

Jeovandro Maria Beltrame

**DESENVOLVIMENTO DE MATRIZ EXTRACELULAR
ELETROFIADA PARA APLICAÇÃO NA ENGENHARIA DE
TECIDOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química, Área de concentração Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Mara G. N. Quadri

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Claudia Sayer.

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Beltrame, Jeovandro Maria

Desenvolvimento de Matriz Extracelular Eletrofiada para Aplicação na Engenharia de Tecidos / Jeovandro Maria Beltrame ; orientadora, Mara Gabriela Novy Quadri ; coorientadora, Claudia Sayer, Florianópolis, 2018.

100 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2018.

Inclui referências.

1. Engenharia Química. 2. Biopolímeros. 3. Matriz extracelular. 4. Eletrofição. 5. Engenharia de tecidos. I. Quadri, Mara Gabriela Novy. II. Sayer, Cláudia. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

Jeovandro Maria Beltrame

Desenvolvimento de matriz extracelular eletrofiada para aplicação na engenharia de tecidos

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Engenharia Química”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 09 de março de 2018.

Prof.^a Dr.^a Cíntia Soares
Coordenadora do Programa

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Mara G. N. Quadri
Orientadora/UFSC/PósENQ

Prof.^a Dr.^a Claudia Sayer
Coorientadora/UFSC/PósENQ

Prof.^a Dr.^a Ana Paula Serafini
Immich Boemo
UFSC/Câmpus BNU

Prof.^a Dr.^a Rozângela C. Pedrosa
UFSC/PPGBQA

Aos meus pais, João e Lourdes, por todo amor e dedicação durante toda minha vida. E meu avô Santo Maria que já não habita mais entre nós. Aos meus irmãos, Matheus “Jonece” e Jaqueline. Ao companheirismo a amizades Bárbara (namorada), e aos amigos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela saúde, pela força e persistência.

Aos meus pais, João e Lourdes, por proporcionaram esta oportunidade desde sempre, por se fazerem tão presentes mesmo com toda distância. Estando sempre comigo, incentivando, apoiando e, principalmente, por todo amor incondicional.

Ao meu avô Santo Maria em memória, pelo incondicional apoio.

Aos meus irmãos Matheus e Jaqueline, e também a cunhada Juciane Araldi, por serem meus grandes amigos, sempre me incentivando com palavras de apoio e conforto e por inúmeros momentos de descontração.

A Bárbara Z. R. Dias, pelo companheirismo, estando ao meu lado na angústia e na tristeza. Pelo auxílio nas dificuldades para poder tornar este trabalho possível. E a sua família pelo incondicional apoio.

Aos meus orientadores, professora doutora Mara Gabriela Novy Quadri e professora doutora Claudia Sayer, pela oportunidade, pela confiança e liberdade em poder estar trabalhando a aplicabilidade deste material desenvolvido contribuindo para com o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o convite e contribuírem para a melhoria desse trabalho.

Aos Professores Dr. Pedro H. Hermes de Araújo e a Dra. Rozângela C. Pedroza, pelos diálogos esclarecedores que me auxiliaram na constituição da proposta de trabalho, com discussões acerca de potenciais de aplicação.

A professora doutora Rozangela C. Pedroza por ceder seu laboratório – Labioex para realização dos ensaios piloto com a célula.

À Universidade Federal de Santa Catarina, especialmente ao programa de Pós-Graduação de Engenharia Química.

Ao secretário da Pós-Graduação, Edevilson Silva, por sua disposição em ajudar.

À CNPq pelo apoio financeiro.

A Central de Análise do Departamento de Engenharia Química e ao Técnico Leandro.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME). Aos técnicos Deise e Américo pelo treinamento e análise de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Ao Laboratório Multiusuários de Estudos em Biologia (LAMEB) pelo uso da microscopia óptica, para visualizar a formação das fibras poliméricas.

Ao Laboratório de Controle de Processos (LCP), pela utilização de equipamentos para a síntese do polímero e utilização do FT-IR para análise de bioatividade.

A professora doutora Karine Bettega Felipe e a aluna de mestranda Andressa pelo suporte com as análises de Viabilidade Celular realizadas no laboratório de análises clínicas na Universidade Federal do Paraná - UFPR.

A todos do Laboratório de Sistemas Porosos (LASIPO), em especial ao Marcelo, Rafael, Valdir.

À Camila Guindani, Clara Calado, Valdelúcia Grinevicius, Fabiana Ouriques e Alexandre Zottis por dividirem seus conhecimentos, pela compreensão e disponibilidade para auxílios com ensaios e discussões, além da convivência no dia a dia. Além disso, pela amizade construída ao longo da realização o mestrado.

Ao Thiago Ourique, pelo suporte com a síntese e funcionalização do biopolímero.

Aos amigos presentes ou distantes (Juciane, Ademir (Junior), Alexandre (Bracinho), Diego, Gabriele, Eduardo, Aline, Maycon), que de alguma forma colaboraram com este trabalho em análises ou em discussões.

A todos, o meu muito obrigada.

RESUMO

O uso de materiais poliméricos sintéticos biodegradáveis como alternativa à construção de suportes com aplicação no crescimento celular permite a adição das características desejadas na superfície desses materiais para aplicações específicas. Para a produção destes suportes será utilizado a técnica de eletrofiação. Esta técnica é relativamente simples e barata, e consiste basicamente na aceleração de uma solução de polímero que flui lentamente através de um capilar metálico, ao qual um campo elétrico externo é aplicado para produzir fibras com diâmetro médio reduzido. A proposta deste trabalho, é a preparação e caracterização de suportes de poli (ϵ -caprolactona) (PCL) e poli (dianidro-D-glucitol) diundeca-10-enoate (PDGU) por eletrofiação para futuras, reduzindo a massa de PCL e adicionando PDGU para aplicações no campo da engenharia de tecidos e órgãos. Adicionalmente, foi verificada a influência da incorporação de n-acetilcisteína (NAC) e cisteína (Cys) por mistura física e por copolimerização com monômero DGU para reduzir a hidrofobicidade e cristalinidade dos suportes. Foi avaliado o efeito da relação PCL-PDGU da concentração de polímero e da composição da mistura de solventes nas propriedades dos fios. A análise das fibras por microscopia eletrônica de varredura mostrou que é possível formar nanofibras de misturas PCL/PDGU, resultando em diâmetros menores em relação ao PCL puro. Os ensaios de bioatividade e a biodegradabilidade dos suportes mostraram aumento da perda de massa para os polímeros funcionalizados por ligação covalente para PCL-PDGUcoNAC (49 %) e para PCL-PDGUcoCys (54 %) em relação à degradação do PCL (8 %) e PCL-PDGU (5 %). Finalmente, os suportes foram avaliados quanto à viabilidade celular, utilizando PCL como um controle positivo, nenhum dos suportes apresentou citotoxicidade apresentando uma viabilidade celular elevada. Adicionalmente, a adição de NAC e CYS resultou em um aumento da adesão das células à superfície dos suportes. Os resultados são promissores como alternativa na obtenção de biomateriais, visando o desenvolvimento de matrizes para o crescimento celular com aplicações na regeneração de tecidos e órgãos.

Palavras-chave: Eletrofiação, funcionalização, suporte (*scaffold*) hidrofiliabilidade, bioatividade, biodegradabilidade e biocompatibilidade.

ABSTRACT

The use of biodegradable synthetic polymeric materials as an alternative for scaffolds for cell growth applications allows the addition of the desired surface characteristics of such materials for specific applications. The electrospinning process is relatively simple and inexpensive, consisting essentially of accelerating a slowly flowing polymer solution through a metallic capillary, to which an external electric field is applied to produce fibers of reduced average diameter. In this work, poly (ϵ -caprolactone) (PCL) and poly (dianhydro-D-glucityl) diundeca-10-enoate (PDGU) supports were prepared by electrospinning and characterized by electrochemistry for future applications in the field of tissue and organ engineering. In addition, the influence of the incorporation of n-acetylcysteine (NAC) and Cysteine (Cys) by physical mixing and by copolymerization with the monomer DGU, aiming the decrease of the hydrophobicity and of the crystallinity of the supports, was also evaluated. The effect of the PCL-PDGU ratio of the polymer concentration and the composition of the solvent mixture on the properties of the fibers was evaluated. The analysis of the fibers by scanning electron microscopy showed that it is possible to form nanofibers of PCL / PDGU blends, resulting in smaller diameters compared to pure PCL. Bioactivity assays and the biodegradability of the supports showed an increase in mass loss for the functionalized polymers by covalent binding for PCL-PDGUcoNAC (49 %) and PCL-PDGUcoCys (54 %) in relation to degradation of PCL (8 %) and PCL-PDGU (5 %). Finally, the substrates were evaluated for cell viability, using PCL as a positive control, none of the substrates presented cytotoxicity presenting 100% cell viability. Additionally, addition of NAC and CYS resulted in increased cell adhesion to the surface of the supports. The results are promising as an alternative in obtaining biomaterials, aiming the development of three - dimensional matrices for cell growth with applications in the regeneration of tissues and organs.

Keywords: Electrospinning, functionalization, scaffold, hydrophilicity, bioactivity, biodegradability and biocompatibility.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo para a regeneração de tecido. Fonte: (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005).....	30
Figura 2. Aplicação de polímeros biodegradáveis e/ou biorreabsorvíveis Fonte: (VENERAL, 2014).....	33
Figura 3. Estrutura química da ϵ -caprolactona representada na sua forma cíclica (a) e unidade monomérica repetitiva da poli(ϵ -caprolactona) (b).....	35
Figura 4. Estrutura química para o (a) monômero dianidro-D-glucitol e (b) unidade monomérica repetitiva do poli(D-glucitol-undeca-10-enoico) (PDGU) (MACHADO, 2015).....	37
Figura 5. Mecanismo de terminação da polimerização tiol-eno (MACHADO, 2015).....	37
Figura 6. Equipamento de Eletrofiação.....	40
Figura 7. Representação esquemática do Cone de Taylor.....	41
Figura 8 Imagens microscopia eletrônica de varredura (MEV) das fibras de polímero mostrando (a) fibras eletrofiadas sem contas (b) fibras eletrofiadas com contas e (c) fibras eletrofiadas com contas.....	41
Figura 9. Representação esquemática da obtenção dos materiais usados na elaboração dos suportes biocompatíveis.....	56
Figura 10. Blenda de PCL e PDGU com NAC e com Cys (mistura física) para a construção do suporte.....	56
Figura 11. Mecanismo de funcionalização do PDGUcoNAC (ligação covalente) para a construção do suporte.....	57
Figura 12. Aspecto macroscópico dos suportes A) PDGU e B) PCL puros.....	63

Figura 13. Imagens de microscopia eletrônica de varredura de fios eletrofiadas a partir de soluções poliméricas de PDGU, PCL e blenda PDL- PDGU em diferentes proporções de mássicas (mg/mL) e em diferentes proporções de solventes clorofórmio:etanol (v:v): A) PDGU 0:18 9:1; B) PCL 0:16 9:1; C) PCL-PDGU 6:10 9:1 D) PCL-PDGU 8:2 E) PCL-PDGU 10:6 9:1 F) PCL-PDGU 10:6 8:2 G) PCL-PDGU 4:12 9:1 H) PCL-PDGU 4:12 8:2 I) PCL-PDGU 5:15 9:1 J) PCL-PDGU 5:11 9:1 K) PCL-PDGU 5:11 8:2 e L) PCL-PDGU 8:8 9:1.....65

Figura 14. Imagens de microscopia eletrônica de varredura das amostras de suporte com mistura física de NAC e Cys e amostras de copolímero funcionalizado com NAC e Cys. N) PCL-PDGUNAC, O) PCL-PDGUCys, P) PCL-PDGUcoNAC e Q) PCL-PDGUcoCys.....67

Figura 15. Curvas de DSC para as amostras de a) PCL escama, b) PCL eletrofiado e c) PCL-DGU.....69

Figura 16. Curvas de DSC para as amostras de d) PCL-DGUNAC, e) PCL-PDGUCys, f) PCL-PDGUcoNAC, g) PCL-PDGUcoCys, h) PDGUcoNAC e i) PDGUco Cys.....70

Figura 17. Comparativo entre o Grau de cristalinidade para o PCL nos suportes e o PCL em escama.....71

Figura 18. Ângulo de contato para os filmes: PCL, PCL-PDGU, PCL-PDGUNAC, PCL-PDGUCYS, PCL-PDGUcoNAC e PCL-PDGUcoCys.....73

Figura 19. Ângulo de contato para os suportes eletrofiados: PCL, PCL-PDGU, PCL-PDGUNAC, PCL-PDGUCYS, PCL-PDGUcoNAC e PCL-PDGUcoCys sem esterilização.....74

Figura 20. Ângulo de contato para os suportes: PCL, PCL-PDGU, PCL-PDGUNAC, PCL-PDGUCYS, PCL-PDGUcoNAC e PCL-PDGUcoCys com esterilização.....	74
Figura 21. Espectrometria de Infravermelho (FT-IR) do Ensaio de bioatividade <i>in vitro</i> . A) PCL; B) PCL-PDGU; C) PCL-PDGUNAC; D) PCL-PDGUCYS; E) PCL-PDGUcoNAC e F) PCL-PDGUcoCys.....	78
Figura 22. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do Ensaio de bioatividade <i>in vitro</i> . A) PCL; B) PCL-PDGU; C) PCL-PDGUNAC; D) PCL-PDGUCYS; E) PCL-PDGUcoNAC e F) PCL-PDGUcoCys.....	79
Figura 23. Ensaio de biodegradabilidade dos suportes durante 28 dias.....	80
Figura 24. Análise da viabilidade celular de linhagem McCoy cultivadas por 24 e 72 horas sobre superfície plana da placa multipoços (Controle) e sobre os suportes: PCL; PCL-PDGU; PCL-PDGUNAC; PCL-PDGUCYS; PCL-PDGUcoNAC e PCL-PDGUcoCys.....	82
Figura 25. Adesão de células fibroblastos McCoy na superfície dos suportes: A) PCL; B) PCL-PDGU; C) PCL-PDGUNAC e D) PCL-PDGUCYS.....	84
Figura 26. Adesão de células fibroblastos McCoy na superfície de suportes: A) PCL-PDGUNAC 6:9,75:0,25 B) PCL-PDGUCYS 6:9,75:0,25 C) PCL-PDGUNAC 6:9:1 D) PDL-PDGUCYS 6:9:1 E) PCL-PDGU 5:11 e F) PCL-PDGU 4:12.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Trabalhos relacionados a obtenção de suportes.....	45
Tabela 2 Razões entre polímeros e entre solventes nos ensaios de eletrofunção.....	53
Tabela 3. Concentração de reagentes empregados na obtenção do PDGU funcionalizado com o NAC.....	54
Tabela 4. Concentração de reagentes empregados na obtenção do PDGU funcionalizado com o Cys.....	55
Tabela 5. Quantidades de NAC e Cys adicionada a solução polimérica PCL-PDGU e proporção polímero solvente para o copolímero.....	55
Tabela 6. Proporções de polímeros com absorção e funcionalização de NAC e Cys.....	58
Tabela 7. Diâmetro médio dos fios obtidos nos suportes.....	67
Tabela 8. Propriedades térmicas dos polímeros do suporte temperaturas de fusão T_{mf} e entalpia de fusão ΔH_m	68
Tabela 9. Perda de massa durante ensaio de bioatividade.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIBN – azobisisobutironitrila

ASTM - American Standards for Testing and Materials

CB: celulose bacteriana.

Cys – Cisteína;

DGU - dianidro-D-glucitol;

DMEM - Dulbecco's modified Eagle medium

DSC – Calorímetro Diferencial de Varredura;

Eq. – Equação;

FT-IR – Espectroscopia Infravermelho Transformada

ISO - International Standardization Organization – Organização

Internacional de Normalização

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MTT - (brometo de 3-[4,5-dimetil-2-tiazolil]-2,5-difenil-2H-tetrazólio)

NAC - n-acetilcisteína;

PAA - poli(anidrido de ácido);

PBS - poli(butileno succinato);

PCA: Poli(cianoacrilato);

PCL - policaprolactona;

PCL-PDGU – policaprolactona + 1-4-dianidro-D-glucitol-diundec-10-etano;

PCL-PDGUNAC - policaprolactona + 1-4-dianidro-D-glucitol-diundec-10-etano + n-acetilcisteína;

PCL-PDGCYS - policaprolactona + 1-4-dianidro-D-glucitol-diundec-10-etano e cisteína;

PCL-PDGUcoNAC – Blenda de policaprolactona e copolímero ((1-4-dianidro-D-glucitol-diundec-10-etano-co-n-acetilcisteína);

PCL-PDGUcoCys – Blenda de policaprolactona e o copolímero ((1-4-dianidro-D-glucitol-diundec-10-etano-co- cisteína);

PDGUcoNAC – Copolímero ((1-4-dianidro-D-glucitol-diundec-10-etano-co-n-acetilcisteína);

PDGUcoCYS – Copolímero ((1-4-dianidro-D-glucitol-diundec-10-etano-co-cisteína);

PDLLA: Poli(DL-lactídeo), Poli(ácido DL-láctico);

PEA: Poli(amida de éster).

PEC: Poli(carbonato de éster);

PES: Poli(succinato de etileno);

PETMP – Pentaeritol tetrakis(3-mercaptopropionato);

PGA Poli(glicolídeo), Poli(ácido glicólico);

PGALA: Poli(glicolídeo-co-lactídeo),

Poli(ácido glicólico-co-ácido láctico);

PHA: Poli(hidroxialcanoato);

PHB: Poli(3-hidroxi butirato);

PLLA: Poli(L-lactídeo), Poli(L-ácido láctico);

POE: Poli(ortoéster);

UV-C – Lâmpada ultravioleta.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	25
1.1 JUSTIFICATIVA.....	25
1.2 OBJETIVOS.....	25
1.2.1 Objetivo Geral.....	25
1.2.2 Objetivos Específicos.....	26
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	27
2.1 ENGENHARIA TECIDUAL.....	27
2.1.1 Importância da engenharia de regeneração de tecidos/órgãos.....	28
2.1.2 Características gerais de suportes aplicados em regeneração de tecidos.....	30
2.1.3 Degradação do polímero durante a regeneração de tecidos/órgãos.....	32
2.1.4 USO DE POLÍMEROS NO DESENVOLVIMENTO DE SUPORTES.....	34
2.1.4.1 Poli(caprolactona).....	34
2.1.4.1.1 Características físico-químicas da olicaprolactona.....	35
2.1.4.2 Poli(D-glucitil-undeca-10-enoico).....	36
2.1.4.2.1 Características físico-químicas do PDGU.....	37
2.1.5 BLENDAS POLIMÉRICAS.....	39
2.2 ELETROFIAÇÃO.....	39
2.2.1 Parâmetros operacionais.....	42
2.2.1.1 Tensão aplicada.....	42
2.2.1.2 Vazão da solução polimérica.....	42

2.2.1.3	Relação entre a concentração do polímero e a viscosidade da solução.....	43
2.2.1.4	Tipo de solvente.....	43
2.2.1.5	A condutividade elétrica da solução.....	44
2.2.1.6	Distância entre a agulha e o coletor.....	44
2.2.2	Parâmetros Ambientais.....	44
2.2.2.1	Temperatura do processo de eletrofição.....	44
2.2.2.2	Umidade Relativa.....	45
2.3	ESTADO DA ARTE.....	45
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	51
3.1	MATERIAL.....	51
3.2	MÉTODOS.....	51
3.2.1	Eletrofição.....	51
3.2.2	Esterilização dos suportes.....	52
3.2.3	Avaliação das soluções poliméricas.....	52
3.2.3.1	Avaliação da solubilidade do PDGU e da blenda PCL-PDGU.....	52
3.2.3.2	Avaliação da concentração de polímero para a elaboração do suporte.....	53
3.2.4	Funcionalização da blenda via mistura física e copolimerização do DGU com NAC e Cys.....	54
3.2.5	Morfologia do suporte.....	57
3.2.5.1	Diâmetro médio das fibras.....	58
3.2.6	Avaliação da Hidrofilicidade.....	58

3.2.7 Propriedades Térmicas.....	59
3.2.8 Avaliação <i>in vitro</i> da Bioatividade e da Biodegradação em tampão Fosfato (PBS 7,5).....	59
3.2.9 Cultura das células sobre os suportes.....	60
3.2.10 Avaliação da citotoxicidade celular.....	60
3.2.11 Adesão celular.....	61
4. DISCUSSÃO E RESULTADOS.....	63
4.1 ASPECTO MACROSCÓPICO DO SUPORTE.....	63
4.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA RAZÃO DE PCL:PDGU.....	63
4.2.1 Avaliação do efeito da funcionalização com NAC e Cys.....	66
4.3 AVALIAÇÃO DO DIÂMETRO DAS FIBRAS DOS SUPORTES.....	67
4.4 PROPRIEDADES TÉRMICAS.....	68
4.5 AVALIAÇÃO DA HIDROFILICIDADE DOS SUPORTES E FILMES.....	72
4.5.2 Avaliação da hidrofiliçidade em suporte sem esterilização..	73
4.5.3 Avaliação da hidrofiliçidade em suportes com esterilização...	74
4.6 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA BIOATIVIDADE DO SUPORTE ELETROFIADO.....	75
4.6.1 Avaliação da biodegradabilidade para os suportes eletrofiados.....	79
4.6.2 Avaliação da perda de massa durante o ensaio de bioatividade.....	80
4.7 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE CELULAR.....	81
4.7.1 Adesão celular.....	83

5. CONCLUSÕES.....	87
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	89
7. REFERÊNCIAS.....	91

1. INTRODUÇÃO

1.1 JUSTIFICATIVA

Os suportes (*scaffolds*) se assemelham à matriz extracelular natural e vem sendo bastante estudados para aplicações biomédicas. A necessidade de se produzir via eletrofição, suportes com as propriedades desejadas vêm se destacando, principalmente, visando à melhoria da adesão e proliferação celular nos mesmos (REN et al., 2017; YAO et al., 2017). Uma maneira de modificar esses materiais é o emprego de compósitos contendo peptídeos os quais são utilizados como materiais para potenciais aplicações para regeneração óssea (WANG et al., 2017).

