UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

Mariana Carvalho Burrows

**Suportes híbridos de PET e
colágeno como modelo para
enxertia vascular**

São Paulo
Data do Depósito na SPG:
26/01/2010

Mariana Carvalho Burrows

Suportes híbridos de PET e colágeno como modelo para enxertia vascular

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Química
(Química Orgânica).*

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Catalani

Mariana Carvalho Burrows

“Suportes híbridos de PET e colágeno como modelo para enxertia vascular”

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Química (Química Orgânica).

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

*Aos amores da minha vida.....
Ao meu amado Senhor Jesus Cristo,
autor e Senhor da minha vida.
Ao meu esposo David John Burrows e ao meu
filho David John C. Burrows.
Aos meus pais, Vicente e Lidia, e aos meus
irmãos Antônio Felipe e Vicente Filho.
Aos meus sogros Don e Sue Burrows.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, o meu amado Senhor Jesus Cristo, que sempre me deu forças mesmo quando eu pensava que já estava no meu último fôlego. Obrigada Senhor porque Tu fizeste real o meu sonho!!

Agradeço às minhas duas famílias. À minha primeira família é a família na qual cresci, recebi amor, ensinamentos morais e cristãos. À minha mãe e meu pai que sempre acreditaram no meu sonho e que sempre me incentivaram e me deram força nas lutas do cotidiano. Minha mãe que sempre viajou de Fortaleza para São Paulo para me ajudar com o meu filho David e ao meu pai que sempre foi compreensivo com as viagens da minha mãe. Aos meus irmãos Antônio Felipe e Vicente Filho de quem eu tanto me orgulho e amo, muito obrigada pelo apoio emocional e pelas constantes visitas à minha casa, o que me fez muito feliz, pois pelo menos por alguns instantes não me sentia sem minhas raízes aqui em São Paulo.

À minha segunda família, o maior presente de Deus na minha vida. Ao meu esposo David que me incentivou a ingressar na pós-graduação e me apoiou durante todo o período do meu mestrado em primeiro lugar financeiramente e muito além disso com muito amor, companheirismo, amizade, compreensão. Sempre se desdobrando para trabalhar e cuidar do nosso filho David John (DJ) até a hora que eu chegasse em casa, que na maioria das vezes já era bem tarde da noite. Ao meu filho David John (DJ), que sempre vinha correndo com um sorriso enorme dizendo mommy quando eu chegava em casa tarde da noite. Ele quase sempre ficava acordado me esperando. Obrigada filho!!! Você foi minha força de vontade de me superar e de querer cada dia fazer melhor o meu trabalho. David e DJ obrigada por todos os fins de semana maravilhosos que vocês me proporcionaram com os pensamentos bem longe da química. Vocês me mostraram que é possível ser uma estudante responsável e, ao mesmo tempo, dedicada como mãe, esposa e dona de casa.

Agradeço aos meus sogros Donald Christopher Marshall Burrows e Suzanne Alida Leone Burrows por todo o apoio psicológico e financeiro, por todas as idas e vindas Brasil África do Sul, que proporcionaram momentos muito felizes para minha família.

Agradeço ao meu orientador, Luiz Henrique Catalani, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa e pela confiança que foi depositada em mim quando fui aceita para entrar em seu grupo. Agradeço pelo projeto que foi dado a mim, tenho esse como um filho que eu amo. Amo o meu projeto de pesquisa. Obrigada porque com a sua orientação amadureci muito cientificamente e espero não parar por aí... Obrigada pela infinita paciência para a entrega da dissertação.

Agradeço aos meus queridos amigos do laboratório (e de fora dele): Antônio, Vânia, Patrícia, Janaína, Silvinha, Ricardo, Renata, Luiz Carlos (técnico), Danielle, Romeu, Alliny, Vitor Zamarion, Guilhermino, Daniel, Flávia e Leonardo.

