

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**Faculdade de Engenharia Química**

**Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos**

**“Recobrimento de Tela de Polipropileno com Quitosana e Polietileno Glicol por Deposição via *Electrospinning*”**

Walter Anibal Rammazzina Filho

Autor

Prof. Dra. Ângela Maria Moraes

Orientadora

Prof. Dr. José Alberto Fracassi da Silva

Co-orientador

*Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.*

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

R146r	<p>Rammazzina Filho, Walter Anibal Recobrimento de tela de polipropileno com quitosana e poli / Walter Anibal Rammazzina Filho. --Campinas, SP: [s.n.], 2011.</p> <p>Orientadores: Ângela Maria Moraes, José Alberto Fracassi da Silva.</p> <p>Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.</p> <p>1. Eletrofição. 2. Biomateriais. 3. Hérnia - Cirurgia. 4. Quitosana. 5. Polietileno glicol. I. Moraes, Ângela Maria. II. Silva, José Alberto Fracassi da. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.</p>
-------	--

Título em Inglês: Coating of polypropylene mesh with chitosan and polyethylene glycol through electrospinning deposition

Palavras-chave em Inglês: Electrospinning, Biomaterials, Hernia surgery, Chitosan, Polyethylene glycol

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Luismar Marques Porto, João Sinézio de Carvalho Campos

Data da defesa: 05-09-2011

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Walter Anibal Rammazzina Filho e aprovada em 05 de Setembro de 2011 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

  
Prof. Dr.ª Angela Maria Moraes

  
Prof. Dr. Luismar Marques Porto

  
Prof. Dr. João Sáezio de Carvalho Campos

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado defendida pelo aluno Walter Anibal Rammazzina Filho, orientada pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ângela Maria Moraes e co-orientada pelo Prof. Dr. José Alberto Fracassi da Silva, e aprovada pela Comissão Julgadora em 05 de Setembro de 2011.

A handwritten signature in black ink, reading "Ângela Maria Moraes". The script is cursive and elegant, with the first letter 'A' being particularly large and stylized.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ângela Maria Moraes

Orientadora



*Aos meus amados e estimados pais.*

Somos o que pensamos. Tudo  
o que somos surge com nossos  
pensamentos. Com nossos  
pensamentos, fazemos o nosso  
mundo.

(Buda)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado saúde, paciência, sabedoria e perseverança para buscar sempre o equilíbrio.

Agradeço de maneira imensurável a meus pais, Walter e Rosângela, e minha irmã, Ana Carolina, eterna fonte de amor e motivação para que eu me torne uma pessoa cada vez melhor. Obrigado por todo o sacrifício realizado, esse e todos os meus trabalhos dedico a vocês.

À Profa. Dra. Ângela Maria pela orientação, ensinamentos e auxílio.

Ao Prof. Dr. José Alberto Fracassi da Silva, pela co-orientação, apoio e por ter disponibilizado o equipamento para eletrodeposição e a estrutura de seu laboratório.

Aos membros da banca de qualificação, Dr. Alexandre Zatkovskis Carvalho, Prof. Dr. João Sinézio de Carvalho Campos (que em especial, agradeço todo o carinho desde a época da graduação), Profa. Mônica Alonso Cotta; e da defesa, Prof. Dr. Luismar Marques Porto e Prof. Dr. João Sinézio de Carvalho Campos, pelas sugestões no trabalho.

Aos professores Dr. Everson Alves Miranda e Dra. Sônia Maria Alves Bueno, pelo uso das dependências de seus laboratórios.

Ao pessoal da Celli Engenharia (Taíse, Cristiane, Rodolfo, Amilton) pela amizade, em especial a minha prima Márcia Ramazzini e ao José Celli por todo o apoio durante essa caminhada. Serei eternamente grato.

Aos meus amigos de Marília que há tantos anos estão junto comigo. A meus amigos da Graduação da FEQ, a minha amiga Daniele, que me apoiaram e me deram forças, muito obrigado. A meus amigos e colegas do IQ (Richard, Aline Guadalupe, Heloisa Hoga, Alexandre, Aline Mora), agradeço todo o companheirismo. A todos do LEBC, LEBp e LIMBIO, obrigado pela companhia. A diversos Mestres que tive durante esse período na FEQ, agradeço por tudo o que me foi ensinado.

Em especial, agradeço à Ana Kelly, por todo o companheirismo, amizade e compreensão, à Cecília por toda a ajuda quando precisei e à Luana por estar comigo desde a época das disciplinas.

Aos funcionários da FEQ e do IQ que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Em especial, ao Daniel Razzo pelas análises por microscopia eletrônica de varredura e à Profa. Dra. Telma Teixeira Franco, pelas análises por cromatografia por permeação em gel.

À empresa Acecil Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda, pela esterilização das telas.

À FAPESP pela bolsa de Mestrado e pela reserva técnica utilizada durante a execução do projeto e à CAPES pelo custeio de parte do trabalho.

## Resumo

O uso de implantes em cirurgias de correção da parede abdominal é freqüentemente necessário. Telas de poli(propileno) podem ser empregadas com sucesso para essa finalidade, possuindo boa aceitação tecidual e baixo custo. O uso deste tipo de biomaterial pode, porém, ocasionar a aderência indesejada entre tecidos e/ou entre órgãos como o fígado e os intestinos e a tela, resultando em dores abdominais, obstrução intestinal e infertilidade. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi o de desenvolver uma estratégia de recobrimento de telas de poli(propileno) enfocando a deposição de soluções de quitosana de massa molar baixa e média e de polietilenoglicol (PEG) de massa molar igual a 1000 Da por *electrospinning*. Para fins de comparação, telas de poli(propileno) foram alternativamente recobertas por imersão com diferentes soluções combinando quitosana e PEG. Nos estudos de recobrimento *via electrospinning*, foram avaliadas as variáveis tipo de solvente para a dissolução da quitosana e do PEG, vazão de solução de recobrimento, proporção entre quitosana e PEG, diferença de potencial usada durante a deposição e distância entre a tela e o jato de injeção. As telas recobertas através da imersão em soluções de quitosana a 1% (tanto com a de baixa massa molar quanto a com massa molar média) e em soluções de quitosana misturada ao PEG também com concentração de sólidos total de 1% apresentaram-se satisfatórias para fins de barreira física em cirurgias de hérnia, considerando-se o aspecto, a uniformidade, os valores médios de espessura (de 1140 e 990  $\mu\text{m}$ , respectivamente), a perda de massa em fluido corpóreo simulado (5,1 e 8,9%, respectivamente) e a capacidade de absorção do mesmo fluido (0,76 e 0,59 g/g, respectivamente). Já o recobrimento por *electrospinning* resultou no depósito de fibras emaranhadas na superfície das telas, que apresentaram, então espessuras finais variando entre 581 e 612  $\mu\text{m}$ , perdas de massa entre 4,9 e 9,2% em fluido corpóreo simulado, capacidade de absorção de 0,17 a 0,36 g/g em fluido corpóreo simulado e diâmetros de fibras de 20,9 a 92,2  $\mu\text{m}$ . O recobrimento *via electrospinning* resultou em biomateriais menos espessos e com menos massa associada, com bom potencial de uso na aplicação pretendida.

## Abstract

The use of implants in surgical correction of the abdominal wall is frequently required. Polypropylene meshes can be successfully employed for this purpose, having good tissue acceptance and low cost. The use of this biomaterial, however, can lead to undesired adhesion between tissues and/or between organs such as the liver and intestines and the mesh, resulting in abdominal pain, bowel obstruction and infertility. In this context, the objective of this work was to develop different coatings of polypropylene meshes, focusing on the deposition of solutions of chitosan of low and medium molecular weight and polyethylene glycol (PEG) of molecular weight equal to 1000 Da by electrospinning. For comparison, polypropylene meshes were alternatively coated by immersion in different solutions combining chitosan and PEG. In the studies of coating via electrospinning, the effect of the variables type of solvent for the dissolution of chitosan and PEG, coating solution flow rate, chitosan to PEG mass ratio, the potential difference used during the deposition and the distance between the mesh and the injection jet were evaluated. Meshes coated by immersion in chitosan (both with low and medium molar mass) and PEG solutions with total solids concentration of 1% were satisfactory for purposes of physical barrier in hernia surgery, considering aspect, uniformity, mean thickness (1140 and 990  $\mu\text{m}$ , respectively), mass loss (5.1 and 8.9%, respectively) and the capacity of fluid absorption (0.76 and 0.59 g/g, respectively). Coating by electrospinning resulted in the deposition of entangled fibers on the surface of the meshes, which had final thickness ranging between 581 and 612  $\mu\text{m}$ , losses of mass between 4.9 and 9.2% in simulated body fluid, absorption capacity of 0.17 to 0.36 g/g in the same fluid and fiber diameters from 20.9 to 92.2  $\mu\text{m}$ . Coating the meshes via electrospinning resulted in thinner biomaterials and with less associated mass, with good potential for use in the intended application.

## Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Justificativa e relevância.....	1
1.2. Objetivos .....	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1. Biomateriais .....	5
2.2. Utilização de telas de poli(propileno) em cirurgias de hérnia .....	8
2.3. Uso de quitosana na produção de biomateriais .....	16
2.4. Emprego da técnica de electrospinning em diferentes campos de aplicação ...	21
2.4.1. Aparato experimental para o processo de <i>electrospinning</i> .....	24
2.4.2. Aspectos técnicos do <i>electrospinning</i> .....	25
2.4.2.1. Mecanismo.....	25
2.4.2.2. Influência das condições de condução do processo.....	27
2.5. Características relevantes do PEG em aplicações in vivo e em processos de electrospinning.....	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	42
3.1. Materiais.....	42
3.2. Métodos .....	42
3.2.1. Montagem do aparato experimental para o processo de <i>electrospinning</i> .....	42
3.2.2. Eletropolimento das agulhas utilizadas.....	43
3.2.3. Recobrimento com quitosana e PEG por <i>electrospinning</i> .....	44
3.2.4. Recobrimento das telas por imersão .....	46
3.2.5. Procedimento de esterilização das amostras.....	47
3.2.6. Caracterização das amostras recobertas .....	47
3.2.6.1. Aspecto e homogeneidade do recobrimento .....	47
3.2.6.2. Morfologia da superfície e da secção transversal.....	48
3.2.6.3. Aspecto e diâmetro das fibras .....	48
3.2.6.4. Espessura do recobrimento .....	48
3.2.6.5. Capacidade de absorção em fluido corpóreo simulado .....	48
3.2.6.6. Perda de massa após exposição a FCS .....	49
3.2.6.7. Análise da massa molar das quitosanas utilizadas no recobrimento de telas .....	50

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	51
4.1. Recobrimento de telas por imersão .....	51
4.1.1. Aspecto visual, morfologia e espessura das telas recobertas.....	51
4.1.2 Capacidade de absorção de fluido corpóreo simulado .....	55
4.1.3 Perda de massa em fluido corpóreo simulado .....	56
4.2 Ensaio preliminares envolvendo o recobrimento via electrospinning .....	57
4.2.1. Análise do efeito da vazão nas características do recobrimento.....	58
4.2.2. Análise da influência da distância agulha-coletor .....	59
4.2.3. Influência da tensão .....	60
4.2.4. Efeito do tipo de solvente utilizado .....	61
4.2.5. Efeito da concentração de polímeros .....	62
4.2.6. Recobrimento em condições ambientais monitoradas empregando agulhas com tratamento superficial (ou eletropolidas).....	63
4.2.7. Efeito da mudança da formulação da solução polimérica no recobrimento via electrospinning.....	69
4.3 Análise detalhada do efeito das variáveis de estudo nas características das telas recobertas por <i>electrospinning</i> .....	76
4.3.1. Efeito da concentração de PEG nas características das fibras.....	77
4.3.1.1. Morfologia das fibras formadas no processo .....	77
4.3.1.2. Diâmetro médio das fibras obtidas .....	79
4.3.1.3. Espessura das telas recobertas .....	81
4.3.1.4. Capacidade máxima de absorção de FCS .....	81
4.3.1.5. Perda de massa durante exposição a soluções aquosas .....	82
4.3.2. Efeito da distância agulha-coletor nas fibras resultantes .....	83
4.3.2.1. Morfologia das fibras formadas no processo .....	83
4.3.2.2. Diâmetro médio das fibras obtidas .....	85
4.3.2.3. Espessura das telas recobertas .....	86
4.3.2.4. Capacidade máxima de absorção de FCS .....	86
4.3.2.5. Perda de massa durante exposição em FCS .....	87
4.3.3. Influência da vazão nas fibras geradas pelo processo de <i>electrospinning</i> .....	88
4.3.3.1. Morfologia das fibras formadas no processo .....	88
4.3.3.2 Diâmetro médio das fibras obtidas .....	90
4.3.3.3 Espessura das telas recobertas .....	91
4.3.3.4 Capacidade máxima de absorção de FCS .....	91

4.4.3.5 Perda de massa durante exposição a FCS .....	92
4.3.4 Efeito da adição de surfatante nas soluções de quitosana e PEG eletrodepositadas.....	93
4.3.4.1 Morfologia das fibras formadas no processo .....	93
4.3.4.2 Diâmetro médio das fibras obtidas .....	96
4.3.4.3 Espessura das telas recobertas .....	97
4.4.4.4 Capacidade máxima de absorção de FCS .....	97
4.4.4.5- Perda de massa durante exposição a FCS .....	98
4.4- Propriedades adicionais das telas recobertas via <i>electrospinning</i> .....	99
5 CONCLUSÕES.....	102
5.1 Sugestões para trabalhos futuros.....	103
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	105
7 ANEXOS.....	121

## Lista de Figuras

Figura 2.1- Micrografias eletrônicas de tela de poli(propileno) (A) e Sepramesh™ (B) (Felemovicius et al., 2004).....	11
Figura 2.2- Aspecto da tela Prolene® Hernia System (Cardinal Health, 2011).....	13
Figura 2.3- Aspecto da Tela Ultrapro® Hernia System (JE Hospitalar, 2011). ....	14
Figura 2.4- Aspecto da Tela Vypro® Hernia System (JE Hospitalar, 2011).....	14
Figura 2.5- Estruturas químicas dos polissacarídeos: (a) quitina e (b) quitosana.....	17
Figura 2.6- Estimativa de campos de pesquisa-alvo em electrospinning em função número de patentes de cada aplicação para nanofibras eletrodepositadas (adaptado de Queen, 2006). ....	24
Figura 2.7 - Diagrama ilustrativo da formação de fibras por electrospinning e deposição na superfície do material a ser recoberto (adaptado de Queen, 2006).....	25
Figura 2.8- Formação e origem do cone de Taylor. ....	26
Figura 2.9- Microscopia eletrônica de varredura de nanofibras de Quitosana/PEG na proporção de 60/40 (m/m) (Bhattacharai et al., 2005).....	27
Figura 2.10- Microscopia de força atômica de fibras de PS de 190000 g/mol dissolvida em THF eletrodepositadas variando a relação polímero/solvente (m/v): (a) menor que 25%, (b) 31-38%, (c) 40-45%, (d) 50-59%, (e) 60-72% (Casper et al., 2004).....	31
Figura 2.11- Estrutura química dos Pluronic (Sigma-Aldrich, 2011a). ....	35
Figura 2.12- A altas viscosidades, as moléculas de solvente estão distribuídas nas moléculas poliméricas emaranhadas [A]. A uma viscosidade menor, as moléculas de solvente tendem a se agregar sob a ação da tensão superficial [B] (adaptado de Ramakrishna et al., 2005). ....	38
Figura 3.1- Sistema utilizado para o recobrimento das telas. ....	43
Figura 3.2- Aparato experimental para o eletropolimento de agulhas ....	44
Figura 4.1- Aspecto visual das telas de poli(propileno): a) sem recobrimento; b) recoberta com quitosana no ensaio 1QM; c) recoberta com quitosana no ensaio 2QM; d) recoberta com quitosana e PEG no ensaio QM+P e e) de recoberta com quitosana de massa molar baixa e PEG no ensaio QB+P.....	52
Figura 4.2- Morfologia de superfície (MEV) das telas: a) sem recobrimento e b) recoberta com quitosana (amostra 1QM).....	53
Figura 4.3- Secção transversal (MEV) das telas: a) sem recobrimento e b) recoberta com quitosana (amostra 1QM). ....	53
Figura 4.4- Morfologia de superfície (MEV) das telas recobertas com PEG com quitosana de massa molar: a) média (1QM+P) e b) baixa (1QB+P).....	53



- Figura 4.5- Morfologia de superfície recoberta com quitosana a 0,8% (m/v) e PEG a 1,8% (m/v) em solução aquosa de ácido acético a 60%, tensão de 15 kV, distância de 10 cm, agulha de 21G utilizando vazões de: a) 5 mL/h b) 7,5 mL/h e c) 10 mL/h (barras de 5  $\mu$ m).  
..... 58
- Figura 4.6- Morfologia da superfície recoberta com quitosana a 0,8% (m/v) e PEG a 1,8% (m/v) em ácido acético a 60%, tensão de 15 kV, vazão de 5 mL/h, agulha de 21G, utilizando distância agulha-coletor de: a) 7,5 cm b) 10 cm e c) 12,5 cm (barras de 5  $\mu$ m).  
..... 60
- Figura 4.7- Morfologia da superfície recoberta com quitosana a 0,8% (m/v) e PEG a 1,8% (m/v) ácido acético a 60%, vazão de 5 mL/h utilizando distância agulha-coletor de 10 cm, agulha de 21G, submetido a tensões de a) 10 kV b) 15 kV c) 20 kV (barras de 5  $\mu$ m)..... 60
- Figura 4.8- Morfologia da superfície recoberta com quitosana a 0,8% (m/v) e PEG a 1,8% (m/v), vazão de 5 mL/h utilizando distância agulha coletor de 10 cm, tensão de 15 kV, agulha de 21G empregando como solventes soluções aquosas de: a) ácido acético a 60% (v/v) b) etanol e ácido acético a 60% (v/v) e 1% (v/v), respectivamente c) acetona e ácido acético a 60% (v/v) e 1% (v/v), respectivamente (barras de 5  $\mu$ m)..... 61
- Figura 4.9- Morfologia da superfície recoberta com mistura de quitosana em variadas proporções e PEG a 1,8% (m/v) em ácido acético a 60%, na tensão de 15 kV, vazão de 5 mL/h, distância agulha-coletor de 10 cm, vazão de 5mL/h, agulha de 21G, nas seguintes concentrações de quitosana a: a) 0,8% b) 1,2% c) 1,6% (m/v) (barras de 5  $\mu$ m)..... 62
- Figura 4.10- Agulhas originalmente chanfradas de: a) 21 G e b) 23 G..... 63
- Figura 4.11- Agulhas eletropolidas de: a) 21 G e b) 23 G. .... 64
- Figura 4.12- Microscopias dos recobrimentos das amostras em placas de vidro: a) 1A (aumento de 100X) b) 2A (aumento de 400X) c) 3A (aumento de 100X) e d) 4A (aumento de 40X)..... 66
- Figura 4.13- Microscopias dos recobrimentos das amostras: a) 5A (aumento de 40X) b) 6A (aumento de 400X) c) 7A (aumento de 400X) d) 8A (aumento de 400X) e e) 9A (aumento de 100X). .... 68
- Figura 4.14- Aspecto do recobrimento obtido através da alteração da composição do solvente: a) formação de fibras b) deposição de material úmido..... 70
- Figura 4.15- Microscopias eletrônicas de varredura do recobrimento resultante da mudança de composição do solvente. .... 71
- Figura 4.16- Formação de fibras, nas condições: agulha de 21G, tensão de 15 kV, vazão de 1 mL/h, distância de 7,5 cm entre agulha e coletor, concentrações de 1,6% de quitosana QB e de 2,5% de PEG solubilizados em 20% de água, 40% de ácido acético e 40% de acetona..... 72
- Figura 4.17- Aspecto macroscópico das fibras resultantes do processo de electrospeining, nas condições: agulha de 21G, tensão de 15 kV, vazão de 1 mL/h, distância de 7,5 cm entre agulha e coletor, concentrações de 1,6% de quitosana QB e de 2,5% de PEG solubilizados em 20% de água, 40% de ácido acético e 40% de acetona..... 73

Figura 4.18- Microscopias das fibras formadas por eletrodeposição nas condições: agulha de 21G, tensão de 15 kV, vazão de 1 mL/h, distância de 7,5 cm entre agulha e coletor, concentrações de 1,6% de quitosana QB e de 2,5% de PEG solubilizados em 20% de água, 40% de ácido acético e 40% de acetona.....	74
Figura 4.19- Estruturas de auto-organização molecular de sericina obtidas por Khire et al. (2010). .....	74
Figura 4.20- Morfologia de superfície das fibras preparadas em diferentes concentrações de PEG: (a) ensaio 1C – 2,0%; (b) ensaio 2C – 2,5% ;e (c) ensaio 3C – 3,0%. .....	78
Figura 4.21- Detalhe da morfologia de superfície das fibras obtidas no ensaio 1C. ....	78
Figura 4.22- Morfologia de superfície das fibras obtidas utilizando as distâncias agulha-coletor de: a) Ensaio 1D - 5 cm; b) Ensaio 3C - 7,5 cm; e c) Ensaio 2D - 10 cm.....	84
Figura 4.23- Morfologia de superfície das fibras obtidas no ensaio 2D, apresentando características mais longilíneas, lisas e arredondadas.....	84
Figura 4.24- Morfologia de superfície das fibras obtidas utilizando as vazões de: a) Ensaio 1E – 0,5 mL/h; b) Ensaio 2D – 1,0 mL/h; e c) Amostra 2E – 2,0 mL/h. ....	89
Figura 4.25- Morfologia de superfície das fibras obtidas utilizando as concentrações de surfatante de a) 0% - ensaio 1E b) 0,5% - Ensaio 1F e c) 1% - Ensaio 2F.....	94
Figura 4.26- Microscopia eletrônica de varredura da amostra obtida no ensaio 2F com maior aproximação. ....	95
Figura 4.27- Microscopia óptica da amostra 2F sem tratamento com NaOH (a) e microscopia eletrônica de varredura (b) .....	99
Figura 4.28- Imagens da amostra 2F referentes às microscopias ópticas (a e b) e eletrônica de varredura (c) da amostra da amostra 2F tratada com NaOH. ....	100

## Lista de Tabelas

Tabela 2.1- Valores em reais para as diferentes telas disponíveis no mercado .....	15
Tabela 2.2 - Principais aplicações da quitina e quitosana (adaptada de Dallan, 2005). ...	18
Tabela 2.3- Trabalhos utilizando eletrodeposição de diferentes soluções poliméricas.....	23
Tabela 2.4- Condutividade elétrica de alguns solventes. ....	33
Tabela 2.5- Constante dielétrica de diferentes solventes. ....	37
Tabela 4.1- Espessuras das telas de poli(propileno) com e sem recobrimento. ....	54
Tabela 4.2- Capacidade de absorção das telas de poli(propileno) recobertas após 24 h de exposição ao FCS a 37°C.....	55
Tabela 4.3- Perda de massa das telas de poli(propileno) recobertas após exposição a FCS por 7 dias.....	56
Tabela 4.4- Condições utilizadas nos quatro primeiros experimentos da etapa, utilizando concentrações de 1,6% de quitosana (massa molar média) e de 1,8% de PEG, distância agulha-coletor de 5 cm e tensão de 15 kV. ....	65
Tabela 4.5- Condições utilizadas nos cinco ensaios posteriores desta etapa, utilizando concentrações de 1,6% de quitosana e vazão de 1 mL/h. ....	67
Tabela 4.6- Condições utilizadas na alteração da formulação do solvente utilizando concentrações de 1,6% de quitosana e vazão de 1 mL/h, com solvente constituído por 40% de ácido acético, 40% de acetona e 20% de água.....	70
Tabela 4.7- Condições iniciais utilizadas nessa etapa experimental. ....	76
Tabela 4.8- Diâmetro das fibras obtidas variando-se a concentração de PEG.....	80
Tabela 4.9- Espessuras obtidas para as telas recobertas em cada ensaio realizado.....	81
Tabela 4.10-Valores obtidos para a capacidade máxima média (C) de absorção das telas de poli(propileno) recobertas com soluções contendo diferentes concentrações de PEG.	82
Tabela 4.11- Valores obtidos para a perda de massa a 37°C, por sete dias, dos conjuntos produzidos. ....	83
Tabela 4.12- Diâmetro das fibras obtidas variando-se a distância da agulha. ....	85
Tabela 4.13- Valores de espessura obtidos para os conjuntos tela de poli(propileno) e recobrimento nos ensaios em que se variou a distância agulha-coletor.....	86
Tabela 4.14- Valores obtidos para a capacidade máxima média (C) de absorção das telas de poli(propileno) recobertas variando a distância agulha-coletor.....	87
Tabela 4.15- Valores obtidos para a perda de massa a 37°C, por sete dias, dos conjuntos produzidos variando a distância agulha e coletor.....	87
Tabela 4.16- Diâmetro das fibras obtidas variando-se a vazão de trabalho. ....	90
Tabela 4.17-Espessura dos materiais recobertos pela alteração da vazão de solução polimérica. ....	91

Tabela 4.18- Valores obtidos para a capacidade máxima média (C) de absorção dos conjuntos variando-se a vazão de injeção. ....	92
Tabela 4.19- Valores obtidos para a perda de massa das amostradas estocadas em diferentes fluidos durante sete dias, a 37°C, obtidos pelo uso de diferentes vazões de injeção da solução polimérica .....	92
Tabela 4.20- Diâmetro das fibras obtidas variando-se a adição de surfatante. ....	96
Tabela 4.21- Espessura dos materiais recobertos considerando a adição de surfatante. ....	97
Tabela 4.22- Valores obtidos para a capacidade máxima média (C) de absorção das telas de poli(propileno) recobertas alterando a concentração de surfactante. ....	98
Tabela 4.23- Valores obtidos para a perda de massa a 37°C, por sete dias, dos conjuntos produzidos em recobrimentos nos quais se estudou a adição de surfatante.....	98

**Nomenclatura**

1QM	Quitosana de massa molar média 1% em solução
2QM	Quitosana de massa molar média 2% em solução
C	Capacidade de absorção de fluido corpóreo simulado
CMC	Carboximetilcelulose
DHEP	Di(2-etilhexil)ftalato
FCS	Fluido corpóreo simulado
G	Gauge
GPC	Cromatografia de permeação em gel
HA	Ácido hialurônico
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
Mf	Massa final
MM	Massa molar
Ms	Massa inicial
NaOH	Hidróxido de sódio
P(LLA-CL)	Copolímero de poli(ácido lático) e poli(capro-lactona)
PEG	Poli(etileno) glicol
PHS	Prolene Hernia System
PM	Perda de massa em fluido corpóreo simulado
PP	Poli(propileno)
PS	Poli(sulfona)
PTFE	Poli(tetrafluoretileno)
PVC	Poli(cloreto de vinila)

QB	Quitosana de baixa massa molar
QB+P	Quitosana de baixa molar adicionada a PEG
QM	Quitosana de massa molar média
QM+P	Quitosana de massa molar média adicionada a PEG
SUS	Sistema Único de Saúde
THF	Tetrahidrofurano

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Justificativa e relevância

Tem-se verificado um apreciável aumento nos últimos anos no número e no tipo de dispositivos de uso clínico com as mais diversas funções. Os dispositivos implantados temporária ou permanentemente no corpo humano são frequentemente denominados de “biomateriais”, sendo este termo adotado desde a Conferência do Instituto Nacional de Desenvolvimento de Consenso em Saúde, em 1982. Entretanto, um biomaterial pode ser definido, de forma mais ampla, como “qualquer substância (outra que não um fármaco) ou combinação de substâncias, sintéticas ou naturais quanto à origem, que possa ser usada por um período de tempo, completa ou parcialmente, como parte de um sistema que trate, aumente ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo humano” (Helmus e Tweden, 1995). Os biomateriais podem ser metálicos, cerâmicos, poliméricos (sintéticos ou naturais), compósitos ou mesmo consistir de dispositivos recobertos. Para que possam ser empregados *in vivo* com sucesso, estes materiais devem ser biocompatíveis, não causando reações alérgicas ou inflamatórias.

Uma das aplicações de importância dos biomateriais é a contenção de hérnias abdominais. Nessa região do organismo, o fator crucial para o sucesso da utilização do biomaterial depende da capacidade do mesmo em fixar-se apenas ao órgão a ser recuperado, sem resultar em adesões na interface com outros tecidos. Como os biomateriais presentes no mercado não são totalmente eficientes nesse sentido, diversas pesquisas têm sido realizadas a fim de se evitar tais complicações cirúrgicas.

Adesões pós-operatórias, as quais resultam de uma agressão ao peritônio, cuja etiologia ocorre por falhas no mecanismo de reparo peritoneal, fazendo surgir, então cicatrizes que se desenvolvem em locais de trauma após intervenção, acontecem em 55 a 97% dos pacientes submetidos a cirurgias abdominais (Diamond *et al.*, 2003). Em mulheres, esse índice corresponde a 80%, podendo ocasionar infertilidade, obstrução intestinal e dores pélvicas crônicas. Além disso, um estudo mostra que 35% das mulheres que passaram por cirurgias ginecológicas precisam ser novamente operadas devido a

adesões em média 2 vezes nos 10 anos seguintes à primeira intervenção (Binda *et al.*, 2003).

Um dos tipos de adesão mais comumente verificado é o que ocorre na região peritoneal. O peritônio é a maior membrana serosa do corpo, possuindo duas camadas (parietal e visceral). Suas principais funções são a redução do atrito entre as vísceras abdominais, o aumento da resistência a possíveis infecções e o armazenamento de gordura. Adesões são geralmente formadas de 7 a 10 dias após a lesão peritoneal decorrente de, por exemplo, procedimentos cirúrgicos. Entre os sintomas mais comuns, pacientes com adesões peritoneais relatam dores abdominais e pélvicas devido à restrição indireta do movimento dos órgãos, resultante do alongamento e da contração dos músculos adjacentes às vísceras ou à parede abdominal. A exploração dessas estruturas por técnicas micro laparoscópicas mostra que 80% desses pacientes apresentam fragilidade nos tecidos que, aparentemente, geram estímulos dolorosos. Após a adesiólise (intervenção cirúrgica para separar ou remover aderências), a maioria dos sintomas desaparece (Sulaiman *et al.*, 2001).

A cicatrização dos ferimentos peritoneais resultantes de cirurgia, infecção ou inflamação é iniciada a partir de uma reação inflamatória que aumenta a quantidade de fluido peritoneal, inclusive células e proteínas, levando à formação de fibrina. Embora as adesões abdominais pós-operatórias possam ser removidas através de procedimentos cirúrgicos, estas podem reaparecer de forma ainda mais severa, o que tem estimulado a realização de estudos para evitar ou minimizar a formação de aderências e eliminar a necessidade de tratamentos cirúrgicos repetidos, invasivos e custosos (Zhou *et al.*, 2004). Alguns produtos estão sendo desenvolvidos para esta finalidade, como agentes antiinflamatórios, antioxidantes e anticoagulantes.

Assim, um dispositivo ideal para a contenção de hérnias abdominais deve ser capaz de manter a sua resistência mecânica e se integrar com os tecidos circundantes sem induzir a formação de aderências (Bellón *et al.*, 2001). Uma das estratégias estudadas é a inserção de barreiras físicas, cuja eficácia e aplicação foram estudadas, por exemplo, por Avital *et al.* (2005). Tais barreiras podem se apresentar na forma de filme ou gel reabsorvíveis colocadas entre as superfícies do tecido danificado e do biomaterial a ser implantado, como a utilização de dispositivos de quitosana (Paulo *et al.*,



2009). A incorporação de polietileno glicol (PEG) na formulação de materiais para aplicação como barreira física é de interesse, pois este composto tem se mostrado eficiente como proteção hidrofílica e apresenta baixa toxicidade, com reduzida incidência de reações alérgicas na aplicação *in vivo*. Entretanto, para que a eficácia do tratamento não seja comprometida, a barreira deve ser naturalmente degradada a uma velocidade apropriada.

Por vários anos o polietileno de baixa densidade foi utilizado no reparo de tecidos da parede abdominal. A partir de 1958, entretanto, com a introdução, nos EUA, de uma malha de poli(propileno) na prática cirúrgica pelo Dr. Francisco Usher, ocorreu a transição para este polímero e outros materiais sintéticos que possuam as qualidades requeridas, como serem quimicamente inertes, não carcinogênicos, antialergênicos e apresentarem adequada resistência mecânica (Greca *et al.*, 2001). Com isso, intensificou-se o estudo do uso de telas protéticas de poli(propileno), analisando-se a influência de sua espessura, diâmetro de poros, resistência mecânica, rigidez, textura superficial, carga elétrica e na recuperação da qualidade de vida dos pacientes. Apesar dos variados estudos já realizados nesta área e do já bem estabelecido uso das telas de poli(propileno) em cirurgias abdominais, ainda hoje se observa a ocorrência frequente de adesões peritoneais após sua utilização. Desta forma, estratégias que possam minimizar ou mesmo eliminar estes problemas, como a associação ou o recobrimento das telas com materiais biocompatíveis, são de grande valia.

## 1.2. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi o recobrimento de telas de poli(propileno) com quitosana e polietileno glicol ou poli(óxido de etileno), através da técnica de deposição via *electrospinning*, visando contribuir para a redução da ocorrência de adesões peritoneais quando do uso deste tipo de dispositivo em cirurgias abdominais. Os efeitos das seguintes variáveis nas características do material recoberto foram analisados: a massa molar da quitosana (baixa MM, 450 kDa e média MM, 600 kDa, verificadas através de cromatografia por permeação em gel), o tipo de solvente para a dissolução da quitosana e do PEG, o uso de tensoativos, a vazão de solução de recobrimento e a proporção

quitosana/PEG. A caracterização das amostras obtidas foi realizada pela análise do aspecto e da morfologia das telas recobertas, da espessura e da homogeneidade do recobrimento, da capacidade de absorção do conjunto tela/recobrimento em fluido corpóreo simulado, da perda de massa no mesmo fluido após 7 dias de contato, e da ocorrência de desprendimento do recobrimento da tela após a hidratação. Os resultados obtidos no recobrimento *via electrospinning* foram comparados com os observados para as telas recobertas por imersão em soluções de quitosana e PEG e mostraram que o recobrimento *via electrospinning* resultou em biomateriais menos espessos e com menor massa associada.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Biomateriais**

Um biomaterial pode ser definido como qualquer material empregado em dispositivos médicos que interagem com sistemas biológicos (Williams, 1987). Tal conceito vem sendo expandido nos últimos anos, por exemplo, com relação ao tipo de interação com sistemas biológicos, compreendendo materiais capazes não somente de tratar distúrbios em um órgão ou em uma dada função do corpo, mas também de estimular ou substituir qualquer tecido (incluindo, portanto, materiais bioativos). Tal dispositivo deve apresentar características adequadas quanto à porosidade, resistência à tensão, flexibilidade e elasticidade, além de ser biocompatível, sendo desejável em alguns casos que o material seja também bioativo e bioabsorvível.

Entende-se por biocompatibilidade a capacidade de um material desempenhar uma resposta tecidual apropriada em uma aplicação específica, enquanto a bioatividade se refere à propriedade inerente a alguns materiais de participarem em reações biológicas específicas. Camadas bioativas podem ser formadas, por exemplo, a partir de moléculas que previnem a formação de coágulos sangüíneos ou iniciam a degradação enzimática de um trombo. A hidroxiapatita, por exemplo, é muito utilizada no recobrimento de implantes endoósseos. Essa camada constitui uma superfície bioativa para o ancoramento de ossos neoformados.

Quanto ao tipo de material, os biomateriais podem ser constituídos de polímeros sintéticos, metais, cerâmicas e macromoléculas naturais (por exemplo, biopolímeros) que são processados a fim de se tornarem adequados a fins médicos, uma vez que estarão em contato com células, tecidos, órgãos e sistemas orgânicos.

Idealmente, os biomateriais não devem produzir qualquer resposta biológica adversa local ou sistêmica, ou seja: o material deve ser não tóxico, não carcinogênico, não antigênico e não mutagênico. A seleção de um biomaterial deve levar em consideração as características físicas, químicas e mecânicas do material. Algumas das propriedades mais relevantes nessa seleção são sumariamente discutidas a seguir.