Primeiramente, a escolha da técnica deu-se em virtude do seu baixo custo acoplado à fácil empregabilidade. Os registros de Taylor sobre a técnica de *Electrospinning* o datam como precursor. A técnica consiste basicamente da aplicação de um campo elétrico de alta intensidade, de forma que as cargas se acumulam na superfície de uma gota de solução polimérica que está na ponta da agulha, isto desestabiliza a gota a qual toma forma de um cone, chamado cone de Taylor. Isto provoca intensa repulsão entre as moléculas de polímero que são arremetidas no ar na forma de um jato. Estando este jato carregado, a sua trajetória pode ser controlada pelo campo elétrico. À medida que a solução se desloca no ar, o solvente evapora e uma fibra de polímero carregada é aleatoriamente depositada e fixada em um coletor planar ou rotatório, formando um filme tecido não tecido (TAYLOR, 1969).

Visando a obtenção e utilização do suporte na área biomédica, foram escolhidos dois biopolímeros (PCL e PDGU), devido às suas propriedades físico-químicas e mecânicas. Para avaliar se os suportes teriam melhores respostas quanto à regeneração e proliferação celular, os suportes foram funcionalizados com n-acetilcisteína e cisteína.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo geral produzir uma matriz extracelular através da técnica de eletrofição para aplicação na engenharia tecidual.

1.2.2 Objetivos Específicos

São objetivos específicos do trabalho:

- Avaliar a obtenção de fibras poliméricas a partir do polímero PDGU;
- Elaborar uma blenda polimérica entre PCL e PDGU;
- Avaliar qual a melhor concentração dos polímeros para a elaboração do suporte;
- Avaliar a funcionalização do PDGU com n-acetilcisteína e cisteína para a elaboração do suporte;
- Avaliar as características estruturais dos suportes;
- Avaliar o crescimento celular na superfície dos suportes com e sem funcionalização.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ENGENHARIA TECIDUAL

Um biomaterial é uma substância e/ou material utilizado em sistema terapêutico e/ou diagnóstico, que pode estar em contato direto com tecido ou fluido biológico. Estes biomateriais constituem um grupo heterogêneo de compostos vivos ou inanimados, de origem natural ou sintética. Estes podem ser introduzidos e/ou acondicionados no corpo com o propósito de melhorar ou substituir determinado tecido ou órgão cuja função esteja comprometida por causa de lesões ou por perda significativa de tecido ou de órgão (ABDI - Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial, 2011; DAVIS et al., 2005).

Dentre os diferentes significados atribuídos ao termo biomaterial este também pode se referir a uma substância não viva com potencial aplicação em saúde (ABDI - Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial, 2011; DAVIS et al., 2005). Entre estas aplicações destacam-se os biomateriais utilizados como dispositivos biomédicos e os empregados como matriz de crescimento celular em engenharia de tecidos e de órgãos. O desenvolvimento tecnológico associado ao uso de biomateriais vem apresentando um crescimento constante de maneira a incrementar bioprocessos industriais (DAVIS et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2010).

Projetos de novos materiais biocompatíveis devem considerar uma integração de áreas tais como engenharias, bioquímica, química e medicina regenerativa de tal maneira que os materiais devem ser projetados para propiciar condições ideais para interações células/biomaterial (DAVIS et al., 2005).

A escolha do biomaterial deve estar baseada no tipo de aplicação desejada. Portanto, para as mais diversas aplicações há uma gama de materiais naturais, sintéticos ou compostos que podem ser empregados. Entre estes materiais que possuem grande importância destacam-se os polímeros sintéticos e naturais como alguns poliésteres, polissacarídeos e proteínas (TANG et al., 2014; ZAWANEH et al., 2010).

Durante o desenvolvimento de novos materiais poliméricos híbridos para aplicações em saúde deve ser dado especial destaque às modificações químicas da superfície do polímero. Tais modificações podem ter como finalidade propiciar uma superfície que melhor represente a matriz extracelular. Desta forma, espera-se criar um ambiente específico a fim de propiciar as condições favoráveis que

estimulem uma resposta de proliferação celular (DAWSON et al., 2008).

Assim, na formulação de uma matriz de crescimento celular inovadora, sua composição poderá mimetizar as condições do microambiente tecidual alvo. Os componentes devem ser livres de quaisquer substâncias que possam vir a prejudicar a adesão e proliferação celular ao longo da superfície tridimensional (BOSS et al., 1995). Além disso, a matriz de crescimento deverá apresentar propriedades físico-químicas adequadas ao seu propósito, ou seja, apresentar estabilidade química, baixa densidade e, quando aplicada, deverá apresentar boa resistência mecânica e elasticidade. Também deve ser obtido pelo menor custo possível (BOSS et al., 1995).

A eficiência do planejamento para o desenvolvimento de um novo biomaterial pode ser determinada por meio de características primordiais em termos de qualidade dos componentes escolhidos. Assim, para uma matriz de crescimento celular de formato tridimensional, como no caso de um suporte estas características referem-se as propriedades de biocompatibilidade e biofuncionalidade (WILLIAMS, 1987).

O termo biocompatibilidade se refere a uma propriedade do biomaterial que consiste na compatibilidade entre o biomaterial e o tecido vivo (WILLIAMS, 1987). Isto deverá ocorrer de tal modo que promova o crescimento e a diferenciação entre as células normais, mantendo uma orientação no espaço tridimensional. Portanto, é imprescindível que o biomaterial utilizado na construção da matriz tridimensional exerça a sua função enquanto suporte para crescimento celular de forma a evitar danos indesejáveis ao tecido, ao mesmo tempo que minimiza perturbações no processo fisiológico de regeneração (WILLIAMS, 1987).

A biofuncionalidade, por sua vez, consiste na habilidade do material desempenhar determinada função de interesse e que é específica ao material, sendo considerada como apropriada às aplicações em regeneração tecidual de acordo com as características físicas, químicas e biológicas do biomaterial (MARQUES; REIS; HUNT, 2002; VERT et al., 1992).

2.1.1 Importância da engenharia de regeneração de tecidos/órgãos

Estudos realizados em engenharia de regeneração de tecidos e órgãos buscam o desenvolvimento de matrizes para crescimento celular empregando biomateriais de duas maneiras distintas. A primeira

consiste em coletar um determinado tecido ou parte de um órgão através de biópsia no paciente que precisa recuperar um tecido ou órgão lesionado. Na sequência as células coletadas devem ser dissociadas e isoladas para permitir o cultivo das células de interesse provenientes do tecido ou órgão em questão. Este cultivo deverá ocorrer em uma matriz de crescimento celular na forma de suporte. Este pode ser constituído por material de origem biológica ou sintética. Em alguns casos tratam-se de estruturas tridimensionais (3D) ou bidimensionais (2D) que poderão ser posteriormente aplicadas superficialmente no local lesionado, implantadas ou inseridas através de procedimento cirúrgico no paciente em tratamento (KAIGLER; MOONEY; PH, 2001; MAIA et al., 2013).

No segundo método de aplicação de biomateriais empregando uma matriz para crescimento celular está poderá ser implantada diretamente no paciente, sem ter havido uma cultura celular prévia. Portanto, neste caso uma matriz para crescimento celular poderá ser composta por suspensão salina contendo polímeros, proteínas e fatores de crescimento e de proliferação celular (KAIGLER; MOONEY; PH, 2001).

Como exemplo de aplicação de biomaterial temos uso de matrigel[®] que apresenta composição similar à matriz extracelular e que pode ser utilizado como suporte para células que tenham sido mantidas apenas em suspensão salina ou que tenham sido multiplicadas através de cultura *in vitro* (ABDI - Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial, 2011).

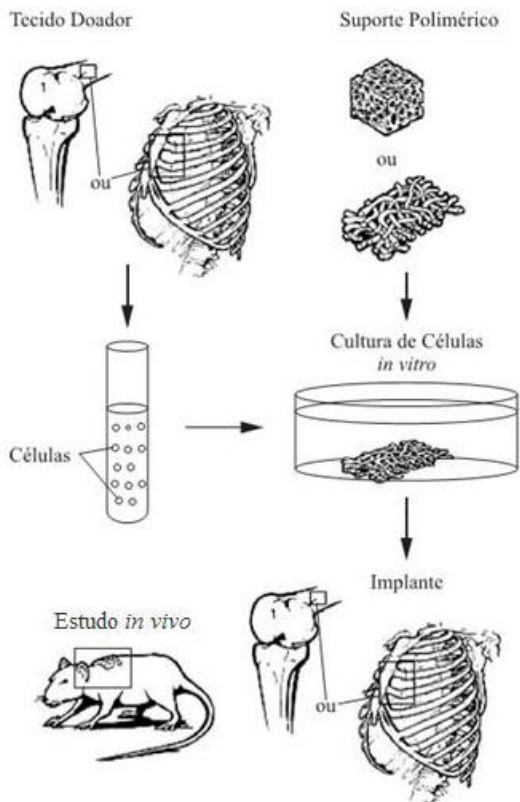


Figura 1. Mecanismo para a regeneração de tecido. Fonte: (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005).

2.1.2 Características gerais de suportes aplicados em regeneração de tecidos

A partir de um mesmo tipo de matriz de crescimento celular podem ser obtidos diferentes formatos de suportes de acordo com as necessidades do paciente (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005). Além disto, as dimensões de um suporte polimérico sólido podem ser projetadas de acordo com o modo de aplicação (BOTCHWEY et al., 2003).

Estas estruturas podem servir de substratos e propiciar uma melhor interação célula-célula ou célula-material. Cabe destacar que a comunicação entre célula-célula e célula-matriz pode ser melhorada, a partir da modificação da superfície do suporte (SUNDELACRUZ;

KAPLAN, 2009). Estas modificações devem preferencialmente promover a viabilidade e proliferação celular, propiciando uma melhor interação entre as moléculas constituintes da matriz de crescimento celular com os componentes da matriz extracelular das células do tecido/órgão alvo (KOBAYASHI; OKANO, 2013).

Assim, o suporte inserido no microambiente tecidual deverá atrair as células apropriadas de maneira a restaurar as funções perdidas. Para tanto, as propriedades físicas-mecânicas destas estruturas também devem ser bem definidas (KOBAYASHI; OKANO, 2013).

Para determinadas aplicações de suportes outras características importantes são suas propriedades mecânicas que são determinadas pela porosidade e arquitetura (SALEM et al., 2002). Cada suporte constitui uma matriz tridimensional temporária com arquitetura específica e propicia ao desenvolvimento de um tecido (HOKUGO; TAKAMOTO; TABATA, 2006; MAIA et al., 2013).

Então, os suportes podem ser empregados tanto para o crescimento celular quanto como uma plataforma de suporte mecânico, auxiliando na formação estrutural do novo tecido originado após a sua aplicação na região desejada (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005). Tais matrizes, modeladas de acordo com o tipo de aplicação, são estruturas capazes de propiciar a difusão de células de tecidos saudáveis do local onde foram implantadas para seu interior (HOKUGO; TAKAMOTO; TABATA, 2006).

Por outro lado, outro ponto importante do processo de regeneração de tecidos empregando matrizes de crescimento celular refere-se à degradação controlada deste biomaterial implantado (PATEL; FISHER, 2008).

Normalmente espera-se que a matriz de crescimento celular na forma de um suporte permaneça tempo suficiente para ocorrer o acoplamento entre as células mantidas neste biomaterial e as células do microambiente tecidual ou entre as células do biomaterial e a matriz extracelular das células do tecido até total regeneração da área lesionada (PATEL; FISHER, 2008).

O controle entre a degradação e a rigidez do biomaterial pode ser observado de forma independente. Durante o processo de modificação química, a modulação de parâmetros como copolimerização e o massa molar dos polímeros empregados ou mesmo alterações na razão de copolimerização são fatores determinantes da qualidade estrutural final do biomaterial (JEONG et al., 2004a). Assim, a empregabilidade destes biomateriais na constituição de suportes fica condicionada a estes fatores.

Estudos para a otimização da taxa de degradação do biomaterial são considerados como estratégia preliminar quando se pretende empregar suporte de fase transitória que apresentem integridade mecânica até o momento planejado (JEONG et al., 2004b).

Outro ponto importante a ser considerado refere-se à porosidade do biomaterial. Pois, no processo de elaboração de um suporte o controle do tamanho, do número e da conectividade dos poros constituem características determinantes na qualidade do biomaterial empregado. Estudos demonstraram que o tamanho dos poros tem relação direta com a vascularização e com a difusão de nutrientes, resíduos e oxigênio no tecido em regeneração dentro do biomaterial. Assim, evidências experimentais demonstraram que diâmetros de poros superiores a 5 μm não permitem uma boa vascularização. Por outro lado, aplicações com poros apresentando diâmetros inferiores a 100 nm, podem levar a um comprometimento da viabilidade e proliferação celular em virtude de estes dificultarem a difusão de nutrientes, resíduos e oxigênio (SALEM et al., 2002). Assim, uma melhor integridade do material estará associada com uma porosidade equilibrada ao longo do mesmo. Desta forma, pode-se garantir as propriedades mecânicas que propiciem os efeitos celulares desejados (BOTCHWEY et al., 2003; TANG et al., 2014).

2.1.3 Degradação do polímero durante a regeneração de tecidos/órgãos

Um resumo das principais aplicações de polímeros biodegradáveis e/ou biorreabsorvíveis encontra-se na Figura 2 (VENERAL, 2014).

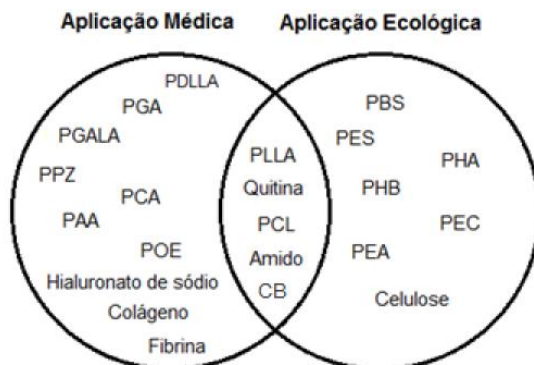


Figura 2. Aplicação de polímeros biodegradáveis e/ou biorreabsorvíveis Fonte: (VENERAL, 2014).

De acordo com Vert e colaboradores, (1992), a velocidade de degradação do material depende do grau de cristalinidade, o qual está relacionado com a absorção de água do polímero.

A classificação de polímeros apresentada pela *American Standards for Testing and Materials* (ASTM), estabelece que os polímeros biodegradáveis são aqueles nos quais a degradação é realizada por microrganismos, predominantemente de modo natural ecossistêmico (ASTM D-883, 2011).

Sabe-se que a degradação está condicionada às características intrínsecas da espécie polimérica empregada na construção dos suportes. Portanto, o uso de um polímero biodegradável fica condicionado por suas características mais adequadas em termos de biocompatibilidade para a aplicação desejada de suportes produzidos com o polímero selecionado. De fato, a biocompatibilidade e a biofuncionalidade são considerados como os principais critérios para a avaliação de um sistema biodegradável (VERT et al., 1992).

Além dos polímeros biodegradáveis, destacam-se os polímeros bioabsorvíveis e os polímeros biorreabsorvíveis (BARBANTI et al., 2005). Podemos diferenciar os tipos de polímeros com base na forma de degradação que ocorre nos mesmos. Na degradação *in vivo* de polímeros biodegradáveis ocorre a cisão das cadeias macromoleculares, sem afetar a integridade do material e sem eliminar subprodutos no organismo. Por outro lado, outros suportes poliméricos podem sofrer a ação de enzimas extracelulares e formar subprodutos de sua degradação que serão removidos do local da ação (VERT et al., 1992).

Os polímeros bioabsorvíveis, podem se integrar nos fluidos corporais sem que haja cisão da cadeia macromolecular ou diminuição da sua massa molar (VERT et al., 1992). Por outro lado os polímeros biorreabsorvíveis ao serem reabsorvidos *in vivo* geram metabólitos que podem ser eliminados do organismo através de alguma via metabólica (VERT et al., 1992).

Adicionalmente, segundo Lenz, (1993) os aspectos estruturais destes materiais devem ser considerados, para que possam ser relacionados com o processo de degradação durante a aplicação de suportes poliméricos. De fato, este autor menciona que são requeridas algumas características relativas ao estado físico; às condições do microambiente tecidual e relação à razão superfície/volume polimérico. Assim, a estrutura do polímero adequado para regeneração tecidual deverá apresentar hidrofiliabilidade relacionada com a presença de grupos funcionais hidroxílicos como o grupo hidroxila, por exemplo. Também deve ser considerado o estado físico e morfológico que implicam no balanço entre cristalinidade e amorfismo polimérico, ambos modulados de acordo com o processo regenerativo desejado.

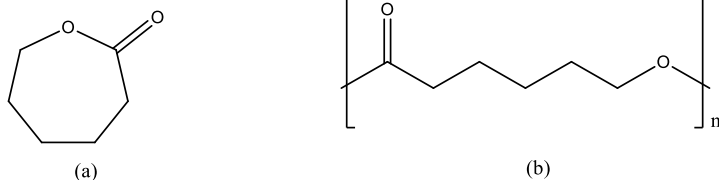
Lenz, (1993) ainda ressalta que as condições de pH do microambiente tecidual são importantes para a modulação da degradação dos materiais biopoliméricos. E, por fim, a razão superfície e volume dependem do tamanho da unidade monomérica e pureza do material de partida. Por tanto, o tipo de polímero e suas unidades poliméricas devem ser cuidadosamente selecionados para cada aplicação em saúde.

2.1.4 USO DE POLÍMEROS NO DESENVOLVIMENTO DE SUPORTES

2.1.4.1 Poli(caprolactona)

A policaprolactona (PCL) (Figura 3), é um polímero empregado na construção de materiais tanto na área médica, quanto na área biológica. A biodegradação e biorreabsorção de poliésteres como a PCL, ocorre a partir da hidrólise das ligações ésteres, o que resulta na redução da massa molar sem a perda de massa. A reabsorção prossegue por meio de células do organismo, tais como macrófagos (PACHENCE, 2007). A PCL pode ser biodegradada pela via hidrolítica sem que haja degradação enzimática no tecido (VERT, 2009). Isso acaba tornando o processo de biorreabsorção/absorção mais lento.

Figura 3. Estrutura química da ϵ -caprolactona representada na sua forma cíclica (a) e unidade monomérica repetitiva da poli(ϵ -caprolactona) (b).



2.1.4.1.1 Características físico-químicas da policaprolactona

O polímero policaprolactona (PCL) é um polímero sintético semicristalino, de cadeia linear, que pertence à classe dos poliésteres alifáticos, com ponto de transição vítrea (T_g) de $-60\text{ }^\circ\text{C}$ e ponto de fusão variando entre $59\text{-}64\text{ }^\circ\text{C}$. Esta variação é dependente da natureza cristalina (SINHA et al., 2004).

A natureza cristalina desse polímero permite a realização de sínteses em uma ampla faixa de temperaturas de fusão. Isso ocorre em virtude da presença de cristais de diferentes tamanhos na região cristalina do polímero e, por esta razão, a temperatura de início da fusão difere da temperatura que ocorre no final do processo (CANEVAROLO, 2001).

Segundo Aoyagia, (2002) o início da degradação térmica da PCL ocorre próximo a 230°C . Assim, não são esperados problemas de degradação durante seu processamento, pois sua temperatura de degradação térmica é muito superior à temperatura de fusão (KOVALEVSKY et al., 2001).

Estudos de solubilidade do PCL foram testados frente alguns solventes orgânicos como clorofórmio, diclorometano, tetracloreto de carbono, benzeno, tolueno, cicloexanona e 2-nitropropano. Nestes ensaios, realizados em temperatura ambiente, o polímero apresentou solubilidade; já para acetona, dimetilformamida e acetonitrila mostrou baixa solubilidade, e é insolúvel frente o álcool, éter de petróleo e éter etílico (COULEMBIER et al, 2006; QIN; WU, 2012).

Ao longo das últimas décadas, o PCL e seus derivados foram amplamente empregados nas mais diversas áreas por serem considerados polímeros absorvíveis. Este uso se justifica pelas propriedades destes polímeros e derivados, tais como: flexibilidade,

biodegradabilidade e biocompatibilidade, além de não toxicidade (YOSHIMOTO et al., 2003; GARKHAL et al., 2007).

Entre as várias possibilidades de aplicação, o PCL destaca-se na área de liberação de medicamentos, em virtude da facilidade deste polímero e seus derivados serem moldados e fabricados. Suas propriedades mecânicas e tipo de cinética de degradação, possibilitam que esses materiais sejam incorporados na constituição de blendas poliméricas (LI et al., 2016; MASSON et al., 1996; REN et al., 2017).