Posso considerar que vocês são a minha família científica. Agradeço por cada detalhezinho que vocês me ensinaram e por terem me acolhido de uma forma tão carinhosa desde que cheguei ao grupo. Adoro o sotaque do interior de alguns e o sotaque nordestino de outros querendo me imitar. Choramos juntos nossas angústias e resultados “ruins”, rimos juntos (e como rimos!!!) de absolutamente tudo (essa capacidade é inexplicável...). Adoro falar besteiras com vocês isso faz lembrar que todos nós temos um lado criança, e que é possível ter um ambiente de trabalho maravilhoso onde todos são irmãos e amigos que se ajudam o tempo inteiro. Comemoramos conquistas e resultados bons uns dos outros como se fossem nossas próprias conquistas e resultados, almoçamos juntos (inclusive cozinhamos às vezes), lanchamos juntos, fazemos café e discutimos nossas idéias científicas sem medo de estar certos ou errados, cada um contribuindo para que o trabalho do outro se desenrole mais favoravelmente, sem cobrar nada em troca. Nos corrigimos mutuamente e crescemos a cada dia em nossa amizade!

Agradeço aos meus amigos coterrâneos, Lidiane e Rafael, da minha terrinha querida, Ceará, pela amizade e apoio.

Agradeço aos professores Denise Petri e Yoshio por algumas discussões que permitiram o meu amadurecimento científico.

Agradeço aos meus colaboradores professora Dra. Célia Regina da Silva Garcia e sua aluna Desireè Cigaran Schuck, professora Dra. Ana Campa e sua aluna Fabíola Branco Filippin Monteiro, e ao professor Henrique Eisi Toma e seu aluno Vitor de Moraes Zamarion, pelas discussões, ensinamentos e acima de tudo por acreditarem no meu projeto.

Agradeço à Prof^a Shirley Schreier por ter disponibilizado a utilização do equipamento de Dicroísmo circular e pelos ensinamentos à respeito da técnica. Agradeço aos seus alunos de pós-graduação Gustavo e Joana que me ajudaram no decorrer do experimento de Dicroísmo circular.

Agradeço à Prof^a Mari Cleide Sogayar do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP) pela doação das células de fibroblastos 3T3-L1.

Agradeço à Prof^a Dulcineia Saes Parra Abdalla do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP) pela doação das células HUVECS.

Agradeço aos funcionários da Central Analítica, em especial: Adriana, Alessandra, Márcio, Fernando, Cristiane e Luzia, que executam com esmero as análises de nossas preciosas amostras. Por serem compreensivos e oferecerem a nós a sua amizade.

Agradeço aos queridos funcionários da seção de pós-graduação: Cibeles, Milton, Emiliano e Marcelo, por fazerem de tudo para resolver todos os nossos problemas, absolutamente todos (e pelos deliciosos chocolates).

Agradeço e muito a todos os professores da Universidade Federal do Ceará (UFC). Todos vocês foram responsáveis pela minha formação base do qual

tanto me orgulho. O amor e a dedicação que vocês têm pelo seu trabalho movem a UFC. Obrigada porque através dos seus ensinamentos eu pude chegar até aqui. Em especial gostaria de agradecer a todos do Laboratório de Polímeros da UFC, às professoras Dra. Judith Feitosa, Dra. Nágila Ricardo, Dra. Sandra Soares e, em especial, à Dra. Regina Célia Monteiro de Paula que foi orientadora e muitas vezes mãe. Às estudantes de pós-graduação da época que eu estava na Iniciação Científica que me ajudaram a iniciar na pesquisa em polímeros Ducilene, Ana Cristina, Jeanny, Pablyanna, Leônia e Marília. À minha querida amiga Alliny por toda a amizade e por ter me aguentado durante toda a nossa graduação, por sempre ter me dado força nos momentos em que eu precisei bastante.

Agradeço ao professor Sérgio Maia Mello e organizador nacional das Olimpíadas de Química, através das olimpíadas de química descobri o meu amor pela química e pude trilhar essa trajetória: Colégio Sete de Setembro – Universidade federal do Ceará – Universidade de São Paulo e espero continuar seguindo adiante.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Agradeço, por fim, a todos que não estão citados aqui especificamente, mas que também contribuíram para que essa obra se tornasse realidade.