A resistência mecânica é muito importante em dispositivos que sofram esforço frequente, como enxertos de aorta, válvulas cardíacas, balões de angioplastia e implantes odontológicos e ortopédicos. Dispositivos com alta resistência à fadiga devem suportar esforços cíclicos sem permitir propagação de trinca, sendo em sua maioria feitos de poliuretana, poliéster e metais em geral. Esses dispositivos funcionam em sua maioria como implantes ortopédicos, odontológicos e cardiovasculares. Quanto à rugosidade, em aplicações onde é desejado baixo atrito, como em implantes de juntas ortopédicas, utilizam-se materiais com acabamentos polidos. Quando se deseja integração tecido-implante, como em implantes endoósseos, alta rugosidade é desejada. Com relação à taxa de permeação de diferentes espécies, dispositivos como lentes de contato devem apresentar alta taxa de permeação de gases. Geralmente a permeação decresce com a cristalinidade do material. Hidrogéis são permeáveis à água e, por esta razão, são muito utilizados como dispositivos de liberação controlada de drogas (Silva, 2008).

A estabilidade em fluidos biológicos é também uma propriedade importante. Alguns materiais sofrem mudanças drásticas em sua resistência à tração, à fadiga, à fluência, em seu módulo de elasticidade, torção ou flexão quando ligeiramente umedecidos. A degradação também é afetada pela absorção de água: materiais hidrofílicos tendem a se degradar do interior para a superfície, enquanto materiais hidrofóbicos tendem a ter primeiramente suas superfícies degradadas. Dispositivos como fios de sutura e dispositivos de liberação controlada de fármacos devem ter sua degradação controlada, enquanto implantes permanentes devem ser estáveis.

O comportamento do biomaterial após sua esterilização é também de grande relevância, já que o método de esterilização utilizado pode influenciar o estado energético da superfície de um implante, alterando a resposta celular. Alguns polímeros podem ter suas propriedades negativamente alteradas quando esterilizados por irradiação com raios gama, apresentando, por exemplo, envelhecimento precoce.

Biomateriais metálicos apresentam alta resistência mecânica, à fadiga e ao desgaste, porém apresentam baixa resistência à corrosão em meio fisiológico, baixa biocompatibilidade e grande diferença de propriedades em relação aos tecidos vivos. As principais ligas utilizadas são as de titânio, de aço inoxidável e de cobalto-cromo.

Materiais metálicos são frequentemente empregados na constituição de próteses ortopédicas, em implantes dentários, em parafusos e em eletrodos.

Os biomateriais cerâmicos possuem como características alta resistência à compressão, alta resistência à corrosão em meio fisiológico, adequada biocompatibilidade, porém baixa resistência à tração e baixa tenacidade (pequena resistência a impactos necessários para levar um material à ruptura). Os principais materiais cerâmicos utilizados são a hidroxiapatita, a zircônia, o fosfato tricálcico e o carbono. As principais aplicações são em ossos artificiais, em traquéia artificial, em preenchimento ósseo, como fixador ósseo e na raiz de dentes.

Já os biomateriais obtidos a partir de polímeros sintéticos apresentam alta ductibilidade, boa biocompatibilidade, facilidade de fabricação, baixa resistência mecânica, e podem se degradar com o tempo. Os principais polímeros utilizados são o poli(etileno), o poli(metacrilato de metila), o Nylon<sup>®</sup>, o Dacron<sup>®</sup>, as siliconas e o ácido polilático. Suas principais aplicações são em superfícies articulares, cartilagem, cimentos ortopédicos e adesivos.

Os biomateriais também podem ser feitos a partir de polímeros naturais, como, por exemplo, os polissacarídeos quitosana, xantana, pectina, alginato e a carragena. Estes apresentam boa biocompatibilidade e biodegradabilidade, possuindo propriedades que favorecem a regeneração dos tecidos. Desta forma, biomateriais provenientes destas matérias-primas naturais se apresentam como uma alternativa relevante para a síntese de implantes que reparem tecidos moles e no tratamento de feridas e queimaduras. Em contrapartida, seu uso é restrito em peças que suportam elevadas cargas, visto que frequentemente são bioabsorvíveis, o que pode ser prejudicial em aplicações cuja durabilidade do biomaterial seja de fundamental importância. Outra limitação dessa classe de matéria-prima é a dificuldade em se obter no mercado polímeros de grau médico (sem aditivos ou contaminantes) e com propriedades reprodutíveis, já que suas características podem variar lote a lote.

O emprego de biomateriais para o tratamento de lesões é relatado há mais de 200 anos. Porém, os desenvolvidos antes de 1960 não atingiram alto nível de sucesso devido ao pouco conhecimento sobre biocompatibilidade. No final da Segunda Guerra Mundial, materiais inicialmente desenvolvidos para fins militares tornaram-se disponíveis

para uso como biomateriais. Posteriormente, uma área totalmente nova de pesquisa foi iniciada na década de 1960, que se caracterizou pela concepção de novos biomateriais com melhor desempenho biológico, considerando as propriedades comuns entre células, moléculas biologicamente ativas e estruturas tridimensionais conhecidas como *scaffolds* (Leeuwenburgh *et al.*, 2008).

Uma das aplicações de importância dos biomateriais é a contenção de hérnias abdominais. Para esta finalidade, segundo Minossi *et al.* (2008), um biomaterial ideal deve ter as seguintes características: resistência mecânica semelhante à dos tecidos circunvizinhos; não propiciar infecção (o que implicaria em sua retirada precoce); ser rapidamente incorporado pelo organismo; não estimular a fibrose excessiva; não ser carcinogênico, e ser economicamente viável. Nessa região do organismo, o fator crucial para o sucesso da utilização do biomaterial depende da capacidade do mesmo em fixar-se apenas à região a ser recuperada, sem resultar em adesões na interface com outros tecidos. Como os biomateriais presentes no mercado não são totalmente eficientes nesse sentido, diversas pesquisas têm sido realizadas a fim de se evitar tais complicações cirúrgicas, conforme discutido a seguir.

## **2.2. Utilização de telas de poli(propileno) em cirurgias de hérnia**

Hérnias constituem-se de defeito, enfraquecimento, ruptura ou relaxamento das estruturas da parede abdominal e que resulte na penetração de uma víscera ou tecidos através de uma abertura geralmente circular que pode ser congênita ou adquirida.

A hérnia da parede abdominal é uma incidência clínica com prevalência, tanto na população adulta como infantil, estimada entre 3% a 8%, sendo cinco a seis vezes mais comum no sexo masculino. Cerca de 75% das hérnias ocorrem na região inguinal. As hérnias incisionais e ventrais representam aproximadamente 10% de todos os tipos de hérnias e as femorais, apenas 3%, enquanto hérnias incomuns são responsáveis por 5% a 10% dos casos restantes (Minossi *et al.*, 2008).

A hérnia e seu reparo cirúrgico são temas vastamente estudados e de profundo interesse por parte dos cirurgiões. As estratégias de correção cirúrgica estão muito

distantes de chegar a um consenso entre os especialistas, havendo muitas divergências mesmo entre as grandes escolas médicas. O marco na correção das hérnias deve ser atribuído a Edoardo Bassini que, em 1884, na Itália, lançou as bases consideradas, até recentemente, as mais racionais para o tratamento das hérnias inguinais (Bassini, 1887).

Outros cirurgiões, como Marcy, discípulo norte-americano de Lister, Halsted, Mc Vay e outros cirurgiões do final do século 19 e começo do século 20, definiram a anatomia patológica e as principais técnicas operatórias, utilizadas até hoje. Na década de 90, emergiram modificações revolucionárias no tratamento das hérnias inguinais. A introdução do conceito de herniorrafia com livre tensão deu espaço aos reparos baseados na colocação de telas (Lichtenstein, “Mesh Plug”, Nyhus e reparo laparoscópico) (Minossi *et al.*, 2008).

Ainda segundo Minossi *et al.* (2008), as próteses, tanto biológicas como artificiais, foram inicialmente utilizadas como reforço realizado pela técnica convencional de tratamento de hérnia inguinal, que consiste da sutura do tendão conjunto ao ligamento de Cooper a partir do tubérculo púbico, lateralmente ao canal femoral, conferindo maior reforço à parede posterior do canal inguinal. O cirurgião, ao não se convencer da resistência do reforço, optava por complementá-lo usando uma prótese. Esta conduta, entretanto, era excepcional, mas hoje tornou-se um procedimento padrão e, de certa forma, indiscriminado. A partir de 1946, após estudos experimentais, foi introduzido na prática médica o uso de próteses metálicas, como as de tântalo e, posteriormente, as de aço inoxidável. A fragmentação destes materiais, no entanto, com risco de penetração em vasos e nervos, e a eventual migração de seus fragmentos para outras partes do organismo, limitou o uso desta técnica, desencadeando pesquisas com outros materiais, como o Nylon<sup>®</sup> (Rhodia), o polietileno, o polivinil, o Dacron<sup>®</sup> (Du Pont) e o Teflon<sup>®</sup> (Du Pont). Esses materiais, todavia, foram associados a um maior índice de infecção e rejeição. O poli(propileno) monofilamentar, material inerte com baixo índice de infecção e fistulização, é o material preferido pela maioria dos cirurgiões.

A escolha de telas multi ou monofilamentadas está relacionada à quantidade de corpo estranho que será introduzida no paciente, podendo aumentar a incidência de infecções. As infecções podem ser minimizadas com a escolha do tamanho dos poros e interstícios, por exemplo. Estes devem ser maiores que 10  $\mu\text{m}$ , pois a maioria das bactérias apresenta diâmetro da ordem de 1  $\mu\text{m}$  e os macrófagos, de 10  $\mu\text{m}$  (Pereira e

Pinheiro, 2008). As telas com multifilamentos em (poli(éster), poli(tetrafluoretileno), epoli(propileno), têm poros menores que 10  $\mu\text{m}$ , onde as bactérias podem se proteger da eliminação por macrófagos. Se ocorrer infecção, a tela deve ser retirada (Goldstein, 1998).

No caso do politetrafluoretileno (PTFE), os fibroblastos não conseguem aderir e se difundir devido à baixa tensão superficial, reduzindo a integração do material ao tecido. Além de apresentar resistência de incorporação 35% menor em relação à do poli(propileno) (Dinsmore *et al.*, 2000), é uma alternativa relativamente cara.

O processo inflamatório provocado pela prótese pode promover sua aderência aos tecidos e fístulas intestinais. O primeiro estágio para a formação de uma fístula é representado pela aderência do material sintético à víscera adjacente. O risco de fistulização não desaparece com o tempo, podendo se manifestar entre 14 a 20 anos após a cirurgia. A incidência de aderências e fistulizações varia de 0,3% a 23% quando se usa telas de poli(propileno) (Minossi *et al.*, 2008). Os riscos a longo prazo das próteses e seu efeito nos tecidos circunjacentes é motivo de preocupação para diversos estudiosos do assunto. Nyhus (2000) e Langer *et al.* (2001) alertam para o risco em potencial de uma persistente reação tecidual desencadear a transformação tumoral maligna local, fato observado em experimentos com animais.

Uma alternativa para tentar minimizar os problemas de aderência e fistulização verificados atualmente nas cirurgias de reparo de hérnia utilizando telas de poli(propileno) é o recobrimento destas com materiais que sejam biocompatíveis, biofuncionais e que evitem a aderência entre o material sintético do implante e a víscera a ele adjacente.

Felemovicus *et al.* (2004) estudaram os efeitos de implantes corretivos para a cirurgia de hérnia através de indução da resposta inflamatória provocada cirurgicamente em uma área de 2,5  $\text{cm}^2$  da parede abdominal de ratos e utilizaram implantes de tela de poli(propileno) do tipo Sepramesh<sup>®</sup>, aplicada tanto isoladamente quanto acoplado a Seprafilm<sup>®</sup> (Genzyme Corporation) para fins comparativos. O Sepramesh<sup>®</sup> (Genzyme Corporation) é constituído por uma tela de poli(propileno) recoberta em uma de suas faces com ácido hialurônico e carboximetilcelulose quimicamente modificados, aderidos à tela pelo uso de adesivo bioabsorvível à base do copolímero poligalactídeo/glicolídeo. Tal material é composto de uma face macroporosa para a integração de maneira firme e



rápida com a parede abdominal e de outra face com uma barreira reabsorvível em contato com as vísceras abdominais, visando inibir a formação de adesões. Já o Seprafilm<sup>®</sup> é uma membrana composta por hialuronato de sódio e carboximetilcelulose quimicamente modificada (HA/CMC). Este dispositivo reduz a formação de aderências através da separação mecânica temporária de superfícies peritoneais lesadas. O dispositivo Seprafilm<sup>®</sup> pode também inibir adesões pelos efeitos bioquímicos do ácido hialurônico.

No estudo de Felemovicius *et al.* (2004), cada grupo experimental envolveu 20 animais, e a área de adesão foi avaliada em termos da área da tela analisada por laparoscopia e após o sacrifício dos animais. Os períodos de avaliação variaram de 7 a 28 dias, e tecidos foram coletados para análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Na Figura 2.1 podem ser observadas as características típicas quanto ao aspecto avaliadas por micrografias eletrônicas das telas de poli(propileno) e Sepramesh<sup>®</sup> antes da exposição aos tecidos animais.

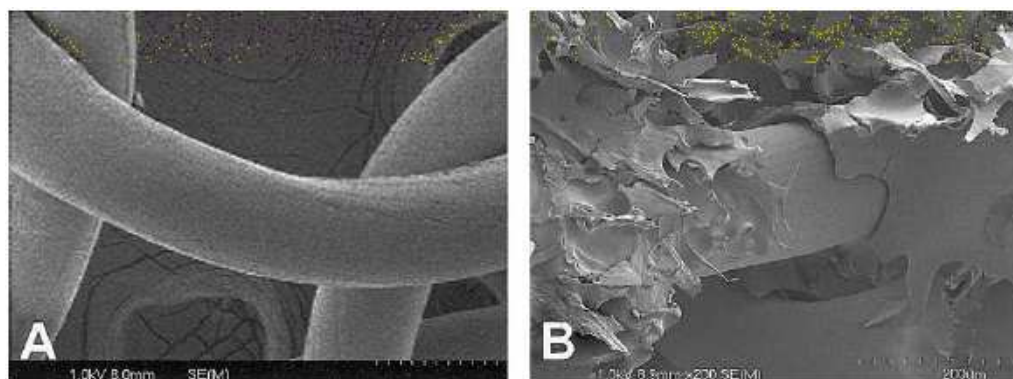


Figura 2.1- Micrografias eletrônicas de tela de poli(propileno) (A) e Sepramesh<sup>TM</sup> (B) (Felemovicius et al., 2004).

Os autores observaram que as aderências estavam completas no sétimo dia, não havendo posterior mudança na área em que estas ocorreram. Superfícies livres de adesão nas telas foram observadas até o quinto dia e, a partir de então, estas foram recobertas por células mesoteliais. A tela de poli(propileno) isolada induziu adesões em todos os ratos. A área média envolvida foi de 92%. Com Sepramesh<sup>TM</sup>, 9 dos 20 ratos ficaram livres de adesão, e a área média de adesão foi de apenas 15%. Quando o

Sepramesh<sup>®</sup> foi acoplado ao Seprafilm<sup>®</sup>, adesões mínimas se desenvolveram em 5 dos 20 ratos, com área média de cobertura de 2%. Quatro das cinco adesões ocorreram em um ponto de ancoragem isolado. Os autores concluíram que o Sepramesh<sup>®</sup> reduz em cerca de três quartos as ocorrências de adesão em telas de poli(propileno), e quando em conjunto com o Seprafilm<sup>®</sup>, a incidência se tornou praticamente nula. Essa é uma alternativa de recobrimento das telas de poli(propileno), porém apresenta alto custo e, em função deste fator, difícil penetração no mercado brasileiro.

Goissis *et al.* (2001) realizaram um trabalho cujos objetivos foram desenvolver, caracterizar e avaliar o comportamento biológico de malhas de poli(propileno) recobertas com colágeno polianiônico ou recoberto com filme denso de poli(cloreto de vinila) como biomateriais para a reconstrução da parede abdominal. A malha de poli(propileno) com recobrimento de poli(cloreto de vinila) mostrou-se mais biocompatível e menos susceptível à adesão das alças intestinais, o que sugere seu potencial para uso na reconstrução da parede abdominal. Os resultados mostraram também que o poli(cloreto de vinila) isoladamente e, principalmente, pela ausência de adesão após 9 semanas, pode constituir-se em um biomaterial para uso temporário. No entanto, materiais de aplicação biológica constituídos de poli(cloreto de vinila) geralmente apresentam plastificantes em sua composição, como é o caso de di(2-etilhexil)ftalato (DEHP), presente em tubos de PVC e extraído do material por soluções fisiológicas como o sangue, por exemplo e em água. Esse plastificante resulta em um efeito depressor da contratilidade miocárdica em ratos e em preparações atriais humanas *in vitro*. A utilização de materiais de PVC isentos de plastificantes, por outro lado, aumenta o custo de confecção de biomateriais e limita suas aplicações pela redução das propriedades mecânicas.

Existem, além das telas supracitadas, outros dispositivos protésicos produzidos por diferentes fabricantes, sendo alguns específicos para determinados tipos de hérnia. As telas PHS (Prolene<sup>®</sup> Hernia System) produzidas pela Ethicon-Johnson & Johnson<sup>®</sup>, são compostas por monofilamentos de poli(propileno) que proporcionam maior resistência e menor reação tissular, sendo indicadas para reparação de hérnias, de defeitos da parede torácica e como reforço de parede. Constitui-se de uma tela porosa, inerte e biocompatível, resistente à infecção, de baixo custo, com amplo histórico de utilização. Além de apresentar eficácia comprovada, requer mínima sutura para sua fixação (2 a 4

pontos), propiciando rápido retorno do paciente às atividades. O aspecto típico da tela PHS é apresentado na Figura 2.2. O formato tridimensional com a presença de uma região circular central facilita a manipulação e a aplicação do material quando do procedimento cirúrgico.

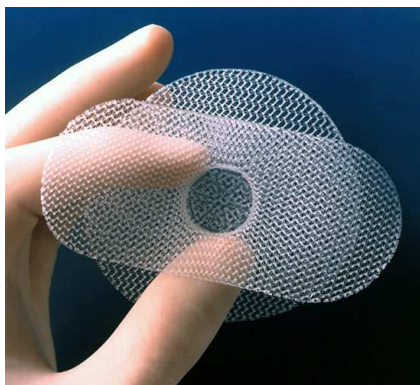


Figura 2.2- Aspecto da tela Prolene<sup>®</sup> Hernia System (Cardinal Health, 2011).

No entanto, esta tela é incorporada ao tecido por fibrose, reduz a mobilidade da parede abdominal, causa maior desconforto no período pós-operatório, podendo o paciente perceber especialmente a borda da tela, em função da alta densidade característica da prótese.

Já a tela Ultrapro<sup>®</sup> Hernia System (Ethicon-Johnson & Johnson<sup>®</sup>) é constituída de 50% de filamentos de Monocryl (poliglicaprona, um copolímero constituído de glicolídeo e  $\epsilon$ -caprolactona), absorvidos em 83 dias, e de 50% de Prolene do tipo macio. Assim, é constituída de um sistema duplo parcialmente absorvível, possui baixa densidade e macroporos. Comparada com as telas de poli(propileno) comumente utilizadas em cirurgias de hérnia, as telas Ultrapro<sup>®</sup> apresentam massa estranha implantada 65% menor, sendo indicada para reparos inguinais e incisionais. Forma um tecido cicatricial flexível e forte, que promove a mobilidade natural da parede abdominal, além de permitir clara visualização da anatomia e melhor manipulação durante os procedimentos devido à presença de linhas azuis. Na Figura 2.3 é apresentado o aspecto típico da tela Ultrapro<sup>®</sup> Hernia System.

As telas Vypro (Ethicon-Johnson & Johnson<sup>®</sup>) apresentam porosidade de 5 mm, resultando em 70% menos quantidade de massa de corpo estranho implantada no

paciente (comparando com a tela de Prolene®). Seu componente principal, a poliglactina(vicryl), é absorvida em 63 dias. São indicadas para reparação dos defeitos da parede torácica, proteção das vísceras abdominais, prevenção de hérnia, reconstrução de superfície pelviana, tratamento de queimaduras e cirurgia plástica de mama (técnica peri-areolar). A tela Vypro® é apresentada na Figura 2.4, e também apresenta uma região central oca para facilitar a manipulação.



Figura 2.3- Aspecto da Tela Ultrapro® Hernia System (JE Hospitalar, 2011).

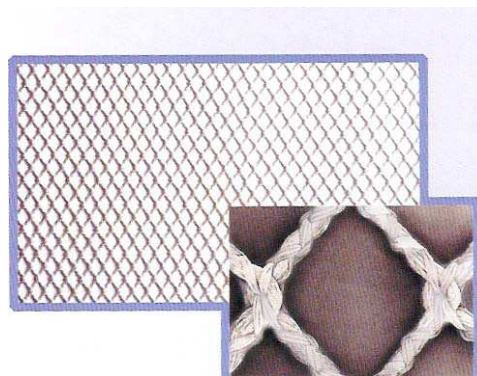


Figura 2.4- Aspecto da Tela Vypro® Hernia System (JE Hospitalar, 2011).

As telas de poli(propileno) recobertas com polímeros biocompatíveis disponíveis atualmente apresentam elevado custo e difícil penetração no mercado brasileiro. Uma alternativa para solucionar o problema econômico verificado se baseia na utilização de telas de poli(propileno) produzidas no país, como, por exemplo, a tela Intracorp® (Venkuri®), confeccionada em poli(propileno) monofilamentado, não absorvível e sintético, que poderiam ser recobertas com polímeros que não impactem significativamente o seu

valor final de venda. Desta forma, tais dispositivos poderiam ser mais acessíveis a órgãos públicos com restrição de recursos, como o Sistema Único de Saúde (SUS) brasileiro.

Na Tabela 2.1 são apresentados os valores verificados no mercado brasileiro para os tipos de telas mencionados. Considerou-se o dólar cotado em cerca de R\$1,80, além de carga tributária e frete aumentam o valor do produto em 50% para as telas importadas da Ethicon-Johnson & Johnson®.

Tabela 2.1- Valores em reais para as diferentes telas disponíveis no mercado (Jul. 2010)

<b>Tela</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Dimensões</b>	<b>R\$/unid.</b>	<b>R\$/cm<sup>2</sup></b>
ULTRAPRO Partially Absorbable Mesh	Ethicon-Johnson	12" x 12" (30cm x 30cm)	540,00	0,60
		6" x 6" (15cm x 15cm)	229,50	1,02
		3" x 6" (7,6cm x 15cm)	310,50	2,72
		2.4" x 4.3" (6cm x 11cm)	292,50	4,43
PROLENE Mesh	Ethicon-Johnson	12" x 12" (30cm x 30cm)	499,50	0,56
		6" x 6" (15cm x 15cm)	225,00	1,00
		3" x 6" (8cm x 15cm)	231,75	1,93
		1" x 4" (2,54cm x 10cm)	189,00	7,44
PROLENE Mesh Pre-Shaped Keyhole (Large)	Ethicon-Johnson	2.4" x 5.4" (6cm x 13,7cm)	108,00	1,31
PROLENE Mesh Pre-Shaped Keyhole (Small)	Ethicon-Johnson	1.8" x 4.0" (4.6cm x 10cm)	81,00	1,76
Vypro Mesh	Ethicon-Johnson	8" x 8" (20cm x 20cm)	742,5	1,86
Intracorp	Venkuri	26cm x 36cm	179,55	0,19
		20cm x 25cm	145,80	0,29
		15cm x 15cm	101,09	0,45
		7,5cm x 7,5cm	73,70	1,31

Através da Tabela 2.1, é possível observar que para um mesmo tipo de tela, o fator de custo por unidade de área aumenta conforme se diminui as dimensões da tela

comercializada. As telas Ultrapro<sup>®</sup> de 6 cm x 11 cm e PROLENE<sup>®</sup> de 2,54 cm x 10 cm apresentam as maiores razões de custo por unidade de área, enquanto a tela nacional Intracorp<sup>®</sup> de 26 cm x 36 cm apresenta o menor valor, motivo pelo qual esta última foi escolhida para o desenvolvimento deste trabalho.

Conforme já mencionado, embora as próteses se constituam em uma boa opção para corrigir hérnias da parede abdominal, principalmente pelo fato de poderem ser utilizadas quando não se consegue reconstituir o defeito de maneira anatômica, elas podem determinar uma série de complicações, tais como infecção, rejeição, deformação, acúmulos serosos ou sangüíneos, aderências e fistulização em vísceras ocas, alterações da espermatogênese, carcinogênese e dores crônicas na região inguinal (inguinodinia), o que faz com que o seu uso deva ser criterioso. O desenvolvimento de um biomaterial que reduza as complicações e, por conseguinte, as preocupações decorrentes do procedimento pós-cirúrgico se torna de extrema importância nesse contexto.

Paulo *et al.* (2009) mostraram que o uso de membranas de quitosana justapostas à superfície de telas de poli(propileno) em contato com vísceras de ratas implantadas com tais dispositivos foi eficiente na prevenção da formação de adesões abdominais, o que deu subsídios para a análise do uso deste polissacarídeo no recobrimento de telas de poli(propileno).

### **2.3. Uso de quitosana na produção de biomateriais**

O uso de polímeros naturais para aplicações diversificadas tem sido de grande importância para o avanço da ciência de forma geral. Estes apresentam várias vantagens, como ser de fácil obtenção, ser biocompatível e biodegradável. Os polissacarídeos, uma classe de macromoléculas naturais, são geralmente derivados de produtos agrícolas, de crustáceos, de algas e mesmo de processos fermentativos. Celulose e goma xantana são exemplos de biopolímeros já há bastante tempo conhecidos, enquanto que a quitina e a quitosana são exemplos de biopolímeros cujas aplicações vêm sendo estudadas mais recentemente. Segundo Azevedo *et al.* (2007), em termos de disponibilidade, a da quitina se aproxima à da celulose; ambas são disponíveis numa extensão de mais de 10

gigatoneladas anualmente. O potencial de aplicação da quitosana é multidimensional, passando desde aplicações na área alimentícia como em nutrição, biotecnologia, ciência dos materiais, veiculação de produtos farmacêuticos, agricultura e proteção ambiental e, recentemente, na terapia genética também.

A quitosana é um polissacarídeo de origem natural, renovável e biodegradável, de apreciável importância econômica e ambiental, uma vez que sua matéria-prima é proveniente de resíduos abundantes e rejeitados pela indústria pesqueira. Este polissacarídeo é derivado da quitina, sendo formado por uma sequência linear de açúcares monoméricos do tipo  $\beta$ -(1-4)-2-acetamido-2-deoxi-D-glicose (N-acetilglucosamina), sendo frequentemente obtido em escala industrial a partir da carapaça de crustáceos. Quando a maioria dos grupamentos acetil da quitina é removida, normalmente por tratamento com bases fortes, obtém-se a quitosana (Mao *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2002; Canella e Garcia, 2001; Wang *et al.*, 2001; Khan *et al.*, 2000; Suzuki e Mizushima, 1997; Muzzarelli *et al.*, 1988).

Na Figura 2.5 são mostradas as estruturas químicas da quitina e da quitosana. Destaca-se que os resíduos de glucosamina e N-acetilglucosamina da quitosana são encontrados também em tecidos de mamíferos, o que reforça ainda mais seu caráter de alta biocompatibilidade (Dallan, 2005). A quitosana possui a capacidade de ativar macrófagos, estimular a migração e proliferação celular e orientar a reorganização da histo-arquitetura celular (Paul e Sharma, 2004; Mi *et al.*, 2003; Suzuki e Mizushima, 1997; Muzzarelli *et al.*, 1988). Em adição, a quitosana possui atividades hemostática, fungicida, antibacteriana e antitumoral.

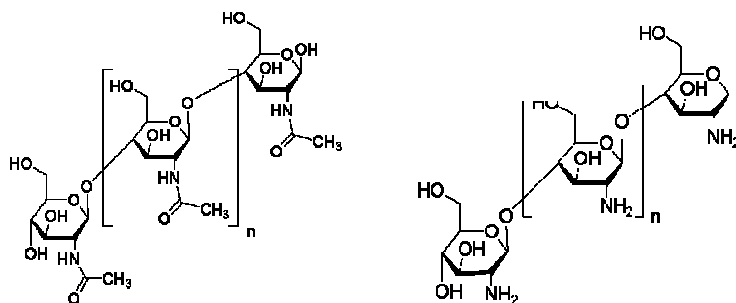


Figura 2.5- Estruturas químicas dos polissacarídeos: (a) quitina e (b) quitosana.

Na Tabela 2.2 são apresentadas algumas das aplicações da quitina e da quitosana em variadas áreas.

Tabela 2.2 - Principais aplicações da quitina e quitosana (adaptada de Dallan, 2005).

<b>Área Industrial</b>	<b>Áreas de Saúde e Nutrição</b>
Purificação de água residual de indústrias	Agentes absorvedores de gorduras
Estabilizantes de aromas	Regeneração de pele
Matriz de troca iônica	Antiácido
Aditivos de cosméticos e xampus	Auxiliar no controle na pressão arterial
Absorventes na remoção de metais pesados	Regenerador de estrutura óssea
Proteção bactericida de sementes	Redução do nível de ácido úrico
Estabilizantes de frutas e verduras perecíveis	Auxiliar na perda de peso
Agentes para imobilização de micro-organismos	Bactericida/antiviral
Estabilizantes de gorduras em alimentos	Inibidor da formação de placa dentária
	Auxiliar na absorção de cálcio
	Membranas artificiais
	Redução de colesterol LDL, auxiliar do colesterol HDL

Em decorrência das suas propriedades, a quitosana pode ser utilizada em várias aplicações médicas, tais como em medicamentos oculares tópicos (Felt *et al.*, 1999), lentes de contato (Niekraszewicz, 2005), injeções intra-articulares (Song *et al.*, 2001), sistemas de liberação controlada e curativos (Niekraszewicz, 2005; Berger *et al.*, 2004a; Berger *et al.*, 2004b). A quitosana pode, ainda, ser utilizada no tratamento da obesidade, na preparação de filmes para embalagens de alimentos, de fios cirúrgicos e de materiais para regeneração óssea (Mi *et al.*, 2001; Suzuki e Mizushima, 1997), dentre outras aplicações.



Segundo Mi *et al.* (2001), membranas assimétricas de quitosana apresentam excelente permeabilidade ao oxigênio, podem controlar a perda de água por evaporação e promover a drenagem de exsudato das lesões. Em experimentos com modelos animais, a quitosana mostrou ter influência em todos os estágios de cicatrização do tecido (Alemdaroğlu *et al.*, 2006; Niekraszewicz, 2005; Howling *et al.*, 2001), processo este considerado complexo, envolvendo vários mecanismos como coagulação, inflamação, síntese e deposição de matriz celular, angiogênese, fibroplasia, epitelização, contração e remodelagem. Ainda sobre esse assunto, segundo Paul e Sharma (2004), lesões tratadas com quitina e quitosana em vários animais apresentaram substancial diminuição no tempo de tratamento, com mínima formação de cicatrizes.

Materiais à base de quitosana podem apresentar diferentes comportamentos *in vivo* dependendo da sua forma (por exemplo, gel ou filme) e de seu pH, uma vez que variações de pH causam mudanças no estado de ionização da quitosana. Normalmente, géis à base de quitosana são produzidos usando ácidos orgânicos diluídos, como ácido acético, que protonam as moléculas do polissacarídeo, aumentando sua solubilidade. Membranas de quitosana, por outro lado, após um processo de moldagem por evaporação de solvente e lavagem com solução de NaOH e água não apresentam ácido acético livre residual, consistindo fundamentalmente de um material sólido neutro. Em condições de pH abaixo de 6,3 (pKa da quitosana), normalmente observadas em géis de quitosana/ácido acético diluído, as moléculas de quitosana possuem grande número de carga positivas, e nesta situação, podem potencialmente induzir a coágulos e formação de adesões (Paulo *et al.*, 2009). Esse comportamento não foi verificado por Zhang *et al.* (2006), que observou que géis de quitosana preveniram de maneira eficaz adesões derivadas de ferimento quando da aplicação *in vivo*. Zhang e seu grupo de pesquisa constataram que quando o pH aumenta para cerca de 7,4 (o pH fisiológico em mamíferos), o número de cargas positivas na membrana de quitosana diminui significativamente (grau de protonação de aproximadamente 0,074), reduzindo as chances de adesão e de desenvolvimento de trombos.

No campo de aplicações biomédicas, a quitosana é amplamente estudada, e suas interações específicas com componentes da matriz extracelular e fatores de crescimento têm levado ao aumento de sua utilização na área de engenharia de tecidos, como no reparo da pele, ossos e cartilagens. Testes clínicos mostram que biomateriais à

base de quitosana não resultam em reações alérgicas no corpo humano após implantação, injeção, aplicação tópica ou ingestão (Khor e Lim, 2003).

Conforme já mencionado, a adequada solubilidade da quitosana em alguns ácidos orgânicos permite a obtenção de géis, filmes e membranas, na forma livre ou combinada com outras substâncias, sendo também possível seu emprego como agente de recobrimento de materiais cuja biocompatibilidade se deseja aumentar, como é o caso das telas de poli(propileno) enfocadas no presente trabalho.

Dallan (2005) constatou que membranas densas de quitosana apresentam baixos valores de adesão de células Vero em suas superfícies, comportamento este que se repete quando da implantação do mesmo tipo de material na cavidade peritoneal de ratos, de acordo com Paulo *et al.* (2009). Conforme já mencionado, estes autores constataram que filmes de quitosana justapostos a telas de poli(propileno) podem diminuir inflamações associadas a lesões peritonias em ratas Wistar, além de não causarem aderências. No entanto, observou-se uma limitação de ordem prática no momento da fixação do conjunto nos animais: a inserção do filme de quitosana, que era muito espesso e pouco resistente mecanicamente, tinha que ser feita de forma independente da tela, o que contribuiu para o aumento da complexidade, do tempo e do risco da cirurgia. O estudo e a utilização de conjuntos tela/recobrimento em que ambos possam ser inseridos de forma acoplada em um único procedimento cirúrgico se apresentam como alternativas viáveis para reparar hérnias abdominais.

Desta forma, a estratégia de recobrimento por imersão de telas de poli(propileno) em soluções compostas por diferentes polímeros, como quitosana (obtida a partir de fontes naturais) e PEG (de origem sintética), com posterior secagem do conjunto é de interesse. Nestes casos, não deve haver descolamento entre a camada biopolimérica da tela de poli(propileno) e o biomaterial deve apresentar estabilidade quando da aplicação *in vivo*. No entanto, a espessura pode ser um fator prejudicial quando da implantação do biomaterial. Assim, novos métodos de recobrimento que envolvam a deposição de materiais biocompatíveis e que eliminem as limitações já encontradas devem ser considerados, como, por exemplo, a técnica do *electrospinning*, que permite o recobrimento de materiais com fibras.

#### 2.4. Emprego da técnica de *electrospinning* em diferentes campos de aplicação

*Electrospinning* é um método de produção de fibras usando forças eletrostáticas que resulta na criação de fios com diâmetros tipicamente entre 10 e 150 nm. Esta técnica possibilita produzir fibras bem menores que as obtidas por meios convencionais de *spinning*. Esta tecnologia tem sido desenvolvida desde o princípio da década de 30. Em 1934, Formhals patenteou sua primeira invenção relacionada ao processo e ao aparato para produzir filamentos artificiais usando cargas elétricas (Formhals, 1934). Embora este método já fosse foco de estudos experimentais durante um longo período, não ganhou importância até a invenção de Formhals devido a algumas dificuldades técnicas em métodos de *spinning* anteriormente empregados. O processo de deposição de Formhals consistiu de um coletor móvel das fibras em sua condição estirada, semelhante a um tambor. Tal processo era capaz de produzir fibras alinhadas paralelamente no aparato receptor, de forma que estas podiam ser desenroladas continuamente. Em sua primeira patente, Formhals reportou o *spinning* de fibras de acetato de celulose usando acetona como solvente.