De fato, a ampla aplicabilidade do PCL, como constituinte de uma blenda polimérica, tem permitido a obtenção de inúmeros novos biomateriais. Cabe destacar que o PCL vem sendo amplamente estudado devido a suas propriedades viscoelásticas, cinética de degradação adequada, tamanhos de poros e propriedades mecânicas propícias para permitir a adsorção de proteínas e adesão celular (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010).

2.1.4.2 Poli(D-glucitol-undeca-10-enoico)

O polímero poli(D-glucitol-undeca-10-enoico) (PDGU) (Figura 4) é um polímero sintético semicristalino, de cadeia linear, obtido via polimerização em miniemulsão, desenvolvido no Laboratório de Controle de Processos, UFSC. Este polímero pode ter suas propriedades melhoradas a partir da funcionalização por reação tiol-eno. Na Figura 5 se observa o mecanismo de funcionalização tiol-eno. A qual ocorre via radicais livre e em três etapas principais: iniciação, propagação e terminação, e mais uma etapa de transferência de cadeia, nesta etapa de transferência de cadeia, um radical carbônico transfere um elétron para o grupo tiol. Normalmente, utiliza-se proporção 1:1 de tiol-eno para, desta forma, evitar reações secundárias (MACHADO et al., 2017).

Figura 4. Polimerização do PDGU (MACHADO, 2017).

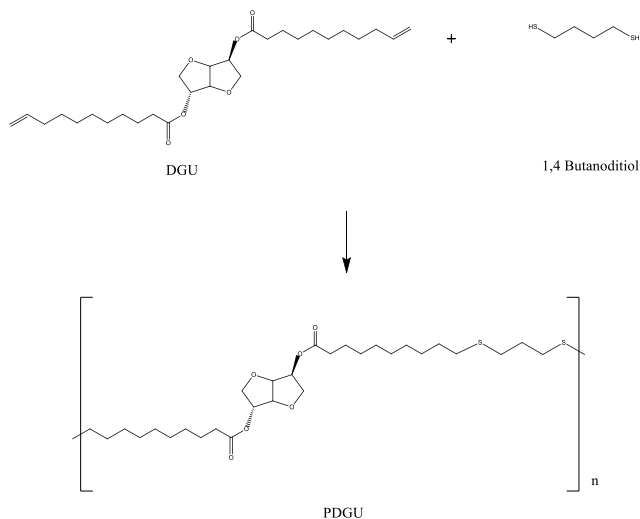
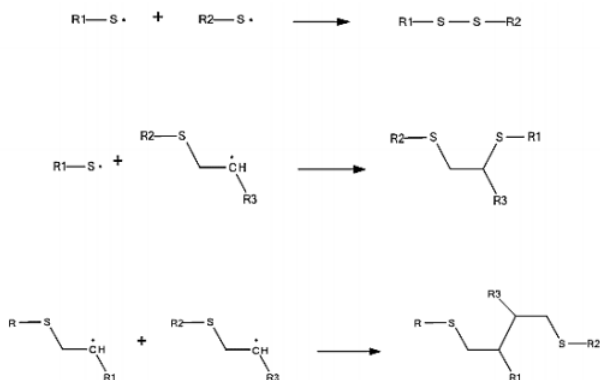


Figura 5. Mecanismo de terminação da polimerização tiol-eno (MACHADO, 2015).



2.1.4.2.1 Características físico-químicas do PDGU

A temperatura de transição vítrea (T_g) do PDGU é -63°C e a temperatura de fusão 60°C (MACHADO, 2015). Seu emprego se justifica em função do fato da reação ser ambientalmente adequada, regioselectiva e degradabilidade oferecidas pela presença das ligações

tiol-eno (RYDHOLM et al., 2007; RYDHOLM; ANSETH; BOWMAN, 2007).

A funcionalização consiste em modificações físicas, químicas e/ou biológicas para aumentar a biocompatibilidade dos biomateriais. O processo de funcionalização pode ser realizado por intermédio de conjugação de moléculas na superfície do material eletrofiado ou incorporado no meio reacional antes do processo de eletrofição (BENTZ; SCHROEDER; ESTRIDGE, 1998). Assim, os biomateriais podem ser projetados de modo a aumentar a degradabilidade ou, até mesmo, para obter-se um maior controle da liberação de micro ou macromoléculas no ambiente (SCHINDLER et al., 2005).

Algumas modificações propiciam aos suportes o aumento das interações celulares com a superfície do biomaterial; bem como podem modular a taxa de degradação, obter uma estrutura mais adequada às necessidades; aumentar a possibilidade de serem incorporados elementos que sirvam como sinalizadores para as células (SCHINDLER et al., 2005; YAO et al., 2017; ZONG et al., 2005). Assim, tais modificações na superfície do suporte podem resultar em maior sucesso nos testes biológicos realizados *in vitro* ou *in vivo* (SCHINDLER et al., 2005; YAO et al., 2017; ZONG et al., 2005).

Existem vários exemplos bem-sucedidos de funcionalização de suportes com substâncias biotivas. Isto pode ocorrer através da incorporação de partículas contendo essas substâncias, como o antioxidante n-acetilcisteína (PUBCHEM CID 12035, [2017]). Outro exemplo é a incorporação de peptídeos bioativos contendo domínios de poliglutamato ligados à hidroxiapatita (PUBCHEM CID 12035, 2017; PUBCHEM CID 14781, 2017; CULPEPPER et al., 2014; LI et al., 2014).

A biocompatibilidade do polímero PDGU melhorada com funcionalização via tiol-eno que possibilita uma rápida polimerização (REDDY; ANSETH; BOWMAN, 2005; RYDHOLM et al., 2006, 2007). Onde, a funcionalização covalente da superfície do polímero potencializa suas aplicações.

Por outro lado, a incorporação de resíduos peptídicos pode facilitar a degradação de suporte que normalmente sofre clivagem hidrolítica de grupamentos ésteres (RYDHOLM; ANSETH; BOWMAN, 2007). Assim, a incorporação destes resíduos poderá aumentar a degradação do biomaterial por clivagem enzimática nos tecidos.

Portanto, o objetivo da utilização do PDGU com a incorporação de n-acetilcisteína e cisteína via funcionalização do grupo tiol-eno como

substâncias bioativas incorporadas, visa à obtenção de matriz de crescimento celular na forma de suportes bidimensionais. Estes permitirão o desenvolvimento de uma plataforma para a liberação controlada que também possa atuar como sinalizadora para os fibroblastos e outras células envolvidas no processo de regeneração de tecidos (FERESHTEH et al., 2016; GABRIEL et al., 2017; REN et al., 2017; YAO et al., 2017).

2.1.5 BLENDAS POLIMÉRICAS

Constitui uma blenda polimérica a mistura mecânica de dois ou mais polímeros ou copolímeros, sem a necessidade de ligação química entre os componentes (UTRACKI, 2002). A blenda tem suas características finais afetadas a partir da sua composição, por exemplo, miscibilidade, morfologia, adesão superficial dentre outros (MANSON; SPERLING, 1976).

As blendas poliméricas possuem as mais diversas aplicações. Por exemplo, podem ser plataformas para a liberação controlada (KENAWY et al., 2009) ou mesmo como suportes para regeneração de tecidos/órgãos (YAO et al., 2017). Para realizar a escolha do polímero devem-se observar alguns critérios tais como, custo, processo de obtenção, biocompatibilidade, entre outros. Nesse processo de seleção do polímero também é pertinente que seja observado a estrutura molecular, morfologia, cristalinidade, solubilidade dentre outras (MANSON e SPERLING, 1976).

O desempenho da blenda fica condicionado à concentração e à morfologia dos polímeros, onde a compatibilidade entre eles deve apresentar uma morfologia compatível com a aplicação destinada. Assim, é necessário observar se os polímeros possuem uma redução da tensão superficial significativa, permitindo uma boa dispersão. Também acompanhar a estabilidade da morfologia e da adesão interfacial, onde se dá a transferência de tensão, responsável por melhorar as propriedades mecânicas do produto (UTRACKI, 2002).

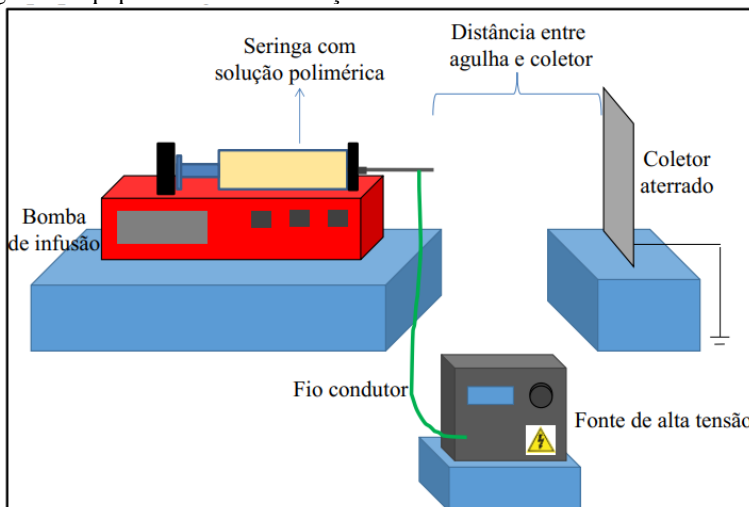
2.2 ELETROFIAÇÃO

A Eletrofiação tem a sua origem a partir do processo de eletrospray; esta é uma técnica simples e de fácil aplicação, que utiliza forças eletrostáticas para produzir fibras poliméricas que podem apresentar dimensões micrométricas chegando até dimensões

nanométricas (BHARDWAJ; KUNDU, 2010). A utilização dessa técnica está em constante crescimento, devido à sua praticidade na obtenção das fibras, as quais podem ser geradas com diversos materiais, como por exemplo: polímeros sintéticos (MA et al., 2005), naturais (CHEN; CHANG; CHEN, 2008), biodegradáveis (KIM; LEE; PARK, 2007; MARETSCHKEK; GREINER; KISSEL, 2008), não degradáveis (VERRECK et al., 2003) e até mesmo o emprego de misturas entre esses materiais (DENG et al., 2007), o que possibilita seu emprego em diversas áreas da engenharia e saúde.

O equipamento utilizado para a eletrofição é uma fonte de baixa tensão, uma bomba injetora, uma seringa com agulha e um suporte para coletar a amostra. O processo consiste na aplicação de uma corrente elétrica na ponta da agulha, gerando uma diferença de potencial elétrico (DDP) entre a agulha e o coletor, que ao iniciar a injeção da solução polimérica forma um jato contínuo, que é amparado pelo coletor. O jato pode ter direção horizontal ou vertical, como apresentado na Figura 6.

Figura 6. Equipamento de Eletrofição.

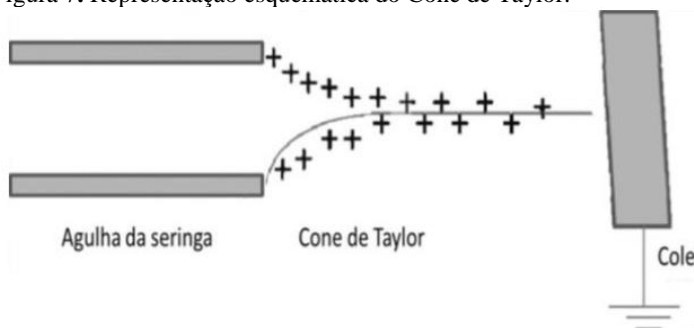


Fonte: (NIEHUES, 2015).

Se não houver diferença de potencial elétrico (DDP), a gota de polímero é mantida na ponta da agulha devido à tensão superficial do líquido (DOSHI; RENEKER, 1993; DOSHI; RENEKER; BAUMGARTEN, 1971). Existindo a DDP, as forças repulsivas superam a tensão superficial e um jato carregado da solução é ejetado da ponta do

cone de Taylor observado na Figura 7 (LIANG; HSIAO; CHU, 2007; TAYLOR, 1969).

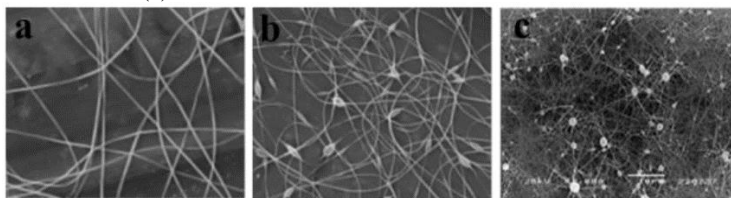
Figura 7. Representação esquemática do Cone de Taylor.



Fonte: (KRIEGEL 2008; NIEHUES, 2015).

A trajetória deste jato pode ser controlada através do campo elétrico. Trajetória está em que o solvente evapora e é depositado em um coletor. Estas fibras dispostas no coletor formam uma membrana de tecido não tecido, como mostrado na Figura 8. Formação de contas é indesejável; para tanto, o processo de eletrofiiação reside na otimização dos parâmetros envolvidos para que se possa alcançar a morfologia e as propriedades desejáveis das fibras. Estes parâmetros são: tensão aplicada, vazão da solução, concentração do polímero, viscosidade da solução, natureza do solvente, condutividade da solução e distância entre o capilar e o coletor. Adicionalmente, esta técnica é afetada por parâmetros externos ao processo como temperatura e umidade relativa.

Figura 8 Imagens microscopia eletrônica de varredura (MEV) das fibras de polímero mostrando (a) fibras eletrofiadas sem contas (b) fibras eletrofiadas com contas e (c) fibras eletrofiadas com contas.



Fonte: (FONG; CHUN; RENEKER, 1999; SUPAPHOL; MIT-UPPATHAM; NITHITANAKUL, 2005; NIEHUES, 2015).

2.2.1 Parâmetros operacionais

Para o sucesso da técnica de eletrofição, se faz necessário regular uma série de variáveis de processamento para gerar as fibras, ao invés de gotículas ou morfologias de gotas.

2.2.1.1 Tensão aplicada

A diferença de tensão aplicada que permite que a instabilidade da gota da solução obtenha a forma cônica é muito pequena (TAYLOR, 1969). De modo que, qualquer alteração nesta tensão além de um valor crítico leva a ejeção de um jato polimérico a partir do ápice do cone. O valor crítico da tensão varia de acordo com a solução de polímero, tendo uma faixa ótima de tensão aplicada ou a força do campo elétrico para um determinado sistema polímero-solvente, onde a obtenção de fibras é o desejado. O campo elétrico interfere diretamente na morfologia, em virtude de da magnitude do campo aplicado, resultado na formação de contas ou até mesmo, na inibição do jato polimérico. Assim, aumentar a tensão além de um valor crítico, o diâmetro da nanofibra em um primeiro momento diminui e, posteriormente, aumentará (SILL; VON RECUM, 2008). A diminuição do diâmetro é atribuída ao maior grau de alongamento do jato em correlação a repulsão da carga dentro do jato e ao forte campo elétrico externo, decorrente do aumento da tensão aplicada.

2.2.1.2 Vazão da solução polimérica

A vazão da solução polimérica durante o processo de eletrofição influencia a formação estrutural da fibra (como diâmetro, porosidade e geometria). Em vazões muito elevadas, não há tempo suficiente para a evaporação do solvente, gerando contas, porosidade com diâmetros maiores que os desejados e morfologia da fibra achatada (MEGELSKI et al., 2002; S.A. THERON, E. ZUSSMANA, 2004); ao mesmo tempo, uma vazão muito baixa não permite a formação do jato por faltar solução na ponta da agulha (DEITZEL et al., 2001; ZONG et al., 2002). Visando manter a forma do Cone de Taylor na ponta do capilar e minimizar os defeitos com contas, deseja-se uma taxa mínima de fluxo da solução polimérica a fim de substituir a solução que é perdida quando o jato de fibra é ejetado (ZELENY, 1935).

A taxa de vazão também é afetada pela tensão aplicada. Se a tensão é aumentada, produz-se uma diminuição do volume da gota de polímero dentro do Cone de Taylor, em contrapartida reduz o jato de fibra a ser expelido no interior do capilar, o que pode ocasionar a formação de contas (SILL; VON RECUM, 2008; ZONG et al., 2002).

2.2.1.3 Relação entre a concentração do polímero e a viscosidade da solução

Baixas concentrações com polímeros de baixo peso molar geram solução com baixa viscosidade. Durante a eletrofiação, o jato tende a se romper devido à baixa tensão superficial, ocasionando a formação de gotículas ao invés de fibras poliméricas (GREINER; WENDORFF, 2007; VENUGOPAL; ZHANG; RAMAKRISHNA, 2004; DEITZEL et al., 2001; J. HOGAN JR.; BISWAS, 2008).

Para soluções com altas concentrações de polímeros de alto peso molar, tem-se alta viscosidade; assim, o jato é menos propenso à ruptura devido à alta tensão superficial. Isto possibilita o estiramento da gota, constituindo o processo de eletrofiação e obtendo a fibra na superfície do coletor (BHARDWAJ; KUNDU, 2010; GREINER; WENDORFF, 2007; VENUGOPAL; ZHANG; RAMAKRISHNA, 2004). Porém, para soluções com viscosidade muito elevada, também ocorre o rompimento do fluxo através da obstrução da agulha.

2.2.1.4 Tipo de solvente

Para a seleção do solvente, dois fatores são relevantes, a solubilidade do polímero e o seu ponto de ebulição. Os principais solventes utilizados são os voláteis, em virtude da facilidade de evaporação durante o percurso da ponta da agulha até a superfície do anteparo utilizado para a coleta das fibras. Contudo, os solventes com pontos de ebulição muito baixo, devem ser evitados, pois se evaporarem na agulha podem provocar possíveis obstruções. Por outro lado, solventes com alto ponto de ebulição, não permitem a evaporação antes de atingir o coletor, formando morfologias indevidas ou mesmo a aglutinação das fibras (LANNUTTI et al., 2007; SILL; VON RECUM, 2008).

2.2.1.5 A condutividade elétrica da solução.

A condutividade de carga da solução polimérica está relacionada à quantidade de íons dissolvidos em solução, e é dependente do tipo de polímero empregado e do solvente. Soluções poliméricas com alta condutividade possibilitam que o jato produzido seja submetido a uma força de tração maior, quando exposto a uma determinada voltagem. O aumento da condutividade da solução permite a obtenção de diâmetros menores das fibras; isto porque, durante a eletrofiação, ocorre o fornecimento de carga suficiente devido à superação da força repulsiva frente à tensão superficial. Isto possibilita maior alongamento do jato de solução polimérica (DOSHI; RENEKER; BAUMGARTEN, 1971; ZONG et al., 2002).

2.2.1.6 Distância entre a agulha e o coletor.

A distância entre a agulha e o coletor também influencia o tamanho e a morfologia final das fibras, mas de forma menos pronunciada perante os demais. A distância ideal entre o capilar e o coletor é desejável para formação de fibras, evitando a possível formação de gotas. Distâncias maiores tendem a reduzir o diâmetro das fibras, enquanto para distâncias menores ocorre o efeito contrário; além da possível não evaporação completa do solvente as fibras podem ser deformadas. Segundo Doshi; Reneker e Baumgarten (1971) e MEGELSKI e colaboradores (2002) a alteração do diâmetro da fibra não está apenas relacionado com a distância entre a agulha e o coletor, mas também com a tensão aplicada.

2.2.2 Parâmetros Ambientais

2.2.2.1 Temperatura do processo de eletrofiação

A temperatura do processo de eletrofiação é um parâmetro que contribui para a evaporação do solvente. Este parâmetro influencia nas propriedades da solução, tal como na viscosidade. Existe uma relação inversa entre a temperatura e a viscosidade, o aumento da temperatura reduz a viscosidade da solução e influencia na espessura das fibras (SUPAPHOL; MIT-UPPATHAM; NITHITANAKUL, 2005).

2.2.2.2 Umidade Relativa

A umidade relativa do meio está diretamente relacionada com a evaporação do solvente durante o processo de eletrofiação. A diminuição da umidade relativa resulta em nanofibras mais espessas (PELIPENKO et al., 2013). A velocidade de evaporação do solvente, em virtude da diminuição da umidade relativa é aumentada e conseqüentemente a concentração local da solução polimérica também irá aumentar, resultando em aumento da viscosidade e formação de fibras mais espessas.

2.3 ESTADO DA ARTE

Vários trabalhos são relatados na literatura com o uso da técnica de eletrofiação. É possível visualizar, na Tabela 1, alguns dos principais trabalhos que serviram de motivação para o desenvolvimento desse trabalho.

Tabela 1. Trabalhos relacionados a obtenção de suportes.