*“All the truths are easy to understand
once they are discovered;
The point is to discover them”*
Galileu Galilei

RESUMO

Burrows, M. C., **Suportes híbridos de PET e colágeno como modelo para enxertia vascular**. 2011. 142. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Suportes eletrofiados para crescimento celular são de interesse para a engenharia de tecidos, principalmente em função de sua estrutura em forma de rede tridimensional de fibras de diâmetro nanométrico. Esta arquitetura especial permite a geração de elevada área superficial e porosidade, características importantes para a adesão, proliferação e infiltração de células para o interior do suporte. A utilização de um suporte eletrofiado como enxerto vascular necessita ainda que este apresente excelentes propriedades mecânicas, associadas a uma elevada biocompatibilidade. Neste trabalho mostramos que estas propriedades podem ser alcançadas a partir da eletrofiação de uma co-solução de PET e colágeno gerando um material híbrido, visto que PET apresenta excelentes propriedades mecânicas e o colágeno é o principal componente da matriz extracelular. A obtenção dos suportes eletrofiados de PETcolágeno mostrou ser possível utilizando-se como solvente HFIP e HFIP/TFA 7:2. No entanto, neste último, o colágeno é completamente degradado durante o processo de solubilização. Fixando-se os parâmetros de eletrofiação, a morfologia da malha obtida mostrou ser dependente da relação massa PET/massa colágeno, concentração total da solução e solvente utilizado. Foram obtidos materiais com distribuição de diâmetros unimodal e bimodal, além de materiais com formato em fitas e teias entre as fibras. Ainda, PET e colágeno formam malhas de composição complexa, nas quais são encontradas fibras compostas de materiais puros, mas também formam blendas em que os dois materiais encontram-se misturados em uma mesma fibra. Os materiais $S_{8,2}$ e $S_{4,6}$ foram caracterizados química-, mecânica- e biologicamente. Observou-se que, para filmes planos, estes materiais apresentaram energia de superfície mais próxima da do colágeno, o que justifica a melhor adesão celular em $S_{8,2}$ e $S_{4,6}$ do que no PET. $S_{8,2}$ mostrou ter valores de módulo de elasticidade e alongação máxima próximos ao da artéria femoral, enquanto que $S_{4,6}$ apresentou-se como um material quebradiço. Os ensaios de crescimento celular utilizando fibroblastos, um modelo de tecido conjuntivo (linhagem 3T3-L1) e células endoteliais, um modelo de tecido arterial e venoso (HUVECs) comprovaram a excelente adesão e proliferação celular nos suportes celulares. $S_{8,2}$ apresentou-se como o melhor material frente às células HUVECs, enquanto que $S_{4,6}$ foi o melhor material frente às células 3T3-L1. Propõe-se a utilização de $S_{8,2}$ como um biomaterial para enxertia vascular e $S_{4,6}$ como material de recobrimento de próteses já utilizadas.

Palavras-chave: suportes eletrofiados, eletrofiação, PET, colágeno, enxertos vasculares

ABSTRACT

Burrows, M. C., **Hybrid scaffolds from PET and collagen as a model for vascular grafts. 2011. 142.** Dissertation – Post Graduate Program in Chemistry. Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Scaffolds obtained by electrospinning for cellular growth are of interest for materials engineering, especially considering its structure in the form of a three-dimensional fiber mesh of nanometric diameter. This special architecture allows the generation of larger surface areas and higher porosity structures, and also important characteristics for the adhesion, proliferation and infiltration of cells into the scaffold. The use of an electrospun scaffold as a vascular graft additionally requires excellent mechanical properties, associated with a high biocompatibility level. In this study we demonstrate that these properties can be achieved by means of electrospinning of PET and collagen co-solution producing a hybrid material, considering that PET possesses excellent mechanical properties and that collagen is the principal component of the extracellular matrix. The production of electrospun scaffolds of PET/collagen is shown to be possible using HFIP and HFIP/TFA 7:2 as solvents. However, in this last one, the collagen is completely degraded during the solubilization process. If the electrospinning parameters are maintained constant, the morphology of the mesh obtained was found to be dependent on the ratio of PET/collagen (w/w), total concentration of the solution and solvent employed. Materials were obtained with unimodal and bimodal diameter distribution, as well as material in the form of ribbons and mesh between the fibers. In addition, PET and collagen form a mesh of complex composition, in which fibers composed by pure and blended materials were found. The materials PET/collagen 80:20 ($S_{8,2}$) and PET/collagen 40:60 ($S_{4,6}$) were characterized chemically, mechanically and biologically. It was observed that, for spincoated films, these materials present a surface energy closer to that of collagen, explaining the better cellular adhesion in $S_{8,2}$ e $S_{4,6}$ than for PET. $S_{8,2}$ presents very similar elasticity and elongation modulus values to the femoral artery, while $S_{4,6}$ is a brittle material. The cellular growth experiments using fibroblasts as a model of conjunctive tissue (3T3-L1) and endothelial cells as a model of arterial and venous tissue (HUVEC) proved the excellent adhesion and cellular proliferation on the cellular PET/collagen scaffolds. $S_{8,2}$ was shown to be the best material considering HUVEC cells, while $S_{4,6}$ was the best material considering 3T3-L1 cells. According to the results obtained, the use of $S_{8,2}$ is proposed as a biomaterial for vascular grafts and $S_{4,6}$ as a material for a coating for vascular grafts prostheses.

