UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia Mecânica

Milton Flavio de Macedo

Nanofibras de Polímeros Biocompativeis e Biorreabsorvíveis: Novos Métodos de Produção, Aperfeiçoamentos no Processo de Eletrofiação e Novas Aplicações na Área Médica

CAMPINAS
2022

Milton Flavio de Macedo

Nanofibras de Polímeros Biocompativeis e Biorreabsorvíveis: Novos Métodos de Produção, Aperfeiçoamentos no Processo de Eletrofiação e Novas Aplicações na Área Médica

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

Orientadora: Profa. Dra. Cecilia Amélia De Carvalho Zavaglia

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO(A) ALUNO MILTON FLAVIO DE MACEDO, E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. CECILIA AMÉLIA DE CARVALHO ZAVAGLIA

CAMPINAS
2022

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

M151n

Macedo, Milton Flavio de, 1956-
Nanofibras de polímeros biocompativeis e biorreabisorvíveis : novos métodos de produção, aperfeiçoamentos no processo de eletrofição e novas aplicações na área médica / Milton Flavio de Macedo. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica.

1. Nanofibras. 2. Nanoesferas. 3. Biomateriais. 4. Engenharia de tecidual. 5. Eletrofiação. I. Zavaglia, Cecília Amelia de Carvalho, 1954-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Mecânica. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Biocompatible and bioresorbable polymer nanofibers : New production methods, improvements in electrospinning process and new applications in medical area
Palavras-chave em inglês:
Nanofibers
Nanospheres
Tissue engineering
Electro-spinning
Biocompatibles
Área de concentração: Engenharia Mecânica
Titulação: Doutor em Engenharia Mecânica
Banca examinadora:
Ceciília Amélia de Carvalho Zavaglia
Marcos Akira D'Avila
Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Arnaldo Rodrigues dos Santos Junior
Andre Gustavo de Sousa Galdino
Data de defesa: 16-09-2018
Programa de Pós-Graduação: Engenharia Mecânica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)
- ORCID do autor: https://orcid.org/0000-0001-5781-3860
- Currículo Lattes do autor: http://lattes.cnpq.br/4668413285008979

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA

TESE DE DOUTORADO ACADÊMICO

Nanofibras de Polímeros Biocompativeis e Biorreabsorvíveis: Novos Métodos de Produção, Aperfeiçoamentos no Processo de Eletrofiação e Novas Aplicações na Área Médica

Autor: Milton Flavio de Macedo
Orientadora: Profa. Dra. Cecilia Amélia De Carvalho Zavaglia

A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Tese:

Profa. Dra. Cecilia Amélia De Carvalho Zavaglia
Faculdade de Engenharia Mecanica – Universidade Estadual de Campinas –UNICAMP

Dr. Marcos Akira D'Àvila
Faculdade de Engenharia Mecanica – Universidade Estadual de Campinas -UNICAMP

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Faculdade de Engenharia Mecanica – Universidade Estadual de Campinas -UNICAMP

Dr. Arnaldo Rodrigres dos Santos Junior
Centro de Ciências Naturais e Humanas – Universidade Federal do ABC

Dr. Andre Gustavo de Sousa Galdino
Departamento de Engenharia Mecânica- Instituto Federal do Espírito Santo

A Ata de Defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Campinas, 16 de Setembro de 2018

Dedicatória:

Aos meus pais, filhas, professores, amigos e parentes, que sempre acreditaram em meus sonhos.

A Júlio Verne, Artur Clark, Isaac Asimov, Jorge Lucas e Gene Roddenberry que me ensinaram a sonhar.

"Tem sido um longo caminho
Vindo de lá para cá
Tem sido um longo tempo
Mas minha hora está finalmente chegando
E eu vou ver meu sonho ganhar vida afinal
Vou tocar o céu
e eles não vão me segurar mais
Não eles não vão mudar o meu coração
Pois eu tenho fé em meu coração
E eu vou para onde meu coração me levar
Eu tenho fé para acreditar
Que eu posso fazer qualquer coisa
Eu tenho a força da alma
E ninguém vai me dobrar ou quebrar
Eu posso alcançar qualquer estrela
Eu tenho fé
Eu tenho fé
Em meu coração"

Tema de abertura de StarTrek Enterprise

Agradecimentos:

Aos Professores:

Cecilia Amélia De Carvalho Zavaglia

Marcos Akira D'Avila

Rubens Maciel Filho

Alexandre L.R. Oliveira

Carlos *Salles* Lambert

Aos Colegas e Amigos:

David Ramalho

Claudia Faria Ramalho

Lucas Correia

Rafael Bertolucci

Marcos Rivabem

Lais Pellizzer Gabriel

Patrícia Capellato

Ana Carolina Benatti

Ana Meloncelli

Rafael Antônio

Lucas TTO

Resumo

A eletrofiação, é uma técnica bastante antiga, inicialmente desenvolvida substituir a fabricação da seda, que fornece fios poliméricos de diametros de dimensões nanometricos e, por algum tempo, ficou bastante esquecida. Recentemente, com o desenvolvimento da nanotecnologia, esse processo ficou muito adequado para diversas aplicações tecnológicas, destacando-se a engenharia de tecidos. Essa ciência envolve o uso de tecnologias das ciências da vida, com as das ciências dos materiais. Portanto são produzidos através da eletrofiação scaffolds (arcabouços porosos) de polímeros ou compósitos biorreabsorvíveis, que podem ser semeados com células dos tecidos que se pretende regenerar. Através de condições corretas (temperatura, pH, nutrientes, marcadores celulares), o tecido se regenera, a medida em que o arcabouço *(scafold)* se degrada. O processo de eletrofiação convencional é pouco produtivo, pois possui uma única ponteira para saída do fio polimérico. Portanto, um dos principais objetivos deste trabalho foi projetar e construir um equipamento de eletrofiação mais produtivo e eficiente que o convencional. Foi utilizado o processo de manufatura aditiva de metais a laser (DMLS) para produzir a peça mais importante desse equipamento, que foi um cilindro com pirâmides ocas, de modo a que cada pirâmide fosse uma ponteira para a saída de nanofibras. Diversos acessórios foram desenvolvidos para o bom funcionamento do equipamento de eletrofiação. Alguns deles funcionaram muito bem, outros foram aperfeiçoados com o decorrer do trabalho. O equipamento avançado de eletrofiação funcionou bem, mas para uso contínuo, necessita de mais alguns aperfeiçoamentos. Foram feitas algumas comparações entre o funcionamento de eletrofiação convencional e o avançado. Verificou-se que a média dos diâmetros das nanofibras obtidas pelo equipamento avançado foi menor que a do convencional e que a quantidade de fibras obtidas foi muito maior. O segundo grande objetivo foi estudar possíveis aplicações das nanofibras poliméricas em biomateriais. Foram feitos estudos bem sucedidos com os seguintes polímeros: poliuretano (ortopedia), policaprolactona (ortopedia, biodesign, cardiovascular, neurologia), poli (ácido láctico) (ortopedia, nanofibras condutivas). Também foram estudadas a produção de nanoesferas de policaprolactona, com possíveis aplicações em *drug delivery*. De modo geral as aplicações possíveis nas nanofibras em medicina são muitas e outros trabalhos podem ocorrer.

Palavras-Chave:

Nanofibras, Nanoesferas, Biomateriais, Engenharia de tecidos, Bioreabsorvíveis, Biocompativeis, Eletrofiação.

Abstract

Electrospinning is a very old technique, which produces small polymer fibers and, for some time, has been forgotten. Recently, with the development of nanotechnology, this process become very suitable for several technological applications, especially tissue engineering. This science involves the use of life sciences technologies, as well as materials sciences. Therefore, scaffolds (porous scaffolds) of bioresorbable polymers or composites, which can be seeded with cells of the tissues to be regenerated, are produced by electroporation. By away correct conditions (temperature, pH, nutrients, cellular markers), the tissue regenerates as the scaffold degrades. The conventional Electrospinning process is not very productive, since it has a single tip for the exit of the polymer wire. Therefore, the main objective of this work was to design and construct a more productive and efficient Electrospinning equipment than the conventional one. The laser metal additive manufacturing process (DMLS) was used to produce the most important piece of this equipment, which was a cylinder with hollow pyramids, so that each pyramid was a tip for the exit of nanofibers. Several accessories have been developed for the proper operation of the Electrospinning equipment. Some of them worked very well, others fine-tuned as the work progressed. The advanced electro-spinning equipment worked well, but for continuous use, it needs some more refinements. Some comparisons were made between the operations of conventional and advanced electrospinning. It was verified that the average of the diameters of the nanofibers obtained by the advanced equipment was smaller than the conventional one and that the amount of fibers obtained was much greater. The second major objective was to study possible applications of polymer nanofibers in biomaterials. Successful studies have been made with the following polymers: polyurethane (orthopedics), polycaprolactone (orthopedics, biodesign, cardiovascular, neurology), poly (lactic acid) (orthopedics, conductive nanofibers). We also studied the production of polycaprolactone nanospheres, with possible applications in drug delivery. In general, the possible applications in nanofibers in medicine are many and other works may occur.

Keywords: Nanofibers, Nanospheres, Biomaterials, Tissue engineering, Bioreabsorbibles, Biocompatibles, Electro-spinning,

Lista de Figuras

Figura 1 Comparação entre os diversos biomateriais quanto a sua resistência a compressão e a sua densidade (Adaptado de ASHBY, M.F., 1999). 24
Figura 2 Estrutura da hidroxiapatita (fonte: https://hydroxyapatite.wikispaces.com/) .. 25
Figura 3- Polimerização de Caprolactona para Policaprolactona (fonte: WOODRUFF, HUTMACHER, 2010) 27
Figura 4. - Unidade estrutural do polímero PLA (fonte: MOTTA, 2002) 29
Figura 5 - Comparação da estrutura PLLA e PDLA 30
Figura 6- Esquema da síntese de um poliuretano 31
Figura 7- Processos de fabricação de arcabouços com polímeros 34
Figura 8 - Esquema representativo do equipamento de eletrofiação. (Fonte: RAMAKRISHNA et.al.,2005) 36
Figura 9 - Detalhe do Cone de Taylor (fonte: TAYLOR, 1964) 37
Figura 10 - Equipamento de eletrofiação da FEM-UNICAMP (Lab. Prof. Marcos Akira D'Ávila) 38
Figura 11 a) Equipamento DMLS; b) amostras saindo do equipamento DMLS. 47
Figura 12 - Bebê queimado: a) antes do tratamento, b e c) etapas intermediárias, d) recuperação de bebe queimado 18 dias após o tratamento. 50
Figura 13 apresenta a lesão antes e depois do tratamento com nanofibras (Fonte : PITTMAN, 2013). 51
Figura 14 - Ferimento profundo em cavalo a) 4 dias de seguimento com bandagens, antes de colocar as nanofibras; b) após 3 semanas com nanofibras e suporte de fibra de vidro removido (Dr. Galen Johnson, Johnson Veterinary Clinic, LLC, North Lewisburg, OH, USA; http://www. Nanofibers soluction.com acesso em 02/02/2018). 52
Figura 15 - Tratamento de tendão de cavalo com nanofibras orientadas 54
Figura 16 - Cilindro Com Pirâmides Ocas Projetado Pelo Software Inventor (Fonte: Feito Pelo Autor) 55
Figura 17 – Dimensões (Fonte: Feito pelo Autor) 56
Figura 18 - Detalhes Dos Cilindros (Fonte: Feito pelo Autor) 56
Figura 19 – Esquema básico de Funcionamento (Fonte: Feito pelo Autor) 57
Figura 20 – Detalhe da peça confeccionada. (Foto do Autor) 59
Figura 21 **- (a-c)** Detalhes do cilindro rotativo com pirâmides ocas. **(a)** Cilindro metálico **(b)** Fileiras circulares de pirâmides na superfície externa do cilindro e **(c)** Vista lateral das pirâmides. (Fotos do Autor) 59
Figura 22 - **(a-c)** Modelos de cilindro rotativo usados durante o desenvolvimento do equipamento. (a) Primeiro modelo, manual (b) Modelo que apresentava instabilidades (c). Modelo atual (Fotos do Autor) 60
Figura 23 - Comparação entre pontas injetoras de solução do processo de eletrofiação convencional (esquerda) e eletrofiação avançada (direita) (Foto do Autor) 61
Figura 24 - Foto da lâmpada LED RGB utilizada (foto comercial) 62
Figura 25 - Foto do equipamento produzindo nanofibras de PCL. Notem a quantidade de nanofibras que saem simultaneamente das pirâmides. (Foto do Autor) 63
Figura 26 - Foi observado que a luz azul dos LEDs, nesse ângulo permite a visualização das nanofibras durante a sua produção. (Foto do Autor) 63

Figura 27 - Detalhe externo da fonte de alta tensão desenvolvida (Foto do Autor) 64
Figura 28- Detalhe interno da fonte de alta tensão (Foto do Autor) 65
Figura 29 - Tela do aplicativo de controle remoto em um celular. (Desenho do Autor) 66
Figura 30 - Telas do aplicativo de controle remoto em um celular. (Desenho do Autor) 67
Figura 31 - Detalhe externo do gabinete seguro desenvolvido (Foto do Autor)..... 69
Figura 32- Detalhe da caixa interna de vidro temperado (Foto do Autor) 69
Figura 33 – Detalhes do projeto em 3D no software Inventor da Autodesk. (Desenho do Autor) 70
Figura 34 – Desenho ilustrativo do dimensional do dispositivo. (Desenho do Autor) ... 71
Figura 35 - Foto do detalhe da abertura que expõe as pirâmides ocas. (Foto do Autor) 72
Figura 36 - Foto do dispositivo usinado montado com seu acoplamento elástico. (Foto do Autor) 72
Figura 37 – Foto do disposto acoplado ao motor através do eixo de vidro (Foto do Autor)..... 73
Figura 38 – Projeto em 3D do dispositivo coletor de nanofibras alinhadas (Desenho feito pelo Autor)..... 74
Figura 39 – Desenho Ilustrativo do Dimensional do Dispositivo. (Desenho Feito do Autor)..... 75
Figura 40 – Foto do equipamento coletor de nanofibras alinhadas. (Foto do Autor) ... 76
Figura 41 - Metodologia de Pesquisas com PCL (Desenho feito pelo Autor) 77
Figura 42 - (a) Nanofibras obtidas pelo método convencional de eletrofiação com seringa e (b) nanofibras produzidas por meio do novo método em processo de depósito de patente. Detalhe do histograma com o diâmetro médio das nanofibras (MEV e Gráficos do Autor)..... 81
Figura 43 – Diagrama de eletrofiação tradicional (desenho do Autor) 83
Figura 44- Vista do molde alvo metálico de forma complexa (1). (Desenho do Autor). 84
Figura 45 - Deposição de nanofibras (Desenho do Autor) 84
Figura 46 - Manta de nanofibras (6) recobrindo alvo metálico (1) (desenho do Autor). 85
Figura 47 - Retirada da manta de nanofibras (6) vista por cima do alvo metálico (1) (Desenho do Autor)..... 85
Figura 48 - MEV de nanofibras em formato de flores (Fonte: Feito pelo Autor) 87
Figura 49 - Microscopia óptica de nanofibras em formato de flor (Fonte: Feito pelo Autor)..... 88
Figura 50 - Nanofibra em formato de néfron com detalhes centésimo de milímetro(Fonte: Feito pelo Autor) 88
Figura 51 - Detalhe do descolamento das nanofibras do molde coletor metálico (Fonte: Feito pelo Autor) 89
Figura 52 - Detalhe do descolamento das nanofibras do molde coletor metálico(Fonte: Feito pelo Autor) 90
Figura 53 - Macrofotografia de nanofibras em formato de néfron(Fonte: Feito pelo Autor)..... 90
Figura 54 - Microfotografia de um detalhe de nanofibras em formato de flor(Fonte: Feito pelo Autor) 91

Figura 55 - Detalhe MEV das nanofibras de PU com excesso de solvente. (Fonte: Feito pelo Autor) 93
Figura 56 - MEV das nanofibras de PU com excesso de solvente. (Fonte: Feito pelo Autor) 93
Figura 57 MEV das nanofibras de PU 94
Figura 58 - MEV das nanofibras de PU 94
Figura 59- Desenho esquemático do equipamento para produção de nanoesferas de PCL. (Adaptado pelo autor) 95
Figura 60 - Nanoesferas de PCL (MEV do Autor) 96
Figura 61 - Fotografia de microscopia óptica da solução aquosa com as nanoesferas (MO do Autor) 96
Figura 62 - Nanoesferas de PCL (fonte: MEV do autor) 97
Figura 63 -Possíveis aplicações (Fonte: Ingesting Injectable Drugs Crystal Growth and Design) 97
Figura 64 - Evolução do crescimento populacional de células de fibroblastos sobre nanofibras PLLA produzidas na Unicamp e o produto comercial PURAC. 99
Figura 65 - Gráfico demonstrando a grande Semelhança do desenvolvimento da população de fibroblastos sobre as nanofibras de PLLA desenvolvido na Unicamp e o produto comercial PURAC. (Fonte: Mariana Vitelo Xavier) 99
Figura 66 - Foto do processo deposição a plasma Fonte https://theofficetalks.com/wp-content/uploads/2018/07/Electride-Sputtering-Target-market.jpg 100
Figura 67 - Detalhe de Nanofibras Recobertas de Titânio (MEV do Autor) 101
Figura 68 - Deposição Seletiva de Titânio sobre nanofibra (foto do autor) 101
Figura 69 Detalhe de microscopia óptica mostrando deposição seletiva titânio (foto do autor) 102
Figura 70 - Detalhe de MEV Nanofibra Metalizada com Titânio. (MEV do Autor) 102
Figura 71 - Foto original tirada por um equipamento comercial de contagem de células (Foto do autor) 104
Figura 72 - Mesma foto d da figura anterior após processamento usando algoritmos de visão computacional (Foto do autor) 104
Figura 73 - Foto original tirada por um equipamento comercial de contagem de células (Foto do autor) 105
Figura 74 - Mesma foto d da figura anterior após processamento usando algoritmos de visão computacional (Foto do autor) 105
Figura 75 - Foto original tirada por um equipamento comercial de contagem de células (Foto do autor) 106
Figura 76 - Mesma foto d da figura anterior após processamento usando algoritmos de visão computacional (Foto do autor) 106
Figura 77- Mesma foto d da figura anterior após processamento usando algoritmos de visão computacional com threshold de três níveis enfatizando os núcleos celulares (Foto do autor) 106

Listas de Tabelas

Tabela 1 - Indícios de Causas e Sugestões para Solução de Problemas Observados na Eletrofiação (MEDEIROS, et al, 2008; THOMPSON, et al. 2007; VRIEZE, et al. 2009; MEDEIROS, et al. 2009; PICCIANI et al., 2011)..... 46

Tabela 2 - Parâmetros de produção dos cilindros, com pirâmides ocas pelo equipamento EOSINT M280, da empresa EOS GmbH:..... 57

Tabela 3 - Algumas Experiências de eletrofiação com PCL pelo Método da Seringa (Fonte: Feito pelo Autor) 78

Tabela 4 - Algumas Experiências com PCL pelo Método das Pirâmides (Fonte: Feito pelo autor) 79

Tabela 5 -Eletrofiação PU - Método da seringa (Fonte: feito pelo autor) 92

Abreviaturas

CAD – Computer Aided Design- Desenho Assistido por Computador

DMLS - Sinterização Direta de Metais a Laser

DSC - Calorimetria Exploratória Diferencial

DTG - Curva derivada da análise termogravimétrica

EOS GmbH **-** Electro-Optical Systems (empresa alemã)

ET - Engenharia de Tecidos

FT-IR - Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier

HA – Hidroxiapatita

IUPAC- International Union of Pure and Applied Chemistry

MA – Manufatura Aditiva

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

PU - Poliuretano

PCL - Policaprolactona

PLA- Poliácido láctico

PLLA- poli (L-ácido láctico)

PPO – poli (óxido de etileno)

PR - Prototipagem Rápida

RGB – Red Green Blue

rpm - Rotação por minuto

TGA - Análise Termogravimétrica

Tg - Temperatura de transição vítrea

UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas

Sumário

FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA 4
Resumo 7
Palavras-Chave: 7
Abstract 8
Keywords: 8
Lista de Figuras 9
Listas de Tabelas 12
1- INTRODUÇÃO 18
1.1 - Justificativas 18
1.2 - Objetivos 20
1.2.1 - Objetivos Gerais 20
1.2.2 - Objetivos específicos 20
2 - REVISÃO DA LITERATURA 22
2.1 - Biomateriais 22
Características de Físicas e Quimicas dos Biomateriais 23
2.1.1 - Hidroxiapatita (HA) 25
2.1.2 - Policaprolactona (PCL) 27
2.1.3 - Poli Ácido Láctico (PLA) 29
2.1.4 - Poli (L-ácido láctico) (PLLA) 30
2.1.5 - Poliuretano (PU) 31
2.2 - Engenharia de Tecidos 33
2.3 - Eletrofiação 35
2.3.1 - Histórico da Eletrofiação 35
2.3.2 - Descrição da Técnica 38
2.3.3 - Fatores que Influenciam a Eletrofiação 39
2.3.3.1 - Parâmetros da Solução Polimérica 40
2.3.3.2 - Parâmetros do Processo ou do Equipamento 43
2.3.3.3 - Parâmetros Ambientais 44
2.4 - Manufatura Aditiva de Metais 47
2.5- Casos Médicos Descritos na Bibliografia 48
2.5.1 - Aplicações na Área de Queimaduras 48

2.5.2 - Aplicações na Área Veterinária 50
3 - PESQUISAS REALIZADAS 55
3.1 - Desenvolvimento de um Equipamento Avançado Para a Produção de Nanofibras - Equipamento Principal 55
3.1.1 – Objetivo 55
3.1.2 - Descrição da Metodologia Empregada 55
3.1.3 - Resultados Obtidos, Observações e Discussão 58
3.2 Desenvolvimento de Acessórios para Complementar o Funcionamento do Equipamento Principal 62
3.2.a Desenvolvimento de um Equipamento de Iluminação que Permita a Observação da Produção de Nanofibras em Tempo Real 62
3.2.a.1 - Objetivo 62
3.2.a.2 - Descrição da Metodologia Empregada 62
3.2.a.3 - Resultados Obtidos, Observações e Discussão 63
3.2.b - Desenvolvimento de uma Fonte de Alta Tensão (até 65 KV) 64
3.2.b.1 - Objetivo 64
3.2.b.2 - Descrição da Metodologia Empregada 64
3.2.b.3 - Resultados Obtidos, Observações e Discussão 65
3.2.c - Desenvolvimento de um Equipamento de Controle Remoto Bluetooth para Controle dos Equipamentos para Produção de Nanofibras 66
3.2.c.1 – Objetivo 66
3.2.c.2 - Descrição da Metodologia Empregada 66
3.2.c.3 - Resultados Obtidos, Observações e Discussão 66
3.2.d - Desenvolvimento de um Equipamento Gabinete Seguro para Eletrofiação 68
3.2.d.1 – Objetivo 68
3.2.d.2 - Descrição da Metodologia Empregada 68
3.2.d.3 - Resultados Obtidos, Observações e Discussão 68
3.2.e - Desenvolvimento de um Dispositivo de Carga Continua de Polímero 70
3.2.e.1 – Objetivo 70
3.2.e.2 - Descrição da Metodologia Empregada 70
3.2.e.3 Resultados Obtidos, Observações e Discussão 72
3.2.f - Desenvolvimento de um Equipamento para Obtenção de Nanofibras Alinhadas 74
3.2.f.1- Objetivo 74
3.2.f.2 - Descrição da Metodologia Empregada 74
3.2.f.3 Resultados Obtidos, Observações e Discussão 76

3.3 - Comparação entre Nanofibras de PCL Eletrofiadas pelo Equipamento Tradicional e pelo Equipamento Avançado 77
3.3.1 - Objetivo 77
3.3.2 - Descrição da Metodologia Empregada 78
3.3.3 - Resultados Obtidos, Observações e Discussão 80
3.4 - Pesquisa para Obtenção de Nanofibras Orientadas a Um *Biodesing* 82
3.4.1 - Objetivo 82
3.4.2 - Descrição da Metodologia Empregada 82
3.4.3 - Resultados Obtidos, Observações e Discussão 87
3.5 - Pesquisa para Obtenção de Nanofibras de Poliuretano (PU) 92
3.5.1 - Objetivo 92
3.5.2 - Descrição da Metodologia Empregada 92
3.5.3 - Resultados Obtidos, Observações e Discussão 93
3.6 - Pesquisa para Obtenção de Nanoesferas de PCL 95
3.6.1 - Objetivo 95
3.6.2 - Descrição da Metodologia Empregada 95
3.6.3 - Resultados Obtidos, Observações e Discussão 95
3.8 - Pesquisa para Obtenção de Nanofibras de PLLA Sintetizadas em Laboratório e Comercial (Comparação entre as Duas) 98
3.8.1 - Objetivo 98
3.8.2 - Descrição da Metodologia Empregada 98
3.8.3 - Resultados Obtidos, Observações e Discussão 98
3.9 - Desenvolvimento de um Processo de obtenção de Nanofibras Condutivas 100
3.9.1 - Objetivo 100
3.9.2 - Descrição da Metodologia Empregada 100
3.9.3 - Resultados Obtidos, Observações e Discussão 100
3.10 - Pesquisa sobre Proliferação Celular de Cardiomiócitos em Manta de Nanofibras de PU 103
3.10.1 - Objetivo 103
3.10.2 - Descrição da Metodologia Empregada 103
3.10.3 - Resultados Obtidos, Observações e Discursões 104
3.11 - Pesquisas sobre Reconstituição de Crânios em Ratos com Nanofibras e Hidroxiapatita 107
3.11.1 – Objetivo 107
3.11.2 - Descrição da Metodologia Empregada 107

3.11.3 - Resultados Obtidos, Observações e Discussão 107
3.12 - Pesquisas sobre Reconstituição de Crânios em Ratos com Nanofibras e Selante de Fibrina 108
3.12.1 – Objetivo 108
3.12.2 - Descrição da Metodologia Empregada 108
3.12.3 - Resultados Obtidos, Observações e Discussões 108
4 – CONCLUSÕES FINAIS E SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS 109
4.1 - Conclusões 109
4.2 – Consideração Final 111
4.3 – Sugestões para Trabalhos Futuros 111
5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 113

1- INTRODUÇÃO

1.1 - Justificativas

A técnica da eletrofiação foi desenvolvida há mais de 70 anos. A primeira patente surgiu em 1938, usando uma solução de acetato de celulose. Entre 1938 e 1993 poucas publicações foram feitas neste tema. A partir de 1993 a técnica foi praticamente redescoberta. Com o desenvolvimento da nanotecnologia, esse processo ficou muito adequados para diversas aplicações tecnológicas, incluindo a obtenção de arcabouços (*scaffolds)* para engenharia de tecidos, obtendo-se poros com arquitetura apropriada (formato, tamanho e distribuição adequada, além da interconectividade desejada).

A engenharia de tecidos envolve o uso de tecnologias da biologia molecular e celular, combinando as vantagens da ciência dos materiais e processamento a fim de produzir a regeneração de tecidos em situações onde as células do paciente não tenham a capacidade de regeneração ao longo do tempo.

Como se sabe, os grupos de células necessitam de estímulos externos ou sinalizações bioquímicas para crescerem dentro de um arranjo tridimensional, denominado arcabouço *(scafold),* como as células que compõem órgãos ou tecidos o fazem.

Na eletrofiação, um polímero em solução é transformado numa matriz fibrosa por aplicação de uma diferença de potencial muito elevada. As fibras formadas distinguem-se das fibras obtidas pelos processos convencionais devido ao seu diâmetro reduzido (podem ser micrométricas, sub-micrométricas ou nanométricas). A configuração padrão do sistema de eletrofiação consiste de uma fonte de alimentação de alta tensão, uma bomba de seringa com seringa e uma agulha metálica, e um coletor ligado à terra. Durante o processo de eletrofiação, uma corrente de alta voltagem é aplicada para criar jato eletricamente carregado de uma solução polimérica. À medida que este jato viajar da ponta da agulha para o coletor, as moléculas de polímeros são

esticadas e o solvente evapora-se, e a fibra é gerada (VENTURELLI & GRIPA, 2008).

Apesar da grande versatilidade de aplicações das fibras produzidas por eletrofiação, algumas desvantagens dessa técnica podem ser mencionadas, podendo-se destacar a baixa produtividade do processo.

1.2 - Objetivos

1.2.1 - Objetivos Gerais

Esta tese teve dois objetivos gerais:

A) - Desenvolver um equipamento de eletrofiação para nanofibras de polímeros biocompatíveis, visando melhorar a produtividade do processo.

B) - Desenvolver novas aplicações das nanofibras para uso como biomateriais para construção de órgãos.

1.2.2 - Objetivos específicos

I - Projetar um equipamento avançado de eletrofiação para a produção de nanofibras

II - Construir o equipamento avançado de eletrofiação com os seguintes acessórios:

- Equipamento de iluminação
- Desenvolvimento de uma fonte de alta tensão
- Desenvolvimento de um gabinete seguro para a eletrofiação
- Desenvolvimento de um equipamento de controle remoto Bluetooth para controle de produção de nanofibras
- Desenvolvimento de um equipamento para obtenção de nanofibras alinhadas
- Montagem de um equipamento convencional e de um equipamento avançado de eletrofiação
- Comparação entre os dois processos

III- Obtenção de nanofibras orientadas a um *Biodesign*

IV - Obtenção de nanofibras de poliuretano

V- Obtenção de nanofibras de policaprolactona

VI- Obtenção de nanoesferas de PCL

VII - Obtenção de nanofibras condutivas

VIII - Obtenção de nanofibras de poli ácido láctico sintetizadas em laboratório e comercial (Comparação entre as Duas)

IX - Obtenção de nanofibras condutivas

X - Reconstituição de Crânios em Ratos com Nanofibras e Hidroxiapatita

XI - Reconstituição de Crânios em Ratos com Nanofibras e Selante de Fibrina

2 - REVISÃO DA LITERATURA

Neste capítulo serão comentados os principais biomateriais utilizados neste trabalho, assim como serão discutidos os conceitos de engenharia de tecidos, eletrofiação, manufatura aditiva de metais e alguns casos de aplicações de nanofibras da literatura.

2.1 - Biomateriais

Biomateriais são materiais destinados a interagir com sistemas biológicos, com a finalidade de tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo humano(WILLIANS, 1987).

Os biomateriais, de natureza natural ou sintética, têm sido largamente utilizados em sistemas diagnósticos e terapêuticos (AMARAL et al., 2003; LANGER et al., 2004), podem ser usados temporária ou definitivamente, com a finalidade de melhorar ou substituir, parcial ou totalmente, tecidos ou órgãos.

Os biomateriais devem possuir as seguintes características: biocompatibilidade, resistência à corrosão, propriedades mecânicas adequadas à aplicação específica, serem esterilizáveis, entre outras (OREFICE et al.).

As aplicações dos biomateriais incluem: a) a substituição de parte do corpo que perdeu sua função (quadril/fêmur, joelho, coração); b) corrigir anormalidades (lesão da medula espinhal); c). Melhorar uma função (marca-passo, *stent*; d) colaborar com uma cura (estrutural, sutura, liberação controlada de fármacos); e) fornecer materiais para engenharia de tecidos (SOARES,2005).

Diversos tipos de biomateriais são utilizados, desde metais e suas ligas (por exemplo aço inoxidável austenítico, titânio e ligas de titânio, ligas de cobalto-cromo, entre outras); cerâmicas (zircônia, alumina, hidroxiapatita, fosfato tricálcico, biovidro, vitrocerâmicas, etc.); polímeros (naturais como o colágeno e a quitosana e sintéticos como o poli ácido láctico e a poli caprolactona); e os

compósitos (geralmente de matriz polimérica e reforço cerâmico, ambos biocompatíveis) (RATNER et al).

Biodegradável é um termo utilizado para polímeros e dispositivos sólidos que devido à degradação macromolecular sofrem dispersão in vivo, mas sem a eliminação dos produtos e subprodutos pelo organismo. Polímeros biodegradáveis podem ser atacados por elementos biológicos de forma que a integridade do sistema seja afetada, formando-se fragmentos ou outros subprodutos de degradação, que podem ser removidos do seu local de ação, mas não necessariamente do organismo (BARBANTI, et.al, 2004).

Materiais biorreabsorvíveis são materiais poliméricos e dispositivos sólidos que mostram degradação através da diminuição de tamanho e que são reabsorvidos in vivo: i.e., materiais que são eliminados por rotas metabólicas do organismo (BARBANTI, et.al, 2004).

Características de Físicas e Quimicas dos Biomateriais

As características tisicas e químicas são extremamente importantes e devem ser muito bem analisadas na escolha de cada biomaterial.

Na figura 1 temos por exemplo um gráfico que mostra a resistência do biomaterial em relação a sua densidade e comparando-as com diversos tipos de tecidos.

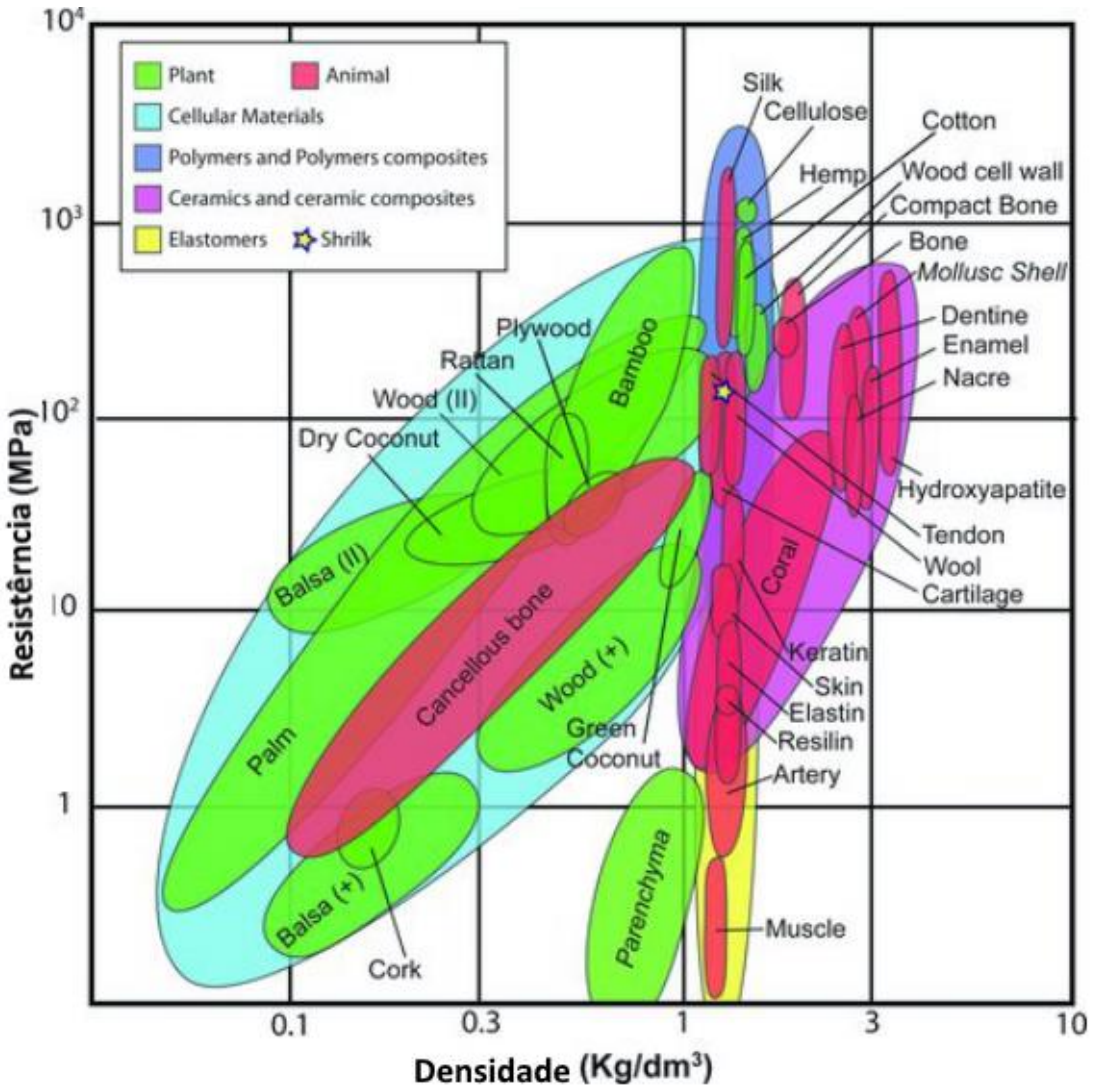


Figura 1 Comparação entre os diversos biomateriais quanto a sua resistência a compressão e a sua densidade (Adaptado de ASHBY, M.F., 1999).

2.1.1 - Hidroxiapatita (HA)

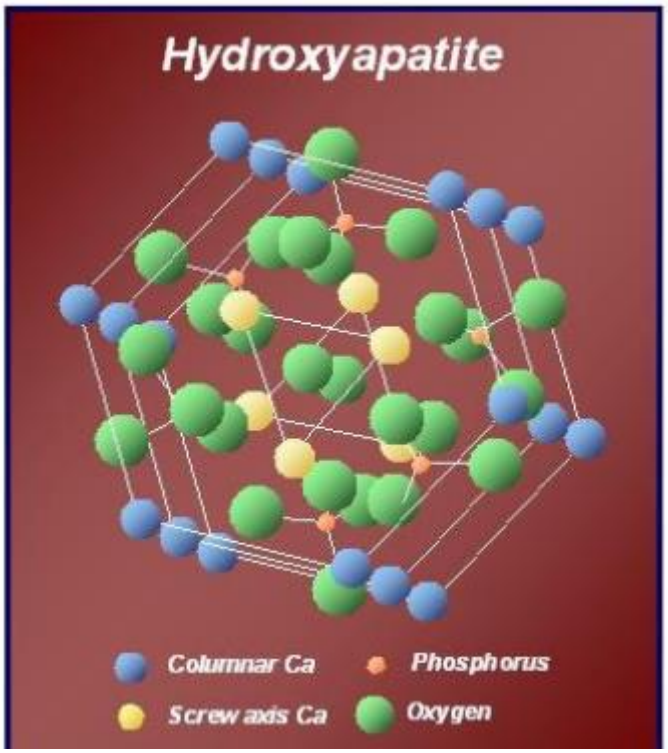


Figura 2 Estrutura da hidroxiapatita (fonte: https://hydroxyapatite.wikispaces.com/)

A hidroxiapatita (HAP) é um fosfato de cálcio cerâmico, cuja identificação e uso estão fortemente ligados à razão dos átomos Ca/P. A sua forma estequiométrica é Ca10(PO4)6(OH)2 cuja razão de Ca/P é igual a 1.67. Todavia, razões próximas de 1,5 podem ser relacionadas a composições estáveis. A hidroxiapatita é classificada em função da razão molar Ca/P, que varia de 0,5 a 2,06, sendo que esta é influenciada pelo método utilizado na sua síntese, e também pelo tratamento posterior a síntese realizada. As apatitas também são classificadas como biológicas e sintéticas. As apatitas biológicas, hidroxiapatita-cálcio, são apontadas como sendo deficientes de cálcio, não estequiométricas, impuras ou apatitas contendo carbonatos. Elas estão contidas na fase mineral dos tecidos calcificados como os dentes, esmalte e ossos.

Já a hidroxiapatita sintética, consiste em um material inorgânico usado em falhas ósseas e como parte da fase mineral de tecidos calcificados.

Nos últimos anos os compostos derivados do fosfato de cálcio, em particular a hidroxiapatita, têm sido objeto de intensas investigações como

material de implante, como sistema de cobertura para superfícies de estruturas metálicas, como catalisador, suporte para catalisadores, fertilizantes, e no tratamento de água. Esta diversidade de aplicações à torna objeto de inúmeras pesquisas seja no desenvolvimento de novos materiais ou na melhoria da tecnologia da sua fabricação.

O método sol-gel é considerado um dos melhores métodos de síntese de hidroxiapatita por permitir uma mistura a nível molecular dos precursores de cálcio e fósforo e, consequentemente, induzir a formação de hidroxiapatita de alta pureza e homogeneidade, utilizando baixas temperaturas de processamento, com a produção de partículas nanométricas, que favorecem a integração óssea, por conduzirem a uma melhor resposta celular (SOARES,2015).

2.1.2 - Policaprolactona (PCL)

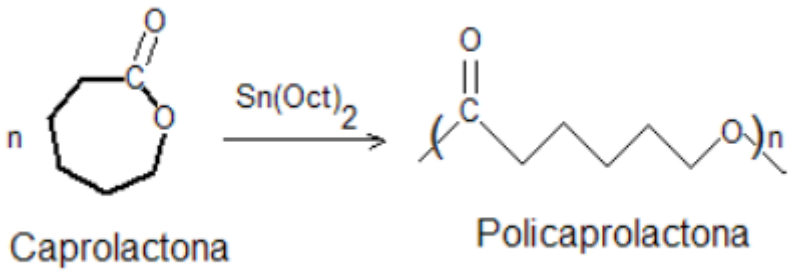


Figura 3- Polimerização de Caprolactona para Policaprolactona (fonte: WOODRUFF, HUTMACHER, 2010)

A policaprolactona (PCL) é um plástico biodegradável elaborado a partir de derivados do petróleo. Compõe-se de uma sequência de unidades de metileno, entre os que se formam grupos éster. Através desta estrutura muito simples, uma rotação ligeiramente limitada dos segmentos individuais da cadeia é possível, o que leva a um ponto de transição vítrea muito baixo (-60°C). Trata-se de um polímero semicristalino com ponto de fusão de 58-60ºC, baixa viscosidade e fácil processabilidade. A temperatura ambiente, a policaprolactona de cadeia curta é amorfa e correspondentemente macia e gomosa. Devido à estrutura uniforme, no entanto, cristaliza-se facilmente, o que resulta no reforço do material. A policaprolactona cristalina assemelha-se ao polietileno na estrutura cristalina. O PCL é altamente solúvel e combina-se bem com outros plásticos, como a lignina e amida. Ademais, adere-se bem a um grande número de superfícies. Sua obtenção é mais simples que outros biopolímeros, funde facilmente e não é tóxico. Sua aplicação principal é no campo médico como fio para suturas. Como o homopolímero se biorreabsorve em aproximadamente 2 anos, desenvolveram-se copolímeros para acelerar a velocidade de biorreabsorção, por exemplo copolímeros com DL- Lactide. A policaprolactona é degradada por hidrólise de seus vínculos ésteres em condições fisiológicas (tais como no corpo humano) e, portanto, tem recebido uma grande atenção para seu uso como um biomaterial implantado. Em particular, é especialmente

interessante para a preparação de dispositivos implantáveis de longo prazo, devido a sua degradação, que é inclusive mais lenta que a de polilactídeo.O PCL tem sido aprovada pela Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA) em aplicações específicas utilizadas no corpo humano como, por exemplo, um dispositivo para fornecimento de fármaco, sutura (vendido pela marca Monocryl) ou barreira de adesão. O Monocryl é uma sutura cirúrgica sintética e absorvível, fabricada e patenteada por Ethicon Inc. Compõe-se de poliglecaprona 25, que é um copolímero de glicólido e Ɛ-caprolactona. A biocompatibilidade da PCL tem sido muito estudada, especialmente do Capronor que é um dispositivo anticonceptivo válido durante 18 meses. O agente ativo é o progestágeno levonorgestrol, apresenta-se em cápsulas subcutâneas que se colocam por médio de uma cirurgia menor. Demonstrou-se que o polímero não é tóxico, exceto por uma pequena irritação no lugar do implante. Lâminas de policaprolactona também são utilizadas como bolus (equivalente a tecido ceroso colocado na superfície da pele) em radioterapia para homogeneizar ou modular a faixa da dose de radiação de fazes externos. Como as lâminas de PCL se amolecem com água quente e se voltam moldáveis, se podem aplicar em áreas difíceis como parede torácica, nariz, parótida ou qualquer superfície anatômica irregular (RAMOS, 2011).

2.1.3 - Poli Ácido Láctico (PLA)

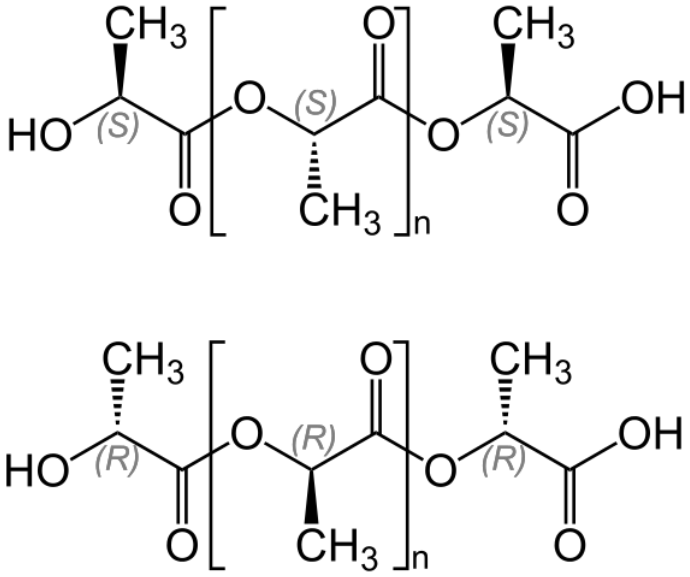


Figura 4. - Unidade estrutural do polímero PLA (fonte: MOTTA, 2002)

O PLA ou Poli Ácido Láctico descoberto pelo químico sueco Carl Wilhelm Scheele, no leite coalhado, é um composto orgânico de função mista, ácido carboxílico e álcool que apresenta fórmula molecular $C_3H_6O_3$. De acordo com a IUPAC, o ácido lático é conhecido como ácido 2-hidroxipropanóico ou ácido α-hidroxipropanóico. O ácido láctico pode ser sintetizado por via de fermentação (síntese de ácido oticamente ativo) ou por reação química (mistura racêmica). Na fermentação, o ácido lático pode ser sintetizado através do açúcar do leite (lactose) com a bactéria Bacillus lactis ácidi; ou a partir do amido, do açúcar da uva (glicose) ou da cana de açúcar (sacarose) utilizando Bacillus Delbrücki. A obtenção de ácido láctico por fermentação pode produzir os isômeros destrógiro ou levógiro, dependendo da enzima envolvida no processo. A forma L (levógiro) difere da forma D (dextrógiro) pelo seu efeito em luz polarizada (MOTTA, 2002).

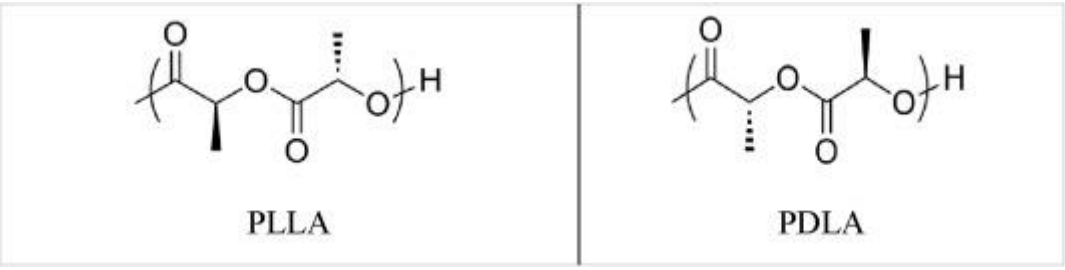
O PLA é fabricado atualmente a partir da dextrose (açúcar) extraídas de materiais de fontes renováveis. É o bioplástico ou biopolímero mais popular e o único atualmente produzido numa fábrica à escala mundial. O PLA pode ser comparado com o PET-A e convertido nas mesmas linhas (moldação sopro,

ISBM e termoformação). Existem também graus com MFI elevado que podem ser utilizados em aplicações moldadas por injeção onde pode representar um substituto do poliestireno (PS).

Este biopolímero é também adequado para a extrusão de fibra onde pode apresentar-se como um substituto do polipropileno (PP).

O PLA pode biodegradar em determinadas condições. Os produtos de PLA podem ser compostados em instalações industriais onde o calor (70°C ou mais) e a humidade (min 70% HR) podem ser controlados. O material é higroscópico e necessita na maioria dos casos de secagem antes do processamento (CARVALHO 2009).

2.1.4 - Poli (L-ácido láctico) (PLLA)



(Fonte: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S074960361530255X)

Figura 5 - Comparação da estrutura PLLA e PDLA

O PLLA é um dos polímeros biodegradáveis mais estudado nos últimos anos, com potencial para aplicação em embalagens. Trata-se de um poliéster alifático termoplástico, relativamente hidrofóbico, que pode ser sintetizado a partir de recursos renováveis. É dito biodegradável, pois em apenas 12 meses a sua resistência a tração decai cerca de 50% e após 36 meses ele é completamente convertido em substâncias de massas molares menores.