Técnica	Material	Aplicação	Aplicação (referência)
Eletrofiação	Polímeros	Criador da técnica de eletrofiação	(TAYLOR, 1969)
Deposição de vapor químico em baixa pressão.	Membranas de nitrito de silício.		(SALEM et al., 2002)
Nanofibras poliméricas	PLLA – poli (L - ácido láctico)	Construção de um suporte para a adsorção de proteínas	(WOO; CHEN; MA, 2003).
Eletrofiação	PCL	Efeito da mudança do solvente na obtenção do suporte	QIN; WU, 2012)
Eletrofiação	PCL	Suporte para o crescimento e infiltração celular	(LI et al., 2014).
Eletrofiação	PCL	Suporte com poros interligados	(XU et al., 2015).
Eletrofiação	Gelatina	Elaboração e caracterização de	(NIEHUES, 2015)

		membranas de Gelatina	
Eletrofição	Blenda de PCL e Gelatina	Comparação de suporte de nanoescala e multiescala	(LI et al., 2016).
Eletrofição	Blenda de PCL e Gelatina	Compósito de nanofibras estruturadas	(REN et al., 2017).
Eletrofição	Blenda de PCL e PLA – poli (ácido láctico)	Desenvolvimento de uma matriz 3D para regeneração óssea	(YAO et al., 2017).
Eletrofição	Membrana de PLLA	Membranas de PLLA eletrofiadas para entrega de Cafeína.	(IMMICH et al., 2017)
Eletrodeposição	Peptídeos	Modificação química	(WANG et al., 2017)

Taylor (1969) descreve que os jatos finos e os grossos podem ser obtidos a partir de fluidos de menor ou de maior viscosidade por aplicação de forças elétricas. A medida em que o potencial elétrico é aplicado, a relação do potencial e coletor aumenta, tornando os fluidos cônicos com jatos finos se formando nos vértices. A estabilidade dos jatos depende da geometria adotada, onde possibilita a obtenção de diâmetros de fios na faixa de micro a nanômetros. As propriedades mecânicas são mais significativas e impactantes durante o processo da obtenção do jato. Assim, as elucidções deste trabalho dizem respeito à formação do jato e quais fatores são determinantes para a obtenção de jatos de fluidos micro e nanométricos a partir da eletrofição.

Salem e colaboradores (2002) relatam a colonização de suportes poliméricos construídos de polímeros biodegradáveis com aplicação na engenharia de tecidos. Dentro dos suportes, às células encontram um ambiente poroso no qual migram através da superfície do polímero e propiciam uma distribuição celular homogênea. Assim, os autores julgam importante prever as interações entre célula e poro a partir do suporte otimizado, investigando o comportamento de dois tipos de células variando características do poro, como o diâmetro. Os autores designam quantitativamente os fatores relevantes para o comportamento das células que são, percentual de cobertura da superfície, o tamanho do poro e o tipo de célula empregado. As células utilizadas foram os

fibroblastos 3T3 e células endoteliais, em que os fibroblastos demonstram um padrão em que diâmetro com poros maiores as dimensões da célula foram alinhadas com outro grupo celular.

Woo e colaboradores (2003) desenvolveram suporte de poli (ácido-L-láctico) sob a hipótese de que a estrutura imitaria a estrutura das fibras naturais de colágeno, criando um microambiente mais favorável para as células. Este trabalho é o primeiro no assunto envolvendo arquitetura nanofibrosa construída em suportes tridimensionais que melhorou as características da adsorção de proteínas, que possibilita interações celulares com andaimes. Os suportes auxiliam na adsorção de proteínas significativamente em relação a suportes de paredes sólidas, aumentando a seletividade à adsorção de proteínas, tais como fibronectina e vitronectina. Seus resultados indicam que tais suporte permitem melhorar a ligação celular em relação aos suportes constituídos de paredes sólidas.

Qin e Wu (2012) relatam em seu trabalho a utilização da policaprolactona e a técnica de eletrofiação para obtenção de nanofibras; eles estabeleceram uma relação entre solubilidade e solventes. Ao utilizarem diferentes solventes mostraram que todos formam compostos com fibras nanométricos, e no caso de solventes muito voláteis podem ocasionar a presença de buracos na superfície do fio em virtude da rápida evaporação.

Li e colaboradores (2014) relatam a construção de um suporte tridimensional de micro e nanofibras. Eles estudaram a morfologia da estrutura porosa obtido por agulha normal e através da obtenção de um disco para obtenção de uma estrutura tridimensional. Avaliaram que a morfologia irregular obtida poderia melhorar a captação de proteínas em relação a andaimes sólidos. Cultivando fibroblastos na superfície dos suportes, avaliaram que a estrutura tridimensional aumenta a fixação da espécie em relação à superfície sólida. Também avaliaram a migração celular para a superfície tridimensional em até 800 μm .

Xu e colaboradores (2015) desenvolveram uma estratégia para promover a autoaglomeração em suportes de PCL. Onde a superfície interconectada dos poros e a sua estrutura microporosa (300 μm), possibilitaram a obtenção de uma superfície 3D com alta porosidade morfológicamente semelhante à matriz extracelular natural, adequada ao crescimento celular. Os estudos *in vitro* revelaram que o suporte pode levar à viabilidade celular e promover a diferenciação osteogênica.

Nieheus e colaboradores (2015) estabelece que o tamanho da estrutura molecular da gelatina afeta o processo de eletrofiação e as

propriedades das membranas fibrosas. Utilizaram gelatina em diferentes índices de Bloom 90, 250 e 280 conjunta com ácido acético 89,6% (v:v) e com diferentes concentrações de polímeros. As soluções foram caracterizadas quanto a viscosidade, condutividade elétrica, microscopia eletrônica de varredura e ensaios de tração. Os autores mostraram que a eletrofiação é melhor sucedida quando a viscosidade das soluções é de 300 a 700 mPa. Avaliaram o efeito na reticulação da gelatina com glutaraldeído e o reforço mecânico promovido por nanocristais de celulose para elevar as propriedades mecânicas da membrana, foram adicionados a solução de gelatina concentrações de 1 a 4 % (m:m) de cristais de celulose e então realizada a eletrofiação, demonstrando assim que a membrana fibrosa reticulou em 69 % praticamente insolúveis em sistemas aquosos a 23 e 30 °C. Nanocristais de celulose

Li e colaboradores (2016) a partir da eletrofiação produziram um suporte composto por poli(caprolactona)/gelatina (PCL/GT) de diferentes estruturas, a saber, a estrutura em nanoescala construída por nanofibras e estrutura multiescala constituída por nanofibras e microfibras. Foi observado pelos autores que, devido à não homogeneidade da solução PCL/GT, o suporte PCL-GT de disco apresentou estrutura multiescala com poros maiores em relação ao ácido (PCL-GT-A). A análise das imagens de microscopia eletrônica de varredura indicou que o suporte PCL-GT foi construído por nanofibras e microfibras. A taxa de proliferação celular foi maior para os suportes multicamadas do que os suportes em nanoescala. Assim, os autores propuseram que a adição do ácido aumenta a adesão e proliferação celular, enquanto os suportes tridimensionais aumentam espaços efetivos para que as células possam proliferar. No entanto, observaram que as nanofibras uniformes e a estrutura densamente empacotada no andaime PCL-GT-A limitaram as células na superfície.

Ke e colaboradores (2017) desenvolveram uma membrana híbrida constituída de policaprolactona/gelatina via eletrofiação seguidas de reticulação com genipina. Os autores utilizaram ácido acético para resolver a separação de fase de PCL e gelatina, obtendo nanofibras híbridas homogêneas com diferentes proporções. Os testes mecânicos mostraram que essas nanofibras exibiram propriedades de resistência à tração e elasticidade adequadas, para aplicações na engenharia de tecido ósseo. Os autores também testaram a biocompatibilidade em células MC3T3-e1. Análises *in vitro* indicaram que as nanofibras obtidas por eles promoveram a formação óssea.

Portanto, todos esses resultados sugeriram que as membranas de nanofibras de polímero/proteína eletrofiada são eficazes para regeneração óssea guiada.

Yao e colaboradores (2017) desenvolveram uma técnica inovadora de autoaglomeração com nanofibras induzidas termicamente, avaliando os modelos de suporte nanofibrosos com alta porosidade e interconectados com tamanhos de poros próximos a 300 μm . Foi incorporado poli (ácido lático) produzindo maior rigidez mecânica e bioatividade. Ainda segundo os autores, estas espécies melhoraram a viabilidade celular e promoveram a diferenciação osteogênica, permitindo a formação de osso em um modelo de rato de defeito ósseo craniano de tamanho crítico *in vivo*. Em resumo, tanto os resultados *in vitro* como os *in vivo* indicaram que os suportes nanofibrosos permitiram a formação de osso craniano.

Immich e colaboradores (2017) desenvolveram uma membrana de PLLA via processo de eletrofiação. Parâmetros de eletrofiação estão diretamente ligados a estrutura tridimensional do eletrofiado, estas estruturas proporcionam que este material possa ser empregado como administrador de fármaco. Portanto além da obtenção da estrutura tridimensional os autores desenvolveram o estudo de um modelo matemático para o controle da liberação do fármaco adicionado na membrana.

Wang e colaboradores (2017) a partir da necessidade de melhorar a biocompatibilidade dos biomateriais modificaram a superfície com peptídeos bioativos melhorando suas características, especialmente, quando utilizados para reparo ósseo.

Recentemente, Machado e colaboradores (2015) relataram a obtenção de um polímero poli(tioéter-éster) através de polimerização de miniemulsão de tiol-eno utilizando um monómero de diéster de α - ω -dieno, sintetizado a partir do ácido 10-undecenoic (derivado do óleo de mamona) e isossorbida (derivado do amido) constituindo o diundec-10-enoato de dianidro-D-glucitol (DGU). A DGU foi copolimerizada com 1,4-butaneditol por polimerização de miniemulsão de tiol-eno. Portanto, polímeros oriundos de fontes renováveis constituíram uma alternativa para o meio ambiente aos polímeros derivados do petróleo, especialmente para fins como aplicações biomédicas quando biocompatibilidade e/ou biodegradabilidade se tornam altamente relevantes.

A necessidade de se propor alternativas aos biomateriais convencionais, este trabalho buscou utilizar um biopolímero PDGU oriundo de fontes renováveis e realizar a funcionalização com n-

acetilcisteína e cisteína via reação tiol-eno, visando aplicações biomédicas quando biocompatibilidade e/ou biodegradabilidade se tornam altamente relevantes, construindo assim um suporte para o emprego na engenharia tecidual.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

Para a realização do presente trabalho utilizaram-se os polímeros policaprolactona (PCL) com massa molar ponderal média (Mw) de 80 000 g·mol⁻¹ adquirida junto a Sigma Aldrich, e 1-4-dianidro-D-glucitil-diundec-10-etano (PDGU) com Mw 20 000 g·mol⁻¹ sintetizado no Laboratório de Controle e Processos na Universidade Federal de Santa Catarina LCP-USFC (MACHADO, 2015) para a produção dos suportes via eletrofição.

Foram utilizados reagentes de grau analítico e diferentes procedências: clorofórmio P.A. (CH₃Cl 99,8 %) (NEON), dimetilformamida P.A. (DMF) (NEON), tetraidrofurano P.A. (THF) ((CH₂)₄ 99 %) (NEON), álcool etílico 96° (CH₃CH₂OH 95 %) (VETEC), Pentaeritol tetrakis(3-mercaptopropionato) (PETMP) (>95 %) (Sigma Aldrich), acetato de etila (99,8 %) (Sigma Aldrich) e azobisisobutironitrila (AIBN) (98 %) (VETEC), como solventes.

Para a funcionalização dos suportes foram utilizados N-acetil cisteína (NAC) e cisteína (Cys) de grau farmacêutico adquiridas no comércio local, objetivando melhor adesão celular.

Para a análise de citotoxicidade foi utilizada a linhagem celular McCoy (fibroblasto murino). Trata-se de uma célula normal, não transformada, obtida comercialmente do Instituto Adolfo Lutz, sendo cultivadas em meio RPMI 1640 (GIBCO, Baltimore, EUA) suplementado com soro fetal bovino (10%), penicilina (100 U ml⁻¹) (GIBCO, Baltimore, EUA) e estreptomicina (100 µg ml⁻¹) (GIBCO, Baltimore, EUA).

As células foram mantidas em uma densidade de 1 x 10⁵ células/mL de meio, à temperatura de 37°C e em uma atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Eletrofição

As condições para a eletrofição foram modificadas a partir das literaturas de Niehues, (2015) e Immich et al., (2017), para os polímeros empregados neste trabalho. As soluções e suspensões poliméricas foram

transferidas para uma seringa de 5 mL equipada com uma agulha de diâmetro interno de 0,723 mm. O volume de 2 mL com vazão de 0,500 mL h⁻¹ foi eletrofiado em bomba de infusão (New Era Pump Systems NE- 300), A temperatura de 23,0 ± 0,5 °C e a umidade relativa de 55,0 ± 5,0 %. A tensão aplicada foi de 17,0 ± 2 kV e a distância entre a ponta da agulha e o coletor aterrado (folha de alumínio, 6,0 × 6,0 cm²) foi de 18 cm. A Figura 6 ilustra o sistema de eletrofição e as condições experimentais utilizadas. Os suportes eletrofiados foram armazenados em placa Petri para testes posteriores.

3.2.2 Esterilização dos suportes

Os suportes foram recortados com dimensões 10 x 15 mm² foram recortados e depositados em placas de 24 poços. A esterilização foi realizada com 2 mL de solução de álcool etílico 70%, por 1 h, seguida de lavagens com PBS (pH 7,4); a seguir foram irradiadas com luz ultravioleta (UV-C) por 20 min em cada lado do material, na sequência se proferiu o plaqueamento (LI et al., 2014).

3.2.3 Avaliação das soluções poliméricas

3.2.3.1 Avaliação da solubilidade do PDGU e da blenda PCL-PDGU

Para verificar a concentração de polímero a ser utilizada para a construção do suporte via eletrofição, foi avaliada a afinidade deste polímero em diferentes solventes. Foi adicionado 160 mg de polímeros em 1 ml de solvente, e agitado por aproximadamente 4 h. Sendo, posteriormente, avaliado quanto a solubilidade em clorofórmio, diclorometano e tetrahidrofurano, para as amostras testadas todas foram solúveis nos solventes testados (BORDES et al., 2010; ENIS; VOJTECH; SADIKOGLU, 2015).

Após o teste de solubilidade do PDGU, foi necessário a produção de uma blenda polimérica, a fim de elevar a viscosidade da solução. A concentração da solução polimérica para preparo da blenda foi de 60 mg PCL e 100 mg de PDGU em 1 mL de solvente.

Após o ensaio de solubilidade da blenda polimérica, o clorofórmio foi escolhido para a realização dos experimentos devido a afinidade com os dois polímeros.

3.2.3.2 Avaliação da concentração de polímero para a elaboração do suporte

A concentração de polímero a ser utilizada para a construção do suporte foi de 160 mg/mL. A escolha para as concentrações foram previamente determinadas através do estudo da literatura (ENIS; VOJTECH; SADIKOGLU, 2015; QIN; WU, 2012). Assim, a partir deste estudo as concentrações avaliadas, neste estudo, para as proporções de PCL e PDGU para a constituição da blenda e a elaboração do suporte estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 Razões entre polímeros e entre solventes nos ensaios de eletrofiação.

Amostra	Polímero (m:m) – PCL:PDGU	Solvente (v:v) – Clorofórmio: Etanol
A	0:18	9:1
B	16:0	9:1
C	6:10	9:1
D	6:10	8:2
E	10:6	9:1
F	10:6	8:2
G	4:12	9:1
H	4:12	8:2
I	5:15	9:1
J	5:11	9:1
K	5:11	8:2
L	8:8	9:1

Foram preparadas diferentes soluções, com diferentes concentrações de PCL e PDGU de acordo com a Tabela 2. As amostras foram pesadas de acordo com o exemplo: 16% de PCL-PDGU; utilizou-se uma balança semi-analítica, modelo Shimadzu AUY220, pesando 63,0 mg de PCL e 104,5 mg de PDGU e adicionada em 1 mL de solvente (0,900 mL de clorofórmio e 0,100 mL de álcool etílico). A mistura foi agitada suavemente em agitador magnético (MS equipamentos, TLK 48) a temperatura ambiente por 24 h. Na sequência foi realizada a eletrofiação conforme descrito no ítem 3.2.1.

3.2.4 Incorporação de NAC e Cys na blenda via mistura física e funcionalização via copolimerização do DGU com NAC e Cys

A obtenção de suportes funcionalizados é uma proposta que visa reduzir a hidrofobicidade e a cristalinidade, tendo como finalidade, a de torná-los compatíveis com tecidos orgânicos. Por isso, após avaliação do efeito da concentração na blenda de PCL-PDGU, foi adicionado na mistura física um percentual de NAC ou Cys, e também foi funcionalizado através da copolimerização via reação tiol-eno do DGU com NAC ou Cys visualizado na Figura 9. Foi tomado como padrão os suportes elaborados apenas com o PCL. A funcionalização com NAC e Cys tem como objetivo propiciar uma redução da energia superficial e da hidrofobicidade dos suportes. Para as amostras da blenda funcionalizadas via mistura física o mesmo procedimento foi realizado em ambos os materiais. Por exemplo: foi utilizado 60 mg de PCL, 95 mg PDGU e 5 mg de NAC em 1 mL de solventes (9:1). As amostras foram agitadas por 24 h e posteriormente foi realizada a eletrofiliação.

Para a reação de funcionalização tiol-eno entre o DGU e NAC, os reagentes adicionados estão descritos na Tabela 3. Todos os reagentes, exceto o DGU, foram adicionados em um sistema reacional sob agitação por um período de tempo de 15 min em atmosfera N₂, para completa solubilização. Posteriormente a solubilização se adicionou o DGU. A reação ocorreu em banho a 80°C por 4 horas.

Tabela 3. Concentração de reagentes empregados na obtenção do PDGU funcionalizado com o NAC.

Reagentes	Quantidades (g)
NAC	0,3415
DGU	1,0000
PETMP	0,2505
Acetato de etila	3,7500
Etanol	3,7500
AIBN	0,0097

O mesmo procedimento foi empregado para a funcionalização tiol-eno com a Cys, os reagentes adicionados estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Concentração de reagentes empregados na obtenção do PDGU funcionalizado com o Cys.

Reagentes	Quantidades (g)
Cys	0,3203
DGU	1,0000
PETMP	0,8180
Acetato de etila	7,5000
Etanol	7,5000
AIBN	0,0082

Após a funcionalização foram preparadas as soluções estão descritas na Tabela 5. Foi pesado 60 mg PCL e 100 mg PDGUcoNAC, na sequência foi adicionado 1 mL de solvente (9:1) e deixado sob agitação por 24 h conforme representação esquemática Figura 9. Nas

Figura 10 e Figura 11 são apresentados os mecanismos para a formação das blendas. Após a preparação da solução foi realizada a eletrofiação.

Tabela 5. Quantidades de NAC e Cys adicionada a solução polimérica PCL-PDGU e proporção polímero solvente para o copolímero.

Amostra	Polímero	Proporção PCL:PDGU:NAC ou Cys (m:m:m)	Solvente (v:v) – Clorofórmio: Etanol
N	PCL-PDGUNAC	6:9,5:0,5	9:1
O	PCL-PDGCys	6:9,5:0,5	9:1
P	PCL-PDGUcoNAC	6:10	9:1
Q	PCL-P0DGUcoCys	6:10	9:1

Figura 9. Representação esquemática da obtenção dos materiais usados na elaboração dos suportes biocompatíveis.

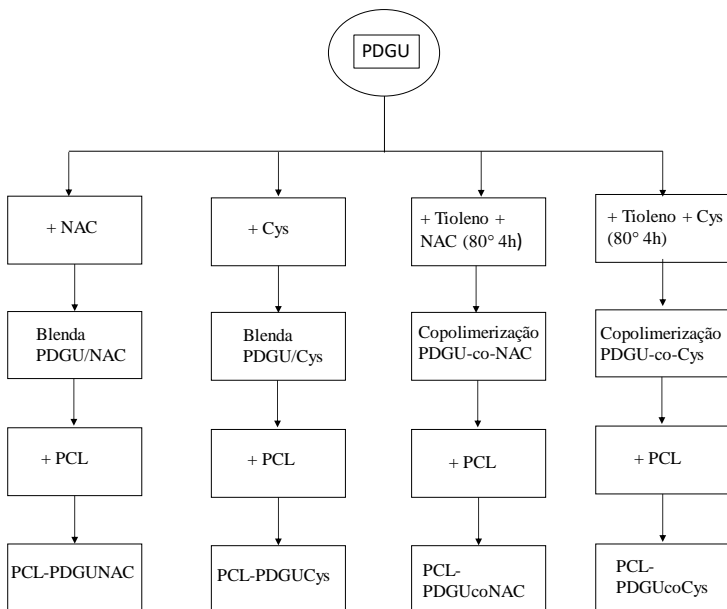


Figura 10. Blenda de PCL e PDGU com NAC e com Cys (mistura física) para a construção do suporte.