Keywords: electrospun scaffolds, electrospinning, PET, collagen, vascular grafts

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

PET: Politereftalato de etila

S_{8,2}: Malha eletrofiada PET/colágeno 80:20 (m/m) em álcool hexafluoroisopropanol

S_{4,6}: Malha eletrofiada PET/colágeno 40:60 (m/m) em álcool hexafluoroisopropanol

Fração A: Fase superior da mistura bifásica de PET e colágeno em HFIP

Fração B: Fase inferior da mistura bifásica de PET e colágeno em HFIP

F_g: Força gravitacional

F_E: Força eletrostática

F_C: Força Coulômbica de repulsão

ECM: Matrix extracelular

TFA: Ácido Trifluoroacético

HFIP: Álcool Hexafluoroisopropanol

Tampão TES: Ácido N-[tris(hidroximetil)-metil]-2-aminoetanosulfônico

PBS: Tampão fosfato salino

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SDS-page: Eletroforese

DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's*

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

HUVEC: *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*

C: Colágeno nativo tipo I

Cs: Colágeno pós-solubilização

Ce: Colágeno pós-eletrofiação

Cdn: Colágeno desnaturado

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

FTIR: Espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier

TGA: Análise termogravimétrica

DSC: Calorimetria exploratória diferencial

MCR: Microscopia confocal Raman

CD: Dicroísmo Circular

T_{onset}: Temperatura inicial de decomposição

T_{endset}: Temperatura final da decomposição

T_d: Temperatura de desnaturação do colágeno

T_g: Transição vítrea

T_m: Temperatura de fusão

ΔH_m: Entalpia de fusão

c_e: Concentração entanglement

E: Módulo de Young

σ_b: Força de ruptura

σ: Força aplicada

ε: Deformação sofrida

ϵ_b : Deformação de ruptura

θ_A : Ângulo de avanço

θ_R : Ângulo de recesso

δ : Histerese de ângulo de contato

γ_s : Energia de superfície total

γ_s^D : Componente dispersiva da energia de superfície

γ_s^P : Componente não-dispersiva ou polar da energia de superfície

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura química do PET	20
Figura 2. Próteses de Dacron.....	20
Figura 3. Representação de uma artéria. Ref 28.....	23
Figura 4. Esquema de um equipamento utilizado em eletrofiação	24
Figura 5. Principais aminoácidos constituintes do colágeno tipo I	37
Figura 6. (a) Fibras de colágeno http://pbm.ct.utwente.nl/dopdrachten/yang.htm (b) Tripla hélice do colágeno (Tropocolágeno) (c) Microfibrilas	38
Figura 7. Imagens de MEV da amostra obtida a partir da condição 1	60
Figura 8. Imagens de MEV da amostra obtida a partir da condição 2	60
Figura 9. Imagens de MEV da amostra obtida a partir da condição 3	60
Figura 10. Imagens de MEV da amostra obtida na condição 10.....	63
Figura 11. Imagens de MEV da amostra obtida na condição 11.....	63
Figura 12. Imagens de MEV da amostra obtida na condição 12.....	63
Figura 13. Imagens de MEV da amostra obtida na condição 13.....	64
Figura 14. Distribuição dos diâmetros das fibras obtidas pelo estudo da influência da voltagem. Valores de diâmetro médio obtido pelo máximo populacional da distribuição gaussiana ($\pm$) limites superiores e inferiores da gaussiana.	64
Figura 15. Imagens de MEV da malha obtida pela condição 15	66
Figura 16. Imagens de MEV da amostra obtida pela condição 20	67
Figura 17. Imagens de MEV da malha eletrofiada de PET-colágeno ($S_{4,6}^{HFIP/TFA}$) sob condições de fluxo 0,8 mL/h distância de 18 cm e voltagem de 40 kV.....	75