Os produtos oriundos da degradação aeróbica do PLLA são o dióxido de carbono (CO_2) e água, que são absorvidos pelo organismo no caso de

aplicações como biomateriais, ou são liberados no meio ambiente se descartados em solo. O CO2 liberado pela decomposição volta para o ciclo de vida destes polímeros e durante a respiração celular das plantas são convertidos em carboidratos que servem como fonte de carbono para a produção do PLLA. O PLLA, de forma estereorregular chamada levogiros, é um termoplástico rígido com temperatura de transição vítrea, Tg, em torno de 60 °C, e temperatura de fusão cristalina, Tm, entre 170 °C e 180 °C. Suas aplicações se aproximam do poli(tereftalato de etileno) (PET) na área de embalagens e fibras para a indústria têxtil.

O poli (L-ácido láctico) tem chamado muita atenção, pois pode ser fabricado com um custo próximo ao dos polímeros que atualmente estão em alta no mercado, além de ter uma baixa ou praticamente nenhuma toxicidade e um alto desempenho mecânico que pode ser comparado ao polietileno, polipropileno e poliestireno. Como biomaterial pode ser aplicado como fios para sutura, cápsulas transportadoras, suporte para crescimento de células, regeneração óssea, etc.

2.1.5 - Poliuretano (PU)

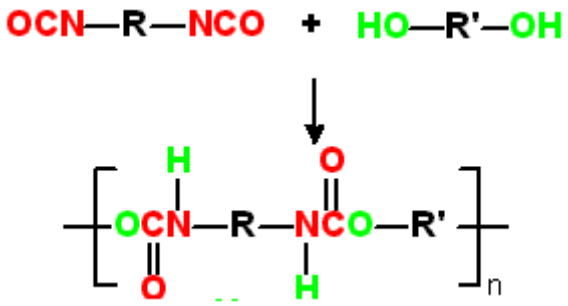


Figura 6- Esquema da síntese de um poliuretano

Poliuretano é um polímero que compreende uma cadeia de unidades orgânicas unidas por ligações uretânicas. É amplamente usado em espumas rígidas e flexíveis, em elastômeros duráveis e em adesivos de alto desempenho, em selantes, em fibras, vedações, preservativos, carpetes, peças de plástico rígido e tintas.

Poliuretanos tem este nome porque são formados por unidades de uretano, ou carbamato. A cadeia poliuretânica consiste de uma sequência alternada de segmentos flexíveis e segmentos rígidos. Os segmentos flexíveis se devem ao poliól que confere características elastoméricas ao polímero. Os segmentos rígidos se devem ao diisocianato e conferem propriedades como dureza, resistência e tenacidade. Assim as características de um polímero PU dependem diretamente da natureza do isocianato e do poliól utilizados na síntese, podendo ser preparados para aplicações específicas através da variação de parâmetros como: extensão, distribuição de segmentos flexíveis e rígidos, massa molar e grau de ramificação das cadeias. Estudos feitos com diisocianatos mostram que poliuretanos preparados com diisocianatos linear alifáticos são mais rapidamente degradáveis do que os PUs preparados com diisocianatos aromáticos. As propriedades mecânicas destes polímeros estão diretamente relacionadas à combinação dos constituintes das cadeias poliméricas, tamanho dos segmentos flexíveis, razão molar NCO/OH, tipo de extensor de cadeia e presença ou não de solventes na síntese. As propriedades finais destes polímeros dependem da natureza do álcool utilizado na síntese, influenciando propriedades como flexibilidade e características de processamento. De um modo geral, quanto mais flexíveis são os PUs, mais suscetíveis são à biodegradação, por exemplo. Os polióis usados são basicamente de duas classes, derivados de poliéster e de poliéter. Os poliéteres são usados em maior abrangência devido à disponibilidade de ampla faixa de massa molar e características como viscosidade, composição e funcionalidade. Estes conferem aos produtos finais propriedades como resistência ao corte e ao impacto, resistência a solventes e ácidos e estabilidade à luz. Os poliésteres foram os primeiros polióis usados no desenvolvimento dos poliuretanos [8]. Eles apresentam pequena estabilidade hidrofílica e degradação frente a álcalis, o que torna este tipo de poliól atrativo para uso na síntese de poliuretanos biodegradáveis. Aliado a isto, os poliuretanos utilizados como biomateriais possuem um caráter de biocompatibilidade e características físicas e mecânicas que permitem o seu uso em dispositivos implantáveis como, balão intraórtico, implantes mamários, balões de angioplastia, dispositivos para cateterismo, entre outros.

2.2 - Engenharia de Tecidos

A Engenharia de Tecidos é a ciência aplicada que utiliza conhecimentos de biologia, química e física para desenvolver tecidos artificiais. Pode ser aplicada à produção de pele artificial, cartilagens e tecidos ósseos. Os tecidos podem ser produzidos fazendo crescer células sobre um substrato biodegradável.

Refere-se ao uso dos princípios e métodos da engenharia e ciências da vida para entender os fundamentos das relações estrutura-função de tecidos normais e patológicos e assim fundamentar o desenvolvimento de substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar funções de diferentes tecidos (definição do National Science Foundation Workshop, 1988)

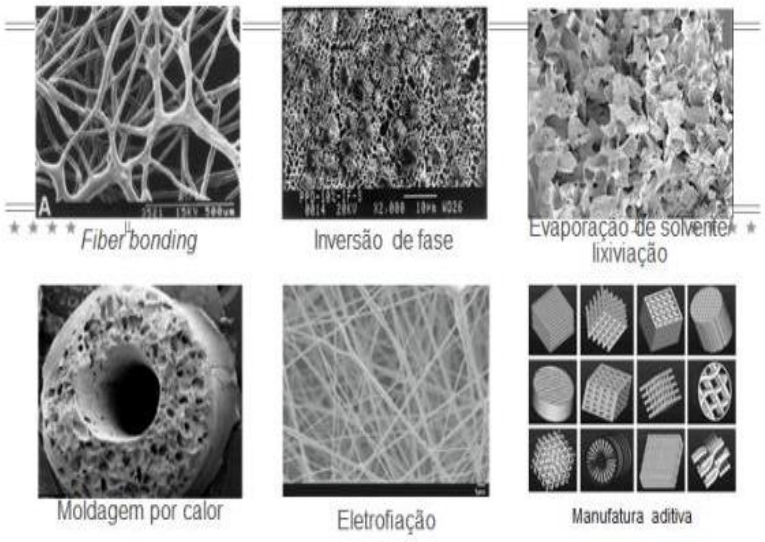
Muitas vezes é interessante que esses biomateriais possuam uma matriz tridimensional, micro ou nanometricamente arquitetada para aumentar a interação entre as células e tecidos (NERURKAR et al., 2007) e otimizar o papel de carreadores de funções biológicas que ocorrem em escala molecular com auto grau de especificidade (SUI et al., 2007). Estas estruturas que servem de suporte para o crescimento celular são chamadas de arcabouço ***(scafold)s***, também chamados de suportes porosos tridimensionais são constituídos de materiais biodegradáveis e biocompatíveis, geralmente polímeros ou cerâmicos. O primeiro objetivo de arcabouços *(scafolds)* na engenharia de tecidos é simular a matriz extracelular (LIAO et al., 2006).

Embora células tenham sido cultivadas, ou crescidas, fora do corpo por muitos anos, a possibilidade de crescer tecidos tridimensionais complexos, literalmente reproduzindo o design e função do tecido humano, é um desenvolvimento recente. A engenharia de tecidos nos Estados Unidos e no mundo tem a intenção de cultivar virtualmente todo tipo de tecido humano - fígado, osso, músculo, cartilagem, vasos sanguíneos, músculos do coração, nervos, ilhotas de pâncreas, e mais.

Para se criar um tecido substituto vivo, um número pequeno de células pode idealmente ser colhido do paciente usando uma técnica de biopsia e então

cultivado em laboratório. Estas células podem então ser expandidas em uma matriz (biomaterial - arcabouço (scafold)) tridimensional, natural ou sintética, na presença de fatores de crescimento e diferenciação. Se providas com as condições e sinais adequados, as células irão secretar vários componentes de matriz extracelular para criar de fato um tecido vivo que pode ser usado como tecido substituto a ser reimplantado no sítio defeituoso no paciente. A matriz tridimensional deveria, em última instância, vai degradar para prevenir certos riscos que podem acontecer, a longo prazo, na presença de qualquer material estranho no corpo. Se células do paciente são usadas, então não haverá nenhuma resposta de rejeição imune ao tecido implantado.

Os biomateriais mais utilizados para a confecção de arcabouço *(scafold)s* são polímeros biorreabsorvíveis como a policaprolactona, o poli (ácido láctico) o poli (ácido glicólico), entre outros. Diversas técnicas são utilizadas para se confeccionar os arcabouços *(scafolds)* poliméricos, podendo-se mencionar: a inversão de fases, a ligação por fibras, a evaporação do solvente, a moldagem por calor, a manufatura aditiva e a eletrofiação, como pode ser visto na figura 7 (ESPOSITO, 2014). Neste trabalho serão estudadas *arcabouços (scafolds)* obtidos por eletrofiação.



(Adaptado de: ESPÓSITO, 2014)

Figura 7- Processos de fabricação de arcabouço *(scafold)s* com polímeros

2.3 - Eletrofiação

2.3.1 - Histórico da Eletrofiação

De acordo com Stanger et al. (2005), em 1500, Willian Gilbert constatou que quando uma porção de âmbar era friccionada, de forma a acumular força eletrostática, entrava em contato com uma gota de água sobre uma superfície seca ela se tornava cônica. Mais tarde essa teoria foi complementada por Lord Rayleigh. Lord demonstrou a grande instabilidade de gotas líquidas quando submetidas a um campo elétrico. Em 1902 nos Estados Unidos, que John Cooley, patenteou o sistema de electrospraying que se intitulou "Apparatus for electrically dispersam fibres", e consiste em uma câmara preenchida com um fluido que carregado eletricamente pela aplicação de alta voltagem, produz fibras que são coletadas em uma segunda câmara (JAWOREK, 2008), em função O jato que se formava quando séries de gotas se juntavam em consequência da instabilidade de cargas eletrostáticas que superavam a tensão superficial das gotas. A eletrofiação foi patenteada em 1934 por Anton Formhals com o título de "Process and apparatus for preparing artificial thread" (FORMHALS, 1934). Anton partiu da utilização de acetato de celulose como o polímero da fiação, utilizou como solvente, uma solução de acetona/álcool a uma diferença de potencial de 57 kV (DEITZEL, 2001-2). O primeiro aparato desenvolvido por Formhals era composto por um reservatório para fornecimento da solução, um dispositivo coletor para o alongamento e alinhamento das fibras depositadas e uma fonte de alta tensão em corrente contínua com dois eletrodos posicionados entre a saída da solução e o coletor. Em 1944, Formhals patenteou um novo processo no qual a solução de polímero se depositava diretamente sobre uma base móvel, a partir de um conjunto de agulhas contendo a mesma solução (FORMHALS, 1944), de acordo com a figura 8.

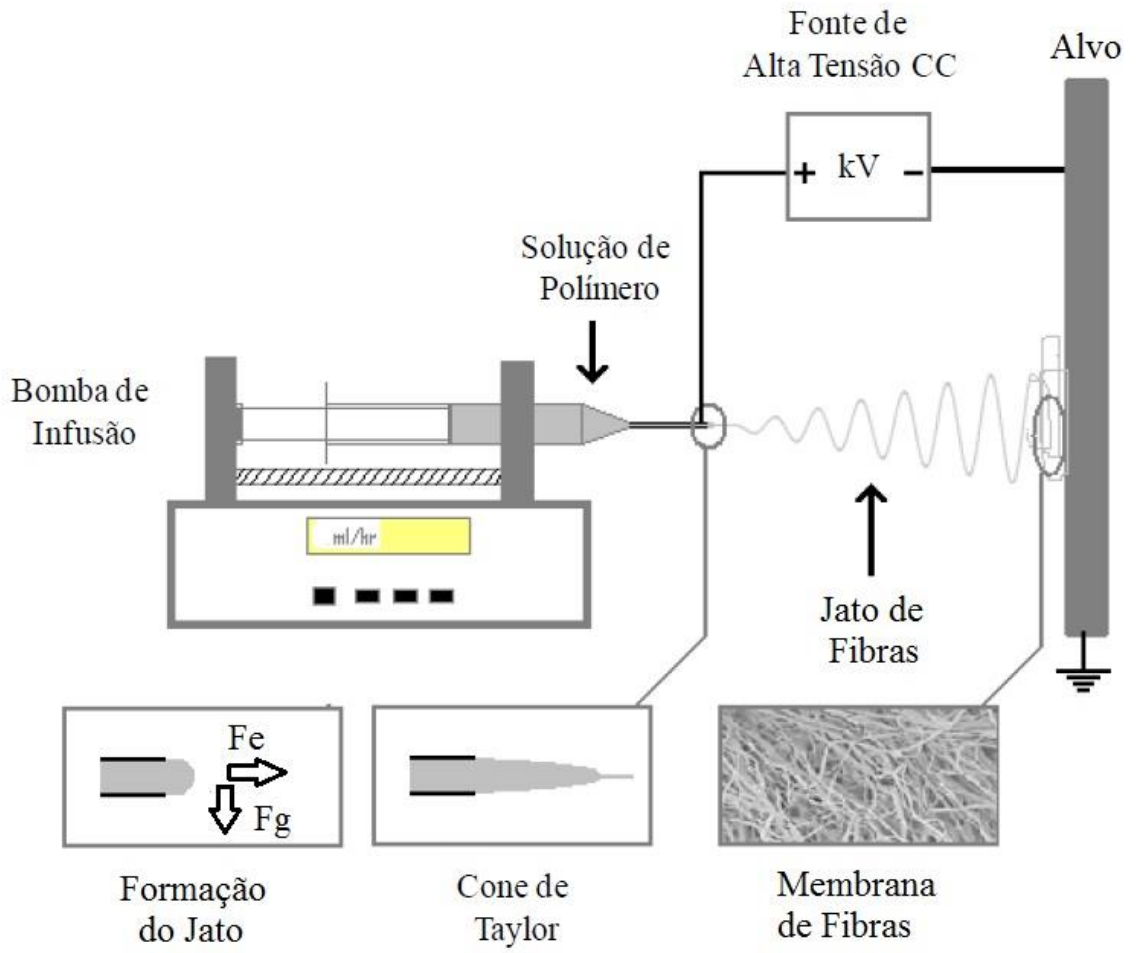


Figura 8 - Esquema representativo do equipamento de eletrofiação. (Fonte: RAMAKRISHNA et.al.,2005)

De 1964 e 1969, teve-se a definição do “Cone de Taylor”. Geoffrey Taylor observou que quando um fluido era colocado sobre um campo de alta voltagem (TAYLOR, 1964), a carga injetada produzia uma força oposta a tensão superficial do líquido e quando o campo elétrico aplicado aumentava ainda mais, a superfície da solução se alongava formando um cone, de acordo com a Fig. 9.

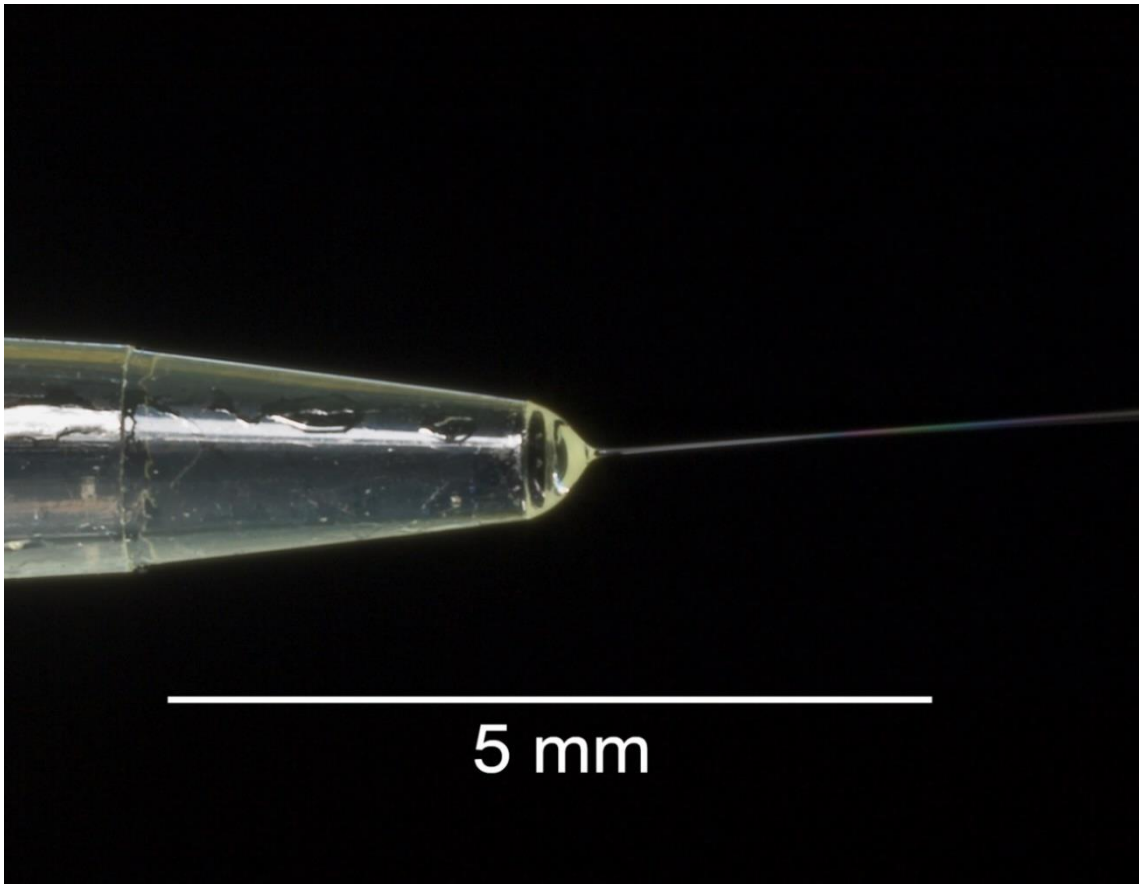


Figura 9 - Detalhe do Cone de Taylor (fonte: TAYLOR, 1964)

Em 1971, foram iniciados estudos, por Baumgarten, sobre como os parâmetros e variáveis do equipamento e da solução tinham influência sobre a estrutura e a disposição das fibras, investigando a correlação entre o diâmetro das fibras, o comprimento do jato, a viscosidade da solução, o fluxo e o gás do meio. Em 1995, Doshi e Reneker (DOSHI e RENEKER, 1995), inclinaram a visão da eletrofiação para algo mais voltado para a área de nanotecnologia, mostrando desta forma a potencial da eletrofiação para produção de materiais nanoestruturados. Assim, Doshi utilizou poli (oxido etileno) (PEO) como solução para montar um modelo matemático sobre a formação das fibras e Reneker utilizando câmeras de vídeo de alta velocidade. Neste estudo, foi verificado como o jato se ramificava ao longo do caminho entre a agulha e o coletor. De 1995 em diante aumentou-se o número de publicações descrevendo a influência das condições de processamento.

2.3.2 - Descrição da Técnica

A eletrofiação é uma técnica na qual nanofibras são formadas a partir de uma solução polimérica submetida a um campo elétrico. É uma técnica muito versátil, pois possibilita a formação de fibras a partir de vários polímeros e copolímeros (BEACHLEY et al., 2000). A eletrofiação é constituída de três componentes básicos: - fonte de alta tensão em Corrente Contínua (CC) ligada eletricamente a um fluido (polímero diluído ou fundindo); - um dispositivo de infusão (“bomba”) para realizar a injeção do fluido armazenado numa seringa de vidro dotada de uma agulha com ponta cortada perpendicularmente ao comprimento; - coletor de material condutor, de cobre ou alumínio. Desta forma, um eletrodo conectado a uma fonte de alta tensão positiva (ou negativa) é inserido na solução polimérica contida em um tubo capilar. Inicialmente, a solução é mantida pela sua tensão superficial na forma de uma gota na extremidade do capilar. Com o aumento da tensão elétrica, a superfície da gota se alonga para formar um cone, conhecido como cone de Taylor. Quando as forças eletrostáticas superam a tensão superficial, um jato carregado da solução na extremidade do cone é ejetado. Durante a trajetória do jato, o solvente evapora e o polímero solidifica-se, formando-se as nanofibras que se depositam no coletor. A figura 10 mostra a foto de um equipamento de eletrofiação da FEM - UNICAMP (Laboratório do Prof. Marcos Akira D’Ávila).

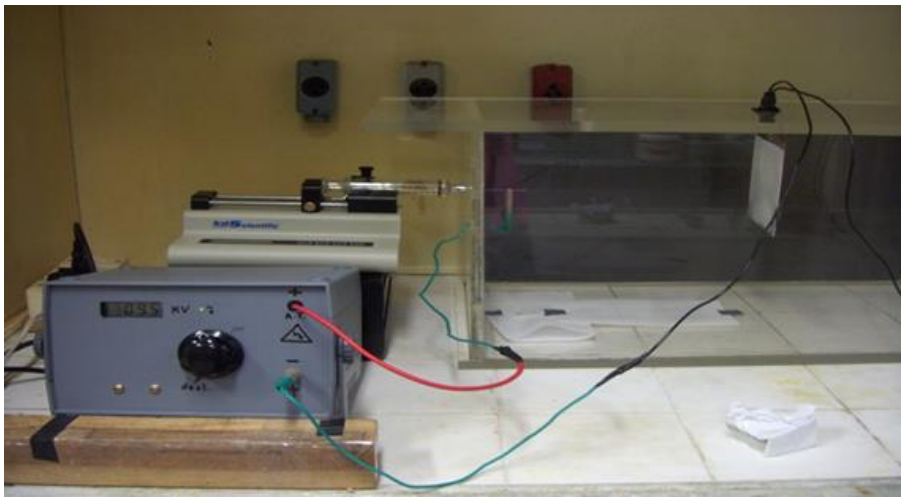


Figura 10 - Equipamento de eletrofiação da FEM-UNICAMP (Lab. Prof. Marcos Akira D’Ávila)

2.3.3 - Fatores que Influenciam a Eletrofiação

Alguns fatores podem afetar a eletrofiação, como por exemplo, a concentração polímero/solvente, tensão elétrica aplicada na solução, adição de sais na solução, vazão de alimentação (saída da solução do capilar) e distância de trabalho (entre a extremidade do capilar até o coletor). Outros fatores que também podem influenciar a eletrofiação que são os parâmetros da solução polimérica, como a viscosidade, tensão superficial, condutividade e constante dielétrica, e os parâmetros do equipamento, como a tensão aplicada, vazão da seringa, distância da ponta da agulha ao anteparo e o efeito do material do coletor (MILLÁS et al., 2012).

Portanto, procurar otimizá-las e combiná-las é essencial para alcançar a morfologia e tamanho de fibra desejadas. A vantagem em utilizar a eletrofiação na Engenharia de Tecidos é devida a vários aspectos, mas principalmente por fornecer uma alta área superficial e uma alta porosidade podem ser alcançadas para uma melhor incorporação e perfusão celular.

Existem três grupos de parâmetros que podem ser controlados e que afetam o processo de eletrofiação e a arquitetura morfológica das fibras resultantes (MILLÁS, 2012). São os parâmetros da solução polimérica, os parâmetros de processo ou de equipamento e os parâmetros ambientais (SALLES, 2013). Os parâmetros da solução polimérica são principalmente viscosidade, tensão superficial e condutividade elétrica. Os parâmetros de processo são tensão aplicada, vazão da seringa e distância entre a ponta da agulha e o coletor das fibras. Os parâmetros ambientais são temperatura e umidade ambiente (SALLES, 2013). A seguir são descritos todos os parâmetros citados e como eles influenciam na eletrofiação.

2.3.3.1 - Parâmetros da Solução Polimérica

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

a) Viscosidade da Solução

A viscosidade é a propriedade física que caracteriza a resistência de um fluido ao escoamento ou a deformação por cisalhamento em função da temperatura (DIARMID et al., 2001). Geralmente, a viscosidade da solução está relacionada com o grau de emaranhamento das cadeias moleculares do polímero na solução. Quando a viscosidade da solução é muito baixa, pode ocorrer electrospraying (formação de micro gotas), em vez do jato fibroso. Com baixa viscosidade, onde geralmente as ligações da cadeia polimérica são de menor intensidade, há uma maior probabilidade de obter fibras onduladas, em vez de fibras lisas. Portanto, fatores que afetam a viscosidade da solução também afetarão o processo e as fibras dele resultante (KULKARNI et al., 2010). A uma baixa concentração (Figura 5a) não houve formação de fibras, somente a deposição de gotas de solução no coletor; a uma concentração média do polímero (Figura 5b) houve deposição de fibra, mas ainda há gotas ‘beads’ na estrutura; e a uma concentração ótima (Figura 5c) os filamentos se depositaram uniformemente e não houve formação de ‘beads’ (defeitos na forma de gotas).

O peso molecular do polímero reflete no comprimento médio das cadeias poliméricas, tem um efeito direto na viscosidade da solução, já que esta será função do nível de emaranhamento das cadeias poliméricas no solvente.

Similarmente ao aumento do peso molecular, um aumento na concentração irá resultar em um maior entrelaçamento das cadeias poliméricas na solução, o que é necessário para manter a continuidade do jato durante o processo de eletrofiação (RAMAKRISHNA et al., 2005).

b) Tensão Superficial

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

O início da eletrofiação requer que a solução carregada eletricamente pela aplicação de um campo elétrico supere a tensão superficial da gota que se forma na ponta da agulha e sob a influência das cargas eletrostáticas, as moléculas de solvente tendem a se espalhar sobre as cadeias emaranhadas do polímero (DOSHI, 1995). Segundo Fong H. et al (1999) o etanol por ser um solvente de baixa tensão superficial pode ser adicionado para incentivar a formação de fibras lisas e mais uniformes. Outra sugestão proposta por Zeng et al (2003) para reduzir a tensão superficial é a adição de surfactante à solução. Ele diz que mesmo quando um surfactante insolúvel é disperso em uma solução na forma de pó fino, a morfologia das fibras também é melhorada. Teoria também confirmada por Lin T. (2004) que observou alterações na reologia e na condutividade, além da tensão superficial quando adicionado um surfactante. Os surfactantes diminuem a tensão superficial da solução e ajudam a aumentar a interação entre o solvente e as cadeias do soluto, evitando a ocorrência de grânulos (beads) na superfície das fibras. Pode ser que os óleos naturais incorporados as nanofibras neste trabalho façam esse papel; diminuindo a tensão superficial as cadeias ficam mais esticadas e interconectadas por solvente e óleo, numa relação estável e pouco energizada, não endotérmica. Na presença de surfactantes o solvente se distribui sobre as cadeias do polímero

emaranhadas. Sem a adição de surfactantes o solvente tende a se agregar sobre a ação da tensão superficial. (Adaptado de RAMAKRISHNA et al.,2005)

c) Condutividade Elétrica

A condutividade de uma solução é determinada pela capacidade de movimento (em massa) dos íons presentes na solução ou ainda, a facilidade com que a solução é capaz de conduzir uma corrente elétrica" (PORTELA, 2010). Soluções com alta condutividade terão maior capacidade de carga do que soluções com baixa condutividade. Dentre as três características que os solventes devem ter para o sucesso da eletrofiação, Ohkawa et al. (2009) citou a semi-condutividade ou capacidade de carga moderada. Condutividade elétrica da solução é determinada principalmente pelo tipo de polímero, solvente utilizado, e da disponibilidade de sais ionizáveis. Verifica-se que com o aumento da condutividade elétrica da solução, existe uma diminuição significativa no diâmetro das nanofibras eletrofiadas, enquanto que com baixa condutividade da solução, resulta em alongamento insuficiente do jato pela força elétrica para produzir fibras uniformes e livres de grânulos. Em síntese, geralmente, o aumento da condutividade elétrica da solução ou a densidade de cargas é usado para reduzir e uniformizar o diâmetro das fibras e, ao mesmo tempo, diminuir o número de defeitos (BHARDWAJ, KUNDU, 2010). A adição de sal iônico demonstra efeito sobre a morfologia e diâmetro das fibras eletrofiadas. Sais iônicos tais como KH2PO4, NaH2PO4, e NaCl produzem fibras livres de grânulos e com diâmetros relativamente menores que variam de 200 a 1000 nm (RAMAKRISHNA et al., 2005; KULKARNI et al., 2010).

2.3.3.2 - Parâmetros do Processo ou do Equipamento

Os parâmetros do processo ou também chamados de “externos” (RAMAKRISHNA, 2005) são também importantes, pois junto com os parâmetros da solução discutidos na sessão anterior, afetam a formação e a morfologia das fibras. Aqui serão discutidos: a tensão (voltagem) aplicada, a vazão da bomba de deslocamento positivo, a distância da ponta da agulha ao coletor e o efeito do material do coletor (MILLÁS, 2012).

a) Tensão Aplicada

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

b) Vazão da Seringa

A vazão irá determinar a quantidade de solução disponível para a eletrofiação. Para uma dada tensão há uma vazão correspondente que faz com que o Cone de Taylor se mantenha estável e não deixe a solução se solidificar na ponta da agulha, nem pingar na superfície do equipamento por excesso de solução antes do jato se formar. Quando a vazão é maior, há um aumento no diâmetro da fibra, porém existe um limite para isso, pois a vazão tem que ser

correspondente à taxa que a solução é levada pelo jato, que é correspondente ao aumento de cargas (ZHONG et al., 2002). Devido ao grande volume de solução que sai da ponta da agulha, o jato leva um tempo maior para evaporar. Os solventes residuais podem se fundir as fibras, formando redes. A menor vazão é mais desejável para o solvente ter tempo para evaporar (YUAN et al., 2005).

c) Distância entre a ponta da agulha e o coletor

Uma distância mínima é necessária para dar as fibras tempo suficiente para evaporar o solvente antes de atingir a placa coletora, caso contrário, com distâncias que são próximas ou demasiado longe, os grânulos têm sido observados (SILL, RECUM, 2008; KULKARNI et al., 2010). Um importante aspecto físico da eletrofiação de nanofibras é a evaporação do solvente utilizado para dissolver o polímero, assim, deve haver distância ótima entre a ponta da agulha e a placa coletora que favoreça este processo para melhorar a produção de nanofibras livres de grânulos (BHARDWAJ, KUNDU, 2010).

2.3.3.3 - Parâmetros Ambientais

Além de parâmetros de solução e de processamento, há também parâmetros ambientais que incluem umidade e temperatura, estes têm sido conduzidos para examinar os efeitos de parâmetros ambientais sobre o processo de eletrofiação.

a) Temperatura

Com o aumento da temperatura, há um rendimento de fibras com diminuição do diâmetro e atribuem esse declínio devido a diminuição da viscosidade das soluções do polímero com o aumento da temperatura. Há uma relação inversa entre viscosidade e temperatura (BHARDWAJ, KUNDU, 2010).

b) Umidade

Aumentando a umidade pode ocorrer um surgimento de pequenos poros circulares na superfície das fibras, aumentando ainda mais a umidade, conduz

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

A tabela 1 apresenta alguns problemas observados na eletrofiação, as prováveis causas e sugestões para resolve-los.

Tabela 1 - Indícios de Causas e Sugestões para Solução de Problemas Observados na Eletrofiação (MEDEIROS, et al, 2008; THOMPSON, et al. 2007; VRIEZE, et al. 2009; MEDEIROS, et al. 2009; PICCIANI et al., 2011)

	Problema Observado	Possível Causa	Solução Sugerida
1.	Ausência de jato	Solvente não condutor	Corrigir a solução para deixá-la com maior condutividade
		Coagulação na ponta injetora	Ver item 2.
2.	Coagulação na ponta injetora	Evaporação muito rápida da solução	Usar solvente com ponto de evaporação menor. Corrigir solução com solvente de maior ponto de ebulição. Usar revestimento de gás. Usar uma blenda polimérica
		Aspecto viscoso da solução	Alterar solvente que não cause aspecto gelatinoso. Aumentar campo elétrico. Usar uma blenda polimérica. Aumentar temperatura da solução. Usar um revestimento anular de gás para facilitar a formação do jato.
3.	Jato de eletrofiação presente, mas sem formação de fibras	Concentração da solução ou peso molecular muito baixos	Aumentar concentração da solução ou peso molecular.
		Baixa viscosidade	
4.	Jato formado mas as fibras não se depositam no coletor	Coletor não condutivo	Trocar coletor. Para coletores em formato de placas finas, inserir eletrodos condutivos embaixo do coletor Soprar ar ionizado na superfície do coletor.
5.	Jatos múltiplos na ponta injetora	Condutividade elétrica elevada da solução	Trocar o solvente por outro de menor condutividade. Usar pontas injetoras de menor diâmetro.
6.	Fibras úmidas	Fibras não estão secas quando chegam ao coletor	Usar solvente mais volátil. Aumentar a distância entre injetor e anteparo.
7.	Agrupamento dos jatos da eletrofiação	Polarização das cargas elétricas no jato	Usar solvente de menor condutividade. Trocar anteparo por outro de menor condutividade. Usar coletor rotativo. Aumentar umidade do ambiente em que ocorre o processo.

2.4 - Manufatura Aditiva de Metais

A manufatura aditiva (MA) é um processo de junção de materiais para construção de objetos a partir de dados de modelos tridimensionais, sendo o contrário dos processos de subtração de material, como a usinagem (norma ASTM F2792, 2012). Segundo Volpato (VOLPATO et.al., 2006, 2017) manufatura aditiva é um processo de fabricação através da adição de material em forma de camadas sucessivas, isto é, baseado no princípio de manufatura por camadas. Essa tecnologia permite fabricar componentes, protótipos, modelos, peças finais, em 3 dimensões (3D), com informações obtidas diretamente do modelo geométrico gerado no sistema CAD (Computer Aided Design) de forma rápida, automatizada e flexível.

Embora existam diversos equipamentos de manufatura aditiva, nesta tese foi utilizado o DMLS - Sinterização Direta de Metais a Laser (EOS M280), utilizando-se o pó da liga Co-28Cr-6Mo fornecida pela fabricante do equipamento (figuras 11.a e 11.b).

a) b)

Figura 11 a) Equipamento DMLS; b) amostras saindo do equipamento DMLS.

A manufatura aditiva de metais por laser possui algumas vantagens, na fabricação de peças metálicas, podendo-se mencionar: produção de geometrias complexas; não é necessária fixação da peça; minimização da intervenção do

operador; etapa única de fabricação; possibilidade de customização; equipamento único; reaproveitamento do pó não utilizado.

Também deve-se mencionar algumas desvantagens: anisotropia de propriedades, segundo a direção de construção; precisão e acabamento inferiores à usinagem; alto custo dos equipamentos; peças de tamanho limitado; tensão residual nas peças.

2.5- Casos Médicos Descritos na Bibliografia

Serão discutidos neste sub-ítem alguns casos observados na literatura que foram solucionados com o uso de nanofibras poliméricas. Esta tese pode contribuir com soluções semelhantes, utilizando os equipamentos aqui desenvolvidos, usando alguns produtos nacionais, como por exemplos fitoterápicos.

2.5.1 - Aplicações na Área de Queimaduras

Um estudo realizado por Highton e colaboradores (HIGHTON, et. al., 2013) avaliou uma pele sintética substituta para queimaduras parciais em 33 crianças (entre 5 meses a 11 anos), produto comercial de nome Suprathel® , que segundo a literatura trata-se de um copolímero PLDLA (copolímero de L e D ácido láctico) com algumas adições. Este produto reduziu significativamente a dor, aderiu rapidamente à ferida, protegendo-a contra infecções. Nenhuma reação alérgica foi observada. A capacidade do polímero ser reabsorvido rapidamente facilitou a cura. A média de tempo de cura das queimaduras foi de 16 dias. As figuras 12a- 12d apresentam as fotos de um dos pacientes tratados nesta pesquisa. A recuperação ocorreu 18 dias após o tratamento, sendo que no tratamento convencional demoraria 3 meses.

12.a

12.b

12.c

12.d

Figura 12 - Bebê queimado: a) antes do tratamento, b e c) etapas intermediárias, d) recuperação de bebe queimado 18 dias após o tratamento.

2.5.2 - Aplicações na Área Veterinária

A empresa NanoFiber Solutions™ desenvolve e comercializa nanofibras 3-D como arcabouço (scafold)s para medicina regenerativa e engenharia de tecidos. Estes arcabouço (scafold)s são feitos de 100% materiais sintéticos aprovados pela FDA, da família dos PLLA (copolímeros e blendas biorrebsorvíveis), permitindo que sejam utilizados para uma infinidade de aplicações clínicas, tanto para seres humanos, como para animais, como cavalos, búfalos, cães e gatos. Essas nanofibras replicam a matriz extracelular encontrada naturalmente no corpo que fornece um suporte estrutural para guiar o crescimento, fazendo com que as células se repliquem e se diferenciem in vivo para formar um tecido funcional. Este produto pode ser usado como curativo para feridas e suturas, base de enxerto alogênico, ou substituto temporário da pele. O período de reabsorção in vivo é de aproximadamente 4 semanas.

Exemplo 1 - Em um ensaio realizado em um cavalo chamado Jax, o NanoCareV™ ajudou a curar uma ferida crônica. Esta ferida desenvolveu-se devido à necrose por pressão como resultado da bandagem durante o tratamento de um grave esmagamento de calcanhar. Após mais de três meses

de bandagens compressivas e terapia com esteróides, a ferida ainda não havia cicatrizado. No entanto, com este produto a base de naonofibras poliméricas aleatórias, a ferida curou em apenas um mês. O procedimento incluiu a semeação de células estaminais autólogas no no arcabouço (scafold) (PITTMANN, 2013). A Figura 13 mostra a ferida de necrose por pressão crónica: A) imediatamente após enxerto de NanoCareVTM semeado com células-tronco autólogas derivadas da medula óssea e B) 4 semanas depois.

Figura 13 apresenta a lesão antes e depois do tratamento com nanofibras (Fonte : PITTMAN, 2013).

.

Exemplo 2 - NanoCareV^{TM}, uma malha para cicatrização de feridas, melhorou o tempo de cicatrização em um ferimento metastático profundo. Sally, um cavalo de um quarto de seis anos, emaranhou um pedaço de arame em volta do seu traseiro esquerdo. Ela foi encontrada dois dias depois com um ferida profunda. Os veterinários removeram o fio, limparam e enfaixaram a ferida durante quatro dias antes de aplicara malha de nanofibras (com orientação aleatória). Eles garantiram a malha diretamente na superfície da ferida com cola de tecido e, em seguida, aplicaram um suporte de fibra de vidro para imobilizar a ferida durante três semanas. Os resultados foram muito satisfatórios após esse período,

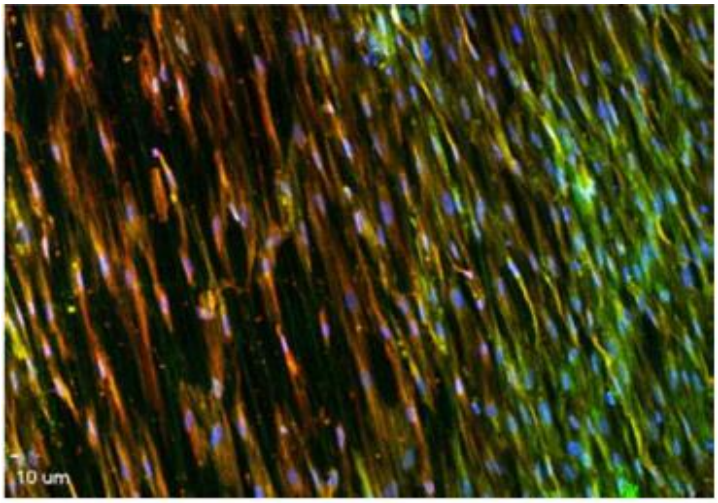
conforme pode ser visto na figura 14.a (antes do tratamento) e 14.b(depois do tratamento) .

a) b)

Figura 14 - Ferimento profundo em cavalo a) 4 dias de seguimento com bandagens, antes de colocar as nanofibras; b) após 3 semanas com nanofibras e suporte de fibra de vidro removido (Dr. Galen Johnson, Johnson Veterinary Clinic, LLC, North Lewisburg, OH, USA; http://www. Nanofibers soluction.com acesso em 02/02/2018).

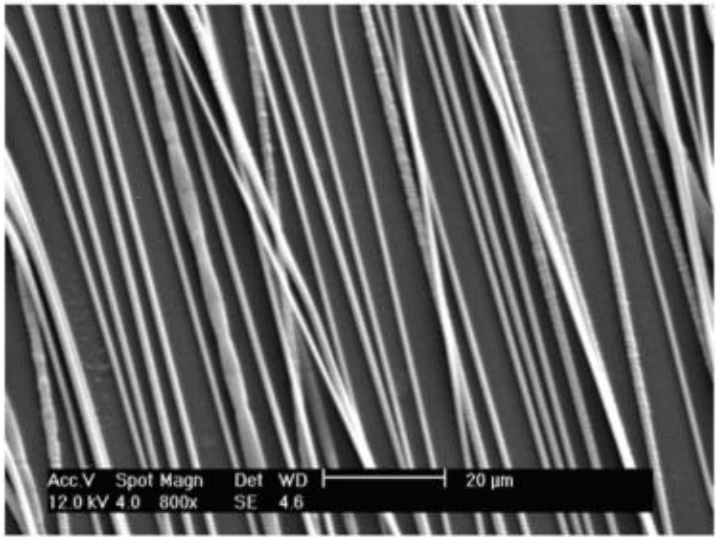
Exemplo 3 - Esse é um caso de enxerto para regeneração de tendões e ligamentos. Um arcabouço (scafold) chamado NanoLigV^{TM} feito com nanofibras alinhadas, para engenharia de tecidos usando polímeros biorreabsorvíveis de PLLA (copolímeros e blendas). Esse produto não possuem nenhum derivado de animal,permitindo que sejam usados para uma infinidade de aplicações. As nanofibras replicam a matriz extracelular que fornece nível de tecido suporte estrutural em todos os organismos multicelulares. O NanoLigV^{TM} é um enxerto desenvolvido para uso em reconstrução de tendões e ligamentos. É não-biorreativo e elimina a necessidade de colheita autóloga. Isso simplifica os procedimentos e reduz o tempo de recuperação do paciente. O período de reabsorção in vivo é de aproximadamente 9 meses.

Em um procedimento em um cavalo com laminite, chamado Phoenix, NanoLigV™ semeado com as células-tronco derivadas da medula óssea do cavalo foram enxertadas sobre o flexor profundo tendão após o corte para aliviar o estresse na lâmina. Isso fez com que o tendão se curasse de forma controlada e linear, reduzindo a cicatrização aleatória e subsequente perda da mobilidade dos membros associada a este procedimento. O cavalo foi totalmente restaurado para um vida normal. A figura 15.a mostra as células tronco mesenquimais crescendo nas naofibras alinhadas. A figura 15.b apresenta o tamanho do enxerto das nanofibras poliméricas. A figura 15.c apresenta a regeneração do tendão e ligamento.



15.a

15.b



15.c

Figura 15 - Tratamento de tendão de cavalo com nanofibras orientadas

a) Células mesenquimais crescendo sobre as nanofibras alinhadas

b) Dimensão do tendão feito de nanofibras alinhadas

c) MEV das nanofibras alinhadas

(Fonte: Nanofibers... Is the backthrougth? The equine veterinarian, July/August 2012, 2, pp.18-24).

3 - PESQUISAS REALIZADAS

Serão descritas neste capítulo as pesquisas realizadas bem como os resultados e a metodologia utilizada.

3.1 - Desenvolvimento de um Equipamento Avançado Para a Produção de Nanofibras - Equipamento Principal

3.1.1 – Objetivo

Desenvolver um equipamento capaz de produzir nanofibras de diversos Polímeros de maneira segura, prática e rápida. Comparar com os métodos tradicionais.

3.1.2 - Descrição da Metodologia Empregada

O equipamento foi desenvolvido dentro dos laboratórios da Faculdade de Engenharia Mecânica da Unicamp com o auxílio de alunos da graduação e do Colégio Técnico da Unicamp.