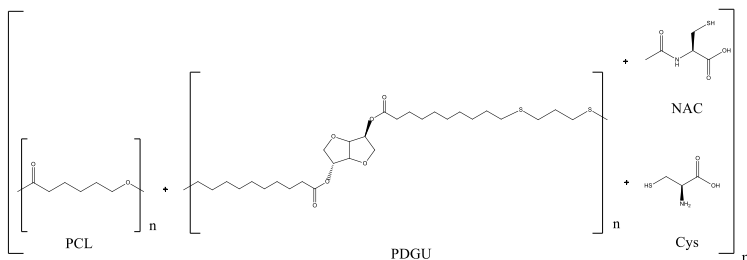
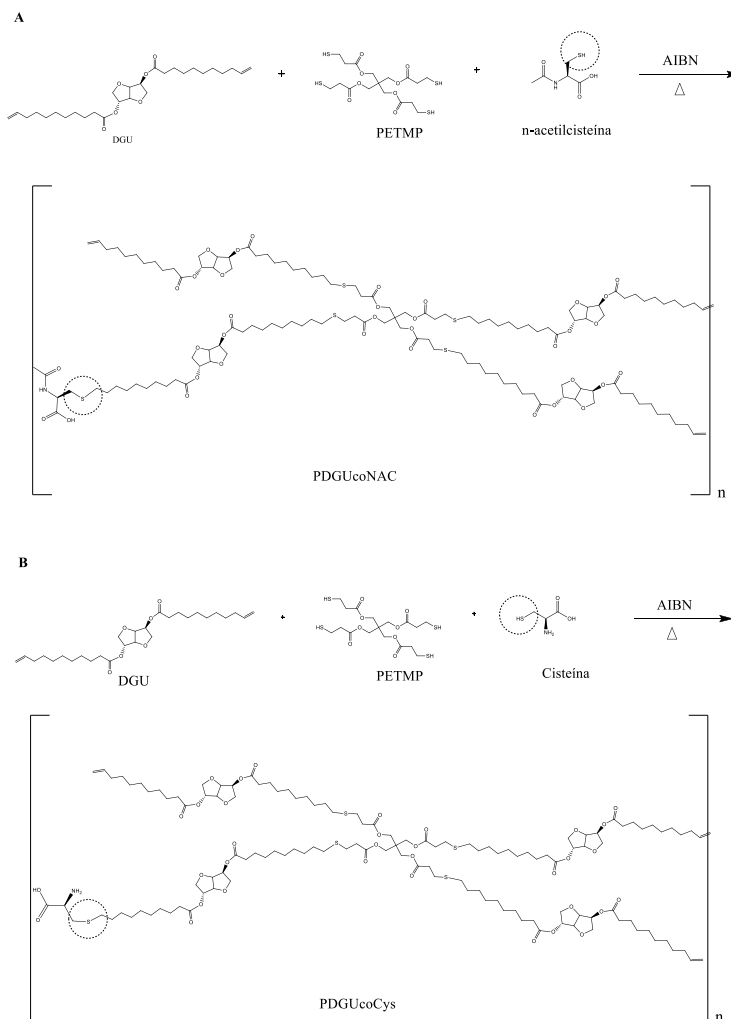


Figura 11. Mecanismo para a funcionalização do PDGU com NAC e Cys: A) PDGUcoNAC e B) PDGUcoCys para a construção do suporte.



3.2.5 Morfologia do suporte

A análise da morfologia dos suportes foi realizada com base nas imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), equipamento da marca JEOL, modelo JSM-6390LV, com filamento de

tungstênio, alocado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC. Para a análise, um fragmento do suporte (0,2 mm x 0,2 mm) foi depositado sobre o *stub* e recoberto com uma fina camada de ouro sendo analisados na sequência.

3.2.5.1 Diâmetro médio das fibras

O diâmetro médio das fibras para as amostras descritas na Tabela 6 foi determinado com base na metodologia ajustada de (CHAKROFF et al., 2015) com alguns ajustes, a partir do valor médio de 100 medidas para cada amostra com auxílio *software* ImageJ, onde utilizou-se as imagens obtidas por MEV.

Tabela 6. Proporções de polímeros com absorção e funcionalização de NAC e Cys.

Polímero	Processo de obtenção	Proporção PCL:PDGU:NAC ou Cys (m:m:m)	Solvente (v:v) – Clorofórmio: Etanol
PCL	Síntese LCP	16	9:1
PDGU	Comercial	6:10	9:1
PDGUNAC	Blenda	6:9,5:0,5	9:1
PDGUCys	Blenda	6:9,5:0,5	9:1
PDGUcoNAC	Copolimerização	6:10	9:1
PDGUcoCys	Copolimerização	6:10	9:1

3.2.6 Avaliação da Hidrofilicidade

O ensaio de hidrofilicidade para as amostras descritas na Tabela 6 foi realizado por medidas de ângulo de contato conforme descrito na literatura (AUGUSTINE et al., 2015; LI et al., 2013). As medidas foram realizadas tanto em amostras de filme, como eletrofiadas antes e após o procedimento de esterilização. O objetivo desta análise é avaliar a interação da superfície do biopolímero com água. Além disso, também foi avaliada a hidrofilicidade do suporte eletrofiado com e sem esterilização. No primeiro caso, visa-se avaliar o efeito da formação da rede do tecido não tecido comparativamente ao filme, e no segundo caso, avaliar se a esterilização afeta esta propriedade.

Foi usado um equipamento Ramé-Hart Inst. Co. Modelo: 250-F1. O filme foi depositado sobre lâminas de vidro para evaporação do solvente. Os suportes foram primeiramente eletrofiados e em seguida

recortados nas dimensões 10 mm x 15 mm e depositados sobre lâminas de vidro. A água foi adicionada (0,5 µL) com uma seringa suspensa perpendicularmente ao suporte da amostra à temperatura ambiente. Os ensaios para preparar as amostras foram realizados em triplicata e cada amostra foi analisada em triplicata, totalizando 9 análises para cada amostra. O resultado é uma média dos valores obtidos.

3.2.7 Propriedades Térmicas

As amostras de polímero seco descritas na Tabela 6 (5 mg cada) foram analisadas usando um Calorímetro Diferencial de Varredura (DSC) 4000 Perkin Elmer, sob atmosfera inerte de nitrogênio (20 mL min⁻¹), na faixa de temperatura entre -60°C a 150 °C, a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min. O histórico térmico foi removido antes das análises a uma taxa de aquecimento de 20°C min⁻¹ e taxa de arrefecimento de -20°C/min. As temperaturas de fusão foram obtidas a partir da segunda corrida de aquecimento. As análises foram realizadas na Central de Análises no Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Para elucidar o percentual de cristalinidade foi utilizada a Equação 1:

$$C\% = \frac{\Delta H_{\text{real}}}{\Delta H_{100\%}} * 100 \quad (1)$$

onde ΔH_{real} é a entalpia de fusão da amostra e $\Delta H_{100\%}$ é a entalpia de fusão do polímero 100% cristalino.

3.2.8 Avaliação *in vitro* da Bioatividade e da Biodegradação em tampão Fosfato (PBS 7,5)

Para avaliar a bioatividade e a biodegradabilidade foi usada metodologia modificada de Felfel et al., (2016) e Fereshteh et al., (2016). As amostras descritas na Tabela 6, foram embebidas em 15 mL de solução tampão fosfato (PBS) (pH 7,5) e colocada em uma incubadora a 37°C com agitação constante a 60 rpm durante 28 dias. O PBS foi substituído semanalmente, sendo realizado a leitura do pH (pHmêtro marca Digimed DM-23). Ao final do 28º dia, as amostras foram removidas do PBS, lavadas por três vezes com água deionizada para remover o PBS residual, na sequência, congeladas a -24°C por 24 h, e então, liofilizadas.

A biodegradabilidade antes e após imersão em PBS 7,5 foi determinada com base na metodologia de Yao et al., (2017). Neste sentido, cada suporte foi analisado por Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada Fourier (FTIR) usando o equipamento IR Prestige-21 da Shimadzu. Os ensaios foram realizados na região de números de 400 e 4000 cm^{-1} usando 30 varreduras com resolução 4 cm^{-1} . Todas as amostras em pó foram maceradas e preparadas na forma de discos de brometo de potássio (KBr) na proporção 1:100.

A biodegradabilidade foi avaliada quanto ao percentual de perda de massa do material.

Para calcular o percentual acumulado de massa degradada foi utilizada a Equação 2:

$$\text{Degadação Acumulada} = \left(\frac{mf-mi}{mf} \right) * 100 \quad (2)$$

onde Mi= massa inicial; Mf= massa final; Degadação Acumulada.

3.2.9 Cultura das células sobre os suportes

Para o ensaio de plaqueamento celular foi utilizada a metodologia ajustada de Yao et al., (2017). As células foram mantidas em incubadora até confluência em condições padrão de 37°C em atmosfera controlada (5 % de CO₂ com 95 % umidade do ar) e em meio de cultivo (DMEM) completo, ou seja, suplementado com soro fetal bovino (SFB) (10 %) e antibióticos (penicilina 100 U/ml e estreptomicina, 100 µg/ml).

Em seguida, para o ensaio de citotoxicidade, em cada placa de 24 poços foram adicionadas 1×10^5 células semeadas em cada poço sobre a superfície dos suportes já esterilizados.

Após 24 h e 48 h de manutenção, sob condições padrão em estufa, o meio de cultura foi removido. Para cada tempo foram preparados 3 poços por placa contendo cada tipo de suporte e foram realizados três ensaios independentes, com três passagens do tipo de célula escolhido. Os poços foram lavados com solução de PBS, o procedimento foi repetido por três vezes para remover as células não ligadas e mortas.

3.2.10 Avaliação da citotoxicidade celular

Para a determinação da viabilidade celular foi utilizada a metodologia ajustada de Yao et al., (2017). Em seguida, para cada

tempo determinado para avaliar a adesão celular (24 h e 72 h), foi efetuado a determinação indireta da quantidade de células aderidas ativas empregando o ensaio MTT padrão (MOSMANN T, 1983; YAO et al., 2017). Para tanto, em cada poço contendo a célula aderidas foram adicionados 720 μL de meio de cultura de DMEM e 80 μL de solução de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-2-tiazolil]-2,5-difenil-2H-tetrazólio) com concentração de 5 mg. mL^{-1} (10 ml de meio sem PBS com 5 mg de MTT). As células foram mantidas em contato com o MTT por 2 h.

Após a remoção do meio de cultura contendo o MTT, se adicionou 500 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) em cada poço. Em seguida as placas foram mantidas sob agitação a temperatura ambiente, durante 30 min. O DMSO dissolveu os cristais de Formazan.

Na sequência foram pipetados 100 μL da solução de cada poço da placa de 24 poços e transferidos para uma placa de 96 poços (cada amostra/poço permite uma triplicata, cada uma com 100 μL). Efetuando-se a quantificação em um leitor de placas multipoços (Elisa), com uma absorvância de 492 nm.

3.2.11 Adesão celular

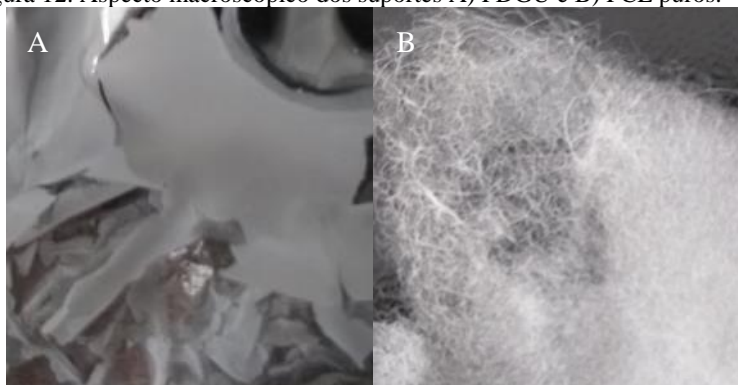
Para detectar a adesão de células fibroblastos McCoy a superfície dos suportes foram usadas metodologia ajustada em Li et al., (2014). As células de McCoy foram semeadas em suportes na concentração de 2×10^4 células, depositados em uma placa de 24 poços (2 x 2 cm). Após o período de 72 h de incubação as amostras foram fixadas com 2,5% de glutaraldeído durante 1 hora. As amostras foram desidratadas com concentrações graduadas de álcool etílico (50%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100% v:v). Posteriormente, as amostras foram secadas em estufa a vácuo e examinadas por MEV.

4. DISCUSSÃO E RESULTADOS

4.1 ASPECTO MACROSCÓPICO DO SUPORTE

A Figura 12 mostra o aspecto macroscópico dos suportes obtidos pelo processo de eletrofição do PDGU e PCL puros.

Figura 12. Aspecto macroscópico dos suportes A) PDGU e B) PCL puros.



O suporte de PDGU, apresentado na Figura 12 A, tem aspecto denso, contínuo e quebradiço, enquanto o suporte de PCL apresenta o aspecto de fios maleáveis (Figura 12 B). Este comportamento é atribuído à baixa viscosidade da solução de PDGU devido a sua baixa massa molar (aproximadamente 20000 g mol^{-1}) (MACHADO, 2015). Com objetivo de aumentar a viscosidade da solução polimérica de PDGU a ser eletrofiada, foi adicionado um segundo polímero, o PCL, para constituir uma blenda com PDGU. Assim, buscou-se realizar uma avaliação do percentual de PCL a ser utilizado para a confecção do suporte.

4.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA RAZÃO DE PCL:PDGU

Inicialmente foram testadas diversas concentrações de PDGU (180, 200, 250, 300, 400, 500, 600 e 700 mg/mL de solvente), porém não foi possível a obtenção de fios (Figura 12.A) devido à baixa massa molar ($20.000 \text{ g mol}^{-1}$) (MACHADO, 2015) do polímero. Isto leva à uma baixa viscosidade da solução polimérica a ser eletrofiada impedindo a formação do cone de Taylor e assim, da fibra.

A caracterização morfológica das amostras, por microscopia eletrônica de varredura (MEV), possibilitou a observação de aspectos como: a formação de fios, a variação nos diâmetros dos fios e defeitos nas estruturas dos suportes.

A partir dos resultados apresentados na Figura 13 foi possível avaliar, qual concentração polimérica e relação entre solventes são mais adequadas para a formação dos fios. Verificou-se que para a elaboração dos fios é necessária uma concentração mínima para que se consiga formar o jato (NIEHUES, 2015). Na Figura 13.A é apresentado um ensaio somente com o polímero PDGU em 18 mg/mL de solvente 9:1 (clorofórmio:etanol) sendo a massa molar do polímero de 20000 g mol^{-1} , onde se observa, que não há presença de fios, em virtude da baixa massa molar e de sua baixa viscosidade em solução. Nos demais ensaios utiliza-se um percentual de PCL, onde, neste estudo, se busca utilizar um percentual mínimo possível para a confecção de fios livres de contas.

Para as amostras apresentadas na Figura 13.A, 13.B, 13.C, 13.E, 13.G, 13.I, 13.J e 13.L foram utilizados PCL com massa molar 80000 g mol^{-1} e/ou PDGU 20000 g mol^{-1} para o solvente clorofórmio:etanol na proporção 9:1 (v:v), e para as Figura 13.D, 13.F, 13.H e 13.K para o solvente clorofórmio:etanol na proporção 8:2 (v:v) visando a formação de uma blenda polimérica via processo de eletrofiação.

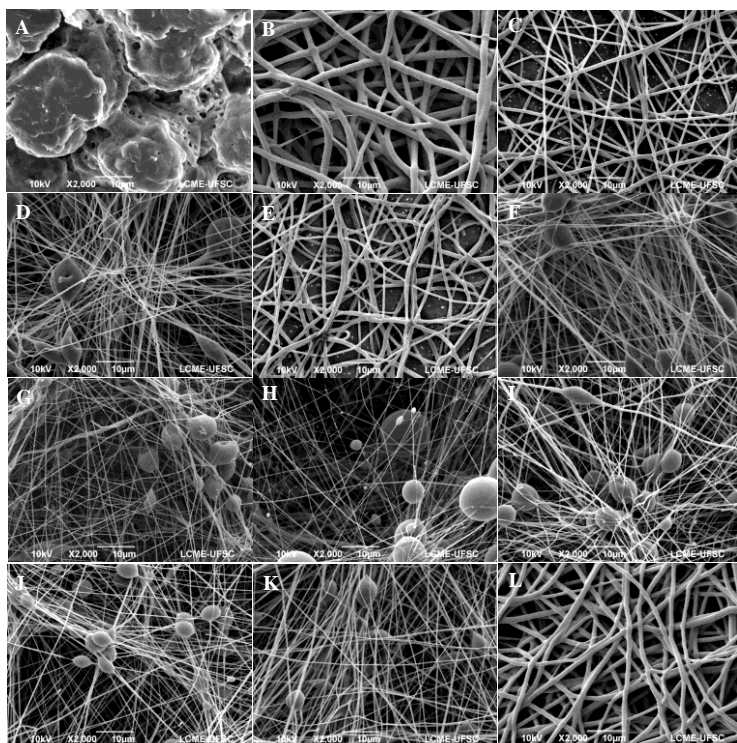
Para a (Fig. 13.B), o PCL 16 mg/mL de solvente, o qual possibilitou a formação de fios devido à maior viscosidade da solução em relação ao PDGU (Fig. 13.A). Buscando reduzir o percentual de PCL na formação dos fios, foi realizada uma blenda com o PDGU, buscando-se estabelecer a menor concentração possível de PCL que ainda leva à formação de fios.

Em relação a (Fig. 13.C), é apresentada a amostra na proporção 6:10 (m:m) da blenda PCL-PDGU com uma solução de clorofórmio:etanol 9:1 (v:v). Observou-se que esta concentração proporcionou a obtenção de fios homogêneos, com ausência de imperfeições ao longo de sua estrutura.

Através das imagens vista da Figura 13, observou-se que a formação de fios é propiciada pela adição do PCL, em virtude das propriedades físicas da solução, tais como viscosidade e tensão superficial também observadas por Perrea (2011). A variação na concentração de PCL gerou morfologias irregulares, em que o aumento da concentração de PCL tende a formação de fios com diâmetros maiores e a redução do percentual de PCL promove a redução no diâmetro e a presença de contas.

Foi observada que a variação para um volume maior no teor de álcool etílico associada a variação da concentração de PCL, apresentou uma tendência a redução do diâmetro do fio e o aparecimento de gotas ao longo da estrutura. Os efeitos associados aos menores percentuais de PCL e volume de álcool etílico promovem uma redução na viscosidade da solução, e com isso o jateamento da solução promove uma maior formação de contas.

Figura 13. Imagens de microscopia eletrônica de varredura de fios eletrofiados a partir de soluções poliméricas de PDGU, PCL e blenda PDL:PDGU em diferentes proporções de mássicas (mg:m) e em diferentes proporções de solventes clorofórmio:etanol (v:v): A) PDGU 0:18 9:1; B) PCL 0:16 9:1; C) PCL-PDGU 6:10 9:1 D) PCL-PDGU 8:2 E) PCL-PDGU 10:6 9:1 F) PCL-PDGU 10:6 8:2 G) PCL-PDGU 4:12 9:1 H) PCL-PDGU 4:12 8:2 I) PCL-PDGU 5:15 9:1 J) PCL-PDGU 5:11 9:1 K) PCL-PDGU 5:11 8:2 e L) PCL-PDGU 8:8 9:1.

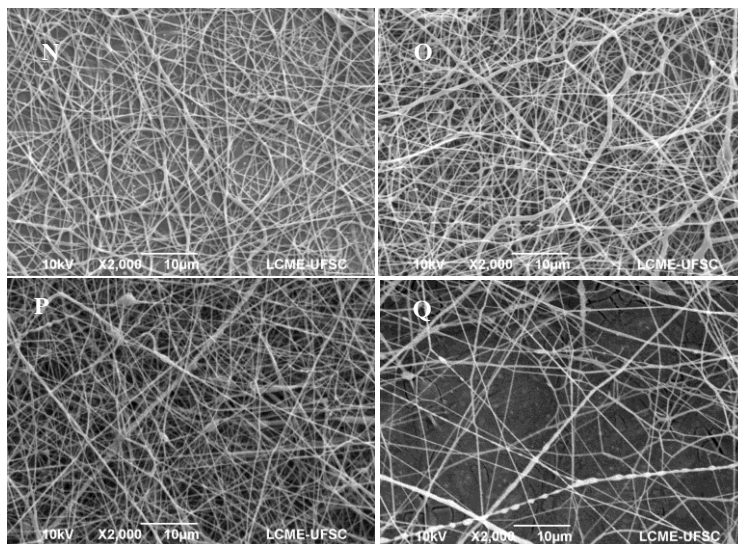


4.2.1 Avaliação do efeito da funcionalização com NAC e Cys

Após a determinação da quantidade mínima de PCL para obtenção de suporte como presença minimizada de contas, buscou-se aumentar a hidrofiliabilidade das membranas por duas rotas distintas: 1) Adição de n-acetilcisteína ou cisteína à solução polimérica antes da eletrofiiação (mistura física); 2) Copolimerização do DGU com NAC e Cys para a funcionalização do PDGU. Com este aumento da hidrofiliabilidade do suporte, visou-se aumentar a adesão e crescimento celular nos suportes poliméricos. As proporções utilizadas são descritas na Tabela 5. A partir da Figura 14 é possível verificar que a funcionalização com NAC e Cys não comprometeu a formação da fibra, podendo ser visualizada na Figura 13.C, que não ocorreu a formação de contas durante a extensão dos fios. Utilizaram-se os processos de mistura física PCL-PDGUNAC e PCL-PDGUCys e funcionalização PCL-PDGU_{co}NAC e PCL-PDGU_{co}Cys para modificar a hidrofiliabilidade dos suportes, a concentração de PCL foi fixada em 6% como limite mínimo.

A integridade e a homogeneidade das fibras são mantidas em todas as amostras apresentadas na Figura 14. A mistura física e a funcionalização não comprometeram a obtenção de fibras, apenas modificaram suas dimensões durante a formação do suporte. Portanto, a inserção de NAC e Cys, via processo de inserção no meio reacional, visa a energia de superfície e o ângulo de contato, que serão discutidos nas próximas sessões.

Figura 14. Imagens de microscopia eletrônica de varredura das amostras de suporte com mistura física de NAC e Cys e amostras de copolímero funcionalizado com NAC e Cys. N) PCL-PDGUNAC, O) PCL-PDGUCys, P) PCL-PDGUcoNAC e Q) PCL-PDGUcoCys.