Figura 18. Imagens de MEV da malha eletrofiada de PET-colágeno ($S_{7,3}^{HFIP/TFA}$) sob condições de fluxo 3,0 mL/h distância de 15 cm e voltagem de 25 kV.....	75
Figura 19. Imagens de MEV da malha eletrofiada de PET-colágeno ($S_{7,3}$) sob condições de fluxo 3,0 mL/h distância de 15 cm e voltagem de 25 kV	75
Figura 20. Imagens de MEV da amostra PET ($S_{10,0}$).....	76
Figura 21. Imagens de MEV da amostra PET-col ($S_{9,1}$)	77
Figura 22. Imagens de MEV da amostra PET-col ($S_{1,9}$)	77
Figura 23. Imagens de MEV das malhas eletrofiadas (A) $S_{8,2}$ (B) $S_{5,5}$ (C) $S_{2,8}$	78
Figura 24. Imagens de MEV da amostra PET-col ($S_{8,2}$)	78
Figura 25. Imagens de MEV da amostra PET-col ($S_{4,6}$)	79
Figura 26. FTIR do PET	80
Figura 27. FTIR do colágeno (Região de 4000 a 500 cm^{-1})	81
Figura 28. Representação da mistura heterogênea de PET e colágeno em HFIP.	81

Figura 29. Espectro de FTIR do Colágeno (Região de 2000 a 1000 cm^{-1}).....	82
Figura 30. Espectro de FTIR da Fração A (Região de 2000 a 1000 cm^{-1}).....	83
Figura 31. Espectro de FTIR da Fração B (Região de 2000 a 1000 cm^{-1}).....	83
Figura 32. SDS-page comparativo do colágeno nativo com o colágeno solubilizado em HFIP e o colágeno solubilizado em HFIP/TFA 7:2.....	87
Figura 33. SDS-page (C) Colágeno Nativo (Cs) Colágeno pós-solubilização (Ce) Colágeno pós-eletrofiação.....	87
Figura 34. Espectro de Dicroísmo Circular comparativo entre o Ce e Cdn	90
Figura 35. Microscopia Eletrônica de Varredura (A) PET (Condição 1); (B) PETcol 80:20 ($S_{8,2}$); (C) PETcol 40:60 ($S_{4,6}$); (D) Colágeno.....	92
Figura 36. FTIR dos materiais PET/col eletrofiados em HFIP	95
Figura 37. FTIR dos materiais PET/col eletrofiados em HFIP/TFA 7:2.....	95
Figura 38. Ligação de hidrogênio entre a carbonila do PET e a amida do colágeno	96
Figura 39. FTIR comparativo do PET, $S_{8,2}$, $S_{4,6}$ e Colágeno (C)	99
Figura 40. Curva Termogravimétrica do PET, Colágeno, $S_{8,2}$ e $S_{4,6}$	101
Figura 41. DSC das amostras de PET, colágeno, $S_{8,2}$ e $S_{4,6}$	102
Figura 42. Microscopia Eletrônica de Varredura das amostras eletrofiadas após 16 dias de digestão com collagenase (A) PET (B) $S_{8,2}$ (C) $S_{4,6}$	105
Figura 43. Gaussianas das distribuições de diâmetro antes e depois de 16 dias de digestão com a collagenase para $S_{4,6}$	105
Figura 44. Amostra $S_{8,2}$ (A) Área scaneada (B) Espectro Raman; Vermelho – Espectro do Colágeno; Verde - Espectro do PET; Amarelo – Espectro do amostra em um ponto da área varrida (C) $S_{8,2}$ – Microscopia Confocal Raman - em verde, temos o PET puro; em vermelho, o colágeno puro; e em amarelo, a mistura entre os dois compostos.	107
Figura 45. Amostra $S_{4,6}$ (A) Área scaneada (B) Espectro Raman; Vermelho – Espectro do Colágeno; Verde - Espectro do PET; Amarelo – Espectro do amostra em um ponto da área varrida (C) $S_{4,6}$ – Microscopia Confocal Raman - em verde, temos o PET puro; em vermelho, o colágeno puro; e em amarelo, a mistura entre os dois compostos.	108
Figura 46. A) $S_{8,2}$ antes da digestão com collagenase B) $S_{8,2}$ após 16 dias de digestão com collagenase C) $S_{8,2}$ – Microscopia Confocal Raman - em verde, temos o PET puro; em vermelho, o colágeno puro; e em amarelo, a mistura entre os dois compostos.	109
Figura 47. A) $S_{4,6}$ antes da digestão com collagenase B) $S_{4,6}$ após 16 dias de digestão com collagenase C) $S_{4,6}$ – Microscopia Confocal Raman - em verde,	