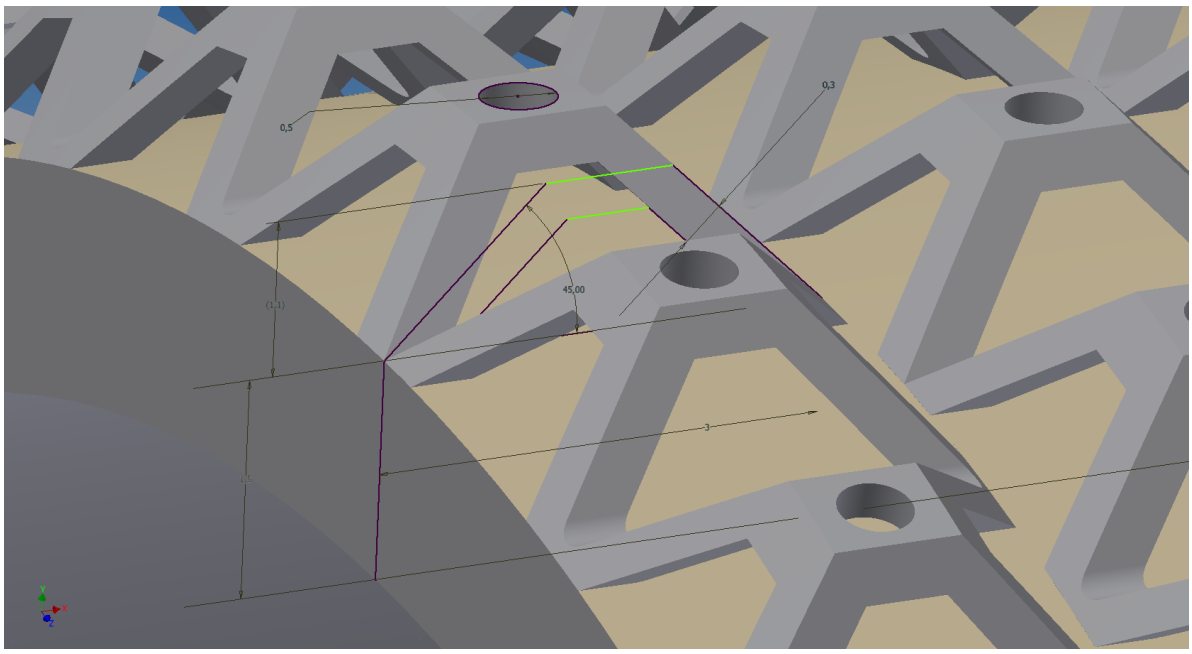


Figura 16 - Cilindro Com Pirâmides Ocas Projetado Pelo Software Inventor (Fonte: Feito Pelo Autor)

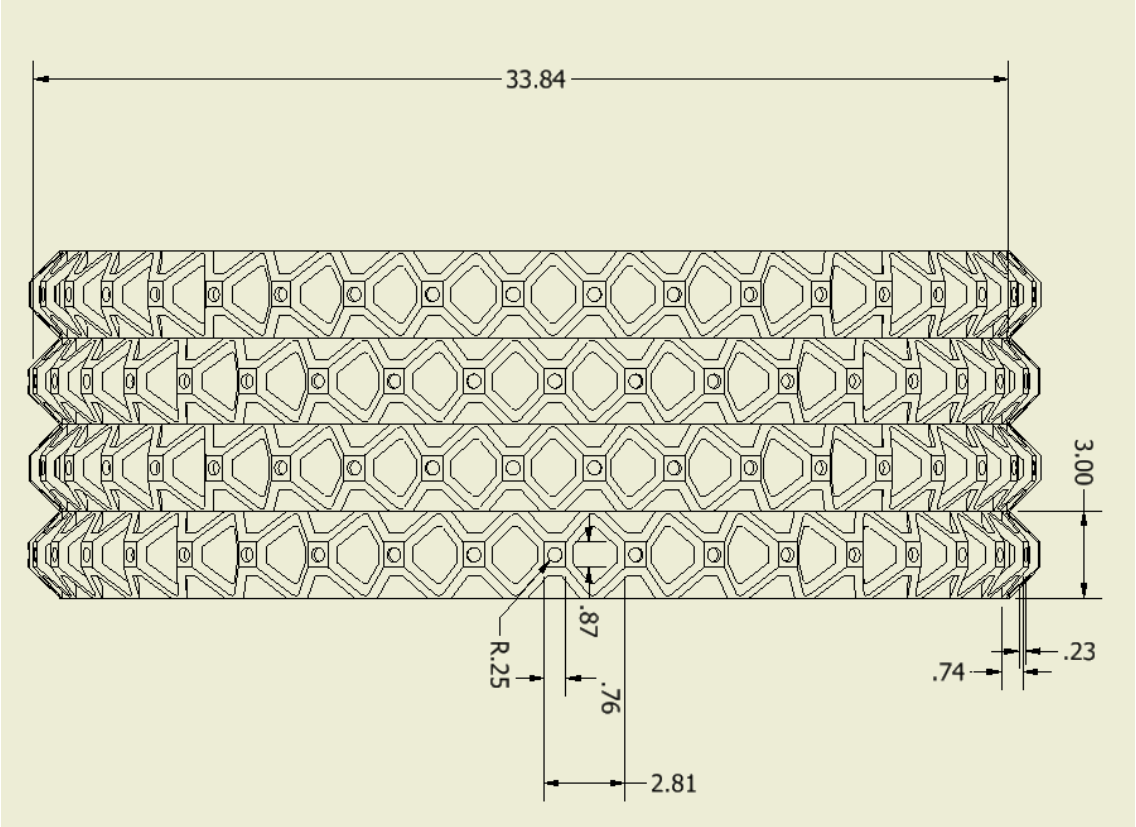


Figura 17 – Dimensões (Fonte: Feito pelo Autor)

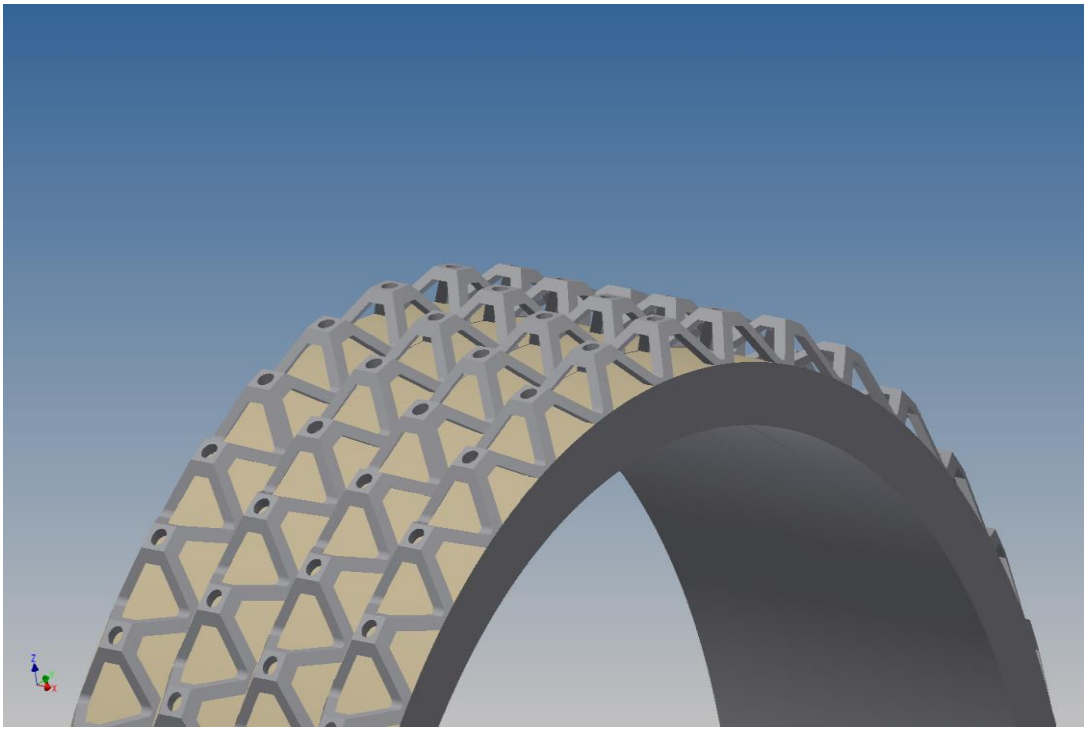


Figura 18 - Detalhes dos Cilindros (Fonte: Feito pelo Autor)

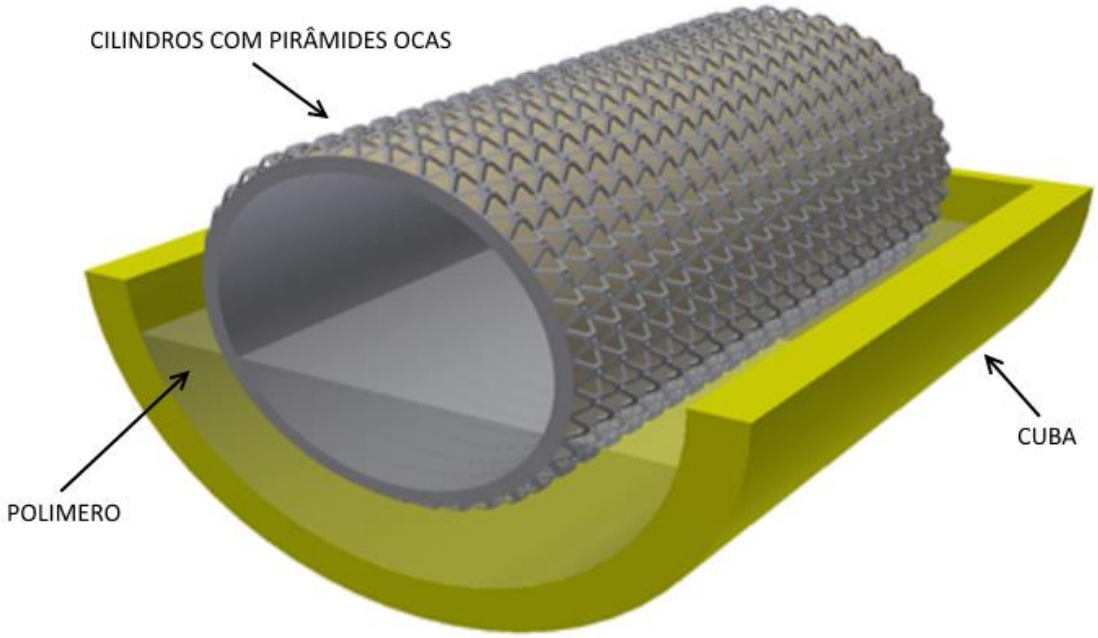


Figura 19 – Esquema básico de Funcionamento (Fonte: Feito pelo Autor)

Devido a complexidade desta peça, sua construção só foi possível através da manufatura aditiva de metais a laser (DMLS).

Tabela 2 - Parâmetros de produção dos cilindros, com pirâmides ocas pelo equipamento EOSINT M280, da empresa EOS GmbH:

Potência do laser: 200V
Diâmetro do feixe de laser: 100-500 µm
Velocidade de varredura: até 7,0 m/s
Espessura da camada: 20µm
Atmosfera: Nitrogênio
Liga metálica: Co-28Cr-6 Mo
Código da liga da EOS: EOS Cobalt Chrome MP1

3.1.3 - Resultados Obtidos, Observações e Discussão

O modelo convencional de Eletrofiação apresenta diversas limitações que tornam a técnica difícil de ser trabalhada. Uma das limitações do processo tradicional é a lentidão na formação da fibra polimérica que desafia o escalonamento da produção de nanofibras na indústria.

Este trabalho teve o objetivo de avaliar um novo processo de obtenção deste material, que consiste na substituição da seringa de injeção da solução por um dispositivo com múltiplas ponteiras de injeção. Este dispositivo é um cilindro impresso de maneira 3D em Cobalto-Cromo com formas piramidais ocas ao longo de sua superfície (figuras 20 e 21).

A técnica consiste na acoplagem deste cilindro a um rotor e imergi-lo na solução polimérica. Durante a rotação, a solução entra nas pirâmides ocas por tensão superficial e a carga elétrica se acumula no topo das pirâmides por uma reação denominada “Efeito das Pontas”. Ocorre ali um efeito semelhante à ponta da seringa, ou seja, a condição eletrostática permite a formação do Cone de Taylor que libera um fio polimérico em direção ao anteparo coletor.

O desenvolvimento do equipamento injetor de polímero é um ponto crítico da inovação no processo de eletrofiação, porque é ele que garante a formação de múltiplos jatos, que aumenta a produtividade da fibra.

O modelo inicialmente testado (figura 22-a) apresentava rotação manual e as pirâmides eram grandes, não formando os jatos poliméricos de maneira adequada. Um novo modelo foi desenvolvido, com pirâmides menores, e design modificado para aumentar a superfície de contato com a solução (figura 22-b), tornando o processo mais eficiente. O acoplamento inadequado entre o cilindro e o rotor gerava instabilidades no processo, pois ocorria flambagem do cilindro que não permitia a uniformidade dos jatos da eletrofiação. O equipamento deixava de produzir nanofibras após alguns minutos de funcionamento, por motivo de entupimento dos orifícios no topo das piramides.

Uma nova solução foi proposta - veja figura 22-c- na qual as regiões de acoplagem do cilindro ao rotor são mais reforçadas e existe um revestimento externo para diminuir os efeitos de flambagem, tornando a rotação mais estável, o que permite formação de jatos mais uniformes.

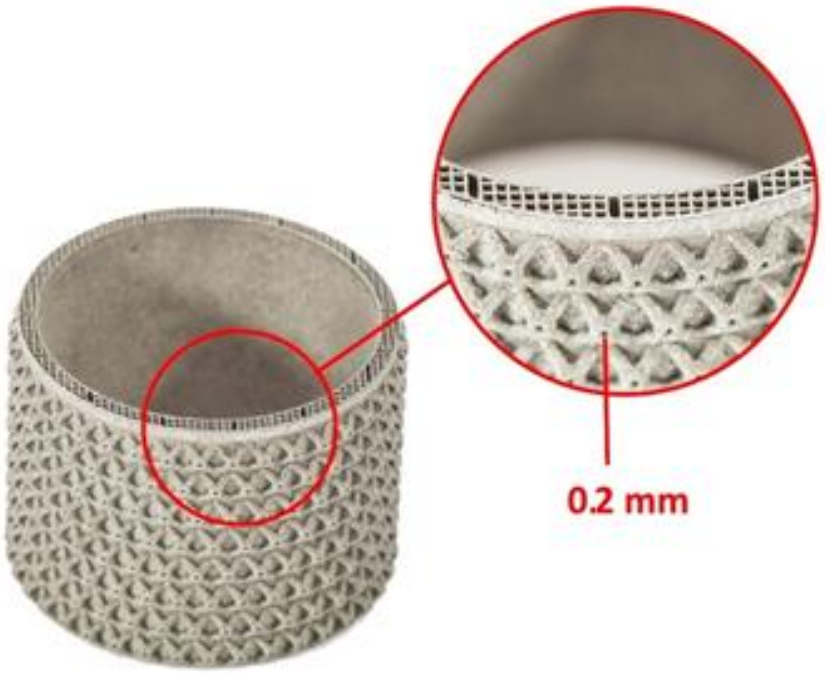


Figura 20 – Detalhe da peça confeccionada. (Foto do Autor)

a) b) c)

Figura 21 **- (a-c)** Detalhes do cilindro rotativo com pirâmides ocas. **(a)** Cilindro metálico **(b)** Fileiras circulares de pirâmides na superfície externa do cilindro e **(c)** Vista lateral das pirâmides. (Fotos do Autor)

a)

b)

c)

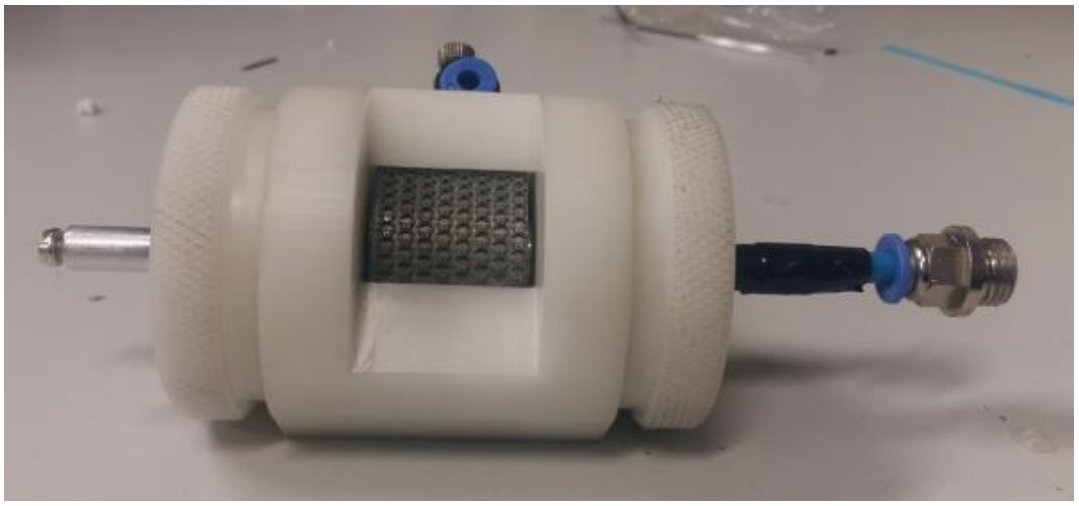


Figura 22 - **(a-c)** Modelos de cilindro rotativo usados durante o desenvolvimento do equipamento. (a) Primeiro modelo, manual (b) Modelo que apresentava instabilidades (c). Modelo atual (Fotos do Autor)

.

Ao comparar a geometria do injetor do processo convencional com o novo modelo estudado neste trabalho, foi identificado que as estruturas piramidais são muito mais refinadas que a ponta da agulha, o que permite formar nanofibras com diâmetros mais delgados e com menos defeitos. Observe a comparação na figura 23.

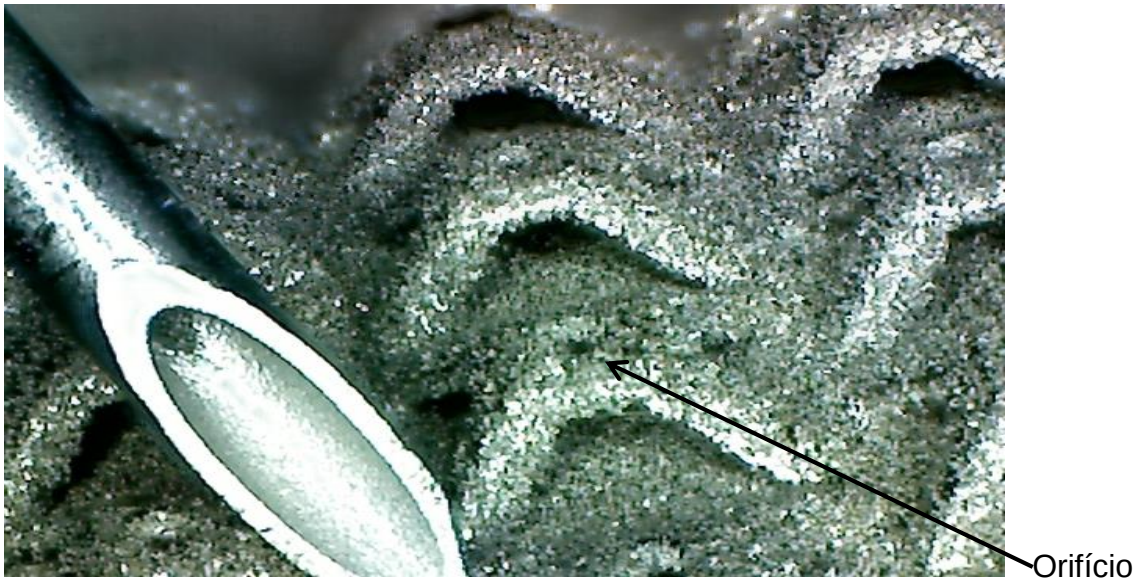


Figura 23 - Comparação entre pontas injetoras de solução do processo de eletrofiação convencional (esquerda) e eletrofiação avançada (direita) (Foto do Autor)

Para obtermos a foto da figura 23 foi utilizado o programa de máxima projeção (Helios) que integrou 15 fotos com diferentes focos em um única foto totalmente focalizada.

3.2 Desenvolvimento de Acessórios para Complementar o Funcionamento do Equipamento Principal

3.2.a Desenvolvimento de um Equipamento de Iluminação que Permita a Observação da Produção de Nanofibras em Tempo Real

3.2.a.1 - Objetivo

Desenvolver o método que possibilite observar as nanofibras durante a sua produção.

3.2.a.2 - Descrição da Metodologia Empregada

Durante a produção de nanofibras houve uma grande dificuldade em enxerga-las. Normalmente se observava apenas o papel alumínio que forrava o coletor ficar levemente turvo, opaco, e perdeu-se vários minutos até ter certeza que estava sendo formado uma manta de nanofibras. Para facilitar a visualização inicialmente forrou-se totalmente a caixa de vidro com papel camurça preto que absorveu totalmente as luzes do ambiente. Como fonte de luz utilizou-se uma lâmpada de LED RGB, que permitiu iluminar o ejetor com 256 cores e com 256 níveis de intensidade luminosa.

Figura 24 - Foto da lâmpada LED RGB utilizada (foto comercial)

3.2.a.3 - Resultados Obtidos, Observações e Discussão

Utilizando a luz azul pura, em sua máxima intensidade, conseguiu-se visualizar a produção de nanofibras durante todo o percurso entre o ejetor e o coletor.

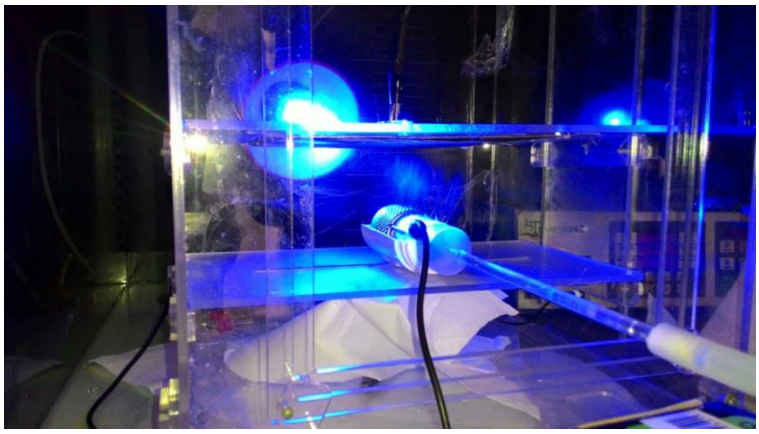


Figura 25 - Foto do equipamento produzindo nanofibras de PCL. Notem a quantidade de nanofibras que saem simultaneamente das pirâmides. (Foto do Autor)

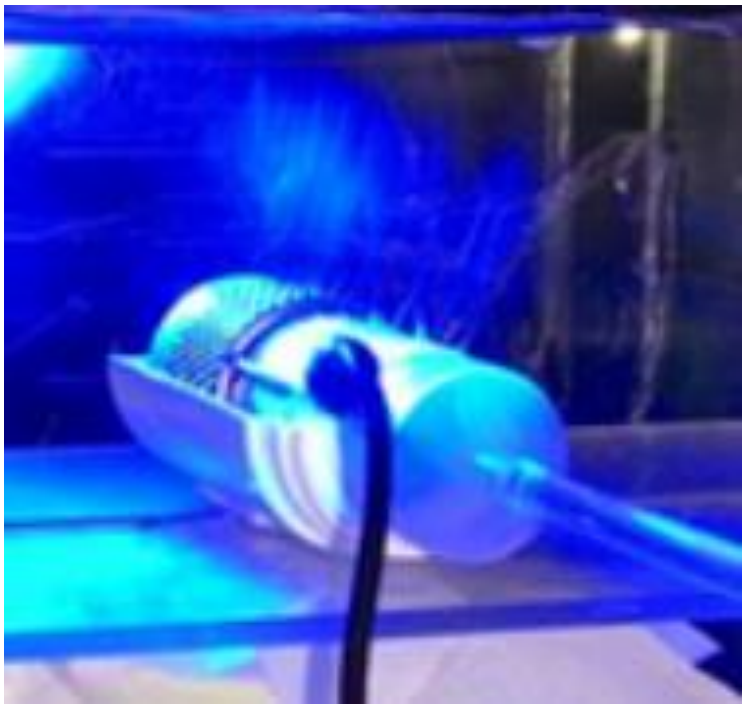


Figura 26 - Foi observado que a luz azul dos LEDs, nesse ângulo permite a visualização das nanofibras durante a sua produção. (Foto do Autor)

Nas figuras 25 e 26 vê-se uma nuvem de nanofibras saindo do topo das pirâmides. O cilindro esta girando no sentido anti-horário a cerca de 5 rotações por minuto. As nano fibras começão a ser produzidas assim que as pirâmides saem da solução, Ao chegar ao topo a produção de nanofibras é interrompida pois a maior parte da solução já foi ejetada.

3.2.b - Desenvolvimento de uma Fonte de Alta Tensão (até 65 KV)

3.2.b.1 - Objetivo

Desenvolver uma fonte de alta tensão que permitisse a produção de nanofibras através do método de eletrofiação avançada.

3.2.b.2 - Descrição da Metodologia Empregada

Foi desenvolvida uma fonte de alimentação a partir de flybacks cinescópios de TV a cores antigas.

Figura 27 - Detalhe externo da fonte de alta tensão desenvolvida (Foto do Autor)

Figura *28*- Detalhe interno da fonte de alta tensão (Foto do Autor)

3.2.b.3 - Resultados Obtidos, Observações e Discussão

O flyback permite a obtenção de cerca de 30.000 V. Foram ligados dois desses flybacks em série formando uma fonte que atingiu mais de 65.000 V. Para fazer a calibração utilizou-se um voltímetro de alta tensão que foi gentilmente cedido pelo Instituto de Física da Unicamp.

Para segurança do operador foi desenvolvido também um controle remoto via Bluetooth que utilizava um micro controlador Arduíno Nano, um servo motor e um aplicativo de modo a podermos controlar sua atenção através de um celular como será descrito detalhadamente no item 3.2.c.

3.2.c - Desenvolvimento de um Equipamento de Controle Remoto Bluetooth para Controle dos Equipamentos para Produção de Nanofibras

3.2.c.1 – Objetivo

Desenvolver um equipamento de controle remoto para controle dos equipamentos de produção de nanofibras dentro do gabinete seguro.

3.2.c.2 - Descrição da Metodologia Empregada

Foi desenvolvido um controle remoto utilizando um aplicativo de celular que controla, através de comunicação *Bluetooth*, a tensão da fonte de alimentação, a velocidade e o sentido de rotação, do conjunto do motor do dispositivo de eletrofiação avançada. Como receptor dos comandos do celular, foi utilizado uma placa *Bluetooth* acoplada a um micro controlador Arduino, que controla todos os dispositivos internos ao gabinete seguro (ver tópico 3.2.d) para eletrofiação (3.2.d).

Foram utilizados servo motores para movimentação dos potenciômetros da fonte de alimentação.

3.2.c.3 - Resultados Obtidos, Observações e Discussão

O aplicativo desenvolvido foi utilizado e mostrou-se eficiente e seguro.

Figura 29 - Tela do aplicativo de controle remoto em um celular. (Desenho do Autor)

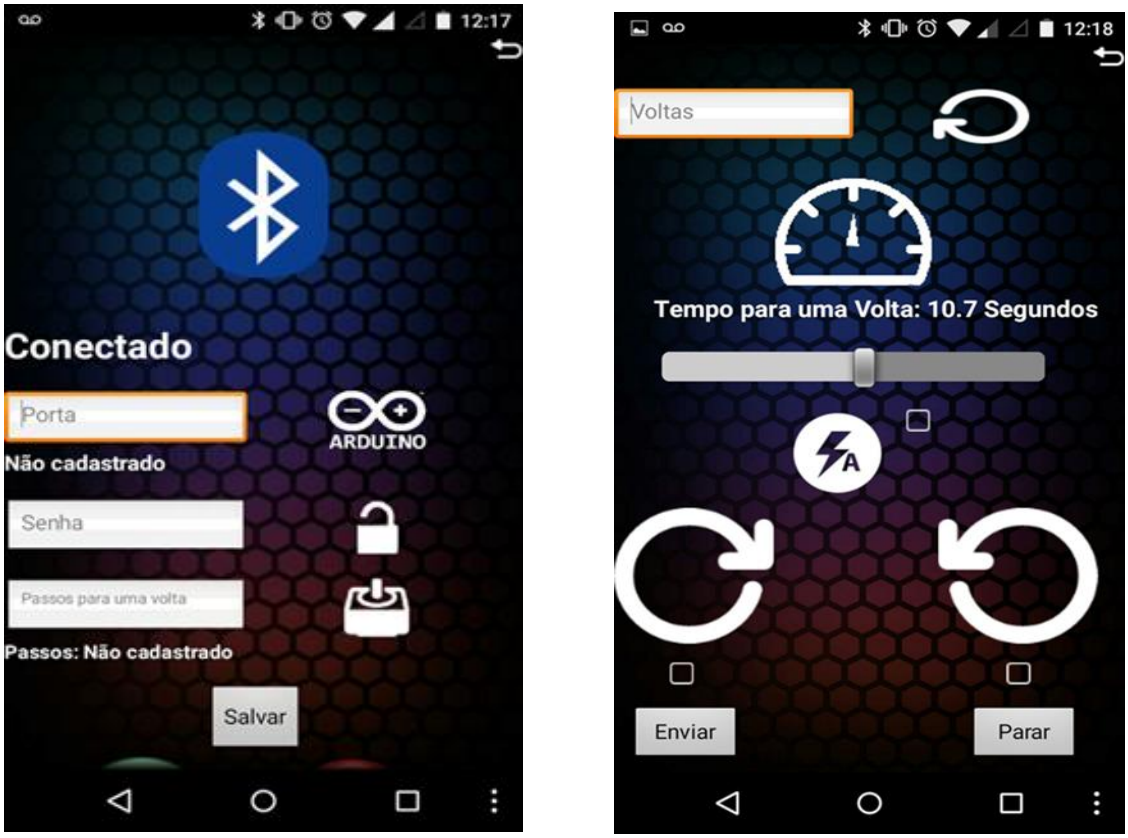


Figura 30 - Telas do aplicativo de controle remoto em um celular. (Desenho do Autor)

3.2.d - Desenvolvimento de um Equipamento Gabinete Seguro para Eletrofiação

3.2.d.1 – Objetivo

Desenvolver um gabinete com sistemas de segurança para permitir a operação de equipamentos para produção de nanofibras utilizando alta voltagem

3.2.d.2 - Descrição da Metodologia Empregada

Foi utilizado um gabinete de servidor de roteadores que possui uma porta de vidro temperado totalmente isolada. A parte metálica do gabinete foi devidamente aterrada para proteção de fugas de alta tensão. Na parte interna, onde são produzidas as nanofibras foi desenvolvido uma outra caixa de vidro temperado para isolar o ambiente de confecção de nanofibras de todas as partes metálicas do gabinete.

3.2.d.3 - Resultados Obtidos, Observações e Discussão

O gabinete desenvolvido possui dupla isolação de vidro temperado, sendo a primeira formada pela porta externa e uma caixa interna de vidro temperado de 6mm de espessura. Todos os componentes metálicos foram aterrados. O gabinete provou ser eficiente e seguro para a produção de nanofibras.

As figuras 31 e 32 apresentam respectivamente detalhes da parte externa do gabinete e da caixa interna de vidro temperado do gabinete.

Figura 31 - Detalhe externo do gabinete seguro desenvolvido (Foto do Autor)

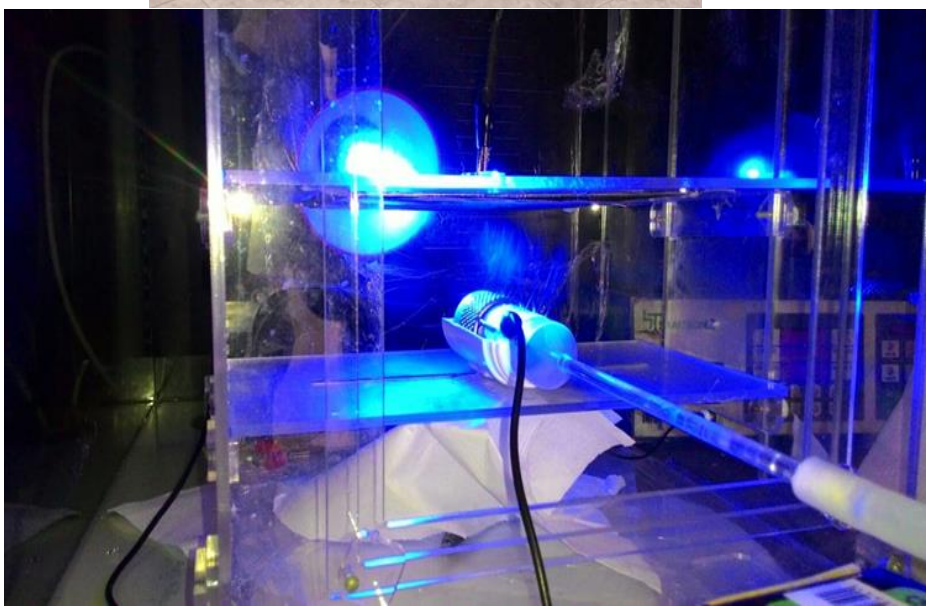


Figura 32- Detalhe da caixa interna de vidro temperado (Foto do Autor)

3.2.e - Desenvolvimento de um Dispositivo de Carga Continua de Polímero

3.2.e.1 – Objetivo

Desenvolver um dispositivo que permita a carga continua de polímero e facilite a desmontagem do conjunto para limpeza das pirâmides ocas.

3.2.e.2 - Descrição da Metodologia Empregada

Desenvolveu-se o projeto utilizando-se o software de modelagem 3D Inventor da Autodesk. Posteriormente o dispositivo foi confeccionado em nylon usinado.

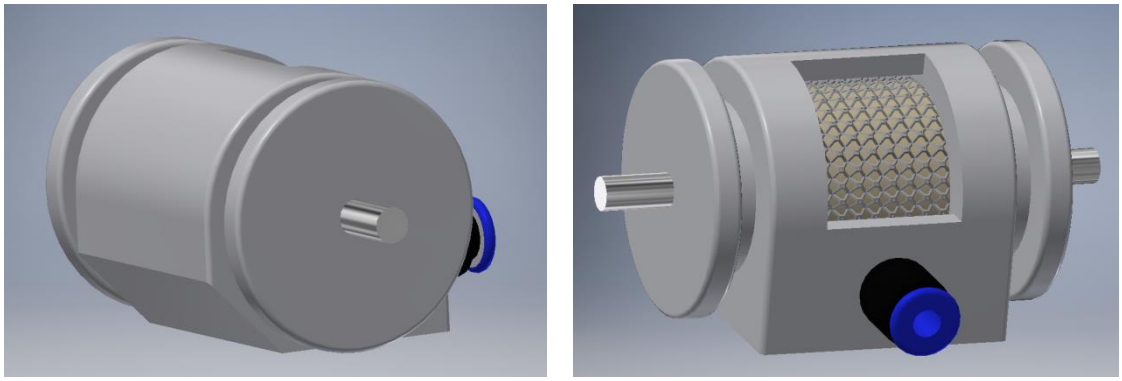


Figura 33 – Detalhes do projeto em 3D no software Inventor da Autodesk. (Desenho do Autor)

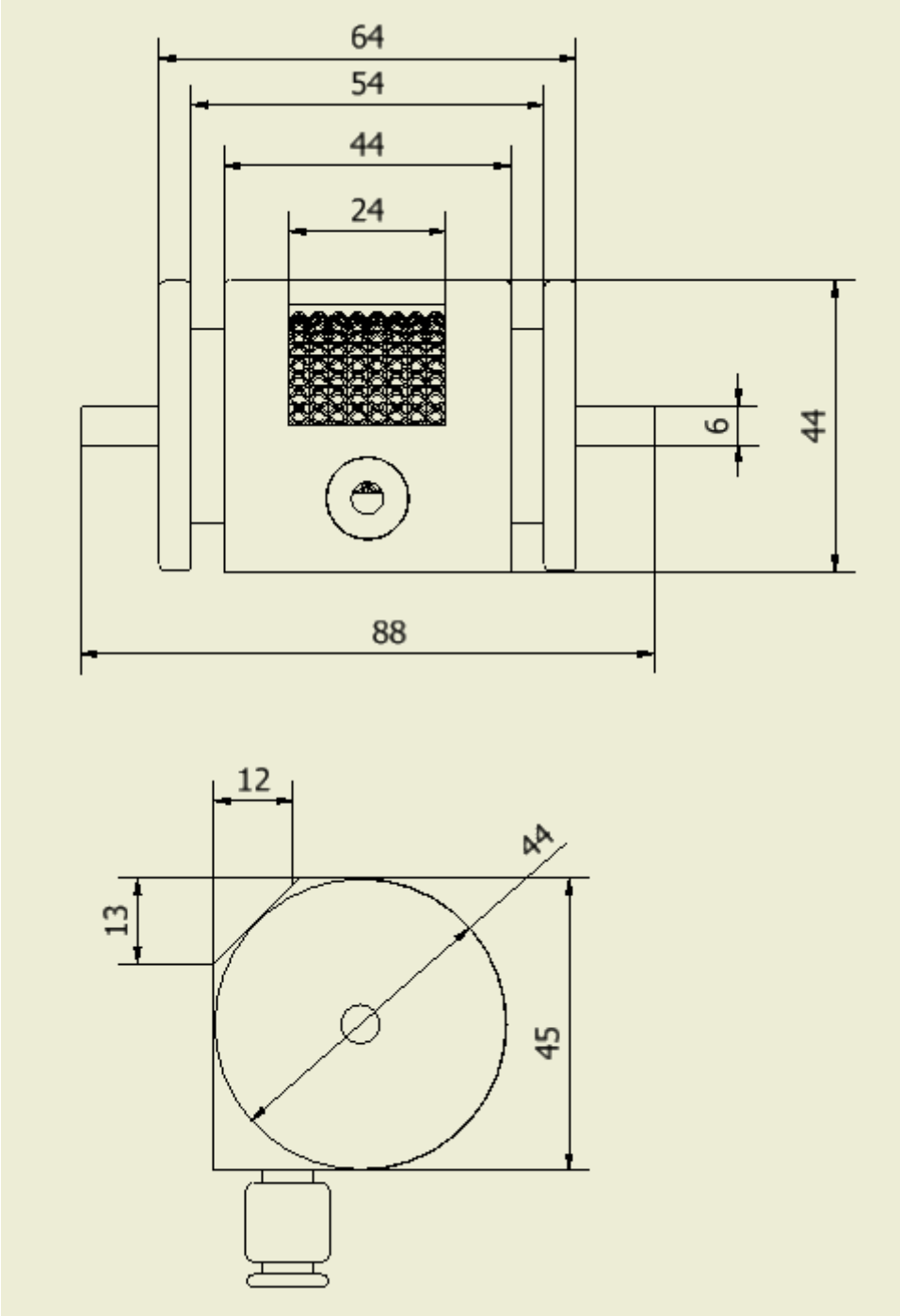


Figura 34 – Desenho ilustrativo do dimensional do dispositivo. (Desenho do Autor)

3.2.e.3 Resultados Obtidos, Observações e Discussão

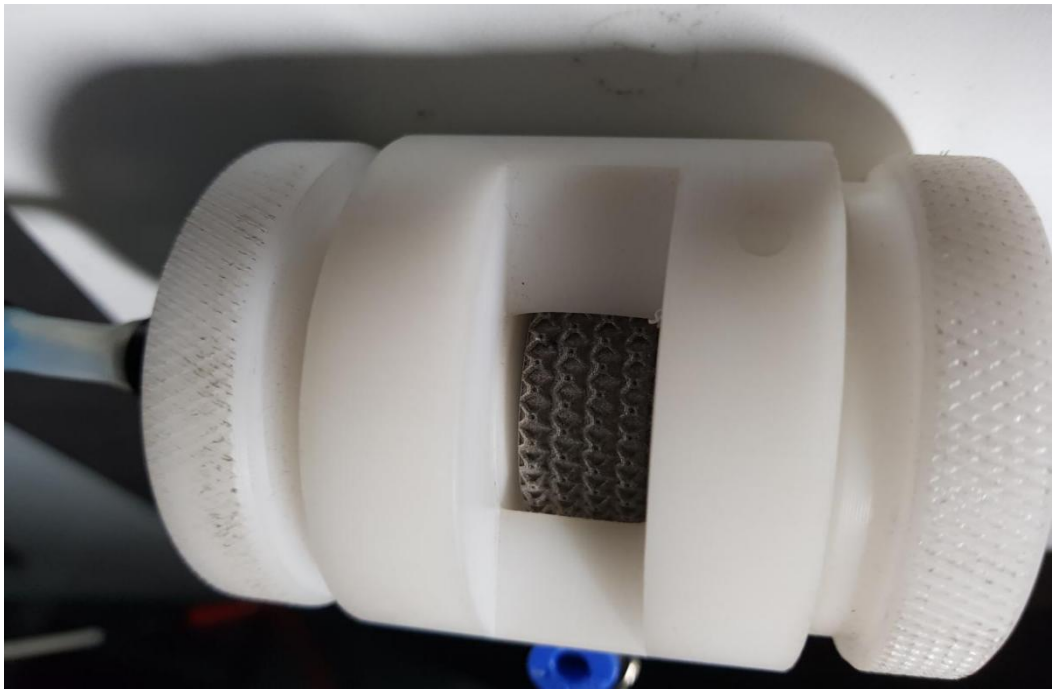


Figura 35 - Foto do detalhe da abertura que expõe as pirâmides ocas. (Foto do Autor)

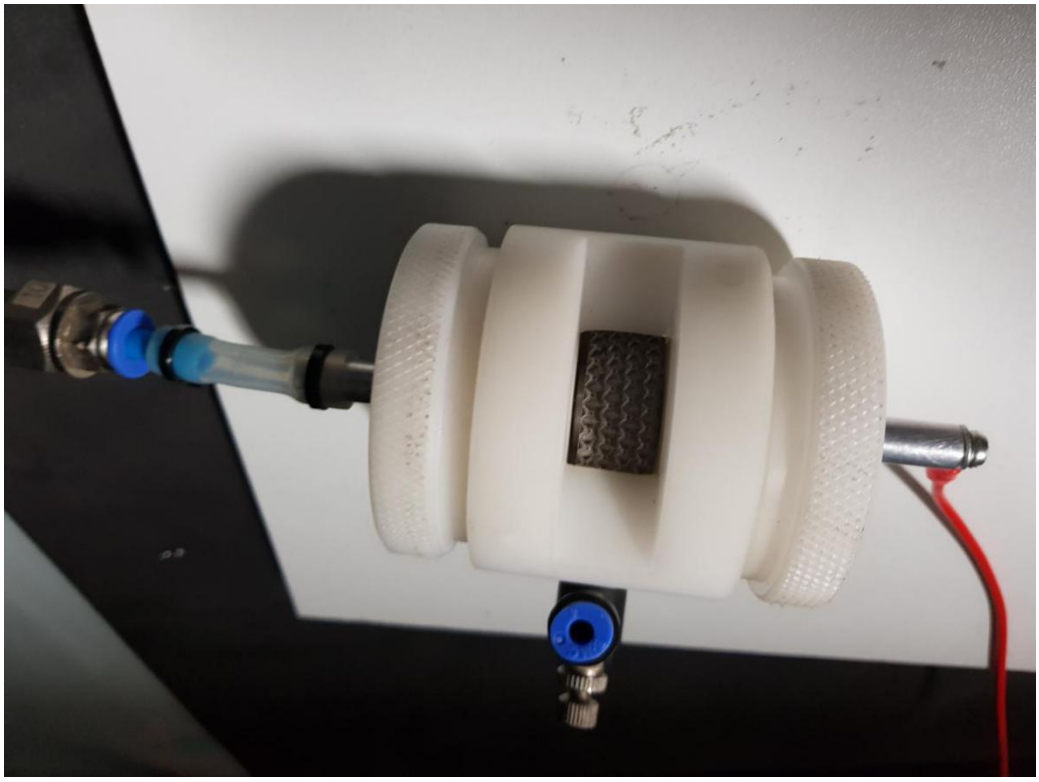


Figura 36 - Foto do dispositivo usinado montado com seu acoplamento elástico. (Foto do Autor)

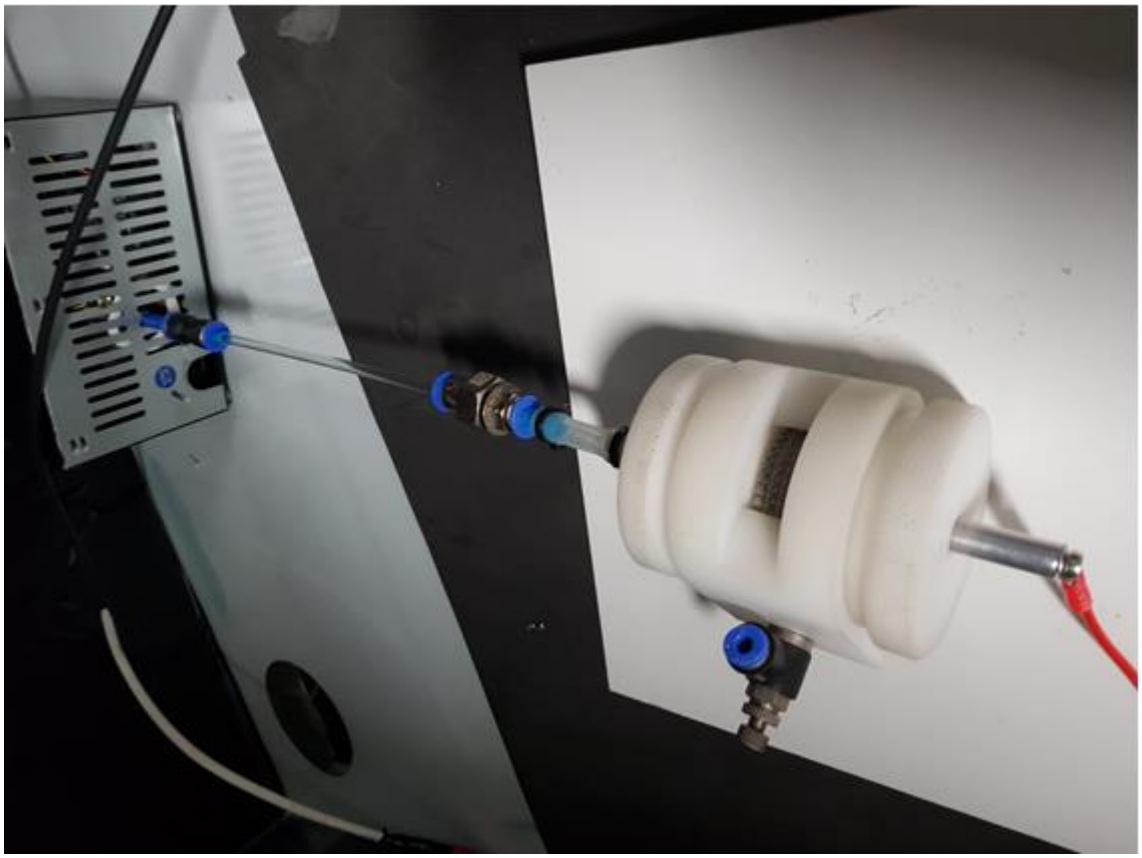


Figura 37 – Foto do disposto acoplado ao motor através do eixo de vidro (Foto do Autor)

Tendo sido completamente desenhado em 3D, o dispositivo foi usinado em nylon, com um eixo em aço e alumínio, onde foram montados os anéis com as pirâmides ocas. No dispositivo foram feitos 3 acoplamentos o primeiro diretamente ligado ao eixo através de um cabo de alta tensão, a fonte carregava com o potencial adequado a eletrofiação as pirâmides ocas. O segundo acoplamento através de uma válvula de engate rápido permitia a entrada continua de polímero e regulava o seu fluxo. O terceiro acoplamento consistia de um tubo de silicone flexível para alinhar o eixo do dispositivo ao eixo do motor e através de um eixo de vidro estava ligado ao motor de corrente contínua que estava em um gabinete aterrado. O eixo de vidro era necessário para isolar a alta tensão, de milhares de volts, do eixo que energiza os anéis de pirâmides ocas, do motor que está em um gabinete e carcaça aterrada.

3.2.f - Desenvolvimento de um Equipamento para Obtenção de Nanofibras Alinhadas

3.2.f.1- Objetivo

Desenvolvimento de um equipamento para obtenção de nanofibras alinhadas para pesquisa de aplicações em ligamentos e tendões.

3.2.f.2 - Descrição da Metodologia Empregada

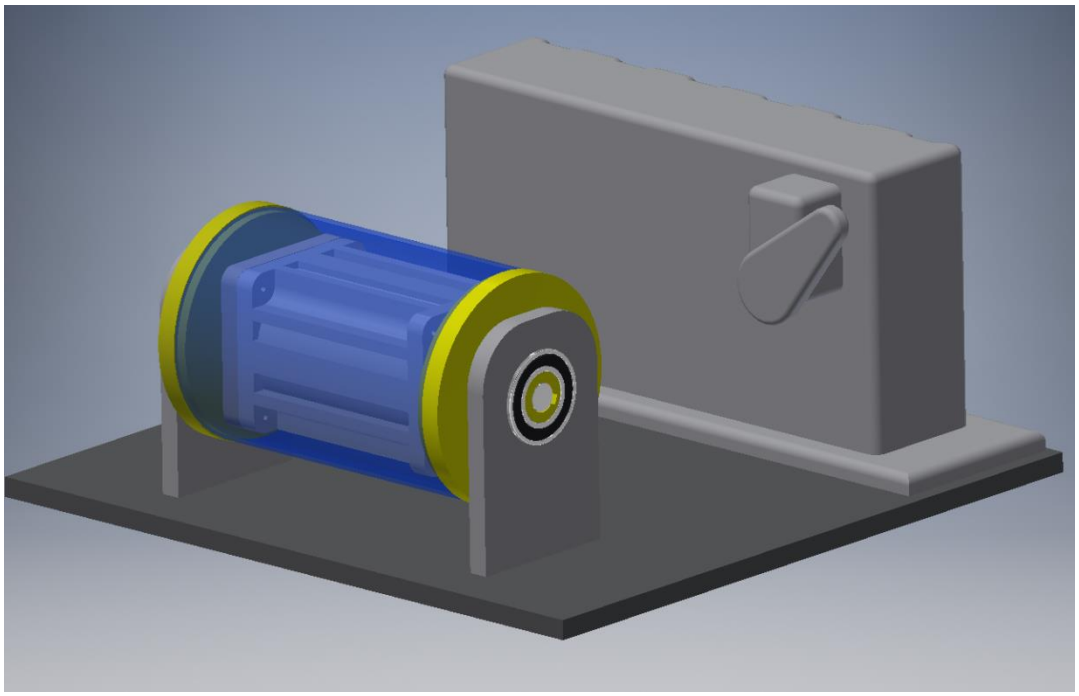


Figura 38 – Projeto em 3D do dispositivo coletor de nanofibras alinhadas (Desenho feito pelo Autor)

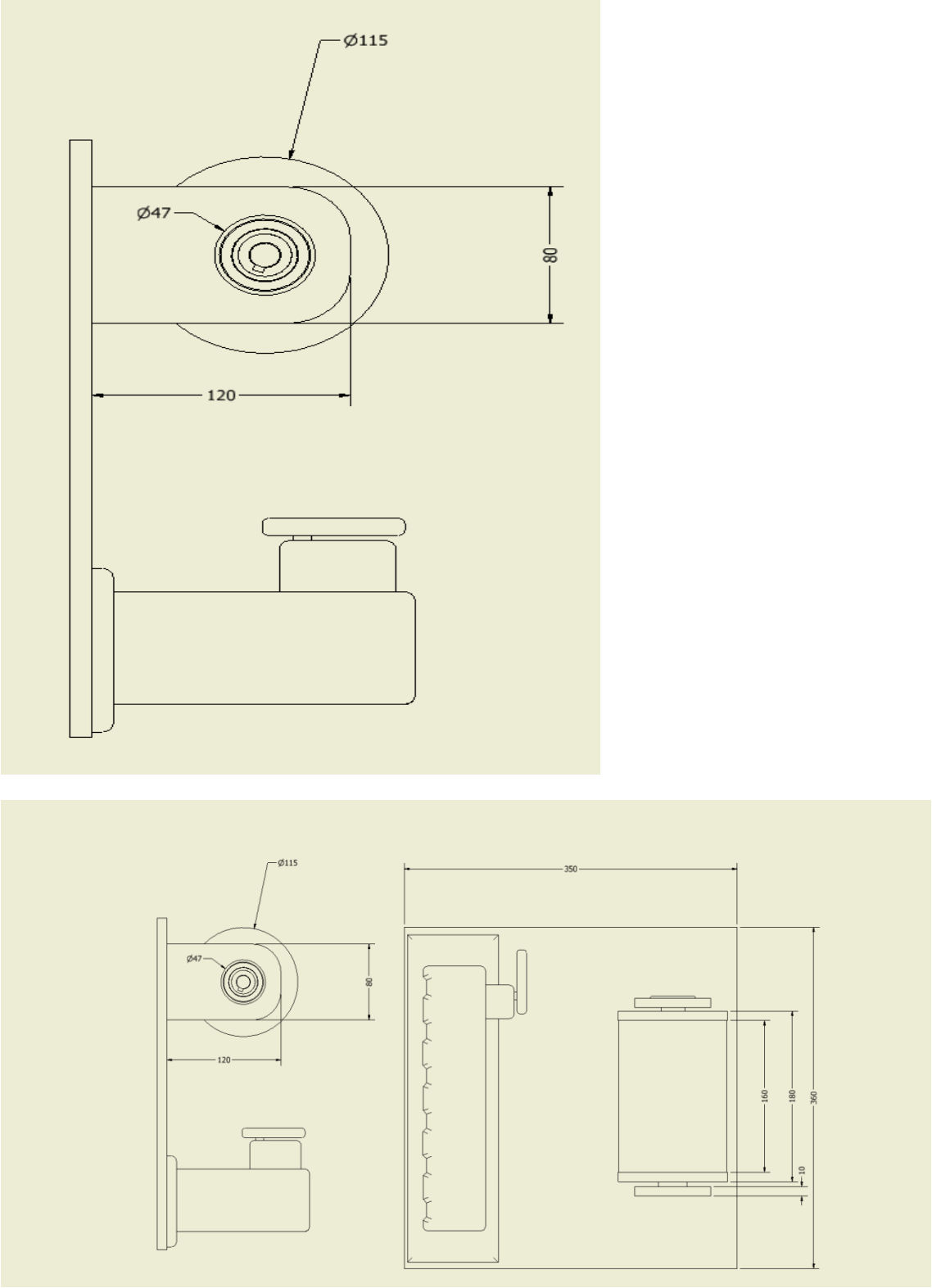


Figura 39 – Desenho Ilustrativo do Dimensional do Dispositivo. (Desenho Feito do Autor)

3.2.f.3 Resultados Obtidos, Observações e Discussão

Figura 40 – Foto do equipamento coletor de nanofibras alinhadas. (Foto do Autor)

Após completar o projeto totalmente feito em 3D utilizando-se o programa Autodesk Inventor, foi confeccionado o dispositivo, por usinagem e montagem, para coletar as nanofibras em um tambor rotativo.

