.

VALENTE, T.A.M. **Electrospun poly (ϵ -caprolactone) nanofibers for bone regeneration and other biomedical applications**. Tese de Mestrado para o Departamento de Ciências Biomédicas da Universidade da Beira Interior: Covilhã, Portugal, 2011.

VAN DER SCHUEREN, L., et al. An alternative solvent system for the steady state electrospinning of polycaprolactone. **European Polymer Journal**, v.47, n.6, p. 1256-1263, Jun. 2011. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2011.02.025.

WANG, J., et al. Biodegradable Polymer Membranes Applied in Guided Bone/Tissue Regeneration: A Review. **Polymers**, Basel, v.8, n.4, p. 1-115, Mar. 2016. DOI: 10.3390/polym8040115.

WILLIAMS, D. Revisiting the definition of biocompatibility. **Medical device technology**, v.14, n.8, p. 3-10, Out. 2003.

WONG, S.C.; BAJI, A.; LENG, S. Effect of fiber diameter on tensile properties of electrospun poly (ϵ -caprolactone). **Polymer**, v.49, n.21, p. 4713-4722, Out. 2008. DOI: 10.1016/j.polymer.2008.08.022

WOODRUFF, M.A.; HUTMACHER, D.W. The return of a forgotten polymer: Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**, v.35, n.10, p.1217-1256, Out. 2010. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002.

XU, C.Y. et al. Aligned biodegradable nanofibrous structure: a potential scaffold for blood vessel engineering. **Biomaterials**, v.25, n.5, p. 877-886, Fev. 2004. DOI: 10.1016/s0142-9612(03)00593-3.

YANG, F., et al. Electrospinning of nano/micro scale poly (L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. **Biomaterials**, v.26, n.15, p. 2603-2610, Mai. 2005. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.06.051.

YANG, G.Z., et al. Influence of Working Temperature on the Formation of Electrospun Polymer Nanofibers. **Nanoscale research letters**, Shanghai, v.12, n.1, p. 55-55, Dez. 2017. DOI: 10.1186/s11671-016-1824-8.

YUAN, H.; ZHOU, Q.; ZHANG, Y. 6 - Improving fiber alignment during electrospinning. In: **Electrospun Nanofibers**, Woodhead Publishing Series in Textiles, p. 125-147, 2017.

ZHANG, Y.Z., et al. Characterization of the Surface Biocompatibility of the Electrospun PCL-Collagen Nanofibers Using Fibroblasts. **Biomacromolecules**, v.6, n.5, p. 2583-2589, Out. 2005. DOI: 10.1021/bm050314k.

ZHANG, H.Y., et al. Comparing Properties of Variable Pore-Sized 3D-Printed PLA Membrane with Conventional PLA Membrane for Guided Bone/Tissue Regeneration. **Materials**, Basel, v.12, n.10, p. 1718, Mai. 2019. DOI: 10.3390/ma12101718.

ZHU, W., et al. Cold Atmospheric Plasma Modified Electrospun Scaffolds with Embedded Microspheres for Improved Cartilage Regeneration. **PLoS One**, v.10, n.7, Jul. 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0134729.

ZHU, Y., et al. Macro-alignment of electrospun fibers for vascular tissue engineering. **Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials**, v.92, n.2, p. 508-16, Fev. 2010. DOI: 10.1002/jbm.b.31544.