temos o PET puro; em vermelho, o colágeno puro; e em amarelo, a mistura entre os dois compostos.	110
Figura 48. Ensaio de MTT para os fibroblastos 3T3-L1	119
Figura 49. Microscopia Eletrônica de Varredura – 1 dia de cultura (A) PET (B) $S_{8,2}$ (C) $S_{4,6}$	119
Figura 50. Ensaio de MTT para as células HUVEC	120
Figura 51. Microscopia Eletrônica de Varredura PET – (A) 1 dia de cultura (B) 4 dias de cultura (C) 7 dias de cultura	121
Figura 52. Microscopia Eletrônica de Varredura $S_{8,2}$ – (A) 1 dia de cultura (B) 4 dias de cultura (C) 7 dias de cultura	121
Figura 53. Microscopia Eletrônica de Varredura $S_{4,6}$ – (A) 1 dia de cultura (B) 4 dias de cultura (C) 7 dias de cultura	122

Lista de Tabelas

Tabela 1. Condições de eletrofiação das soluções de PET 15% e 24% em HFIP ..	59
Tabela 2. Efeito do fluxo na eletrofiação do PET	61
Tabela 3. Estudo da influência da voltagem na eletrofiação do PET	62
Tabela 4. Planejamento fatorial de eletrofiação do PET	66
Tabela 5. Malhas eletrofiadas de PET de diâmetro micrométrico e de diâmetro nanométrico	68
Tabela 6. Parâmetros comparativos dos solventes puros e dos solventes utilizados na eletrofiação, à 25 °C.....	69
Tabela 7. Soluções PET-colágeno eletrofiadas sob diferentes parâmetros de eletrofiação.....	73
Tabela 8. Correlação de massas utilizadas na preparação das blends PET-colágeno com massa total constante, utilizando HFIP como solvente.....	74
Tabela 9. Estudo da correlação entre as bandas de PET e colágeno nas frações A e B	84
Tabela 10. Distribuição de diâmetros e porosidade das malhas eletrofiadas	93
Tabela 11. Dados obtidos nas curvas de TG e DTG dos materiais	100
Tabela 12. Resultados obtidos por DSC.....	103
Tabela 13. Medidas de ângulo de avanço ângulo de recesso e histerese dos filmes produzidos por revestimento rotacional de soluções 30 mg/mL sem recozimento.....	112
Tabela 14. Valores de Energia de superfície total e das suas componentes polar e dispersiva	114
Tabela 15. Ensaio mecânico de tração comparativo.....	116