O dispositivo consta de uma base feita em poliacetal, devido à proximidade da alta tensão do ejetor das nanofibras, e também, para que o tambor metálico de aço inox seja a peça aterrada mais próxima do ejetor.

Esse tambor de aço inox gira em alta velocidade (3000 rpm), devido a um servo motor que se encontra em seu interior. A velocidade de rotação é controlada por um controlador eletrônico e sua precisão e estabilidade mostraram-se excelente. Em sua velocidade máxima de 3000 rpm sua variação não chega a 1%. Foi balanceado também esse rotor de maneira a se te um mínimo de vibrações. Ainda não foram efetuados experimentos com a coleta de nanofibras.

3.3 - Comparação entre Nanofibras de PCL Eletrofiadas pelo Equipamento Tradicional e pelo Equipamento Avançado

3.3.1 - Objetivo

Comparar nanofibras eletrofiadas pelo método da seringa e pelo método do cilindro de pirâmides ocas. A figura 41 apresenta um fluxograma mostrando a metodologia das pesquisas sobre a comparação entre os dois processos. Para a determinação dos parâmetros da eletrofiação utilizados nesses experimentos, foram consultadas dissertações e teses de alunos da FEM- UNICAMP, que trabalharam nessa área (RAMOS,2011; PEREA,2011; BRITO, 2013; RIGON, 2013; SALLES, 2013; ALMEIDA R, 2014; PEREA, 2015; PINTO, 2015, NASCIMENTO, 2015; SALLES, 2017).

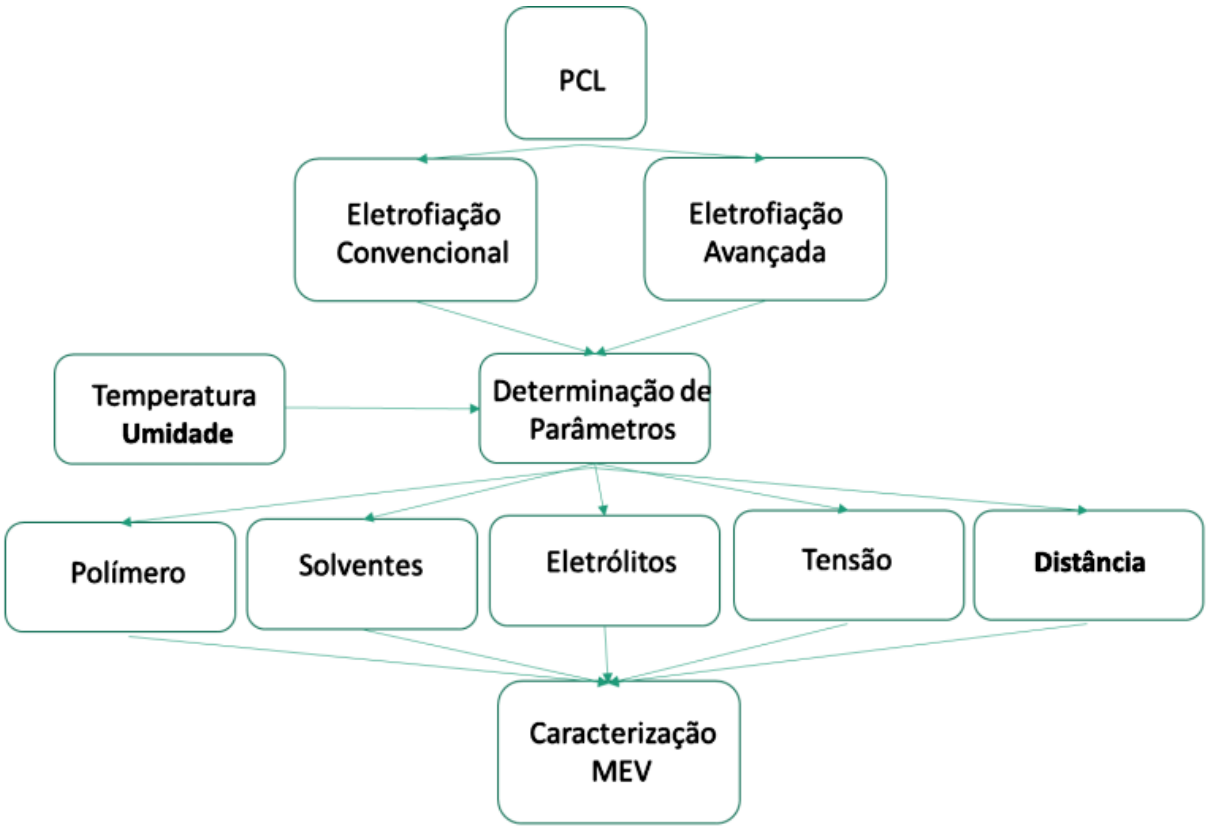


Figura 41 - Metodologia de Pesquisas com PCL (Desenho feito pelo Autor)

3.3.2 - Descrição da Metodologia Empregada

Foi utilizado o método de eletrofiação tradicional (seringa), o método de eletrofiação avançada (pirâmides) de produção de nanofibras e experimentado diferentes concentrações de PCL.

Tabela 3 - Algumas Experiências de eletrofiação com PCL pelo Método da Seringa (Fonte: Feito pelo Autor)

Manta	PCL	Clorofórmio	Acetona	Distância	Tensão	Vazão	Volume	Tempo
Ø	33,30 %	33,30 %	33,30 %	Sem formação de fibras				
Ø	33,30 %	66,70 %	0,00%	Sem formação de fibras				
8	13,50 %	64,50 %	22,00 %	160 mm	12 kV	20 ml/h	3 ml	22 min
9	13,50 %	64,50 %	22,00 %	160 mm	12 kV	20 ml/h	3 ml	22 min
10	20,00 %	59,70 %	20,30 %	160 mm	15 kV	23 ml/h	2,8 ml	18 min
11	20,00 %	59,70 %	20,30 %	160 mm	15 kV	23 ml/h	2,4 ml	16 min
12	18,00 %	61,50 %	20,50 %	160 mm	15 kV	23 ml/h	2,2 ml	16 min
13	18,00 %	61,50 %	20,50 %	160 mm	15 kV	23 ml/h	3,6 ml	25 min
14	15,00 %	63,75 %	21,21 %	160 mm	15 kV	20 ml/h	4,4 ml	35 min
15	13,50 %	43,25 %	43,25 %	160 mm	15 kV	2 ml/h	1,2 ml	90 min
16	13,50 %	43,25 %	43,25 %	160 mm	15 kV	2 ml/h	1,6 ml	120 min
17	13,50 %	43,25 %	43,25 %	160 mm	15 kV	2 ml/h	1,5 ml	90 min
18	13,50 %	43,25 %	43,25 %	160 mm	15 kV	2 ml/h	1,8 ml	120 min
19	13,50 %	43,25 %	43,25 %	160 mm	20 kV	2 ml/h	1,4 ml	120 min

Ø	25,00 %	56,25 %	18,75 %	Sem formação de fibras. Deposição de um jato de solução no coletor

Tabela 4 - Algumas Experiências com PCL pelo Método das Pirâmides (Fonte: Feito pelo autor)

Teste	PCL	Clorofórmio	Acetona	Posição	Distância	Tensão	Tempo por volta	Resultado
1	33,30%	33,30%	33,30%	45° e 90°	Entre 15 e 100 mm	Entre 20 e 30 Kv	Entre 0,2 e 20 s	Ø
2	33,30%	66,70%	0,00%					"gotas" depositadas no coletor sem secagem completa
3	13,50%	64,50%	22,00%		Entre 15 e 50 mm			
4	20,00%	59,70%	20,30%	45°				Formação de nanofibras
5	18,00%	61,50%	20,50%	45° e 45° paralelo				
6	15,00%	63,75%	21,21%					
7	13,50%	43,25%	43,25%					Ø
8	25,00%	56,25%	18,75%					Atração da solução polimérica, porém sem formação ou deposição

3.3.3 - Resultados Obtidos, Observações e Discussão

Foram feitos diversos experimentos utilizando-se o polímero PCL em diferentes soluções cada experimento está detalhado especificamente em cada capítulo indicados na descrição da metodologia empregada do capítulo 3.8.

O PCL mostrou-se ser o polímero de mais fácil eletrofiação embora tenha sido adaptado as concentrações de polímeros e solventes de acordo com cada aplicação específica. Pelo método da seringa não houve dificuldades em fazer nanofibras de acordo com as indicações tradicionais.

Pelo método da pirâmide, o PCL demonstrou ser polímero eficiente, mas a evaporação do solvente rapidamente pela grande área exposta ao ar para confecção de nanofibras em larga escala alterava rapidamente sua viscosidade e concentração ocasionando entupimento das pirâmides em curtos espaços de tempo devendo, portanto, ser melhor desenvolvido.

As nanofibras de PCL confeccionadas pelo Método Tradicional de Eletrofiação e pelo novo método desenvolvido nos laboratórios da Engenharia Mecânica precisam ser avaliados para garantir integridade funcional e confiabilidade dos procedimentos e produto final.

Para este trabalho, decidimos avaliar as nanofibras em relação a pesagem das amostras, que determina a razão de produtividade das fibras e a identificação do diâmetro médio das nanofibras, através de microscopia eletrônica de varredura e uso de software ImageJ, que calcula a distribuição dos diâmetros por amostragem.

A figura 42 apresenta os histogramas da distribuição do diâmetro das nanofibras de PCL obtidas pelo método de eletrofiação convencional, e as imagens por microscopia eletrônica de varredura (a) e também o histograma das amostras obtidas pelo método avançado, assim como suas imagens em MEV (b). Observa-se que a média dos diâmetros das nanofibras obtidas pelo método avançado foram menores que as do método tradicional.

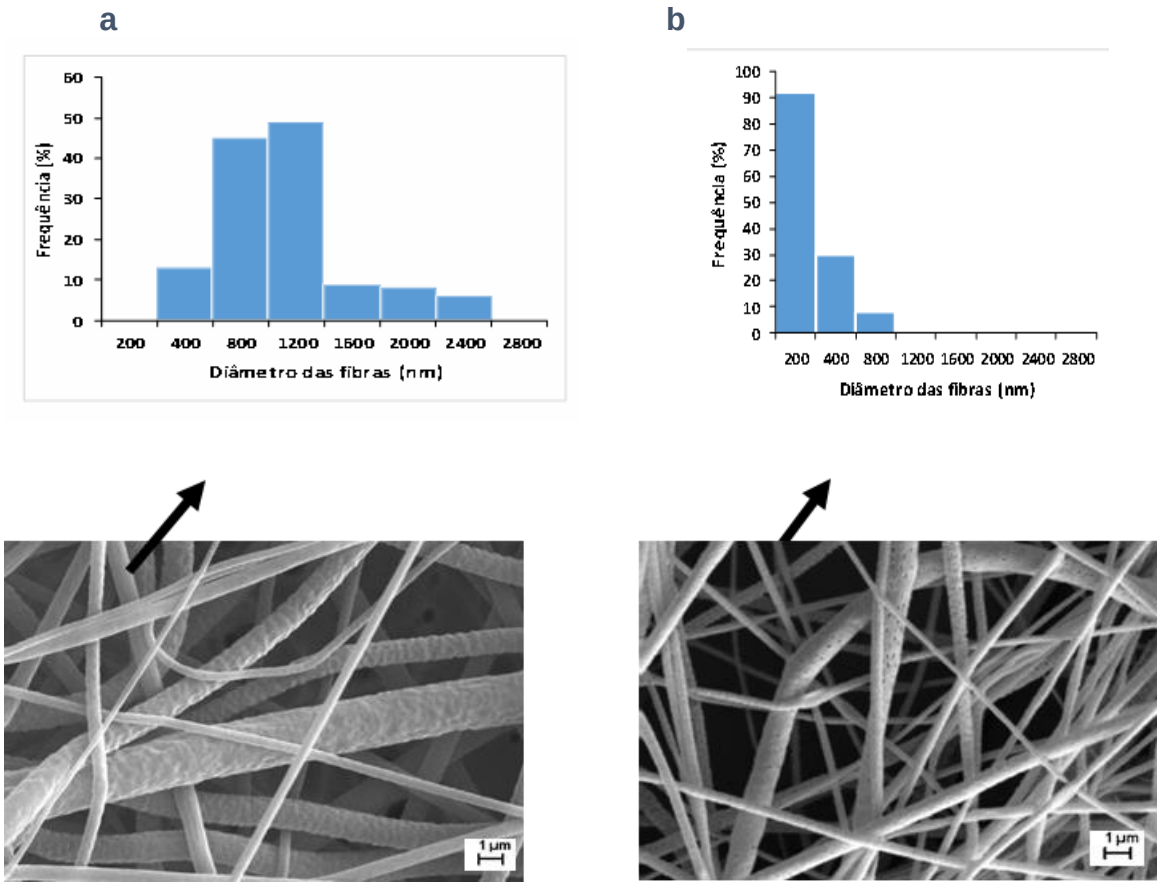


Figura 42 - (a) Nanofibras obtidas pelo método convencional de eletrofiação com seringa e (b) nanofibras produzidas por meio do novo método em processo de depósito de patente. Detalhe do histograma com o diâmetro médio das nanofibras (MEV e Gráficos do Autor)

3.4 - Pesquisa para Obtenção de Nanofibras Orientadas a Um *Biodesing*

3.4.1 - Objetivo

Obter nanofibras em forma de um desenho específico (Biodesing), como por exemplo os néfrons dos rins ou uma cadeia de ramificações nervosas ou vasculares.

3.4.2 - Descrição da Metodologia Empregada

Para obtenção de nanofibras em um formato específico (biodesign), foi desenvolvido o método cujo coletor metálico tem o formato específico desejado. O método aqui proposto permite a confecção de micro e nano estruturas de alta complexidade utilizando para isso o alvo metálico (1) confeccionado por um processo qualquer que permita alta definição de contornos e pequenas dimensões de detalhes, por exemplo, foto corrosão ou corte a laser de chapas metálicas utilizadas na confecção de adornos. Este alvo metálico (1) é confeccionado com o formato e a dimensão do objeto da manta de nanofibra desejada. Por exemplo, uma fatia de um fígado (semelhante a uma fatia de uma tomografia ou ressonância magnética) incluindo todos as suas cavidades onde seriam formadas as veias e artérias. Este novo alvo (1) contém todas as informações de detalhes da manta de nanofibra desejadas. Quando conectada a um dos polos da fonte de alimentação (9) formará intenso e completo campo elétrico tridimensional que atrairá as nanofibras coletando-as sobre sua superfície formando a manta de nanofibra no formato desejado. Experiências realizadas demonstram que tal procedimento consegue reproduzir complexos desenhos com precisão da ordem de centésimos de milímetro.

Após a deposição da camada de nanofibra sobre o alvo metálico (1) na espessura desejada destaca-se por extração mecânica, a manta de nanofibra resultante preservando-se suas dimensões e conformações geométricas. Para facilitar este procedimento utiliza-se um tratamento superficial antiaderente tal como a deposição de por exemplo ouro ou teflon sobre a superfície do alvo metálico (1).

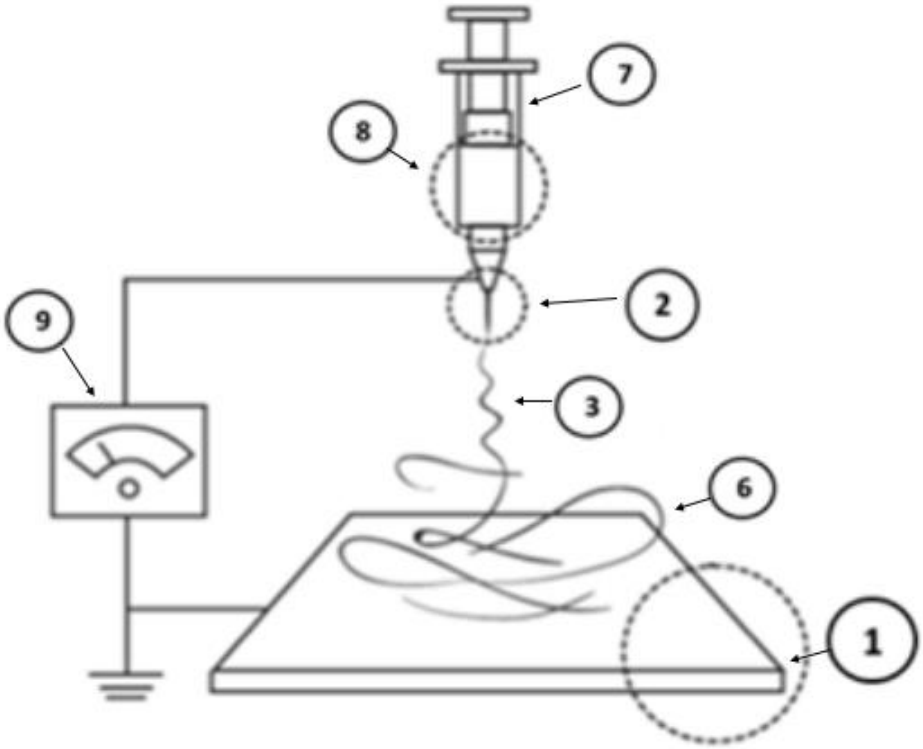


Figura 43 – Diagrama de eletrofiação tradicional (desenho do Autor)

O sistema de eletrofiação mundialmente conhecido, é composto de um alvo metálico (1), uma agulha (2), uma seringa (7) e uma fonte de alta tensão (9). Dentre da seringa (7) é colocado uma solução de um polímero, por exemplo o PLA (poli ácido lático) dissolvido em um determinado solvente, por exemplo clorofórmio em uma proporção adequada, de maneira a criar uma viscosidade compatível com o processo de eletrofiação. Esta seringa (7) é colocada sobre um infusor automático que utiliza uma velocidade de infusão extremamente baixa, da ordem de alguns mililitros por hora. A fonte de alimentação (9), de alta tensão, da ordem de dezenas de milhares de volts é conectada em seu polo positivo na agulha do infusor (2) e seu polo negativo no alvo metálico (1). O campo elétrico gerado pela fonte de alta tensão (9) entre a agulha (2) e o alvo metálico (1) é suficiente para extrair um fio do polímero (8) que se acumula na ponta da agulha (2). Este fio tem dimensões da ordem de algumas centenas de nanômetros (nanofio). O nanofio (3) solidifica-se no ar e é atraído pelo alvo metálico (1) sobre o qual se deposita, sob a forma de uma manta de nanofibras.

As dimensões e propriedades físicas e químicas dependerão de vários fatores tais como, tipo do polímero utilizado, tensão aplicada, solvente utilizado, temperatura, pressão e umidade do meio ambiente, etc.

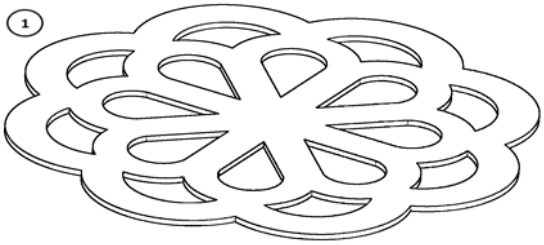


Figura 44- Vista do molde alvo metálico de forma complexa (1). (Desenho do Autor)

Exemplo de um alvo metálico (1) com formas geométricas complexas e de dimensões reduzidas, por exemplo diâmetro total de 05 milímetros.

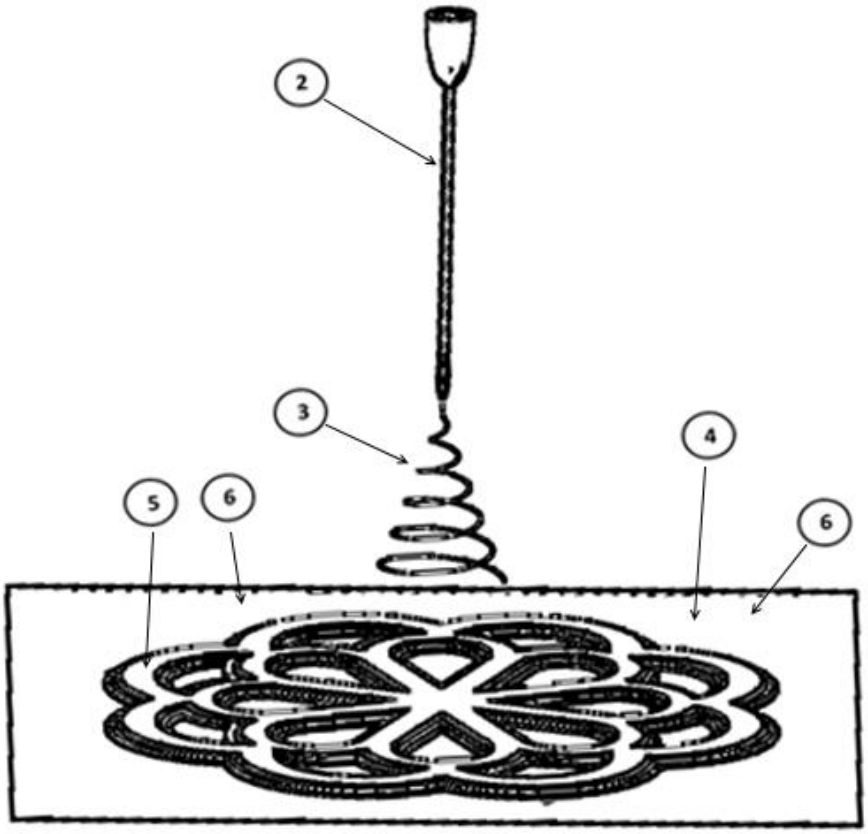


Figura 45 - Deposição de nanofibras (Desenho do Autor)

O alvo metálico (1) confeccionado por um processo qualquer que permita alta definição de contornos e pequenas dimensões de detalhes, por exemplo, foto corrosão ou corte a laser de chapas metálicas utilizadas na confecção de adornos. Este alvo metálico (1) é confeccionado com o formato e a dimensão do objeto da manta de nanofibra desejada. Por exemplo, uma fatia de um fígado (semelhante a uma fatia de uma tomografia ou ressonância magnética) incluindo todos as suas cavidades onde seriam formadas as veias e artérias. Este novo

alvo (1) contém todas as informações de detalhes da manta de nanofibra desejadas quando conectada a um dos polos da fonte de alimentação (9) formará intenso e complexo campo elétrico tridimensional que atrairá as nanofibra coletando-as sobre sua superfície formando a manta de nanofibra no formato desejado. Experiências realizadas demonstram que tal procedimento consegue reproduzir complexos desenhos com precisão da ordem de centésimos de milímetro.

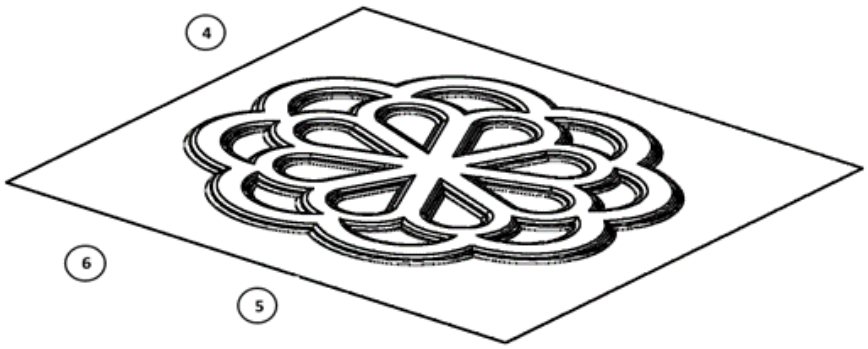


Figura 46 - Manta de nanofibras (6) recobrindo alvo metálico (1) (desenho do Autor)

Como resultado da deposição das nanofibras sobre a superfície do alvo metálico (1), obtemos uma manta de nanofibras (6) com características de pequena espessura nas lacunas e locais onde não há metal, e grande espessura sobre a superfície metálica. Esta manta de grande espessura acompanha, por tanto o formato do alvo metálico.

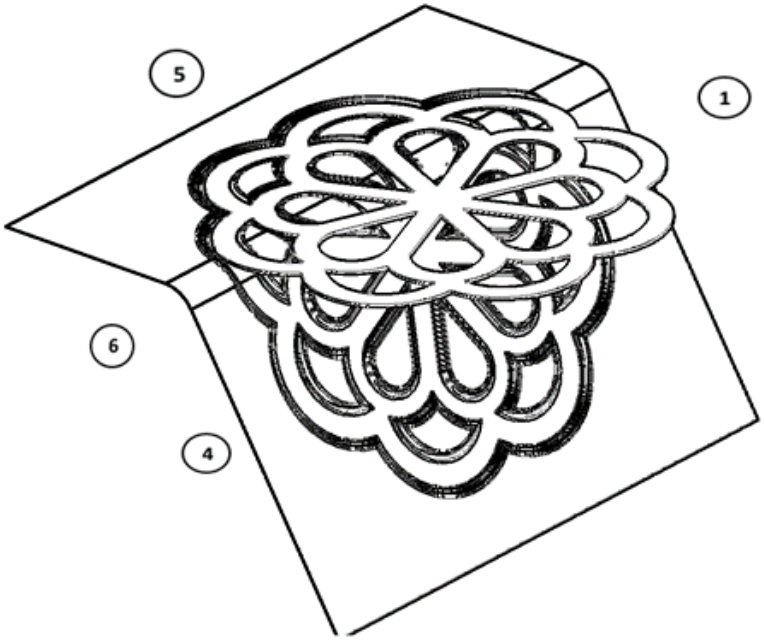


Figura 47 - Retirada da manta de nanofibras (6) vista por cima do alvo metálico (1) (Desenho do Autor)

Após a deposição da camada de nanofibras sobre o alvo metálico (1) na espessura desejada destaca-se por extração mecânica, a manta de nanofibra resultante preservando-se suas dimensões e conformações geométricas. Para facilitar este procedimento utiliza-se um tratamento superficial antiaderente tal como a deposição de por exemplo ouro ou teflon sobre a superfície do alvo metálico (1).

3.4.3 - Resultados Obtidos, Observações e Discussão

Como demonstrado nas fotos 49-54, foi conseguido com grande precisão a cópia do coletor com nanofibras. Os desenhos obtidos mostram detalhes de centésimos de milímetros, mostrando ser possível, portanto a obtenção de nanofibras no formato desejado.

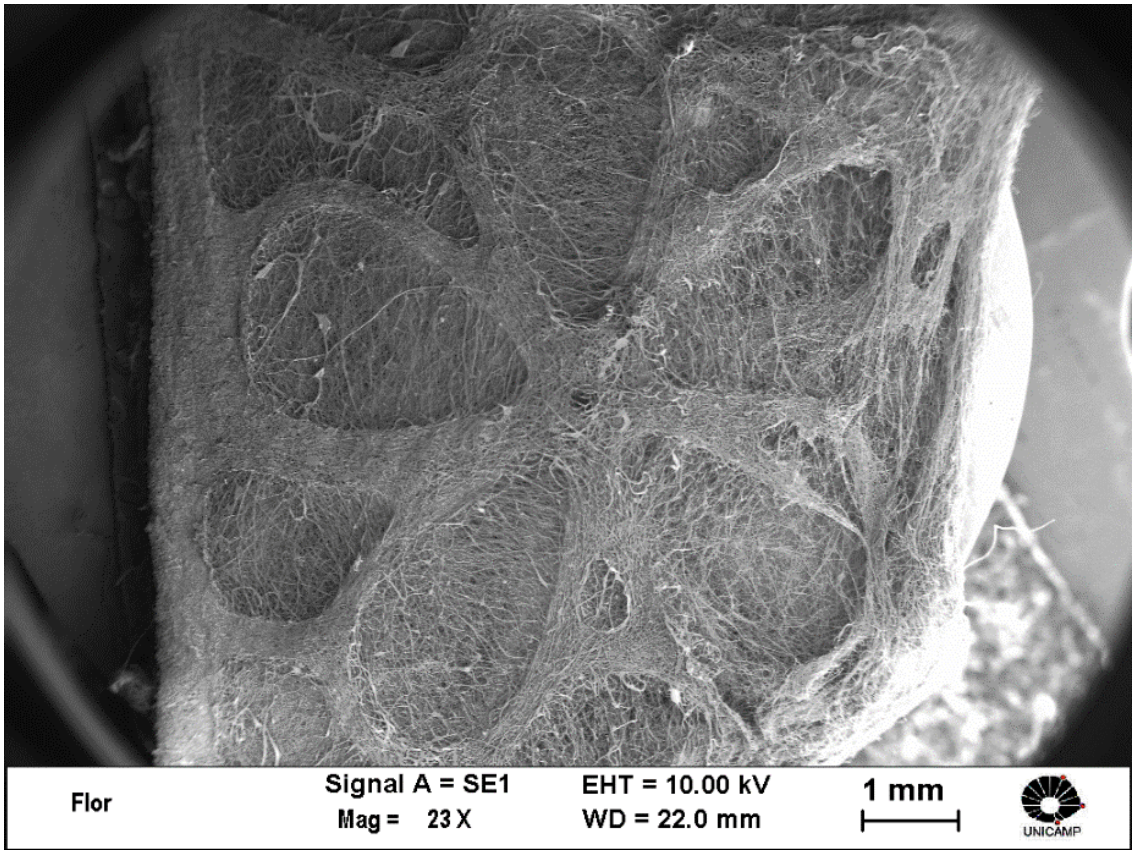


Figura 48 - MEV de nanofibras em formato de flores (Fonte: Feito pelo Autor)

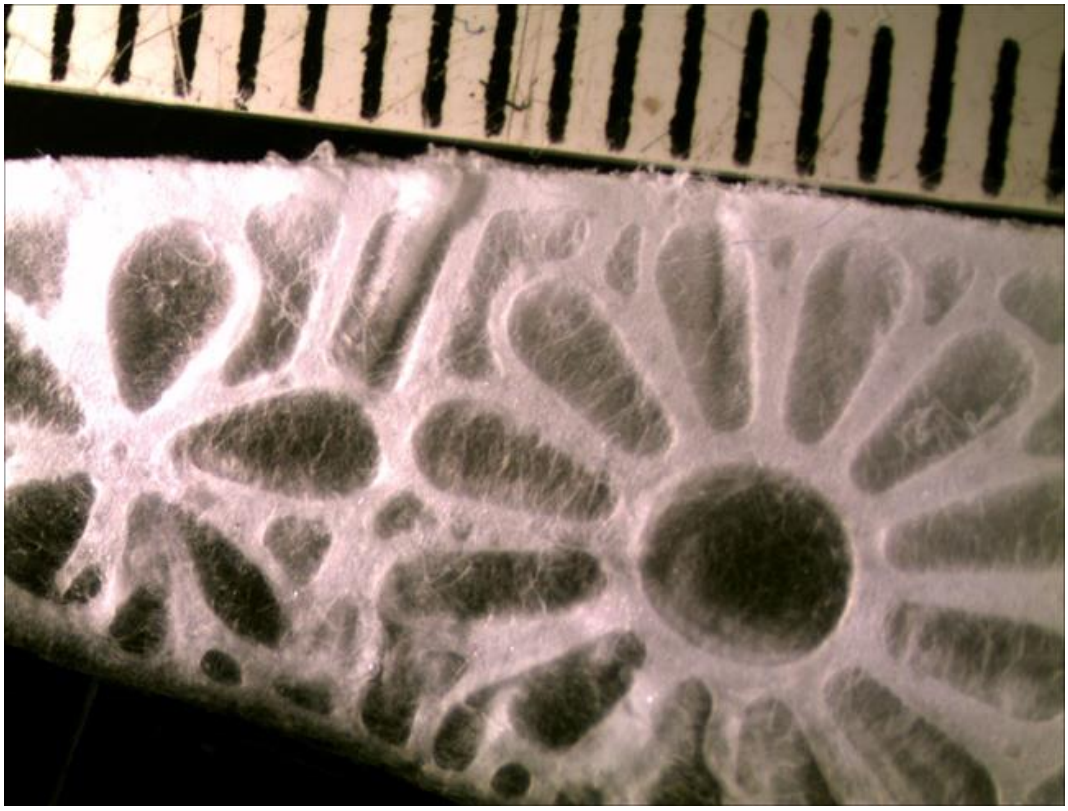


Figura 49 - Microscopia óptica de nanofibras em formato de flor (Fonte: Feito pelo Autor)

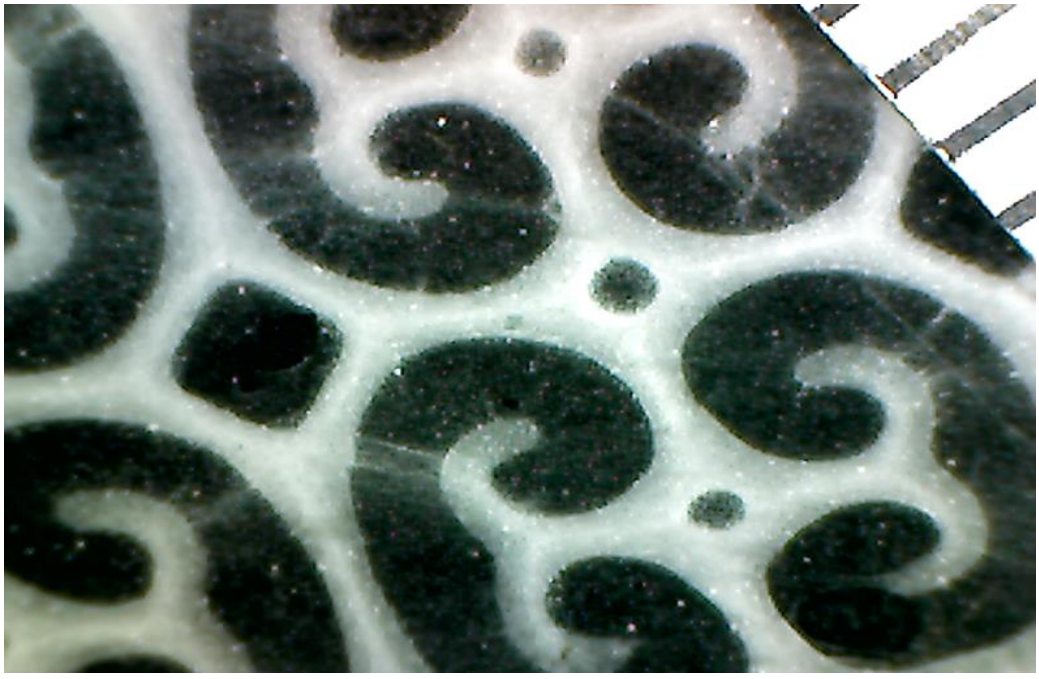


Figura 50 - Nanofibras em formato de Cápsula de Bowmann com detalhes centésimo de milímetro(Fonte: Feito pelo Autor)

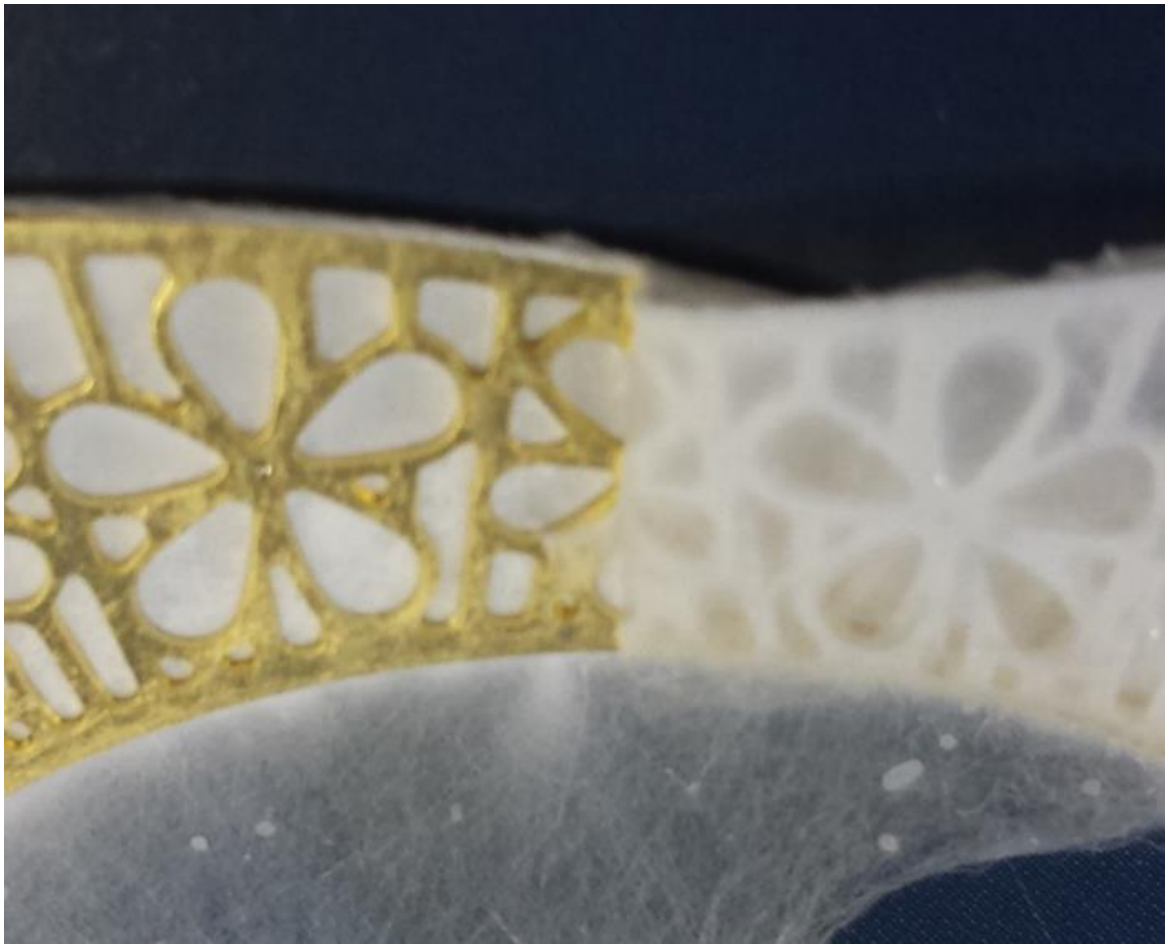


Figura 51 - Detalhe do descolamento das nanofibras do molde coletor metálico (Fonte: Feito pelo Autor)

A retirada da manta de nanofibras (6) vista por baixo do alvo metálico (1), após a deposição da camada de nanofibras sobre o alvo metálico (1) na espessura desejada destaca-se por extração mecânica, a manta de nanofibras resultante preservando-se suas dimensões e conformações geométricas. Para facilitar este procedimento utiliza-se um tratamento superficial antiaderente tal como a deposição de por exemplo ouro ou teflon sobre a superfície do alvo metálico (1).

Este método de formatar nanofibras com pequenos detalhas, com grande precisão, poderá ser importante na engenharia de tecidos, pois permitira reproduzir sistemas de design complexos, tais como estruturas de rins, pulmão, fígado, etc.

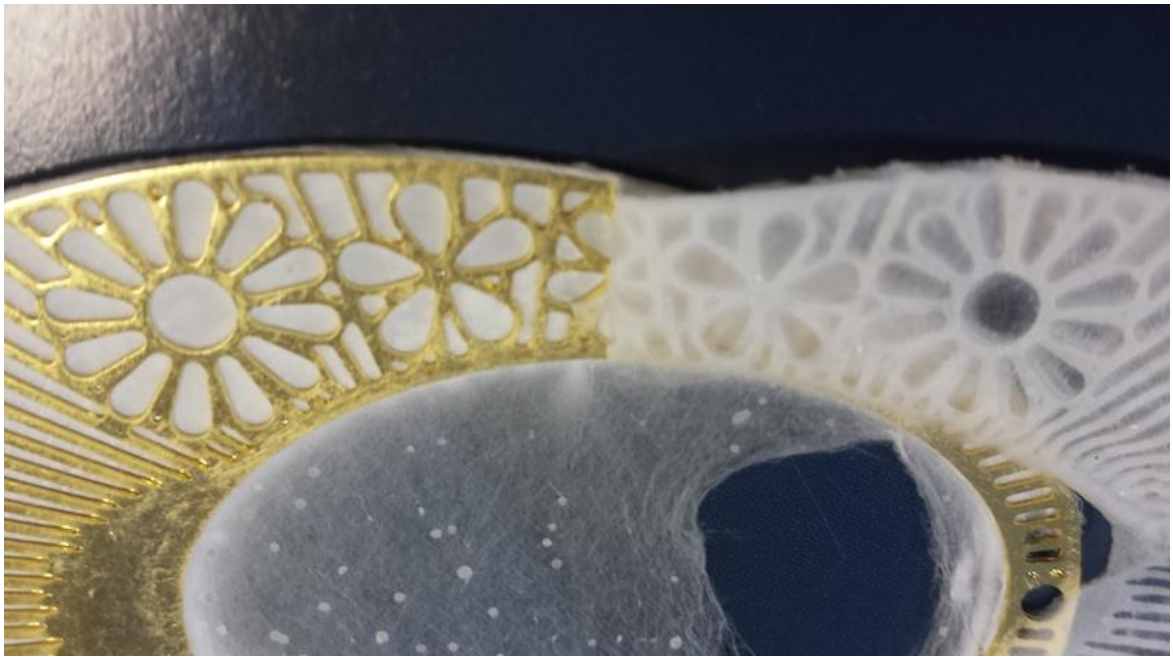


Figura 52 - Detalhe do descolamento das nanofibras do molde coletor metálico(Fonte: Feito pelo Autor)

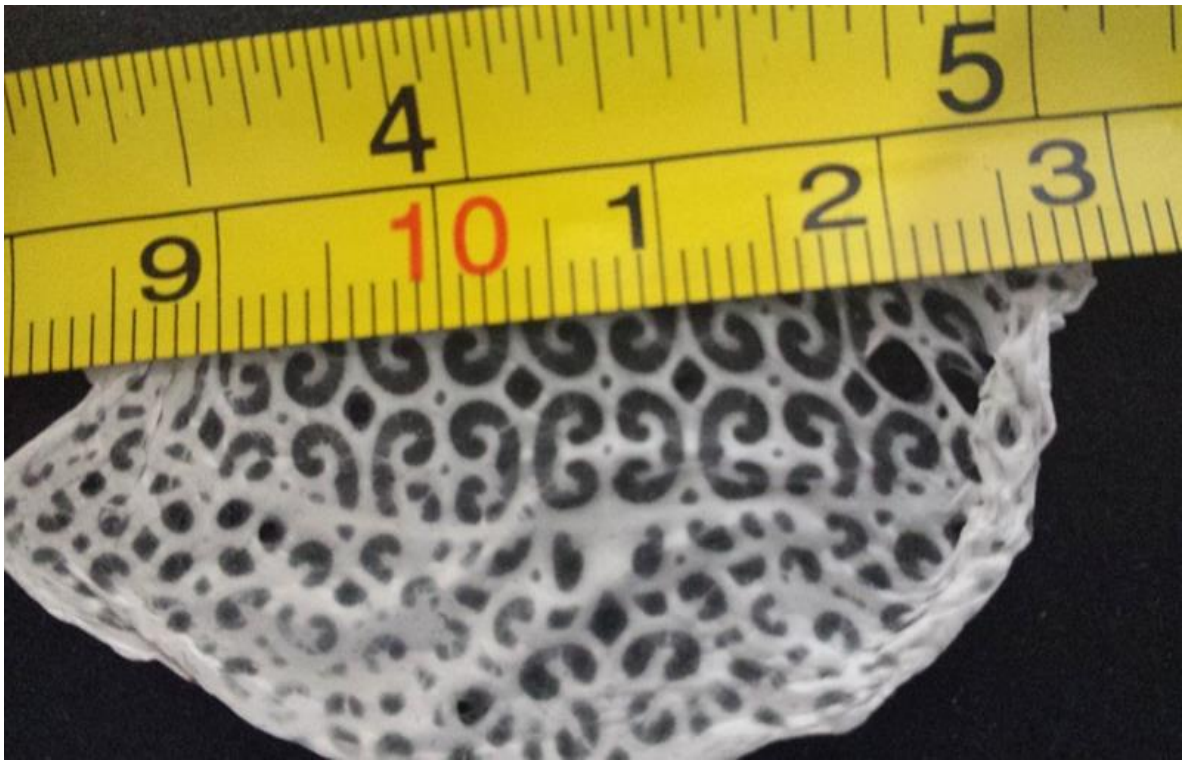


Figura 53 - Macrofotografia de nanofibras (Fonte: Feito pelo Autor)

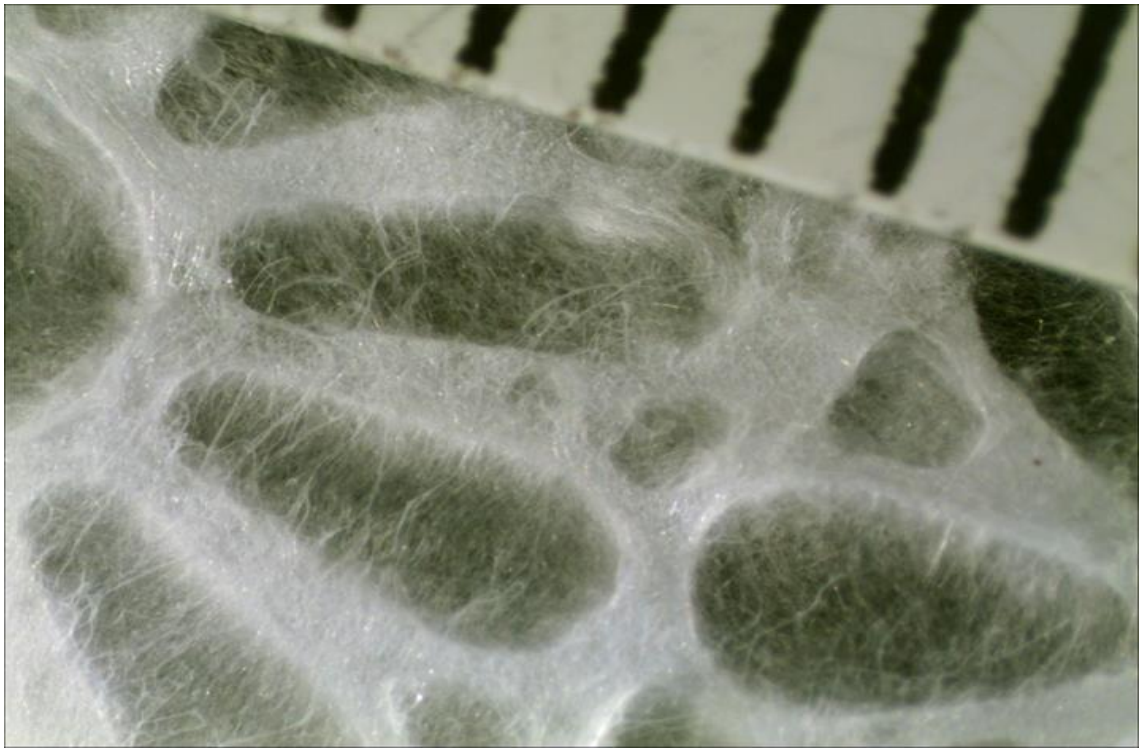


Figura 54 - Microfotografia de um detalhe de nanofibras em formato de flor(Fonte: Feito pelo Autor)

3.5 - Pesquisa para Obtenção de Nanofibras de Poliuretano (PU)

3.5.1 - Objetivo

Produzir nanofibras de poliuretano, para estudar suas propriedades.