O primeiro método de *spinning* adotado por Formhals apresentou algumas desvantagens técnicas. Verificou-se dificuldade em secar completamente as fibras após a deposição, devido ao curto caminho para o *spinning* e posterior deposição das fibras, que resultou em uma estrutura de rede pouco agregada. Em uma patente subsequente (Formhals, 1939), o autor aprimorou a metodologia experimental anteriormente utilizada a fim de minimizar a desvantagem em relação à secagem anteriormente citada, alterando a distância entre o bico de alimentação e o dispositivo coletor para aumentar o tempo de exposição das fibras ao ambiente. Posteriormente, em 1940, Formhals estudou um novo método para produzir redes de fibras de compósitos a partir de múltiplos substratos de polímeros e fibras por deposição eletrostática do material, porém, dessa vez, em um substrato de base móvel, patenteando-o posteriormente. Duas décadas depois, foram iniciados estudos sistemáticos e fundamentais para a compreensão do processo de formação dos jatos poliméricos responsáveis pelo *electrospinning* (Taylor, 1969). Em 1969, foi estudado com maior detalhamento o formato cônico da gota polimérica produzida na ponta da agulha quando um campo elétrico é aplicado, e a ejeção dos jatos

a partir dos vértices do cone. Em 1988, Hayati *et al.* estudaram os efeitos do campo elétrico, condições experimentais, e os fatores que afetam a estabilidade e a atomização da fibra. Os autores observaram que a aplicação de tensões crescentes em fluidos produzia correntes altamente instáveis que chicoteavam em diferentes direções. Jatos relativamente estáveis foram produzidos com líquidos semicondutores ou isolantes, como o óleo parafínico.

Conforme anteriormente relatado, pesquisas têm sido conduzidas para esse processo durante décadas desde a sua proposição, porém com menor intensidade até 1990, quando variados polímeros orgânicos provaram ser capazes de ser submetidos com sucesso ao processo, resultando em fibras de diâmetros da ordem de nanômetros. Isso fez com que o interesse nessa área fosse revitalizado. Desde esta época o *electrospinning* tem sido foco de pesquisa para aplicações como reforço de compósitos, obtenção de membranas multifuncionais, produção de matrizes tridimensionais para engenharia de tecidos, curativos, liberação de fármacos e enxertos vasculares (Queen, 2006). Em termos de eficiência de processo, o *electrospinning* pode ser utilizado para recobrir materiais com potencial aplicação biológica em menor tempo e com menores massas associadas (além da maior área superficial obtida com o recobrimento em diâmetros micro e nano), apresentando-se como uma alternativa viável em termos de custo de material e operacional. Além disso, é possível se obter materiais praticamente isentos de solventes orgânicos, devido à evaporação que ocorre durante o trajeto agulha-coletor.

A Tabela 2.3 apresenta alguns trabalhos interessantes envolvendo polímeros sintéticos e naturais satisfatoriamente submetidos ao processo de eletrodeposição. As concentrações destacadas correspondem a condições na quais verificou-se a formação preferencial de fibras ao invés de gotas. Variados solventes como o ácido fórmico, etanol, clorofórmio, 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol podem ser empregados para solubilizar polímeros de diferentes características e massas molares em concentrações de até 30% (m/m) para a obtenção de fibras de características adequadas.

Em termos de flexibilidade de processo, o *electrospinning* é capaz de produzir nanofibras contínuas a partir de uma extensa variedade de materiais. Dentre esses materiais encontram-se polímeros, compósitos, materiais semicondutores e materiais

cerâmicos. Estudos recentes no campo das fibras eletrodepositadas têm se concentrado na exploração de vários materiais que se submetem satisfatoriamente a tal processo, na caracterização das fibras e em encontrar novas aplicações.

Embora as áreas de estudo e de aplicação das fibras obtidas possam ser distintas entre si, aplicações na área biomédica apresentam crescimento majoritário no campo de pesquisa das nanofibras, conforme é mostrado na Figura 2.6. Este crescimento deve-se em parte ao maior entendimento do corpo humano, da estrutura celular e da reação do organismo a materiais implantados.

Tabela 2.3- Trabalhos utilizando eletrodeposição de diferentes soluções poliméricas.

<b>Polímero</b>	<b>Solvente</b>	<b>Concentração polimérica</b>	<b>Autores</b>
Nylon 4,6	Ácido Fórmico	10% (m/m)	Bergshoef and Vancso (1999)
Nylon 6 MM 43,300	1,1,1,3,3,3 hexafluoro-2-propanol	15% (m/m)	Stephens <i>et al.</i> (2004)
Poliácido acrílico, MM 250000	Etanol	6% (m/m)	Ding <i>et al.</i> (2004)
Poli( $\epsilon$ -caprolactona) MM 80000	Clorofórmio	30% (m/m)	Yoshimoto <i>et al.</i> (2003)
Poli(L-ácido láctico) MM 14000-20000	1,1,1,3,3,3 hexafluoro-2-propanol	8% (m/m)	You <i>et al.</i> (2005)
Colágeno tipo I	1,1,1,3,3,3 hexafluoro-2-propanol	0,083 g/mL	Matthews <i>et al.</i> (2002)

O processo de *electrospinning* pode ser modificado para se adequar às propriedades e à morfologia desejadas para as fibras. Além disso, na produção de fibras a partir de certos materiais, tratamentos posteriores podem ser necessários, como no caso de fibras cerâmicas, motivo pelo qual é importante se conhecer os diferentes grupos e características dos materiais a fim de se otimizar a formação de fibras. Para obtenção de nanofibras, é vital que estas possam crescer ou serem posicionadas ao longo do eletrodo específico. Em aplicações como membranas de filtração, telas não-tecidas são mais desejáveis.

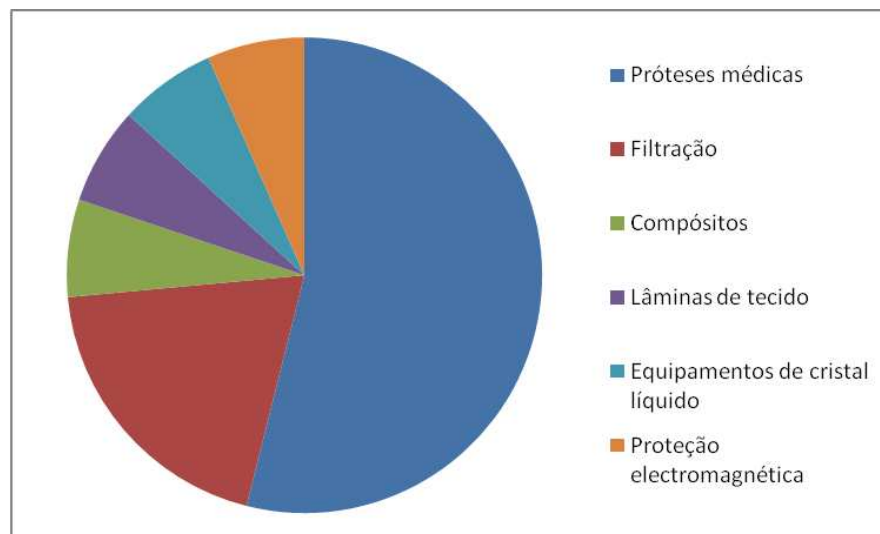


Figura 2.6- Estimativa de campos de pesquisa-alvo em *electrospinning* em função número de patentes de cada aplicação para nanofibras eletrodepositadas (adaptado de Queen, 2006).

A habilidade de formar fios feitos de nanofibras pode abrir caminhos para tecidos de alto desempenho ou *scaffolds*. Devido ao tamanho das nanofibras, é difícil formar diferentes arranjos através de manipulação física. Todavia, é possível a fabricação de vários emaranhados de nanofibras *in situ*. Isto dá ao *electrospinning* uma fronteira maior quando comparado às outras técnicas de produção de nanofibras em larga escala (Teo e Ramakishna, 2006).

#### 2.4.1. Aparato experimental para o processo de *electrospinning*

O aparato experimental para a deposição por *electrospinning* é constituído de um bico injetor ou de uma agulha, de uma fonte de alta tensão e um coletor aterrado, conforme mostrado na Figura 2.7. A seringa é preenchida com uma solução polimérica que é alimentada através da agulha em direção ao campo elétrico (gerado pela fonte de alta tensão), geralmente pelo uso de uma bomba do tipo seringa ou por gravidade. A bomba seringa permite que a solução seja introduzida ao sistema de deposição em uma

taxa precisamente controlada, com auxílio, por exemplo, de interfaceamento com o computador. A solução polimérica flui pela seringa através da agulha metálica, que é conectada a uma fonte de alta tensão tipicamente capaz de produzir tensões entre 1 e 30 kV. O campo elétrico é formado através do aterramento do coletor juntamente com a agulha carregada. O coletor, geralmente uma placa, completa o sistema e permite que um significativo campo elétrico seja criado entre a agulha e a placa, além de constituir uma superfície de deposição para a rede de nanofibras sintetizadas durante o processo (Queen, 2006).

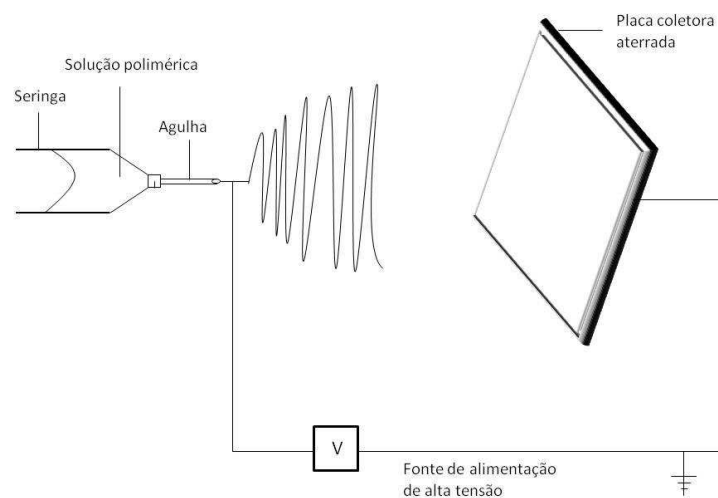


Figura 2.7 - Diagrama ilustrativo da formação de fibras por *electrospinning* e deposição na superfície do material a ser recoberto (adaptado de Queen, 2006).

## 2.4.2. Aspectos técnicos do electrospinning

### 2.4.2.1. Mecanismo

As fibras são produzidas durante o processo de *electrospinning* devido às forças eletrostáticas que agem sobre a solução polimérica conforme esta percorre o campo elétrico. O processo se inicia quando um campo elétrico é gerado pela fonte de alta

tensão, entre o capilar condutor (geralmente uma agulha metálica) que contém a solução polimérica e uma placa condutora metálica aterrada. A solução polimérica permanece em formato de gota devido à tensão superficial e pela carga induzida na superfície da gota decorrente da transferência de cargas elétricas da fonte de alta tensão à agulha e desta para a solução. Forças atrativas atuam, puxando a gota em direção ao campo elétrico. Com o aumento gradual na força, a carga na gota também aumenta e faz com que a gota esférica se deforme e apresente um formato cônico. Tal fenômeno é conhecido como cone de Taylor, esquematicamente ilustrado na Figura 2.8.

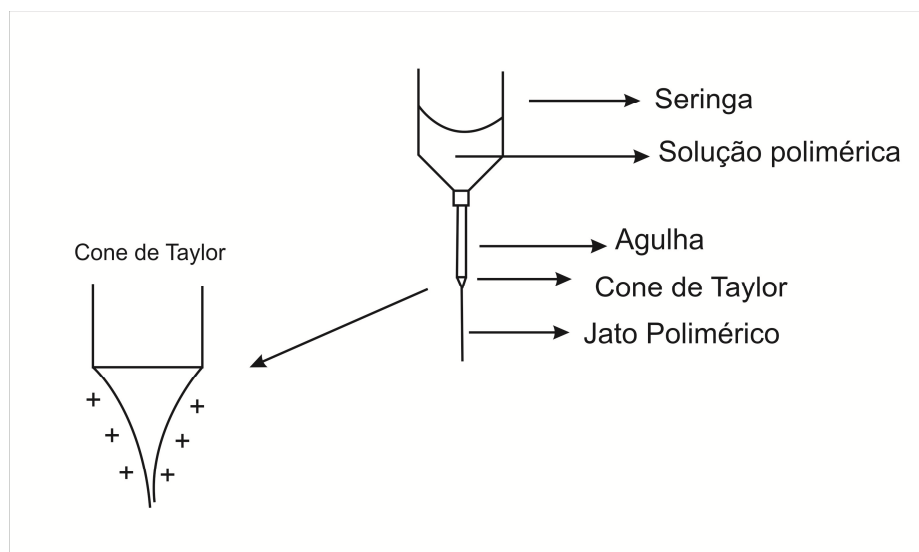


Figura 2.8- Formação e origem do cone de Taylor.

Quando a ação do campo elétrico faz com que a força de repulsão ultrapasse a tensão superficial, a solução carregada é empurrada para o campo elétrico em direção à placa coletora. Conforme a solução, agora na forma de um filamento de fluido, é empurrada através do campo elétrico, cargas internas e externas à solução fazem com que o jato de líquido seja atraído fortemente à medida que este é acelerado em direção ao coletor aterrado. Este fenômeno causa simultaneamente a evaporação do solvente em solução, o estiramento das cadeias poliméricas e o deslizamento destas umas sobre as outras. O movimento de chicoteamento permite às fibras obtidas no coletor aterrado ter diâmetros pequenos o suficiente para serem classificadas como nanofibras.



#### 2.4.2.2. *Influência das condições de condução do processo*

Enquanto a montagem e o processo propriamente dito de *electrospinning* podem ser considerados relativamente simples no tocante às variáveis envolvidas na produção de fibras com diâmetro em escala nanométrica, redes formadas a partir de nanofibras com diferentes graus de uniformidade são comumente verificadas. Parâmetros tanto de solução quanto de equipamento e de operação devem ser considerados.

Devido às características morfológicas que as nanofibras podem possuir em função dos parâmetros de solução e de processo/equipamento, como grandes áreas superficiais, poros de pequeno tamanho (resultado da evaporação do solvente, que afeta propriedades mecânicas como resistência à tração e módulo de Young) e capacidade de serem produzidas em formas tridimensionais, o *electrospinning* tem despertado cada vez mais o interesse de pesquisadores. Tal interesse decorre das características anteriormente descritas que permitem com que se controle a produção das fibras para que se encaixem adequadamente ao fim a que destinam (Queen, 2006). Uma rede típica de nanofibras é mostrada na Figura 2.9.

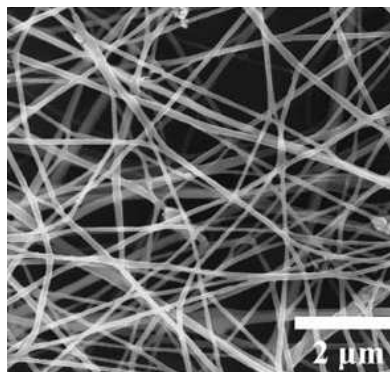


Figura 2.9- Microscopia eletrônica de varredura de nanofibras de Quitosana/PEG na proporção de 60/40 (m/m) (Bhattarai *et al.*, 2005).

Dentre os parâmetros de equipamento ou de processo se incluem a intensidade do campo elétrico, a taxa de escoamento, a distância do capilar ao coletor, a forma e o movimento do coletor, o diâmetro da agulha, a temperatura ambiente e a umidade.

a) *Efeito da tensão no recobrimento*

Um dos elementos cruciais no *electrospinning* é a aplicação de alta voltagem à solução. Esta induzirá as cargas necessárias à solução e, juntamente com o campo elétrico externo, iniciará o processo quando a força eletrostática se tornar maior que a tensão superficial da solução. Geralmente, tensões tanto positivas quanto negativas maiores que 6 kV são suficientes para fazer com que a gotícula de solução na saída da agulha se distorça na forma do cone de Taylor. Dependendo da vazão de alimentação da solução, uma maior voltagem pode ser requerida para que o cone de Taylor seja estável. A força coulômbica repulsiva no jato faz com que a solução viscoelástica seja estirada. Se a tensão aplicada se torna bastante alta, o jato é acelerado mais rapidamente e uma quantidade maior de solução é arrastada da ponta da agulha, devido à presença excessiva de cargas. Tal fenômeno resulta em um cone de Taylor menor e menos estável (Zhong *et al.*, 2002).

Apesar da fonte de alta tensão geralmente ser de corrente contínua, também é possível utilizar corrente alternada no processo. Neste caso, o estabelecimento do jato, seu estiramento e a instabilidade que gera seu encurvamento são causados pelas cargas presentes na solução. A solução fica carregada rapidamente e o estabelecimento do jato ocorre antes da mudança da tensão na fonte de corrente alternada. Durante o caminho dos jatos em direção ao coletor, estes encontram-se carregados positiva e negativamente. Uma vez que a instabilidade é resultado das forças coulômbicas repulsivas no jato, os segmentos carregados positiva ou negativamente reduzem a força repulsiva, diminuindo, conseqüentemente, a instabilidade do jato. Havendo menos instabilidade e menos estiramento do jato, as fibras resultantes apresentam maiores diâmetros se comparadas com as formadas a partir de uma fonte de corrente contínua em uma mesma tensão aplicada. Outra desvantagem de uma fonte de corrente alternada é que esta apresenta menor tendência para acúmulo de cargas de mesma polaridade nas fibras após a deposição (Kessick *et al.*, 2004).

Segundo Deitzel *et al.* (2001), vários tipos de instabilidade operacional podem ocorrer durante o processo de formação da fibra devido ao efeito combinado do campo elétrico e das propriedades do material polimérico. A instabilidade pode ser associada, por

exemplo, ao formato da superfície iniciadora do jato, que pode produzir mudanças efetivas na morfologia da fibra. No processo de *electrospinning*, o transporte de cargas devido à tensão aplicada se dá principalmente no fluxo do jato polimérico em direção ao coletor, e os autores observaram que existe relação direta entre o aumento da corrente e o aumento do fluxo mássico, quando outros parâmetros de solução permanecem constantes, como condutividade e constante dielétrica. Um aumento na tensão aplicada causa uma mudança no formato do ponto inicial do jato, e por conseguinte, na estrutura e morfologia das fibras. Além disso, quando o volume de solução atraída ao coletor é maior que o fornecido pela bomba, o cone de Taylor pode recuar na saída da agulha.

*b) Efeito da distância do capilar ao coletor, do diâmetro e da geometria da agulha*

A distância do capilar ao coletor afeta a estrutura e a morfologia das fibras, devido à sua associação ao tempo de deposição, à taxa de evaporação e à instabilidade da torção. O fluxo da solução através da seringa é um importante parâmetro de processo, uma vez que este afeta a velocidade do jato e a taxa de transferência do material a ser depositado (Subbiah *et al.*, 2005).

A geometria do dispositivo de saída da solução, que pode consistir, por exemplo, de uma agulha cirúrgica, pode também influenciar o processo de eletrodeposição. Agulhas cirúrgicas são geralmente confeccionadas em aço inoxidável a fim de resistir à corrosão que pode ocorrer quando do contato com o fluido presente na seringa. Comumente deseja-se que as agulhas cirúrgicas convencionais tenham superfícies lisas, isentas de rebarbas, marcas de máquinas utilizadas em sua produção e outras irregularidades de superfície. Tais protusões ou irregularidades de superfície podem ser provenientes do processo de manufatura das agulhas, podendo ser removidas da agulha de modo que se tenha uma superfície homogênea e lisa. Tal propriedades confere à agulha mínimo arraste de tecido e, conseqüentemente, trauma mínimo no momento da injeção. Para eliminar irregularidades de agulhas cirúrgicas processos eletroquímicos como o eletropolimento podem ser empregados (Brown *et al.*, 1999).

No processo convencional de eletropolimento, as agulhas cirúrgicas são imersas em banhos constituídos de soluções aquosas de ácidos (fosfórico, sulfúrico, nítrico). O banho é tipicamente disposto em um recipiente não-condutor capaz de conter tanto a

solução quanto a peça metálica a ser polida. Dois eletrodos de polaridades opostas são imersos no banho e a corrente é conduzida do eletrodo anódico, através das partes metálicas, ao eletrodo catódico. A passagem da corrente através do banho resulta na remoção do metal das superfícies externas das partes metálicas, especialmente das regiões pontiagudas ou irregulares.

O diâmetro interno da agulha ou do orifício da pipeta utilizada também gera efeitos no processo de *electrospinning*. Mo *et al.* (2004) estudaram a deposição de copolímeros de poli-ácido láctico e policaprolactona [P(LLA-CL)] utilizando diferentes agulhas (com diâmetros internos de 0,4 a 1,2 mm) e relataram que as agulhas cujos diâmetros eram menores apresentaram menores incidências de entupimento, além de terem diminuído a quantidade de gotas nas fibras eletrodepositadas. A redução do entupimento pode ser explicada por uma menor exposição da solução ao ambiente durante o processo. A diminuição do diâmetro interno do orifício também causa diminuição no diâmetro das fibras formadas. Quando o tamanho da gotícula na saída do orifício é diminuído, como acontece quando se verifica um diâmetro menor do orifício, a tensão superficial da gotícula aumenta. Para uma mesma tensão fornecida, uma maior força coulômbica é necessária para iniciar o jato. Como resultado, a aceleração deste é reduzida e permite maior tempo para a solução ser estirada e alongada antes de ser coletada. No entanto, é necessário se considerar o limite do processamento, pois se o diâmetro da saída é muito pequeno, pode não ser possível realizar a extrusão da solução através do orifício, devido a problemas de entupimento (Zhao *et al.*, 2004).

### c) *Influência das condições ambientais*

Condições ambientais ao redor da agulha, como umidade relativa (UR), condições de vácuo, tipo de atmosfera nas imediações, dentre outras, influenciam também a estrutura e morfologia das fibras eletrodepositadas.

Quando se desenvolve o processo a altas umidades, é provável que a água condense na superfície da fibra sob condições atmosféricas, influenciando a morfologia das fibras formadas, especialmente quando o polímero encontra-se solubilizado em solventes voláteis (Megelski *et al.*, 2002; Bognitzki *et al.*, 2001).

Experimentos utilizando polisulfona dissolvida em tetrahidrofurano (THF) demonstram que em condições de umidade menores que 50%, as fibras apresentam superfícies lisas (Casper *et al.*, 2004). No entanto, o aumento da umidade durante o processo resulta na formação de poros na superfície das fibras. O tamanho dos poros circulares aumenta com a elevação da umidade até que estes coalescem para formar estruturas com aspecto não-uniforme, conforme mostra a Figura 2.10. A profundidade do poro também aumenta com a elevação da umidade, segundo análises de microscopia de força atômica. Entretanto, acima de certos valores (50-59%) de umidade, a profundidade dos poros, seu diâmetro e sua incidência começam a apresentar comportamento saturante.

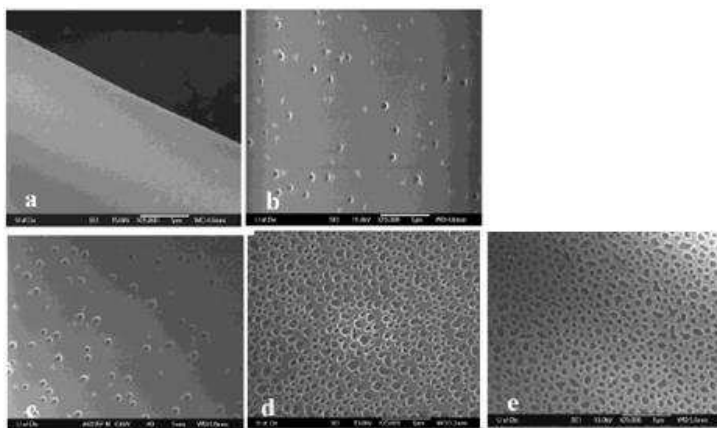


Figura 2.10- Microscopia de força atômica de fibras de PS de 190000 g/mol dissolvida em THF eletrodepositadas variando a relação polímero/solvente (m/v): (a) menor que 25%, (b) 31-38%, (c) 40-45%, (d) 50-59%, (e) 60-72% (Casper *et al.*, 2004).

No estudo de filmes finos, a formação de poros na superfície é atribuída ao fenômeno de “*breath figures*”, que corresponde à névoa que se forma quando o vapor condensa em uma superfície mais fria (Srnivasarao *et al.*, 2001). Isso pode ocorrer também durante o *electrospinning*, quando o vapor d’água condensa na superfície do jato devido ao resfriamento de sua superfície, resultante da rápida evaporação do solvente volátil. Poros são criados quando tanto a água quanto o solvente eventualmente evaporam. Embora os poros formados devido ao efeito de “*breath figures*” sejam uniformes, esta propriedade não é verificada nas fibras eletrodepositadas e isso pode

ocorrer devido à condição dinâmica do jato de *electrospinning* comparada à condição estática onde os efeitos das “*breath figures*” são observadas em filmes finos (Megelski *et al.*, 2002; Casper *et al.*, 2004).

Ainda sobre o efeito da umidade, Baumgarten (1971) observou que fibras acrílicas depositadas em uma atmosfera com umidade relativa maior que 60% não secaram devidamente e ficaram emaranhadas na superfície do coletor.

#### d) *Parâmetros de solução*

Dentre os parâmetros de solução se incluem o tipo de polímero, sua concentração, sua massa molar, seu comportamento de ionização, o tipo de solvente, sua concentração, além da volatilidade, da viscosidade, da condutividade da solução e de sua tensão superficial.

O *electrospinning* envolve o estiramento da solução causado pela repulsão de cargas em sua superfície. Se a condutividade da solução é aumentada, mais cargas podem ser carregadas pelo jato de eletrodeposição. Tal aumento pode ser obtido através da adição de íons em solução. Além disso, grande parte das macromoléculas expostas ao efeito do *electrospinning* se ioniza quando de sua dissolução em água. Quando uma pequena porção de sal ou de um polieletrólito é adicionada à solução polimérica, a quantidade de cargas transportadas pela solução aumenta, proporcionando maior estiramento da mesma. Em decorrência disso, ocorre diminuição na incidência de gotas nas fibras formadas, que se formam majoritariamente lisas.

Nesse contexto, Fong *et al.* (1999) mostraram que a ocorrência de gotículas se tornou menor com o aumento da densidade de cargas. Embora solventes orgânicos sejam conhecidos como não-condutivos, muitos deles apresentam certo nível de condutividade. Soluções preparadas utilizando solventes com maiores condutividades geralmente levam à formação de fibras ao invés de gotas, ao passo que fibras não são formadas se a solução possui condutividade nula. A Tabela 2.4 apresenta as condutividades de alguns solventes comumente utilizados em trabalhos envolvendo a técnica de *electrospinning*.

Tabela 2.4- Condutividade elétrica de alguns solventes.

Solvente	Condutividade (mS/m)	Referência
Butanol	0,0036	Prego <i>et al.</i> (2000)
Acetona	0,0202	Theron <i>et al.</i> (2004)
1,2-Dicloroetano	0,0340	Jarusuwannapoom <i>et al.</i> (2005)
Tetrahidrofurano/Etanol (1:1 v/v)	0,0370	Theron <i>et al.</i> (2004)
Propanol	0,0385	Prego <i>et al.</i> (2000)
Etanol	0,0554	Prego <i>et al.</i> (2000)
Etanol (95% v/v)	0,0624	Theron <i>et al.</i> (2004)
Metanol	0,1207	Prego <i>et al.</i> (2000)
Etanol/Água (40/60 v/v)	0,1500	Theron <i>et al.</i> (2004)
1,2-Diclorometano/dimetilformamida (75/25 v/v)	0,2730	Theron <i>et al.</i> (2004)
Água destilada	0,4470	Theron <i>et al.</i> (2004)
1,2-Diclorometano/ dimetilformamida (40/60 v/v)	0,5050	Theron <i>et al.</i> (2004)
Dimetilformamida	1,0900	Jarusuwannapoom <i>et al.</i> (2005)

Outra maneira de aumentar a condutividade de uma solução é alterando o seu pH. Sob condições básicas, o processo de eletrodeposição de soluções de acetato de celulose resulta em significativa redução no diâmetro da fibra se comparado ao realizado com soluções em condições neutras (Son *et al.*, 2004b). Uma vez que o acetato de celulose sofre desacetilação quando submetido a altos valores de pH, os íons hidroxila podem ser capazes de exercer maior influência na condução e no estiramento da solução. No entanto, ainda segundo Son *et al.*(b), a interação entre o reagente que é adicionado para melhorar a condutividade da solução e a composição original desta também influencia as fibras formadas. Quando o acetato de celulose foi dissolvido em condições ácidas, as fibras eletrodepositadas apresentaram diâmetros somente um pouco maiores, embora a condutividade tenha sido melhorada.

A adição de novos compostos pode influenciar a viscosidade da solução, resultando em uma situação em que a força viscoelástica ultrapassa a força coulômbica, gerando gotas e fibras de maiores diâmetros (Mit-uppatham *et al.*, 2004). A solubilidade do polímero em um determinado solvente também apresenta efeito na morfologia da fibra (Wannatong *et al.*, 2004).

Além disso, uma vez que os solventes apresentam diferentes tendências ao serem submetidos ao *electrospinning*, é importante utilizar compostos que solubilizem eficientemente o polímero e ao mesmo tempo sejam adequados ao processo. A solubilidade é mais difícil em polímeros que em compostos de baixas massas molares devido à diferença de tamanhos entre as moléculas poliméricas e do solvente, à viscosidade do sistema, aos efeitos de estrutura e de massa molar do polímero. Há duas etapas na solubilização de um polímero em certo solvente. Primeiramente, as moléculas do solvente se difundem vagarosamente na estrutura do polímero para produzir um gel intumescido. Se as forças intermoleculares polímero-polímero são altas devido às ligações cruzadas, à cristalinidade ou a fortes ligações de hidrogênio, as interações polímero-solvente podem não ser fortes o suficiente para quebrar as ligações polímero-polímero. A segunda etapa só ocorre se as ligações polímero-polímero são rompidas para produzir a solução em si.

A estrutura do polímero apresenta impacto em sua solubilidade no solvente. Geralmente, polímeros com altas massas molares são menos solúveis e levam um tempo maior para se solubilizar que aqueles com menor massa molar considerando o uso do mesmo solvente. As forças intermoleculares entre as cadeias mais longas são mais fortes e as moléculas de solvente necessitam de mais tempo para se difundir na estrutura polimérica. Polímeros com ligações covalentes intercadeia não se solubilizam, uma vez que as ligações entre as moléculas são muito mais fortes que as forças secundárias exercidas pelas interações polímero-solvente. Além disso, uma maior cristalinidade do polímero, propriedade que reflete o grau de ordenação da cadeia polimérica na estrutura, resulta em uma menor solubilidade devido às mesmas dificuldades de penetração anteriormente citadas.

O início do processo de *electrospinning* requer que a intensidade do campo elétrico ultrapasse a tensão superficial na saída do dispositivo percorrido pela solução polimérica. No entanto, conforme o jato se dirige à placa coletora, a tensão superficial pode causar a formação de gotas através do jato. A tensão superficial tem como efeito a diminuição da área superficial por unidade de massa de um fluido. Nesse caso, quanto maior a concentração de moléculas livres, maior é a tendência das moléculas de solvente se agregarem e da solução apresentar superfície esférica na saída da agulha devido à tensão superficial.



Durante o processo de *electrospinning*, o solvente é evaporado à medida que o jato é acelerado em direção ao coletor. Quando a maior parte do solvente é evaporada no trajeto entre a formação do jato e o coletor, fibras individuais são formadas. No entanto, se a taxa de evaporação do solvente é baixa o suficiente para que o solvente não seja completamente evaporado, não são formadas fibras, e em detrimento, são produzidos filmes finos de solução polimérica depositados no coletor. A taxa de evaporação do solvente é dependente de vários fatores, como, por exemplo, da pressão de vapor, do ponto de ebulição, do calor específico, da entalpia e do calor de vaporização do solvente, da taxa de calor suprida (quando do caso de aquecimento), da interação entre moléculas de solvente e entre as moléculas de solvente e do soluto, da tensão superficial do líquido e do movimento do ar sobre a superfície do líquido.

Uma alternativa para diminuir a tensão superficial de uma solução é a inclusão de co-solventes com menores valores para essa propriedade, ou a adição de agentes surfatantes, sendo os da classe dos Pluronicos (ou Poloxamers) comumente utilizados. São copolímeros de polioxietileno e polioxipropileno. Sua estrutura química consiste em um bloco central de polioxipropileno, o qual é relativamente hidrofóbico, cercado dos dois lados por blocos de polioxietileno, relativamente hidrofílicos (Sigma-Aldrich, 2011a; Karmarkar *et al.*, 2008). A estrutura química geral dos Pluronicos é mostrada na Figura 2.11.

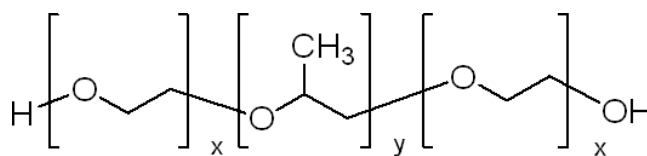


Figura 2.11- Estrutura química dos Pluronicos (Sigma-Aldrich, 2011a).

Devido à variação dos índices  $x$  e  $y$  mostrados na Figura 2.11, existem vários tipos de Pluronicos, que se apresentam em diferentes formas físicas. A designação dos Pluronicos é feita do seguinte modo: F para flocos, P para pastas e L para líquidos.

O Lutrol (Pluronic F68), particularmente, é muito usado na indústria farmacêutica por ser compatível com diversas formulações medicamentosas e mesmo com células animais em cultura. De acordo com Karmarkar *et al.* (2008), vários artigos citam o uso dos Pluronic em formulações de géis, emulsões água-óleo e óleo-água, nanopartículas e blendas poliméricas sólidas, sendo o uso deste composto aprovado pelo FDA.

O Lutrol (Pluronic F68) apresenta-se na forma de um pó branco, sem cheiro ou sabor, o qual é solúvel em água. Seus índices x e y correspondem a 80 e 27, respectivamente (Karmarkar *et al.*, 2008), e sua massa molar é em média 8350 g/mol (Sigma-Aldrich, 2011a).

A constante dielétrica é uma propriedade do material isolante utilizado em capacitores que influi na capacitância total do dispositivo. Matematicamente, a constante dielétrica pode ser definida como  $Q/Q_0$ , ou seja, é a razão entre a carga Q, obtida com uma determinada tensão no capacitor que contém um dado dielétrico e a carga  $Q_0$ , que é a carga que existiria se os eletrodos estivessem separados pelo vácuo. Pode ser entendida como a relação entre um capacitor com determinado dielétrico e outro capacitor com mesmas dimensões, cujo dielétrico é o vácuo. A constante dielétrica do solvente também possui influência significativa no *electrospinning*. Geralmente, uma solução com maior caráter dielétrico reduz a formação de gotas e o diâmetro das fibras resultantes (Son *et al.*, 2004a). A adição de co-solventes pode facilitar a redução do diâmetro das fibras devido ao aumento do caminho do jato, influenciado pela alteração do estiramento da solução (Hsu e Shivakumar, 2004). No entanto, se um solvente de maior constante dielétrica é adicionado a uma solução para contribuir com seu potencial de formação de fibras, a interação entre as misturas, bem como a solubilidade do polímero, impactarão no diâmetro destas. Quando dimetilformamida é adicionada à solução de poliestireno, gotas são verificadas mesmo com o aumento da constante dielétrica propiciado pela adição do solvente. Tal fenômeno pode ser explicado pela retração da molécula de poliestireno devida à pequena interação entre as moléculas do polímero e as do solvente (Wannatong *et al.*, 2004). As constantes dielétricas de alguns solventes comumente utilizados no processo de *electrospinning* estão dispostas na Tabela 2.5.

A viscosidade da solução é um parâmetro particularmente importante, sendo fortemente influenciada pela concentração polimérica. Para produzir fibras em qualquer

dispositivo de *spinning*, uma quantidade mínima de cadeias poliméricas precisa estar presente para permitir o emaranhamento das moléculas e a produção das fibras. Aumentando-se a concentração de polímero, aumenta-se o número de cadeias poliméricas presentes em solução e também aumenta-se a viscosidade, que pode se tornar muito alta para permitir o fluxo através da agulha, evitando a formação do cone de Taylor e a subsequente formação das fibras.