Lista de Equações

Equação 1	49
Equação 2	52
Equação 3	115

Sumário

1	Introdução.....	19
2	Objetivos	42
3	Materiais	44
4	Métodos.....	46
4.1	Obtenção dos materiais eletrofiados	46
4.1.1	Eletrofiação do Poliéster	46
4.1.2	Eletrofiação da co-solução PET-colágeno.....	46
4.2	Obtenção dos filmes de PET/colágeno por revestimento rotacional	47
4.3	Obtenção do colágeno desnaturado, colágeno pós-solubilizado e colágeno eletrofiado	48
4.4	Caracterização das malhas eletrofiadas e filmes.....	48
4.4.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	48
4.4.2	Distribuição de diâmetros e Porosidade das Malhas eletrofiadas ...	49
4.4.3	Espectroscopia por Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	49
4.4.4	Análise Térmogravimétrica (TGA).....	50
4.4.5	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	50
4.4.6	Ensaio de digestão das malhas com collagenase	50
4.4.7	Microscopia Confocal Raman (MCR)	51
4.4.8	Medidas de ângulo de contato.....	52
4.4.9	Cálculo da energia de superfície	52
4.4.10	Ensaio mecânico de tração.....	53
4.4.11	Ensaio de adesão, viabilidade e proliferação celular com fibroblastos (3T3-L1) e HUVECS	53
4.5	Caracterização do colágeno eletrofiado	55
4.5.1	Eletroforese (SDS-page)	55
4.5.2	Dicroísmo circular (CD).....	56
5	Resultados e Discussão	57

5.1	Eletrofiação do Poliéster	57
5.1.1	Estudo dos parâmetros de eletrofiação do PET	58
5.2	Eletrofiação da co-solução de PET-colágeno	71
5.3	Estudo de FTIR do PET e do Colágeno nativo	79
5.4	Estudo por FTIR das frações da mistura	81
5.5	Estudo do Colágeno	85
5.5.1	Eletroforese (SDS-page)	85
5.5.2	Dicroísmo Circular (CD)	88
5.6	Caracterização Morfológica	91
5.6.1	Distribuição de diâmetros e porosidade	92
5.7	Caracterização Química	94
5.7.1	Caracterização das malhas eletrofiadas de PET-colágeno por FTIR. 94	
5.7.2	Análise Termogravimétrica – TGA.....	100
5.7.3	Calorimetria Exploratória Diferencial	101
5.7.4	Ensaio de Digestão com Colagenase e Microscopia Confocal Raman (MCR)	104
5.8	Caracterização de Superfície.....	111
5.8.1	Medidas de Ângulo de contato	111
5.8.2	Cálculo da Energia de Superfície.....	113
5.9	Caracterização Mecânica através de Ensaio de Tração.....	115
5.10	Ensaio de adesão, viabilidade e proliferação celular com fibroblastos (3T3-L1) e HUVECS	118
6	Conclusões	123
7	Referências Bibliográficas	126
8	ANEXOS.....	143

1 Introdução

Doenças Cardiovasculares, especificamente as doenças coronárias são resultantes de aterosclerose, e lideram uma das maiores causas de morte no mundo¹. A aterosclerose é uma doença vascular provocada pelo aumento da espessura da parede do vaso arterial, o que gera uma subsequente perda de lúmen arterial e acarreta na diminuição ou perda total de circulação na área afetada pela doença².

Uma vez que o fluxo sanguíneo está comprometido, são realizadas cirurgias de desvios para substituir as artérias coronárias, utilizando-se a veia safena ou uma artéria mamária interna. No entanto, muitos pacientes que sofrem de problemas na circulação periférica não podem recorrer a este tipo de cirurgia. Além disso, o número de vasos autólogos aos coronários são limitados e estes podem já terem sido utilizados em cirurgias anteriores.

Como alternativa a estes tratamentos têm sido utilizados diversos tipos de biomateriais. Biomaterial é definido como qualquer substância (que não fármaco) ou combinação de substâncias, sintéticas ou naturais, que podem ser utilizadas por qualquer período de tempo, como um todo ou parte de um sistema que trata, aumenta ou substitui qualquer tecido, órgão ou função do corpo.

O Politereftalato de etila (PET - Figura 1) é um poliéster aromático sintético largamente utilizado como biomaterial³, principalmente em: suturas,

reconstrução de tendões e ligamentos e implantes faciais. Sua utilização como biomaterial está relacionada às suas excelentes propriedades mecânicas e à sua moderada biocompatibilidade.

A aplicação médica de maior sucesso do PET é a reconstrução cirúrgica arterial^{4,5}. Enxertos vasculares de grande a médio diâmetro são manufaturados a partir de Dacron® usando uma extensa variedade de processos.