3.5.2 - Descrição da Metodologia Empregada

Foi utilizado o método tradicional de produção de nanofibras e experimentado diferentes concentrações de PU.

Tabela 5 -Eletrofiação PU - Método da seringa (Fonte: feito pelo autor)

Manta		Distância	Tensão	Vazão		Volume	Tempo
1		160 mm	20 kV		23 ml/h	5 ml	Ø
2		160 mm	12 kV		23 ml/h	5 ml	Ø
3		160 mm	12 kV		23 ml/h	5 ml	Ø
4		160 mm	12 kV		23 ml/h	2,2 ml	15 min
5		160 mm	15 kV		23 ml/h	5 ml	34 min
6		160 mm	15 kV		23 ml/h	5 ml	40 min
7		160 mm	15 kV		23 ml/h	1,2 ml	10 min

Ocorreu a formação de fibras em todas as tentativas de eletrofiação.

3.5.3 - Resultados Obtidos, Observações e Discussão

Observação: Resultados obtidos com a participação da Dra. Lais Pellizzer Gabriel.

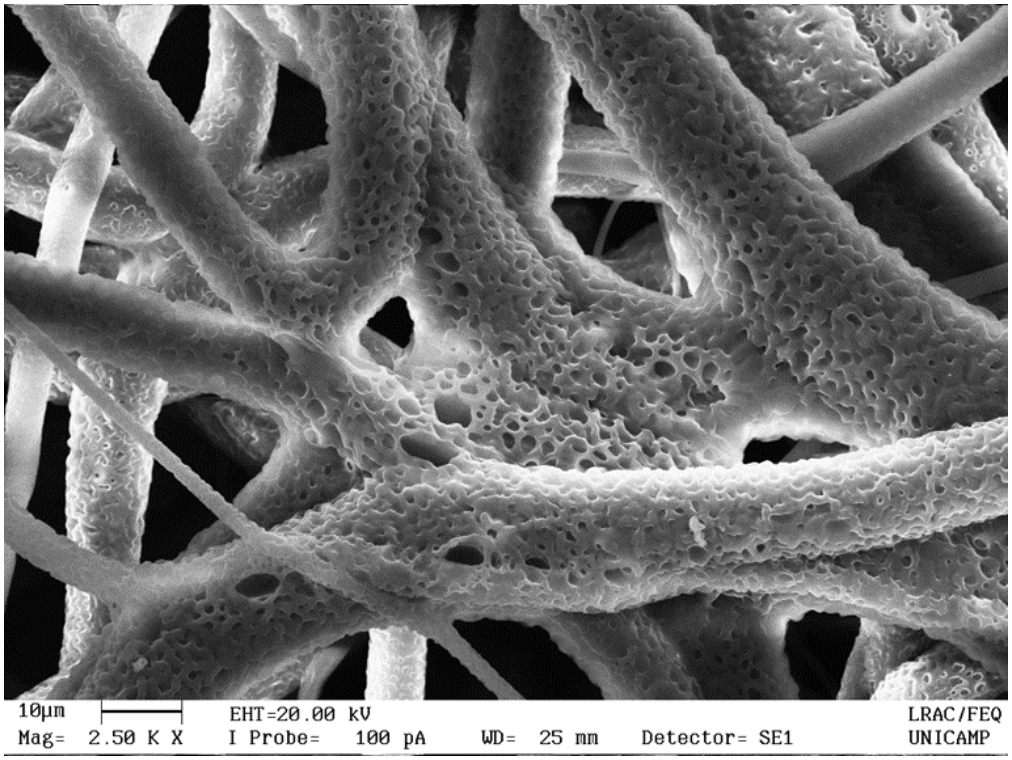


Figura 55 - Detalhe MEV das nanofibras de PU com excesso de solvente. (Fonte: Feito pelo Autor)

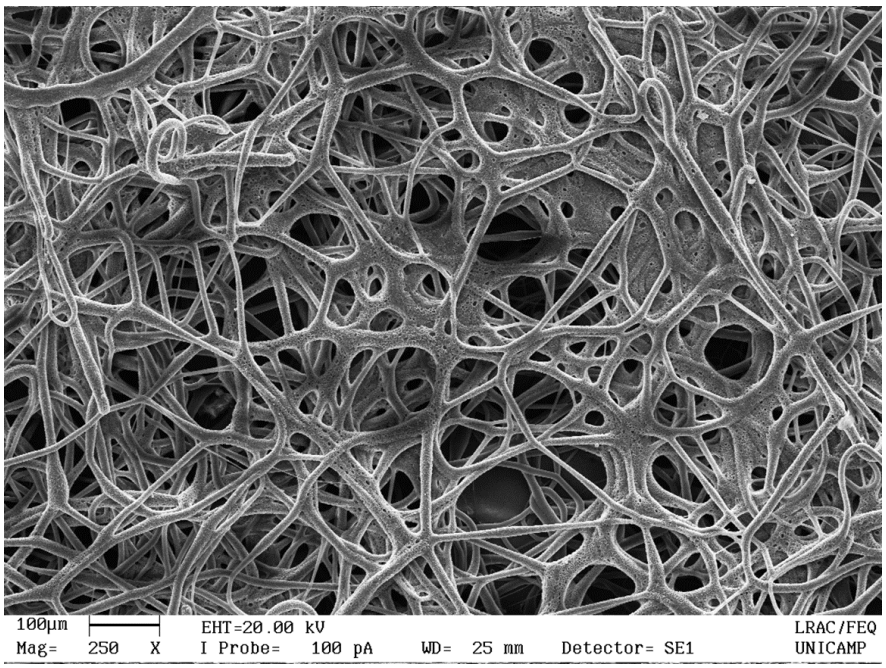


Figura 56 - MEV das nanofibras de poliuretano com excesso de solvente. (Fonte: Feito pelo Autor)

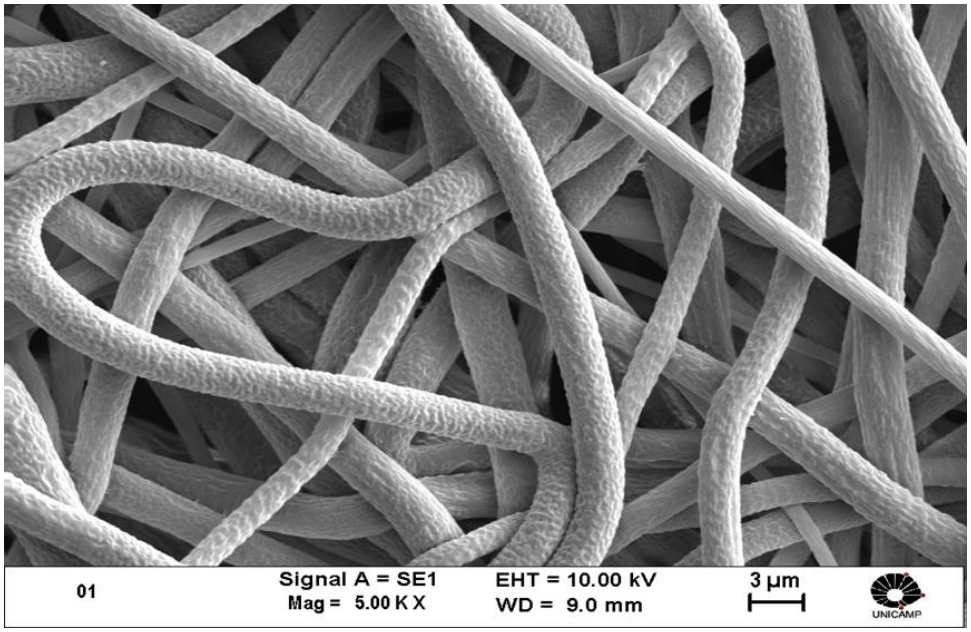


Figura 57 MEV das nanofibras de PU

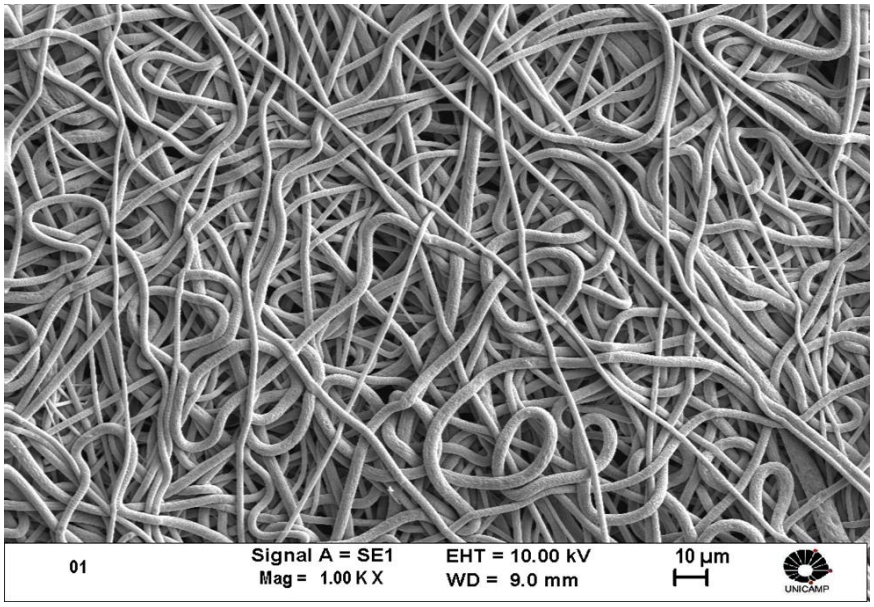


Figura 58 - MEV das nanofibras de PU

Nas figuras 55 e 56 observa-se que havíamos fibras se depositaram sobre o anteparo alvo ainda úmidas, excesso de solvente e formaram um trabeculado muito semelhante ao trabeculado ósseo. Esse resultado não era o esperado mas demonstrou ser muito interessante.

Nas figuras 57 e 58 observou-se que as nanofibras se depositaram formando cilindros muito bem definidos.

Em ambos os casos, as mantas obtidas demonstraram-se altamente elásticas.

Como sugestão de aplicação podemos citar pele artificial.

3.6 - Pesquisa para Obtenção de Nanoesferas de PCL

3.6.1 - Objetivo

Desenvolver um método de produção de nanoesferas de PCL visando um futuro uso em *drug delivery*.

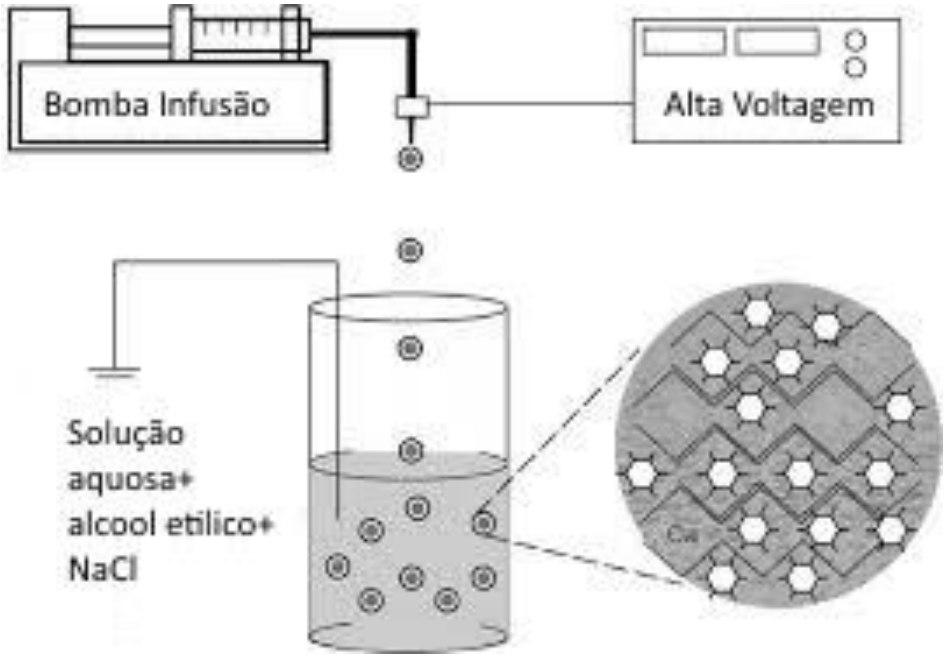


Figura 59- Desenho esquemático do equipamento para produção de nanoesferas de PCL. (Adaptado pelo autor)

3.6.2 - Descrição da Metodologia Empregada

O processo utilizado para confecção de nanoesferas é muito semelhante ao de nanofibras, consiste de uma fonte de alta voltagem que que polariza o polímero dentro de uma bomba de infusão. Esse polímero possui uma maior quantidade de solvente do que as usadas para confeção de nanofibras.

3.6.3 - Resultados Obtidos, Observações e Discussão

O polímero ao sair da agulha se despedaça em pequenas gotículas, formando um spray, que pela sua tensão superficial adquirem formato esférico. O coletor líquido é formado por recipiente aterrado com uma solução aquosa com cerca de 5% em peso de álcool etílico e NaCl para facilitar a condutividade elétrica.

O líquido ao coletar as nanoesferas fica com uma opacidade branca semelhante ao do leite não sendo possível ver as nanoesferas a olho nu.

Com a evaporação dos solventes obtivemos um pó muito fino.

Ao colocar esta solução em um microscópio foi verificado a existência das esferas.

Com a utilização do microscópio eletrônico de varredura podemos verificar a grande quantidade e perfeição destas nano esferas a perfeição destas nanoesferas.

Para controlar o diâmetro das esferas podemos variar a tensão ou a quantidade dos solventes.

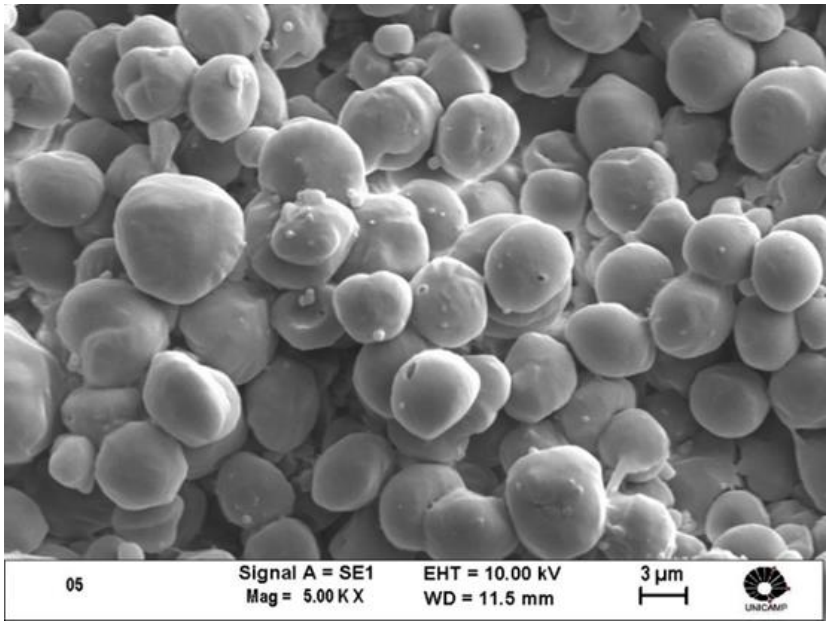


Figura 60 - Nanoesferas de PCL (MEV do Autor)

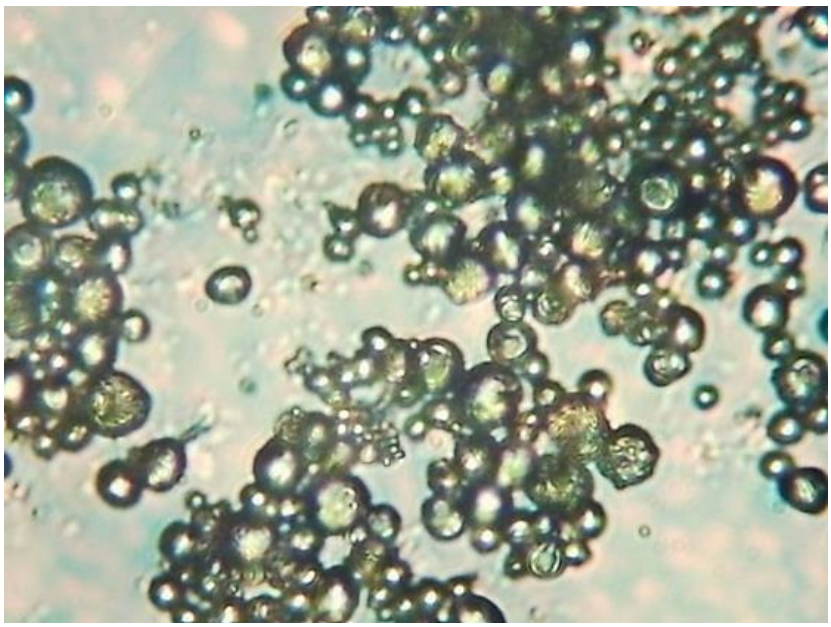


Figura 61 - Fotografia de microscopia óptica da solução aquosa com as nanoesferas (MO do Autor)

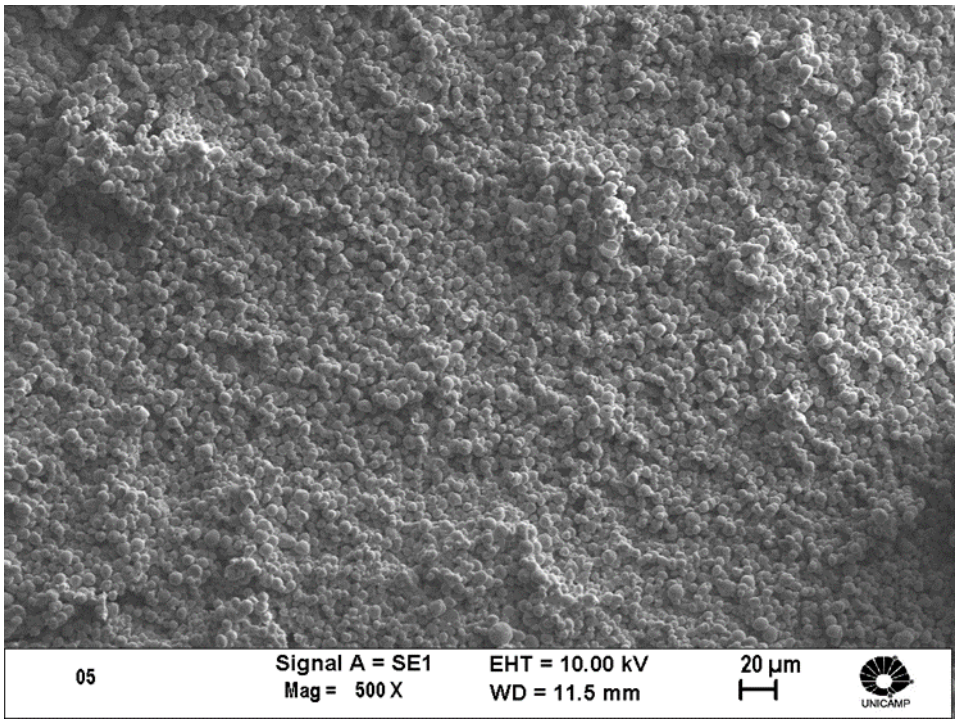


Figura 62 - Nanoesferas de PCL (fonte: MEV do autor)

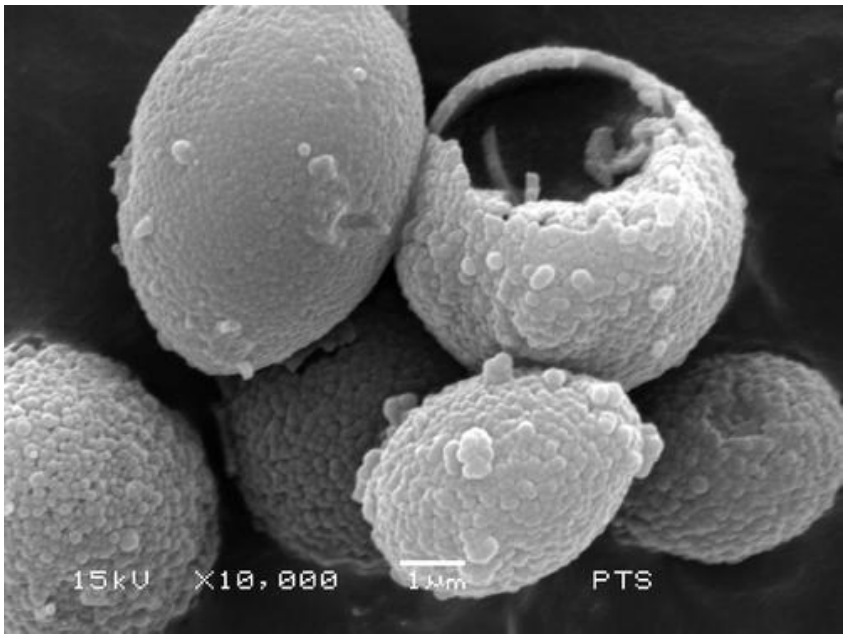


Figura 63 -Possíveis aplicações (Fonte: Ingesting Injectable Drugs Crystal Growth and Design)

Nanoesferas são utilizadas em drug delivery. São esferas muito pequenas que podem ser colocadas na posição desejada dentro do organismo. Normalmente são feitas de um material biorreabsorvível, que o corpo metaboliza e ao destruir a camada externa de polímero libera o medicamento, que está em seu interior. Controlando-se espessura da camada externa é possível prever com razoável precisão o momento da liberação do medicamento.

3.8 - Pesquisa para Obtenção de Nanofibras de PLLA Sintetizadas em Laboratório e Comercial (Comparação entre as Duas)

3.8.1 - Objetivo

Comparar as nanofibras de PLLA produzidas nos Laboratórios da Unicamp com o produto comercial PURAC®.

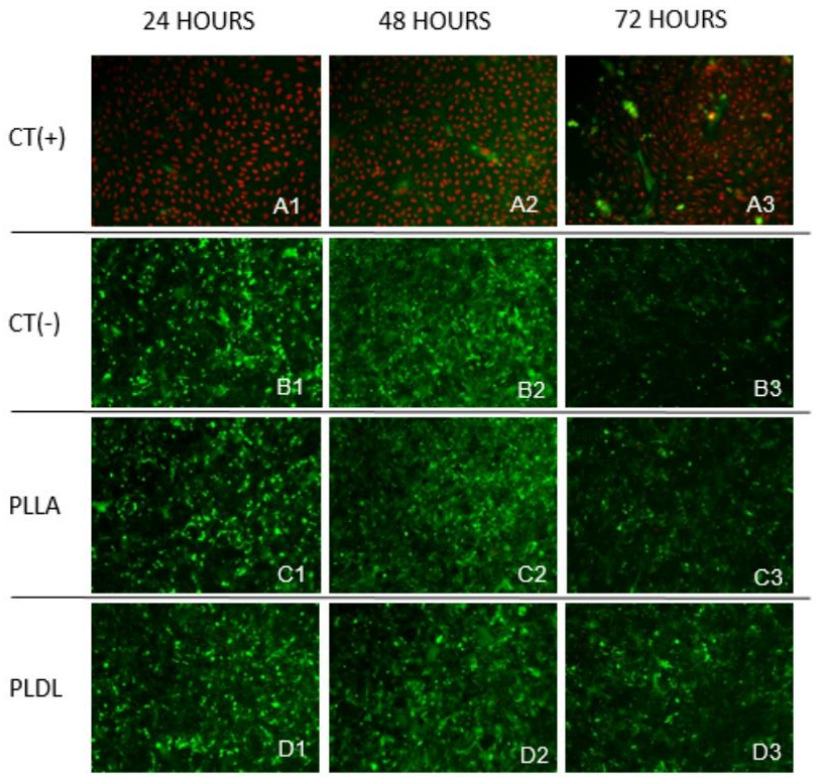
Participação da Mestranda Mariana Vitelo Xaviera

3.8.2 - Descrição da Metodologia Empregada

Foram feitas amostras de nanofibras através do processo de eletrofiação tradicional, de ambos os materiais PLLA, produzido na Unicamp e o composto comercial PURAC®. Sobre essas nanofibras foram cultivadas células (fibroblastos) e comparou-se o resultado do aumento da população de células em 24 48 e 72 horas. Ver detalhes no Artigo no Anexo I.

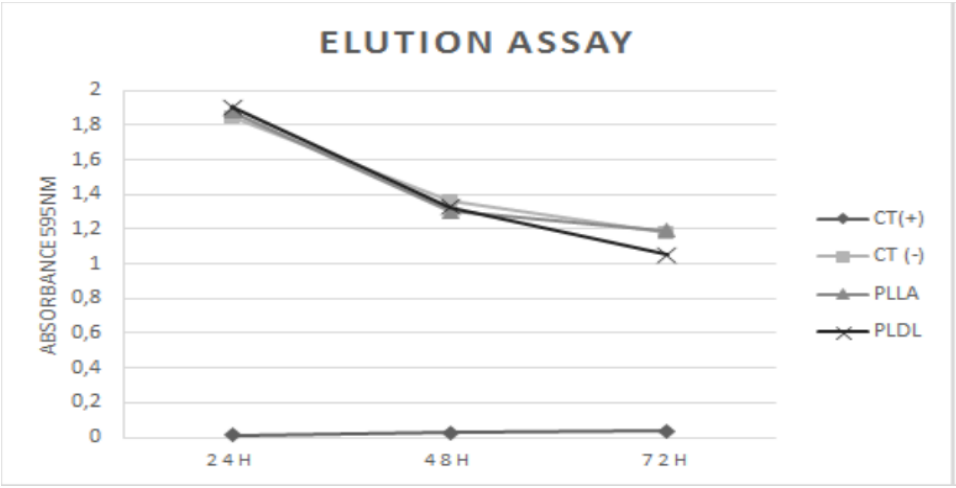
3.8.3 - Resultados Obtidos, Observações e Discussão

Como pode ser observado nas fotos e na figura 68, a população celular sobre as nanofibras tiveram um grande desenvolvimento em pouco espaço de tempo e sua densidade populacional mostrou-se muito semelhante, na comparação entre o produto PLLA desenvolvido na Unicamp e o produto comercial PURAC®.



(Fonte: Mariana Vitelo Xavier)

Figura 64 - Evolução do crescimento populacional de células de fibroblastos sobre nanofibras PLLA produzidas na Unicamp e o produto comercial PURAC.



Xavier

Figura 65 - Gráfico demonstrando a grande Semelhança do desenvolvimento da população de fibroblastos sobre as nanofibras de PLLA desenvolvido na Unicamp e o produto comercial PURAC. (Fonte: Mariana Vitelo Xavier)

3.9 - Desenvolvimento de um Processo de obtenção de Nanofibras Condutivas

3.9.1 - Objetivo

Obter nanofibras recobertas de metal de modo a torná-las condutivas. Para possíveis uso em energia (confecção de nanotubos de metal), medicina (condutores elétricos), segurança (Coletes a prova de Balas).

3.9.2 - Descrição da Metodologia Empregada

Foram realizados experimentos utilizando-se prata e titânio como metais a serem depositados.

Utilizou-se um equipamento deposição por plasma a frio do departamento de física da Unicamp com o auxílio do Físico Carlos Salles Lambert,

Este equipamento consiste em uma câmara de alto vácuo onde é formado plasma com vapor do metal a ser depositado.

3.9.3 - Resultados Obtidos, Observações e Discussão

A figura 66 apresenta um equipamento de deposição por plasma a frio, como o utilizado na confecção de nanofibras condutivas.

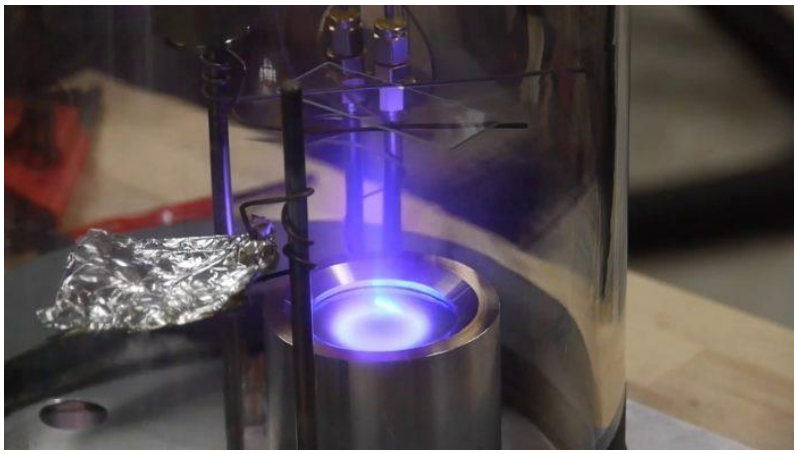


Figura 66 - Foto do processo deposição a plasma Fonte https://theofficetalks.com/wp-content/uploads/2018/07/Electride-Sputtering-Target-market.jpg

Como pode ser verificado nas fotos MEV (figuras 67,68, e 70), conseguiu - se com sucesso efetuar a deposição, de camada nanométrica de metal (foram experimentados o titânio e a prata) sobre as nanofibras poliméricas (nesse caso o polímero foi PLA).

Ao analisar as nanofibras metalizadas pode-se observar uma grande condutividade elétrica capaz de ser medida com um simples multímetro, também foi observado que na manta de nanofibra recoberta de titânio, a mesma se tornou extremamente resistente ao corte. Houve muita dificuldade em se cortar as

mantas de nanofibras metalizadas. Portanto tratava-se de um material extremamente leve e forte.

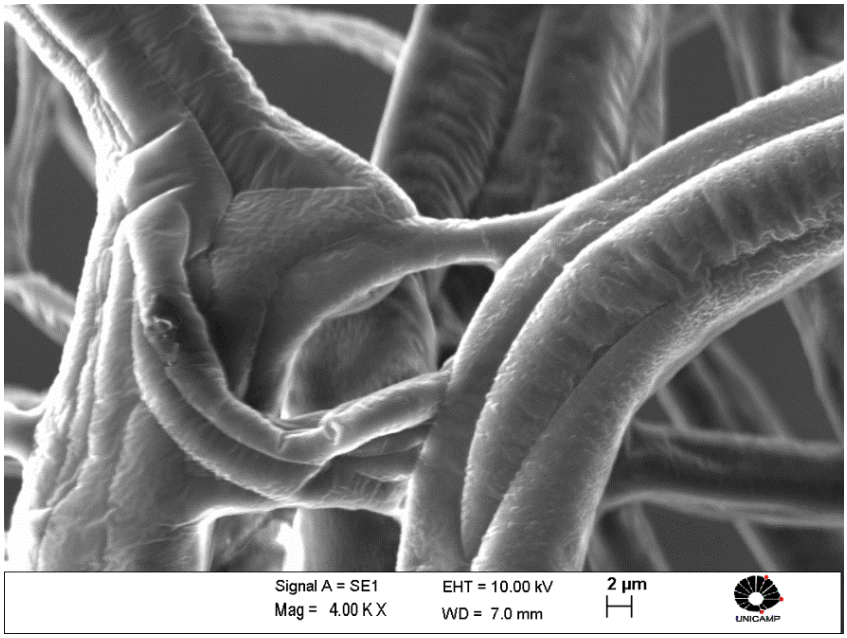


Figura 67 - Detalhe de Nanofibras Recobertas de Titânio (MEV do Autor)

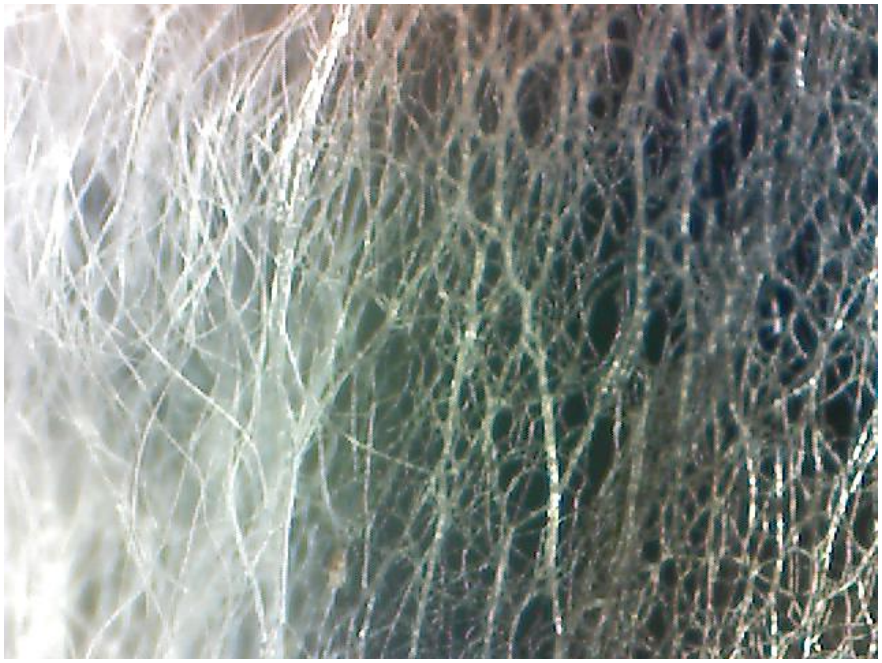


Figura 68 - Deposição Seletiva de Titânio sobre nanofibra (foto do autor)

(Lado esquerdo Nanofibra de PLA natural Lado direito metalizado)

Figura 69 Detalhe de microscopia óptica mostrando deposição seletiva titânio (foto do autor)

(Parte Superior Nanofibra Natural de PLA Parte Inferior Metalizado com titânio.)

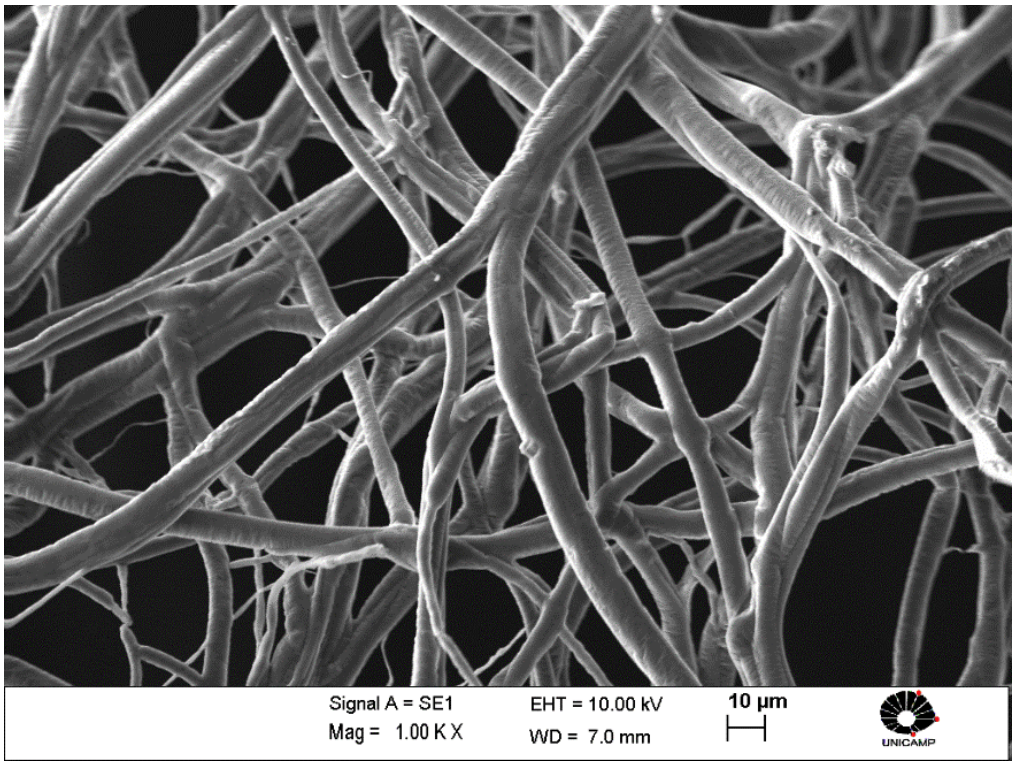


Figura 70 - Detalhe de MEV Nanofibra Metalizada com Titânio. (MEV do Autor)

3.10 - Pesquisa sobre Proliferação Celular de Cardiomiócitos em Manta de Nanofibras de PU

3.10.1 - Objetivo

Trabalho realizado com Dr. Diogo Biagi - Pluricell - Cietec - USP

Aproveitando o fato de que as células humanas desenvolverem adequadamente sobre as nanofibras, o trabalho visa o desenvolvimento de um novo método de produção em larga escala de cardiomiócitos e no futuro o desenvolvimento de um coração completo.

3.10.2 - Descrição da Metodologia Empregada

A Pluricell é a principal companhia que desenvolve e comercializa cardiomiócitos para experimentos no Brasil. Ela desenvolveu um protocolo próprio para produção de células cardíacas. Utilizando as nanofibras desenvolvidas pelo autor, foram feitos vários experimentos com diversos tipos de polímeros tais como PCL, PLLA e PU. Por motivos de acordo de confidencialidade os resultados não serão expostos aqui. Dando apenas o exemplo de uso de visão computacional para a identificação e contagem de células pois o método é notoriamente conhecido e de domínio público.

O processo consiste em cultivo de células de cardiomiócitos sobre a nanofibra e utilizando-se um marcador proteico tornar-se parte da célula luminescente quando exposta a ultravioleta. Usando técnicas de visão computacional pegou-se a imagem e a processou-se de modo a salientar os núcleos e através de um algoritmo de contagem de pixels, contou-se o número e a área ocupada pelos cardiomiócitos.

3.10.3 - Resultados Obtidos, Observações e Discursões

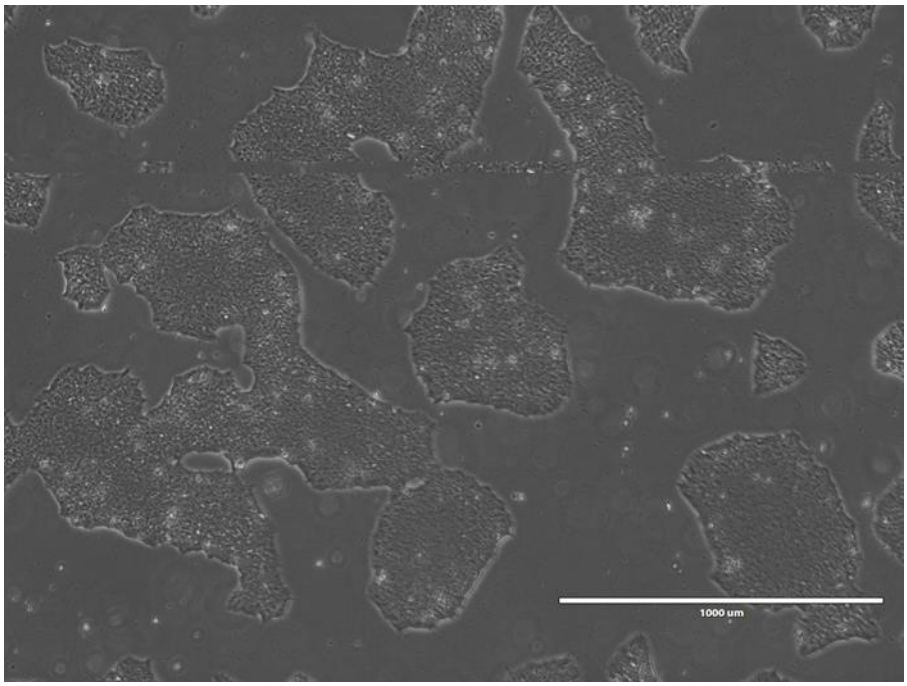


Figura 71 - Foto original tirada por um equipamento comercial de contagem de células (Foto do autor)

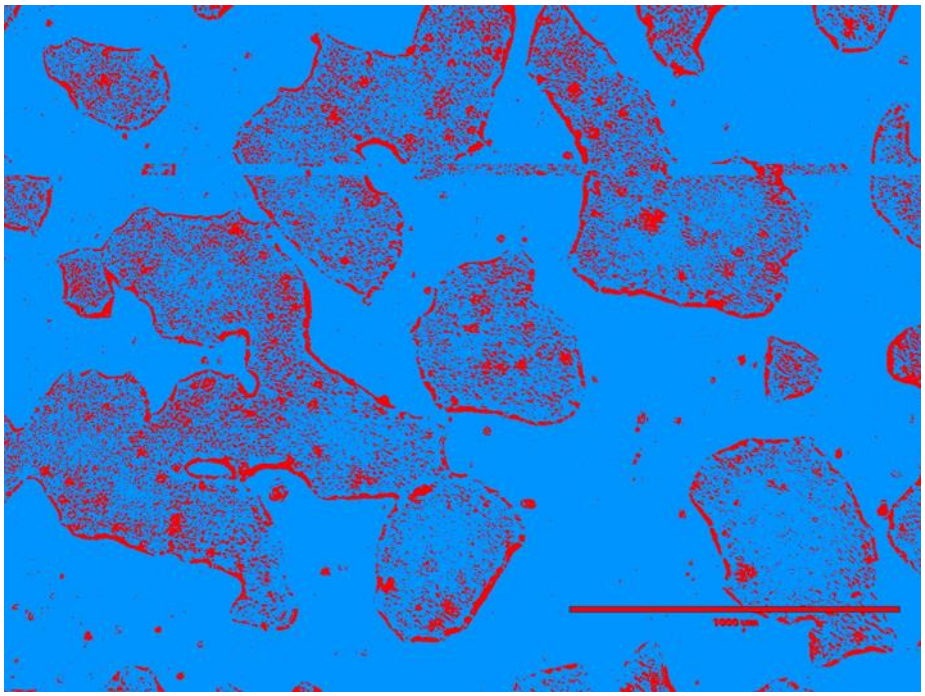


Figura 72 - Mesma foto d da figura anterior após processamento usando algoritmos de visão computacional (Foto do autor)

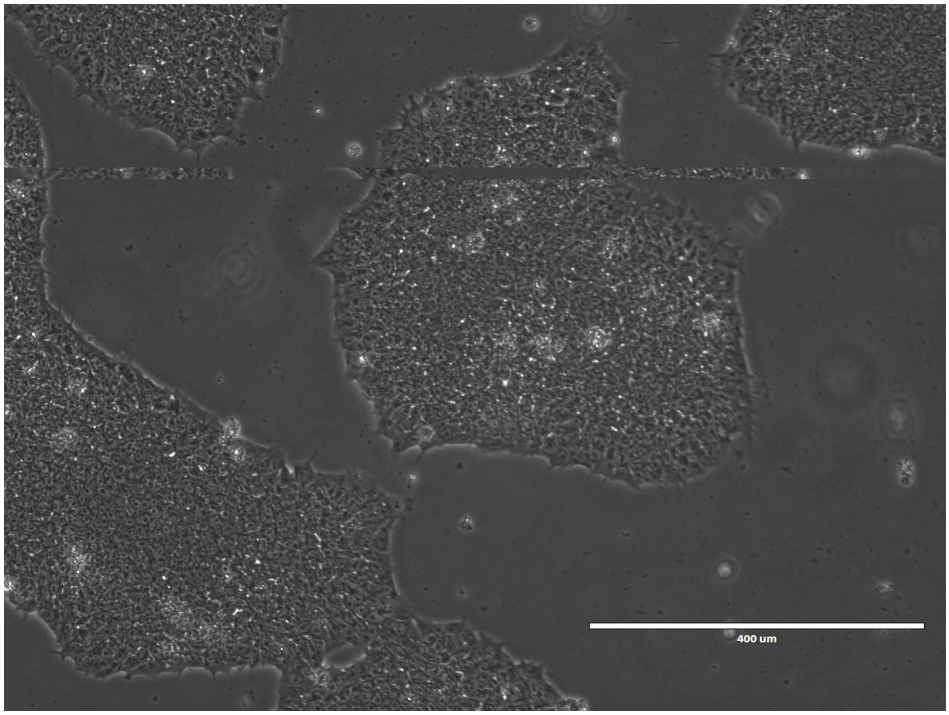


Figura 73 - Foto original tirada por um equipamento comercial de contagem de células (Foto do autor)

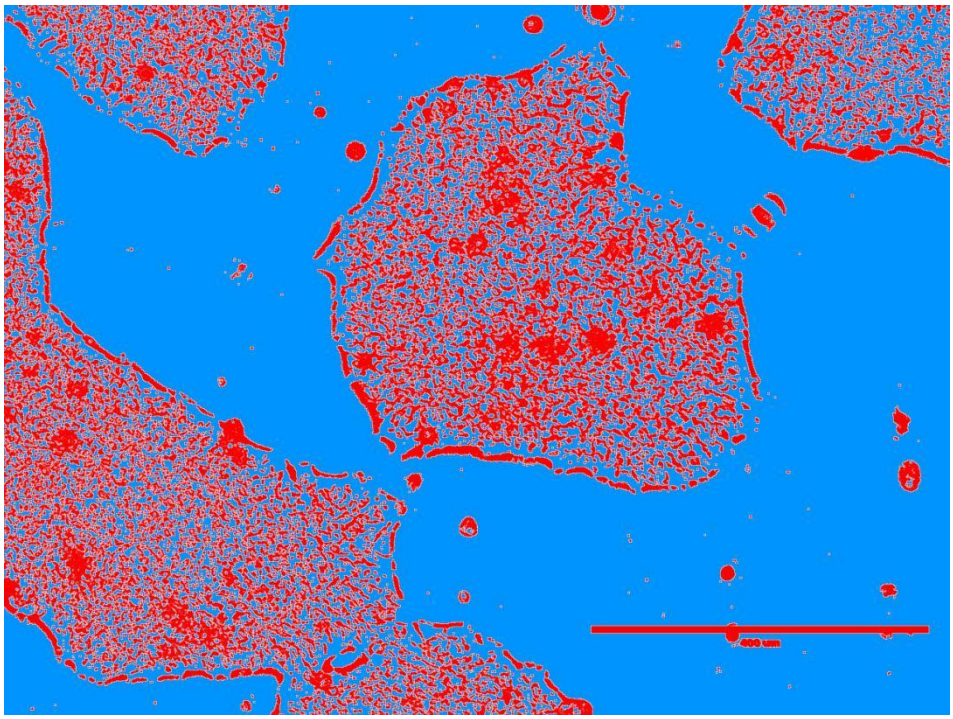


Figura 74 - Mesma foto d da figura anterior após processamento usando algoritmos de visão computacional (Foto do autor)

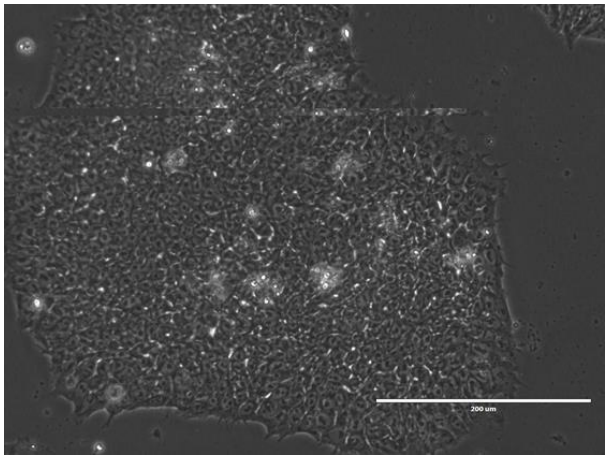


Figura 75 - Foto original tirada por um equipamento comercial de contagem de células (Foto do autor)

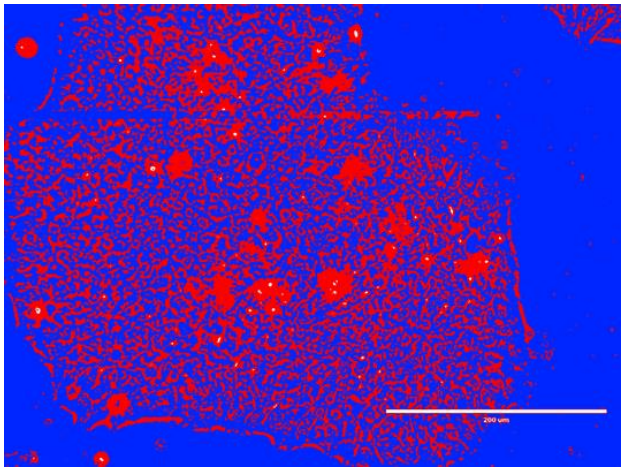


Figura 76 - Mesma foto d da figura anterior após processamento usando algoritmos de visão computacional (Foto do autor)

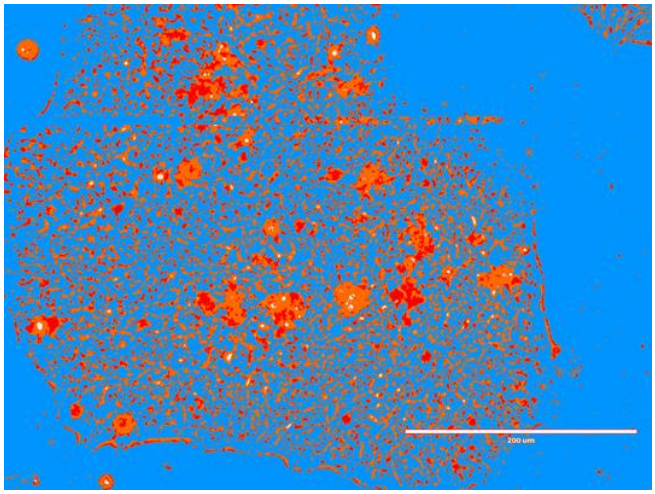


Figura 77- Mesma foto d da figura anterior após processamento usando algoritmos de visão computacional com *threshold* de três níveis enfatizando os núcleos celulares (Foto do autor)

3.11 - Pesquisas sobre Reconstituição de Crânios em Ratos com Nanofibras e Hidroxiapatita

3.11.1 – Objetivo

Caracterização da compatibilidade entre malha de nanofibras e hidroxiapatita na regeneração de defeitos cranianos de ratos.