Tabela 2.5- Constante dielétrica de diferentes solventes.

Solvente	Constante Dielétrica	Referência
2-Propanol	20,18	Sigma-Aldrich (2011b)
Ácido Acético	6,15	Wannatong <i>et al.</i> (2004)
Acetona	20,70	Berkland <i>et al.</i> (2004)
Acetonitrila	35,92-37,06	Wannatong <i>et al.</i> (2004)
Clorofórmio	4,80	Berkland <i>et al.</i> (2004)
Diclorometano	8,93	Yang <i>et al.</i> (2004)
Dimetilformamida	36,71	Yang <i>et al.</i> (2004)
Acetato de etila	6,00	Berkland <i>et al.</i> (2004)
Etanol	24,55	Yang <i>et al.</i> (2004)
m-Cresol	11,80	Wannatong <i>et al.</i> (2004)
Metanol	32,60	MERCK technical data sheet (2011a)
Piridina	12,30	MERCK technical data sheet (2011b)
Tetrahidrofurano	7,52	Detsi <i>et al.</i> (2003)
Toluene	2,44	Wannatong <i>et al.</i> (2004)
Trifluoretanol	27,00	Berkland <i>et al.</i> (2004)
Água	80,20	Ramakrishna <i>et al.</i> , (2005)

Maiores valores de viscosidade significam que há uma interação maior entre as moléculas do solvente e do polímero. Dessa forma, quando a solução é estirada sob a influência das cargas, as moléculas do solvente tendem a se dispersar nas moléculas de polímero emaranhadas, reduzindo a tendência das moléculas de solvente se agregarem sob a influência da tensão superficial. Dessa forma, o balanço ideal entre tensão superficial e viscosidade é um parâmetro de otimização do processo de formação de nanofibras. A Figura 2.12 esquematiza o fenômeno da dispersão das moléculas de solvente nas moléculas de polímero em diferentes soluções.

Ainda com relação à necessidade do uso de soluções poliméricas razoavelmente concentradas, deve-se destacar que tal requerimento pode não ser adequadamente atendido no caso de polímeros pouco solúveis no solvente usado no processo de recobrimento por *electrospinning*. Nestes casos, uma opção é adicionar à mistura outro polímero, que apresente maior solubilidade no solvente em questão e que seja compatível com a aplicação desejada. O PEG, por ser atóxico, presta-se para aplicação na área de biomateriais, podendo ser misturado com sucesso a soluções acidificadas de quitosana.

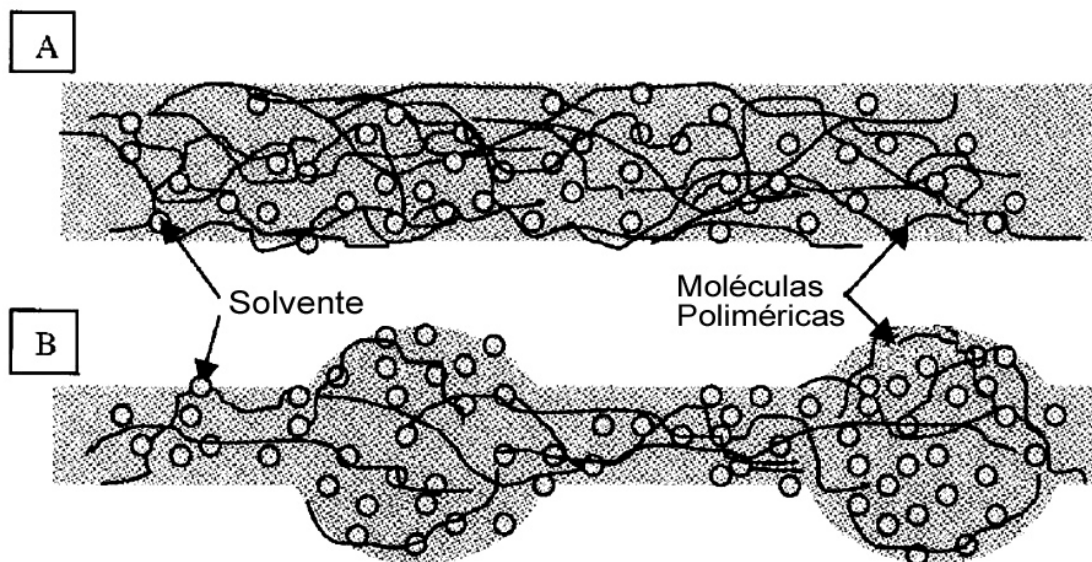


Figura 2.12- A altas viscosidades, as moléculas de solvente estão distribuídas nas moléculas poliméricas emaranhadas [A]. A uma viscosidade menor, as moléculas de solvente tendem a se agregar sob a ação da tensão superficial [B] (adaptado de Ramakrishna *et al.*, 2005).

## **2.5. Características relevantes do PEG em aplicações *in vivo* e em processos de *electrospinning***

O PEG é um composto de grande importância para as áreas biomédicas e de biomateriais (Li e Kao, 2003). É produzido mundialmente em grandes quantidades e com massas molares variando de poucas centenas a milhares de Daltons. A designação PEG é usada para compostos de baixa massa molar (abaixo de 20.000 g/mol) e a designação PEO, poli (óxido de etileno), é aplicada para compostos de altas massas molares (maiores que 20.000 g/mol) (Ribeiro, 2001). O PEG é um polímero flexível, solúvel em água, que não apresenta interações específicas com uma grande variedade de produtos químicos destinados a aplicações biológicas. Estas propriedades fazem do PEG uma das moléculas mais usadas para o desenvolvimento de condições de elevada pressão osmótica em experimentos bioquímicos, particularmente quando se usa a técnica de estresse osmótico. Destaca-se ainda que, por ser um composto atóxico e biodegradável por processos aeróbicos, o descarte de PEG não é problemático para o ambiente.

Devido à sua excelente biocompatibilidade e sua baixa toxicidade, o uso potencial do PEG em aplicações biomédicas tem atraído grande atenção tanto dos pontos de vista científico quanto clínico. O PEG possui uma variedade de propriedades pertinentes para aplicações biomédicas, sendo elas: reduzida solubilidade em água a elevadas temperaturas, formação de complexos com cátions metálicos, alta mobilidade com grande poder de volume excluído em água, agente precipitante de proteínas e ácidos nucléicos. Tais propriedades conferem ampla utilização (como agente emulsificante, umectante, lubrificante, plastificante e detergente) em diversos setores (alimentício, farmacêutico, médico, odontológico, cosmético, têxtil, industrial, entre outros). Vale ressaltar que o PEG é aprovado para uso interno pelo FDA (*Food and Drug Administration*) (Li, 2003). Estudos de Kondo *et al.* (1994) mostraram que os grupos hidroxila primários na celulose e metilcelulose podem formar pontes de hidrogênio com o oxigênio do PEG. Similarmente, isso pode ocorrer também com a quitosana, facilitando a obtenção de nanofibras (Bhattarai *et al.*, 2005).

De maneira geral, a mistura (blenda) de dois polímeros visa utilizar as propriedades atraentes de ambos. Na tentativa de eletrodepositar quitosana, a adição de

PEG permite à solução como um todo se submeter mais facilmente ao *electrospinning*, pois contorna-se o problema da baixa solubilidade e da alta viscosidade de soluções de quitosana em solução aquosa. O PEG possui baixa toxicidade, é facilmente excretado pelo corpo, causa reações alérgicas mínimas *in vivo* e pode ser adicionado à quitosana em solução sem diminuir o potencial para as aplicações finais das nanofibras eletrodepositadas. A adição de PEG reduz a viscosidade total da solução por interações com a quitosana através de ligações de hidrogênio, reduzindo a interação entre cadeias de quitosana. Assim, a adição de PEG à solução de quitosana possibilita a obtenção de uma blenda que se comporta melhor durante processo de *electrospinning* que a quitosana pura, reduzindo a viscosidade da solução sem limitar a quantidade de polímero solubilizado, além de permitir ao produto final manter sua propriedade de bioabsorção e de afetar positivamente o sistema imunológico.

Os primeiros trabalhos bem sucedidos na deposição de blendas de PEG/quitosana *via electrospinning* descrevem a obtenção de nanofibras com diâmetros variando de 40 a 290 nm, mas as fibras mais lisas e isentas de defeitos possuíam diâmetros variando de 200 a 250 nm (Spasova *et al.*, 2004). Outro estudo usando uma blenda PEG/quitosana resultou em nanofibras com diâmetros variando entre 80 e 180 nm, porém foi verificado que as amostras não apresentavam diâmetros reprodutíveis (Duan *et al.*, 2004). Usando espectroscopia de infravermelho acoplada à transformada de Fourier e à calorimetria diferencial de varredura (DSC), os autores observaram que os dois polímeros tinham se separado e as fibras maiores consistiam predominantemente de PEG, enquanto as fibras menores eram compostas de quitosana (Duan *et al.*, 2004).

Para reduzir o diâmetro das fibras das blendas de PEG/quitosana eletrodepositadas, outro grupo de pesquisa introduziu Triton X-100™ como surfatante não-iônico e dimetilsulfóxido como solvente adicional. A adição desses compostos aumentou significativamente a capacidade de deposição de blendas de PEG/quitosana com alta concentração polimérica e produziu fibras com diâmetros que variaram de 40 a 110 nm (Bhattarai *et al.*, 2005). O mesmo grupo testou a adesão e a viabilidade celular na nanotela produzida, observando que as células aderiram nesta mais rapidamente e eram capazes de se sustentar mais eficientemente na nanotela que em filmes feitos dos mesmos materiais isolados. A eletrodeposição de blendas de PEG/quitosana sem aditivos

pode ser feita também com sucesso, resultando em fibras com diâmetro médio de 300 nm (Subramanian *et al.*, 2005).

Conforme observado, há diversos relatos na literatura sobre o sucesso do uso da mistura quitosana/PEG em estudos enfocando *electrospinning* (Kriegel *et al.*, 2009; Desai *et al.*, 2008; Vondran *et al.*, 2008; Queen, 2006; Bhattarai *et al.*, 2005). Entretanto, não se localizou estudos detalhados de recobrimento de telas de poli(propileno) através desta abordagem visando à aplicação no tratamento de hérnias.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Materiais**

Para a obtenção das membranas foram utilizados os seguintes materiais e reagentes: tela protésica de poli(propileno) de dimensões de 20 cm x 25 cm, 0,45 mm de espessura e poros de 0,5 x 0,5 mm<sup>2</sup> da Intracorp Co.; quitosana 95% desacetilada de massa molar média (QM), surfatante Pluronic F68, cloreto de sódio, bicarbonato de sódio e PEG da Sigma Chemical Co.; quitosana de grau farmacêutico de baixa massa molar (QB) da Cognis Co.; ácido acético glacial, ácido sulfúrico glacial, ácido fosfórico glacial, cloreto de potássio; cloreto de magnésio, ácido clorídrico e hidrogeno fosfato de potássio da Synth (Labsynth Produtos para Laboratório, Ltda.); hidróxido de sódio da Ecibra (Cetus Ind. e Com. Prod. Químicos Ltda); sulfato de sódio, cloreto de cálcio e tampão TRIS da Merck & Co, Inc. A água utilizada foi destilada e deionizada em sistema Milli-Q da Millipore Co. Todos os reagentes utilizados possuíam qualidade analítica certificada.

#### **3.2. Métodos**

##### **3.2.1. *Montagem do aparato experimental para o processo de electrospinning***

A deposição por *electrospinning* foi realizada em aparato constituído de bomba do tipo seringa (New Era Pump Systems, NE-500 OEM) acoplada a uma agulha com dimensões de 26 G x ½ in, 23 G X ½ in, 21G X ½ in ou 18G X ½ in (Becton, Dickinson and Company), de fonte de alimentação de alta tensão (Spellman High Voltage Electronics Corp., modelo EPM30PX1731) capaz de produzir diferenças de potencial entre 1 e 30 kV e um coletor de cobre retangular imóvel e aterrado, de dimensões de 10 cm x 15 cm. A seringa de polietileno de capacidade igual a 20 mL (Becton, Dickinson and Company) foi preenchida com a solução polimérica (quitosana/PEG), que foi bombeada através da agulha através do campo elétrico gerado pela fonte de alta tensão. O controle



de vazão foi realizado por interfaceamento analógico/digital da fonte de alta tensão, bomba e sensores com um microcomputador.

Para maior controle das condições experimentais, o sistema de deposição foi montado em um gabinete de acrílico passível de controle de temperatura e umidade, além de ser provido de um dispositivo de segurança para evitar a exposição do usuário aos altos potenciais aplicados. Na Figura 3.1 é apresentada a fotografia do sistema operacional utilizado.

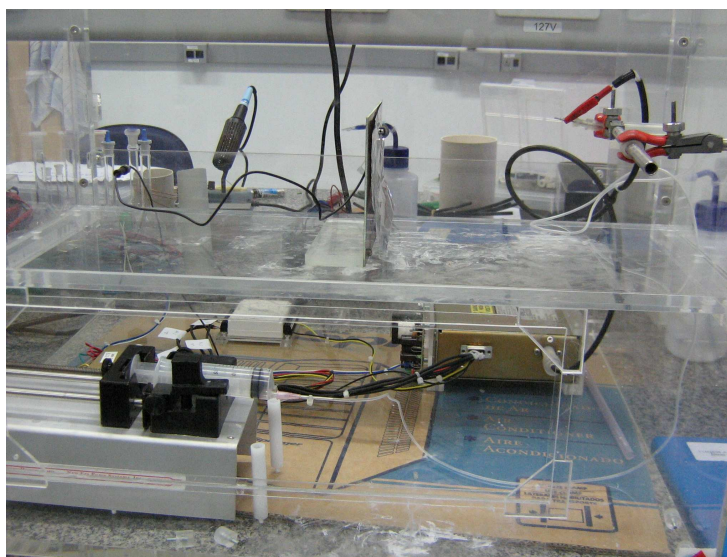


Figura 3.1- Sistema utilizado para o recobrimento das telas.

### **3.2.2. Eletropolimento das agulhas utilizadas**

Com a finalidade de remoção das irregularidades superficiais das agulhas usadas no sistema de *electrospinning*, as agulhas de diferentes diâmetros (18 G, 21 G, 23 G e 26 G) foram acopladas a uma seringa fina para manter o contato com uma solução composta por ácido sulfúrico, ácido fosfórico e água, nas proporções de 1:1:1 (v/v/v), disposta em cadinho de níquel, para que ocorresse a reação eletroquímica. O pólo negativo de uma fonte de tensão foi conectada à agulha e o pólo positivo foi conectado ao cadinho. Utilizou-se aumento gradual de tensão, até que se atingisse 9 V, com acompanhamento

da corrente no processo até que esta atingisse valor nulo, indicando que o contato da agulha com a solução ácida havia cessado. Na Figura 3.2 é apresentado o aparato experimental para o eletropolimento das agulhas.

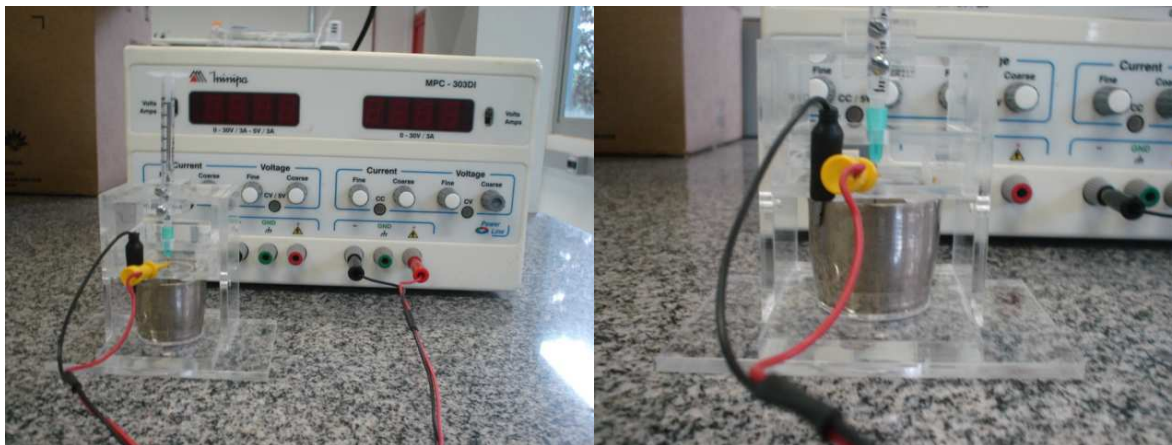


Figura 3.2- Aparato experimental para o eletropolimento de agulhas

Após o tratamento químico, as eventuais irregularidades ou protuberâncias remanescentes foram removidas da agulha com o auxílio de uma lixa de diamante (3M).

### **3.2.3. Recobrimento com quitosana e PEG por electrospinning**

Os testes iniciais de recobrimento foram realizados em substrato constituído de papel alumínio, para uma melhor visualização do recobrimento quando da caracterização da morfologia e do aspecto por microscopia eletrônica de varredura, além de lâminas de vidro para acompanhamento por microscopia óptica. Posteriormente, foram utilizadas amostras de telas de poli(propileno) de 2 cm x 2 cm dispostas sobre o papel alumínio a fim de evitar o contato direto com os depósitos resultantes da oxidação da placa coletora de cobre devido ao ácido acético presente nas soluções de recobrimento.

Para determinar a mais satisfatória condição de recobrimento da tela, foram estudados os efeitos das seguintes variáveis, que sabidamente interferem no processo:

tipo de solvente para a obtenção das soluções poliméricas (água, ácido acético, etanol e acetona em diferentes proporções); vazão de solução polimérica (variando de 0,5 a 15 mL/h); concentração de quitosana (variando de 0,8 a 1,6%) e de PEG de (1,8 a 3,0% em solução); tensão usada no recobrimento (10 a 20 kV) e distância agulha-coletor (5 a 12,5 cm). O tempo de recobrimento foi calculado em função do volume de material transferido ao substrato de deposição, fixado em 1 mL.

Para a preparação das soluções de recobrimento, diferentes massas de quitosana (0,8 g a 1,6 g) foram dissolvidas em 60 mL de ácido acético glacial. Soluções de PEG a 10% (m/v) foram preparadas a partir da dissolução do material em água. Foram adicionados de 18 a 30 mL de solução de PEG às soluções de quitosana, de forma a se obter concentrações de PEG de 1,8 a 3,0% nas soluções finais, após completar-se o volume com água deionizada até se obter 100 mL de solução polimérica. Para as soluções com etanol e acetona, as diferentes massas de quitosana foram solubilizadas em soluções a 1% em ácido acético, e posteriormente completadas com 60 mL de etanol ou acetona, quando requerido. Já para as soluções a 80% de ácido acético e 20% de água, e soluções a 40% de acetona, 40% de ácido acético e 20% de água, a quitosana (1,6 g) foi dissolvida em 120 mL de ácido acético, e 60 mL de ácido acético e 60 mL de acetona, respectivamente. Assim como anteriormente foram adicionados de 18 a 30 mL de soluções de PEG a 10% (m/v) às soluções de quitosana, e completou-se o volume com água deionizada até se obter 150 mL de solução polimérica.

Quando requerida, a adição de surfatante Pluronic F68 foi realizada de maneira lenta na solução final a fim de garantir total solubilização do tensoativo, nas proporções de 0,5 e 1,0% (m/v).

Quando necessário, as telas recobertas foram neutralizadas quanto ao ácido acético residual com 10 mL de solução aquosa de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> através de adição lenta para evitar desprendimento do recobrimento polimérico, deixando-as em repouso nesta solução por 15 minutos. As amostras foram secas e posteriormente lavadas com 50 mL de água deionizada. A secagem foi realizada em temperatura ambiente por 24 horas. A neutralização foi realizada para que se pudesse submeter as amostras às análises de caracterização de espessura, perda de massa e capacidade de absorção.

### 3.2.4. Recobrimento das telas por imersão

A fim de comparar os resultados obtidos pelo recobrimento *via electrospinning*, foram preparadas telas recobertas por filmes formados pela imersão da tela de poli(propileno) em diferentes soluções e posterior secagem.

Soluções de quitosana a 1,0% e a 2,0% (m/v) foram preparadas a partir da dissolução do material em solução aquosa de ácido acético a 1% (v/v). A solução foi mantida em repouso em geladeira por 72 h e, após este período, foi filtrada através de uma placa de vidro sinterizado de poros G1. A solução de PEG a 1% (m/v) foi preparada a partir da dissolução do material em água. Soluções contendo simultaneamente quitosana (tanto de massa molar baixa quanto média) e PEG foram preparadas pela mistura das soluções a 1% (m/v) para cada polímero em proporções volumétricas iguais, resultando em uma solução polimérica (quitosana e PEG) com concentração total de 1% (m/v).

O revestimento da tela de poli(propileno) (amostras de 2 cm x 2 cm) foi efetuado em apenas uma de suas faces, através da cuidadosa colocação da tela sobre a solução. Para as telas recobertas com quitosana (1,0% m/v) com cobertura mais fina (com ou sem adição de PEG), as amostras (quatro por placa) foram posicionadas diretamente sobre 95 mL da suspensão, em uma placa de Petri de 15 cm de diâmetro. Telas com cobertura mais espessa de quitosana foram também preparadas, posicionando-se as duas amostras sobre 42 mL de solução de quitosana (2,0% m/v) em uma placa de Petri de 7 cm de diâmetro. As amostras foram então, denominadas como 1QM para telas cobertas com uma fina camada de quitosana de massa molar média, 2QM para telas com recobrimento mais espesso de quitosana de massa molar média, QB+P para telas recobertas com a solução de quitosana de baixa massa molar e PEG e QM+P para as telas recobertas com solução de quitosana de massa molar média e PEG. Os conjuntos tela/recobrimento foram secos à temperatura ambiente por aproximadamente 72 horas, formando as películas de cobertura de maneira concomitante a sua fixação à superfície da tela.

Após a secagem, as amostras foram tratadas por imersão em 20 mL de solução aquosa de NaOH a  $1 \text{ mol L}^{-1}$  por cerca de 15 minutos. Tal procedimento, além de neutralizar o excesso de ácido acético presente, auxiliou na remoção das amostras da placa. Para a remoção do NaOH em excesso foram feitas mais duas imersões de meia hora em 500 mL de água deionizada. A secagem final foi realizada em temperatura ambiente por 24 horas.

### **3.2.5. Procedimento de esterilização das amostras**

Quando requerido, as amostras obtidas ao final do processo foram esterilizadas com óxido de etileno (Oxyfume-30) na empresa Acecil Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda (Campinas, SP) sob as seguintes condições: vácuo de 400 mmHg, tempo de exposição das amostras ao gás de 8 horas, pressão de  $0,5 \text{ kgf/cm}^2$ , umidade entre 40 e 50%, temperatura de  $40^\circ\text{C}$  e três trocas com nitrogênio. Antes de sua utilização, as amostras esterilizadas foram armazenadas por um período mínimo de 72 horas, conforme recomendação da empresa. Previamente à esterilização, as amostras foram colocadas em embalagens apropriadas constituídas por uma face plástica e outra de papel, fornecidas pela própria empresa de esterilização, sendo tais embalagens seladas a quente.

### **3.2.6. Caracterização das amostras recobertas**

As amostras foram caracterizadas de acordo com os procedimentos que se seguem, basicamente conforme proposto por Rodrigues *et al.* (2008).

#### **3.2.6.1 Aspecto e homogeneidade do recobrimento**

As amostras foram inspecionadas quanto ao aspecto a olho nu e por microscopia óptica, e tais características foram registradas através de uma câmera digital (modelo MVC-FD75, Sony).

### 3.2.6.2 *Morfologia da superfície e da secção transversal*

A morfologia foi avaliada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) em microscópio modelo LEO 440 (Leica). Antes da análise, as amostras foram armazenadas em dessecador por 24 h, fraturadas, fixadas em um suporte adequado e metalizadas (mini Sputter coater, SC 7620) através da deposição de uma fina camada de ouro (espessura de 92Å) em suas superfícies.

### 3.2.6.3 *Aspecto e diâmetro das fibras*

O aspecto e o diâmetro das fibras depositadas por *electrospinning* foi avaliado por MEV. O tamanho das fibras foi determinado através do software Measure (C Thing Software) a partir de 50 medições independentes para cada amostra. As fibras foram isoladas da tela e medidas previamente à neutralização. Após as medições, foi realizado o tratamento dos dados para obtenção do valor médio do diâmetro.

### 3.2.6.4 *Espessura do recobrimento*

A espessura do recobrimento foi determinada pela utilização de micrômetro (Digimess), através de medições em diferentes pontos ao longo da extensão de amostras recobertas e não-recobertas. As medições de espessura foram realizadas com o biomaterial neutralizado.

### 3.2.6.5 *Capacidade de absorção em fluido corpóreo simulado*

Para os ensaios de absorção de fluido corpóreo simulado (FCS), com composição (Kokubo *et al.*, 1999), descrita na Tabela 3.1, corpos de prova de 2 cm x 1 cm neutralizados, lavados com água e secos foram pesados em balança analítica ( $M_s$ ) e imersos em 10 mL de FCS, permanecendo nesta solução por 24 horas em estufa a 37 °C. Após este período, o excesso de fluido foi suavemente removido com papel de filtro e as amostras foram novamente pesadas para a determinação da massa final ( $M_f$ ). A capacidade de absorção de FCS em 24h, C foi calculada pela Equação 1:

$$C = \frac{(M_f - M_s)}{M_s} \quad (1)$$

A composição do fluido corpóreo simulado encontra-se descrita na Tabela 3.1. As análises foram feitas em triplicata para todos os ensaios.

Tabela 3.1: Composição do fluido corpóreo simulado (FCS) em solução tampão TRIS-HCl (Kokubo *et al.*, 1990). O pH da solução final foi ajustado para 7,4.

Íons	Concentração (mM)
Na <sup>+</sup>	142,0
K <sup>+</sup>	5,0
Ca <sup>2+</sup>	2,5
Mg <sup>2+</sup>	1,5
Cl <sup>-</sup>	148,8
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	4,2
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1,0
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0,5

### 3.2.6.6 Perda de massa após exposição a FCS

Neste ensaio, as amostras foram cortadas em corpos de prova de 2 cm x 1 cm, neutralizadas, lavadas com água, secas e pesadas em balança analítica (para a determinação da massa seca inicial,  $M_s$ ), e posteriormente expostas ao fluido corpóreo simulado por 7 dias a 37°C. Após este período, os corpos de prova foram lavados com água, secos por 24 h a 37°C em estufa com circulação de ar Nova Ética modelo 410, e novamente pesados em balança analítica para a determinação da massa seca final,  $M_f$ . A perda de massa em FCS, PM foi determinada através da Equação 2:

$$PM = \frac{(M_s - M_f)}{M_s} \times 100 \quad (2)$$

Também neste ensaio as amostras foram avaliadas quanto ao possível desprendimento do recobrimento após o período total de incubação. As análises foram feitas em triplicata para todos os ensaios.

### *3.2.6.7 Análise da massa molar das quitosanas utilizadas no recobrimento de telas*

Cromatografia de permeação em gel (GPC) é uma das técnicas mais largamente usadas para se determinar massa molar e distribuição de massa molar em polímeros naturais e sintéticos. O princípio desta técnica está na separação das moléculas pelo seu raio hidrodinâmico. Este processo de separação utiliza uma coluna com material poroso, onde moléculas maiores eluem mais rapidamente que moléculas menores.

A forma mais básica dos experimentos de GPC emprega o conceito de calibração convencional usando somente um detector de concentração, normalmente índice de refração. O procedimento de calibração convencional requer a injeção de um polímero padrão conhecido gerando uma curva de calibração convencional baseado no tempo ou volume de injeção. Neste caso, a massa molar média obtida é relativa a um determinado padrão.

Neste trabalho o experimento de GPC foi realizado utilizando-se um cromatógrafo com multi-detector da Viscotek (TODA 302). Utilizou-se como solvente ácido acético 0,33M/ NaOH 0,1M em pH  $3,9 \pm 0,2$ , fluxo de 0,8 mL/min e temperatura de 40°C. O estojo de colunas utilizado foi constituído das colunas Ultrahydrogel 2000 e Ultrahydrogel 1000 (Waters), de poli-metacrilato hidroxilado, com volumes de exclusão de  $2 \times 10^6$  e  $1 \times 10^6$  g.mol<sup>-1</sup>, respectivamente, conectadas em série. Para calibração do equipamento utilizou-se um padrão de poli(óxido de etileno) com uma massa molar de  $1,9 \times 10^4$  g.mol<sup>-1</sup>, na concentração de 2,00 g.L<sup>-1</sup>.

A concentração do polímero injetado a ser analisada estava em torno de 2,5 g.L<sup>-1</sup>, em ácido acético 3 % v/v. Os dados foram analisados utilizando o software OMNISEC 4.1 (Viscotek). Estas medidas foram realizadas no Laboratório de Engenharia Bioquímica do DPQ/FEQ/UNICAMP.



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos enfocando o recobrimento de telas de poli(propileno) por imersão e *via electrospinning*, e suas respectivas caracterizações. Destaca-se que o estudo do recobrimento por *electrospinning* foi realizado em duas etapas, uma considerada como preliminar, na qual foram conduzidos ensaios visando estabelecer faixas experimentais para análise, e outra considerada como de análise detalhada, na qual a influência das variáveis de processo foi estudada nas características do material.

### 4.1 Recobrimento de telas por imersão

#### 4.1.1 Aspecto visual, morfologia e espessura das telas recobertas

As telas puderam ser efetivamente recobertas por todas as soluções testadas contendo quitosana e PEG empregando o método de imersão seguido de neutralização e posterior secagem. O recobrimento das telas de poli(propileno) com solução de quitosana de massa molar média foi mais homogêneo para as amostras com camadas mais finas do polissacarídeo (1QM), não sendo observada a retenção de bolhas de ar. Esta homogeneidade foi mantida nas amostras em que o PEG foi adicionado. Ao se dobrar a massa de quitosana (2QM) utilizada no recobrimento, verificou-se que as amostras ficaram bastante quebradiças, ressecadas e espessas, enrolando com facilidade, o que dificultou sua manipulação. O enrolamento da tela recoberta após a secagem, entretanto não foi considerado como um fator adverso, pois para aplicação *in vivo* a tela deve ser intumescida em solução salina estéril, quando volta a ficar plana.

Na Figura 4.1 são apresentados os aspectos da tela de poli(propileno) e dos recobrimentos de tela realizados com diferentes soluções de quitosana, combinada ou não ao PEG. Observa-se que os recobrimentos por imersão constituíram-se fundamentalmente da formação de um filme polimérico sobreposto na tela de poli(propileno).

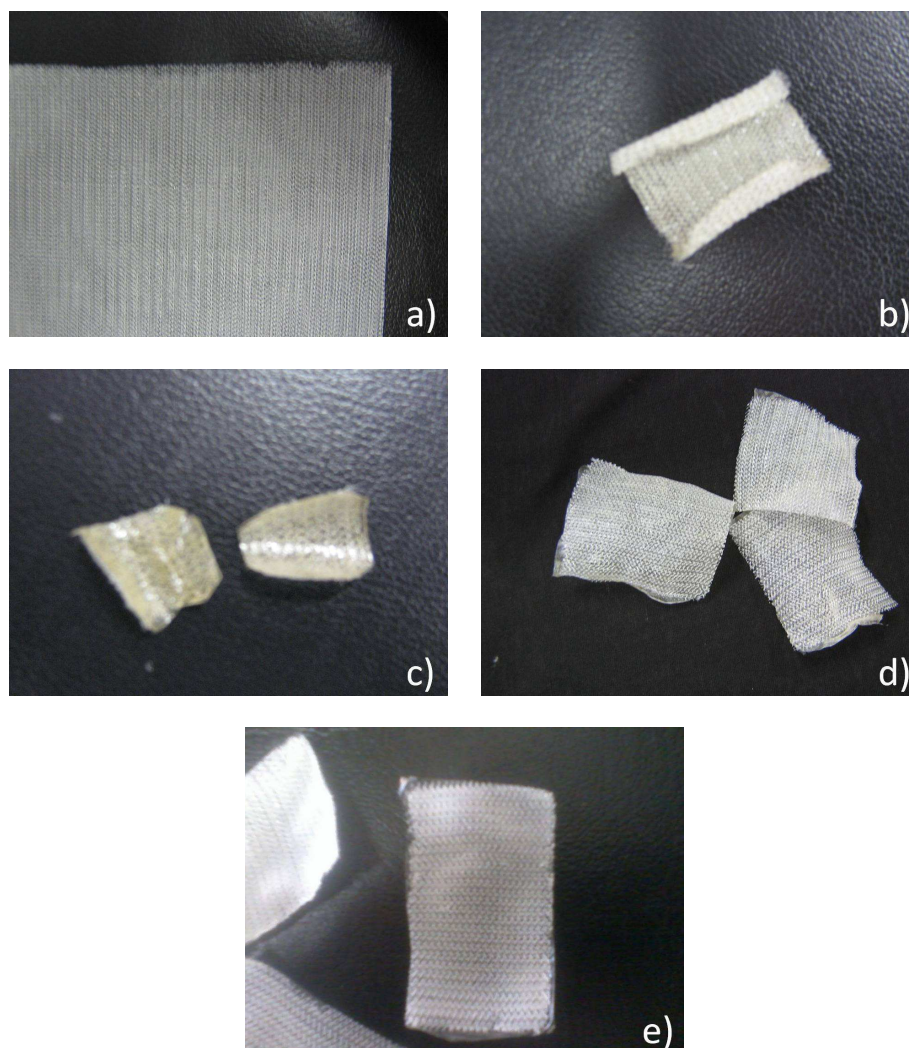


Figura 4.1- Aspecto visual das telas de poli(propileno): a) sem recobrimento; b) recoberta com quitosana no ensaio 1QM; c) recoberta com quitosana no ensaio 2QM; d) recoberta com quitosana e PEG no ensaio QM+P e e) de recoberta com quitosana de massa molar baixa e PEG no ensaio QB+P.

A análise por MEV das amostras dos ensaios 1QM, 1QM+P, 1QB+P resultou em nas Figuras 4.2 a 4.4. Observa-se que o recobrimento com ambos os tipos de quitosana e com a adição de PEG constituem-se de uma camada densa de material sobre a tela, cobrindo toda a sua superfície. Quanto ao aspecto, a substituição da quitosana de massa molar média pela de baixa massa molar resultou em orifícios (Figura 4.4b) na superfície

do biomaterial, o que pode ser prejudicial quando da aplicação *in vivo*, pois pode causar adesão tecidual junto ao poli(propileno) não recoberto.

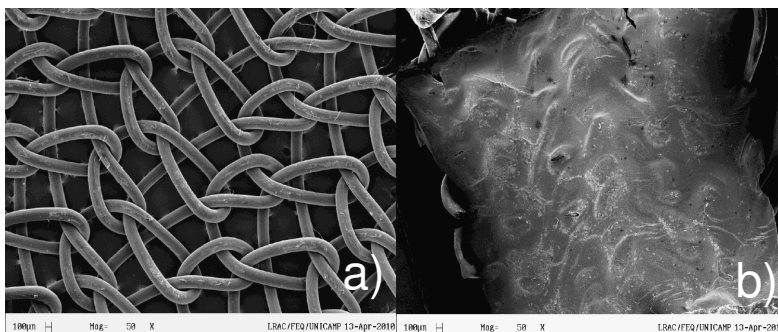


Figura 4.2- Morfologia de superfície (MEV) das telas: a) sem recobrimento e b) recoberta com quitosana (amostra 1QM).

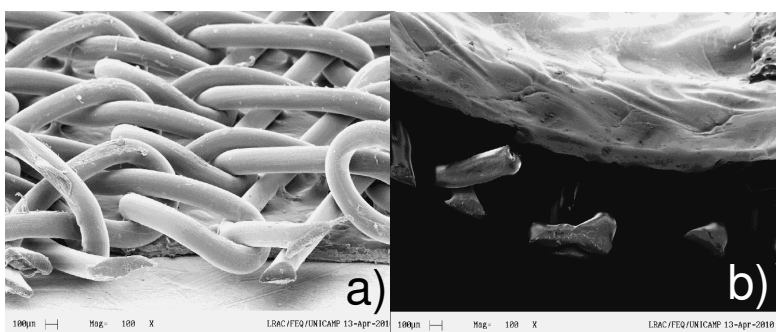


Figura 4.3- Secção transversal (MEV) das telas: a) sem recobrimento e b) recoberta com quitosana (amostra 1QM).