4.3 AVALIAÇÃO DO DIÂMETRO DAS FIBRAS DOS SUPORTES

A caracterização dos diâmetros dos fios é de suma importância para a aplicação final do suporte dado que, o diâmetro influencia significativamente na interação da superfície do biomaterial (LI et al., 2014; NIEHUES, 2015). Na Tabela 7 são apresentados os diâmetros médios que foram medidos e determinados a partir das imagens de MEV dos suportes conforme descritos no item 3.2.5.1.

Tabela 7. Diâmetro médio dos fios obtidos nos suportes.

Suporte	Proporção CL:PDGU: NAC ou Cys (m:m:m)	Diâmetro Médio (nm)	Desvio Padrão (nm)
PCL	16	733	256
PCL-PDGU	6:10	600	97
PCL-PDGUNAC	6:9,5:0,5	273	85
PCL-PDGUCys	6:9,5:0,5	287	102
PCL-PDGUcoNAC	6:10	124	56
PCL-PDGUcoCys	6:10	233	73

As imagens mostradas nas Figuras 13 e 14 exibem a disposição dos fios eletrofiados, e a variação do diâmetro em função da funcionalização realizada. O diâmetro médio dos fios eletrofiados é reduzido quando se usa as blendas contendo NAC e Cys: PCL-PDGUNAC, PCL-PDGUCys, PCL-PDGUcoNAC e PCL-PDGUcoCYS. As Figuras 13.B e 13.C referem-se à eletrofição do PCL puro e blenda PCL-PDGU, respectivamente, cujos diâmetros médios foram 733 ± 256 nm e 600 ± 97 nm. As blendas das espécies funcionalizadas (Figuras 14.C, 14.D, 14.E e 14.F) não comprometem a obtenção de fios, e a sua inserção no meio reacional propicia a obtenção de membranas homogêneas e com diâmetro reduzido. Os menores diâmetros foram obtidos para os copolímeros, sendo que o menor referente ao PCL-PDGUcoNAC (124 nm).

4.4 PROPRIEDADES TÉRMICAS

Os resultados da análise de DSC são apresentados na Tabela 8. Foi avaliada a temperatura de fusão cristalina (T_{mf}) e dos polímeros utilizados na produção do suporte.

Tabela 8. Propriedades térmicas dos polímeros do suporte temperaturas de fusão T_{mf} e entalpia de fusão ΔH_m .

Material	T_m Pico A	T_{mf} Pico B	ΔH_m Pico A (J/g)	ΔH_m Pico B (J/g)
PCL-Escama	57		96	
PDGU-Puro*		66		
PCL-Fibra	54		49	
PCL-PDGU	54	66	24	28
PCL-PDGUNAC	52	66	25	21
PCL-PDGUCYS	53	**	38	**
PCL-PDGUcoNAC	53		35	
PCL-PDGUcoCys	54		26	

*(MACHADO, 2015).

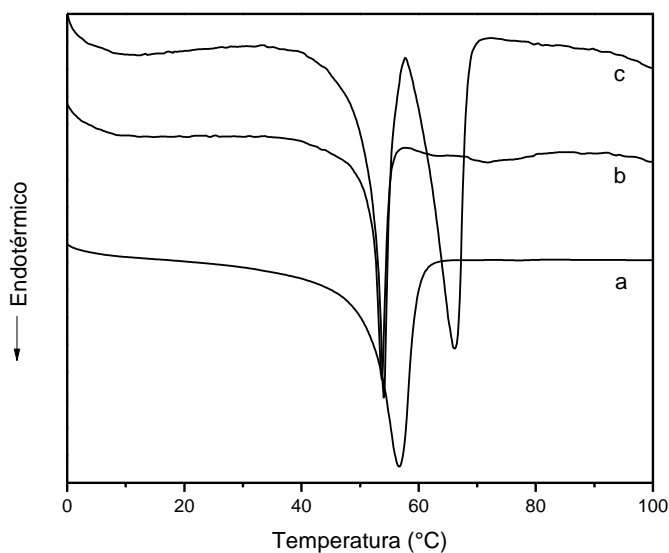
** Valor não quantificado devido à baixa intensidade.

Para o ensaio envolvendo os polímeros puros PCL escama, PCL eletrofiado e a blenda PCL-PDGU, os resultados são apresentados na Figura 15. Os dados correspondentes ao PCL em escama e eletrofiado apresentam um único pico endotérmico intenso entre 57 e 54°C, como

pode ser visto na Figura 15a e Figura 15b, apresentando uma leve redução de sinal referente a forma eletrofiada em relação à escama. Esta redução é proveniente da quebra de algumas cadeias poliméricas, o que proporciona uma redução no M_w e, portanto, a variação da T_m .

O PCL eletrofiado apresentou uma redução na T_m em relação ao PCL escama, efeito promovido pela quebra das cadeias poliméricas, o que afeta na polidispersão dos cristais. Em estudos com blendas de PCL características semelhante foi observada por (LEBOURG et. al., 2008). No suporte de PCL-PDGU, é mostrado na Figura 15c picos em 54°C para o PCL e em 66°C para o PDGU, os quais são condizentes com os valores dos polímeros puros. A presença desses dois picos evidencia a cristalinidade dos dois polímeros no suporte PCL-PDGU.

Figura 15. Curvas de DSC para as amostras de a) PCL escama, b) PCL eletrofiado e c) PCL-DGU.

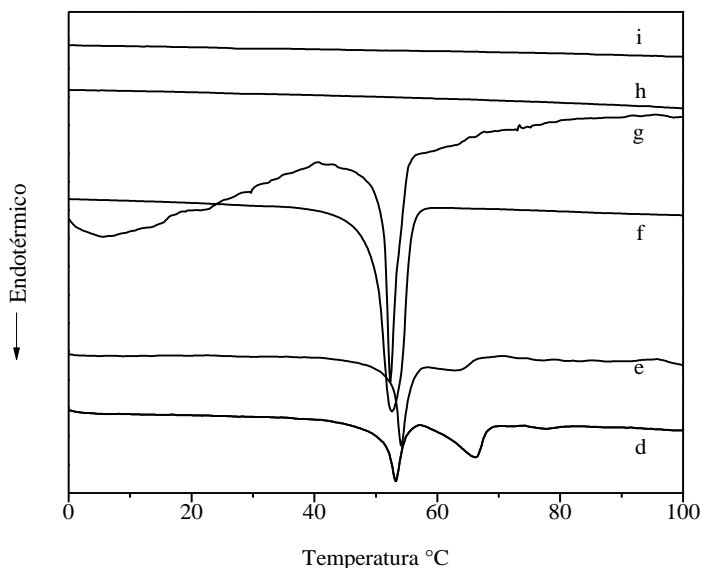


As curvas de DSC do suporte eletrofiado na presença de NAC e Cys, de PCL-PDGUNAC ou PCL-PDGUCys, podem ser visualizadas na Figura 16. O pico referente à fusão do PCL aparece em 53°C e 54°C, com um leve decaimento para a amostra com NAC em relação a Cys. Pode-se, como hipótese, que o NAC e a Cys ao serem eletrofiados na blenda com PCL e PDGU, primeiramente reduzam o M_w . Também estes podem promover um maior espaçamento entre as cadeias alifáticas do

PCL e PDGU com os grupamentos carboxílicos e amina, diminuindo assim o empacotamento e, conseqüentemente, a redução do grau de cristalinidade (PICQUART et al., 1998).

Para os suportes constituídos do copolímero PCL-PDGUcoNAC e PCL-PDGUcoCys, também representados na Figura 16f e Figura 16g, o pico referente a fusão do PCL ocorre em 52°C, evidenciando a cristalinidade do PCL na blenda. Entretanto, o segundo pico, Figura 16h e Figura 16i referente ao PDGU não é visualizado nos copolímeros PDGUcoNAC e PDGUcoCys, mostrando que a funcionalização torna este biomaterial amorfo. Esta característica pode aumentar a viabilidade de aplicação do biomaterial como matriz extracelular em virtude de possibilitar uma maior biodegradabilidade.

Figura 16. Curvas de DSC para as amostras de d) PCL-DGUNAC, e) PCL-PDGUCys, f) PCL-PDGUcoNAC, g) PCL-PDGUcoCys, h) PDGUcoNAC e i) PDGUco Cys.



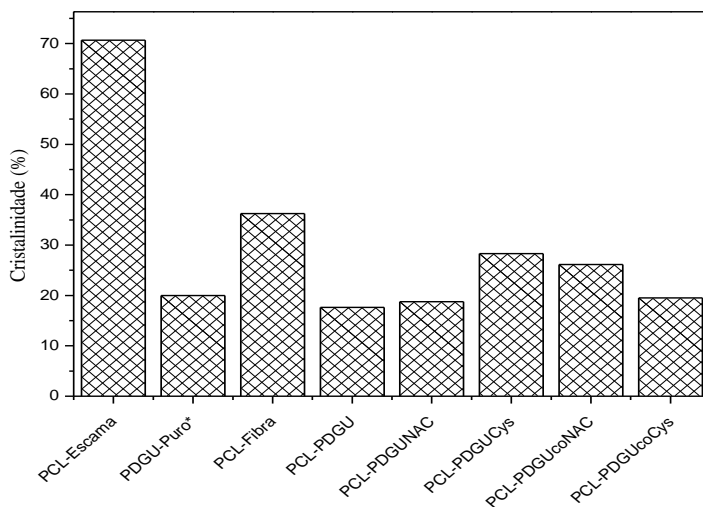
Nas amostras de PCL-PDGUNAC e PCL-PDGUCys, com a mistura física de NAC e Cys, ainda podem ser observados picos referentes a fusão dos dois polímeros, embora na presença de Cys o segundo pico referente ao PDGU tenha se tornado bem menor. O efeito mais pronunciado da cristalinidade é observado para as amostras de polímeros via mistura física do copolímero funcionalizado. Nas quais, a

diminuição e/ou ausência do pico do PDGU, em 66°C, mostra a sua interação com n-acetilcisteína e cisteína.

O modo de interação do PDGU com a NAC e a Cys é diferente para cada situação. Para a mistura física têm-se uma interação eletrostática e para o DGU funcionalizado via reação tiol-eno, tem-se uma ligação covalente. A hipótese provável é de que no momento do preparo da solução da blenda para eletrofição, nem todas as espécies estão ligadas ao polímero, o que altera a estrutura de empacotamento durante a eletrofição, assim a presença de espécies livres na superfície propicia a interação com moléculas de água de degradação. Para o copolímero funcionalizado, a formação da ligação covalente possibilita maior estabilidade uma vez que todas espécies estão ligadas ao polímero. Com isso a formação de fios durante a eletrofição, e a estrutura do suporte é mais regular, o que infere diretamente nas propriedades, tais como ângulo de contato, bioatividade, biodegradabilidade (VERT et al., 1992).

Segundo Crescenzi e colaboradores, (1972) a energia estimada para fundir o PCL cem por cento cristalino é 135,4 J/g. Com auxílio da Equação 1 e os dados ΔH_m dos biomateriais expostos na Tabela 8, foi elaborado o gráfico do grau de cristalinidade para os suportes os resultados podem ser vistos na Figura 17.

Figura 17. Comparativo entre o Grau de cristalinidade para o PCL nos suportes e o PCL em escama.



*(MACHADO, 2015)

A cristalinidade é mais acentuada quando o polímero se encontra na forma comercial, em escama. Após a utilização do processo de eletrofiação o PCL tem sua cristalinidade reduzida, em virtude do novo empacotamento molecular. A constituição da blenda entre o PCL-PDGU reduz ainda mais a cristalinidade para o pico de PCL, mostrando que a cristalinidade continua a diminuir.

4.5 AVALIAÇÃO DA HIDROFILICIDADE DOS SUPORTES E FILMES

Para a realização do ensaio de hidrofiliçidade as amostras foram preparadas de acordo com as condições descritas na Tabela 6 e tiveram como base a melhor formação de fibra, observada na Figura 13.C.

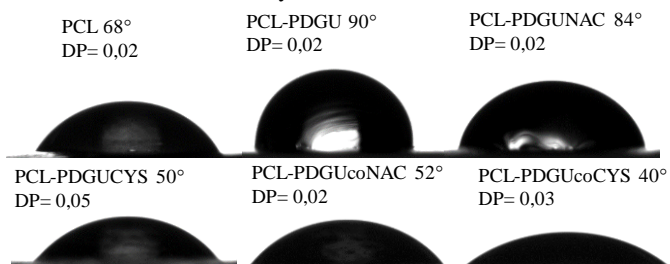
4.5.1 Avaliação da hidrofiliçidade em filmes poliméricos

O ângulo de contato possibilita realizar o estudo da energia da superfície, e, consequentemente a hidrofiliçidade e a molhabilidade do suporte. Estas propriedades refletem diretamente nas possíveis aplicações do biomaterial. Para este ensaio foram empregadas amostras de filmes poliméricos, descritas na Tabela 6, os resultados podem ser observados na Figura 18.

Para as espécies estudadas tem-se uma mudança no ângulo frente ao PCL. A adição do PDGU ao suporte de PCL-PDGU propicia um caráter mais hidrofóbico ao biomaterial, o maior ângulo de contato como observado na Figura 18 para o PCL puro 68° . Após adição do PDGU o ângulo obtido foi de 90° .

Para os polímeros em que se tem a mistura física de NAC e Cys na superfície, a blenda PCL-PDGU, tem a predominância de grupamentos NH_2^+ , NH_3^+ , COO^- , CO , CH_2 na superfície, uma vez que se forma a interação C-S. Foi observado que para o PCL-PDGUNAC o ângulo de contato é menor do que o observado para o PCL-PDG, devido a sua melhor interação com o solvente. Para ângulos de contato menores do que 90° , o sólido é molhado pelo líquido, caracterizado como hidrofílico, acima de 90° a predominância de caráter hidrofóbico (PRAJITNO; MAULANA; SYARIF, 2016). Assim, as espécies CH_2 presentes na superfície do material resultam neste valor do ângulo de contato alto.

Figura 18. Ângulo de contato para os filmes: PCL, PCL-PDGU, PCL-PDGUNAC, PCL-PDGUCys, PCL-PDGUcoNAC e PCL-PDGUcoCys.



A modificação da superfície pode ser modelada de forma a permitir um controle da adesão celular na superfície do biomaterial (KESELOWSKY; COLLARD; GARCÍA, 2003). Para as amostras funcionalizadas via reação tiol-eno, a predominância de grupamento NH_2 , CO e CH_2 para a NAC e NH e COOH para a Cys, levaram a uma diminuição efetiva em relação ao PCL, e a hidrofobicidade e a molhabilidade foram significativamente reduzidas para estes materiais.

A incorporação da Cys em ambas as situações resultou na maior redução de ângulo de contato em relação ao NAC. Chama atenção a copolimerização do PDGU com Cys, o qual reduz consideravelmente o ângulo de contato com a água, tornando a superfície mais hidrofílica. Efeito similar foi observado com a incorporação de gelatina ao PCL (REN et al., 2017).

4.5.2 Avaliação da hidrofobicidade em suporte sem esterilização

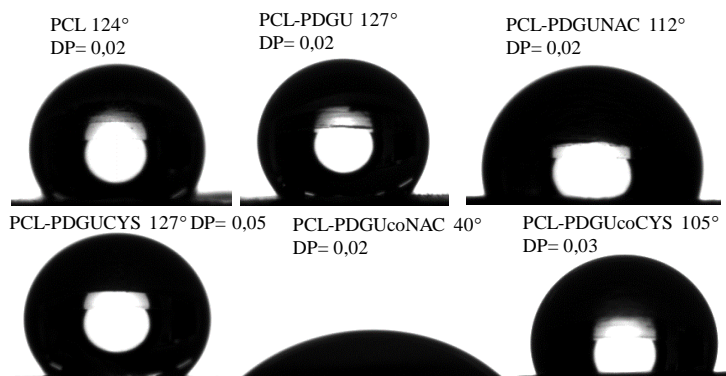
Os resultados de ângulo de contato dos suportes eletrofiados estão dispostos na Figura 19, onde é observada a formação da gota na superfície do suporte.

No processo de eletrofição, as características de processo influenciam o diâmetro de fio obtido, os quais refletem diretamente na compactação do material, que por sua vez, interfere na obstrução da água ou nutrientes quando em diâmetros demasiado pequenos (SALEM et al., 2002). Assim, a molhabilidade da superfície do biomaterial é reduzida. Logo tem-se um aumento do ângulo de contato em relação ao filme. Para a maioria dos casos avaliados tem-se um aumento do ângulo de contato, efeito não observado para a mistura física de PCL-PDGUcoNAC, onde a estabilização da NAC via ligação tiol-eno e a presença do radical acetil, em ligação peptídica com a NAC de grupos

amino e carbóximo viabiliza a interação com moléculas de água, reduzindo o ângulo de contato neste suporte.

Para os ângulos de contatos superiores a 90°, a característica obtida nestes materiais é de moderadamente hidrofóbicas, efeito predominante para as espécies da mistura física (REN et al., 2017). No copolímero de PCL-PDGUcoCys, o qual também apresentou uma redução no ângulo de contato após a modificação química em relação ao PCL, embora menos acentuada em relação ao PCL-PDGUcoNAC. No PCL-PDGUcoNAC o caráter hidrofílico é predominante da superfície, viabilizando a sua interação com as células (LI et al., 2013).

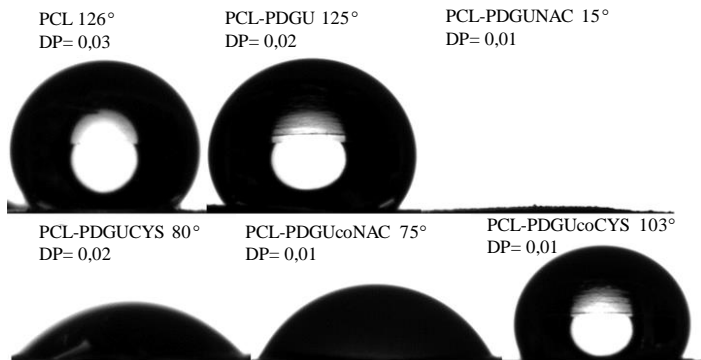
Figura 19. Ângulo de contato para os suportes eletrofiados: PCL, PCL-PDGU, PCL-PDGUNAC, PCL-PDGUCys, PCL-PDGUcoNAC e PCL-PDGUcoCys sem esterilização.



4.5.3 Avaliação da hidrofiliicidade em suportes com esterilização

Foi avaliado se o processo de esterilização dos suportes para aplicação em ensaio biológico, afeta o ângulo de contato com a água. O resultado está disposto na Figura 20 onde são observados os ângulos formados na superfície dos suportes. Não pode ser observado uma tendência clara do efeito da esterilização sobre o ângulo de contato.

Figura 20. Ângulo de contato para os suportes: PCL, PCL-PDGU, PCL-PDGUNAC, PCL-PDGUCys, PCL-PDGUcoNAC e PCL-PDGUcoCys com esterilização.



4.6 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA BIOATIVIDADE DO SUPORTE ELETROFIADO

Para avaliação *in vitro* da bioatividade foram utilizadas a análise de FT-IR e imagens MEV. Os ensaios dos suportes descritos na Tabela 6 foram realizados conforme descrito no item 3.2.8. Os espectros de FT-IR na faixa de $4000-500\text{ cm}^{-1}$ e as imagens de MEV antes e após o ensaio de bioatividade *in vitro* podem ser vistos nas Figuras 21 e 22.

No espectro para o suporte PCL^{Antes}, observa-se a banda de vibração referente a deformação axial da carbonila do éster (C=O) em 1730 cm^{-1} , e a banda característica ao estiramento das ligações (C-O-C) em 1208 cm^{-1} (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 2006). A redução da intensidade destas bandas no espectro PCL^{Após}, pode ter ocorrido em virtude da clivagem das ligações éster, decorrente da hidrólise (PACHENCE, J.M; BOHRER, M. P.; KOHN, 2007). Enquanto que a banda em 1654 cm^{-1} pode ser atribuída ao ânion carboxilato, que foi desprotonado após a hidrólise das ligações éster (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 2006).

Como decorrência desta hidrólise, observou-se um aumento da intensidade da banda correspondente ao grupo hidroxila (OH) em 3461 cm^{-1} . As moléculas de água atacam a ligação éster, formando ácido carboxílico como subproduto, levando ao rompimento dos fios, este fenômeno pode ser observado nas imagens MEV (Figura 22) das espécies antes a após o ensaio de bioatividade (BÖLGEN et al., 2005).

A formação de grupamentos carboxílicos solúveis em água, é observada na redução do pH do meio (LI; MCCARTHY, 1999; YAO et al., 2017).

Adicionalmente, também foi observado o pico em 1654 cm^{-1} resultante do ânion carboxilato. A hidrólise das ligações éster foi confirmada através do surgimento da banda em 3447 cm^{-1} , a qual possui sua intensidade aumentada, evidenciando um aumento do número de hidroxilas no biomaterial (SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, 2006). Estas hidroxilas surgem a partir da formação de ácido carboxílico no biomaterial, e são o resultado da hidrólise das ligações éster.

Para a blenda PCL-PDGU, após o ensaio, houve uma redução na intensidade das bandas 1730 cm^{-1} do espectro, isso pode ter ocorrido em virtude da clivagem das ligações éster, decorrente da hidrólise, fenômeno observado na Figura 22.