3.11.2 - Descrição da Metodologia Empregada

Deformidades congênitas ou traumas com perda de massa óssea podem ser reparados utilizando enxerto ósseo autógeno. Entretanto, a sua utilização pode tornar-se limitada devido a algumas desvantagens como dores crônicas e necrose da área doadora. Desta maneira, os biomateriais sintéticos constituem uma alternativa viável para o processo de enxertia. Entre esses, destacam-se a hidroxiapatita pela sua composição semelhante ao tecido ósseo e a malha de nanofibras por atuar como rede de suporte para adesão e proliferação celular. Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar a capacidade osteogênica da combinação de nanofibras com hidroxiapatita, no reparo de defeitos produzidos na calota craniana de ratos. Utilizaram-se 20 ratas (Rattus norvegicus, Wistar) machos com 15 semanas de idade e peso médio de 350g, separadas em grupo 1 (G1) com defeito craniano sem preenchimento, grupo 2 (G2) preenchido com nanofibra (PLLA); grupo 3 (G3) com grânulos de hidroxiapatita e grupo 4 (G4) com a combinação de hidroxiapattia e nanofibra.

3.11.3 - Resultados Obtidos, Observações e Discussão

O sacrifício dos animais ocorreu 5 semanas pós-cirúrgico da cirurgia do defeito experimental no crânio dos animais. Em seguida, as amostras da área cirúrgica foram removidas, foto documentadas, radiografadas e submetidas aos procedimentos histotécnicos de rotina para a confecção das lâminas histológicas para análise histomorfométrica da neoformação óssea do reparo da área cirúrgica. Nos resultados macroscópicos e radiológicos observou integridade do local cirúrgico devido à ausência de sinais que pudessem indicar presença de infecção. A falha óssea não se regenerou por completo. Assim, conclui-se que o biomaterial usado é biocompativel com o tecido ósseo receptor de ratas, mas não estimulou rápida regeneração óssea, no tempo de estudo.

3.12 - Pesquisas sobre Reconstituição de Crânios em Ratos com Nanofibras e Selante de Fibrina

3.12.1 – Objetivo

Combinação de malha de nanofibras com selante de fibrina derivada do veneno de cobra, como enxerto ao estimulo osteoregenerativo de lesões cranianas de ratos.

3.12.2 - Descrição da Metodologia Empregada

A engenharia de tecidos vem se destacando no desenvolvimento ou aperfeiçoamento de biomateriais, que agem como alternativa viável nos casos clínicos em que há a necessidade de enxertia. Esses materiais atuam como suporte tridimensional para adesão, proliferação e diferenciação celular durante as etapas do reparo ósseo. Dentre esses, estão a nanofibra produzida pelo método de eletrofiação e o selante de fibrina derivado do veneno de Crotalus durissus terrificus, ambos agindo como com capacidade de arcabouço *(scafold)* (suporte) para crescimento celular pela rede de fibras entrelaçadas. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade osteogênica da combinação de nanofibras com selante de fibrina derivada do veneno de cobra, no reparo de defeitos produzidos na calota craniana de ratos.

Foram utilizadas 20 ratas (Rattus norvegicus, Wistar) machos com 15 semanas de idade e peso médio de 350g, separadas em grupo 1 (G1) com defeito craniano sem preenchimento, grupo 2 (G2) preenchido com nanofibra (PLLA); grupo 3 (G3) com selante de fibrina derivado do veneno de cobra e grupo 4 (G4) com a combinação de selante de fibrina e nanofibra.

3.12.3 - Resultados Obtidos, Observações e Discussões

O sacrifício dos animais ocorreu 5 semanas de pós-cirúrgico da cirurgia do defeito experimental no crânio dos animais. Em seguida, as amostras da área cirúrgica foram removidas, foto documentadas, radiografadas e submetidas aos procedimentos histotécnicos de rotina para a confecção das lâminas histológicas para análise histomorfometrica da neoformação óssea do reparo da área cirúrgica. Nos resultados macroscópicos e radiológicos não foi observado sinais de infecção na área cirúrgica. A falha óssea permaneceu intacta e preservada as áreas circunvizinhas. Concluiu-se que o material utilizado como enxerto é biocompativel, porém não permitiu o reparo total dentro do período experimental padronizado nesta pesquisa.

4 – CONCLUSÕES FINAIS E SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

4.1 - Conclusões

Serão apresentadas conclusões individuais de cada pesquisa:

- Desenvolvimento de um Equipamento Avançado Para a Produção de Nanofibras - Equipamento Principal

O equipamento bem como seus acessórios funcionaram de acordo com o esperado.

A ideia da utilização de manufatura aditiva para fazer uma peça altamente complexa, que foram as pirâmides ocas, demonstrou ser perfeitamente viável e a utilização desse dispositivo produziu nanofibras de excelente qualidade.

O dispositivo injetor múltiplo com as pirâmides ocas devido ao problema de evaporação dos solventes variar a viscosidade da solução deve ser aperfeiçoado em trabalhos futuros.

- Desenvolvimento de um Equipamento de Iluminação que Permita a Observação da Produção de Nanofibras em Tempo Real

Ver a produção de nanofibras em tempo real era um problema muito grave inicialmente; com a utilização desta iluminação de LED de cor azul bem como as paredes revestidas de papel camurça preto fosco demonstraram ser altamente eficientes, permitindo a visualização em tempo real com o desejado.

- Desenvolvimento de uma Fonte de Alta Tensão (até 65 KV)

Conseguir uma fonte de alta tensão e baixo custo também foi um grande desafio, mas conseguimos adaptar esta fonte de cinescópio de TV. Após devidamente calibrado verificamos que essa fonte atinge tensões além dos 60 Kv, portanto plenamente utilizável em pesquisas eletrofiação.

- Desenvolvimento de um Equipamento de Controle Remoto Bluetooth para Controle dos Equipamentos para Produção de Nanofibras

Após alguns incidentes de choques, a alta tensão atravessava até nossas luvas de látex, passamos a utilizar o duplo isolamento de vidro temperado e para controlarmos a longa distância os equipamentos, foi desenvolvido este controle remoto Bluetooth e um app via celular. Seu desenvolvimento foi muito interessante e útil, sendo sempre utilizado.

- Desenvolvimento de um Equipamento Gabinete Seguro para Eletrofiação

Este gabinete aterrado e com uma segunda caixa de vidro temperado interna nos permitiu trabalhar em segurança. Em dezenas de horas de uso, nunca houve um incidente de choque elétrico no gabinete metálico.

- Desenvolvimento de um Dispositivo de Carga Continua de Polímero

O dispositivo mostrou-se muito eficiente, embora os problemas de limpeza no interior das pirâmides continuam sendo graves.

- Desenvolvimento de um Equipamento para Obtenção de Nanofibras Alinhadas

O uso do dispositivo permite uma rápida remoção dos cilindros com as pirâmides ocas, mas ainda não resolveu o problema da variação da concentração dos solventes durante o processo exigindo ainda muita manutenção.

- Comparação entre Nanofibras de PCL Eletrofiadas pelo Equipamento Tradicional e pelo Equipamento Avançado

Os MEV comparando as nanofibras feitas pela eletrofiação convencional e a utilizando pirâmide ocas, mostram que as nanofibras produzidas pelas pirâmides eram muito mais finas, sendo em sua totalidade nanofibras e não nano e microfibras misturadas.

- Pesquisa para Obtenção de Nanofibras Orientadas a Um Biodesign

A ideia de formar nanofibras com formatos específicos de biodesign foi muito bem recebida, quando foi exposta nos congressos na Universidade de Manchester e na Universidade do Porto, a todos que mostra essas nanofibras com desenhos ficam realmente muito impressionados.

- Pesquisa para Obtenção de Nanofibras de PU

Foram produzidas as fibras de PU que se mostraram altamente elásticas, não se rompendo mesmo quando fortemente tracionadas.

- Pesquisa para Obtenção de Nanoesferas de PCL

Conseguiu se produzir com relativa facilidade as nanoesferas depois que achamos indicações do uso do coletor líquido.

- Pesquisa para Obtenção de Nanofibras de PCL

Não houve praticamente nenhum problema em produzir nanofibras de PCL.

- Pesquisa para Obtenção de Nanofibras de PLLA Sintetizadas em Laboratório e Comercial (Comparação entre as Duas)

Não houve problemas da confecção das nanofibras sintetizadas na Unicamp e as comerciais e os resultados utilizando-se células mostraram ser idênticas e biocompatíveis.

- Desenvolvimento de um Processo de obtenção de Nanofibras Condutivas

O resultado desse experimento nos surpreendeu muito devido à grande resistência ao corte das nanofibras revestidas de metal e também pela sua grande condutibilidade.

4.2 – Consideração Final

As nanofibras de biomateriais demonstram ser um ótimo condutor e substrato para a formação de vários tipos de tecidos celulares. As nanofibras possuem as dimensões apropriadas para as células se agarrar em e se locomoverem usando-as como apoio; este fato faz com que as células se desenvolvam em três dimensões, acelerando muito seu desenvolvimento e sua proliferação. Por ser um assunto relativamente novo, existe um amplo campo aberto para pesquisa pois ainda existem muitos poucos pesquisadores na área e realmente existe muito a se descobrir. Durante este estudo foi necessário não somente conhecimentos de engenharia, mas também de química, física e biologia. É muito raro encontrar hoje em dia engenheiros que conheçam todas essas áreas, sendo este um fator que também limita o desenvolvimento dessas pesquisas.

4.3 – Sugestões para Trabalhos Futuros

- Produção em Larga Escala de Nanofibras

Construção de um equipamento capaz de produzir em de maneira continua e em larga escala, usando a técnica de múltiplos ejetores feitos em manufatura aditiva.

- Sistema de Alimentação Continuo

A alimentação continua mostrou-se ser um problema de difícil solução, devido a variação das concentrações do polímero e do solvente ao longo do tempo, necessitando de um estudo individual mais aprofundado.

- Sistema de Limpeza Automático

A solidificação do polímero no interior das pirâmides são de difícil remoção, devendo ser desenvolvido meios mais eficientes de remoção e limpeza.

- Sistema de Coleta Continuo

Ao serem solucionados os problemas de alimentação e limpeza continuas haverá a necessidade de desenvolver um sistema de coleta continua devido a grande quantidade de nanofibras produzidas, tornando então a produção comercial.

- Produção de Nanotubos

Seria muito interessante o desenvolvimento de nanotubos em escala comercial para usos em *drug delivery* e energia.

- Produção de Nanoesferas menores

Utilizando-se tensões maiores conseguiremos nanoesferas menores seria interessante estudar com esta fonte de 65 Kv quais seriam os menores tamanhos possíveis.

Produção de Nanoesferas Recheada

Para *drug delivery* as nanoesferas recheadas com medicamentos seriam fundamentais e seu desenvolvimento ainda precisa ser feito.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACIARI, J.R.F., YOSHIKA, S.. Caracterização de esferas de fibroína calcificadas. Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais (COLAOB). Do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, 2012.

ALMEIDA, R.S. Eletrofiação em Corrente Alternada/Corrente Contínua de Nanocompósitos de Poli(Caprolactona) com Óxido de Grafeno e Nanotubos de Carbono Visando Aplicações como Biomateriais. Tese (Doutorado em Doutorado em Engenharia Mecânica), 2014

AMARAL, I. F.; BARBOSA, M. A.; BARRIAS, C. C.; CAVALHEIRO, J.; FERRAZ M. P.; GRANJA, P. L.; LOPES M. A.; MARTINS M. C. L.; MONTEIRO F. J.; RIBEIRO C. C.; SANTOS, J. D.; SOUSA, S. R.; QUEIROZ, A. C. Biomateriais. In: Biotecnologia., Lidel, 377-397 .2003.

ASHBY, M.F. Materials Selection and Process in Mechanical Design, Butterworth Heinemann, Oxford, 1999

BARBANTI, S. H. ; SANTOS JR, A. R. ; ZAVAGLIA, C. A. C. ; DUEK, E. A. R. . Porous and dense poly(L-lactic acid) and poly(D,L-lactic acid glycolic scaffolds:in vitro degradation in culture medium and osteoblasts culture. Journal of Materials Science. Materials in Medicine, London, v. 15, p. 1315-1321, 2004.

BEACHLEY, V., WEN, X. Polymer nanofibrous structures: Fabrication, biofunctionalization, and cell interactions. Progress in polymer science, 35, 868–892. 2000.

BHARDWAJ, N. & KUNDU, S. C. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. Biotech. Adv. 28, 325-347.

BRITO, T.A.V. Preparação e Caracterização de Nanofibras da Blenda PLLA/PCL obtidas pelos processos de Eletrofiação e Rotofiação, Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Universidade Estadual de Campinas, 2013.

CARVALHO, N. et al. Síntese e Caracterização e de Poliuretanos para Uso como Biomateriais, Anais do X Salão de Iniciação Científica da PUCRS, p. 1254-1255, 2009.

CHEW, S. Y.; WEN, Y.; DZENIS, Y.; LEONG, K. W. The Role of Electrospinning in the Emerging Field of Nanomedicine. Curr Pharm Des. v.12, ed.36, p.4751–4770, 2006.

COSTA, R. G. F.; OLIVEIRA, J. E.; PAULA, G. F.; PICCIANI, P. H. S.; MEDEIROS, E. S.; MATTOSO, L. H. C. Eletrofiação de polímeros em solução.

Parte I: Fundamentação teórica. Polímeros, São Carlos, v. 22, n. 2, p. 170-177, 2012.

COSTA, R. G. F.; OLIVEIRA, J. E.; PAULA, G. F.; PICCIANI, P. H. S.; MEDEIROS, E. S.; MATTOSO, L. H. C. Eletrofiação de polímeros em solução. Parte II: Aplicações e perspectivas. Polímeros, São Carlos, v. 22, n. 2, p. 178-185, 2012.

ESPÓSITO, A.R. Processamento, Caracterização e Desempenho in vivo de Arcabouço Biorreabsorvível de PLDLA-co-TMC. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) - Universidade Estadual de Campinas, 2014.

DEITZEL, J.M., J.D. KLEINMEYER, J.K. HIRVONEN, AND N.C. TAN, Controlled deposition of electrospun polylethylene oxide fibers. Polymer, vol. 42,pp. 8163-8170. 2001.

DIARMID, A.M., JONES,W., NORRIS,I., GAO,J., JOHNSON,A., PINTO, N., HONE, J., HAN, B., KO,F., OKUZAKI,H., LLAGUNO, M. Electrostatically-generated nanofibers of electronic polymers. Synthetic Metals, vol. 119, 2001, pp. 27-30.

DONG, J. et al. Aqueous elestrospinning of wheat gluten fibers with thiolated additives. Polymer 51:3164-3172. 2010.

DOSHI,J.; RENEKER, D.H Electrospinning process and applications of electrospun fibers, Journal of Electrostatics, volume 35, Issues 2-3, pp. 151-160, 1995.

EGAWA, E.Y.; Caracterização Térmica e Reológica de Blendas de Glicerol: Colágeno tipo I de diferentes tecidos. Dissertação de mestrado do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, 2007.

FONG, H., CHUN, I., RENEKER, D.H. Beaded nanofibers formed during electrospinning. Polymer 40 (1999) 4585–4592.

FORMHALS, A . Method and Apparatus for Spinning, May 30, 1944. Patente A US2349950.

FORMHALS, A. Process and apparatus for preparing artificial threads. US Patent. 1,975,504.1934.

GAUTAM, S.; DINDA, A. K.; MISHRA, N. C. Fabrication and characterization of PCL/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method. Materials Science and Engineering C, v. 33, p. 1228 – 1235, 2013.

HIGHTON, L.; WALLACE, C.; SHAH, M. Use of Suprathel® for partial thickness burns in children, Burns, 39, pp.136-141, 2013.

HUANG, Z. M.; ZHANG, Y. Z.; KOTAKI, M.; RAMAHRISHNA, S. Review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. Composites Science and Technology, v.63, p.2223–2253, 2003.

HUANG, Z.M., ZHANGB, Y.Z., RAMAKRISHNAB, S., LIM, C.T. Electrospinning and mechanical characterization of gelatin nanofibers. Polymer 45 (2004) 5361–5368.

HUANG, C. H.; CHI, C. Y.; CHEN, Y.S. Evaluation of proanthocyanidin-crosslinked eletrospun gelatina nanofibers for drug delivering system. Materials Science and Engineering, v. 32, p. 2476-2483, 2012.

JAWOREK, A., AND A.T. SOBCZYK, Electrospraying route to nanotechnology: An overview, Journal of Electrostatics, vol. 66, 2008, pp. 197-219.

KITSARAA, M. et al. Fibers for hearts: A critical review on electrospinning for cardiac tissue engineering. Acta Biomaterialia Volume 48, 15 January 2017, Pages 20-40.

KULKARNI, A.; BAMBOLE, V. A.; MAHANWAR, P. A. Electrospinning of Polymers, Their Modeling and Applications. Polymer-Plastics Technology and Engineering, v.49, p.427–441, 2010.

KULKARNI A., BAMBOLE V.A., MAHANWAR P.A. Electrospinning of Polymers, Their Modeling and Applications. Polymer-Plastics Technology and Engineering, 49: 427–441, 2010.

LANGER R, TIRRELL D.A. Designing materials for biology and medicine. Nature. P.428:487-492. 2004.

LANNUTTI, J.; RENEKER, D.; MA, T.; TOMASKO, D.; FARSON, D. Electrospinning for tissue engineering scaffolds. Materials Science and Engineering C, v. 27, p. 504 – 509, 2007.

LIAO, S.; LI, B.; MA,Z.; WEI, H.; CHAN C. AND RAMAKRISHNA, S. Biomimetic electrospun nanofibers for tissue regeneration. Biom. Mater. 1. Institute of Physics Publishing R45-R53. 2006.

LIN, t.; WANG,HX.; WANG,HM.; WANG, XG. The charge effect of cationic surfactants on the elimination of fibre beads in the electrospinning of polystyrene, Nanotecnology, 15, pp.1375-1381, 2004.

LIU, W.; THOMOPOULOS, S.; XIA, Y. Electrospun Nanofibers for Regenerative Medicine. Advanced Healthcare Materials, v. 1, p. 10 – 25, 2012.

MEDEIROS, E. S.; MATTOSO, L. H.C.; ITO, E. N.; GREGORSKI, K. S.; ROBERTSON, G. H.; OFFEMAN, R.D.; WOOD, D. F.; ORTS, W. J.; IMAM, S. H. Electrospun Nanofibers of Poly(vinyl alcohol) Reinforcedwith Cellulose NanofibrilsJ. Biobased Mater. Bio., 2, p.231 , 2008.

MEDEIROS, E. S.; GLENN, G. M.; KLAMCZYNSKI, A. P.; ORTS, W. J.; MATTOSO, L. H. C. Solution blow spinning: A new method to produce micro- and nanofibers from polymer solutions J. Appl. Polym. Sci., 113, p. 2322, 2009.

MEIRA, C.R. Processamento de hidroxiapatita bovina associada com prototipagem rápida visando implantes ósseos, Tese de doutorado, USP-São Carlos, 2014.

MILLÁS, A.L. Instalação da tecnologia de electrospinning para a produção e caracterização de nanofibras de celulose incorporadas com óleos naturais. 2012. 131f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2012.

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

MOTTA , A.C. Síntese e Caracterização de PLLA e PLGA e Estudo da Degradação In Vitro de Suas Membranas, Tese de doutorado, FEM-UNICAMP, Campinas, 2002.

NAM, J.; RATH, B.; KNOBLOCK,T.J.; LANNUTI, JJ; AGARWAK, S. Novel Elesctrospun scaffolds for the molecular analysis of condrocytes unde dynamic compression, Tissue Engineering, PartA, Vol 15, number 3, pp. 513-523, 2009.

NASCIMENTO, A.F. Obtenção e Caracterização de Mantas Formadas por Poli(fluoreto de Vinilideno) Obtidas por Eletrofiação sob Tratamento com Plasma e Dispersão de Nanotubos de Carbono. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Universidade Estadual de Campinas, 2015.

NERURKAR N.L.; ELLIOTT D.M.; MAUCK RL. Mechanics of Oriented Electrospun Nanofibrous Scaffolds for Annulus Fibrosus Tissue Engineering. Journal of Orthopaedic Research, 25(8):1018-28. 2007.

NORUZI, M. Electrospun nanofibres in agriculture and the food industry: a review, Journal of Food and Agriculture, vol.96, no. 14, p. 4663-4678, 2016.

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

PEREA, G.N. R.. . Eletrofiação de nanocompósito de poli(L-ácido láctico) com hidroxiapatita para regeneração óssea Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Universidade Estadual de Campinas, 2011.

PEREA, G.N. R. Desenvolvimento e caracterização de scaffolds tridimensionais hierárquicos pelo processo de bioextrusão e eletrofiação. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) - Universidade Estadual de Campinas, 2015.

PERSANO, L.; CAMPOSEO, A.; TEKMEN, C.; PISIGNANO, D. Industrial Upscaling of Electrospinning and Applications of Polymer Nanofibers: A Review. Macromolecular Materials and Engineering, v. 298, p. 504 – 520, 2013.

PIRES A. L. R., BIERHALZ A. C. K, MORAES A. M.; Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. Quim. Nova, Vol. 38, No. 7, 957-971, 2015.

PICCIANI, P. MEDEIROS<E.S.; ORTS, W.J.; MATTOSO, L.H. Advances in Electroactive Electrospun Nanofibers, pp.85-117, in: Nanofibers – Production, Properties and Funtional Applications, LIN (Ed.) 2011.

PINTO,S.A.A Malha compósita de poli caprolactona (PCL) com biocerâmica beta-fosfato tricálcico (beta-TCP) obtida por processo de rotofiação,Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Universidade Estadual de Campinas,, 2015.

RAMOS, S.L.F. Membranas de policaprolactona obtidas por eletrofiação para utilização em engenharia tecidual, Dissertação de mestrado, FEM-UNICAMP, Campinas, 2011.

RAMAKRISHNA, S and FUJIHARA, K. An Introduction to Electrospinning and Nanofibers, World Scientific, New Jesey, 415p., 2005.

RATNER, B.;HOFFMAN,A.; SCHOEN,F.; LEMONS, J. – Biomaterials Science – An Introduction to Materials in Medicine, Academic Press,San Diego, 1996.

RENEKER, D. H.; CHUN, I. Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. Nanotechnology, v. 7, n. 3, p. 216, 1996.

RENEKER, D. H.; YARIN, A. L.; FONG, H.; KOOMBHONGSE, S. Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning. Journal of Applied Physics, V. 87, N. 9, P. 4531, 2000.

RIGON, G.R. Matrizes de compósitos de PLDLA com hidroxiapatita obtidas por rotofiação para utilização em engenharia tecidual, Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Universidade Estadual de Campinas, 2013.

SALLES, T.H. C. Desenvolvimento de membranas poliméricas pelo processo de eletrofiação para aplicação em regeneração tecidual. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) - Universidade Estadual de Campinas, 2017.

SOARES, G. A. Fórum de biotecnologia: Biomateriais. 2005. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005. Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais – Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós–Graduação e

STANGER, J., N. TUCKER, AND M. STAIGER, Electrospinning, Macromolecules, vol. 16, 2005. SALLES, T. H. C. Eletrofiação de nanofibras de blendas de gelatina/pvp (poli (vinil pirrolidona)) a partir de soluções de água e ácido acético. Campinas: UNICAMP. p. 83. Dissertação de Mestrado. 2013.

SILL, T. J.; RECUM, H. A. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. Biomaterials, v.29, p.1989-2006, 2008.

SILVA, P. ODORIZZI, C MIRANDA, K.W.; DUARTE, M.A.F. PEZZIN, S.H. Influência Dos Parâmetros Reacionais Na Produção De POLI(L-ÁCIDO LÁCTICO), Anais do 70COLAOB, Natal, RN, pp.01-17, 2012.

SIONKOWSKA, A. Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review. Progress in Polymer Science, v.36, p.1254– 1276, 2011.

SUI, Z AND MURPHY, W.L. Nanoscale Mechanisms for Assembly of Biomaterial. University of Wisconsin-Madison, Springer, USA.2007.

TAYLOR, G. Desintegration of Water Drops in an Electric Field, Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences, vol. 280, pp. 383-397. 1964.

THOMPSON, C. J.; CHASE, G. G.; YARIN, A. L. ; RENEKER, D. H. Effects of parameters on nanofiber diameter determined from electrospinning model, Polymer, 48(23), p.6913, 2007.

VENTURELU, R.B. AND GRIPA, S. Eletrofiação: Uma Alternativa para a Produção de Não-Tecidos, Revista da UNIFEBE (ISSN 2177-742x), Brusque, SC, vol1, no 22, pp1-16, 2017.

VOLPATO, Neri et al (Ed.). Prototipagem Rápida: tecnologia e aplicações. São Paulo: Blücher, 2006. 244 p

VOLPATO, Neri et al (Org.). Manufatura aditiva: tecnologias e aplicações da impressão 3,.São Paulo: Blücher, 2017. 400 p.

VRIEZE, S; VAN CAMP, T.; NELVIG, A.; HAGSTROM, B.; WESTBROEK, P.; CLERCK, K. D. The effect of temperature and humidity on electrospinning, J. Mater. Sci., 44, p.1357, 2009.

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

WOODRUFF, M.A., HUTMACHER, D.W. The return of a forgotten polymer – Plycaprolactone in the 21st century, Progress in Polymer Science, v. 35, n. 10, pp. 1217-1256, 2010.

Anexo I

1 - “Controlled Biodesing of the Electrospinning Nanofibers with PLLA”

Esse antigo seria apresentado no IBIC 2018. 6th INTERNATIONAL CONFERENCE ON INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY. Veneza, Itália, ele demonstra um método inovador de conseguir mantas de nanofibras em duas dimensões com detalhes extremamente precisos utilizando apenas uma placa coletora no formato da manta desejada. Este novo método bem como o equipamento utilizado foram desenvolvidos pelo autor.

CHEMICAL ENGINEERING TRANSACTIONS
VOL. 64, 2018

A publication of AIDIC
The Italian Association of Chemical Engineering
Online at www.aidic.it/cet

Guest Editors: Enrico Bardone, Antonio Marzocchella, Tajalli Keshavarz
Copyright © 2018, AIDIC Servizi S.r.l.
ISBN 978-88-95608- 56-3; **ISSN** 2283-9216

"Controlled Biodesign of the Electrospinning Nanofibers with PLLA"

Macedo, M.F. [a,b], Benatti, A.C.B. [a,c], Zavaglia, C.A.C, [a,b]

a – Institute of Biofabrication - School of Chemical Engineering, University of Campinas, CEP 13081-970, Campinas-SP, Brazil
b– School of Mechanical Engineering, University of Campinas, CEP 13083-860, Campinas – SP, Brazil
c - School of Medical Sciences, Surgery Department, University of Campinas, CEP 13083-970, Campinas-SP, Brazil

Abstract

This paper will propose and demonstrate, a new approach using the electrospinning process to create a nanofiber mat with extremely complex designs and small dimensions. Electrospinning is a well-known technic to produce polymeric nanofibers. Substantial progress has been made on its fabrication, whatever, there hadn't been much advance in the development of complex designs. Many materials are used to produce it, however Poly (L-lactic acid) (PLLA) is one of the most important to fabricate nanofibers for biomedical use, for its biodegrability and biocompatibility characteristics, thus chosen to be used in this paper to create a PLLA nanofiber mat with complex design.

1. Introduction

Nanofibers are defined as fibers with diameter with less than 1000 nanometers. They can be manufactured through diverse techniques, such as phase separation, self-assembly and electrospinning [1].

Electrospinning is a well-known and excellent processing technique. It was extensity studied for the past few years whereas of the interesting nanostructured materials [2-3]. The technique has great features for nanofiber assembly, such as veracity, cost-benefits, with potential to escalate to industrial processing and to use a large range of materials [4-6].

The technique of Electrospinning is the only one that permits dimensional control of the fibers, as well different arrangements of it. It also allows the use of different polymers, and its production is higher when compared with another approaches [7]. The method consist on the application of high scale electric potentials (5-50 kV) and low current (0.5- 10 μA), that leads to a jet of dissolved polymer being accelerated and stretched. As the jet moves in the air, the solvent evaporates, generating fibers of smaller diameter that can be collected on a metal screen. Nanofibers in the diameter range between 10-2000 nm can be produced depending on the appropriated choice of the polymer-solvent. The mere alignment of the electrospinning nanofibers creates a unique and functional nanostructure such as nanotubes and nanowires for instance [8-12].
The electrospinning fibers have exceptional properties due to the biomimetic features dwelling on the fibers diameter in the Nano range; to the high surface area/volume ratio; as well the great porosity with controllable pore sizes; the potential for surface functionalization and extremely similar structure with the extracellular matrix. Because of those traits, the technic has gained attention since the 1990s, as well to its versatility and economic attractiveness on the industrial scale for producing nanofibers from a notable range of organic and inorganic materials [13-18]. The array of industrial use of the nanofibers goes from barriers, filters, batteries, energy storage, aerospace technology and biomedical devices [5-6].

Fascinated with the biomimetic structure of the electrospinning membranes, and its similarity with the extracellular matrix, scientist started studying its impending use as scaffolds for tissue engineering and also for use as drug delivery [19- 22]. One of the most used biomaterials for tissue engineering is the Poly (L-lactic acid) (PLLA), a FDA approved biocompatible and biodegradable polyester. PLLA displays a semi crystalline structure, with a high elastic modulus, which is vital to endure high pressure and flow without breakdown or degradation. It also presents a mechanical response similar to collagen and it has an excellent electro-spinability [23–26].Reason to why many researchers chosen to work with PLLA with their electrospinning studies.
However, despite the large interest in the technic and the progress in electrospinning, and two decades of investment, the current capability of semi-industrialized nanofiber fabrication does not supply the market needs. The low efficiency of the process of the state-of-art electrospinning, and the few companies that hold the technic at industrial scale limits the supply of the market, driven by cost-performance benefits, creating a substantial gap between supply and demand [27].
To enhance the productivity of electrospinning, there is the need for construct more efficient setups and fiber organization, so to improve the production rate and the control of the process itself, especially to regulate the electrospinning jet to achieve ordered configurations [28].
At this moment, exists only nanofibers mats with homogeneous form and thickness. Those are lacking in complex details on its structure. Thus, it is extremely hard to adapt it to a specific desired form.
In this paper, we focus on the recent development of the controlled design of the electrospinning PLLA nanofibers produced in our lab, with the ability to create very complex details in small dimensions.

2. Materials and methods

2.1 Materials

It was used for the electrospinning the biodegradable and biocompatible polymer Poly (L- lactic acid) (PLLA). It was synthetized on our laboratory, described in the PhD thesis written by the student Milena Savioli Lopes [29]. The material was dissolved with Acetone and Chloroform from Synth. All the solvents were analytical grade and were used as received.

2.2 Methods

2.2.1 Production of the PLLA electrospinning nanofibers

With intent to optimize the experimental conditions, a standard electrospinning setup was used (Figure 1).
The solution was loaded into a 10ml syringe, connected to a polyamide tube, attaching to a 0,7mm hypodermic needle as a nozzle. The flow rate of 8 ml/h was controlled using a programmable syringe pump. A high voltage power-source of 15 kV was used to charge the solution by attaching it on the metallic target plate. The distance between the needle-target plate was of 17 cm. To control the design of the electrospinning nanofibers, instead of having the standard metallic collecting plate, a metallic template cast with complex shape (Figure 2) Was put on its place. Than the standard procedure for electrospinning was carried away, as shown in Figure 3. The experiment was performed at room temperature in a chamber with ventilation system.

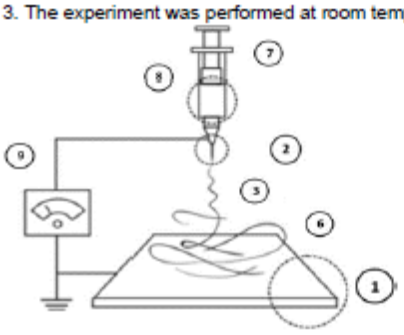


Figure 1

Figure 2

Figure 1: Diagram of the Electrospinning apparatus 1. Metallic Target; 2. Needle;3. Nanowire; 6. Nanofiber mat; 7, Syringe Infuser; 8. Polymer; 9. High Voltage Source.
Figure 2: Metallic template with complex shape

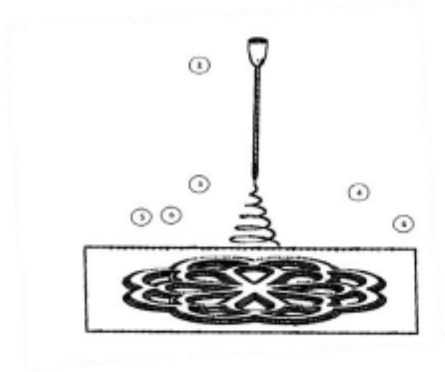


Figure 3

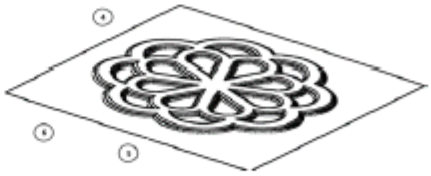


Figure 4

Figure 3: Process of PLLA nanofiber deposition. 2. Needle; 3 Nanowire; 4.Nanofiber Mat with small thickness; 5. Nanofiber mat with great thickness; 6. Nanofiber mat.
Figure 4: Nanofiber mat coating the target. 4. Nanofiber Mat with small thickness; 5.Nanofiber mat with great thickness; 6. Nanofiber mat.

2.2.2. PLLA nanofiber morphology.

Micrographs of the PLLA nanofibers were recorded in a Scanning Electron Microscope (SEM) (LEO Electron Microscopy 440i) after sputter coating with gold, and processed with image processing software (Image Pro Plus; Media Cybernetics Inc., USA).

3. Results and Discussion

The electrospinning process with PLLA to produce nanofibers is a well-known method. However, the capacity to create designs using the nanofibers it is a complicated matter.
Many works proposed different technics to create different patterns with the nanofibers using diverse methods. The use of electrodes to alternate the electrical field during the electrospinning was one of those technics. In the works of Bellan [30], Kim [31] and Archarya [32], there were fabrications of different patters with the nanofibers using steering electrodes, whose depending on the complexity of the pattern consisted of the use of two or more electrodes.
The position of the collector itself also can play an important role in the deposition of the nanofibers. Where the use of grids like in the works of Munir [33], Gibson [34], Wang et.al. [35] And Zang [36] were used to guide the deposition of the nanofibers, creating certain patterns. Zhang [37] on the other hand, used charged needles to create a patterned nanofibers membrane. His work, while promising, created patterns with 5 mm dimension, that didn't show great complexity on its design. These arrays consist on regions of high fibers density, with potential and fibers density, lower in the isolated areas.
On our work, we were able to create an intricate mat of PLLA nanofibers. The method consisting in the simply replacement of the collecting plate with a metallic template to guide de deposition of the nanofibers, lead to the creation of a complex setting.
As show in Figure 4, the nanofibers coated the target, using the metallic template as a guide to deposition.
On Figure 5 and 6, we can see how the nanofiber mat would withdraw from the mold, while keeping up the complex design of the template.

Figure 5

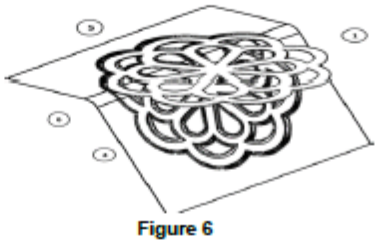


Figure 6

Figure 5: Withdrawal of the nanofiber mat - upper view. 1. Metallic Target; 4. Nanofiber Mat with small thickness; 5. Nanofiber mat with great thickness; 6. Nanofiber mat.
Figure 6: Withdrawal of the nanofiber mat - bottom view. 1. Metallic Target; 4.Nanofiber Mat with small thickness; 5. Nanofiber mat with great thickness; 6. Nanofiber mat.

On Figure 7, we can see a picture of the PLLA nanofibers mat that was built from the metallic template. The nanofiber deposition followed the complex design of the template, with a higher density of nanofibers deposited on the metallic area than on the gaps, like in the work of Zhang [37]. On figure 8, we can see the small dimensions of the fiber when compared with a regular measurement rule.

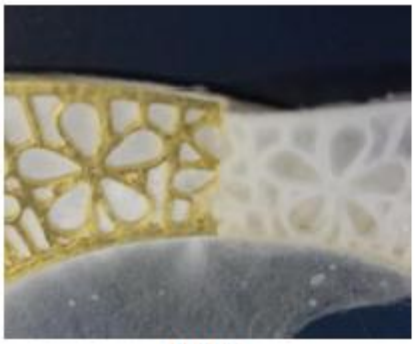


Figure 7

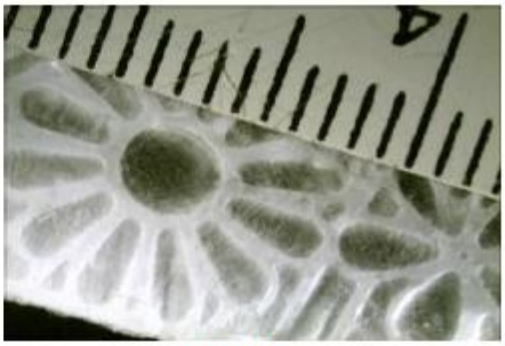


Figure 8

Figure 7: Photo of the withdrawn nanofiber mat next to its metallic template. On the left, we can see the metallic mold, and on the right, the nanofiber mat created based on the metallic template.
Figure 8: Picture of the nanofiber mat showing it small dimension (mm scale).

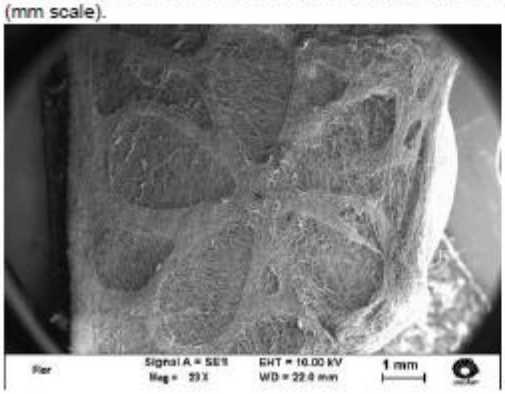


Figure 9: SEM image from the nanofiber mat.

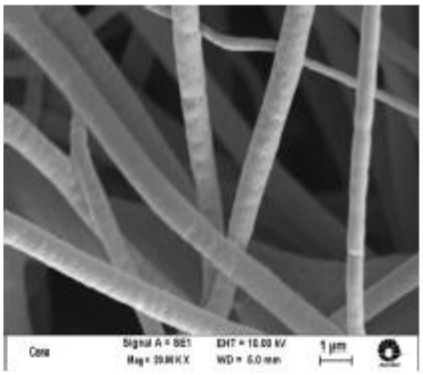


Figure 10: SEM of the nanofiber mat.

However, it was when the PLLA nanofiber mat was observed through SEM that we could gather the detailed image of the nanometric range of it. When magnified 23 times, we could observe that the deposition of the fibers followed the entire design of the template, including small gap areas, fully covering it with the mat, like shown in Figure 9.
With our electrospinning technique, we obtained fibers with a diameter of less than 1µm, like shown in the SEM image on Figure 10. Those fibers are extremely thin, and yet they kept their morphological structure, no matter how complex the deposition template was. This lead us to believe that we can control the deposition of the nanofibers in any form that we desire, and such, create different patterns for different uses of the nanofibers. This technic could be used for instance to create a scaffold with a detailed structure to guide cellular proliferation and differentiation, leading to a more efficient cellular growth, and tissue regeneration.

4. Conclusion

Until this moment, it was inexistent a way to make nanofibers with very complex patterns and small dimensions. A characteristic, which it is extremely important to the development of different uses for the nanofibers. In our work, we demonstrated a simple method to control the design of the deposition of the nanofibers, leading to the production of the complex designs with extremely small dimensions.

Acknowledgments
National Institute of Biofabrication - BIOFABRIS.

References:

[1]Zeng J, Chen X and Liang Q. Ultrafine fibers electrospun from biodegradable polymers. J. Appl. Polym. Sci. 2003; 4:1085-1092.

[2]Reneker DH, Chun I. Nanometre diameter fibres of polymer produced by electrospinning. Nanotechnology. 1996; 7: 216-223. [3]Doshi J, Reneker DH. Electrospinning process and application of electrospun fibers. J Electrostatics. 1995; 35: 151-160.

[4]Greiner A, Wendorff JH. Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. Angew. Chem. Int. 2007; 46: 2–36.

[5]Raghavan P, Lim D-H, Ahn J-H, Nah Ch, Sherrington DC, Ryu H-S, Ahn H-J. Electrospun polymer nanofibers: The booming cutting edge technology. React. Funct. Polym. 2012; 72: 915–930.

[6]Agarwal S, Greiner A, Wendorff JH, Functional materials by electrospinning of polymers. Prog. Polym. Sci. 2013; 38: 963–991.

[7]Yarin AL, Koombhongse S and Reneker DH. Bending instability in electrospinning of nanofibers. J. Appl. Phys.2001; 89(5):3018-3026

[8]Li D and Xia Y. Electrospinning of Nanofibers: Reinventing the Wheel? Adv. Mater.2004; 16(14):1151-1170.

[9]Lannutti J, Reneker D, Tomasko D and Farson
D. Electrospinning for tissue engineering scaffolds.
Mater. Sci. Eng. C. 2007; 27:504-509.

[10]Pham QP, Sharma U, Mikos AG. Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review. Tissue Eng. 2006;12(5):101-110.

[11]Yarin AL, Koombhongse S, Reneker DH. Bending instability in electrospinning of nanofibers. J Appl Phys. 2001; 89: 3018-3026.

[12]Grafe T; Graham K. Presented at the International Nonwovens Technical Conference, Atlanta, GA, Sept 24, 2002.

[13]Reneker DH and Yarin AL. Electrospinning jets and polymer nanofibers. Polymer, 2008; 49: 2387–2425.

[14]Hardy JG, Romer LM and Scheibel TR. Polymeric materials based on silk proteins. Polymer, 2008; 49: 4309–4327.

[15]Dong B, Arnoult O, Smith ME and Wnek GE, Electrospinning of Collagen Nanofiber Scaffolds from Benign Solvents. Macromol. Rapid Commun. 2009; 30: 539–542.

[16]Ohkawa K, Cha DI, Kim H, Nishida A and Yamamoto H. Electrospinning of chitosan. Macromol. Rapid Commun. 2004; 25: 1600–1605.

[17]Huang ZM, Zhang YZ, Kotaki M and Ramakrishna S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. Compos. Sci. Technol. 2003; 63:2223–2253.

[18]Ramakrishna S, Jose R, Archana PS, Nair AS, Balamurugan R, Venugopal J and Teo WE. Science and engineering of electrospun nanofibers for advances in clean energy, water filtration, and regenerative medicine. J. Mater. Sci. 2010; 45: 6283–6312.

[19] Zamani M, Prabhakaran MP and Ramakrishna S. Advances in drug delivery via electrospun and electrosprayed nanomaterials. Int. J. Nanomedicine 2013; 3: 2997–3017.

[20]Dahlin RL, Kasper FK, Mikos AG. Polymeric nanofibers in tissue engineering. Tissue Eng. Part B 2011; 17: 349–364.

[21]Agarwal S, Wendorff JH, Greiner A. Use of electrospinning technique for biomedical applications. Polymers 2008; 49:5603–5621.

[22]Sill TJ and von Recum HA. Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. Biomaterials 2008; 29:1989–2006

[23]Roh JD, Nelson GN, Brennan MP, Mirensky TL, Yi T, Hazlett TF, Tellides G, Sinusas AJ, Pober JS, Saltzman WM, Kyriakides TR and Breuer CK. Small-diameter biodegradable scaffolds for functional vascular tissue engineering in the mouse model, Biomaterials 2008;29:1454–1463.

[24]Amass W, Amass A and Tighe B. A review of biodegradable polymers: uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradables polymers and recent advances in biodegradation studies, Polym. Int. 1998; 47:89–

2-“Comparative Analysis of Biocompatibility between Poly (Llactic Acid) (PLLA) and PLDL Purac® Nanofibers for use in Tissue Engineering”

Esse artigo apresentado durante Congresso engenharia química de biomateriais, em Bolonha, mostra a comparação de compatibilidade biológica do PLLA desenvolvido na Unicamp com o PLDL Purac®, que é um dos melhores biomateriais vendidos comercialmente. Para fazermos a comparação foram produzidas nanofibras no equipamento do autor dos dois materiais, cultivou-se células sobre ambos e comparou-se o resultado final mostrando que os resultados obtidos foram praticamente os mesmos.

CHEMICAL ENGINEERING TRANSACTIONS
VOL. 49, 2016
A publication of AIDIC
The Italian Association of Chemical Engineering
Online at www.aidic.it/cet
Guest Editors: Enrico Bardone, Marco Bravi, Tajalli Keshavarz
Copyright © 2016, AIDIC Servizi S.r.l.,
ISBN 978-88-95608-40-2; ISSN 2283-9216
DOI: 10.3303/CET1649034

Comparative Analysis of Biocompatibility between Poly (L-lactic Acid) (PLLA) and PLDL Purac® Nanofibers for use in Tissue Engineering

Ana Carolina B. Benatti[a,b*], Mariana V. Xavier[a], Milton F. Macedo[a], Ana Amélia Rodrigues[a], André L. Jardini[a], Rubens M. Filho[a], Paulo Kharmandayan[a,b]

[a] Institute of Biofabrication - School of Chemical Engineering, University of Campinas, CEP 13081-970, Campinas-SP, Brazil
[b] School of Medical Sciences, Surgery Department, University of Campinas, CEP 13083-970, Campinas-SP, Brazil
carol_benatti@hotmail.com

The absorbable polyacid, poly (L-Lactide) (PLLA) is one of the most commonly used and studied materials in tissue engineering, for its biocompatibility and biodegradability. This work will show that the PLLA synthesized at our laboratory has the same biocompatibility as the PLDL Purac®. The PLLA was synthesized through ring-opening polymerization and manufactured into nanofibers through the electrospinning process. The cytotoxicity of the material was evaluated by the calorimetric MTT assay (Sigma), Live/Dead (Molecular Probes), Direct Contact, Elution and Agar Diffusion.The assays were performed using nanofibers membranes made with PLLA and with PLDL Purac®, where the biomaterials were in contact with the fibroblast cell culture, in the sense to compare the results between them. For the MTT, Live/Dead and Elution assays the nanofiber membranes were incubated with the fibroblast cell culture for 24h, 48h and 72h. For the Direct Contact and Agar Diffusion the nanofiber membranes were maintained in contact with the cells for 24h. For the assay controls we used DMEM-LG containing 0.5% phenol as the positive control of toxicity CT(+) and for negative control of toxicity CT(-) DMEM-LG containing 10% FBS. The ANOVA test was used to measure the MTT assay results, and within 24h of exposure, the cells in contact with the PLLA showed a higher proliferation rate than CT(-) and PLDL Purac®, being significantly different ($p < 0,05$). Whatsoever, there were no statistically significant differences between the PLLA, the PLDL Purac®, and the CT(-) after 48h and 72h of culture ($p>0.05$). The morphology of the cells in contact with both biomaterials was also considered normal, showing no signal of cytotoxicity. The high rates of proliferation and viability of the cells in contact with the PLLA, shown by the biocompatibility assays, demonstrate that the PLLA is a biocompatible material. The PLDL Purac® exhibited similar results, as expected. Those findings show that the PLLA synthesized has the same biocompatibility as the PLDL Purac®. Thus, the PLLA synthesized in our laboratory is a high quality biomaterial that can assist in the manufacturing of nanofibers that can be adapted for different biomedical applications.