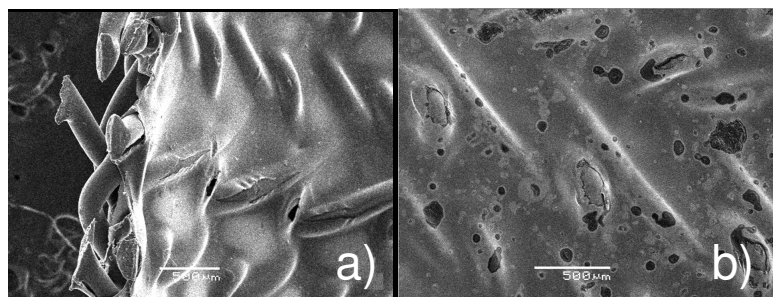


Figura 4.4- Morfologia de superfície (MEV) das telas recobertas com PEG com quitosana de massa molar: a) média (1QM+P) e b) baixa (1QB+P).

São apresentadas na Tabela 4.1 as medidas de espessura das telas de poli(propileno) com e sem recobrimento.

Tabela 4.1- Espessuras das telas de poli(propileno) com e sem recobrimento.

<b>Amostra</b>	<b>Espessura (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Diferença de espessura (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
Sem recobrimento	$588 \pm 8$	-
1QM	$848 \pm 54$	260
2QM	$1805 \pm 88$	1217
1QM+P	$1140 \pm 7$	552
1QB+P	$990 \pm 15$	402

Quando se dobrou a massa de quitosana (2QM) no filme de recobrimento, a espessura aumentou em cerca de 207% em relação à 1QM. Verificou-se resultados semelhantes quando da medição da espessura nas telas de quitosana e PEG, em que o aumento foi de cerca de 94% e 68% (1QM+P e 1QB+P, respectivamente, em relação à tela sem recobrimento). Estes resultados podem ser atribuídos à maior tendência de enrolamento destas amostras, o que dificulta a medição e contribui para a redução da homogeneidade de distribuição do revestimento durante a secagem. Além disso, eventuais inclinações dos suportes metálicos nos quais são colocadas as placas para secagem podem ter causado recobrimento irregular, refletindo em diferenças na espessura.

Paulo *et al.* (2009) produziram membranas de quitosana através da metodologia descrita para a amostra 1QM, porém foram aplicadas por sobreposição tela/filme sem constituir um único conjunto, e obtiveram valores de espessura de  $152 \pm 24 \mu\text{m}$ , que após intumescimento apresentaram espessura de  $202 \pm 19 \mu\text{m}$ . Em comparação com os dados obtidos, observa-se que o filme de quitosana confeccionado sobre a tela de poli(propileno) apresentou espessura de  $260 \mu\text{m}$ . A avaliação *in vivo* realizada por Paulo

*et al.* (2009) demonstrou que a espessura do filme não foi uma limitação em relação à aplicação, o que permite inferir que a aplicação dos biomateriais obtidos nos ensaios 1QM, 1QM+P e 1QB+P não apresentariam limitações de aplicação. Além disso, a implantação das telas recobertas com maior massa de quitosana *in vivo* (2QM) talvez possa não ser viável, uma vez que o conjunto apresentaria espessura demasiadamente elevada, o que poderia causar desconforto e aumento na probabilidade de processos inflamatórios no organismo receptor da prótese.

#### 4.1.2 Capacidade de absorção de fluido corpóreo simulado

Na Tabela 4.2 são apresentados os resultados obtidos para a capacidade de absorção de FCS pelos diferentes tipos de amostras preparadas.

Observa-se que a capacidade de absorção de fluido corpóreo simulado média das telas recobertas do tipo 1Q foi de 0,95 g de solução por grama de amostra seca. Ao se dobrar a massa de quitosana, houve redução de cerca de 30% na capacidade de absorção, fato também verificado em relação à adição de PEG à solução de quitosana QM, e uma variação negativa ainda maior para a quitosana QB. Pode-se inferir que a adição de PEG resultou em recobrimentos com menor retenção de fluido corpóreo simulado, o que é de interesse quando se deseja aplicar o biomaterial em hérnias.

Tabela 4.2- Capacidade de absorção das telas de poli(propileno) recobertas após 24 h de exposição ao FCS a 37°C.

<b>Amostra</b>	<b>Capacidade de absorção (g/g)</b>
Sem recobrimento	0,21 ± 0,08
1QM	0,95 ± 0,14
2QM	0,79 ± 0,10
1QM+P	0,76 ± 0,18
1QB+P	0,59 ± 0,03

#### 4.1.3 Perda de massa em fluido corpóreo simulado

Na Tabela 4.3 são apresentados os dados de perda de massa em FCS, visando avaliar a provável estabilidade dos dispositivos quando implantados.

Tabela 4.3- Perda de massa das telas de poli(propileno) recobertas após exposição a FCS por 7 dias.

<b>Amostra</b>	<b>Perda de massa (%)</b>
Sem recobrimento	0,10 ± 0,04
1QM	2,89 ± 0,04
2QM	5,51 ± 1,31
QM+P	5,14 ± 1,59
QB+P	8,91 ± 2,00

Nota-se que a perda de massa percentual do conjunto foi baixa quando da exposição a fluido corpóreo simulado para as amostras do tipo 1QM (cerca de 3%). Quando se dobra a massa de quitosana (2QM) no recobrimento, a perda de massa aumenta significativamente, talvez em decorrência da menor homogeneidade da cobertura, resultando em uma maior área de exposição ao fluido corpóreo simulado. Novamente, os valores verificados para as amostras com quitosana e PEG se assemelharam aos obtidos para as que possuem o dobro de massa de quitosana.

Segundo Paulo *et al.* (2009), aderências são formadas de 7 a 10 dias após a lesão peritoneal; desta forma, se o filme permanece íntegro durante esse período, este poderia inibir de forma satisfatória o processo de formação das aderências. Neste sentido, as taxas de perda de massa observadas para as amostras recobertas com quitosana misturadas ou não ao PEG mostram-se bastante adequadas para a finalidade proposta, pois se tal comportamento se repetir *in vivo*, os filmes seriam totalmente solubilizados no prazo de 79 a 241 dias, ou seja bem, após o período crítico de formação das aderências.

Os implantes com cobertura à base somente de quitosana são os mais estáveis, perdendo pouco material quando submetidos a condições semelhantes às corpóreas no período de 7 dias. Porém, o PEG conferiu maior flexibilidade ao filme formado sobre a tela de polipileno.

#### **4.2 Ensaios preliminares envolvendo o recobrimento *via electrospinning***

Os estudos realizados nesta etapa foram executados empregando papel alumínio ao invés da tela de poli(propileno) para facilitar as análises e a caracterização visual dos recobrimentos, por se tratarem de ensaios preliminares visando estabelecer as faixas experimentais para análise mais detalhada e sistemática.

O estudo do recobrimento por meio de *electrospinning* foi realizado alterando a distância da agulha à placa coletora contendo o papel alumínio, a vazão de solução polimérica, a concentração de quitosana e PEG utilizados, a tensão elétrica e o tipo de solvente. Nestes ensaios foi usada a quitosana QM (de massa molar média), por estar disponível em maior quantidade.

O primeiro passo a ser tomado para otimizar a obtenção de soluções de quitosana sem material particulado, além de blendas contendo-a, é determinar a quantidade de ácido acético que dissolva completamente a quitosana em solução. Queen (2006) realizou experimentos dissolvendo quitosana em diferentes proporções de ácido acético diluído, variando de 10 a 90% (v/v), com o restante do volume sendo constituído de água deionizada. A concentração de quitosana em solução foi fixada em 3% (m/m) para todos os ensaios. A análise reológica realizada pela mesma autora confirmou que o polímero não se dissolveu completamente em soluções abaixo de 60% em ácido acético, resultando, em concentrações abaixo desta, em géis. Tais suspensões gelificadas não se submeteram satisfatoriamente ao processo de *electrospinning*, uma vez que neste estado fibras não podem ser formadas, devido à alta viscosidade do gel e à evaporação ineficaz do solvente.

Dessa forma, utilizou-se no presente trabalho como solvente padrão o ácido acético em concentração de 60% (v/v). Concentrações iniciais de 0,8% (m/v) de quitosana e 1,8% (m/v) de polietileno glicol foram então testadas, conforme o trabalho de Queen (2006).

Além disso, determinou-se experimentalmente que a distância de 10 cm da agulha em relação ao coletor era razoável (como condição inicial para a realização dos experimentos) para que a solução polimérica atingisse o coletor. A vazão de referência foi definida como 5 mL/h, e a tensão para o início dos experimentos foi estabelecida em 15kV, com base em dados médios obtidos da análise da literatura específica do processo.

#### 4.2.1 *Análise do efeito da vazão nas características do recobrimento*

Conforme anteriormente citado, a vazão de referência utilizada foi de 5 mL/h. Esta foi aumentada para 7,5 e 10 mL/h para efeito de estudo. Na Figura 4.5 são apresentadas as microscopias eletrônicas de varredura de amostras recobertas nas três vazões estudadas.

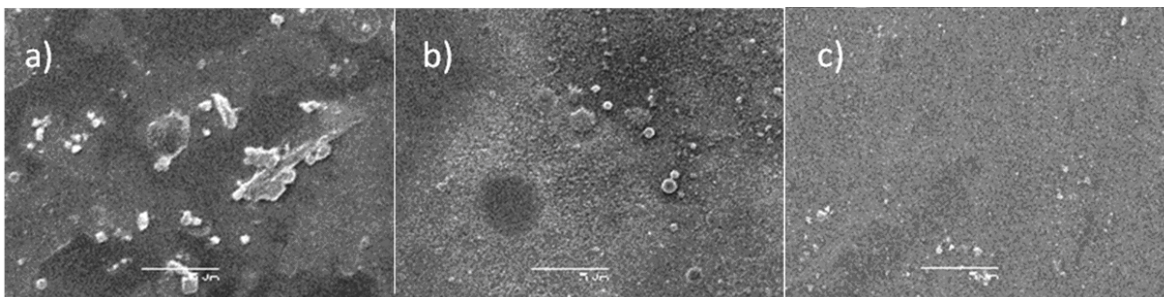


Figura 4.5- Morfologia de superfície recoberta com quitosana a 0,8% (m/v) e PEG a 1,8% (m/v) em solução aquosa de ácido acético a 60%, tensão de 15 kV, distância de 10 cm, agulha de 21G utilizando vazões de: a) 5 mL/h b) 7,5 mL/h e c) 10 mL/h (barras de 5  $\mu$ m).



Analisando-se a Figura 4.5, verifica-se que o aumento da vazão resulta em gotas cada vez menores, além de maior homogeneidade do recobrimento (através da análise morfológica do recobrimento no substrato de papel alumínio), entretanto, sem resultar na formação de fibras. Pode-se inferir que as vazões utilizadas nessa etapa foram altas, de modo que não houve evaporação suficiente do solvente quando da deposição da solução no papel alumínio, prevalecendo o depósito de gotículas. Observa-se o gotejamento da solução, com maior clareza, na Figura 4.5(b).

#### *4.2.2 Análise da influência da distância agulha-coletor*

A distância inicial pré-determinada foi de 10 cm; esta foi incrementada para 12,5 cm e reduzida a 7,5 cm para efeitos de estudo. Na Figura 4.6 são apresentadas as microscopias eletrônicas de varredura para as amostras recobertas nas distâncias analisadas.

O recobrimento com a agulha a 7,5 cm de distância gerou uma camada fina de material sobre o substrato, caracterizando um filme ao invés de fibras. Fato semelhante ocorreu quando se aumentou a distância para 12,5 cm, porém foram observadas algumas gotas no recobrimento, tornando-o mais heterogêneo. Distâncias maiores poderiam favorecer o processo, visto que o tempo de transferência da solução e a taxa de evaporação do solvente são dependentes desse parâmetro. Porém, a distância não pode ser alta a ponto de que o material não atinja o coletor. Por outro lado, quando se utiliza distâncias menores, pode-se conseguir maiores valores de campo elétrico sem a necessidade de aumentar exarcebadamente a tensão, conferindo maior segurança ao processo. Apesar da distância ser relevante, a sua variação é menos impactante nos resultados que outros parâmetros, como concentração polimérica, tensão e tipo de solvente, que foram, então, averiguados.

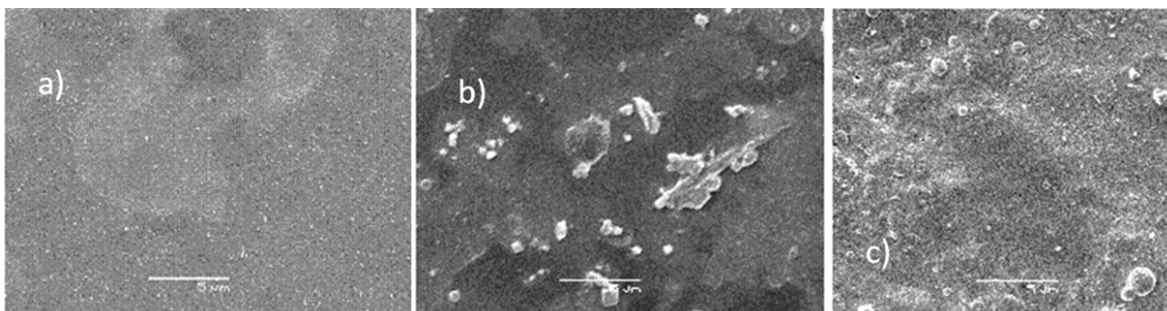


Figura 4.6- Morfologia da superfície recoberta com quitosana a 0,8% (m/v) e PEG a 1,8% (m/v) em ácido acético a 60%, tensão de 15 kV, vazão de 5 mL/h, agulha de 21G, utilizando distância agulha-coletor de: a) 7,5 cm b) 10 cm e c) 12,5 cm (barras de 5 µm).

#### 4.2.3 Influência da tensão

Na Figura 4.7 são apresentadas as microscopias eletrônicas de varredura das amostras recobertas com solução de quitosana a 0,8% (m/v) e PEG a 1,8% (m/v) sob diferentes tensões.

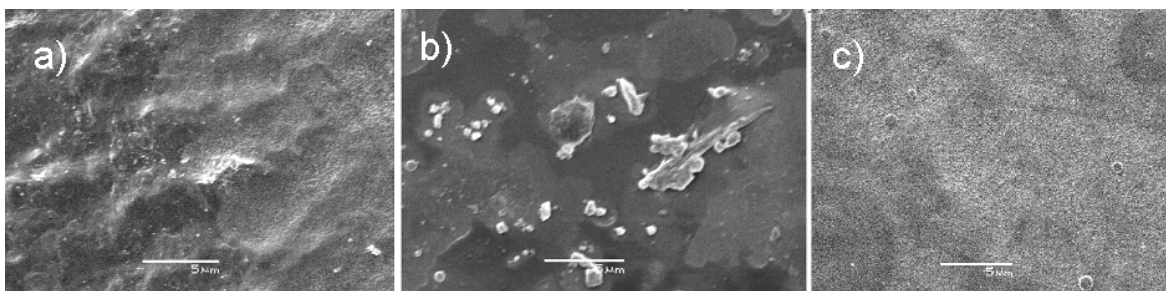


Figura 4.7- Morfologia da superfície recoberta com quitosana a 0,8% (m/v) e PEG a 1,8% (m/v) ácido acético a 60%, vazão de 5 mL/h utilizando distância agulha-coletor de 10 cm, agulha de 21G, submetido a tensões de a) 10 kV b) 15 kV c) 20 kV (barras de 5 µm).

A tensão elétrica é um parâmetro importante, pois está associada à força com que o fluido que sai da agulha será estirado. Logo, menores volumes de solução e maiores forças de estiramento produzem fibras menores. Dessa forma, devido às poucas diferenças no padrão de recobrimento das superfícies tratadas mostradas na Figura 4.7 e as limitações operacionais do sistema, estabeleceu-se a tensão mais adequada como sendo a de 15 kV.

#### 4.2.4 Efeito do tipo de solvente utilizado

Na Figura 4.8 são mostrados os resultados obtidos a partir da mudança de solvente utilizado.

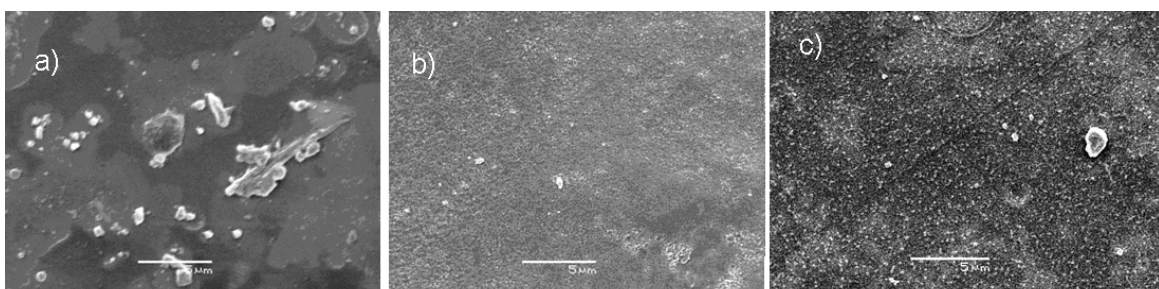


Figura 4.8- Morfologia da superfície recoberta com quitosana a 0,8% (m/v) e PEG a 1,8% (m/v), vazão de 5 mL/h utilizando distância agulha coletor de 10 cm, tensão de 15 kV, agulha de 21G empregando como solventes soluções aquosas de: a) ácido acético a 60% (v/v) b) etanol e ácido acético a 60% (v/v) e 1% (v/v), respectivamente c) acetona e ácido acético a 60% (v/v) e 1% (v/v), respectivamente (barras de 5 µm).

Baseando-se na Figura 4.8, observou-se que a substituição por etanol gerou um filme fino depositado sobre o papel alumínio, enquanto pode-se inferir que a substituição quase completa do ácido acético por acetona configura-se como uma alternativa promissora quando se deseja recobrimentos do tipo *electrospraying*. Ocorreu uma distribuição homogênea das gotículas nesta condição, o que pode ser interessante em outras aplicações médicas. No entanto, a formulação da solução pode ser modulada com a adição de acetona para promover maior volatilidade à solução polimérica, de modo a se obter fibras em detrimento à dispersão de pequenas gotas. Visto que o aumento da viscosidade da solução polimérica poderia contribuir para a formação de fibras, testou-se o efeito do aumento da concentração de quitosana e PEG no recobrimento.

#### 4.2.5 Efeito da concentração de polímeros

A concentração inicial de quitosana foi estabelecida em 0,8% (m/v), enquanto a de PEG foi de 1,8% (m/v); aumentou-se a concentração de quitosana para 1,2% (m/v) e 1,6% (m/v), a fim de analisar a influência da quantidade de polímeros no recobrimento. Na Figura 4.9 são apresentadas as microscopias eletrônicas de varredura para as amostras obtidas nas três concentrações estudadas.

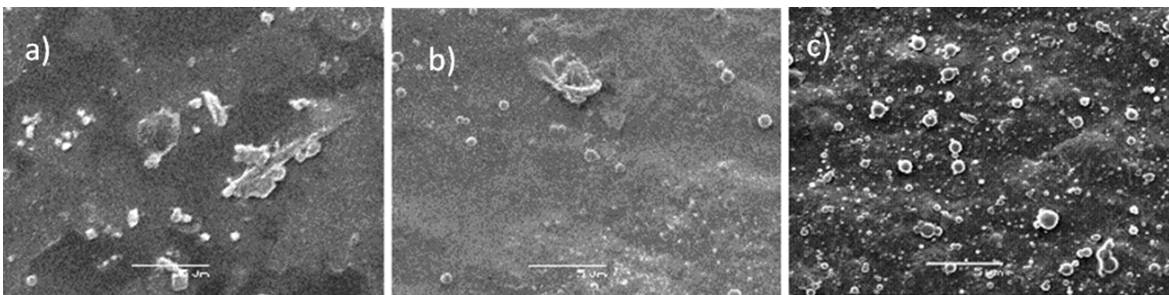


Figura 4.9- Morfologia da superfície recoberta com mistura de quitosana em variadas proporções e PEG a 1,8% (m/v) em ácido acético a 60%, na tensão de 15 kV, vazão de 5 mL/h, distância agulha-coletor de 10 cm, vazão de 5mL/h, agulha de 21G, nas seguintes concentrações de quitosana a: a) 0,8% b) 1,2% c) 1,6% (m/v) (barras de 5  $\mu$ m).

Através da Figura 4.9, é possível observar que nas três concentrações analisadas, obteve-se um recobrimento do tipo microdispersão na superfície das amostras de papel alumínio. O aumento da concentração polimérica em solução resultou em maiores diâmetros de gota. A fim de otimizar o parâmetro concentração na formação de fibras, a quantidade de moléculas poliméricas em solução deve ser elevada, porém tendo precaução quanto à viscosidade da solução, de maneira que não se verifique sua gelificação. Dessa forma, o recobrimento mais satisfatório se deu com quitosana a 1,6% (m/v), embora em nenhuma das condições se verificasse a formação de fibras. Apesar da dispersão das gotas ter se tornado menor, o conjunto de variáveis de processo e de solução não permitiu que houvesse agregação, estiramento e evaporação do solvente para a deposição de fibras em detrimento à de gotas.

Analisando as Figura 4.5 a 4.9, observa-se que houve a formação somente de gotas ao invés de fibras. O fenômeno verificado pode ser explicado tanto por parâmetros

de processo, como a umidade relativa e temperatura quando da realização do recobrimento, e parâmetros de solução, como viscosidade inapropriada. Por esse motivo, foram realizados aprimoramentos na metodologia experimental, a fim de se obter recobrimentos fibrosos ao invés dos constituídos por microdispersões, iniciando-se com o eletropolimento das agulhas de injeção visando a remoção de irregularidades em suas superfícies para a formação estável de jatos das soluções poliméricas, e o monitoramento da condição ambiental. Na última etapa dos ensaios preliminares, foi variada a formulação da solução polimérica.

#### 4.2.6 Recobrimento em condições ambientais monitoradas empregando agulhas com tratamento superficial (ou eletropolidas)

A fim de aprimorar a metodologia do recobrimento via *electrospinning*, diferentes agulhas testadas após seu eletropolimento (ou polimento eletroquímico) empregando solução ácida. As agulhas passaram a apresentar caráter afunilado em todas as direções, em detrimento ao aspecto chanfrado que possuíam originalmente. O tratamento teve como objetivo uniformizar a geometria da saída, visando aprimorar a deposição da solução evitando acúmulo na ponta da agulha. Na Figura 4.10 apresenta-se a microscopia óptica das agulhas em seu aspecto original e na Figura 4.11, as agulhas quimicamente tratadas de 21G (diâmetro interno de 0,8 mm) e 23G (diâmetro interno de 0,6 mm), respectivamente.

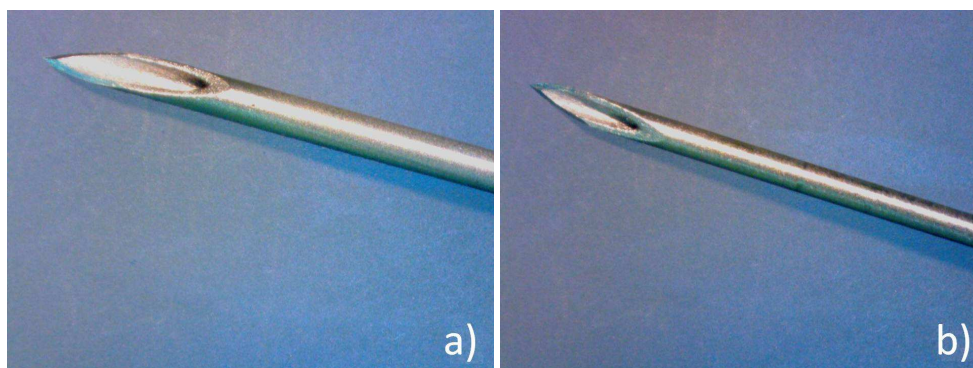


Figura 4.10- Agulhas originalmente chanfradas de: a) 21 G e b) 23 G.



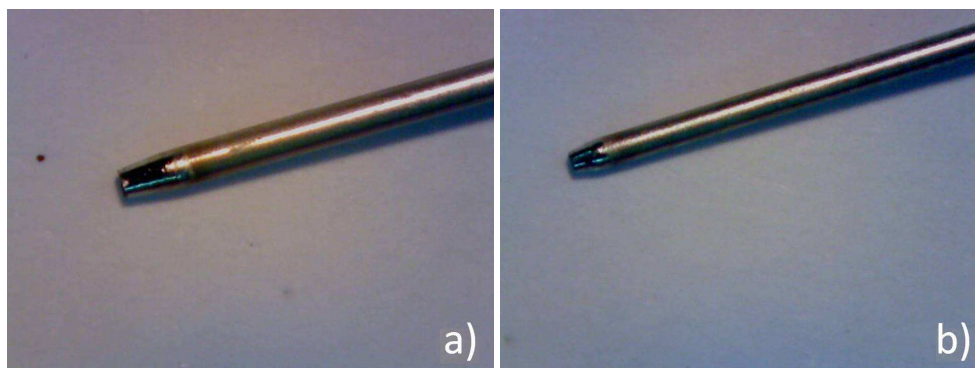


Figura 4.11- Agulhas eletropolidas de: a) 21 G e b) 23 G.

Segundo Ishihama *et al.* (2002), o eletropolimento de agulhas destinadas ao *electrospraying* confere a elas maior resistência à corrosão e resulta em emissores de material mais robustos. Além disso, os autores verificaram que agulhas de menor diâmetro interno e de parede mais fina na saída (proporcionado pelo eletropolimento) mostram-se mais promissoras em relação à estabilidade do cone de Taylor em vazões mais baixas. Assim, as agulhas polidas foram utilizadas a partir desta etapa do trabalho, considerando-se a similaridade entre os processos de *electrospinning* e *electrospraying*. Os recobrimentos foram realizados com a agulha posicionada horizontalmente, pois dessa forma foi possível controlar de maneira mais eficaz as variáveis, de modo a evitar o entupimento pela solução na saída.

Segundo De Vrieze *et al.* (2006), para que se tenha sucesso em um processo de deposição por *electrospinning*, uma série de requisitos devem ser preenchidos: 1) formação do cone de Taylor na ponta da agulha (detectável visualmente); 2) formação de um jato estável (detectável visualmente); 3) distribuição uniforme das fibras depositadas macroscopicamente (detectável visualmente); 4) formação de fibras de dimensão microscópicas (detectável por microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura).

Nesta etapa do trabalho, foram considerados tais requisitos para se confirmar que o recobrimento se deu efetivamente por *electrospinning*. O recobrimento foi realizado em papel alumínio nas análises iniciais, em placas de vidro para as análises por microscopia óptica e nas próprias telas de poli(propileno) nas condições em que houve a formação de fibras. Continuou-se utilizando as concentrações descritas por Queen

(2006). Durante os ensaios desta etapa, foram consideradas a temperatura e a umidade relativa do ambiente. A influência da umidade relativa é um parâmetro de elevada importância no processo de *electrospinning* e deve ser controlada com critério. Quanto menor a umidade relativa, mais rapidamente evapora o solvente e mais finas são as fibras formadas, pois cargas eletrostáticas mais altas na superfície da fibra tendem a alongá-las de maneira mais eficiente. Segundo o Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura (CEPAGRI/Unicamp), diariamente a umidade relativa do ar pode variar em até 25% em Campinas-SP, considerando a diferença entre os períodos da manhã e da tarde. Dessa forma, a estabilidade da umidade relativa do processo pode propiciar resultados mais expressivos em termos de *electrospinning*.

Na Tabela 4.4 são listadas as condições utilizadas nos quatro primeiros experimentos realizados nesta etapa, incluindo as suas respectivas temperaturas e umidades. A solução polimérica, para as quatro condições, foi solubilizada em uma mistura de 80% de ácido acético e 20% de água, para aumentar a volatilidade e diminuir a viscosidade da solução.

Tabela 4.4- Condições utilizadas nos quatro primeiros experimentos da etapa, utilizando concentrações de 1,6% de quitosana (massa molar média) e de 1,8% de PEG, distância agulha-coletor de 5 cm e tensão de 15 kV.

<b>Amostra</b>	<b>Agulha (G)</b>	<b>Vazão (mL/h)</b>	<b>Temperatura (C)</b>	<b>Umidade (%)</b>	<b>Aspecto do recobrimento</b>
1A	18	15	24°C	54	Partículas dispersas
2A	21	15	23°C	54	Partículas dispersas
3A	21	5	24°C	47	Agregação dos particulados
4A	21	0,5	27°C	33	Formação de filme fino

Na Figura 4.12 são apresentadas microscopias típicas dos recobrimentos obtidos nas condições listadas na Tabela 4.4.

Observa-se que, para os recobrimentos 1A e 2A, as partículas de quitosana se dispersaram, não apresentando emaranhamento para a formação de fibras. Isso se dá pela formação de chicotes observados experimentalmente, resultado de uma distribuição

heterogênea de cargas ao longo do jato, causando um efeito semelhante ao de um *spray* de material na saída da agulha. Dessa forma, o primeiro requisito do processo não foi atendido.

Comparando as amostras 1A e 2A, nas quais houve diminuição do diâmetro interno da agulha, verifica-se que para vazões altas essa alteração não foi significativa em termos de eficácia de recobrimento. Já ao se reduzir em três vezes a vazão (comparando-se as amostras 2A e 3A), mantendo as outras condições constantes, verifica-se que as partículas apresentam maior grau de agregação, que pode ser explicado por um maior tempo de exposição da solução à atmosfera, resultando em maior evaporação do solvente. Já a redução da vazão (amostras 3A e 4A) não apresentou diferença na análise por microscopia, mas houve diminuição do acúmulo de solução na saída da agulha, observado experimentalmente.

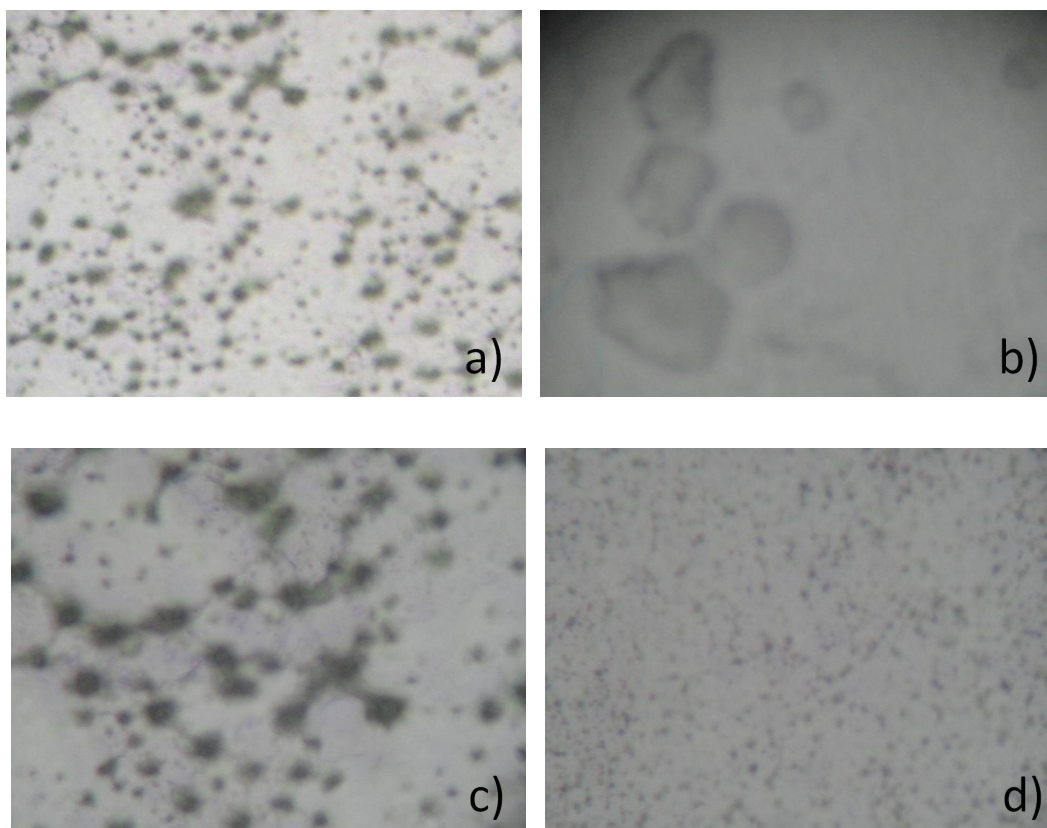


Figura 4.12- Microscopias dos recobrimentos das amostras em placas de vidro: a) 1A (aumento de 100X) b) 2A (aumento de 400X) c) 3A (aumento de 100X) e d) 4A (aumento de 40X).



Além dos recobrimentos realizados sobre as lâminas de vidro, foram realizados testes sobre as telas de poli(propileno). Estas apresentaram, nesses ensaios, recobrimento do tipo filme fino, com a presença de gotículas. Observou-se, experimentalmente, que essas gotículas entupiram os poros do material, o que pode ser prejudicial do ponto de vista da fixação celular na face voltada ao músculo. Cabe salientar que resultados mais promissores foram obtidos nas condições 3A e 4A, indicando que condições de umidade mais baixa poderiam ser propícias ao *electrospinning*.

Mediante esses resultados, foram propostas cinco novas condições para análise do comportamento e da morfologia do recobrimento, listadas na Tabela 4.5 juntamente com seus respectivos resultados qualitativos. Novamente, a solução polimérica, para todas as condições citadas, foi solubilizada em uma mistura de 80% de ácido acético e 20% de água. A quitosana utilizada foi a de massa molar média da Sigma-Aldrich. Na Figura 4.13 são apresentadas microscopias dos recobrimentos referentes à Tabela 4.5.

Tabela 4.5- Condições utilizadas nos cinco ensaios posteriores desta etapa, utilizando concentrações de 1,6% de quitosana e vazão de 1 mL/h.

<b>Amostra</b>	<b>Agulha (G)</b>	<b>Conc. PEG (%)</b>	<b>Distância (cm)</b>	<b>Tensão (kV)</b>	<b>Umidade (%)</b>	<b>Aspecto do recobrimento</b>
5A	21	1,8	5	15	33	Formação de filme fino
6A	21	2,5	5	15	42	Aparecimento de fibras
7A	21	2,5	7,5	15	41	Formação de emaranhado
8A	21	2,5	7,5	12	56	Aparecimento de fibras
9A	23	2,5	7,5	15	48	Partículas dispersas

Através das microscopias, observa-se que o aumento da vazão de 0,5 mL/h para 1 mL/h não causou alteração significativa, comparando-se as Figuras 4.13 (a) e 4.12 (d). Já o aumento da concentração de polietileno glicol de 1,8% para 2,5% resultou no aparecimento de fibras (Figuras 4.13(b) a (d)), o que permite inferir que a quantidade de polímero presente em solução era insuficiente. A maior adição de PEG permitiu que a

solução tivesse, possivelmente, um emaranhado polimérico aumentado, mas sem que se alterasse drasticamente a viscosidade da solução.