(PACHENCE, J.M; BOHRER, M. P.; KOHN, 2007). Enquanto que o pico em 1654 cm^{-1} pode ser atribuído ao ânion carboxilato, que foi desprotonado após a hidrólise das ligações éster (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 2006). Adicionalmente, como decorrência desta hidrólise, observou-se um aumento da intensidade da banda correspondente ao grupo hidroxila (OH). A hidrólise das ligações éster, o qual o subproduto gerado seja o ácido carboxílico, tornando as cadeias de polímero mais curta, este fenômeno pode ser observado na microscopia das espécies antes a após o ensaio Figura 7 (BÖLGEN et al., 2005).

Em relação as espécies funcionalizadas via mistura física de NAC e CYS (PCL-PDGUNAC e PCL-PDGUCYS, respectivamente), observa-se que o perfil de degradação é semelhante as espécies anteriores (PCL e PCL-PDGU) diferindo em relação ao surgimento do pico característico da ligação C-S em 734 cm^{-1} , bem como o pico referente a amida (1536 cm^{-1}) para a NAC e 1633 cm^{-1} amina para a CYS. A interação intermolecular reduz a intensidade do pico OH em 3454 cm^{-1} para o PCL-PDGUNAC o que não foi observado para o PCL-PDGUCYS.

Em relação aos suportes funcionalizados via reação tiol-eno mostraram picos deslocados para região de menor comprimento de onda (C-S 727 cm^{-1}), decorrente da reação tioleno. O discreto ombro detectado para o PCL-PDGuCoCys em 1661 cm^{-1} do grupo amina NH_2^+ , uma vez que a molécula está ligada covalentemente, o pico referente ao estiramento (N-H) $-\text{NH}_3^+$ da amina está encoberto com o pico do ânion carboxilato COO^- . A banda intensa detectada em 3343 cm^{-1} decorrente do aumento da intensidade, referente ao grupo OH do ácido carboxílico,

produto de degradação decorrente da hidrólise nas ligações éster. Para o PCL-PDGUcoNAC observou-se um aumento na intensidade do pico correspondente ao grupo N-H em 3363 cm^{-1} e do pico correspondente ao OH em 3503 cm^{-1} em decorrência da ligação do hidrogênio. Portanto, a adição na mistura física de NAC e CYS na solução empregada para a eletrofição favorece a formação de espécies COO^- , NH_2^+ , COO^- e NH_3^+ as quais viabilizam a degradação dos suportes utilizados nos ensaios de bioatividade *in vitro* (Figura 22). Perfil semelhante é observado na copolimerização do PDGU com PDGUcoNAC e PDGUcoCYS, onde é possível verificar o aumento na degradação dos suportes, evidenciados com aumento de intensidade do grupo hidroxila O-H. Picquart e colaboradores, (1998) verificaram o surgimento destas espécies durante o processo de degradação. Adicionalmente, a presença destas cargas de superfície podem atuar como sítios de possíveis interações com outras moléculas, estes possíveis sítios são indicados pelas setas na Figura 22, a exemplo do biomaterial PCL/PLA com a incorporação de hidroxiapatita na superfície conforme evidenciado no trabalho de Yao et. al., (2017) (COX, 2014; SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, 2006).

Figura 21. Espectrometria de Infravermelho (FT-IR) do Ensaio de bioatividade *in vitro*. A) PCL; B) PCL-PDGU; C) PCL-PDGUNAC; D) PCL-PDGUcoCYS; E) PCL-PDGUcoNAC e F) PCL-PDGUcoCys.

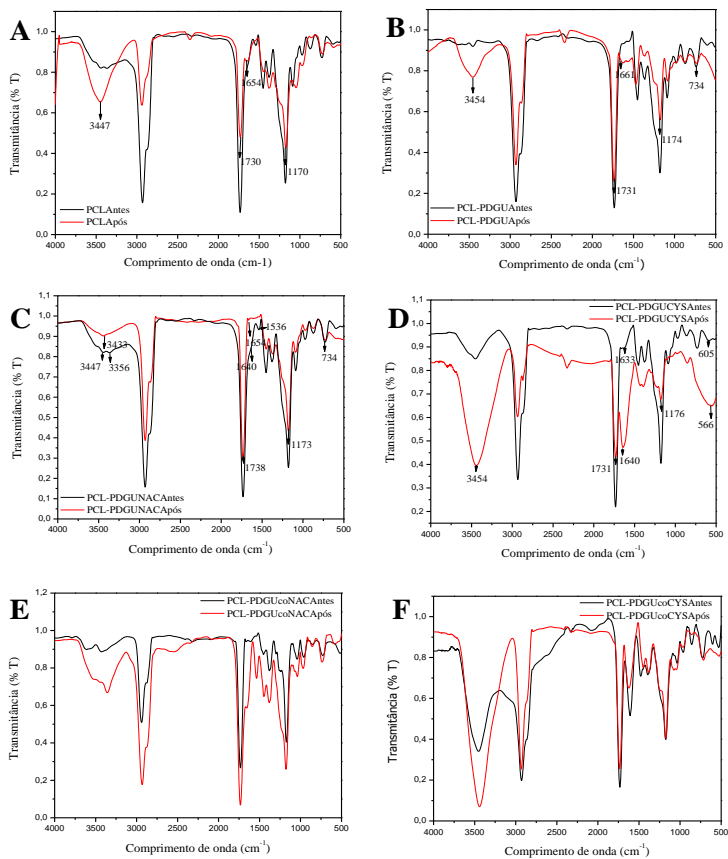
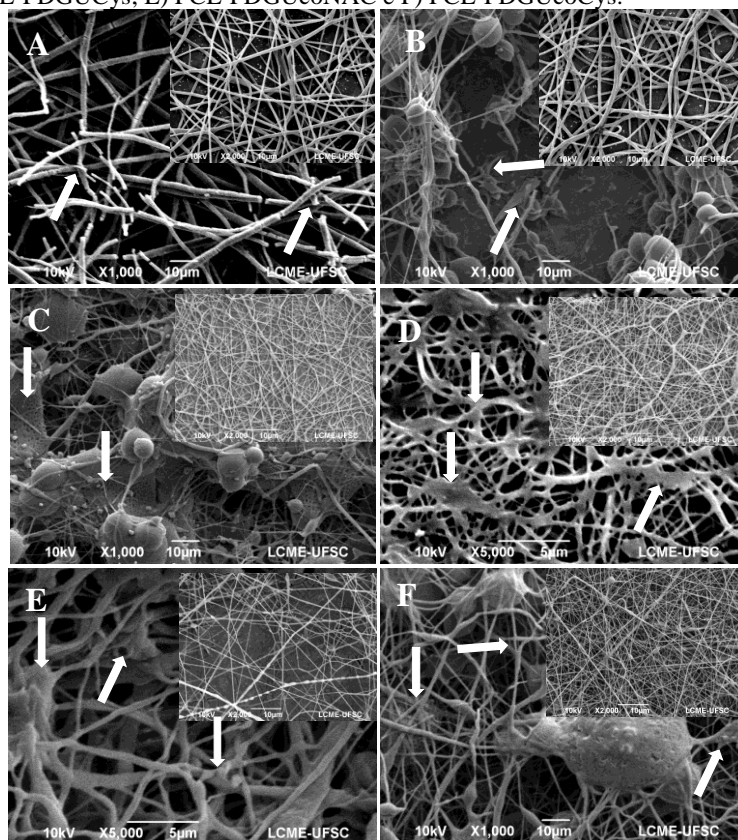


Figura 22. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do Ensaio de bioatividade *in vitro*. A) PCL; B) PCL-PDGU; C) PCL-PDGUNAC; D) PCL-PDGU_{Cys}; E) PCL-PDGU_{coNAC} e F) PCL-PDGU_{coCys}.



4.6.1 Avaliação da biodegradabilidade para os suportes eletrofiados

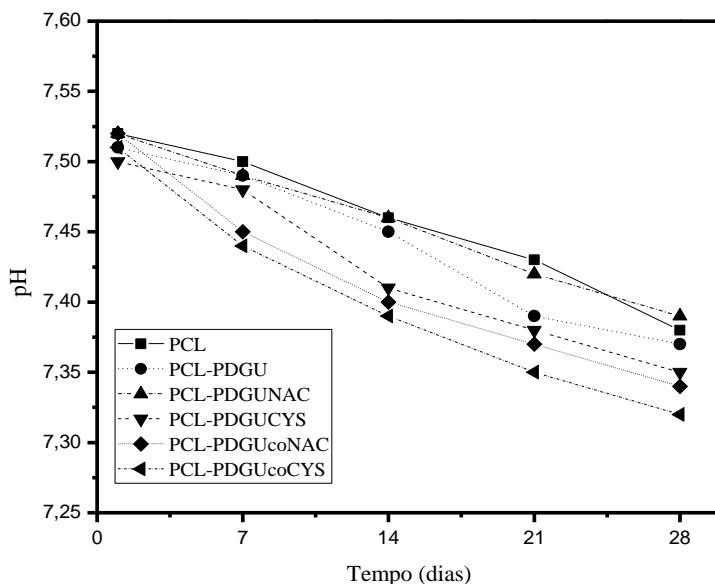
O ensaio de biodegradabilidade foi realizado no período de 28 dias em tampão PBS pH 7,5. As leituras de pH foram realizadas no período de 1, 7, 14, 21 e 28 dias. Os resultados estão representados na Figura 23.

As variações de pH observadas durante o período de imersão são pequenas, mas todas as amostras apresentaram ligeira redução do pH durante o ensaio. Para os suportes com a adição de NAC e Cys a redução do pH foi ligeiramente mais acentuada do que para o PCL e PCL-PDGU. A redução da cristalinidade dos copolímeros

PDGUcoNAC e PDGUcoCys em relação ao PDGU Figura 16, propicia uma maior interação dos fios com a água ao decorrer do tempo. A redução da cristalinidade aumenta a superfície de contato do suporte, o que permite uma maior interação do suporte com a água, após a imersão em PBS, aumentando a hidrólise dos ésteres (LI; MCCARTHY, 1999). Assim, para os suportes de PCL-PDGUNAC e PCL-PDGUCys, o processo de degradação propicia a formação de íons COO^- e NH_3^+ , facilitando a formação de sítios de interação do tipo suporte-célula (PICQUART et al., 1998; YAO et al., 2017). De modo análogo, a degradação nos suportes de PCL-PDGUcoNAC e PCL-PDGUcoCys, a inserção do NAC e Cys também propicia uma maior redução da energia de superfície e viabiliza a degradação destes.

A copolimerização do polímero com NAC e Cys possibilitou uma maior degradabilidade do suporte em relação aos suportes obtidos pela adição de NAC e Cys na mistura física.

Figura 23. Ensaio de biodegradabilidade dos suportes durante 28 dias.



4.6.2 Avaliação da perda de massa durante o ensaio de bioatividade

O resultado relativo a perda de massa acumulada durante o ensaio de bioatividade pode ser observada na Tabela 9. O percentual de degradação acumulada foi determinado com auxílio da Equação 2.

Tabela 9. Perda de massa durante ensaio de bioatividade.

Amostra	(%) Perda de massa acumulada
PCL	8
PCL-PDGU	5
PCL-PDGUNAC	28
PCL-PDGUCYS	37
PCL-PDGUcoNAC	49
PCL-PDGUcoCys	54

As amostras de PCL e PCL-PDGU apresentaram perda de massa próximas. O baixo percentual de degradação, é atribuído à predominância do caráter hidrofóbico (Figura 20) e elevada cristalinidade (Figura 16). Por outro lado, as amostras com NAC e Cys apresentaram valores de perda de massa bem mais acentuados, principalmente nas amostras funcionalizadas por reação tiol-eno.

A presença de NAC e Cys auxilia na redução da energia de superfície (Figura 20) e da cristalinidade dos materiais (Figura 16) aumentando a degradação dos suportes.

A redução na energia de superfície propiciou a maior estabilidade e maior degradação acumulada nos suportes, viabilizando potenciais aplicações como matriz extracelular.

4.7 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE CELULAR

O método de análise de viabilidade celular foi aplicado em concordância com a norma ISO 10993-5: 2009 (ISO, 2009). Nestes ensaios foram avaliadas as blendas e os polímeros apresentados na Figura 24 em relação ao caráter citotóxico dos materiais presentes na estrutura dos suportes.

A linhagem celular McCoy foi escolhida por se tratar de fibroblastos normais não transformado, um tipo celular muito importante para a regeneração de tecidos. Optou-se por dois períodos de cultivo (24 h e 72 h) para avaliar os efeitos sobre os fibroblastos de camundongos semeados sobre os suportes Tabela 6 . Este intervalo

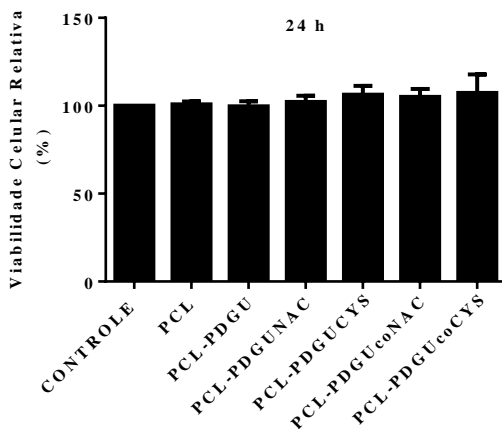
tornou possível observar a proliferação dos fibroblastos sobre a superfície dos suportes (YAO et al., 2017).

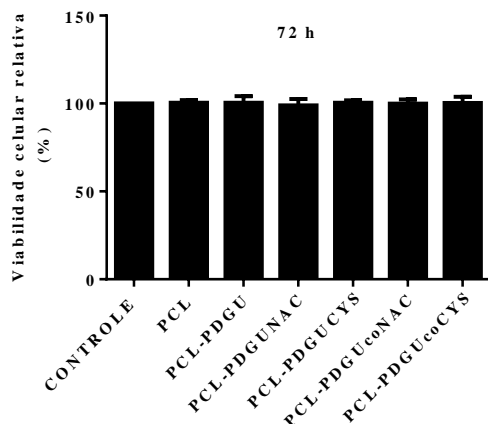
Como o PCL propicia condições adequadas ao crescimento celular (LI et al., 2014; YAO et al., 2017) e devido ao fato dos fibroblastos apresentarem boa adesão na superfície de substratos baseados em PCL (SHARIFI et al., 2016) neste trabalho o PCL foi utilizado como controle positivo para avaliar a viabilidade celular.

Na Figura 24 foram apresentados os resultados da viabilidade celular dos suportes e do grupo controle.

Os resultados para 24 h e 72 h mostraram que todos os suportes avaliados apresentam elevada viabilidade celular, indicativo da ausência de características citotóxicas nos materiais presentes no suporte e da aceitação da superfície pelos fibroblastos da linhagem McCoy.

Figura 24. Análise da viabilidade celular de linhagem McCoy cultivadas por 24 e 72 horas sobre superfície plana da placa multipoços (Controle) e sobre os suportes: PCL; PCL-PDGU; PCL-PDGUNAC; PCL-PDGUCYS; PCL-PDGU_{co}NAC e PCL-PDGU_{co}Cys.





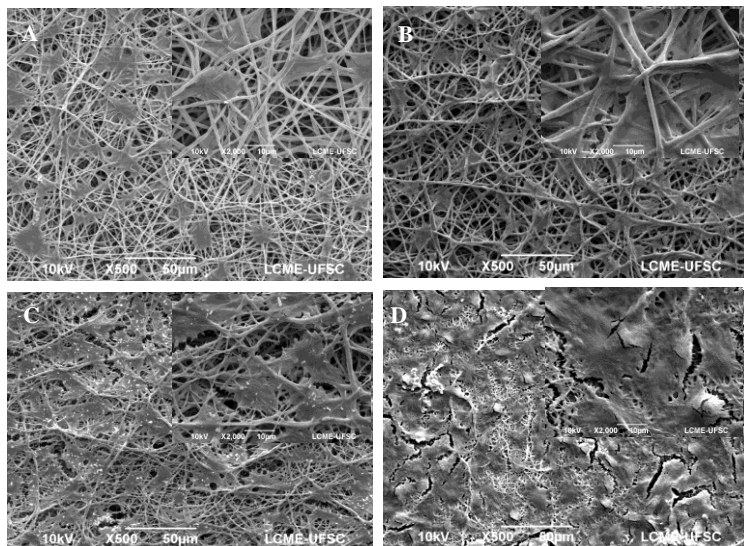
Desta forma, foi possível perceber que a incorporação do PDGU e a funcionalização deste polímero com NAC e Cys não comprometeu a viabilidade celular indicando que a blenda PCL-PDGU representa um promissor biomaterial para emprego na regeneração de tecidos e órgãos.

Portanto, os resultados obtidos para o ensaio de viabilidade celular, apresentados na Figura 24, demonstraram que ambas as técnicas empregadas para a funcionalização dos suportes, são adequadas. Assim, o desenvolvimento destas matrizes tridimensionais com potencial aplicação para o crescimento celular e futuras aplicações na regeneração de tecidos e órgãos.

4.7.1 Adesão celular

Para investigar a adesão celular nos suportes celulares, ainda em caráter preliminar, os fibroblastos de McCoy foram semeados nas superfícies dos suportes por um período de 3 dias. A Figura 25 indicou que para as espécies funcionalizadas com a NAC (Fig. 25.C) e Cys (Fig. 25.D) adicionadas a mistura física apresentam visivelmente uma maior adesão de células na superfície, em relação aos seus respectivos polímeros puros (Fig. 25.A) e (Fig. 25.B).

Figura 25. Adesão de células fibroblastos McCoy na superfície dos suportes: A) PCL; B) PCL-PDGU; C) PCL-PDGUNAC e D) PCL-PDGUCYS.



A partir dos resultados apresentados na Figura 25, se observa que a funcionalização da mistura física propicia a proliferação celular ao longo dos fios, os quais apresentam diâmetro de fios de 273 e 287 nm aproximadamente duas vezes menores em relação aos fios dos polímeros puros (LI et al., 2014). As células se acomodam melhor nestas superfícies, preenchendo quase toda superfície do material. Os ensaios com a espécie funcionalizadas via reação tiol-eno ainda não foram realizados, uma vez que este copolímero foi sintetizado após este ensaio. Mesmo com o ângulo de contato elevado a células aderiram a superfície dos suportes, mostrando a viabilidade com o suporte construído.

A funcionalização da superfície dos suportes via mistura física de NAC e CYS, visa proporcionar a incorporação de cargas superficiais. Estas cargas favorecem a interação do suporte com resíduos de aminoácidos carregados que estão presentes nas proteínas das células, de forma a aumentar as interações e favorecer a adesão das células ao suporte. A incorporação destes resíduos de aminoácidos na superfície do suporte amplia as chances de ocorrerem interações eletrostáticas entre a superfície do suporte e o sítio de ligação célula-matriz da proteína. O fato do aminoácido estar adsorvido na superfície do suporte permite

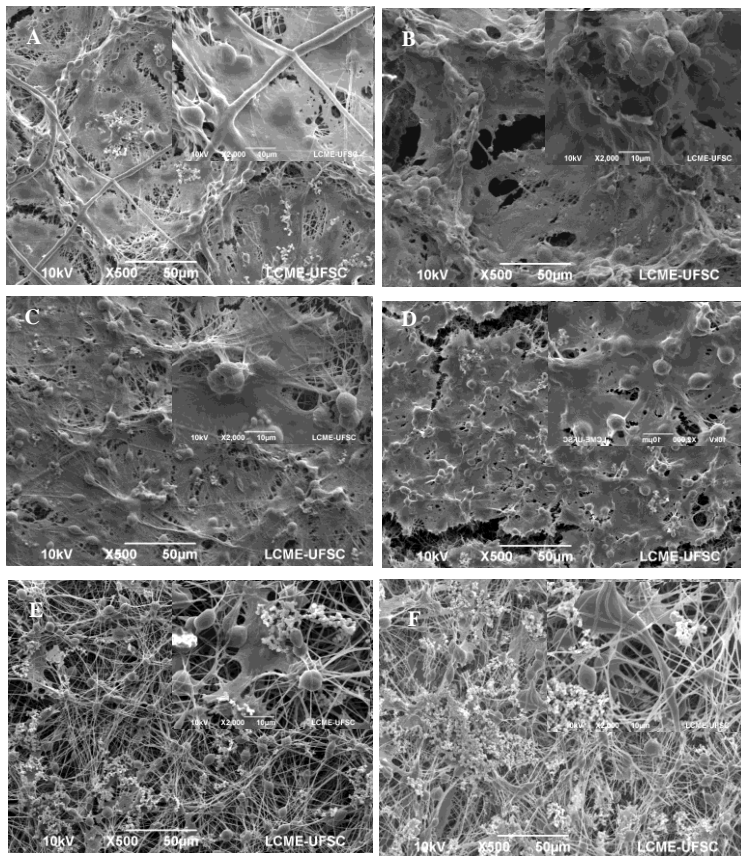
interação do tipo COO^- e NH_2^+ e COO^- e NH_3^+ para o NAC e CYS, bem como a interação com o grupo SH (COX, 2014; PICQUART et al., 1998).

A presença destas espécies com cargas na superfície do suporte constituem sítios de interações com os resíduos de aminoácidos das proteínas fibronectina e integrinas e possibilitam a viabilidade celular do material, sendo a maior observada na PCL-PDGUNAC, onde a ligação peptídica pode ter contribuído para formação de uma região com maior densidade eletrônica e com isso ampliou as possibilidades da interações entre o sítio do suporte com o sítio de ligação da proteína (KRISHNA et al., 2011; LUO; KIICK, 2017; TAKAGI, 2007).