1. Introduction

Polymers constitute a very wide-ranging class of biomaterials, with diverse uses in the biomedical field. These biomaterials must show suitable mechanical properties as well as biocompatibility characteristics, for use in the human body. Therefore, they should not present any local or systemic adverse biological response. PLA is known for its outstanding biocompatibility and mechanical properties. It also features a diversification of applications, since simple changes in its physical and chemical structure may make it useful in different areas. It can be used as a combination of L-lactic (PLLA) and D, L-lactic (PLDL) acid monomers, being the latter rapidly degraded without formation of crystalline fragments during this process (Fukushima et al. 2008). Therefore, PLA and its copolymers are materials commonly used in tissue engineering. Whereas one of the goals of tissue engineering is to help improve tissue regeneration, the use of nanofiber membranes, combined with their potential for biodegradation, could be of interest for various biomedical applications, since they mimic the natural extracellular matrix (ECM), providing an excellent environment for the cells to attach, grow

Please cite this article as: Benatti A., Xavier M., Macedo M., Rodrigues A.A., Jardini A., Filho R., Kharmandayan P., 2016, Comparative analysis of biocompatibility between poly (l-lactic acid) (plla) and pldl purac® nanofibers for use in tissue engineering, Chemical Engineering Transactions, 49, 199-204 DOI: 10.3303/CET1649034

and migrate, thus improving the rate of tissue regeneration (Dong et al. 2009). In the present study, we synthesized PLLA in our laboratory through ring-opening polymerization and manufactured nanofiber membranes with it. To assay the biocompatibility of the material, we performed different biocompatibility experiments, and we compared it with PLDL Purac® nanofibers membranes, a PLA co-polymer commonly used in tissue engineering, with excellent biocompatibility characteristics (Leiggener et al. 2006).

2. Materials and Methods

2.1 Manufacturing of PLLA and PLDL nanofibers

For electrospinning, the biodegradable and biocompatible polymers PLDL Purac® and Poly(L-lactic acid) (PLLA) were used. PLLA was synthesized in our laboratory as described by Lopes (2014). In the nanofibers manufacturing process, the PLLA was dissolved in acetone and chloroform, and PLDL in acetone, both at analytical grade. The solution was then loaded in a 10ml syringe, connected to a polyamide cylinder, attached to a 0.7mm hypodermic needle as a nozzle. The flow rate of the jet (8ml/h) was controlled by using a syringe pump. To charge the solution, a 15kV high voltage power-source was used. The distance between the needle and the collector plate was of 17cm and the time of electrospinning of 2h.

2.2 Cell Incubation

The Vero cells (fibroblast) were seeded (3 x 106 cells/mL) in a culture plate and incubated with 5% CO_2 at 37ºC for 24h. Then, PLLA and PLDL nanofibers were added in wells and cultured for different times. DMEM-LG containing 0.5% phenol and 10% FBS were used as the positive control CT(+) and negative control CT(-) for toxicity, respectively. All experiments were performed at least in triplicate (n=3).

2.3 MTT

The modified Mosmann (1983) method was chosen to perform the MTT assay. For this assay, after periods of incubation, the MTT solution (0.5 mg/mL Sigma) was added, and after 4h of incubation it was withdrawn and 200 µl of dimethyl sulphoxide (DMSO) was added to determine the absorbance values, at an absorption wavelength of λ = 595 nm (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate reader, Molecular Probes). The resulting absorbance values were expressed as optical density (OD) (mean value ± standard deviation). The comparison between the values was made through parametric data analysis One-way ANOVA. Analysis with $p < 0.05$ were considered significant. Analyzes were performed by using StatView software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

2.4 Elution

The elution assay is a quantitative method designed to show the presence of toxic material eluted from a test sample and the effects on the fibroblast cells cultured in the presence of the extract. For this assay, the materials were incubated in culture medium for 48h. After this period, the extract obtained from incubation of materials was inoculated with the fibroblast cells, prepared as mentioned in item 2.2. After various incubation periods (24, 48 and 72h), the extract was removed and a calorimetric assay was performed, as mentioned in item 2.3.

2.5 Live/Dead®

The qualitative fluorescence assay kit Live/Dead® (Molecular Probes) was used to qualify the fibroblast viability. After the incubation time, the cells were washed with 200 µl of PBS and treated with a solution of Calcein AM and Ethidium homodimer-1 (EthD-1) according to the manufacturer's instructions. The cells were incubated at 37°C for 30 min, then washed with PBS and observed by inverted fluorescence microscopy (Nikon E800) with a specific program (Image Pro-Plus software).

2.6 Direct Contact

For direct contact assay fibroblasts were cultured into a high confluence layer in a 24 wells plate. Then, the culture medium was removed and replaced with fresh one. The nanofiber samples of PLLA and PLDL were placed onto the culture and incubated for 24h, with 5% CO_2 at 37ºC. After this period, the materials and culture medium were removed from the wells. The remaining cells were fixated with alcohol 70% and then stained with Toluidine Blue (TB) and Xylidine Ponceau (XP). The stain only works on the living cells, and thus, the toxicity of the material is indicated by the absence of stained cells around the material.

2.7 Agar Diffusion

The agar diffusion assay is a qualitative test designed to show toxic effects of the material on cell morphology. A near confluent layer of fibroblasts was prepared in a 6-well culture plate. The medium was removed and the cells covered with a solution of 2% agar, which contained vital stain. While the agar solidified, the cells dispersed through it. The PLLA and PLDL nanofibers were then placed onto the surface overlaid of the agar and incubated for 24h at 37 ºC. Latex was chosen as positive control of cytotoxicity CT(+) and Teflon as the negative control of cytotoxicity CT(-). The live cells take up the neutral red vital stain and retain it, while the

dead cells do not. Thus, the toxicity of the material were evaluated by the loss of vital stain under and around the material, allowing differentiating the viable from the lysed cells.

3. Results and Discussion

3.1 Cytotoxicity by MTT assay

Cytotoxicity tests were performed to study the polymer biocompatibility. In this study, we chose the MTT assay where the metabolic activity and the rate of cell growth indicated the degree of cytotoxicity of the PLLA and PLDL in the cell culture. MTT is a yellow salt that is reduced by mitochondrial dehydrogenase activity of the enzyme, resulting in a formazan purple salt. This reduction occurs only in living cells. Thus, cell viability was determined by the intensity of purple color, which is proportional to the amount of formazan crystals formed. After performing the MTT test, the absorbance values obtained generated the curves below (Figure 1). The graph shows the proliferation of fibroblast cells in contact with the PLLA and PLDL after 24, 48 and 72h of exposition.

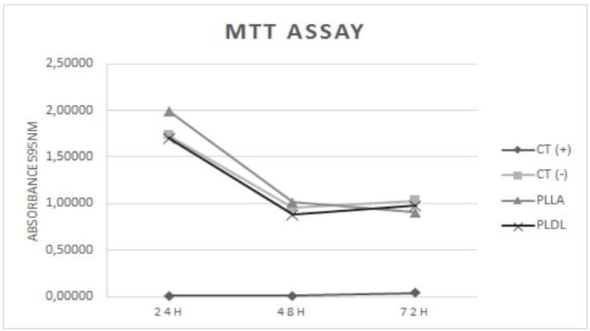


Figure 1. MTT assay for fibroblast cells cultured with PLLA and PLDL, negative control for toxicity CT(-) and positive control for toxicity CT(+) for 24 h, 48 h and 72 h.

According to the ANOVA test, after 24h of exposure, there were statistical differences ($p < 0,05$) between CT(-), PLLA and PLDL, with PLLA showing a higher rate of cell proliferation than PLDL and CT(-). Whatsoever, there were no statistically significant differences between the PLLA, PLDL and the (CT-) after 48h and 72h of culture ($p > 0.05$). Those results appoint that at the initial exposure time, where the medium is rich in nutrients and space for the cells to proliferate, there is a high rate of cellular growth. The presence of the nanofibers stimulate the cell development, which explains the higher amount of cells when cultured with the PLLA and PLDL nanofibers, than on the CT(-). Those findings show that the synthesized PLLA and the PLDL do not present cytotoxic behavior with respect to the fibroblast cells in the evaluated periods, in accordance with the MTT studies of Sarasua et al. (2011) and Wu et al. (2014).

3.2 Elution

The elution assay is a quantitative technique designed to show the incidence of toxic material eluted from a test sample into the culture medium. Figure 2 shows the kinetics of the cells exposed to the PLLA and PLDL nanofibers. As observed, the positive control of cytotoxicity CT(+) shows a very little presence of live cells. As for the negative control CT(-), cells with PLLA nanofibers and cells with PLDL nanofibers, both showed a high rate of proliferation at 24h of incubation, with no statistical difference between them, where at 24h of incubation there was a high amount of space and nutrients for the cells to multiply. At 48h there was a decrease in cell proliferation for CT(-), PLLA and PLDL, probably due to the increasing amount of metabolites and the decreased quantity of space and nutrients for the cells. The same happened at 72 h of incubation. These findings show that the synthesized PLLA and the PLDL does not negatively affect the fibroblast cell viability in the evaluated time periods.

202

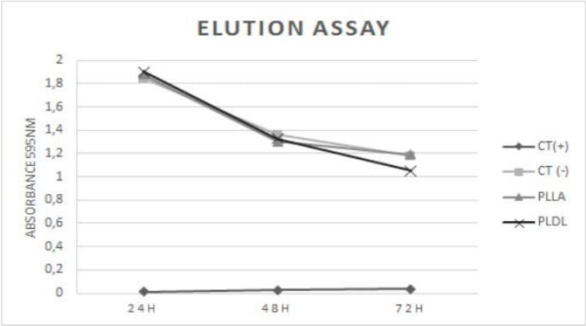


Figure 2. Elution assay for fibroblast cells cultured with PLLA and PLDL, negative control for toxicity CT(-) and positive control for toxicity CT(+) for 24 h, 48 h and 72 h.

3.3 Viability by LIVE/DEAD®

The Live/Dead® assay provides a qualitative evaluation of the polymer biocompatibility when in contact with the cells. The fibroblast were cultured with the biomaterials at three different times: 24, 48 and 72h, along with it controls of toxicity. The calcein present in live cells produces an intense green fluorescence, which is determined by the enzymatic conversion of the non-fluorescent cell-permeant agent, calcein AM. EthD-1 enters cells with damaged membranes undergoing a strong fluorescence enhancement upon binding to nucleic acids, thereby producing a bright red fluorescence in dead cells. EthD-1 is excluded by the intact plasma membrane of live cells.

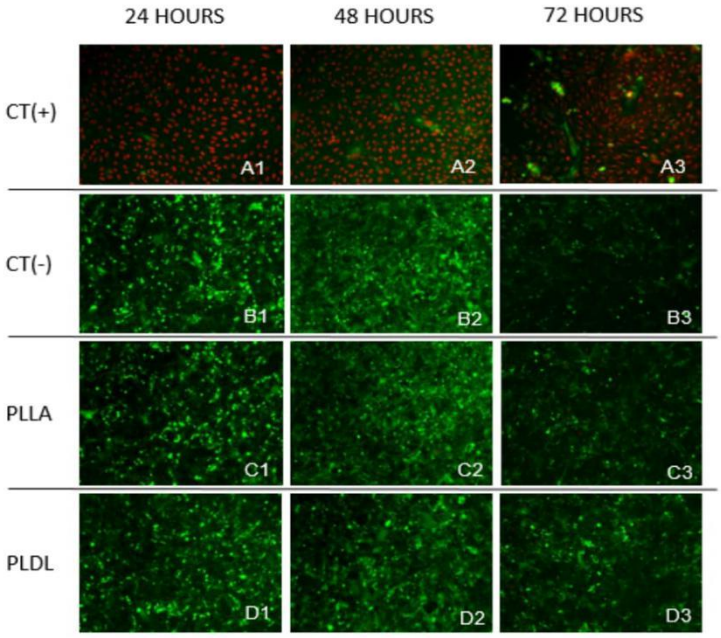


Figure 3. Live/Dead assay of fibroblast in contact with PLLA and PLDL at different times. A – Positive control CT(+). B – Negative control CT(-). C – PLLA nanofibers cultured with fibroblasts. D – PLDL nanofibers cultured with fibroblasts.

Figure 3 presents the results of the Live/Dead assay. Images A show the positive control of toxicity CT(+) where the cells were red stained, showing cell death at all times. Images B shown the negative control of toxicity CT(-), where, at different times, cells were stained in fluorescent green indicating that the cell membrane was intact. Images C show the cells in contact with PLLA for 24h, 48h and 72 h, respectively. They all showed normal morphology, as the ones at CT(-); however, at 72h we can see some cells red stained, showing that there are some dead cells. Whatsoever, at 72h of incubation, there are less nutrient and space for the cells to keep proliferating, with a high amount of metabolites in the culture medium. This can be the reason for the appearance of a higher number of dead cells in the culture. The same results were obtained for the cells in contact with PLDL, as shown in Images D. Those results show that the presence of PLLA and PLDL nanofibers did not affect negatively cell proliferation and morphology, instead improved cell proliferation, in line with the results previously shown by Bernstein et al. (2012), who tested PLLA with different formats, such as screws and pins through LIVE/DEAD® assay. Hence the qualitative assay of Live/Dead corroborate the quantitatively cytotoxicity assay MTT.

3.4 Direct Contact

The cells were directly exposed to the PLLA and PLDL nanofibers to assay if their presence would cause toxic effects on cell morphology. Since only live cells are stained, we can measure the toxicity of the material through the lack of stain around the area exposed to the material. Figure 4 presents the results of the assay; Images A report the control, where no material was in contact with the fibroblast, showing normal cell morphology (A1 and A2). Images B show the cells in contact with PLLA nanofibers and stained with Toluidine Blue (B1) and Xylidine Ponceau (B2), both images show a normal cell morphology, indicating that the PLLA nanofibers present no toxicity for the fibroblasts. Images C show the cells in contact with PLDL nanofibers and stained with Toluidine Blue (C1) and Xylidine Ponceau (C2) indicating that the PLDL nanofibers also present no toxicity for the fibroblasts.

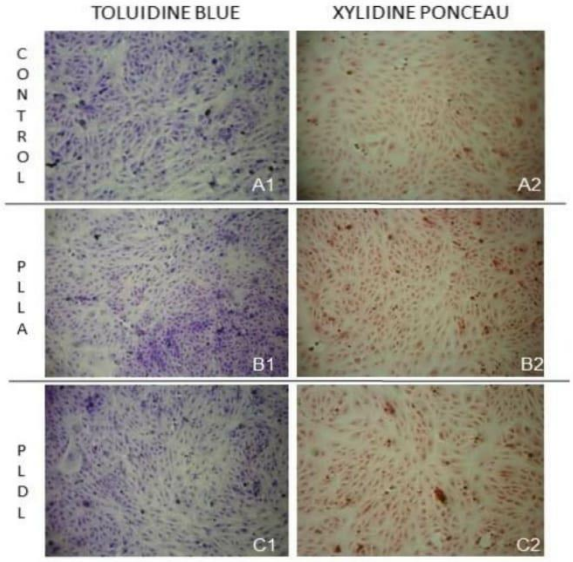


Figure 4. Direct Contact assay. Cells in contact with PLLA and PLDL stained with Toluidine Blue and Xylidine Ponceau.

3.5 Agar Diffusion

The agar diffusion assay is a qualitative test, where one can assay the toxicity of a material from the lack of dye around it, since only live cells can be stained. Figure 5 show the fibroblast cells in contact with PLLA, PLDL and their respective controls. On image A we can see the lack of dye of the cells in contact with the Latex CT(+), showing cell death. On image B, the cells were all stained with vital stain neutral red when in contact with the Teflon CT(-), showing that the cells were alive and with normal morphology. Image C show the cells in contact with PLLA nanofiber and image D with PLDL nanofibers. On both images, the cells were stained, both presenting normal morphology. This demonstrated that both materials do not present any toxic effect on cell culture.

204

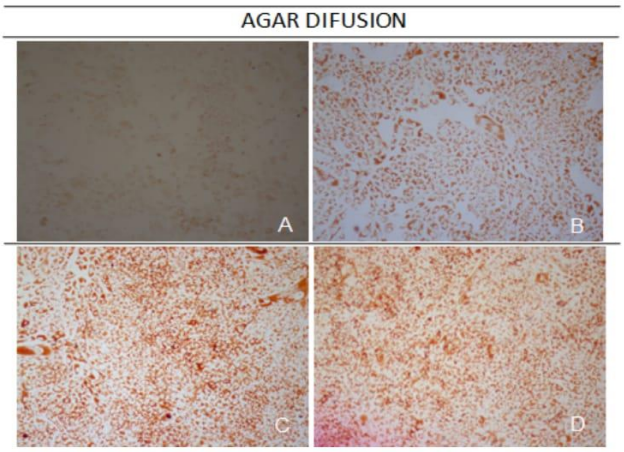


Figure 5. A – Positive Control of Toxicity (Latex). B – Negative control of toxicity (Teflon). C- Cells exposed to PLLA nanofibers. D- Cells exposed with PLDL nanofibers.

4. Conclusion

The results of the MTT assay, Live/Dead, Direct Contact, Elution and Agar Diffusion bring to the conclusion, that both PLLA nanofibers and PLDL® nanofibers do not present toxic effect on fibroblast cell cultures. Moreover, there were no statistical differences between the quantitatively results of PLLA and PLDL® on the MTT and Elution assays. This show that the PLLA synthesized in our laboratory has the same biocompatibility characteristics than the PLDL®, a material available on the market.

Acknowledgments

The authors wish to acknowledge the financial support provided by the Scientific Research Foundation for the State of São Paulo and National Council for Scientific and Technological Development.

Reference

Bernstein A., Tecklenburg K., Südkamp P., Mayr H.O., 2012, Adhesion and proliferation of human osteoblast-like cells on different biodegradable implant materials used for graft fixation in ACL-reconstruction. Arch Orthop Trauma Surg. 132 (11), 1637-1645.

Dong Y., Liao S., Ngiam M., Chan C. K., Ramakrishna S., 2009, Tissue Eng. Part B. Rev. 15, 333-351.

Fukushima K., Kimura Y., 2008, An efficient solid-state polycondensation method for synthesizing stereocomplexed poly(lactic acid)s with high molecular weight. J Polym Sci Part A: Polym Chem. 46, 3714–3722.

Leiggener C.S., Curtis R., Muuller A.A, Pfluger D., Gogolewski S., Rahn B.A., 2006, Influence of copolymer composition of polylactide implants on cranial bone regeneration. Biomaterials. 27,202–207.

Lopes M. S., 2014, Microreactor development for Synthesis of Bioabsorble Polymer (PLLA) used as biomedical implants. Campinas, 2014. PhD Program in Chemical Engineering. State University of Campinas.

Mosmann T., 1983, Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, J Immunol Methods, 65, 55-63.

Sarasua J.R., Rodrıguez-Lopez N., Zuza E., Petisco S., Castro B., del Olmo M., Palomares T., Alonso-Varona A., 2011, Crystallinity assessment and in vitro cytotoxicity of polylactide scaffolds for biomedical applications. J Mater Sci: Mater Med. 22, 2513–2523.

Wu G., Wu W., Zheng Q., Li J., Zhou J., Hu Z., 2014, Experimental study of PLLA/INH slow release implant fabricated by three dimensional printing technique and drug release characteristics in vitro. Biomed Eng Online. 19, 13:97.

3 - “PLLA Synthesis and Nanofibers production: Viability by Human Mesenchymal Stem Cell from Adipose Tissue”

Este artigo apresentado numa conferência de biofabricação, em Manchester, mostra a síntese e a produção de nanofibras de PLLA, produzidas no equipamento desenvolvido pelo autor e sua compatibilidade com células-tronco mesenquimais humanas feitas a partir células de tecido adiposo.

Ressalta-se que os resultados obtidos demonstram um aumento de 110% da população de células, após 72 horas, na amostra disposta sobre nanofibras em relação à amostra de células diretamente sobre o PLLA.

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Procedia CIRP 49 (2016) 213 – 221

www.elsevier.com/locate/procedia

The Second CIRP Conference on Biomanufacturing

PLLA Synthesis and Nanofibers production: Viability by Human Mesenchymal Stem Cell from Adipose Tissue

Xavier, M.V.[1] *, Macedo, M.F.[1,4], Benatti, A. C. B.[1,5] , Jardini, A.L. [1,2] , Rodrigues A.A. [1,2], Lopes M.S.[1,2], Lambert C.S.[1,2], Filho, R.M. [1,2] , Kharmandayan, P. [1,5]

1 – Institute of Biofabrication - School of Chemical Engineering, University of Campinas, CEP 13081-970, Campinas-SP, Brazil

2 – School of Chemical Engineering, University of Campinas, CEP 13081-970, Campinas-SP, Brazil

3 - Institute of Physics "Gleb Wataghin", Departament of Applied Physics, University of Campinas, CEP 13083-859, Campinas-SP, Brazil

4 – School of Mechanical Engineering, University of Campinas, CEP 13083-860, Campinas – SP, Brazil

5 - School of Medical Sciences, Surgery Department, University of Campinas, CEP 13083-970, Campinas-SP, Brazil

* Corresponding author. Tel.: *+55 19 4108-0014*; fax: *+55 19 3521-3965*. *E-mail address: maryvitelo@hotmail.com*

Abstract

The absorbable polyacid is one of the most used and studied materials in tissue engineering. This work synthesized a poly (L-lactic acid) (PLLA) through ring-opening polymerization and produced with it nanofibers by the electrospinning process. The PLLA was analyzed by FTIR and its cytotoxicity was evaluated by the MTT assay and Live/Dead® (Molecular Probes). The tests were performed in contact with human mesenchymal cells at varying times. The high rates of viability and proliferation of cells in contact with the PLLA shown by MTT and Live/Dead® tests demonstrate that this PLLA is a biocompatible material. There was also the successful production of electrospinning nanofibers, which can be converted for specific biomedical applications in the future.

© 2015 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).
Peer-review under responsibility of the scientific committee of The Second CIRP Conference on Biomanufacturing

Keywords: biomaterials; material synthesis; PLLA; cell culture; MTT test; tissue-engineering; biofabrication.

1. Introduction:

For the past few years, there had been a growing interest in biomaterials and tissue engineering. This interest is a result of the indispensable role of those in the medical field. Biomaterials are biocompatible and bioactive, with the intent to interact with biological systems, as well as restore functions of living tissues and organs on human or animal individuals [1-4].

The polymers compose a very broad class of biomaterials, and there had been development in the biomedical field for use of

2212-8271 © 2015 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).
Peer-review under responsibility of the scientific committee of The Second CIRP Conference on Biomanufacturing
doi:10.1016/j.procir.2015.11.019

those polymeric materials. These biomaterials must show appropriate mechanical properties as well as be biocompatible, to be used in the human body. Thus they shouldn´t present any local or systemic adverse biological response. The material should be then non-toxic, non-carcinogenic, non-antigenic and non-mutagenic. In blood applications, they must also be non-thrombogenic [5].

The assigning of biomaterials appropriate for the development of implants requires meeting certain criteria, so that its effects on the surrounding tissues are decreased. The most pertinent variables should be studied in detail, such as biocompatibility, biodegradability, bioabsorbable capacity, degradation rate, surface finish (pore diameter and porosity), etc. [6].

Biomaterials may show a low, medium or high plausible risk to human safety, conditional on the kind and length of patient contact with it. One of the suggested and appropriate steps for the biological assessment of the medical devices is the *in vitro* measurement of the cytotoxicity of the biomaterial [7]. Cytotoxicity assays are essential for biocompatibility analysis of a biomaterial. These tests will be determined the cytotoxicity effect of the material, depending on the time and contact of it with the body, blood, bone and other tissues [8]. Therefore, the in vitro cytotoxicity evaluation of biomaterials is an important aspect in the research for tissue engineering.

Nowadays, many biomaterials are used in the medical area. We can find bioabsorbable screws and pins, biodegradable peripheral stents and suture materials. Frequently these materials are made of poly(L-Lactide) (PLLA) and others compounds which contains that polymer.

Polylactides in overall and in specific poly (L-lactide) (PLLA) may be seen as second-generation biomaterials[1-4]. Different variants of temporary devices have been used in the medical field, and the most used are polyesters composed of derivatives of α-hydroxy acids such as poly (L-lactic acid) (PLLA), poly (D-lactic acid) (PDLA), poly (DL-lactic acid) (PDLLA), poly (glycolic acid) (PGA) and polycaprolactone (PCL). The polymer is degraded through simple hydrolysis, breaking the molecule into small units, and so its products can then be eliminated from the body through natural metabolic pathways, such as citric acid cycle, or through renal excretion [9]. The hydrolysis initially promotes the fall of the molar mass, mainly in the amorphous regions. As the water diffuses into the device and fragmentation occurs to decrease in mechanical strength and further reduced weight due to hydrolysis and enzymatic attack [10].Thus, no surgical removal of the materials is necessary and over the time, the new tissue can be shaped substituting the mechanical purpose of the implant itself.

PLLA has gained great attention because of its excellent biocompatibility and mechanical properties. It also presents a diversification of applications, since simple changes in their physical and chemical structure may make it useful in different areas. Depending on your application and your final destination, you can get different products using specific polymerization routes. However, its long degradation times coupled with the high crystallinity of its fragments can cause inflammatory reactions in the body. In order to overcome this, PLLA can be used as a material combination of L-lactic and D, L-lactic acid monomers, being the latter rapidly degraded without formation of crystalline fragments during this process [11].

Prior works done by our group [12, 13] have shown that the PLLA can be obtained using different routes (Figure 1). In general, there are three methods that can be used to produce high molecular mass PLLA of about 100,000 Daltons: (a) direct condensation polymerization; (b) azeotropic dehydrative condensation and (c) polymerization through lactide formation, the ring-opening polymerization [14]. Currently, direct condensation and ring-opening polymerization are the most used production techniques.

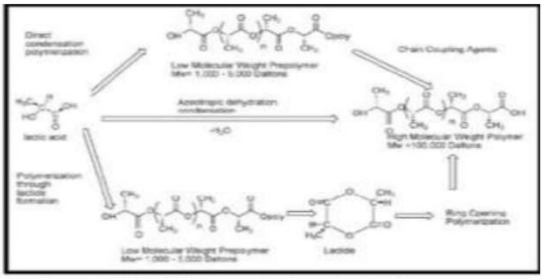


Figure 1. PLLA different synthesis methods [14]

While there are different ways to manufacture PLLA, its production is not an easy task. The synthesis of PLLA demands severe control of conditions such as temperature, pressure and pH, just as well as the use of catalysts and long polymerization time, which lead to a high-energy consumption to achieve the final product.

PLLA not only is a biodegradable and biocompatible material, it also presents a mechanical response similar to collagen, as well as a semi crystalline structure, with an excellent elastic capacity, characteristics that makes the polymer a perfect candidate for electrospinning [15-18]. Electrospinning of polymer solutions has been extensively used in the last few years to produce polymeric fibers of Nano-dimensions [19].

The electrospinning fibers have exceptional properties due to the biomimetic features dwelling on the fiber diameter, with less than 1000 nanometers in diameter, in the Nano range as

well as due to the high surface area/volume ratio [20]. In the electrospinning process, a capillary tube or syringe and a metallic electrode are used, associated to a grounded high voltage supply in the polymeric solution. An electrical tension is applied and when the electrostatic forces overcome the solution's surface tension, the hemispherical surface of the capillary's drop (Taylor's cone) elongates and an electrically charged jet of polymeric solution is generated. During the jet's trajectory to the collector, the solvent evaporates; thus solid nanofibers are formed and collected in the form of non-woven mats on the metallic collector. The variables of this process are many: solutions concentration (which determines the solutions viscosity), solvent type, applied electrical field, ionic salts addition (which can increase the solution's electrical conductivity), flow rate, temperature and others [19]. This work will present evidence about the properties and synthesis of PLLA scaffolds and nanofibers, as well as evaluate the biocompatibility of it, through cytotoxicity assays.

2. Materials and Methods

2.1 Poly-lactic acid synthesis

The synthesis of PLLA was conducted by bulk polymerization by adding L-lactide monomer into a glass reactor containing the catalyst Sn (Oct) $_2$ (Sigma). The proportion monomer/catalyst was 0.5%. The mixture was immersed in an oil bath at 140°C for 2 hours under nitrogen flow. The produced polymer was dissolved in chloroform, $CHCl_3$ (Merck), precipitated in ethyl alcohol and dried in a vacuum oven at 60°C for 12 hours.

2.2 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

The functional groups of the produced PLLA were analyzed by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), and paralleled with standard commercial polymer, PLLA (PURAC). The samples were evaluated by ATR accessory SMART mode OMNI-SAMPLER in an infrared Fourier transform spectrometer Thermo Scientific Nicolet 6700. The spectra were analyzed in the mid-infrared range 4000-675cm^{-1}, obtained from the intensities absorption bands of molecules expressed in transmittance.

2.3 Isolation of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue

The human adipose tissue was obtained by liposuction procedure. It was washed with phosphate-buffered saline (PBS) to remove any connective tissue and red blood cells present. The adipose tissue was added to a 50-ml Falcon tube, followed by digestion for 30 minutes at 37 °C with 20 mg collagenase type 1A (Sigma, St. Louis, MO, EUA), 200 mg of bovine serum albumin (BSA), 20 ml of Dulbecco's Modified Eagle's Medium Low Glucose (DMEM-LG) and 10 µl of gentamicin. After tissue digestion, 10 ml of fetal bovine serum (FBS) was added to neutralize the enzymatic activity, and the cells were centrifuged at 1500 rpm for 15 minutes, resuspended in 10 ml DMEM with 10% FBS, seeded into culture plate and incubated at 37 °C with 5% atmospheric CO2. After 24 hours, the medium was changed every three days until the cells reached 70% of confluence. After four passages, the Adipose tissue-derived stem cells (ADSCs) (1x103 cells/ml) were characterized and seeded into a 96-well plate and incubated with DMEM-LG containing 10% FBS at 37 °C for 24 hours.

2.4 MTT test for cytotoxicity evaluation

The PLLA samples (2mm x 5 mm) were incubated with the ADSCs for 24 hours. DMEM-LG containing 0.5% phenol was used as the positive control for toxicity (CT+), whereas DMEM-LG containing 10% FBS was used as the negative control for toxicity (CT-). The cells were cultured for 24, 48 and 72 hours.

The modified MOSMANN method [21] was chosen to perform the MTT assay. After the chosen incubation time, the scaffolds were removed, and the wells were washed with 200 µl of PBS and 200 µl of DMEM-LG. Next, 200 µl of thiazolyl blue tetrazolium bromide solution (MTT, Sigma) in DMEM-LG (0,5 mg/ml) was added, and the plate was incubated in the dark for 4 hours at 37 °C. The MTT solution was withdrawn, and 200 µl of dimethyl sulphoxide (DMSO) was added to determine the absorbance values, at an absorption curve of λ= 595 nm (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate reader, Molecular Probes).

The absorbance values of the results were expressed as optical density (OD) as the mean ± standard deviation. The comparison between the values was made with the method Least Significance Difference (LSD) test of Fisher and parametric data analysis One-way ANOVA. Analysis with $p < 0.05$ were considered significant. Analyzes were performed using StatView software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

2.5 Viability by Live/Dead®

A Live/Dead fluorescence assay kit (Molecular Probes) was used to qualify the ADSC viability. In a qualitative test for biocompatibility Live Dead®**.** The cells were seeded (3 x 106 cells/ml) into a 96-well plate and incubated with DMEM-LG containing 10% FBS at 37 °C for 24 h. After this period, the PLLA scaffolds (2mm x 5 mm) were incubated with the cells for 24 h. A Live/Dead fluorescence assay kit (Molecular Probes) was used to qualify the cells viability. After 24 h, the cells were washed with 200 µl of PBS and treated with a solution of Calcein AM and Ethidium homodimer-1 according to the manufacturer's instructions. The cells were incubated at 37 °C for 30 min and then washed and maintained in PBS. The

cells were observed by inverted fluorescence microscopy (Nikon E800) with a specific program (Image Pro-Plus software).

2.6 Electrospinning process

For the production of the PLLA nanofibers, the polymer was dissolved with acetone and chloroform. The solution was then loaded in a 10ml syringe, connected to a polyamide cylinder, attached to a 0,7mm hypodermic needle as a nozzle. The flow rate of the jet (8ml/h) was managed using a syringe pump. To charge the solution, a 15kV high voltage power-source was used. The distance between the needle and the collector plate was of 17cm. Meaning to enhance the experimental settings, a default electrospinning setup was used as shown in Figure 2.

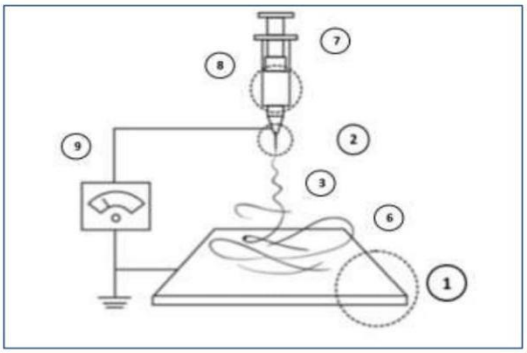


Figure 2. Diagram of the Electrospinning apparatus 1. Metallic Target; 2.Needle; 3.Nanowire; 6.Nanofiber mat; 7, Syringe Infuser; 8.Polymer; 9.High Voltage Source.

2.7 PLLA nanofiber morphology

To analyze the nanofiber morphology, images of the PLLA nanofibers were documented in the Scanning Electron Microscope (SEM) (LEO Electron Microscopy 440i). The nanofiber mat was sputter coating with gold, and then analyzed by SEM. The images were then processed with an image software (Image Pro Plus; Media Cybernetics Inc., USA).

3. Results and Discussion

Poly-lactic acid synthesis

The PLLA was synthesized by opening of the cyclic dimer of L-lactide in order to obtain high molecular weight polymer. The synthesis temperature was maintained at 140 °C thus avoiding, high temperatures, which lead to a depolymerization process which allows the decrease of the molecular weight of the polymer [24,25]. The obtained polymer had the PLLA molecular weight 86.93 g/mol.

Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

FTIR analyses were made to determine the functional groups of the products obtained in order to understand more deeply what happens in the polymerization of Poly (lactic acid).
The standard PLLA and the synthesized by our group, were structurally analyzed by spectroscopy in the infrared (FTIR). The infrared analyzes were performed to determine the functional groups of the product obtained, compared with the standard and verified the formation of the polymer. The spectrum of synthesized PLLA and standard PLLA is presented in Figure 3.

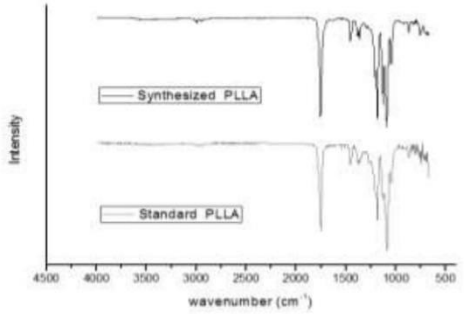


Fig. 3. FTIR spectrum of PLLA synthesized compared with PLLA standard.

In Figure 3 for the standard commercial PLLA, vibrations were observed symmetrical and asymmetrical valence of 1130.42 and 1044.92 cm^{-1}, related to C-O the grouping COO; stretching of the C-H at 2999.47 and 2948.81 cm^{-1}; COO stretching to 872 cm^{-1}; valence vibration of C = O of COO at 1754 cm^{-1} and CH bending vibrations at 1387.86 and 1452 cm^{-1}.
For PLLA obtained in the synthesis, were observed symmetric and asymmetric vibration valence 1130.53 and 1040.14 cm^{-1}, related to C-O the grouping COO; stretching of the C-H bond at 2989.63 and 2946.87 cm^{-1}, COO stretching to 870.76 cm^{-1}, valence vibrations of C=O of COO at 1750 cm^{-1} and C-H bending vibrations at 1374.56 and 1345.14 cm^{-1}.
The results demonstrated the similarity of the peaks relating to the absorption bands of each sample. Which shows the formation of the synthetized polymer PLLA through the studied pathway. The bands of functional groups are the same as those obtained in the standard sample and also those found in the literature shown by Nikolic [26], Motta and Duek [27]. And Lasprilla [28], confirming the formation of the polymer.

Cytotoxicity by MTT

Cytotoxicity test was performed to study the polymer

biocompatibility. During the last few years, the interest of *in vitro* tests has increased, as an alternative to animal experimentation. The cytotoxicity is the harmful *in vitro* effect induced in the cell culture system by the presence of a certain substance or material, such as a biomaterial for instance. In this study we used the MTT assay (a direct and suitable assay for the quantitative in vitro biocompatibility evaluation), on which the metabolic activity and the rate of cell growth have indicated the degree of PLLA cytotoxicity in the cell culture.

MTT [29] is a yellow salt which is reduced by mitochondrial dehydrogenase activity of the enzyme resulting in a formazan salt purple. This reduction occurs only in living cells. Thus, cell viability can be determined by the intensity of purple color, which is proportional to the amount of formazan crystals formed.

After performing the MTT test, the absorbance values that were obtained, generated the curves below (Figure 4). The curves show the cytotoxicity of mesenchymal cells in contact with the PLLA after 24, 48 and 72 hours.

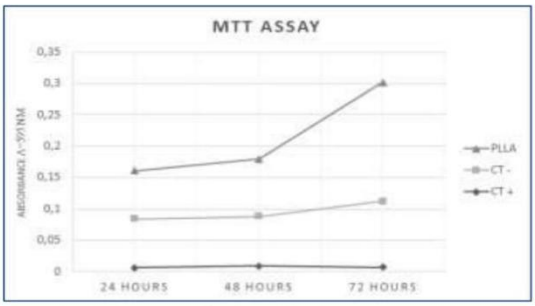


Figure 4. Kinetic curves of cell proliferation as measured by optical density (OD) from the MTT assay for mesenchymal cells cultured with PLLA, negative control for toxicity (CT-) and positive control for toxicity (CT+) for 24 hours, 48 hours e 72 hours.

According to the ANOVA test, there are no statistically significant differences between the PLLA and the (CT-) after 24 hours and 48 hours of culture ($p > 0.05$). However after 72 hours, the cells cultured with PLLA showed higher proliferation when compared to (CT-), considered statistically significant ($p < 0.05$).

These results show that the synthetized PLLA doesn't negatively affect the mesenchymal cell viability in the evaluated periods. This indicates that the material does not present cytotoxic behavior after 24, 48 and 72 hours, in accordance with the MTT studies of Sarasua (2011) [30] and WU (2014) [31]. In the MTT tests made by Niu (2015) [32] and Liu (2014) [33], they evaluated polymers that showed no in vitro cytotoxicity as well, demonstrating correlation with our results.

Viability by LIVE/DEAD®

The Live/Dead® assay shows in a qualitatively matter the polymer biocompatibility when in contact with the cells. The cells were cultured with the biomaterial in three different times: 24, 48 and 72 hours. There was also the presence of positive control for toxicity (CT+) and negative controls of toxicity (CT-). The live cells reacted with the fluorescent marker SYTO® 9, staining the viable cells with green. On the other hand, un-viable cells were stained red, showing cell death.

Figure 5 shows the results obtained by the Live/Dead® method by inverted fluorescence microscopy.

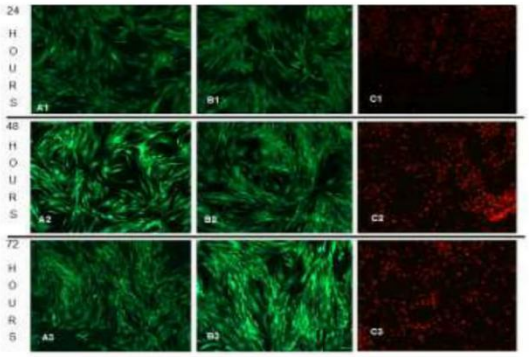


Figure 5. Images show cell viability on Live/Dead® test after 24 hours, 48hours and 72hours. **A-** Shows the negative control for toxicity (CT-), live cells in green fluorescence. **B-** PLLA, the cells present green fluorescence as negative control (CT-). **C-** Positive Control for toxicity (CT+), dead cells shown in red fluorescence.

Figures 5A1, 5A2 and 5A3 show the negative control for toxicity (CT-), on different times, where the viable cells with intact cellular membrane, were stained fluorescent green. On Figures 5B1, 5B2 and 5B3 show the cells in contact with PLLA for 24 hours, 48 hours and 72 hours respectively. The images of the cells in contact with PLLA appeared normal morphology on all times, just like the ones of (CT-) (Fig 5A and 5B). On the other hand, Figures 5C1, 5C2 and 5C3 show the positive control for toxicity (CT+), where it was stained red on all times, showing dead cells, with presence of debris and cell fragments. The results obtained in this assay shows that the cells in contact with new PLLA demonstrated the same green fluorescence that the Negative Control (CT-), which reassure that the mesenchymal cells are alive and proliferating.

The work of Bernstein (2012) [34], tested PLLA with different formats, such as screws and pins, and through his LIVE/DEAD® test, no cytotoxicity was detected, which corresponded with our results.

Our findings with the quantitative cytotoxicity assay MTT and qualitative cytotoxicity test LIVE/DEAD® showed that the mesenchymal cells in contact with the synthetized PLLA proliferated just as the ones of the negative control, keeping the normal morphological characteristics of the cell. That

demonstrates that our synthetized PLLA is a biocompatible material.

PLLA Electrospinning

The electrospinning process was performed after the PLLA synthesis and the following realization of the cytotoxicity tests, and evaluation of it biocompatibility. PLLA nanofibers were produced, forming a mat as shown in Figure 6.

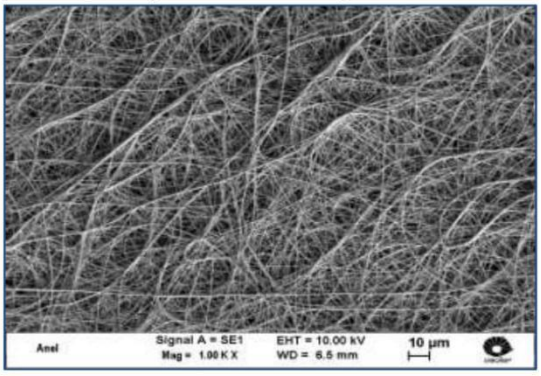


Figure 6. SEM image of the PLLA nanofibers mat. 1000x.

The nanofiber mat contains fibers that are extremely thin, and yet that keep their morphological structure. Those have a diameter of less than 1µm, as shown in Figure 7. To repair or restore the function of damaged or diseased tissue it is necessaire many complex methodes , employing a mix of knowledge and techniques of engineering, chemistry and cell biology, the use of PLLA and nanofibers to create a more efficient three-dimensional structure to assist it, is a well accepted method in the scientific community..
The nanofiber scaffold has a high surface area per unit volume, as well an extremely interconnected pore network and fiber diameters that mimic the extracellular matrix environment.

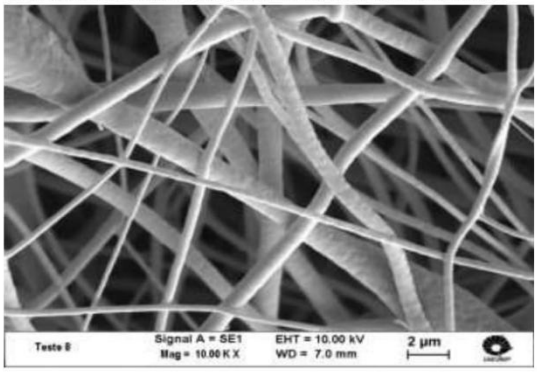


Figure 7. SEM image of the PLLA nanofiber mat. 10.000x.

With intention to show that the electrospinning process to produce the nanofibers wouldn´t be prejudicial to cell growth, the calorimetric assay of MTT [21] was performed with the PLLA nanofibers. The cytotoxicity of the nanofibers are shown in Figure 8.

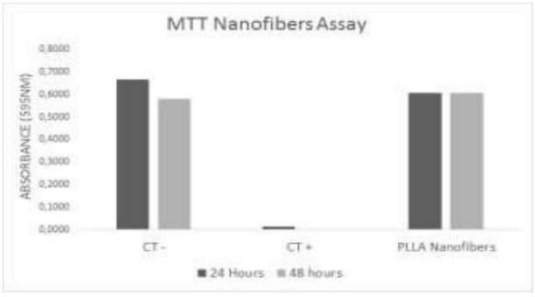


Figure 8. Kinetic curves of cell proliferation as measured by optical density (OD) from the MTT PLLA Nanofibers assay, negative control for toxicity (CT-) and positive control for toxicity (CT+) for 24 hours and 48 hours.

The graphics show the cytotoxicity of the mesenchymal cells in contact with the PLLA nanofibers after 24 hours and 48 hours. According to the ANOVA test, there are no statistically significant differences between the PLLA and the negative control of cytotoxicity (CT-) after 24 hours and 48 hours of culture ($p > 0.05$). Though, the cells cultured with the PLLA nanofibers showed higher proliferation when compared to the positive control of cytotoxicity (CT+), considered statistically significant ($p < 0.05$). Thus, the data shows that the electrospinning process wasn´t harmful to the cells.

The nanofibers are known for mimic the natural extracellular matrix conditions, and because of this characteristic, they help promote a higher cell adhesion, migration and proliferation. This leads to a higher cell growth and so tissue regeneration. Thus, making it an extremely interesting device to be used in tissue engineering. Considering the presented studies, it is possible to use the knowledge on the following tissue engineering (TE) tests with this material for clinical application, it is essential to fabricate autologous TE skin substitutes, with sufficient mechanical strength for handling and suturing during surgical implantation and effective functionality for facilitating wound closure [35]. Composite scaffolds can also be created using electrospinning. For example, by sequentially spinning different polymer solutions, a scaffold with layers can be constructed. Each layer can be tailored for specific cell adhesion and could be potentially beneficial for zonal articular cartilage or arterial vessel repair [36].
There are many applications of the electrospinning technology in the biomedical field. The reasons are quite evident such as

the simplicity of the procedure in generating the large surface area- to- volume ratio of the material and the mechanical stability of the fibres that allows for its use in the biomedical field [37]. The improvement of PLLA production and electrospinning process generate new TE possibilities to be tested.

4. Conclusion

This study has proved that the ring-opening polymerization is a viable process for the production of PLLA derivation from the lactic acid in these studied conditions. It also shows that this PLLA is a non-toxic polymer to the cell, hence being then considered biocompatible. Thus, PLLA can be employed to the manufacture of nanofibers by the electrospinning process, which can be used for different purposes in the medical field.

Acknowledgments
The authors wish to acknowledge the financial support provided by the Scientific Research Foundation for the State of São Paulo (FAPESP Process 2008/57860-3) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq Process 573661/2008-1)..

References

1. Barca F, Busa R. Resorbable poly-l-lactic acid mini-staples for the fixation of Akin osteotomies. *J Foot Ankle Surg* 1997;36 (2): 106–111.

2. Brunon J, Duthel R, Fotso MJ, C. Tudor Anterior osteosynthesis of the cervical spine by phusiline bioresorbable screws and plates. Initial results apropos of 5 cases. *Neurochirurgie* 1994; 40 (3): 196–202.

3. Burns AE, Varin J. Poly-l-lactic acid rod fixation results in foot surgery. *J Foot Ankle Surg* 1998; 37(1):37–41.

4. Pihlajamaki H, Bostman O, Rokkanen P. A biodegradable expansion plug for fixation of the coracoid bone block in the Bristow–Latarjet operation. *Int Orthop*, 1994;18 (2): 66–71.

5. Jahno VD. Synthesis and Characterization of Poly (L-Lactic Acid) For Use As Biomaterial. Porto Alegre: School of Engineering, Federal University of Rio Grande do Sul Master's Thesis.2005.

6. Maia M, Klen ES, Monje TV, Pagliosa C. Facial structure reconstruction by biomaterial: Literature Review. *Rev. Bras. Cir. Plást* 2010; 25 (3):566-72.

7. Theiszová M, Jantová S, Dragúnová J, Grznárová P, Palou M. The cytotoxicity of hydroxyapatite measured by direct cell counting and MTT test in murine fibroblast NIH-3T3 cells. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2005;149(2):393-6.