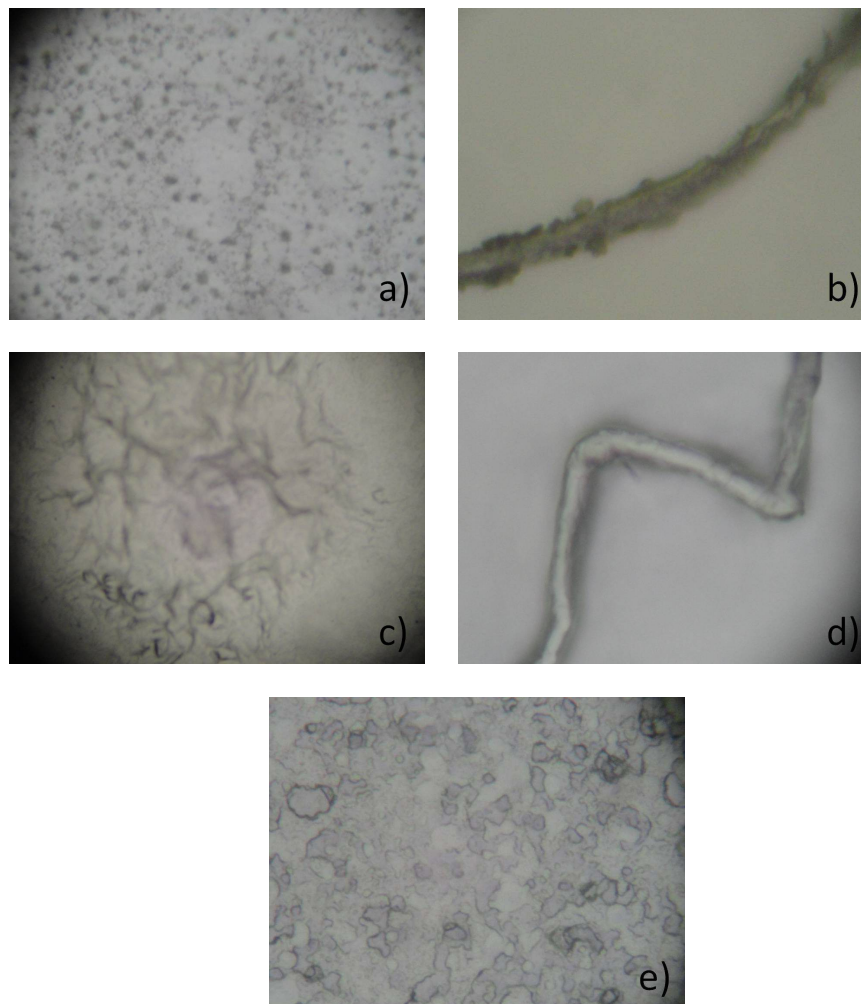


Figura 4.13- Microscopias dos recobrimentos das amostras: a) 5A (aumento de 40X) b) 6A (aumento de 400X) c) 7A (aumento de 400X) d) 8A (aumento de 400X) e) 9A (aumento de 100X).

A alteração da distância, comparando os ensaios 6A e 7A, não representou efeito significativo na morfologia do recobrimento, sendo observada a formação de um emaranhado polimérico. A redução na tensão (comparando 7A e 8A) resultou na

formação de um emaranhado sem aspecto de fibras. O aumento do diâmetro da agulha não resultou em melhores resultados, uma vez que houve ocorrência de gotas dispersas.

Nos ensaios 5A, 6A, 7A e 9A verificou-se a formação do cone de Taylor, no entanto não se observou a presença de jato estável; assim, o primeiro requisito da metodologia de reconhecimento foi atendido, porém o segundo não; dessa forma, foi preciso aprimorar as condições experimentais para garantir a estabilidade do jato na saída de material da agulha ao coletor.

O propósito que leva à utilização de uma blenda é o de se empregar, de forma sinérgica, as propriedades de ambos os polímeros em solução. Na tentativa de melhorar a eletrodeposição da quitosana, o polietileno glicol permite à solução como um todo ser mais facilmente depositada por diminuir as influências da baixa solubilidade e da alta viscosidade da quitosana em solução (Queen, 2006). O PEG apresenta baixa toxicidade, pode ser facilmente eliminado do organismo, apresenta mínima reação adversa *in vivo*, e pode ser adicionado à quitosana sem prejudicar o potencial para aplicações biomédicas das fibras. A adição de PEG reduz a viscosidade da solução por interagir com a quitosana através de ligações de hidrogênio, diminuindo as ligações intercadeias das moléculas de quitosana. A adição de PEG à solução de quitosana gera uma blenda que é mais suscetível à eletrodeposição que a quitosana isolada, através da redução da quantidade de polissacarídeo em solução, permitindo ao produto final manter a sua característica biodegradável e de afetar positivamente o sistema imunológico. Dessa forma, o aumento da proporção de PEG é benéfico tanto do ponto de vista tecnológico quanto em relação às características desejadas do biomaterial, e mostrou-se vantajoso também no presente trabalho.

#### *4.2.7 Efeito da mudança da formulação da solução polimérica no recobrimento via electrospinning*

A formulação da solução polimérica foi alterada trocando-se o solvente utilizado. Ao invés de utilizar uma mistura composta por 80% de ácido acético em água, empregou-se uma solução formada por 40% de ácido acético, 40% de acetona e 20% de água, a

fim de aumentar a volatilidade desta. Liu *et al.* (2008) constataram que é possível otimizar a composição do solvente para a eliminação de gotas nos produtos obtidos via *electrospinning*, e a eficiência do processo depende fortemente desse parâmetro. Dessa forma, estudos mais detalhados sobre o solvente mais adequado para o sistema se mostraram necessários.

A alteração da composição do solvente resultou na formação de um jato líquido no centro da tela de poli(propileno) a ser recoberta e na formação macroscópica de pequenas fibras dispersas em suas bordas. As condições experimentais utilizadas são apresentadas na Tabela 4.6, e nas Figuras 4.14 e 4.15 são apresentados o aspecto típico e a microscopia eletrônica de varredura resultante do ensaio.

Tabela 4.6- Condições utilizadas na alteração da formulação do solvente utilizando concentrações de 1,6% de quitosana e vazão de 1 mL/h, com solvente constituído por 40% de ácido acético, 40% de acetona e 20% de água.

Amostra	Agulha (G)	Conc. PEG (%)	Distância (cm)	Tensão (kV)	Temp (°C)	Umidade (%)	Aspecto do recobrimento
10A	21	2,5	7,5	15	25	44	Formação de fibras e filmes finos e descontínuos

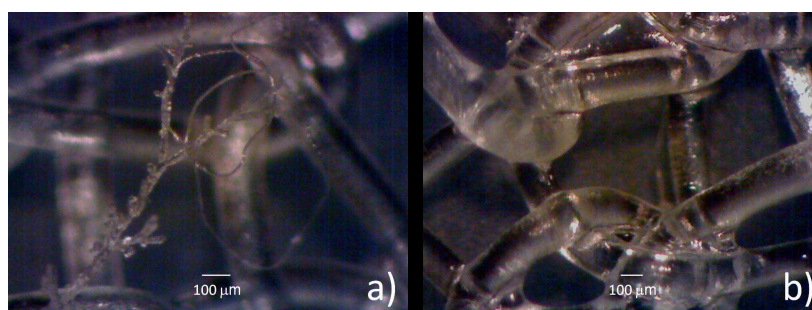


Figura 4.14- Aspecto do recobrimento obtido através da alteração da composição do solvente: a) formação de fibras b) deposição de material úmido.

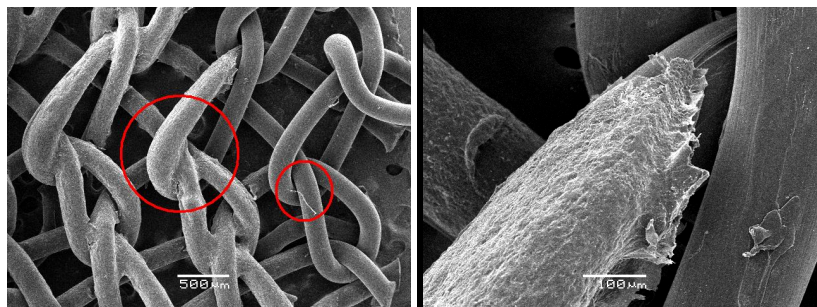


Figura 4.15- Microscopias eletrônicas de varredura do recobrimento resultante da mudança de composição do solvente.

Através das Figuras 4.14 e 4.15, verifica-se que houve a formação de pequenas fibras concomitante com o recobrimento por filme verificado sobre a tela de poli(propileno). A fim de otimizar a formação de fibras e eliminar a incidência de recobrimentos constituídos de filmes, na qual o solvente não fosse totalmente evaporado, testou-se a substituição de quitosana de massa molar média pela quitosana de massa molar baixa.

A massa molar do polímero apresenta notável efeito na viscosidade da solução e na capacidade de se realizar a sua eletrodeposição. Queen (2006) realizou o estudo de diferentes quitosanas: a de massa molar mais alta (600.000 Da), a intermediária (400.000 Da) e a mais baixa (150.000 Da) e constatou que a quitosana de massa molar mais elevada apresentou limite de solubilidade em solução aquosa de ácido acético a 60% de 2% (m/m), resultando em uma solução gelificada; já a quitosana de massa molar intermediária apresentou limite de solubilidade na mesma solução de 3% (m/m) e a de massa molar mais baixa apresentou limite de 5% (m/m). Quando os diferentes biopolímeros foram solubilizados a uma mesma concentração, a solução com alta massa molar apresentou maior viscosidade, seguida pela média e pela baixa, respectivamente. Tanto a quitosana de alta quanto a de média massa molar resultaram em soluções bastante viscosas, que dificultam o processo de *electrospinning*. Sabe-se que para a formação de fibras via *electrospinning* um número suficiente de cadeias poliméricas precisa estar presente em solução para ocorrer seu emaranhamento, permitindo a formação de fibras à medida que as cadeias poliméricas são manipuladas no campo elétrico. Por essa razão, o balanço entre quantidade razoável de polímeros em solução e

viscosidade precisa ser considerado para se ter sucesso. A utilização de um polímero com menor massa molecular, que pode gerar uma solução com menor viscosidade, é de relevante interesse. Dessa forma, foi coerente considerar a substituição da quitosana de massa molecular média (600 kDa) da Sigma-Aldrich por quitosana baixa massa molar (grau farmacêutico) da Cognis (450 kDa), que pode ser mais apropriada para a utilização de forma isolada ou em blendas com outros polímeros. Seguiu-se a nomenclatura alta e média conforme descrição dos fabricantes.

As condições experimentais utilizadas foram as mesmas do o ensaio 10A: agulha de 21G, tensão de 15 kV, vazão de 1 mL/h, distância de 7,5 cm entre agulha e coletor, concentrações de 1,6% de quitosana QB (ao invés de QM) e de 2,5% de PEG. Este ensaio foi designado como 1B.

Na Figura 4.16 é apresentado o depósito típico da formação de fibras sobre a tela de poli(propileno). Na Figura 4.16, é possível observar que foi formado um material fibroso, constituído por quitosana de baixa massa molar e de polietileno glicol. Dessa forma, observa-se que a substituição da quitosana de massa molar média pela baixa foi satisfatória, bem como a adição de uma fração significativa de acetona no solvente utilizado para a solução polimérica. Na Figura 4.17 são apresentados o aspecto e a morfologia macroscópica do biomaterial sobreposto pelas fibras.



Figura 4.16- Formação de fibras, nas condições: agulha de 21G, tensão de 15 kV, vazão de 1 mL/h, distância de 7,5 cm entre agulha e coletor, concentrações de 1,6% de quitosana QB e de 2,5% de PEG solubilizados em 20% de água, 40% de ácido acético e 40% de acetona.

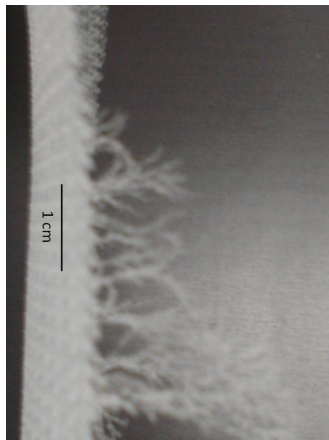


Figura 4.17- Aspecto macroscópico das fibras resultantes do processo de *electrospinning*, nas condições: agulha de 21G, tensão de 15 kV, vazão de 1 mL/h, distância de 7,5 cm entre agulha e coletor, concentrações de 1,6% de quitosana QB e de 2,5% de PEG solubilizados em 20% de água, 40% de ácido acético e 40% de acetona.

Na Figura 4.17, observa-se que as fibras formadas pareceram se estabelecer em um ponto de fixação sobre a tela de poli(propileno) e a partir deste ponto apresentaram crescimento tanto longitudinal quanto lateral, apresentando um tipo de geometria conhecida como fractal.

Estruturas na forma de fractais são comumente verificadas na natureza, como nos brônquios pulmonares (Santos *et al.*, 2011) e nas sericinas (Khire *et al.*, 2010) (proteínas hidrofílicas produzidas juntamente com a fibroína por diferentes bichos da seda). Para efeito comparativo, na Figura 4.18 são apresentadas as microscopias ópticas das fibras experimentalmente obtidas, enquanto na Figura 4.19 mostra-se a morfologia da sericina conforme registro de Khire *et al.* (2010).

A análise das Figuras 4.18 e 4.19 permite inferir que as estruturas obtidas pelo processo de *electrospinning* se assemelham às obtidas pelo processo de nucleação e crescimento da estrutura fibrosa de sericina, apresentando um eixo central com ramificações através de sua extensão. De acordo com Khire *et al.* (2010), durante a secagem, a sericina forma espontaneamente tais padrões fractais ramificados, que são



qualitativa e quantitativamente semelhantes a estruturas fractais formadas por processos limitados pela difusão da macromolécula.

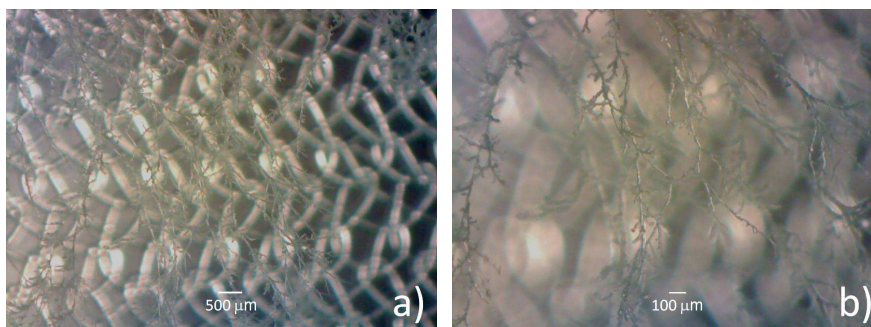


Figura 4.18- Microscopias das fibras formadas por eletrodeposição nas condições: agulha de 21G, tensão de 15 kV, vazão de 1 mL/h, distância de 7,5 cm entre agulha e coletor, concentrações de 1,6% de quitosana QB e de 2,5% de PEG solubilizados em 20% de água, 40% de ácido acético e 40% de acetona.

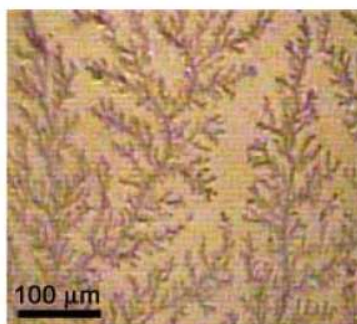


Figura 4.19- Estruturas de auto-organização molecular de sericina obtidas por Khire *et al.* (2010).

Amir *et al.* (2010) estudaram membranas poliméricas contendo diferentes porcentagens de sal para aplicação em dispositivos eletroquímicos operando em estado sólido. Padrões de crescimento fractal foram observados e analisados em membranas de PEG, onde foram obtidos fractais de iodeto de amônio, e de quitosana, onde cresceram estruturas de nitrato de prata, e suas dimensões fractais foram determinadas. Foram realizados ensaios experimentais e simulações computacionais a fim de comparar os



resultados. Para isso, um modelo de agregação limitado pela difusão, o qual é baseado na teoria do movimento Browniano, foi aplicado para simular computacionalmente os padrões fractais obtidos experimentalmente. Segundo Amir *et al.* (2010), à medida que as partículas coalescem, agregados de sal de formatos irregulares são formados. Em um processo de agregação limitado pela difusão, a partícula se desloca em movimentos Brownianos até que entre em contato com outra partícula. No início, o agregado é constituído por um único grão. O crescimento do agregado se dá pelo seguinte processo: inicialmente, uma partícula direciona-se a um determinado local ao redor do perímetro do círculo cujo centro é o grão inicial. Então, a partícula realiza um movimento aleatório até que se encontre adjacente ao agregado, que causa a junção da partícula à estrutura. O processo contínuo, partícula a partícula, faz com que o agregado cresça até atingir determinadas dimensões. Apesar do fenômeno do *electrospinning* não ser caracterizado por esse modelo difusional, uma vez que se trata do movimento acelerado do jato em direção ao coletor, a transferência do fragmento de fibra inicial (grão) e o crescimento aleatório foram observados nas estruturas obtidas pela eletrodeposição neste trabalho.

Amir *et al.* (2010) relataram que os fractais foram formados em centros de nucleação diferentes e cresceram na direção oposta ao sítio de nucleação. Os diferentes tamanhos e formas desses fractais se devem à ocorrência de outros sítios de nucleação em paralelo, o que também foi observado experimentalmente na eletrodeposição de soluções de quitosana e PEG no presente trabalho.

Observou-se, também, tanto nas membranas propostas por Amir *et al.* (2010) quanto na deposição via *electrospinning*, que o processo de crescimento aleatório leva à formação de pequenas protuberâncias que apresentam maior facilidade de captura das partículas que difundem, caracterizando-se como ponto de coleta e de crescimento preferencial. Esses pontos são facilmente identificados, uma vez que a retenção gradual das partículas e seu crescimento ocorrem geralmente em uma zona ativa pequena dentro de um raio bem determinado. Ocorre um processo de auto-estabilização da protuberância até que ela cresça e gere novas protuberâncias, resultando, assim, na característica ramificada, semelhante ao que se verifica em árvores. Dessa forma, pode-se inferir que a deposição via *electrospinning* se caracteriza, além da formação de redes de nanofibras,

como um mecanismo de obtenção de estruturas fractais de soluções poliméricas quando do seu trajeto através do ar.

#### 4.3 Análise detalhada do efeito das variáveis de estudo nas características das telas recobertas por *electrospinning*

Tabela 4.7- Condições iniciais utilizadas nessa etapa experimental.

Variável	Condições experimentais utilizadas
Conc. de PEG	2 a 3%
Distância agulha-coletor	5 a 10 cm
Vazão	0,5 a 2 mL/h
Conc. de surfatante	0 a 1%
Conc. de quitosana (QB)	1,6%
Agulha	21 G
Solvente	20% água 40% acetona 40% ácido acético

Através da análise qualitativa da influência da composição do solvente, considerando a volatilidade, tensão superficial e constante dielétrica, e das diferentes características de recobrimento obtidas com quitosanas de massas molares distintas, verificou-se que as condições experimentais utilizadas na amostra 1B mostraram-se apropriadas para dar início a estudos mais detalhados visando resultados quantitativos referentes à espessura das telas após o recobrimento, ao diâmetro médio das fibras obtidas, à capacidade máxima de absorção e à perda de massa após a exposição a soluções aquosas. Para os ensaios de espessura, perda de massa e capacidade de absorção foram utilizadas as amostras constituídas por tela de poli(propileno) e

recobrimento; já para as análises por microscopia eletrônica de varredura, utilizou-se amostras de fibras isoladas da tela, para melhor visualização. As condições experimentais utilizadas para recobrimento de telas estão dispostas na Tabela 4.7.

#### **4.3.1 Efeito da concentração de PEG nas características das fibras**

Nestes ensaios foi variada a concentração de PEG na solução, e conseqüentemente a proporção entre os polímeros utilizados para a obtenção de fibras. Os resultados obtidos para a análise da influência desse parâmetro de solução são apresentados nos itens a seguir.

##### *4.3.1.1 Morfologia das fibras formadas no processo*

A análise por microscopia eletrônica de varredura da morfologia da superfície das fibras formadas foi realizada visando auxiliar na análise das fibras formadas via *electrospinning*. Os resultados são mostrados na Figura 4.20.

Através das micrografias é possível perceber que a diminuição da concentração de PEG resulta em defeitos ao longo das fibras formadas no processo. É possível observar pequenos depósitos de material sobre as fibras, conforme apresentado com maior aproximação na Figura 4.21. Já o aumento da concentração de PEG resultou em fibras mais homogêneas e lisas, praticamente sem a presença de depósitos (Figura 4.20 c).

A formação de depósitos sobre as fibras pode ser explicada pela existência de processos de *electrospinning* e *electrospraying* combinados, no qual este último se torna prevaente em condições de baixas concentrações poliméricas. Pode-se inferir que tais depósitos sejam constituídos por quitosana, uma vez que esta apresenta maior influência quando a proporção de PEG na solução polimérica é diminuída. Dessa forma, quando se deseja fibras mais lisas e homogêneas, a concentração polimérica deve ser relativamente alta.

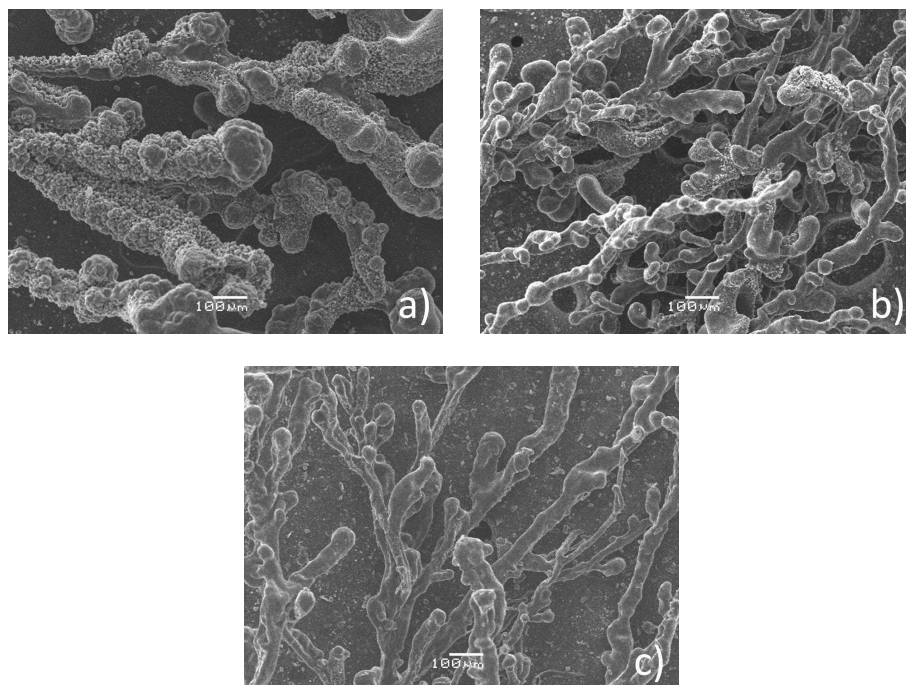


Figura 4.20- Morfologia de superfície das fibras preparadas em diferentes concentrações de PEG: (a) ensaio 1C – 2,0%; (b) ensaio 2C – 2,5% ;e (c) ensaio 3C – 3,0%.

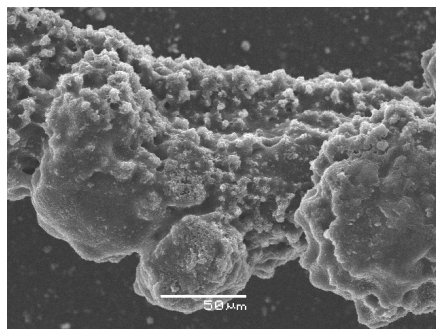


Figura 4.21- Detalhe da morfologia de superfície das fibras obtidas no ensaio 1C.

Comparando com dados da literatura, Fong *et al.* (1999) realizaram ensaios de eletrodeposição de PEG de 1 a 4,5% em água e etanol (com proporções variando de 1:0 a 3:2 em massa) e constataram que a formação de gotas concomitantes com fibras está

intimamente relacionada com a concentração polimérica em solução, obtendo fibras mais lisas com a concentração de 4,5% de PEG.

Liu *et al.* (2008) estudaram a deposição de polibutileno succinato em uma faixa de concentração de 11 a 17% solubilizado em diferentes solventes, como o clorofórmio, o diclorometano, o 2-cloro-etanol e o 2-propanol. Tais autores constataram que a concentração polimérica é um dos parâmetros mais importantes no processo de *electrospinning* porque está intimamente ligada à viscosidade da solução, sendo esta relacionada à obtenção e à morfologia das fibras. Quando a concentração polimérica é baixa, tanto gotas quanto microesferas podem ser encontradas na superfície da placa coletora, predominando o processo de *electrospraying*. Aumentando a quantidade de polímeros em solução, espera-se que ocorra uma diminuição no número e no tamanho das gotas, e em alguns casos é possível eliminar totalmente a presença de gotas, otimizando o processo de *electrospinning*. Os autores constataram também que, a concentrações poliméricas mais baixas, a força viscoelástica não foi suficientemente grande para suportar a alta intensidade do campo elétrico, resultando na ruptura do jato carregado em jatos menores, que se tornavam arredondados e formavam gotas discretas. Já a concentrações mais altas, com o aumento do emaranhamento das cadeias, a força viscoelástica foi suficientemente grande para prevenir a ruptura total do jato carregado e o posterior alongamento durante o caminho em direção ao coletor, resultando no desaparecimento das gotas e dos defeitos.

#### 4.3.1.2 Diâmetro médio das fibras obtidas

Os diâmetros médios das fibras obtidos nos experimentos cujo efeito da alteração da concentração de PEG foi estudado estão dispostos na Tabela 4.8.

Os diâmetros obtidos com a alteração na concentração de PEG apresentaram variação estatística significativa quando da utilização de concentrações de PEG mais baixas. Observou-se que houve diminuição do diâmetro a concentrações maiores que 2%, porém, acima desse valor, não houve mudança significativa. No entanto, quando se trabalhou com menores concentrações de PEG, a morfologia das fibras tornou-se bastante irregular e os diâmetros ficaram distribuídos em uma faixa mais ampla, sendo

observados tanto valores relativamente baixos quanto valores mais elevados para esse parâmetro. O erro padrão obtido para a análise no ensaio 1C foi maior que os verificados para os outros dois ensaios, corroborando a maior variabilidade verificada na análise morfológica.

Tabela 4.8- Diâmetro das fibras obtidas variando-se a concentração de PEG

<b>Amostra</b>	<b>Conc. PEG (%)</b>	<b>Diâmetro mínimo (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Diâmetro máximo (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Diâmetro médio (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
1C	2,0	38,6	174,6	92 $\pm$ 8 <sup>a</sup>
2C	2,5	31,9	118,1	59 $\pm$ 5 <sup>b</sup>
3C	3,0	33,7	102,2	64 $\pm$ 5 <sup>b</sup>

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

A análise comparativa com dados da literatura permite inferir que o aumento da concentração de PEG teria efeito direto na obtenção de maiores diâmetros. Jacobs *et al.* (2010) e Kriegel *et al.* (2009) realizaram ensaios variando, entre outros parâmetros, a concentração de PEG em solução, e concluíram que seu aumento causa elevação na viscosidade, aumentando, conseqüentemente, o emaranhamento das cadeias poliméricas, gerando fibras com maiores diâmetros. Isso ocorre provavelmente devido à maior resistência da solução polimérica enquanto é estirada por cargas elétricas no jato de *electrospinning*. Além da mudança no diâmetro, a morfologia das fibras também é influenciada pela concentração polimérica na solução. No entanto, no presente trabalho verificou-se efeito inverso, com a obtenção de maiores valores de diâmetro quando se utilizou menores concentrações de PEG. Tal inversão se deu pelas irregularidades e pela presença de defeitos nas fibras obtidas, aumentando o diâmetro das fibras no ensaio 1C; além disso, o aumento de 2,5 para 3,0% não resultou em alteração no diâmetro médio das fibras. Pode-se inferir que a utilização de concentrações abaixo de 2,0% de PEG, nas condições experimentais propostas, não resultam em fibras satisfatórias, já o aumento de concentração polimérica das amostras 2C para 3C não tem efeito significativo.

#### 4.3.1.3 Espessura das telas recobertas

Os valores referentes à espessura das telas de poli(propileno) recobertas estão presentes na Tabela 4.9, com sua respectiva variação de concentração de PEG.

Tabela 4.9- Espessuras obtidas para as telas recobertas em cada ensaio realizado.

<b>Amostra</b>	<b>Conc. PEG (%)</b>	<b>Umidade relativa (%)</b>	<b>Espessura (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
1C	2,0	33	605 $\pm$ 4 <sup>a</sup>
2C	2,5	34	603 $\pm$ 7 <sup>a,b</sup>
3C	3,0	33	581 $\pm$ 8 <sup>b</sup>

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

As espessuras médias dos conjuntos variaram de 581 a 603  $\mu\text{m}$ . Houve variação estatística nas condições extremas nas quais foram realizados ensaios. As fibras formadas no ensaio 1C, no qual foi utilizada menor concentração de PEG, apresentaram maiores diâmetros e maior heterogeneidade, o que pode ter acarretado em maiores espessuras. À medida em que se caminhou em direção da utilização de maiores concentrações de PEG, fibras mais homogêneas e finas foram formadas, influenciando na obtenção de menores espessuras do conjunto.

#### 4.3.1.4 Capacidade máxima de absorção de FCS

Os valores obtidos para a capacidade máxima de absorção de fluido corpóreo simulado estão listados na Tabela 4.10.

Os conjuntos apresentaram capacidades máximas de absorção de FCS variando de 0,20 e 0,29 g de FCS por grama de amostra recoberta. A análise estatística mostra que as amostras obtidas nos três ensaios não tiveram suas capacidades de absorção afetadas pelas diferentes condições de recobrimento. Observou-se que a variação foi pequena, e que as capacidades de absorção se aproximam do valor obtido para a tela de poli(propileno) sem recobrimento (0,21 g/g), o que permite inferir que a

absorção dos fluidos foi definida pelo caráter higroscópico do poli(propileno) que constitui a tela protésica, e que a influência do recobrimento foi mínima nesses ensaios, possivelmente porque a espessura e, conseqüentemente, a quantidade de material depositado foi reduzida em todos os ensaios.

Tabela 4.10-Valores obtidos para a capacidade máxima média (C) de absorção das telas de poli(propileno) recobertas com soluções contendo diferentes concentrações de PEG.

<b>Amostra</b>	<b>Conc. PEG (%)</b>	<b>C<sub>FCS</sub> (g/g)</b>
1C	2,0	0,20 ± 0,03 <sup>a</sup>
2C	2,5	0,26 ± 0,12 <sup>a</sup>
3C	3,0	0,29 ± 0,14 <sup>a</sup>

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, p<0,05).

#### 4.3.1.5 Perda de massa durante exposição a soluções aquosas

Os valores obtidos para a variável-resposta perda de massa do conjunto tela de poli(propileno) e recobrimento em FCS estão listados na Tabela 4.11, além da estimativa da perda de massa somente levando em consideração somente o recobrimento. Através da Tabela 4.11, observa-se que houve diferença estatística entre as amostras obtidas no ensaio 1C em relação aos ensaios 2C e 3C, assim como ocorreu com a espessura. No entanto, os valores de perda de massa dos conjuntos obtidos se assemelharam aos obtidos para os recobrimentos por imersão. Em relação à estimativa da perda de massa do recobrimento via *electrospinning*, observa-se que este parâmetro foi significativo para a amostra 1C, chegando a cerca de 25%. Pode-se inferir que tal condição não resultaria em material estável, diferentemente das outras duas condições. Apesar de o PEG ser mais solúvel que a quitosana, o aumento da proporção de PEG (comparando as amostras 2C e 3C) não resultou em diferenças estatisticamente relevantes.



Tabela 4.11- Valores obtidos para a perda de massa a 37°C, por sete dias, dos conjuntos produzidos.

<b>Amostra</b>	<b>Conc. PEG (%)</b>	<b>PM Conjunto (%)</b>	<b>PM Recobrimento (%)</b>
1C	2,0	8,38 ± 0,21 <sup>a</sup>	25,13 ± 0,63 <sup>a</sup>
2C	2,5	5,25 ± 0,91 <sup>b</sup>	15,74 ± 2,74 <sup>b</sup>
3C	3,0	4,80 ± 1,04 <sup>b</sup>	14,40 ± 3,12 <sup>b</sup>

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

#### **4.3.2 Efeito da distância agulha-coletor nas fibras resultantes**

A partir dos resultados obtidos para o efeito da concentração de PEG nas características das fibras obtidas, e considerando que um dos fatores de sucesso para a confecção do biomaterial é a homogeneidade do recobrimento, manteve-se a condição do ensaio 3C, na qual uma concentração maior de PEG foi utilizada, e variou-se a distância agulha-coletor.

##### *4.3.2.1 Morfologia das fibras formadas no processo*

As microscopias eletrônicas de varredura da morfologia da superfície das fibras obtidas como produto da alteração das distâncias agulha-coletor estão dispostas na Figura 4.22.

A alteração da distância agulha-coletor resultou em fibras com morfologias diferentes. A aproximação do coletor à agulha gerou fibras com aspecto irregular, semelhante às obtidas com baixa concentração de PEG. Observa-se, na Figura 4.22 (a), que a incidência de gotas foi alta quando se utilizou condição mais aproximada do coletor à saída da agulha. Esse fenômeno pode ser explicado pela incompleta secagem das fibras, indicando que estas se encontravam majoritariamente úmidas quando atingiram o coletor aterrado. Já o aumento da distância entre a agulha e o coletor resultou em fibras mais longilíneas e arredondadas (amostra 2D), apresentadas com maior ampliação na Figura 4.23.

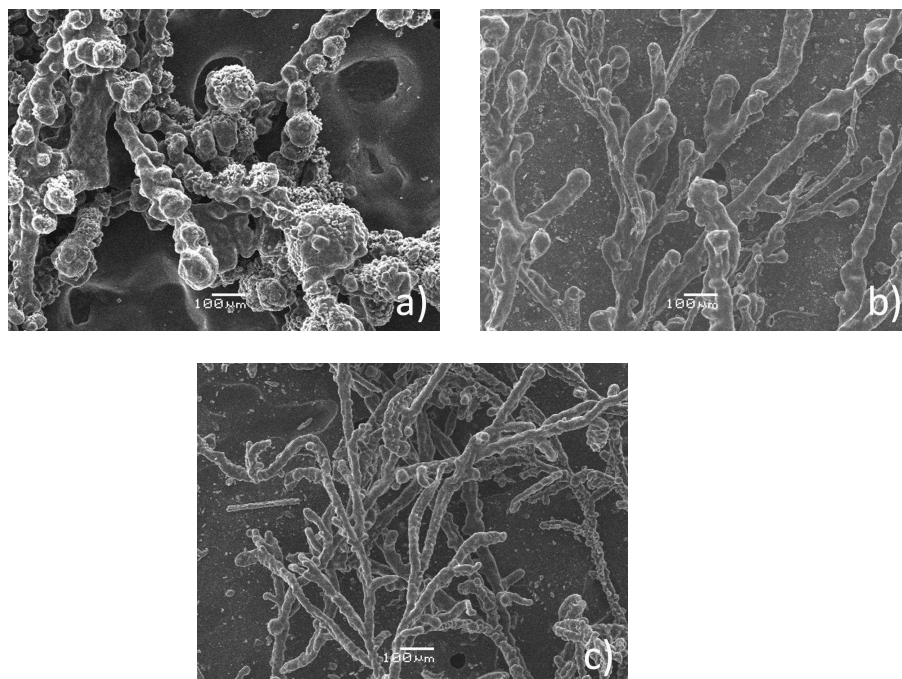


Figura 4.22- Morfologia de superfície das fibras obtidas utilizando as distâncias agulha-coletor de: a) Ensaio 1D - 5 cm; b) Ensaio 3C - 7,5 cm; e c) Ensaio 2D - 10 cm.

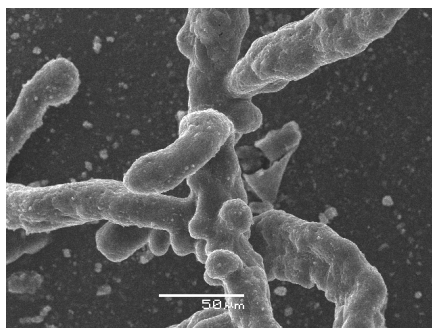


Figura 4.23- Morfologia de superfície das fibras obtidas no ensaio 2D, apresentando características mais longilíneas, lisas e arredondadas.