Assim, a hipótese assumida no presente trabalho seria a de que em pH fisiológico os eventos de desprotonação e/ou protonação dos grupos na superfície da proteína estariam aumentando as interações entre os sítios NH_2^+ e COO^- em relação ao NAC e os sítios NH_3^+ e COO^- em relação à Cys (COX, 2014; PICQUART et al., 1998). Além disto, deve-se ter em mente que os números de sítios disponíveis nos suportes diminuem ao longo do tempo de interação em relação aos resíduos de aminoácidos das proteínas fibronectina, integrina e colágeno (KRISHNA et al., 2011; LUO; KIICK, 2017; TAKAGI, 2007). Isto poderia explicar os melhores resultados obtidos após 24 h de exposição

Foi avaliado a superfície em relação da presença de contas, para verificar se estas interferem a adesão da célula na superfície dos suportes. Independentemente da presença de contas a célula aderiu a superfície do material.

Figura 26. Adesão de células fibroblastos McCoy na superfície de suportes: A) PCL-PDGUNAC 6:9,75:0,25 B) PCL-PDGUCys 6:9,75:0,25 C) PCL-PDGUNAC 6:9:1 D) PDL-PDGUCys 6:9:1 E) PCL-PDGU 5:11 e F) PCL-PDGU 4:12.



5. CONCLUSÕES

Os suportes (*scaffold*) foram obtidos a partir da avaliação da concentração mínima de PCL necessária para e a obtenção de fios entre PCL-PDGU para obtenção da viscosidade adequada para a eletrofiação. Na funcionalização da blenda via mistura física e copolimerização do DGU com NAC e Cys foi-se observado uma maior hidrofiliabilidade e consequentemente, uma maior degradabilidade dos suportes. Assim, viabilizou-se o emprego destes suportes como matriz extracelular para aplicações na engenharia de tecidos.

A melhor concentração de polímero para o desenvolvimento do suporte foi de 16 mg/mL. Tendo como condição mínima a proporção de PCL-PDGU 6:10 mg/mL. A funcionalização da blenda entre PCL-PDGU com adição na mistura física e copolimerização do DGU com NAC e Cys melhoraram as propriedades do suporte, reduzindo a cristalinidade, e, principalmente, para o copolímero, apresentando nestes uma maior hidrofiliabilidade nos suportes eletrofiados.

Em relação a citotoxicidade celular, os suportes foram testados em relação ao de PCL utilizado como controle positivo. O emprego do PDGU mostrou-se relevante quanto a obtenção destes suportes, não sendo observada nenhuma citotoxicidade. Desta forma, a funcionalização da blenda via mistura física e a copolimerização do DGU para a construção dos suportes também viabilizou possíveis aplicações para a engenharia de tecidos, também não sendo observada citotoxicidade.

Os suportes foram avaliados em relação a adesão de células de fibroblastos McCoy na superfície dos suportes. Os ensaios preliminares para adesão celular indicaram que as espécies funcionalizadas, via mistura física, permitiram adesão celular na superfície dos suportes. Viabilizando à aplicação destes suportes como matriz de crescimento celular e possíveis aplicações na engenharia de tecido.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Avaliar o uso dos materiais propostos neste trabalho par a obtenção de suportes em novas geometrias não planas;

Avaliar citotoxicidade por NRU

Avaliar a infiltração celular em superfície de suporte com nova geometria;

Avaliar a adesão e proliferação celular em diferentes períodos (1, 3, 5, 7 dias);

Avaliar a bioatividade e biodegradabilidade dos suportes propostos no presente trabalho para diferentes períodos (7, 15, 30, 60 e 120 dias);

Realizar estudo da perda de massa molar e da estrutura molecular para diferentes períodos de tempo via Cromatografia de Permeação de Gel (GPC) ou Espectroscopia de Massa (Maltitof);

Avaliar a osteogênese em cálcio, para verificar se ocorre a interação com a superfície proposta;

Avaliar a absorção de proteínas (colágeno, fibronectina, integrina) para verificar se os sítios de interação na superfície promovem a adesão celular;

7. REFERÊNCIAS

ABDI, A. B. DE D. I.-. De registro e cadastramento de materiais de uso em saúde. . 2011.

AUGUSTINE, R. et al. Dose-dependent effects of gamma irradiation on the materials properties and cell proliferation of electrospun polycaprolactone tissue engineering scaffolds. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 64, n. 10, p. 526–533, 2015.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. **Polímeros**, v. 15, p. 13–21, 2005.

BENTZ, H.; SCHROEDER, J. A; ESTRIDGE, T. D. Improved local delivery of TGF-beta2 by binding to injectable fibrillar collagen via difunctional polyethylene glycol. **Journal of biomedical materials research**, v. 39, n. 4, p. 539–48, 1998.

BHARDWAJ, N.; KUNDU, S. C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 3, p. 325–347, 2010.

BÖLGEN, N. et al. In vitro and in vivo degradation of non-woven materials made of poly(ϵ -caprolactone) nanofibers prepared by electrospinning under different conditions. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 16, n. 12, p. 1537–1555, 2005.

BORDES, C. et al. Determination of poly(ϵ -caprolactone) solubility parameters: Application to solvent substitution in a microencapsulation process. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 383, n. 1–2, p. 236–243, 2010.

BOSS, J. H. et al. The relativity of biocompatibility. A critique of the concept of biocompatibility. **Israel journal of medical sciences**, v. 31, n. 4, p. 203–209, 1995.

BOTCHWEY, E. A. et al. Tissue engineered bone: Measurement of nutrient transport in three-dimensional matrices. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 67A, n. 1, p. 357–367, 2003.

CHAKROFF, J. et al. Development and Characterization of Novel Electrospun Meshes for Hernia Repair. **SOJ Materials Science & Engineering**, v. 3, n. 1, 2015.

CHEN, J. P.; CHANG, G. Y.; CHEN, J. K. Electrospun collagen/chitosan nanofibrous membrane as wound dressing. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 313–314, p. 183–188, 2008.

COX, D. L. N. M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. [s.l: s.n.].

CRESCENZI, V. et al. Thermodynamics of fusion of poly- β -propiolactone and poly- ϵ {lunate}-caprolactone. comparative analysis of the melting of aliphatic polylactone and polyester chains. **European Polymer Journal**, v. 8, n. 3, p. 449–463, 1972.

CULPEPPER, B. K. et al. Tunable delivery of bioactive peptides from hydroxyapatite biomaterials and allograft bone using variable-length polyglutamate domains. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 102, n. 4, p. 1008–1016, 2014.

DAVIS, M. E. et al. Custom design of the cardiac microenvironment with biomaterials. **Circulation Research**, v. 97, n. 1, p. 8–15, 2005.

DAWSON, E. et al. Biomaterials for stem cell differentiation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 2, p. 215–228, 2008.

DEITZEL, J. . et al. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. **Polymer**, v. 42, n. 1, p. 261–272, 2001.

DENG, X.-L. et al. Poly (L-lactic acid)/ hydroxyapatite hybrid nanofibrous scaffolds prepared by electrospinning. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 18, n. 1, p. 117–130, 2007.

DOSHI, J.; RENEKER, D. H. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. **Conference Record of the 1993 IEEE Industry Applications Conference Twenty-Eighth IAS Annual Meeting**, v. 35, p. 151–160, 1993.

DOSHI, J.; RENEKER, D. H.; BAUMGARTEN, P. K. Electrostatic

spinning of acrylic microfibers. **Conference Record of the 1993 IEEE Industry Applications Conference Twenty-Eighth IAS Annual Meeting**, v. 35, n. 1, p. 151–160, 1971.

ENIS, I. Y.; VOJTECH, J.; SADIKOGLU, T. G. Chloroform-Formic Acid Solvent Systems for Nanofibrous Polycaprolactone Webs. **Materials and Metallurgical Engineering**, v. 9, n. 5, p. 429–432, 2015.

FELFEL, R. M. et al. In vitro degradation and mechanical properties of PLA-PCL copolymer unit cell scaffolds generated by two-photon polymerization. **Biomedical Materials (Bristol)**, v. 11, n. 1, 2016.

FERESHTEH, Z. et al. Preparation and characterization of aligned porous PCL/zein scaffolds as drug delivery systems via improved unidirectional freeze-drying method. **Materials Science and Engineering C**, v. 68, p. 613–622, 2016.

FONG, H.; CHUN, I.; RENEKER, D. H. Beaded nanofibers formed during electrospinning. **Polymer**, v. 40, n. 16, p. 4585–4592, 1999.

GABRIEL, L. P. et al. Bio-based polyurethane for tissue engineering applications: How hydroxyapatite nanoparticles influence the structure, thermal and biological behavior of polyurethane composites. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 13, n. 1, p. 201–208, 2017.

GARKHAL, K. et al. Fast degradable poly(L-lactide-co- ϵ -caprolactone) microspheres for tissue engineering: Synthesis, characterization, and degradation behavior. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 45, n. 13, p. 2755–2764, 1 jul. 2007.

GREINER, A.; WENDORFF, J. H. Electrospinning: A fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 46, n. 30, p. 5670–5703, 2007.

HOKUGO, A.; TAKAMOTO, T.; TABATA, Y. Preparation of hybrid scaffold from fibrin and biodegradable polymer fiber. **Biomaterials**, v. 27, n. 1, p. 61–67, 2006.

IMMICH, A. P. S. et al. Electrospun PLLA Membranes for Caffeine Delivery : Diffusional Approach. v. 10, n. 12, p. 563–574, 2017.

J. HOGAN JR., C.; BISWAS, P. Narrow size distribution nanoparticle production by electrospray processing of ferritin. **Journal of Aerosol Science**, v. 39, n. 5, p. 432–440, 2008.

JEONG, S. I. et al. Morphology of elastic poly(L-lactide-co-epsilon-caprolactone) copolymers and in vitro and in vivo degradation behavior of their scaffolds. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 4, p. 1303–9, 2004a.

JEONG, S. I. et al. In vivo biocompatibility and degradation behavior of elastic poly(L-lactide-co-epsilon-caprolactone) scaffolds. **Biomaterials**, v. 25, n. 28, p. 5939–5946, 2004b.

KAIGLER, D.; MOONEY, D.; PH, D. Tissue Engineering 's Impact on Dentistry. **Journal of Dental Education**, v. 65, n. 5, p. 456–462, 2001.

KENAWY, E.-R. et al. Processing of polymer nanofibers through electrospinning as drug delivery systems. **Materials Chemistry and Physics**, v. 113, n. 1, p. 296–302, 2009.

KESELOWSKY, B. G.; COLLARD, D. M.; GARCÍA, A. J. Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 66A, n. 2, p. 247–259, 2003.

KIM, T. G.; LEE, D. S.; PARK, T. G. Controlled protein release from electrospun biodegradable fiber mesh composed of poly(epsilon-caprolactone) and poly(ethylene oxide). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 338, n. 1–2, p. 276–283, 2007.

KOBAYASHI, J.; OKANO, T. Thermoresponsive Cell Culture Surfaces Designed for Cell-Sheet-Based Tissue Engineering and Regenerative Medicine. In: **Biomaterials Surface Science**. [s.l: s.n.]. p. 491–510.

KRISHNA, O. D. et al. Integrin-mediated adhesion and proliferation of human MSCs elicited by a hydroxyproline-lacking, collagen-like peptide. **Biomaterials**, v. 32, n. 27, p. 6412–6424, 2011.

LANNUTTI, J. et al. Electrospinning for tissue engineering scaffolds. **Materials Science and Engineering C**, v. 27, n. 3, p. 504–509, 2007.

LEBOURG, M.; ANTÓN, J. S.; RIBELLES, J. L. G. Porous membranes of PLLA-PCL blend for tissue engineering applications. **European Polymer**

Journal, v. 44, n. 7, p. 2207–2218, 2008.

LENZ, R. W. *Biodegradable Polymers*. v. 107, 1993.

LI, D. et al. Three-dimensional polycaprolactone scaffold via needleless electrospinning promotes cell proliferation and infiltration. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 121, p. 432–443, 2014.

LI, D. et al. A comparison of nanoscale and multiscale PCL/gelatin scaffolds prepared by disc-electrospinning. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 146, p. 632–641, 2016.

LI, S. M.; MCCARTHY, S. Further investigations on the hydrolytic degradation of poly(DL-lactide). **Biomaterials**, v. 20, n. 1, p. 35–44, 1999.

LI, T.-T. et al. Comparative studies on osteogenic potential of micro- and nanofibre scaffolds prepared by electrospinning of poly(ϵ -caprolactone). **Progress in Biomaterials**, v. 2, n. 1, p. 13, 2013.

LIANG, D.; HSIAO, B. S.; CHU, B. Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 14, p. 1392–1412, 2007.

LUO, T.; KIICK, K. L. Collagen-Like Peptide Bioconjugates. **Bioconjugate Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 816–827, 2017.

MA, Z. et al. Surface engineering of electrospun polyethylene terephthalate (PET) nanofibers towards development of a new material for blood vessel engineering. **Biomaterials**, v. 26, n. 15, p. 2527–2536, 2005.

MACHADO, T. O. Thiago Ouriques Machado SYNTHESIS OF POLY (THIOETHER-ESTER) NANOPARTICLES DERIVED FROM RENEWABLE RESOURCES VIA THIOL-ENE POLYMERIZATION IN MINIEMULSION Dissertação submetida ao Programa de Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade. 2015.

MACHADO, T. O. et al. Thiol-ene miniemulsion polymerization of a biobased monomer for biomedical applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 159, p. 509–517, 2017.

MACHADO, T. O.; SAYER, C.; ARAUJO, P. H. H. Thiol-ene polymerisation: A promising technique to obtain novel biomaterials.

European Polymer Journal, v. 86, p. 200–215, 2017.

MAIA, A. L. M. F. et al. Morphological and chemical evaluation of bone with apatite-coated Al₂O₃ implants as scaffolds for bone repair. v. 59, p. 533–538, 2013.

MARETSCHKEK, S.; GREINER, A.; KISSEL, T. Electrospun biodegradable nanofiber nonwovens for controlled release of proteins. **Journal of Controlled Release**, v. 127, n. 2, p. 180–187, 2008.

MARQUES, A. P.; REIS, R. L.; HUNT, J. A. The biocompatibility of novel starch-based polymers and composites: In vitro studies. **Biomaterials**, v. 23, n. 6, p. 1471–1478, 2002.

MASSON, V. et al. Stability of poly (ϵ caprolacton) nanospheres in sterile aqueous media. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 139, n. 1–2, p. 113–123, 1996.

MEGELSKI, S. et al. Micro- and Nanostructured Surface Morphology on Electrospun Polymer Fibers. p. 8456–8466, 2002.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

NIEHUES, E. **Elaboração e Caracterização de Membranas de Gelatina Eletrofiadas e Modificadas por Glutaraldeído ou Nanocristais de Celulose**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.

OLIVEIRA, C. S. et al. Avanços e aplicações da bioengenharia tecidual. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 9, p. 28–36, 2010.

PACHENCE, J.M; BOHRER, M. P. ; KOHN, J. Biodegradable polymers. **Biopolymers I**, p. 1–40, 2007.

PATEL, M.; FISHER, J. P. Biomaterial scaffolds in pediatric tissue engineering. **Pediatric Research**, v. 63, n. 5, p. 497–501, 2008.

PELIPENKO, J. et al. The impact of relative humidity during electrospinning on the morphology and mechanical properties of nanofibers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 456, n. 1, p. 125–134, 2013.

PICQUART, M. et al. Spectroscopic study of N-acetylcysteine and N-acetylcysteine r hydrogen peroxide complexation. **Chemical Physics**, v. 228, p. 279–291, 1998.

PRAJITNO, D. H.; MAULANA, A.; SYARIF, D. G. Effect of Surface Roughness on Contact Angle Measurement of Nanofluid on Surface of Stainless Steel 304 by Sessile Drop Method. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 739, n. 1, 2016.

PUBCHEM CID 12035. **National Center for Biotechnology Information**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/12035>>. Acesso em: 17 dez. 2017.

PUBCHEM CID 14781. **National Center for Biotechnology Information**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/14781>>. Acesso em: 17 dez. 2017.

QIN, X.; WU, D. Effect of different solvents on poly(caprolactone)(PCL) electrospun nonwoven membranes. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 107, n. 3, p. 1007–1013, 2012.

REDDY, S. K.; ANSETH, K. S.; BOWMAN, C. N. Modeling of network degradation in mixed step-chain growth polymerizations. **Polymer**, v. 46, n. 12, p. 4212–4222, 2005.

REN, K. et al. Electrospun PCL/gelatin composite nanofiber structures for effective guided bone regeneration membranes. **Materials Science and Engineering C**, v. 78, p. 324–332, 2017.

RYDHOLM, A. E. et al. Controlling network structure in degradable thiol-acrylate biomaterials to tune mass loss behavior. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 10, p. 2827–2836, 2006.

RYDHOLM, A. E. et al. Development and characterization of degradable thiol-allyl ether photopolymers. **Polymer**, v. 48, n. 15, p. 4589–4600, 2007.

RYDHOLM, A. E.; ANSETH, K. S.; BOWMAN, C. N. Effects of neighboring sulfides and pH on ester hydrolysis in thiol-acrylate photopolymers. **Acta Biomaterialia**, v. 3, n. 4, p. 449–455, 2007.

S.A. THERON, E. ZUSSMANA, A. L. . Y. Experimental investigation of the governing parameters in the electrospinning of polyethylene oxide

solution. **IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation**, v. 45, n. 6, p. 2017–2030, 2004.

SALEM, A. K. et al. Interactions of 3T3 fibroblasts and endothelial cells with defined pore features. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 61, n. 2, p. 212–217, 2002.

SCHINDLER, M. et al. A synthetic nanofibrillar matrix promotes in vivo-like organization and morphogenesis for cells in culture. **Biomaterials**, v. 26, n. 28, p. 5624–5631, 2005.

SHARIFI, F. et al. Comparative of fibroblast and osteoblast cells adhesion on surface modified nanofibrous substrates based on polycaprolactone. **Progress in Biomaterials**, v. 5, n. 3–4, p. 213–222, 2016.

SILL, T. J.; VON RECUM, H. A. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. **Biomaterials**, v. 29, n. 13, p. 1989–2006, 2008.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. [s.l: s.n.].

SUNDELACRUZ, S.; KAPLAN, D. L. Stem cell- and scaffold-based tissue engineering approaches to osteochondral regenerative medicine. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 20, n. 6, p. 646–655, 2009.

SUPAPHOL, P.; MIT-UPPATHAM, C.; NITHITANAKUL, M. Ultrafine electrospun polyamide-6 fibers: Effect of emitting electrode polarity on morphology and average fiber diameter. **Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics**, v. 43, n. 24, p. 3699–3712, 2005.

TAKAGI, J. Structural basis for ligand recognition by integrins. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 19, n. 5, p. 557–564, 2007.

TANG, X. et al. Polymeric Biomaterials in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. p. 351–371, 2014.

TAYLOR, G. Electrically Driven Jets. **Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 313, n. 1515, p. 453–475, 1969.

VENERAL, J. G. **PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE POLI (ε -**

CAPROLACTONA) EM Florianópolis. [s.l: s.n.].

VENUGOPAL, J.; ZHANG, Y. Z.; RAMAKRISHNA, S. Electrospun nanofibres: Biomedical applications. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part N: Journal of Nanoengineering and Nanosystems**, v. 218, n. 1, p. 35–45, 2004.

VERRECK, G. et al. Incorporation of drugs in an amorphous state into electrospun nanofibers composed of a water-insoluble, nonbiodegradable polymer. **Journal of Controlled Release**, v. 92, n. 3, p. 349–360, 2003.

VERT, M. et al. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 3, n. 6, p. 432–446, 1992.

WANG, C. et al. The use of bioactive peptides to modify materials for bone tissue repair. **Regenerative Biomaterials**, v. 4, n. 3, p. 191–206, 2017.

WILLIAMS, D. F. **Definitions in biomaterials: proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://books.google.co.uk/books/about/Definitions_in_Biomaterials.html?id=6zdrAAAAMAAJ&redir_esc=y>.

WOO, K. M.; CHEN, V. J.; MA, P. X. Nano-fibrous scaffolding architecture selectively enhances protein adsorption contributing to cell attachment. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 67A, n. 2, p. 531–537, 2003.

XU, T. et al. Electrospun Polycaprolactone 3D Nanofibrous Scaffold with Interconnected and Hierarchically Structured Pores for Bone Tissue Engineering. **Advanced Healthcare Materials**, v. 4, n. 15, p. 2238–2246, 2015.

YAO, Q. et al. Biomaterials Three dimensional electrospun PCL / PLA blend nano fi brous scaffolds with signi fi cantly improved stem cells osteogenic differentiation and cranial bone formation. **Biomaterials**, v. 115, p. 115–127, 2017.

YOSHIMOTO, H. et al. A biodegradable nanofiber scaffold by

electrospinning and its potential for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 24, n. 12, p. 2077–2082, 2003.

ZAWANEH, P. N. et al. Design of an injectable synthetic and biodegradable surgical biomaterial. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 24, p. 11014–11019, 2010.

ZELNY, J. The Role of Surface Instability in Electrical. v. 219, n. 6, p. 1314–1345, 1935.

ZONG, X. et al. Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes. **Polymer**, v. 43, n. 16, p. 4403–4412, 2002.

ZONG, X. et al. Electrospun fine-textured scaffolds for heart tissue constructs. **Biomaterials**, v. 26, n. 26, p. 5330–5338, 2005.