8. ISO 10993. Biological evaluation of medical devices – Part 5. Selection of tests for interactions with blood and *in vitro* citotoxicity test. 2012.

9. Junior, ARS. Bioresorbable polymers as Substrate for Cells Culture and Tissue Engineering. Polímeros: *Ciênc. Técnol*. 2007;17(4):308-17.

10. Middleton JC, Tipton AJ. Synthetic Biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials* 2000:20:2335-2346.

11. Fukushima K, Kimura Y. An efficient solid-state polycondensation method for synthesizing stereocomplexed poly(lactic acid)s with high molecular weight. *J Polym Sci Part A: Polym Chem* 2008;46: 3714–3722.

12. Lopes MS, Jardini AL, Filho RM. Synthesis and Characterizations of Poly (Lactic Acid) by Ring-Opening Polymerization for Biomedical Applications. *Chem. Eng. Trans.* 2014: 38: 331−336.

13. Lasprilla AJR, Martinez GAR, Lunelli BH, Jardini AL, Marciel Filho R. Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices – review. Biotechnology Advances 2012 Jan-Feb;30(1):321-8.

14. Aura R, Harte B, Selke S. An overview of polylactides as packaging materials. *Macromol. Biosci.* 2004; 4: 835–864.

15. Roh JD, Nelson GN, Brennan MP, Mirensky TL, Yi T, Hazlett TF, Tellides G, Sinusas AJ, Pober JS, Saltzman WM, Kyriakides TR and Breuer CK. Small-diameter biodegradable scaffolds for functional vascular tissue engineering in the mouse model, *Biomaterials* 2008;29:1454–1463.

16. Amass W, Amass A and Tighe B. A review of biodegradable polymers: uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters,blends of biodegradables polymers and

recent advances in biodegradation studies, *Polym. Int*. 1998;47:89–114.

17. Gupta B, Revagade N and Hilborn J. Poly(lactic acid) fiber: an overview. *Prog. Polym. Sci*. 2007;32:455–482.

18. Savioli ML, Jardini AL and Maciel Filho R. Poly (lactic acid) production for tissue engineering applications. *Procedia Eng*. 2012;42:1402–1413.

19. Guerrini LM, Branciforti MC, Canova T, Bretas RES, Electrospinning and characterization of polyamide 66 nanofibers with different molecular weights. *Mat. Res.* 2009; 12 (2): 609-613.

20. Zeng J, Chen X and Liang Q. Ultrafine fibers electrospun from biodegradable polymers. *J. Appl. Polym. Sci.* 2003; 4:1085-1092.

21. Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J lmmunol Methods*, 1983; 65: 55-63.

22. Almeida AT. Obtaining hemocompatibles surfaces by modification of polymeric materials by ionizing radiation.IPEN.

23. Moreira DS, Lins UGC. Microscopy techniques for microorganism identification and quantification. *Saúde & Amb. Rev*. 2010; 5 (2): 01-11.

24. Gupta MC, Deshmukh, VG. Thermal Oxidative Degradation Of Poly-Lactic Acid Partii :Molecular And Eletronic Spectra During Isothermal Heating. *Colloid Polymer Sci* 1982; 260:514-517.

25. Dubbis C, Jacobs R, Jerome R. PhD, Thesis, *Macromolecules*, 1991; 24: 2266.

26. Nikolic L, Ristic I, Adnadjevic B, Nikolic V, Jovanovic J, Stankovic M. Novel Microwave-Assisted Synthesis of Poly(D,L-lactide): The Influence of Monomer/Initiator Molar Ratio on the Product Properties. *Sensors*, 2012;10: 5063-5073.

27. Motta AC, Duek EAR. Synthesis, Characterization and Degradation -in vitro of Poly (L-lactic acid) *Polímers* 2006 ;16: 26-32.

28. Lasprilla AJRPoli synthesis (lactic acid) from lactic acid for Application in Biomedical Devices. Master Degree Thesis. School of Chemical Engineering.UNICAMP, 2011.

29. Nozaki ACM, Marques RFC, Diniz IMA, Marques MM, Marchi J. Cytotoxicity evaluation of collagen membranes aimed at application as biomaterial. August /2013 7º COLAOB – Latin American Congress of Artificial Organs and Biomaterials.

30. Sarasua JR, Rodrıguez-Lopez N, Zuza E, Petisco S, Castro B, del Olmo M, Palomares T, Alonso-Varona A. Crystallinity assessment and in vitro cytotoxicity of polylactide scaffolds for biomedical applications. *J Mater Sci: Mater Med 2011;*22:2513–252.

31. Wu G, Wu W, Zheng Q, Li J, Zhou J, Hu Z. Experimental study of PLLA/INH slow release implant fabricated by three dimensional printing technique and drug release characteristics *in vitro. Biomed Eng Online* 2014;13:97.

32. Niu X, Rouabhia M, Chiffot N, King MW, Zhang Z. An electrically conductive 3D scaffold based on a nonwoven web of poly(l-lactic acid) and conductive poly(3,4-ethylenedioxythiophene) *J Biomed. Mater. Res. A*. 2015 Jan 28. doi: 10.1002/jbm.a.35408. [Epub ahead of print] .

33. Liu Y, Hu J, Zhuang X, Zhang P, Chen X, Wei Y, Wang X. Preparation and Characterization of Biodegradable and Electroactive Polymer Blend Materials Based on mPEG/ Tetraaniline and PLLAa. *Macromol Biosci*. 2011;11(6):806-13.

34. Bernstein A, Tecklenburg K, Südkamp P, Mayr HO. Adhesion and proliferation of human osteoblast-like cells on different biodegradable implant materials used for graft fixation in ACL-reconstruction. *Arch Orthop Trauma Surg* 2012;132 (11),1637-1645.

35. Mahjour SB, Fu X, Yang X, Fong J, Sefat F, Wang H. Rapid creation of skin substitutes from human skin cells and biomimetic nanofiners for acute full-thickness wound repair. ScienceDirect BUR-4676; 2015.

36. Phan QP, Sharma U, Mikos AG. Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review. Tissue Engineering Volume 12, Number 5, 2006.

37. Khan N, Applications of electrospun nanofibers in the biomedical field. Studies by Undergraduate Researchers at Guelph Vol. 5, No. 2, Winter 2012, 63-73

4- “Electrospun polyurethane membranes for Tissue

Engineering applications”

Este artigo apresentado e publicado na Materials Science & Engineering, mostra as nanofibras de PU produzidas no equipamento do autor servindo de base para reprodução de células de fibroblastos onde foi verificado sua viabilidade. Os resultados obtidos mostram que além de ser viável as nanofibras promovem um grande aumento na proliferação das células além de que foram observados um comportamento elástico das nanofibras impressionante.

Materials Science and Engineering C 72 (2017) 113–117

Contents lists available at ScienceDirect

Materials Science and Engineering C

journal homepage: www.elsevier.com/locate/msec

Electrospun polyurethane membranes for Tissue Engineering applications

Laís P. Gabriel [a,b,*], Ana Amélia Rodrigues [a,c], Milton Macedo [a,b], André L. Jardini [a,b], Rubens Maciel Filho [a,b]

[a] National Institute of Biofabrication, Campinas, Brazil
[b] Department of Chemical Engineering, University of Campinas, Campinas, Brazil
[c] Department of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 26 August 2016
Received in revised form 27 October 2016
Accepted 4 November 2016
Available online 16 November 2016

Keywords:
Electrospinning
Fibroblast proliferation
Implants
Polyurethane

ABSTRACT

Tissue Engineering proposes, among other things, tissue regeneration using scaffolds integrated with biological molecules, growth factors or cells for such regeneration. In this research, polyurethane membranes were prepared using the electrospinning technique in order to obtain membranes to be applied in Tissue Engineering, such as epithelial, drug delivery or cardiac applications. The influence of fibers on the structure and morphology of the membranes was studied using scanning electron microscopy (SEM), the structure was evaluated by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), and the thermal stability was analyzed by thermogravimetry analysis (TGA). *In vitro* cells attachment and proliferation was investigated by SEM, and *in vitro* cell viability was studied by 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assays and Live/Dead® assays. It was found that the membranes present an homogeneous morphology, high porosity, high surface area/volume ratio, it was also observed a random fiber network. The thermal analysis showed that the membrane degradation started at 254 °C. *In vitro* evaluation of fibroblasts cells showed that fibroblasts spread over the membrane surface after 24, 48 and 72 h of culture. This study supports the investigation of electrospun polyurethane membranes as biocompatible scaffolds for Tissue Engineering applications and provides some guidelines for improved biomaterials with desired properties.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Tissue Engineering (TE) has emerged as a technology with potential for regeneration of tissues through scaffolds and provides the basis as a possible option for organs development. Tridimensional biomimetic scaffolds have been applied in TE because of their nanoscaled architecture, similar to the extracellular matrix (ECM). However, the synthesis of adequate scaffolds to a cell culture is a challenge to be overcome. Scaffolds should have a porous structure, appropriate pore size, interconnectivity and must be biocompatible [1]. Typical scaffolds designs have included foams, sponges, films and membranes.

The use of polymeric membranes in the medical area has grown considerably. From the membranes, it is possible to obtain artificial skin [2], bandages [3], angioplasty balloons, intra-gastric balloons, and neural connections [4].

The skin wounds market has been considered the most successful market in the TE area, so far [5]. This is a large market composed by products to heal damaged skin, severe burns, diabetic and pressure ulcers. Skin wounds may appear as a result of accidents, but also as a result of surgical incisions. Pressure ulcers may be caused by immobility, and cause infections or more severe complications. Patients with chronic diseases such as diabetes and obesity are also subject to more difficult wound healing. In the United States, it is estimated that, about 6.5 million cases per year of skin ulcer [6], about 285 million people had diabetes mellitus in 2010 and it is estimated >360 million people by 2030 will have diabetes mellitus [7,8]. It is worthwhile mentioning, that with population aging, it is expected to have a significant increase in such illnesses as well as in the skin wounds in general due to more skin sensibility.

Nowadays, several polymers have been applied as membranes for TE, including poly(lactic acid) (PLA) [9], poly(glycolic acid) (PGA), poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) [10], polycaprolactone (PCL) and polyurethane (PU). Among them, polyurethanes (PUs) are of particular interest due to the mechanical properties, processability, flexibility and biocompatibility, associated with their versatile structure. The soft segment of the segmented structure of PUs can be modified in order to obtain a flexible structure, leading to lower friction with the host tissue improving the artificial tissue integration.

The final property of the membrane is not only function of the polymer, but also of the manufacture process. Among possible techniques, electrospinning was identified as a suitable procedure for TE due the possibility of obtain scaffolds that can mimic the extracellular matrix. It is an attractive technique, but many factors determine the success of

* Corresponding author at: 500 Albert Einstein Avenue, Campinas, São Paulo, Brazil.
E-mail address: lagabriel@gmail.com (L.P. Gabriel).

http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.11.057
0928-4931/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

the fiber production, from the solution parameters, such as, concentration, conductivity and viscosity, the controlled variables, such as, the flow rate, the electrical field strength, the distance between the tip and the collector, and the laboratory environment parameters, such as temperature, humidity and air velocity [11–13]. However, this technique presents limitations based on scarce cell infiltration and ingrowth, inadequate mechanical strength [14], possible toxicity due to the residual solvent, and slow production rate. The optimum pore sizes for tissues are in the range 100–500 μm [15] and the electrospinning technique enables to obtain pore sizes in this range.

The synthesis of electrospun polyurethanes is relatively new and associating with the fact that PU is a promising polymer to support cell adhesion due to its mechanical resistance, it is interesting to investigate the potential of this material. Moreover, there have been few studies proving that this is a viable and promising technique for the fabrication of membranes. In addition, PU demonstrated to have good barrier properties and oxygen permeability, ideal for membrane applications [16]. For fibroblasts culture, the optimal pore size was found to be 20 μm [17], at the same time, a large pore size of 500 μm was found to be excellent for fibroblast vascular tissue ingrowth [18]. However, few *in vivo* studies of electrospun PU scaffold were done [19]. Electrospun polyurethane have been applied as wound dressings [20], shape memory devices [21], drug delivery device [22], stents [23], aortic valve [24], bandages [16] and grafts [25].

The purpose of this study was to prepare PU membranes *via* the electrospinning apparatus and to investigate the produced membrane through morphological, structural, thermal properties and biological response through *in vitro* cell viability and adhesion assays.

2. Materials and methods

2.1. Materials

All chemicals were of analytical grade, purchased by Sigma Aldrich and were used without further purification. PUs in pellets form (medical grade SG85A) was kindly provided by Lubrizol Advanced Materials. This is an aliphatic poly(ether-urethane) prepared from poly(tetramethylene glycol) (PTMG), hexamethylene diisocyanate (HMDI) and butanediol (BDO) as chain extender.

2.2. Methods

2.2.1. PU electrospinning solution preparation

PU stock solution was prepared by dissolving PU in chloroform at a concentration of 2 g/L during sonication (Ultrasonic clear, Unique, São Paulo, Brazil) for 2 h.

2.2.2. Preparation of the electrospun membranes

The electrospinning apparatus employed in this research was designed and built-up by the National Institute of Biofabrication (INCT-Biofabris), where it is located, and presents more operational flexibility compared to commercial rigs. It consisted of a syringe pump, a high-voltage direct-current power supplier (Testtech) generating a positive dc voltage up to 30 kV, and a grounded collector that was covered with aluminum foil. The solution was loaded into a syringe, and a positive electrode was clipped onto the syringe needle. The feeding rate of the polymer solution was controlled by a syringe pump, and the solutions were electrospun onto the collector. The syringe pump was set at a volume flow rate of 7 mL/h, the applied voltage was 18 kV, the tip-to-collector distance was 10 cm, and all solution preparations and electrospinning were carried out at room temperature.

2.3. Material characterization

2.3.1. Morphological and structural characterization

SEM analysis was performed in a Scanning Electron Microscope (model LEO 440i; Leo Electron Microscopy; Cambridge, England). The voltage used was 20 kV and the current was 100 pA. A metallic SC7620 Sputter Coater was used for coating the sample with gold.

2.3.2. Structural characterization

FT-IR studies were conducted at room temperature using a Thermo Scientific Nicolet 6700 FT-IR Spectrophotometer (Nicolet Instrument Inc., Madison, WI, USA), connected with an ATR accessory. Spectra were collected from 40 scans, within a range of 675–4000 cm^{-1} using a resolution of 4 cm^{-1}. All spectra were ATR corrected using Smart Omni Sampler (Thermo Scientific, Madison, WI).

2.3.3. Thermal characterization

The investigation of the PU thermal stability was carried out by TGA, model TGA-50 (Shimadzu Instruments Kyoto, Japan). A sample mass of about 15 mg was heated under a flowing nitrogen atmosphere (50 mL/min) from 30 to 600 °C, at a heating rate of 10 °C/min.

2.3.4. Fibroblasts cell culture

VERO fibroblasts cells (African green monkey kidney fibroblasts) were provided by Adolfo Lutz Institute (São Paulo, Brazil). Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco). Growth media contained 100 units/mL penicillin and streptomycin and cells were cultured at 37 °C, humidified, 5% CO_2/95% air environment. Cells were used at population numbers below 5. The DMEM-LG with 10% of phenol was used as positive control of toxicity (PCT) and the polystyrene extract was used as negative control of toxicity (NCT).

2.3.5. Evaluation of fibroblasts cells using SEM

VERO cells were seeded on the PU surface with a final density of 3×10^6 cells/mL. After growth time of 24, 48 and 72 h, the samples were fixed in glutaraldehyde 2.5% in 0.1 M sodium cacodilate buffer for about 2 h. The samples were washed in PBS and then in water for 15 min. Afterwards, they were dehydrated in a graded series of ethanol (50%, 70%, 95% and 100%), critical point dried with CO_2 (Balzers, CTD-030), and sputter coated with gold in a SC7620 Sputter Coater apparatus. The cell-seeded PU scaffolds were characterized by Scanning Electron Microscope (SEM, model 440i Leo, Zeiss) operated at 20 kV and 100 pA. Statistical study was carried out using the Image J Software.

2.3.6. In vitro cell viability by MTT assays

To determine the toxicity of the polyurethane and the nanocomposite, cells were seeded onto 96-well culture plates at 1×10^6 cells/mL and were incubated for 24 h. After that, cells were incubated with 100 μL of the aforementioned cell culture medium for 24, 48 and 72 h. The amount of formazan crystals formed was measured after 4 h of exposure to the MTT solution in dimethyl sulfoxide (DMSO) and absorbance values were measured at 595 nm by a scanning multi well spectrophotometer plate reader (Microplate Reader F5, Molecular Probes).

The data are presented as mean ± S.E.M. Statistical analysis of the data was carried out using ANOVA, followed by Tukey's HSD *post hoc* test (equal variances). Differences were considered statistically significant when the p-value was <0.05.

2.3.7. In vitro cell viability by Live/Dead assays

A viability study on PU membranes was performed with a Live/Dead assay kit (Kit Live/Dead® Viability Cytotoxicity Molecular Probes TM). The cells were seeded (1×10^3 cells/mL) into a 96-well plate and incubated with DMEM-LG containing 10% of FBS at 37 °C for 24 h. After this period, the membranes were incubated with the cells for 24, 48 and 72 h. A Live/Dead fluorescence assay kit was applied to qualify the

cells viability. After the specific times, the cells were rinsed with 200 μL of PBS and stained with calcein/ethidium homodimer, according to the manufactures' instructions. The cells were incubated at 37 °C for 30 min and then rinsed and maintained in PBS. After that, the membranes were visualized by fluorescence microscopy (Nikon E800) with a specific program (Image Pro-Plus software).

3. Results

3.1. Microphase-separated structure

The FTIR-ATR spectrum of PU is shown in Fig. 1.

The band present at 3322 cm^{-1} can be assigned to the —N—H stretching vibration of urethane groups, this new band confirms the presence of urethane groups. The peaks at 2940 and 2858 cm^{-1} are the asymmetric and symmetric vibrations of the $—CH_2$ groups and mostly represent the hard and soft segments, respectively. The band at 2350 cm^{-1} corresponds to the stretching vibration of the isocyanate group, —N═C═O. Carbonyl stretching bands (—C═O) of urethane bonds appear at 1713 cm^{-1}. The absorption peaks at 1529 cm^{-1} corresponds to the deformation vibration of (—NH—) bonds in the urethane (—NHCOO—) groups from amide II. The bands at 1447, 1370 and 1222 cm^{-1} corresponds to C—N stretching. The stretching of the ether group C—O—C is associated with the absorption at 1109 cm^{-1}, which indicates the soft segments. It is possible to confirm that there is no residual solvent in the polyurethane.

3.2. The thermal degradation of polyurethane

The thermal degradation of PU is depicted in Fig. 2.

The TGA/DTG curves show two steps of mass loss. The first step of mass loss occurred from 254 to 403 °C and it is attributed to the decomposition of the rigid segments of PU. The second step occurs between 403 and 487 °C due to the decomposition of flexible segments of PU.

3.3. Evaluation of the fibroblasts cells attachment and proliferation of the electrospun fibers using SEM

The resulting morphology of the electrospun surfaces were investigated using SEM. Fig. 3 shows the control sample (Plain PU) and the samples after 24, 48 and 72 h of fibroblasts culture.

Electrospun PUs showed relatively uniform fiber diameter distributions, exhibiting fiber diameter of approximately 20 μm, and it was also observed a random fiber networks. From the image analysis, the membranes presented an average of pore size of 74 μm and their pore sizes ranged from 50 to 150 μm. The black arrows in the Figures indicated the fibroblasts cells. In this manner, after 24 and 48 h, the results

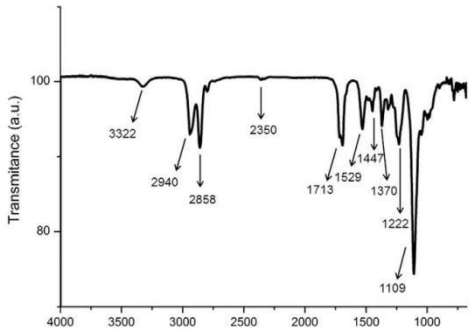


Fig. 1. FTIR-ATR spectra of polyurethane.

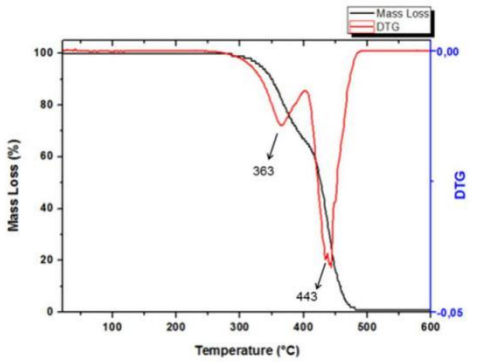


Fig. 2. TGA/DTG of polyurethane.

showed that cells migrated and proliferated. Specifically after 72 h, the sample showed that cell proliferation and adhesion was enhanced, generating an extensive network of fibroblasts cells.

3.4. In vitro cell viability by MTT assays

Cytotoxicity test was performed to study the polyurethane biocompatibility. Fibroblasts cells were seeded directly onto PU membranes during 24, 48 and 72 h and the amount of formazan crystals formed was measured after 4 h of exposure to the MTT. The results obtained after 24, 48 and 72 h to PU, PCT and NCT are presented in Fig. 4.

Fig. 4 represents the number of viable fibroblasts cells measured by the MTT assay. According to the two-way ANOVA, a statistically significant ($p < 0.001$) difference was found between the groups when cell viability was considered. Results obtained after 24 h showed no toxic effect of polyurethane compared to the NCT control group (polystyrene extract). Cytotoxic effect was observed after 48 h ($p < 0.005$) and after 72 h ($p < 0.001$). The cytotoxic effect was also verified comparing the PU with the PCT control group (phenol solution) for 24 h ($p < 0.014$), 48 h ($p < 0.012$) and 72 h ($p < 0.001$).

3.5. In vitro cell viability by Live/Dead® assays

Cell viability as a function of culture time (24, 48 and 72 h) was determined by Live/Dead assay kit. The viable fibroblasts cells (stained green) and dead fibroblasts cells (stained red) were visualized by fluorescence microscopy (Fig. 5).

Fig. 5 shows that, at all culture times, predominantly living cells were found within the PU membranes. Fibroblasts cells adhered through the membranes and have a good cytocompatibility. These findings were further confirmed with the SEM images (Fig. 3) and MTT assays (Fig. 4). The viable fibroblasts cells which stained green were observed throughout the membrane, showing a uniform cell distribution. Specifically at 24 and 48 h, the results strongly suggest that the membrane did not compromise cell viability and the transport of nutrients and oxygen to the cells. After 72 h, it was showed the decrease of stained green cells, resulting in an increase of toxic effect of polyurethane compared to the NCT.

4. Discussion

This study highlights the synthesis and characterization of polymeric membranes with potential for several TE applications.

It was observed the obtained membranes were able to maintain function of fibroblasts, due to interconnected structures achieved,

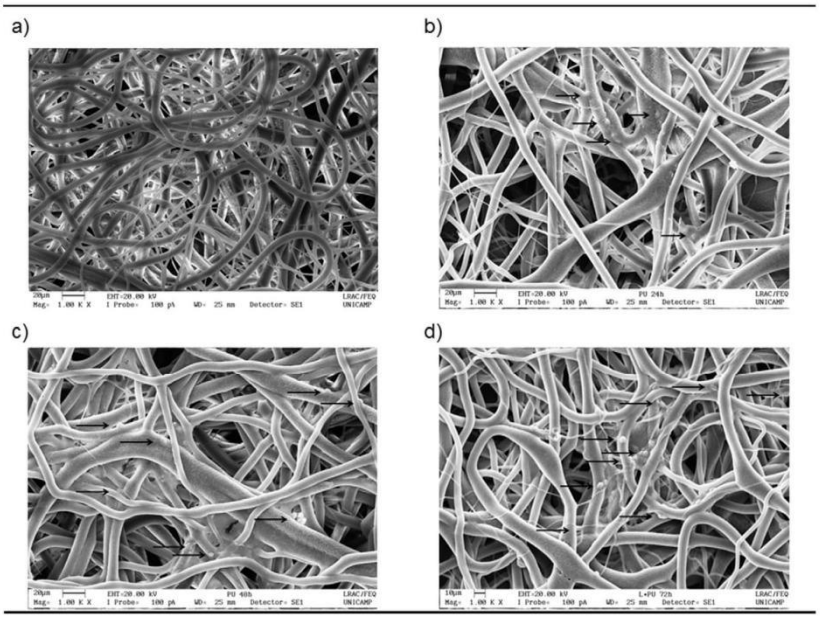


Fig. 3. SEM images of the plain PU (panel a) and the fibroblasts after 24 h (panel b), 48 h (panel c) and 72 h (panel d) of culture. Scale bars in a–c represent 20 μm and scale bar in d represent 10 μm.

adequate for cell attachment, migration and proliferation, oxygen and nutrient transport, and physical support for cell seeding.

The obtained membranes showed the success of fiber production, indicating homogeneous morphology, appropriate concentration, temperature, electrical field strength, and more important, that all residual solvent was consumed during the electrospinning process.

Although certainly more studies are required, such as mechanical resistance, the present results are encouraging for further emphasis of electrospinning technique as an attractive technique for membranes synthesis.

This fascinating area of research demonstrate just how multidisciplinary field of TE is vast, the opportunities for improving human health are immense. Many challenges have to faced, and the complexity of biological systems involved in the regeneration of different tissues needs to be well understood. Significant progress has been made to achieve the TE goals. While simple polymeric scaffolds that were being developed in the past were not providing adequate interactions between cells and the ECM, future advances in TE are depending on new systems that will actively modulate the behavior of cells to a functional TE. The success of TE depends on the researchers efforts to understand the results of science and clinical applications. The integration of knowledge of life sciences areas along with materials science, medicine, chemistry, biology and engineering is crucial in the scaffolds design, and it will also generate new technologies for application in regenerative medicine.

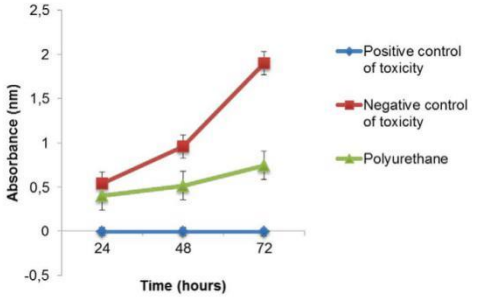


Fig. 4. Cell viability monitored by MTT assay following 24, 48 and 72 h exposure of fibroblasts cells.

5. Conclusion

Polyurethane membranes were successfully built-up by electrospinning technique with a flexible apparatus allowing to identify the most suitable operating parameters to achieved desired properties. The structure and morphological analysis showed random fibers, exhibiting fiber diameter of approximately 20 μm. The TGA revealed results with high degradation temperature, ideal for processes such as sterilization.

The combination of polyurethane with electrospinning technique proved to be advantageous in the production of membranes with an attractive architecture which provides adequate porosity, pore size and interconnectivity of pores ideal for cell adhesion and proliferation, supporting the exchange of nutrients and metabolic products to the cells and generating an extensive network of fibroblasts cells.

Bearing in mind all the achievements, this work supports further investigation of polyurethane membranes as biocompatible scaffolds for

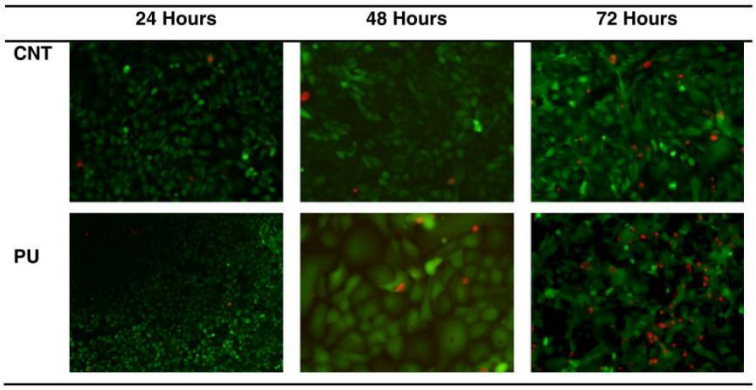


Fig. 5. Live/Dead assays showing fibroblasts incorporated in control and PU membranes, after 24, 48 and 72 h. Amplification: 20×.

numerous TE applications, such as cardiac, epithelial or drug delivery applications.

Acknowledgements

This work was supported by the National Institute of Biofabrication (INCT-Biofabris), CNPq Brazil and FAPESP Process 2008/57860-3. The authors would like to thank the Lubrizol for the pellets donation.

References

[1] J.J. Li, D.L. Kaplan, H. Zreiqat, Journal of Materials Chemistry B 2 (2014) 7272–7306.
[2] C. Wu, T. Chen, Y. Xin, Z. Zhang, Z. Ren, J. Lei, B. Chu, Y. Wang, S. Tang, Biomed. Mater. 11 (2016) 035019.
[3] A.R. Unnithan, A.G. Nejad, A.R.K. Sasikala, R.G. Thomas, Y.Y. Jeong, P. Murugesan, S. Nasseri, D. Wu, C.H. Park, C.S. Kim, Chem. Eng. J. 287 (2016) 640–648.
[4] Z.-F. Zhou, F. Zhang, J.-G. Wang, Q.-C. Chen, W.-Z. Yang, N. He, Y.-Y. Jiang, F. Chen, J.-J. Liu, ACS Biomater Sci. Eng. (2016).
[5] G.Z. Teoh, P. Klanrit, M. Kasimatis, A.M. Seifalian, Minerva Med. 106 (2015) 17–33.
[6] C.K. Sen, G.M. Gordillo, S. Roy, R. Kirsner, L. Lambert, T.K. Hunt, F. Gottrup, G.C. Gurtner, M.T. Longaker, Wound Repair Regen. 17 (2009) 763–771.
[7] J.E. Shaw, R.A. Sicree, P.Z. Zimmet, Diabetes Res. Clin. Pract. 87 (2010) 4–14.
[8] D.R. Whiting, L. Guariguata, C. Weil, J. Shaw, Diabetes Res. Clin. Pract. 94 (2011) 311–321.
[9] T.A.M. Valente, D.M. Silva, P.S. Gomes, M.H. Fernandes, J.D. Santos, V. Sencadas, ACS Appl. Mater. Interfaces 8 (2016) 3241–3249.
[10] C.A. Bashur, L.A. Dahlgren, A.S. Goldstein, Biomaterials 27 (2006) 5681–5688.
[11] M. Selvakumar, H.S. Pawar, N.K. Francis, B. Das, S. Dhara, S. Chattopadhyay, ACS Appl. Mater. Interfaces 8 (2016) 5941–5960.
[12] S. Budun, E. İşgören, R. Erdem, M. Yüksek, Appl. Surf. Sci. 380 (2016) 294–300.
[13] C.W. Cui, Y. Zhou, Jiang, Sci. Technol. Adv. Mater. 11 (2010) (014108).
[14] S. Khorshidi, A. Solouk, H. Mirzadeh, S. Mazinani, J.M. Lagaron, S. Sharifi, S. Ramakrishna, J. Tissue Eng. Regen. Med. (2015) (n/a-n/a).
[15] L.D. Wright, T. Andric, J.W. Freeman, Mater. Sci. Eng. C 31 (2011) 30–36.
[16] M. Amina, T. Amna, M.S. Hassan, T.A. Ibrahim, M.-S. Khil, Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp. 425 (2013) 115–121.
[17] K. Whang, C.H. Thomas, K.E. Healy, G. Nuber, Polymer 36 (1995) 837–842.
[18] M.C. Wake, C.W. Patrick Jr., A.G. Mikos, Cell Transplant. 3 (1993) 339–343.
[19] J. Kucinska-Lipka, I. Gubanska, H. Janik, M. Sienkiewicz, Mater. Sci. Eng. C 46 (2015) 166–176.
[20] Y. Wang, P. Li, P. Xiang, J. Lu, J. Yuan, J. Shen, J. Mater. Chem. B 4 (2016) 635–648.
[21] D.L. Safranski, J.M. Boothby, C.N. Kelly, K. Beatty, N. Lakhera, C.P. Frick, A. Lin, R.E. Guldberg, J.C. Griffis, J. Mech. Behav. Biomed. Mater. (2016).
[22] C. Akduman, I. Özgüney, E.P.A. Kumbasar, Mater. Sci. Eng. C 64 (2016) 383–390.
[23] L.E. Aguilar, A.R. Unnithan, A. Amarjargal, A.P. Tiwari, S.T. Hong, C.H. Park, C.S. Kim, Int. J. Pharm. 478 (2015) 1–8.
[24] D.S. Puperi, A. Kishan, Z.E. Punske, Y. Wu, E. Cosgriff-Hernandez, J.L. West, K.J. Grande-Allen, ACS Biomaterials Science & Engineering (2016).
[25] H. Bergmeister, C. Schreiber, C. Grasl, I. Walter, R. Plasenzotti, M. Stoiber, D. Bernhard, H. Schima, Acta Biomater. 9 (2013) 6032–6040.

Anexo II

Patente a ser depositada

INOVA UNICAMP

COMUNICAÇÃO DE INVENÇÃO:

DESCRIÇÃO DO INVENTO E AVALIAÇÃO DA ANTERIORIDADE

Data: 09/08/2016 - 15:57:11

Inventores

Inventor 1
Nome: Cecilia Amelia de Carvalho Zavaglia
E-mail: zavagl@fem.unicamp.br
Vínculo: Docente
Unidade: Faculdade de Engenharia Mecânica
Telefone/Ramal: 1935213316/Comercial
Sexo: Feminino
País de Origem: Brasil
CPF: 627.925.208-68
RG: 61022056
Data de Nascimento: 01/04/1954
Estado Civil: Casado(a)
Endereço: Rua Mendeleiev, s/n
CEP: 13083970
Bairro: Barao Geraldo
Cidade: Campinas
Estado: São Paulo
País: Brasil
Profissão: Engenheira de Materiais

Inventor 2
Nome: Milton Flavio de Macedo
E-mail: m.macedo@visinet.com.br
Vínculo: Aluno Pós-Graduação
Unidade: Faculdade de Engenharia Mecânica
Telefone/Ramal: 11999315633/Celular
Sexo: Masculino
País de Origem: Brasil
CPF: 008.289.408-60
RG: 79814335
Data de Nascimento: 23/09/1956
Estado Civil: Casado(a)
Endereço: Rua do retiro 1371
CEP: 13209201
Bairro: Jardim Paris
Cidade: Jundiai
Estado: São Paulo
País: Brasil
Profissão: Engenheiro eletronico

Inventor 3 (responsável)
Nome: Patricia Capellato
E-mail: pcapellato@gmail.com
Vínculo: Pesquisador Colaborador (Resolução GR 67 de 25/09/03)
Unidade: Faculdade de Engenharia Mecânica
Telefone/Ramal: 12981563426/Celular
Sexo: Feminino
País de Origem: Brasil
CPF: 167.194.188-82
RG: 20757877
Data de Nascimento: 01/03/1973
Estado Civil: Casado(a)
Endereço: Rua do Colegio Nossa senhora do Bom conselho 12
CEP: 12030050

Bairro: Jd das Nacoes
Cidade: Taubate
Estado: São Paulo
País: Brasil
Profissão: Dentista

Inventor 4
Nome: Rubens Maciel Filho
E-mail: maciel@feq.unicamp.br
Vínculo: Docente
Unidade: Faculdade de Engenharia Química
Telefone/Ramal: 1935213958/Comercial
Sexo: Masculino
País de Origem: Brasil
CPF: 046.056.718-70
RG: 7638197
Data de Nascimento: 24/05/1958
Estado Civil: Casado(a)
Endereço: Rua Albert Einstein 500
CEP: 13083552
Bairro: Barão Geraldo
Cidade: Campinas
Estado: São Paulo
País: Brasil
Profissão: Engenheiro Quimico

---

1. Invento

1.1 Título proposto para a Invenção: Processo produtivo de produção de nanofibras poliméricas por meio de um anel metalico com estruturas piramidais ocas

1.2 Resumo (em inglês): The current interest in nanotechnology has increased due to exclusive properties of nanoscale materials. Electrospinning is a process for the production of polymeric fibers in nanometer scale, thus obtaining a greater surface area than the conventional spinning technique, enabling a variety of applications in areas such as scaffolds for tissue engineering, drug delivery, filters, biosensors, protective clothing, power generation, cosmetics, among others. One of the greatest attractions of this system lies on the simplicity of the equipment. The conventional system consists of three components: a spinneret, a high voltage power supply, and grounded collector, that may have several shapes. In this study, polymeric nanofibers were produced by means of a new technology consisting of a spinneret replaced by a metallic ring with a hollow pyramidal shape on its external surface. This pyramidal metallic ring (PMR) was then connected to the motor rotation axis, being dipped in a polymer solution, all connected to a high voltage power supply and a collector plate. An electric field was established and the electric forces overcame the surface tension, thus forming a jet solution that addressed the grounded collector. On the way between the PMR and the collector, the solvent evaporated leaving only the polymer. Results indicate that the electrospinning process using PMR allows for the production of a larger amount of polymeric nanofibers compared to the conventional electrospinning system. Therefore, it can be concluded that the electrospinning process with PMR has potential use in biomedical applications.

1.3 Palavras-Chave: Eletrofiação; nanofibras; polímeros; parâmetros do processo Electrospinning; Nanofiber; polymers, process parameters

1.4 Descrição DETALHADA do invento: A tecnologia compreende um novo processo de obtenção de nanofibras poliméricas empregando a técnica de eletrofiação. O processo envolve parâmetros particulares de produção, como o emprego de um anel metálico recoberto com pirâmides ocas formando, então uma superfície piramidal. O invento possibilita a produção de manta polimérica em maior quantidade quando comparada ao processo convencional.A eletrofiação consiste em um processo de produção de fibras poliméricas, em escala nanométrica obtendo assim uma área de superfície maior que o processo de fiação convencional propiciando uma variedade de aplicações em áreas como scaffolds para engenharia de tecidos, curativos, liberação de medicamentos, filtros, biosensores, roupas de proteção, geração de energia, cosméticos, entre outros. Um dos grandes atrativos deste sistema reside na simplicidade dos equipamentos. O sistema convencional consiste em três componentes: uma seringa com capilar, uma fonte de alta tensão, e um coletor aterrado que pode ter vários formatos. Neste trabalho nanofibras poliméricas são produzidas por meio de uma nova metodologia na qual a seringa com capilar é substituída por um anel metálico com pirâmides ocas na superfície externa. Este anel metálico piramidal (AMP) é então conectado ao eixo de rotação do motor, mergulhado numa solução polimérica sendo, o conjunto conectado a uma fonte com tensão e uma placa coletora. Um campo elétrico é estabelecido, as forças elétricas vencem a tensão superficial, o campo elétrico atinge um valor crítico formando o cone de Taylor produzindo um jato da solução que se dirige ao coletor aterrado. No caminho entre a ponta do capilar e o coletor o solvente evapora

restando apenas o polímero. Os resultados obtidos indicam que o processo de eletrofiação empregando o anel metálico piramidal proporciona a fabricação de uma maior quantidade de nanofibras poliméricas quando comparada ao sistema de eletrofiação convencional. Assim, pode-se concluir que este processo tem potencial para aplicações biomédicas em escala comercial.

Anexo(s):

* patente_090816.pdf(1.12 Mb)

1.5 Relatórios Técnicos enviados a agências de fomento e/ou Teses:

Nenhum arquivo anexado.

1.6 De forma geral, qual é o PROBLEMA resolvido pelo invento?: A eletrofiação consiste em um processo de produção de fibras poliméricas, em escala nanométrica obtendo assim uma área de superfície maior que o processo de fiação convencional. A morfologia e geometria das nanofibras produzidas são determinadas pelos parâmetros da solução, do ambiente e do processo. Porém, para a quantidade de fibras produzidas no processo está relacionada a quantidade de agulhas. Podemos relacionar de forma direta a quantidade de fibras produzidas com o número de pontas de agulhas envolvidos no processo. Para aplicações comerciais verificamos hoje no mercado que um produto para ser viável é imprescindível uma grande produção com custo reduzido. A utilização do anel metálico com piramides ocas na superfície externa no processo de eletrofiação possibilita a otimização do processo tornando comercial a produção de nanofibras poliméricas para aplicações comerciais.

1.7 Qual a principal APLICAÇÃO da tecnologia?: A tecnologia possibilita aplicações em áreas como engenharia de tecidos, curativos, liberação de medicamentos, filtros, biosensores, roupas de proteção, geração de energia, cosméticos entre outros.

---

2. Diferencial da Invenção em Relação ao Estado da Técnica

2.1 Qual o DIFERENCIAL da tecnologia proposta em relação às existentes? Diante da descrição técnica detalhada do invento (1.5) aponte a essência da invenção: O diferencial desta tecnologia consiste na quantidade de nanofibras produzidas por meio do processo de eletrofiação. O sistema convencional consiste em três componentes: uma seringa com capilar, uma fonte de alta tensão, e um coletor aterrado que pode ter vários formatos. Uma grande variedade de polímeros naturais ou sintéticos tem sido empregados neste processo. A solução polimérica formada por um polímero dissolvido em solvente será introduzida na seringa capilar, o embolo quando pressionado força a saída da solução que encontrasse então submetida a um campo elétrico onde uma carga elétrica será induzida sobre sua superfície formando o cone de Taylor. As forças elétricas vencem a tensão superficial, quando o campo elétrico atinge um valor crítico e a partir do cone de Taylor um jato da solução dirige-se ao coletor aterrado. No caminho entre a ponta do capilar e o coletor o solvente devera evaporar restando apenas o polímero (Bhardwaj e Kundu, 2010). Com esta tecnologia a seringa capilar será substituída por um anel metálico recoberto com 312 pirâmides ocas propiciando a formação de 312 fios de fibra polimérica. Desta maneira a quantidade de fibra polimérica sera maior quando comparada a técnica convencional.

---

3. Concepção e Divulgação ao Público

3.1 - Existe algum tipo de divulgação/publicação? Não.

---

4. Patrocinadores e/ou co-titulares

4.1 - Há envolvimento de alguma outra instituição na pesquisa? Sim.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP Número do processo: '2014/14533-3'

---

5. Busca de Anterioridade

Busca - Base de Patentes Relacionar as Bases de Patentes Derwent, Esp@cenet, USPTO, Epoline, JPO, CIPO,

Free Patents Online, INPI, Inova Unicamp. Cite as patentes encontradas pelo número de depósito, cite a(s) diferença(s) da tecnologia investigada em relação às encontradas. Como sugestão, cite-as por ordem decrescente de relevância. Inclua mais linhas na tabela, se necessário.

Nenhuma busca foi realizada.

Busca - Artigos Científicos, Teses, Trabalhos em Congresso, etc Cite as publicações relacionadas às tecnologias semelhantes ou próximas à tecnologia a ser patenteada. Apresente a(s) diferença(s) existente(s) com o invento. Como sugestão, cite-as por ordem de relevância.

Nenhuma busca foi realizada.

Anexo III

Certificados de Pesquisa

Faculdade de Medicina de Jundiaí

CERTIFICADO

Certificamos que os pesquisadores

André Torres Montanaro, Nicole Beatriz de Alcantara Ferreira Garrido, Milton Macedo, Ana Maria de Guzzi Plepis, Virgínia da Conceição Amaro Martins, Marcelo Rodrigues da Cunha

apresentaram o trabalho científico

CARACTERIZAÇÃO DA COMPATIBILIDADE ENTRE MALHA DE NANOFIBRAS E HIDROXIAPATITA NA REGENERAÇÃO DE DEFEITOS CRANIANOS DE RATOS

no **XIII Fórum de Iniciação Científica PIBIC-FMJ**, realizado no dia 31 de agosto de 2017 na Faculdade de Medicina de Jundiaí, Jundiaí-SP.

Prof. Dr. Edmir Américo Lourenço
Diretor

Prof. Dr. Fernando Claret Arcadipane
Coordenador do PIBIC-FMJ

Faculdade de Medicina de Jundiaí

CERTIFICADO

Certificamos que os pesquisadores

Nicole Beatriz de Alcantara Ferreira Garrido, André Torres Montanaro, Rafaela Fonseca Falcão, Milton Macedo, Benedito Barraviera, Rui Seabra Ferreira Júnior, Ewerton Alexandre Galdeano, Talita Lopes, Marcelo Rodrigues da Cunha

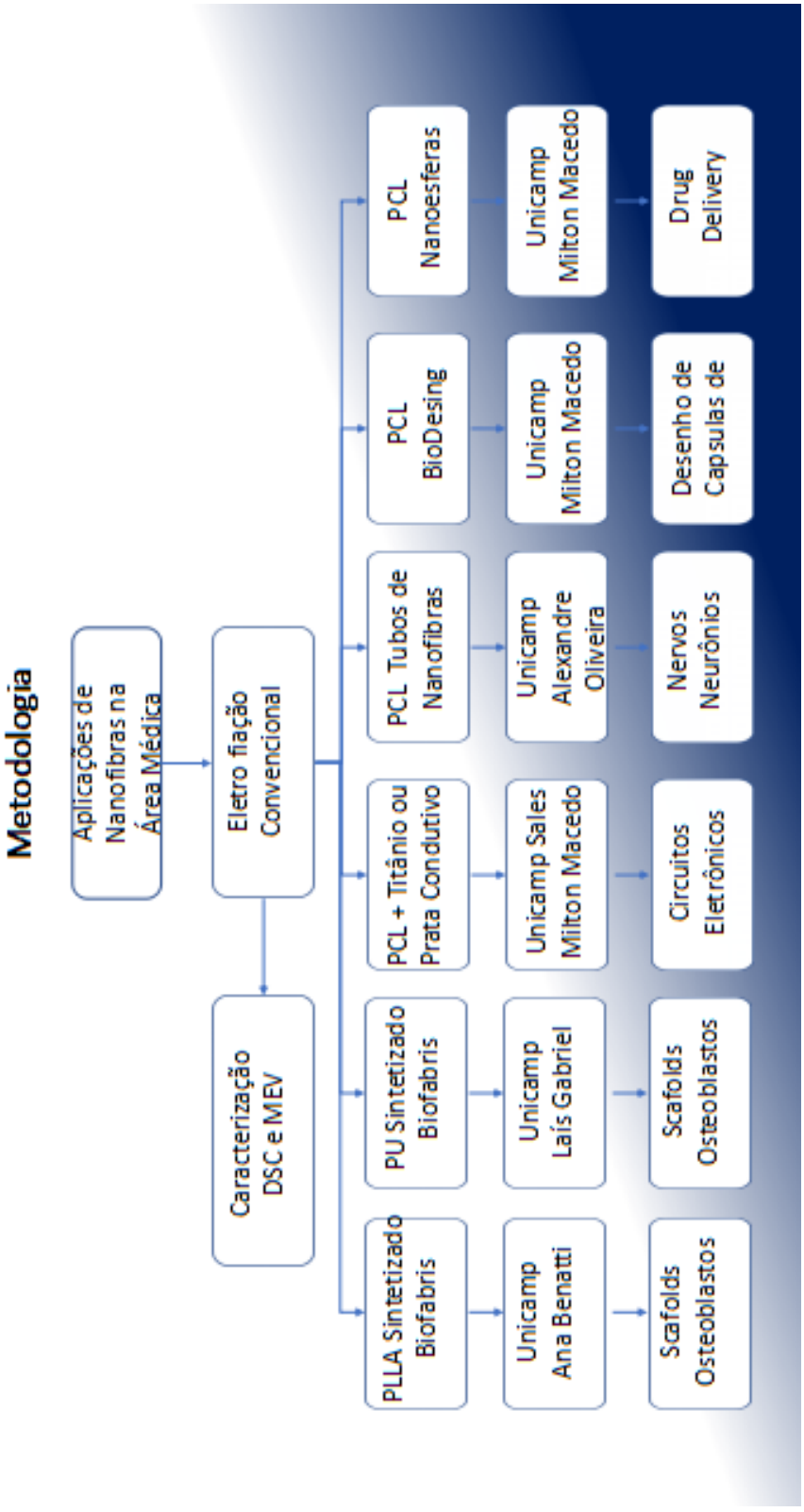
apresentaram o trabalho científico

COMBINAÇÃO DE MALHA DE NANOFIBRAS COM SELANTE DE FIBRINA DERIVADA DO VENENO DE COBRA COMO ENXERTO AO ESTIMULO OSTEOREGENERATIVO DE LESÕES CRANIANAS DE RATOS. É VIÁVEL?

no **XIII Fórum de Iniciação Científica PIBIC-FMJ**, realizado no dia 31 de agosto de 2017 na Faculdade de Medicina de Jundiaí, Jundiaí-SP.

Prof. Dr. Edmir Américo Lourenço
Diretor

Prof. Dr. Fernando Claret Arcadipane
Coordenador do PIBIC-FMJ

Anexo IV

Fluxograma Geral