Tal resultado indica que, com o aumento da distância, as fibras ficam por maior tempo expostas ao ambiente, permitindo que cheguem ao coletor em condições de quase total ausência de solvente em sua composição, situação diferente com grande proximidade entre a agulha e o coletor.

#### 4.3.2.2 Diâmetro médio das fibras obtidas

Os diâmetros mínimo, máximo e médio verificados nos experimentos nos quais foram estudados os efeitos das alteração da distância agulha-coletor são mostrados na Tabela 4.12.

Tabela 4.12- Diâmetro das fibras obtidas variando-se a distância da agulha.

<b>Amostra</b>	<b>Distância (cm)</b>	<b>Diâmetro mínimo (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Diâmetro máximo (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Diâmetro médio (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
1D	5	50,3	128,4	$89 \pm 6^a$
3C	7,5	33,7	102,2	$64 \pm 5^b$
2D	10,0	27,5	42,3	$35 \pm 1^c$

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Através da análise dos dados, nota-se que a redução da distância em relação ao coletor gerou fibras mais espessas, com aumento de cerca de 38% em relação ao controle utilizado (ensaio 3C). O que se verificou, também, é que a dispersão dos valores dos diâmetros das fibras obtidas pela diminuição do caminho do jato até o coletor foi maior, além da maior dificuldade em se determinar o real valor dos diâmetros das fibras, visto que estruturas diferentes fibras (aglomerados e gotas) foram formadas. Já o aumento da distância resultou em fibras mais finas, com diâmetro médio cerca de 46% menor em relação ao ensaio 3C, com valores mínimo e máximo distribuídos em uma faixa restrita, variando de 27,5 a 42,3  $\mu\text{m}$ , demonstrando maior estabilidade e reprodutibilidade na formação das fibras. Através da análise estatística, pode-se inferir que a alteração da distância agulha-coletor influencia significativamente o diâmetro das fibras obtidas.

#### 4.3.2.3 Espessura das telas recobertas

Os valores referentes à espessura das telas de poli(propileno) recobertas estão listados na Tabela 4.13, em função das diferentes distâncias utilizadas nos experimentos.

Tabela 4.13- Valores de espessura obtidos para os conjuntos tela de poli(propileno) e recobrimento nos ensaios em que se variou a distância agulha-coletor.

<b>Amostra</b>	<b>Distância (cm)</b>	<b>Umidade relativa (%)</b>	<b>Espessura (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
1D	5	38	$595 \pm 3^a$
3C	7,5	33	$581 \pm 8^{a,b}$
2D	10,0	40	$612 \pm 11^b$

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

As espessuras médias dos conjuntos obtidos a diferentes distâncias do controle foram de 581 e 612  $\mu\text{m}$ , havendo diferença estatisticamente significativa quando se aumentou a distância agulha-coletor. Nas condições experimentais extremas, observou-se aumento em ambos os casos, porém a diferença pode ter ocorrido devido à imprecisão do aparelho de medição, e não diretamente com o recobrimento realizado.

#### 4.3.2.4 Capacidade máxima de absorção de FCS

Os valores obtidos para a capacidade máxima de absorção de fluido corpóreo simulado estão listados na Tabela 4.14.

Os comportamentos de absorção foram semelhantes para todas as amostras, que sofreram pouca alteração devido à influência da mudança da distância entre a agulha e o coletor, conforme demonstrado pela análise estatística. Novamente, a capacidade de absorção pouco alterada pelo recobrimento indica que esta propriedade do biomaterial foi definida, majoritariamente, pelo poli(propileno) que constitui a tela.

Tabela 4.14- Valores obtidos para a capacidade máxima média (C) de absorção das telas de poli(propileno) recobertas variando a distância agulha-coletor.

<b>Amostra</b>	<b>Distância (cm)</b>	<b>C<sub>FCS</sub> (g/g)</b>
1D	5	0,3 ± 0,2 <sup>a</sup>
3C	7,5	0,3 ± 0,1 <sup>a</sup>
2D	10,0	0,28 ± 0,05 <sup>a</sup>

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, p<0,05).

#### 4.3.2.5 Perda de massa durante exposição em FCS

Os valores obtidos para as perdas de massa em FCS são exibidos na Tabela 4.15.

Tabela 4.15- Valores obtidos para a perda de massa a 37°C, por sete dias, dos conjuntos produzidos variando a distância agulha e coletor.

<b>Amostra</b>	<b>Distância (cm)</b>	<b>PM Conjunto (%)</b>	<b>PM Recobrimento (%)</b>
1D	5	9 ± 1 <sup>a</sup>	28 ± 3 <sup>a</sup>
3C	7,5	5 ± 1 <sup>b</sup>	14 ± 3 <sup>b</sup>
2D	10,0	5 ± 1 <sup>a,b</sup>	16 ± 4 <sup>a,b</sup>

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, p<0,05).

As perdas de massa foram maiores para os conjuntos nos quais houve a alteração da distância agulha-coletor, no entanto, somente houve diferença estatisticamente significativa do controle em relação à diminuição da distância, observando-se menor estabilidade para amostras obtidas pela aproximação da agulha e

do coletor, o que provavelmente resulta de fibras menos secas e mais heterogêneas, com maior área superficial exposta ao ataque do FCS.

### ***4.3.3 Influência da vazão nas fibras geradas pelo processo de electrospinning***

Considerando as respostas no processo proporcionadas pelo efeito da distância agulha-coletor nas fibras obtidas, considerou-se o ensaio designado por 2D como o que resultou em comportamento mais adequado, pois levou à formação de fibras mais finas e com diâmetros distribuídos em uma faixa mais restrita de valores, valores de perda de massa e de capacidade máxima de absorção relativamente baixos, analisando-se a seguir a influência da vazão nas características das fibras formadas.

#### *4.3.3.1 Morfologia das fibras formadas no processo*

As microscopias eletrônicas de varredura das fibras formadas como resultado da variação da vazão da solução de recobrimento são apresentadas na Figura 4.24.

A diminuição da vazão (ensaio 1E) resultou em fibras mais finas e mais homogêneas que as obtidas no controle designado para o estudo da alteração do parâmetro. Houve diminuição dos defeitos na formação das fibras em relação às vazões mais elevadas. No processo de *electrospinning*, a vazão deve ser ajustada a partir do momento em que se verifica a presença do cone de Taylor. Vazões mais baixas podem causar vácuo na agulha, fazendo com que o cone de Taylor desapareça e a deposição cesse temporariamente. Em contrapartida, vazões mais altas podem, potencialmente, causar acúmulo de solução na saída da agulha. À medida que a vazão aumenta, a densidade superficial de cargas diminui; dessa forma, a taxa de remoção das cargas na solução é dependente do tempo de residência dos íons em contato com a agulha. A vazões mais altas, a solução permanece em contato com o aparato metálico durante menos tempo, fazendo com que o balanço de massa resulte em um jato sustentado, porém instável.

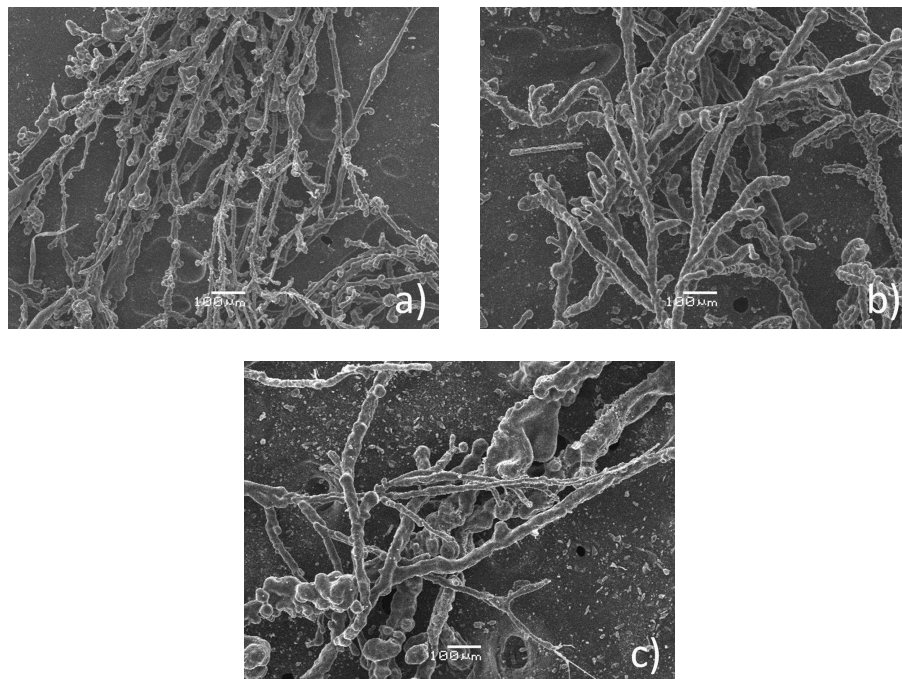


Figura 4.24- Morfologia de superfície das fibras obtidas utilizando as vazões de: a) Ensaio 1E – 0,5 mL/h; b) Ensaio 2D – 1,0 mL/h; e c) Amostra 2E – 2,0 mL/h.

Segundo Yacoob *et al.* (2010), o aumento da vazão acima de um limite crítico tem efeitos similares aos observados para a diminuição da distância agulha-coletor. A partir desse limite crítico, a taxa de escoamento do jato de solução excede a taxa na qual a solução é removida pela força eletrostática na saída da agulha. Como consequência, é formado um jato instável e são formadas gotas e fibras com defeitos, uma vez que a evaporação não se dá de maneira completa.

Apesar dos defeitos verificados na Figura 4.24 (c) serem menos impactantes na estrutura das fibras que os verificados para a as Figuras 4.20 (a) e 4.22 (a), verifica-se que o aumento da vazão resultou em fibras mais heterogêneas e com formação de estruturas diferentes das cilíndricas e longitudinais esperadas.

#### 4.4.3.2 Diâmetro médio das fibras obtidas

Os diâmetros mínimo, máximo e médio obtidos experimentalmente variando a vazão de recobrimento estão listados na Tabela 4.16.

Tabela 4.16- Diâmetro das fibras obtidas variando-se a vazão de trabalho.

<b>Amostra</b>	<b>Vazão (mL/h)</b>	<b>Diâmetro mínimo (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Diâmetro máximo (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Diâmetro médio (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
1E	0,5	14,9	29,5	$20,9 \pm 0,9^a$
2D	1,0	27,5	42,3	$35 \pm 1^b$
2E	2,0	23,0	82,4	$49 \pm 4^c$

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

A alteração da vazão de trabalho apresentou efeito direto nos resultados de diâmetro das fibras formadas, conforme constatado pela análise estatística. Estas apresentaram diâmetro médio mais elevado (aumento de cerca de 42%) quando o processo ocorreu a uma vazão mais alta que a estabelecida nos ensaios anteriores; já a redução da vazão de trabalho resultou em fibras cerca de 28% menores. Esses resultados foram também observados nos trabalhos de Rutledge *et al.* (2001) e Zhong *et al.* (2002).

Apesar de existir relação entre as vazões mais altas e o aumento do diâmetro das fibras, é necessário analisar o limite do balanço de cargas a ser considerado, conforme anteriormente mencionado. Além disso, o aumento do diâmetro, devido ao aumento do volume de solução submetida à ação do campo elétrico, ocorre devido às mudanças no estiramento da solução. Ressalta-se que o volume final injetado foi, como nos ensaios anteriores, de 1 mL.



#### 4.3.3.3 Espessura das telas recobertas

Os valores referentes à espessura das telas de poli(propileno) recobertas estão listados na Tabela 4.17, apresentando as diferentes vazões utilizadas nos experimentos.

As espessuras do biomaterial produzido foram pouco influenciadas pela alteração da vazão no processo, gerando um recobrimento fino com valores próximos ao da tela de poli(propileno) isenta de recobrimento. O volume injetado e a concentração polimérica foram iguais para todos os ensaios, e não houve variação estatisticamente significativa para esse parâmetro nas condições utilizadas. Menores espessuras foram verificadas para o recobrimento com fibras mais homogêneas e mais finas (ensaio 1E), no entanto, não verificou-se maiores espessuras de para a amostra com fibras mais heterogêneas e mais espessas (amostra 2E) .

Tabela 4.17-Espessura dos materiais recobertos pela alteração da vazão de solução polimérica.

<b>Amostra</b>	<b>Vazão (mL/h)</b>	<b>Umidade relativa (%)</b>	<b>Espessura (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
1E	0,5	43	601 $\pm$ 4 <sup>a</sup>
2D	1,0	40	612 $\pm$ 11 <sup>a</sup>
2E	2,0	44	608 $\pm$ 2 <sup>a</sup>

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

#### 4.3.3.4 Capacidade máxima de absorção de FCS

Os valores obtidos para a capacidade máxima de absorção de fluido corpóreo simulado estão listados na Tabela 4.18. Os comportamentos verificados para a capacidade de absorção dos conjuntos tela de poli(propileno) e recobrimento foram semelhantes para as fibras recobertas a diferentes vazões, e não sofreram influência do fluido ao qual foram expostos. Houve uma pequena diferença entre o controle e os dois experimentos de alteração de vazão, quando da exposição a fluido corpóreo simulado, porém essa diferença não foi significativa estatisticamente.

Tabela 4.18- Valores obtidos para a capacidade máxima média (C) de absorção dos conjuntos variando-se a vazão de injeção.

<b>Amostra</b>	<b>Vazão (mL/h)</b>	<b>C<sub>FCS</sub> (g/g)</b>
1E	0,5	0,17 ± 0,04 <sup>a</sup>
2D	1,0	0,28 ± 0,05 <sup>a</sup>
2E	2,0	0,2 ± 0,1 <sup>a</sup>

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

#### 4.4.3.5 Perda de massa durante exposição a FCS

Os valores obtidos para as perdas de massa em FCS são exibidos na Tabela 4.19.

Tabela 4.19- Valores obtidos para a perda de massa das amostradas estocadas em diferentes fluidos durante sete dias, a 37°C, obtidos pelo uso de diferentes vazões de injeção da solução polimérica

<b>Amostra</b>	<b>Distância (cm)</b>	<b>PM Conjunto (%)</b>	<b>PM Recobrimento (%)</b>
1E	0,5	6,3 ± 0,7 <sup>a</sup>	18 ± 2 <sup>a</sup>
2D	1,0	5 ± 1 <sup>a</sup>	16 ± 4 <sup>a</sup>
2E	2,0	8,4 ± 0,9 <sup>a</sup>	25 ± 3 <sup>a</sup>

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

A amostra na qual foi utilizada vazão de solução mais elevada apresentou maiores valores de perdas de massa para o fluido em estudo, permitindo sugerir que esta apresentaria menor estabilidade quando da exposição a sangue animal. A diminuição da

vazão também resultou em valores acima dos verificados para o controle utilizado obtido a partir de ensaios anteriores, porém a diferença não foi estatisticamente significativa.

#### **4.3.4 Efeito da adição de surfatante nas soluções de quitosana e PEG eletrodepositadas**

Com o intuito de analisar a influência da presença do surfatante Pluronic F68 em solução empregado como agente de compatibilização da quitosana e do PEG, utilizou-se, condições mais adequadas de recobrimento as estabelecidas no ensaio designado por 1E. Os motivos da escolha para sua utilização desse controle foram, novamente, baseados na distribuição dos maiores e menores diâmetros em uma faixa mais estreita, no menor diâmetro médio, na homogeneidade e na disposição mais alinhada das fibras, além de menores valores de capacidade de absorção. A adição do Pluronic foi feita para diminuir a tensão superficial da solução, facilitando a deposição de fibras via *electrospinning*.

##### *4.3.4.1 Morfologia das fibras formadas no processo*

As microscopias eletrônicas de varredura das fibras formadas nos ensaios envolvendo a adição de surfatantes são apresentadas na Figura 4.25.

Através da morfologia de superfície dos recobrimentos realizados a partir de soluções com surfatante, observa-se que as fibras tornaram-se mais homogêneas com o incremento dessa espécie em solução. A amostra resultante do ensaio 1E apresenta, em sua estrutura, pequenas gotas e imperfeições em seu aspecto geral; a utilização de 0,5% de surfatante em solução resultou em fibras com menor incidência de defeitos, no entanto foram observados diâmetros distintos das fibras, o que será discutido quantitativamente no item 4.3.4.2. O aumento da concentração de surfatante, referente à amostra 2F, teve como resultado fibras com menos defeitos e com distribuição de diâmetros mais regular.

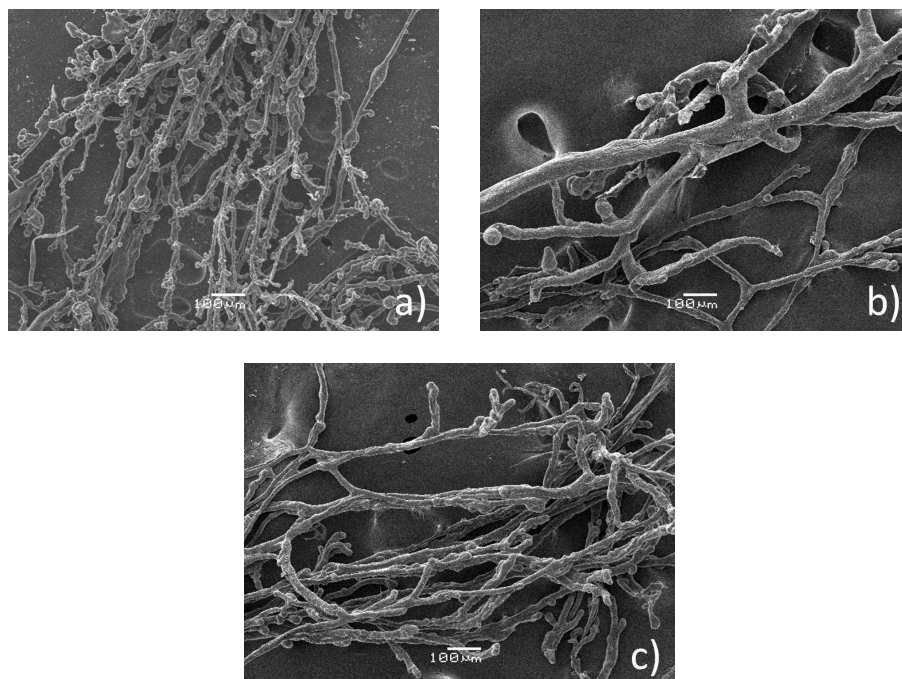


Figura 4.25- Morfologia de superfície das fibras obtidas utilizando as concentrações de surfatante de a) 0% - ensaio 1E b) 0,5% - Ensaio 1F e c) 1% - Ensaio 2F.

Yao *et al.* (2003) reportaram que a adição de pequenas quantidades de surfatantes não-iônicos reduziu a tensão necessária para induzir o processo de *electrospinning*, melhorando a reprodutibilidade experimental. Kriegel *et al.* (2009) demonstraram que a adição de surfatantes não-iônicos a blendas de quitosana e PEG foi benéfica nas características das fibras formadas. Os surfatantes interferem nas interações polímero-surfatante e, conseqüentemente, polímero-polímero, e adição de tensoativo foi estudada a fim de se obter estruturas mais finas e isentas de defeitos.

É possível, também, obter fibras porosas com a adição de surfatantes. A microscopia da amostra 2F, que ilustra este aspecto, é apresentada na Figura 4.26.

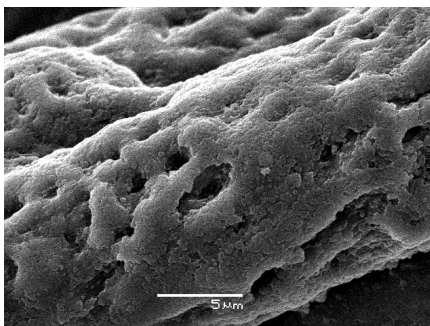


Figura 4.26- Microscopia eletrônica de varredura da amostra obtida no ensaio 2F com maior aproximação.

Observa-se que a adição de surfatante à solução de quitosana e PEG resultou em fibras com poros de diferentes tamanhos. Pode-se inferir que tais estruturas são decorrentes de bolhas formadas na solução transferida para o coletor ou quando do movimento acelerado do jato em direção ao coletor. No entanto, trata-se de uma especulação, e análises mais específicas poderiam descrever melhor o fenômeno. Poros facilitam a liberação controlada de agentes ativos eventualmente incorporados na estrutura (como antiinflamatórios).

Existem vários métodos de produção de fibras poliméricas porosas na literatura. Pode-se trabalhar com a remoção seletiva de uma das fases da solução, ou ainda com a separação dessas, através da evaporação do solvente ou na presença de vapor, conforme apontado por McCann *et al.* (2006). Xia e Li (2004) mostraram que, utilizando aparatos coaxiais para deposição com solventes miscíveis e polímeros imiscíveis, fibras altamente porosas podem ser obtidas por dissolução seletiva (no caso de fibras poliméricas) ou por calcinação (no caso de fibras obtidas a partir de compósitos). Bognitzki *et al.* (2001) relataram que fibras porosas podem ser geradas a partir da eletrodeposição de blendas poliméricas, seguido pela dissolução seletiva das espécies. Outros grupos constataram que, quando solventes altamente voláteis foram utilizados no processo de *electrospinning*, fibras porosas ou com superfícies diferenciadas puderam ser obtidas (Megelski *et al.*, 2002). Para materiais inorgânicos, fibras porosas foram obtidas a partir de *electrospinning* sol-gel com a presença de surfatantes (Macías *et al.*,

2003). Dessa forma, a obtenção de fibras porosas a partir de materiais orgânicos também se mostra viável.

#### 4.3.4.2 Diâmetro médio das fibras obtidas

Os diâmetros mínimo, máximo e médio obtidos experimentalmente variando a concentração de surfatante no recobrimento estão listados na Tabela 4.20.

A adição de surfatante influenciou o diâmetro das fibras, porém não houve relação direta do aumento do valor médio com o aumento da concentração do tensoativo. Com a presença de 0,5% do composto, foram obtidas fibras com menos defeitos, porém a faixa em que se distribuíram os diâmetros foi maior (de 18,6 a 83,9  $\mu\text{m}$ ), com diâmetro médio com valor cerca de 93% maior que o verificado no ensaio livre de tensoativo. No entanto, quando se trabalhou com uma concentração maior de surfatante, o diâmetro médio foi cerca de 21% maior, e a faixa de valores mínimo e máximo também foi ampliada. Observa-se, no ensaio designado por 2F, que foram obtidas fibras mais finas, com até 13,6  $\mu\text{m}$  de diâmetro.

Tabela 4.20- Diâmetro das fibras obtidas variando-se a adição de surfatante.

<b>Amostra</b>	<b>Conc. Surfatante (% m/v)</b>	<b>Diâmetro mínimo (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Diâmetro máximo (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Diâmetro médio (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
1E	0	14,9	29,5	20,9 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>
1F	0,5	18,6	83,9	40 $\pm$ 4 <sup>b</sup>
2F	1,0	13,6	40,6	25 $\pm$ 2 <sup>c</sup>

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

No entanto, esperava-se que os diâmetros médios das fibras com surfatante fosse menor que o diâmetro verificado para o controle utilizado isento desse componente. Segundo Jung *et al.* (2005) e Wang *et al.* (2008), a adição de Pluronic F68 em soluções

de polivinil álcool e sílica, respectivamente, não só reduziu o diâmetro médio das fibras obtidas mas também diminuiu a incidência de defeitos e gotas nas fibras formadas, conforme verificado na Figura 4.28. No entanto, houve aumento do diâmetro quando da adição de surfatante, que pode ser explicado pela presença de poros nas estruturas das fibras obtidas no presente trabalho.

#### 4.3.4.3 Espessura das telas recobertas

Os valores referentes à espessura das telas recobertas estão listados na Tabela 4.21. Observou-se que as espessuras não sofreram influência do recobrimento via *electrospinning*, conforme verificado pela análise estatística realizada. A diferença de espessura foi pequena o suficiente para se inferir que pode ter havido influência do fundo de escala do equipamento de medição.

Tabela 4.21- Espessura dos materiais recobertos considerando a adição de surfatante.

<b>Amostra</b>	<b>Conc. Surfatante (% m/v)</b>	<b>Umidade relativa (%)</b>	<b>Espessura (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
1E	0	43	$601 \pm 4^a$
1F	0,5	43	$607 \pm 4^a$
2F	1,0	41	$612 \pm 6^a$

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

#### 4.4.4.4 Capacidade máxima de absorção de FCS

Os valores obtidos para a capacidade máxima de absorção de fluido corpóreo simulado estão listados na Tabela 4.22.

A adição de surfatante não alterou significativamente a capacidade de absorção das amostras, conforme constatado pela análise estatística.

Tabela 4.22- Valores obtidos para a capacidade máxima média (C) de absorção das telas de poli(propileno) recobertas alterando a concentração de surfactante.

<b>Amostra</b>	<b>Conc. Surfatante (% m/v)</b>	<b>C<sub>FCS</sub> (g/g)</b>
1E	0	0,17 ± 0,04 <sup>a</sup>
1F	0,5	0,4 ± 0,1 <sup>a</sup>
2F	1,0	0,21 ± 0,04 <sup>a</sup>

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, p<0,05).

#### 4.4.4.5- Perda de massa durante exposição a FCS

Os valores obtidos para as perdas de massa em FCS são exibidos na Tabela 4.23. Através da análise estatística, pode-se observar que esta variável-reposta sofreu alteração com a adição de 0,5% de surfatante em solução, porém observa-se que o aumento adicional de surfactante gerou resposta estatisticamente igual à amostra livre dessa espécie. O aumento da perda de massa com a utilização de maiores concentrações de surfatante pode ser explicado pela maior presença de polímeros solúveis em fluido corpóreo simulado.

Tabela 4.23- Valores obtidos para a perda de massa a 37°C, por sete dias, dos conjuntos produzidos em recobrimentos nos quais se estudou a adição de surfatante.

<b>Amostra</b>	<b>Conc. Surfatante (% m/v)</b>	<b>PM Conjunto (%)</b>	<b>PM Recobrimento (%)</b>
1E	0	6,3 ± 0,7 <sup>a</sup>	19 ± 2 <sup>a</sup>
1F	0,5	9,0 ± 0,5 <sup>b</sup>	27 ± 2 <sup>b</sup>
2F	1,0	8,3 ± 0,6 <sup>a,b</sup>	25 ± 2 <sup>a,b</sup>

Mesma letra na mesma coluna indica que não há diferença significativa entre os valores médios (Teste de Tukey, p<0,05).



#### 4.4- Propriedades adicionais das telas recobertas via *electrospinning*

A partir dos resultados discutidos no item 4.3, é possível inferir que a utilização das condições determinadas no ensaio 2F seria satisfatória para a obtenção de telas recobertas com propriedades morfológicas (fibras mais homogêneas e lisas) que são compatíveis com a aplicação em cirurgias de hérnia, enquanto as condições designadas no ensaio 1E resultaram em menores capacidades de absorção e perdas de massa em fluido corpóreo simulado, além de menores diâmetros médios das fibras e espessura da tela recoberta.

Dessa forma, foram estudadas propriedades adicionais do material na condição mais propícia para o recobrimento efetivo. As fibras formadas pelo processo de *electrospinning* foram tratadas com NaOH para a neutralização do ácido acético residual no ensaio 2F para análise de morfologia, e observou-se que as fibras fractais se tornaram horizontais e agregadas (Figuras 4.27 e 4.28). Nas Figuras 4.27 e 4.28 são apresentados resultados das análises por microscopias óptica e eletrônica de varredura da amostra 2F antes e depois da neutralização.

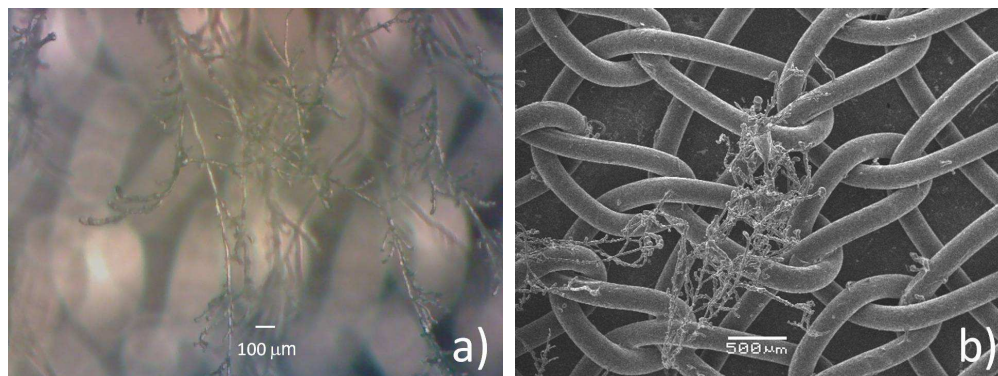


Figura 4.27- Microscopia óptica da amostra 2F sem tratamento com NaOH (a) e microscopia eletrônica de varredura (b)

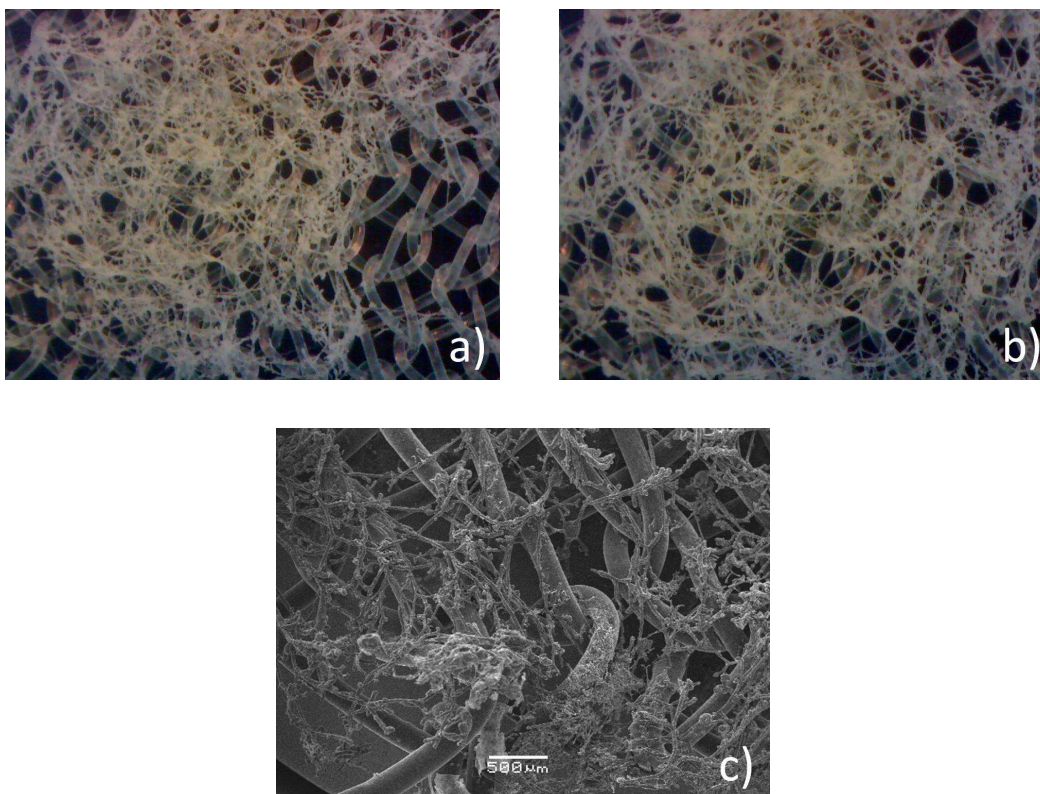


Figura 4.28- Imagens da amostra 2F referentes às microscopias ópticas (a e b) e eletrônica de varredura (c) da amostra da amostra 2F tratada com NaOH.

Através das Figuras 4.27 e 4.28, é possível perceber que a neutralização das amostras permitiu que ocorressem interações entre as fibras, formando uma rede mais compacta sobre o biomaterial somente em uma de suas faces. As ligações podem ter se formado pela alteração do balanço de cargas no sistema, permitindo que os grupamentos  $-OH$  do PEG interagissem com os grupamentos  $-NH_2$  da quitosana e que pontes de hidrogênio auxiliassem na estabilização do sistema. Destaca-se que nos ensaios anteriores de análise de morfologia as amostras não foram neutralizadas para que se preservassem a sua estrutura original, visto que há alteração visível após a imersão em NaOH, havendo compactação e interação entre as fibras.

Em linhas gerais, os materiais obtidos a partir da deposição via *electrospinning* apresentaram espessuras e massas de polímeros utilizadas menores que as obtidas para o recobrimento por imersão da tela. Esta última abordagem apresentou-se como uma

alternativa viável para minimizar os problemas de aderência verificados atualmente nas cirurgias de reparo de hérnia, uma vez que o recobrimento é de realização mais simples e rápida e que o dispositivo não apresentou aumento significativo de espessura, indicando que a implantação do conjunto não causaria desconforto ou exacerbaria a reação inflamatória naturalmente causada pela tela. Nota-se que o recobrimento pela abordagem do *electrospinning* conduz ao depósito de um emaranhado de fibras sobre a tela. Como não se avaliou *in vivo* o conjunto tela/recobrimento resultante de *electrospinning* quanto à eficácia na presença de adesão, não se sabe se o recobrimento com fibras emaranhadas será efetivo.

A deposição de fibras sobre a tela de poli(propileno) não alterou a capacidade de absorção de fluido corpóreo simulado da malha polimérica; no entanto, maiores valores dessa característica foram observados para recobrimentos com maiores massas de quitosana e de PEG. Já em relação à perda de massa, ambos os recobrimentos apresentaram-se estáveis, com baixas perdas percentuais.

Um ponto em comum entre as duas técnicas foi a associação do recobrimento em apenas uma das faces da tela. Esse fato constitui-se como uma vantagem na confecção do material, principalmente quando ocorre sem perda das características desejáveis do poli(propileno). Este biomaterial quando implantado nos tecidos deve exercer o chamado “efeito velcro” que promove a integração do material aos tecidos hospedeiros por meio da permeação dos monofilamentos da tela pelo tecido fibroso. Entretanto, os mesmos fatores que concorrem para a formação adequada deste tecido também contribuem significativamente para a formação de feixes fibrosos anormais que caracterizam as aderências peritoniais. Assim, a face recoberta, voltada ao peritônio, preveniria tais reações e a necessidade de segundas cirurgias, que podem ser avaliadas através de testes *in vivo*.

## 5 CONCLUSÕES

A realização deste trabalho permitiu que se chegasse às seguintes conclusões:

1) O uso da quitosana associada ou não ao PEG na forma de filme pouco espesso para o recobrimento de telas de poli(propileno) por imersão mostrou ser uma alternativa relevante para minimizar os problemas de aderência verificados atualmente nas cirurgias de reparo de hérnia, uma vez que o dispositivo não apresentou espessura elevada, indicando que a implantação do conjunto não causaria desconforto ou exacerbaria a reação inflamatória naturalmente causada pela tela. Observou-se que as telas recobertas por imersão com quitosana de baixa massa molar e PEG apresentaram espessuras menores que as recobertas utilizando quitosana de massa molar média, indicando que a substituição da segunda pela primeira pode gerar filmes mais finos sobre a tela de poli(propileno).

3) Resultados dos ensaios de perda de massa e de capacidade de absorção permitiram afirmar que a tela recoberta com quitosana de ambas as massas molares associada ou não ao PEG é estável, isto é, não houve perda de massa apreciável durante sete dias, período em que normalmente ocorre a formação das aderências peritoniais.

4) Nas seguintes condições de operação do processo tem-se o recobrimento dos substratos utilizados por *electrospraying* ao invés de *electrospinning*: agulha de 21G, tensão de 15 kV, vazão de 1 mL/h, distância de 7,5 cm entre agulha e coletor, concentrações de 1,6% de quitosana QB e de 2,5% de PEG e umidade relativa abaixo dos 50%.

5) A substituição da quitosana de massa molar média pela quitosana de massa molar baixa favoreceu a obtenção de estruturas fibrosas no processo de *electrospinning*.

6) A utilização de menores concentrações de PEG resultou em processos combinados de *electrospinning* e *electrospraying*, com a formação de depósitos sobre as fibras e maiores diâmetros de fibras. A aproximação da agulha ao coletor resultou em

fibras com aspecto irregular, havendo relação direta do diâmetro médio das fibras com a variação da distância. Concluiu-se, a partir do estudo da vazão, que a sua diminuição gerou fibras mais finas e mais homogêneas, havendo diminuição dos defeitos em relação às oriundas de vazões mais elevadas. Já a adição de surfatante à solução de quitosana e PEG resultou em fibras porosas. No entanto, não foi observada relação direta entre a concentração de Pluronic F68 em solução e o diâmetro das fibras obtidas.

7) A deposição de fibras sobre a tela de poli(propileno) não alterou a capacidade de absorção de fluido corpóreo simulado da malha polimérica (de 0,17 a 0,36 g de FCS por grama de conjunto); no entanto, maiores valores dessa característica foram observados para recobrimentos com maiores massas de quitosana e de PEG no recobrimento por imersão (0,59 g/g). Já em relação à perda de massa, obteve-se valores para os conjuntos tela e recobrimento variando entre 4,80 a 9,23%, enquanto por imersão obteve-se perda de massa de 8,91%. Porém, a análise da estimativa das perdas de massa levando em consideração somente o recobrimento via *electrospinning* apresentou valores entre 14,40 e 27,69%, o que permite deduzir que, apesar da pequena massa de recobrimento, houve relativa estabilidade dos conjuntos formados.

### 5.1 Sugestões para trabalhos futuros

Sugere-se, a partir dos resultados e conclusões obtidas no presente trabalho, estudos enfocando os seguintes aspectos.

1. Otimização do sistema de deposição por *electrospinning* com temperaturas e umidades relativas controladas, para se modular as características do material depositado através também desses parâmetros ambientais;
2. Estudo do crescimento de células animais *in vitro* na superfície das telas recobertas por quitosana e PEG via *electrospinning*;
3. Avaliação *in vivo* detalhada do comportamento das telas recobertas por ambas as técnicas utilizadas no trabalho, a fim de se observar as diferenças de resposta biológica em função das propriedades estruturais do material;

4. Aprimoramento do sistema operacional de deposição de fibras, através do aumento da automatização;
5. Estudo de outras espécies plastificantes, além do polietileno glicol, que não alterem a absorção biológica do recobrimento dos dispositivos destinados à utilização como barreira física;
6. Utilização de diferentes padrões de movimento para o alinhamento das fibras depositadas.
7. Realização de ensaios in vitro a temperaturas superiores a 37°C para analisar o comportamento do material em estado febril simulado.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alemdaroğlu, C.; Değim, Z.; Celebi, N, Zor, F.; Oztürk, S.; Erdoğan. D; An investigation on burn wound healing in rats with chitosan gel formulation containing epidermal growth factor. *Burns*, v. 32(3), p. 319-327, 2006.
2. Amir, S., Aishah, S., Ali, H., Mohamed, N.S.B., Studies of fractal growth patterns in poly (ethylene oxide) and chitosan membranes. *Ionics*, v. 17(2), p. 121-125, 2010.
3. Avital, S.; Bollinger, T. J.; Wilkinson, J. D.; Marchetti, F.; Hellinger, M. D.; Sands, L. R. Preventing intra-abdominal adhesions with polylactic acid film. *Diseases of the Colon & Rectum*, v. 48(1), p. 153-157, 2005.
4. Azevedo, V. V. C.; Chaves, S. A.; Bezerra, D. C.; Lia Fook, M. V., Costa, A. C. F. M.; Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v.2.3, p. 27-34, 2007.
5. Bassini, E.; Nuovo metodo per la cura radicale dell'Ernia inguinale. *Atti del Congresso. Associazione Medica Italiana*, 1887.
6. Baumgarten, P. K. Electrostatic Spinning of Acrylic Microfibers, *Journal of Colloid & Interface Science*, p. 36, pp. 75-79, 1971.
7. Bellón, J. M.; García-Carranza, A.; Jurado, F.; García-Honduvilla, N.; Martin, A. C. S.; Buján, J. Peritoneal regeneration after Implant of a composite prosthesis in the abdominal wall. *World Journal of Surgery*, v. 25, p. 147-152, 2001.
8. Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J. M.; Felt, O.; Peppas, N. A.; Gurny, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan

hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 57, p. 19-34, 2004(a).

9. Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J. M.; Felt, O.; Gurny, R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 57, p. 35-52, 2004(b).
10. Berkland, C, Pack, D. W., Kim, K. Controlling surface nano-structure using flow-limited field-injection electrostatic spraying (FFESS) of poly(D,L-lactide-coglycolide). *Biomaterials*. v. 25, p. 5649-5658, 2004.
11. Bergshoef, M. M. and Vancso, G.J., Transparent Nanocomposites with Ultrathin Electrospun Nylon-4,6 Fiber Reinforcement. *Advanced Materials*. v. 11, p. 1362-1365, 1999.
12. Bhattarai, N.; Edmondson, D.; Veisoh, O.; Matsen, F.A.; Zhang, M. Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility, *Biomaterials*, v. 26, p. 6176–6184, 2005.
13. Binda, M. M.; Molinas, C. R.; Koninckx, P. R. Reactive oxygen species and adhesion formation. *Human Reproduction*, v. 18(12), p. 2503-2507, 2003.
14. Bognitzki, M., Czado, W., Frese, T., Schaper, A., Hellwig, M., Steinhart, M., Greiner, A. and Wendorff, J. H. Nanostructured Fibers via Electrospinning. *Advanced Materials*. v. 13, p. 70-72, 2001.
15. Brown, R., DeYoung, G., Schuessler, A. J., Schob, G., Olantuji, M.G., Reynolds, E., Continuous Process for Electropolishing Surgical Needles, Patente Americana 5.935.411, 1999.
16. Canella, A. M. N. C.; Garcia, R. B. Caracterização de Quitosana por Cromatografia de permeação em Gel - Influência do Método de Preparação e do Solvente. *Química Nova*, v. 24, 2001.



17. Cárdenas, A.; Arguelles-Monal, W.; Goycoolea, F.M.; Higuera-Ciapara, I.; Peniche, C. Difusión Through Membranes of the Polyelectrolyte Complex of Chitosan and Alginate. *Macromolecule Bioscience*, v.3 (10), 2003.
18. Cardinal Health, disponível em [http://www.cardinal.com/us/en/distributedproducts/ASP/PHSM.asp?cat=med\\_surg](http://www.cardinal.com/us/en/distributedproducts/ASP/PHSM.asp?cat=med_surg), acesso em junho/2011.
19. Casper, C.L., Stephens, J.S., Tassi, N.G., Chase, D.B. and Rabolt, J.F. Controlling surface morphology of electrospun polystyrene fibers: Effect of humidity and molecular weight in the electrospinning process, *Macromolecules*. v. 37, pp. 573-578, 2004.
20. Dallan, P. R. M. Preparação e caracterização de membranas de quitosana e alginato para aplicação na terapia de lesões. *Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas*, 2005.
21. Deitzel, J. M.; Kleinmeyer, J.; Harris, D.; BeckTan N. C., The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles, *Polymer*, 42, 261, 2001.
22. Desai, K.; Kit, K.; Li, J.; Zivanovic, S. Morphological and surface properties of electrospun chitosan nanofibers. *Biomacromolecules*, v. 9 (3), p. 1000-1006, 2008.
23. Detsi, A., Afantitis, A., Athanasellis, G., Markopoulos, J., Igglessi-Markopoulou, O., Skylaris, C.K., Cyclisation of Novel Amino Oxo Esters to Tetramic Acids – Density Functional Theory Study of the Reaction Mechanism, *European Journal of Organic Chemistry*, V. 2003, p. 4593–4600, 2003.

24. De Vrieze, S., Westbroek, P., van Camp, T., van Langenhove, L. Electrospinning of chitosan nanofibrous structures: feasibility study. *Journal of Materials Science*, v. 42, p. 8029–8034, 2006.
25. Diamond, M.; Luciano, A.; Johns, A.; Dunn, R.; Young, P.; Bieber, E. Reduction of postoperative adhesions by N,O-carboxymethylchitosan: a pilot study. *Fertility and Sterility*, v. 8, p. 631 – 636, 2003.
26. Ding, B., Yamazaki, M. and Shiratori, S. Electrospun fibrous polyacrylic acid membrane-based gas sensors, *Sensors and Actuators B-Chemistry*. v. 106, pp. 477-483, 2004.
27. Dinsmore, R. C.; Calton Junior W. C.; Harvey, S.B.; Blaney, M.W. Prevention of adhesions to polypropylene mesh in a traumatized bowel model. *Journal of the American College of Surgeons*, v. 191(2), p. 131-136, 2000.
28. Duan, B., Dong C., and Xiaoyan Y. "Electrospinning of Chitosan Solutions in Acetic Acid with Poly(ethylene Oxide)." *Biomaterials Science*, v. 15.6, p. 797-811. 2004.
29. Felemovicius, I., Bonsack, M. E., Hagerman, G., Delaney, J. P., Prevention of Adhesions to Polypropylene Mesh, *Journal of American College of Surgeons*, v. 198, p 543-548, 2004
30. Felt, O.; Furrer, P.; Mayer, J. M.; Plazonnet, B.; Buri, P.; Gurny, R. Topical use of chitosan in ophthalmology: tolerance assessment and evaluation of precorneal retention. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 180(2), p. 185-193, 1999.
31. Fong, H.; Chun, I. D. & Reneker, H. "Beaded nanofibers formed during electrospinning", *Polymer* , v.40, p.4585-4592, 1999.
32. Formhals, A, Process and apparatus for preparing artificial threads, Patente Americana 1.975.504, 1934.

33. Formhals, A, Method and apparatus for spinning, Patente Americana 2.160.962, 1939.
34. Formhals, A., Artificial thread and method of producing same, Patente Americana 2.187.306, 1940.
35. Goissis, G., Suzigan, S., Parreira, D.R., Raymundo, S.R.O., Chaves, H., Hussain, K.M.K. Malhas de poli(propileno) recobertas com colágeno polianiónico ou com dupla camada com poli(cloreto de vinila) para reconstrução da parede abdominal. *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica*, v.17, n.2, p.69-78, 2001.
36. Goldstein, H. S. Selecting the right mesh. *VAMC and University of Miami School of Medicine, Department of Surgery, Miami, USA*, 1998.
37. Greca, F.H.; Paula, J.B.; Biondo-Simões, M.L.P.; Costa, F.D.; Silva, A.P.G.; Time, S.; Mansur, A. The influence of differing pore sizes on the biocompatibility of two polypropylene meshes in the repair of abdominal defects. *Hernia*, v. 5, p. 59-64, 2001.
38. Hayati, I.; Bailey, A. I.; Tadros, T. F.; Investigation into the mechanisms of electrohydrodynamic spraying of liquids. 1. Effects of electric-field and the environment on pendant drops and factors affecting the formation of stable jets and atomization; *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 117,p. 205-217, 1987.
39. Helmus, M. N. e Tweden K, "Materials Selection", In: *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering*, Part A, Vol.1, pp.27-59, 1995.
40. Howling, G.I., Dettmar, P.W., Goddard, P.A., Hampson, F.C., Dornish, M., Wood, E.J. The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro. *Biomaterials*, v. 22, p. 2959–2966, 2001.

41. Hsu, C. M., Shivakumar, S. N,N-Dimethylformamide Additions to the Solution for the Electrospinning of Poly( $\epsilon$ -caprolactone) Nanofibers. *Macromolecular Materials and Engineering*. v. 289, pp. 334-340, 2004.
42. Ishihama, Y., Katayama, H., Asakawa, N, Oda, Y., Highly robust stainless steel tips as microelectrospray emitters. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 16, p. 913-918, 2002.
43. Jacobs, V, Anandjiwala, RD and Maaza, M. Influence of electrospinning parameters on the structural morphology and diameter of electrospun nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 115(5), p. 3130-3136, 2010.
44. Jarusuwannapoom, T., Hongrojjanawiwat, W., Jitjaicham, S., Wannatong, L., Nithitanakul, M., Pattamaprom, C, Koombhongse, P., Rangkupan, R., Supaphol, P. Effect of solvents on electro-spinnability of polystyrene solutions and morphological appearance of resulting electrospun polystyrene fibers. *European Polymer Journal*. v. 41, pp. 409-421, 2005.
45. JE Hospitalar, [www.jehospitalar.com.br](http://www.jehospitalar.com.br), acesso em junho/2011.
46. Jung, Y.H., Kim, H.Y., Lee, D.R., Park, S.Y., Characterization of PVOH Nonwoven Mats Prepared from Surfactant-Polymer System via Electrospinning, *Macromolecular Research*, Vol. 13, No. 5, pp 385-390, 2005.
47. Karmarkar, A.B., Gonjari I.D., and Hosmani A.H., Poloxamers and their applications, *Pharmainfo.net*, 2008.
48. Kessick, R., Fenn, J., Tepper, G. The use of AC potentials in electro spraying and electrospinning processes. *Polymer*. 45, pp. 2981-2984, 2004.

49. Khan, T. A.; Peh, K. K.; Ch'ng, H. S. Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v.3(3), p. 303-311, 2000.
50. Khire T. S., Kundu J., Kundu S.C., Yadavalli, V.K., The fractal self-assembly of the silk protein sericine. *Soft Matter*, v. 6, p. 2066-2071, 2010.
51. Khor, E.; Lim, L.Y., Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*, v. 24, p. :2339-2349, 2003.
52. Kokubo, T.; Kushitani, H.; Sakka, S.; Kitsugi, T.; Yamamuro, T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 24, p. 721-734, 1990.
53. Kondo, T.; Sawatari, C. Intermolecular hydrogen bonding in cellulose/poly(ethylene oxide) blends: thermodynamic examination using 2,3-di-O- and 6-O-methylcelluloses as cellulose model compounds. *Polymer*, v. 35, p. 4423-4428, 1994.
54. Kriegel, C.; Kit, K. M.; McClements, D. J.; Weiss, J. Electrospinning of chitosan–poly(ethylene oxide) blend nanofibers in the presence of micellar surfactant solutions. *Polymer*, v. 50, p. 189–200, 2009.
55. Langer C, Neufang T, Kley C, Liersch T, Becker H. Central mesh recurrence after incisional hernia repair with Marlex – are the meshes strong enough? *The Journal of Hernias and Abdominal Wall*. v.5, p. 164-167, 2001.
56. Leeuwenburgh, S. C.G.; Malda, J.; Rouwkema, j.; Kirkpatrick, C. J.; Williams, D. F. Trends in biomaterials research: An analysis of the scientific programme of the World Biomaterials Congress 2008. *Biomaterials*, v. 28, p. 3047-3052, 2008.

57. Li, J., Kao, W.J., Synthesis of polyethylene glycol (PEG) derivatives and PEGylated-peptide biopolymer conjugates, *Biomacromolecules*, v. 4, p. 1055-67, 2003.
58. Liu, Y. He, J. H. Yu, J. y. Zeng, H., Controlling numbers and sizes of beads in electrospun nanofibers, *Polymer International*, v. 57, p. 632-636, 2008.
59. McCann J.T., Li D., and Xia. Y, Electrospinning of nanofibers with core–sheath, hollow, or porous structures. *Journal of Material Chemistry* v. 15 p. 735–8, 2006.
60. Macleod, G. S.; Collett, J. H.; Fell, J. T. The potential use of mixed films of pectin, chitosan and HPMC for bimodal drug release. *Journal of Controlled Release*, v. 58, p. 303-310, 1999.
61. Macías, E. D., Chacko, A., Ferraris J.P., and Balkus,Jr., K. J, Electrospun mesoporous metal oxide fibers, *Microporous Mesoporous Materials*. v.86, p. 1-13, 2003.
62. Mandelbrot, B., *The Fractal Geometry of Nature*. W. H. Freeman. San Francisco. Mellars, 1970 p.
63. Mao, J. S.; Feng liu, H.; Yin, Y. J.; De Yao, K. The properties of chitosan-gelatin membranes and scaffolds modified with hyaluronic acid by different methods. *Biomaterials*, v .24, p. 1621-1629, 2003.
64. Matthews, J.A., Wnek, G.E., Simpson, D.G. and Bowlin, G.L. Electrospinning of collagen nanofibers. *Biomacromolecules*, 3, pp. 232-238, 2002.
65. Megelski, S., Stephens, J.S., Chase, D.B. and Rabolt, J.F. Micro- and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers, *Macromolecules*. v. 35, pp. 8456-8466, 2002.

66. Merck Technical Data Sheet Metanol, <http://www.bioinfo.ulusofona.pt/Site/4/tecn/methanoltecn.pdf>, acesso em junho, 2011a.
67. Merck Technical Data Sheet Piridine, [www.bioinfo.ulusofona.pt/Site/4/tecn/piridine.pdf](http://www.bioinfo.ulusofona.pt/Site/4/tecn/piridine.pdf), acesso em junho, 2011b.
68. Mi, F. L.; Wu, Y. B.; Shyu, S. S.; Chao, A. C.; Lai, J. Y.; Su, C. C. Asymmetric chitosan membranes prepared by dry/wet phase separation: a new type of wound dressing for controlled antibacterial release. *Journal of Membrane Science*, v. 212, p. 237-254, 2003.
69. Mi, F. L.; Shyu, S. S.; Wu, Y. B.; Lee, S. T.; Shyong, J. Y.; Huang, R. N. Fabrication and characterization of sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing. *Biomaterials*, v. 22, p. 165-173, 2001.
70. Mhiochain, T.R.N, Coey, J.M.D. Chirality of electrodeposits grown in a magnetic field 529. *Physical Review*, v. 69(6), p. 061404.1-10, 2004.
71. Minossi, J. G., Silva, A. L., Spadella, C. T., O uso da prótese na correção de hérnias da parede abdominal é um avanço, mas o seu uso indiscriminado, um abuso, *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, v. 35, p. 416-424, 2008.
72. Mit-uppatham, C, Nithitanakul, M. and Supaphol, P. Ultrafine Electrospun Polyamide-6 Fibers: Effect of Solution Conditions on Morphology and Average Fiber Diameter. *Macromolecular Chemistry and Physics*. 205, pp. 2327-2338, 2004.
73. Mo, X. M., Xu, C. Y., Kotaki, M, Ramakrishna, S. Electrospun P(LLA-CL) nanofiber: a biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation. *Biomaterials*. v. 25, pp. 1883-1890, 2004.
74. Muzzarelli, R.; Baldassarre, V.; Ferrara, P.; Biagini, G. Biological activity of chitosan:: ultrastructural study. *Biomaterials*, v. 9, p. 247-252, 1988.

75. Niekraszewicz, A. Chitosan medical dressings. *Fibres & Textiles in Eastern Europe*, v. 13(6), p. 16-18, 2005.
76. Nyhus, L. M., Ubiquitous use of prosthetic mesh in inguinal hernia repair: the dilemma. *The Journal of Hernias and Abdominal Wall*, v. 4, p. 184-186, 2000.
77. Paul, W.; Sharma, C. P. Chitosan and alginate wound dressings: a short review. *Trends in Biomaterials & Artificial Organs*, v. 18, p. 18-23, 2004.
78. Paulo, N. M.; Menezes, L. B.; Silva, M. S. B.; Miguel, M. P.; Moraes, A. M.; Rodrigues, A .P.; Lima, F. G.; Faria, A. M. Use of chitosan membrane associated with polypropylene mesh to prevent peritoneal adhesion in rats. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 91, p. 221-227, 2009.
79. Pereira, V.F.; Pinheiro, L.C., Preparação e caracterização de um filme à base de quitosana associado à tela de poli(propileno) para prevenção de aderências peritoneais, Trabalho de Conclusão de Curso, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2008.
80. Prego, M., Cabeza, O., Carballo, E., Franjo, C. F. and Jimenez, E. Measurements and interpretation of the electrical conductivity of 1-alcohols from 273K to 333K. *Journal of Molecular Liquids* V. 89, pp. 233-238, 2000.
81. Queen, H.A. Electrospinning Chitosan-based Nanofibers for Biomedical Applications. Dissertação de Mestrado, North Carolina State University, EUA, 2006.
82. Ramakrishna, S., Fujihara, K., Teo, W., e Ma, Z., *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers*, World Scientific, Singapore, 2005, 382 p.



83. Ribeiro, M. Z. Extração de glicose-6-fosfato desidrogenase em sistemas de duas fases aquosas. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica), Universidade de São Paulo; 138 p; 2001.
84. Rodrigues, A. P.; Sanchez, E. M. S.; Costa, A. C.; Moraes, A. M. The influence of preparation conditions on the characteristics of chitosan-alginate dressings for skin lesions. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 109, p. 2703-2710, 2008.
85. Rutledge, G. C, Li, Y., Fridrikh, S., Warner, S. B., Kalayci, V. E. and Patra, P. Electrostatic Spinning and Properties of Ultrafine Fibers, *National Textile Center, 2000 Annual Report (M98-D01)*, National Textile Center, pp. 1-10, 2000.
86. Santos, A.C., Bertassoli, B.M., Oliveira, V.C., Souza, A.F., Rosa, R.A., Carvalho, A.F., Mançaneres, C.A.F., Morfologia da árvore brônquica de pulmões de quatis (*Nasua nasua*, Linnaeus, 1966), *Biotemas, UFSC*, v. 24, p. 75-82, 2011.
87. Sigma-Aldrich. Pluronic®F68 P1300, Disponível em: [http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=pt&N4=P1300|SIGMA&N5=SEARCH\\_CONCAT\\_PNO|BRAND\\_KEY&F=SPEC](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=pt&N4=P1300|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC). Acesso em Junho/2011a.
88. Sigma-Aldrich Data Sheet Disponível em <http://www.sigmaaldrich.com/chemistry/solvents/2propanol-center.html>, acesso em junho de 2011b.
89. Silva, M. H. P., Apostila de Biomateriais. Disponível em: [http://200.19.182.147/Materiais/Arquivos\\_Biomateriais.html](http://200.19.182.147/Materiais/Arquivos_Biomateriais.html), acesso em junho/2011.

90. Son, W. K., Youk, J. H., Lee, T. S. and Park, W. H. The effects of solution properties and polyelectrolyte on electrospinning of ultrafine poly(ethylene oxide) fibers. *Polymer*. v. 45, pp. 2959-2966, 2004a.
91. Son, W. K., Youk, J. H. and Park, W. H. Preparation of Ultrafine Oxidized Cellulose Mats via Electrospinning. *Biomacromolecules*. v. 5, pp. 197-201, 2004b.
92. Song, J.; Chang, H. S.; Park, Y. B.; lee, S. H.; Yoo, N. C.; Lee, J. D.; Kim, K. H.; Lee, S. K. A phase I/IIa study on intra-articular injection of holmium-166-chitosan complex for the treatment of knee synovitis of rheumatoid arthritis. *European Journal of Nuclear Medicine*, v. 28(4), p. 489-497, 2001.
93. Spasova, M., N. Manolova, D. Paneva, and I. Rashkov. "Preparation of Chitosan-containing Nanofibres by Electrospinning of Chitosan/poly(ethylene oxide) Blend Solutions." *E-Polymers* 2004: Art. No. 056, 2004.
94. Stephens, J. S., Chase, D. B. and Rabolt, J. F. Effect of the Electrospinning Process on Polymer Crystallization Chain Conformation in Nylon-6 and Nylon-12. *Macromolecules*. v. 37, pp. 877-881, 2004.
95. Subbiah, T., Bhat, G. S., Thock, R. W., Parameswaran, S. S., Ramkumar, S. S., Electrospinning of Nanofibers, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 96, p. 557-569, 2005.
96. Subramanian, A., D. Vu, G. F. Larsen, and H. Y. Lin. "Preparation and Evaluation of the Electrospun Chitosan/PEO Fibers for Potential Applications in Cartilage Tissue Engineering." *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* v. 16.7 p. 861-873, 2005.
97. Sulaiman, H.; Gabella, G.; Davis, C.; Mutsaers, S. E.; Boulos, P.; Laurent, G. J.; Presence and distribution of sensory nerve fibers in human peritoneal adhesions. *Annals of Surgery*, v. 234(2), p. 256-261, 2001.

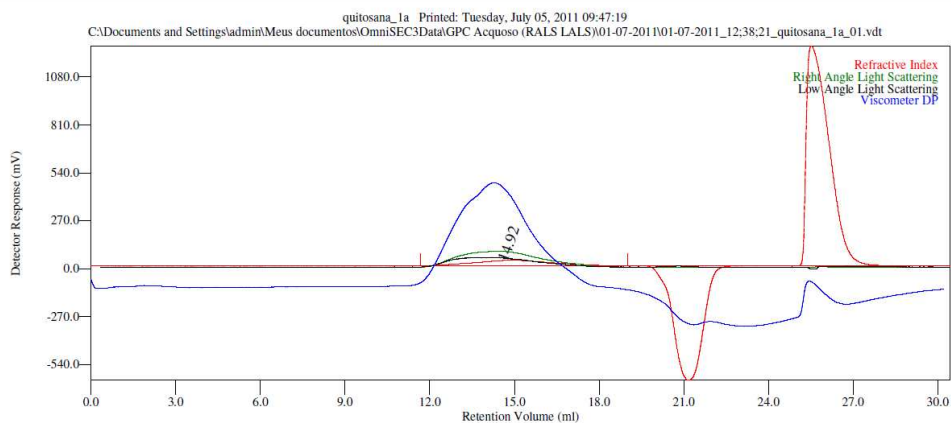
98. Suzuki, T.; Mizushima, Y. Characteristics of silica-chitosan complex membrane and their relationships to the characteristics of growth and adhesiveness of L-929 cells cultured on the biomembrane. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 84(2), p. 128-132, 1997.
99. Srinivasarao, M., Collings, D., Philips, A. and Patel. Three-Dimensionally Ordered Array of Air Bubbles in a Polymer Film. *Science*. p. 292, pp. 79-83, 2001.
100. Taylor, G. I.; Electrically Driven Jets. *Proceedings of the Royal Society A*, v. 313, p. 453. 1969.
101. Teo, W. E. e Ramakrishna, S., A review on electrospinning design and nanofibre assemblies, *Nanotechnology*, v. 17, p. 89–106, 2006.
102. Theron, S. A., Zussman, E. And Yarin, A. L. Experimental investigation of the governing parameters in the electrospinning of polymer solutions. *Polymer*, v. 45, pp. 2017-2030, 2004.
103. Tsing, P., *Electrospinning natural polymers for tissue engineering applications*, Tese de Mestrado, University of Pennsylvania.
104. Vondran, J. L.; Sun, W.; Schauer, C. L. Crosslinked, electrospun chitosan–poly(ethylene oxide) Nanofiber Mats. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 109, p. 968–975, 2008.
105. Wang, L.; Khor, E.; Lim, L.Y. Chitosan-alginate-CaCl<sub>2</sub> system for membrane coat application. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 90, p. 1134-1142, 2001.
106. Wang, L.; Khor, E.; Wee, A.; Lim, L.Y. Chitosan-alginate PEC membrane as wound dressing: Assessment of incisional wound healing. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 63, p. 610-618, 2002.

107. Wannatong, L., Sirivat, A. and Supaphol, P. Effects of solvents on electrospun polymeric fibers: preliminary study on polystyrene. *Polymer International*, p. 53, 1851-1859, 2004.
108. Williams, D.F. Definitions in biomaterial. Proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials. Chester: Elsevier, 1987.
109. Xia Y. e Li, D., Direct fabrication of composite and ceramic hollow nanofibers by electrospinning, *Nano Letters*, v. 4, p. 933-938, 2004.
110. Yacoob, C., Liu, W., and Adanur, S., "Properties and Flammability of Electrospun PVA and PVA/Laponite® Membranes", *Journal of the Industrial Textiles*, v. 40, pp. 33-48, 2010.
111. Yang, Q. B., Li, Z. Y., Hong, Y. L., Zhao, Y. Y., Qiu, S. L., Wang, C. and Wei, Y. Influence of Solvents on the Formation of Ultrathin Uniform Poly(vinyl pyrrolidone) Nanofibers with Electrospinning. *I. Polym. Sci. Pol. Phys.* v. 42, pp. 3721-3726, 2004.
112. Yao, L., Haas, T.W., Guiseppi-Elie, A., Browlie, G.L., Simpson, D.G., Wnek, G.E., *Electrospinning* and stabilization of fully hydrolyzed poly(vinyl alcohol) fibers. *Chem Mater*, v. 15, p.1860–1864, 2003.
113. Yoshimoto, H., Shin, Y. M., Terai, H. and Vacanti, J. P. A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering. *Biomaterials*. v. 24, pp. 2077-2082, 2003.
114. You, Y., Min, B. M, Lee, S. J., Lee, T. S. and Park, W. H. In Vitro Degradation Behavior of Electrospun Polyglycolide, Polylactide, and Poly(lactide-coglycolide). *J. Appl. Polym. Sci.* 95, pp. 193-200, 2005.
115. Zhang Z.L., Xu S.W., Zhou X.L. Preventive effects of chitosan on peritoneal adhesion in rats. *World J Gastroenterol*; v. 12 p. 4572–4577, 2006.

116. Zhao, S. L., Wu, X. H., Wang, L. G. and Huang, Y. Electrospinning of Ethyl-Cyanoethyl Cellulose/Tetrahydrofuran Solutions. *J. Appl. Polym. Sci.* 91, pp. 242-246, 2004.
117. Zhou, J.; Elson, C.; Lee, T. D. G. Reduction in postoperative adhesion formation and re-formation after an abdominal operation with the use of N, O – Carboxymethyl Chitosan. *Surgery*, v. 135(3), p. 307-312, 2004.
118. Zhong, X. H., Kim, K. S., Fang, D. F., Ran, S. F., Hsiao, B. S. and Chu, B.; Structure and process relationship of Electrospun bioabsorbable nanofiber membranes. *Polymer*. 43, pp. 4403-4412, 2002.

## 7 ANEXOS

## Análise de GPC da quitosana de massa molar média da Sigma-Aldrich®

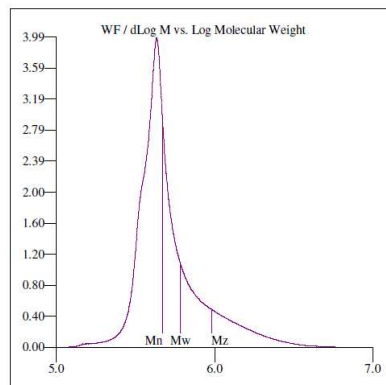
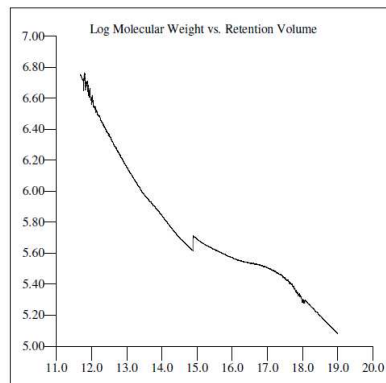


## Multi-Detectors - Homopolymers : Results

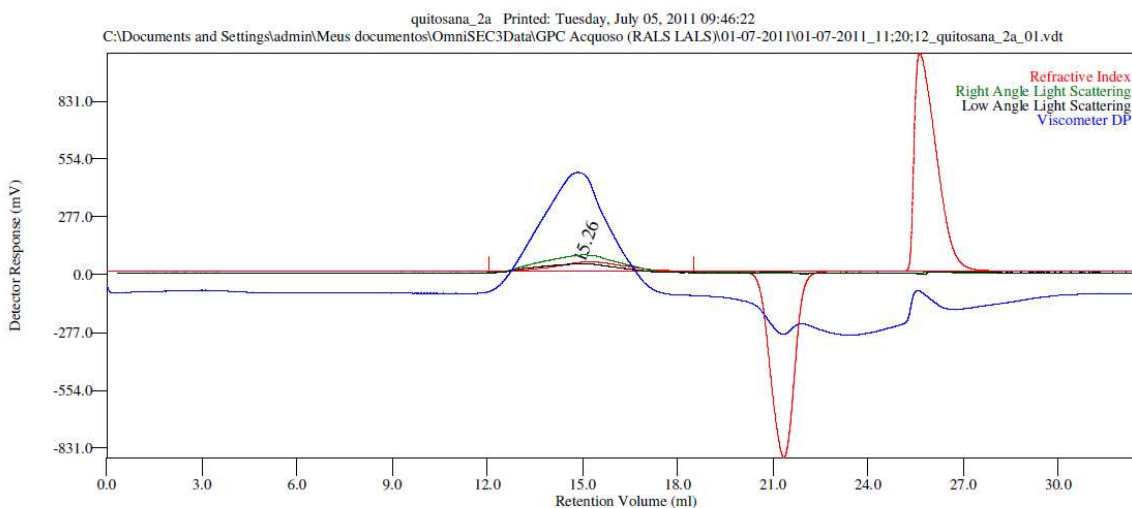
Peak RV - (ml)	14.924
Mn - (Daltons)	469.613
Mw - (Daltons)	606.777
Mz - (Daltons)	951.071
Mp - (Daltons)	503.916
Mw / Mn	1.292
Percent Above Mw:	0
Percent Below Mw:	0
IV - (dl/g)	9.5104
Rh - (nm)	43.124
Rg - (nm)	26.696
Wt Fr (Peak)	1.000
Mark-Houwink a	0.964
Mark-Houwink logK	-4.565
Branches	0.000
Branch Freq.	0.000
RI Area - (mVml)	98.03
UV Area - (mVml)	0.00
RALS Area - (mVml)	302.14
LALS Area - (mVml)	183.92
DP Area - (mVml)	1799.73

Sample Parameters	Input	Calculated
Sample Conc - (mg/ml)	2.500	0.000
Sample Recovery (%)	0.000	124.951
dn/dc - (ml/g)	0.1350	0.0000
dA/dc - (ml/g)	1.0000	0.0000

Annotation	
Method File	a-0000.vcm
Limits File	1-07-2011_12:38:21_quitosana_1a_01-a-0000-0001.lim
Date Acquired	Jul 01, 2011 - 12:38:21
Solvent	AcOH 0.33- NaOH 0.1
Acquisition Operator	admin : Administrator
Calculation Operator	admin : Administrator
Column Set	2 Ultrahydrogel linear
System	GPC Acquoso (RALS/LALS)
Flow Rate - (ml/min)	0.800
Inj Volume - (ul)	199.0
Volume Increment - (ml)	0.00266
Detector Temp. - (deg C)	40.0
Column Temp. - (deg C)	40.0
OmniSEC Build Number	224



## Análise de GPC da quitosana de massa molar baixa da Cognis®



### Multi-Detectors - Homopolymers : Results

Peak RV - (ml)	15.264
Mn - (Daltons)	382,035
Mw - (Daltons)	447,511
Mz - (Daltons)	619,409
Mp - (Daltons)	360,302
Mw / Mn	1.171
Percent Above Mw:	0 0.000
Percent Below Mw:	0 0.000
IV - (dl/g)	7.7967
Rh - (nm)	36.682
Rg - (nm)	No Calc
Wt Fr (Peak)	1.000
Mark-Houwink a	1.056
Mark-Houwink logK	-5.040
Branches	0.000
Branch Freq.	0.000
RI Area - (mvm)	113.26
UV Area - (mvm)	0.00
RALS Area - (mvm)	243.62
LALS Area - (mvm)	129.09
DP Area - (mvm)	1470.38

Sample Parameters	Input	Calculated
Sample Conc - (mg/ml)	2.500	0.000
Sample Recovery (%)	0.000	144.368
dn/dc - (ml/g)	0.1350	0.0000
dA/dc - (ml/g)	1.0000	0.0000

Annotation	
Method File	a-0000.vcm
Limits File	1-07-2011_11:20:12_quitosana_2a_01-a-0000-0001.lim
Date Acquired	Jul 01, 2011 - 11:20:12
Solvent	AcOH 0.33- NaOH 0.1
Acquisition Operator	admin : Administrator
Calculation Operator	admin : Administrator
Column Set	2 Ultrahydrogel linear
System	GPC Acquoso (RALS/LALS)
Flow Rate - (ml/min)	0.800
Inj Volume - (ul)	199.0
Volume Increment - (ml)	0.00266
Detector Temp. - (deg C)	40.0
Column Temp. - (deg C)	40.0
OmniSEC Build Number	224