Figura 1. Estrutura química do PET

Figura 2. Próteses de Dacron

O uso de materiais poliméricos como substrato para crescimento celular aumentou consideravelmente tendo em vista o desenvolvimento de um grande número de tecnologias de modificação superficial. A modificação da superfície de polímeros é freqüentemente necessária para melhorar sua biocompatibilidade através da imobilização de proteínas^{6,7}.

O PET tem sido largamente estudado como matriz polimérica de suporte para a imobilização de células e biomacromoléculas^{8,9,10,11,12}. Na medicina é usado com sucesso na substituição de artérias de diâmetro elevado (> 6mm diâmetro interno), mas não foi obtido o mesmo sucesso na substituição de vasos sanguíneos de diâmetro reduzido (< 6mm). Vasos sanguíneos de elevado diâmetro apresentam maior taxa de fluxo sanguíneo que os vasos de diâmetro reduzido. Nos últimos, o baixo fluxo e a maior área de contato do sangue com a parede do enxerto fazem serem mais propensos à formação de trombos e à hiperplasia da camada miointimal¹³.

A cobertura incompleta das células endoteliais na superfície do enxerto vascular e a conseqüente hiperplasia da camada miointimal são as principais razões para a falha nos enxertos vasculares nos vasos de diâmetro reduzido^{14,15}. A endotelização¹⁶ é o método mais adequado para resolver este problema sendo utilizado para melhorar a desobstrução de enxertos vasculares de diâmetro reduzido, já que as células endoteliais podem liberar fatores para controlar a trombogênese ou fibrinólise, ativação ou inibição de plaquetas^{17,18}.

O processo de endotelização envolve a semeadura de células endoteliais autólogas na superfície luminal dos enxertos vasculares para permitir a formação de monocamadas de células endoteliais antes do implante. O método é capaz de aumentar significativamente a desobstrução dos enxertos vasculares¹⁹. Porém, devido à carência de funcionalidade bioativa, a endotelização espontânea de enxertos vasculares com PET é limitada.

Várias tentativas foram utilizadas para incorporar biomacromoléculas na superfície do PET, visando imitar as características de uma matriz extracelular natural, na qual sítios de reconhecimento da célula favorecem a interação material-célula^{20,21,22,23}.

A obtenção de um biomaterial ideal que apresente uma endotelização completa estaria associada a 2 fatores: (1) materiais constituídos por biomoléculas que funcionem como sinalizadores²⁴, e que (2) apresentem uma estrutura tridimensional semelhante à da matriz extracelular^{25,26,27}; características estas que facilitam a adesão e proliferação celular, e permitem a conjugação entre as células. Além disso, tendo em vista a sua aplicabilidade, deverá ainda apresentar facilidade de manipulação, produção, esterilização, armazenamento, baixo custo e possibilidade de obtenção em diversos comprimentos e diâmetros¹³.

Fisiologia Vascular

A constituição de uma artéria é extremamente complexa. Ela é formada por multicamadas de tecidos compostos por diferentes células e proteínas, com uma arquitetura responsável por elevada resistência mecânica, capaz de resistir a altas taxas de fluxo sanguíneo e altas pressões. A Figura 3 mostra a representação de uma artéria²⁸.

Figura 3. Representação de uma artéria. Ref 28

Uma artéria é formada por 3 camadas diferentes: *intima*, *media*, *adventitia*¹³. *Intima* é a camada mais interna da parede do vaso, responsável pela formação de uma barreira contra a ativação de plaquetas; é constituída de uma única camada de células endoteliais suportadas em uma membrana basal e em uma camada subendotelial constituída de colágeno tipo IV e elastina. *Media* é uma camada formada por inúmeras camadas de células do tecido muscular liso em uma matriz de colágeno tipo I e tipo III, elastina e proteoglicanos. *Adventitia* é a camada mais externa, constituída de fibroblastos e de colágeno tipo I randomicamente arranjados.

As proteínas majoritárias em uma artéria são colágeno tipo I e elastina. Estas conferem a elasticidade do vaso, que é refletida em sua capacidade de dilatação e compressão de acordo com a pulsação do sangue^{29,30}. É a natureza elástica da elastina que controla a resposta de deformação do vaso de acordo com a pulsação o que previne que seja dissipada energia na forma de calor^{31,32}.

Eletrofiação

A técnica de eletrofiação tem sido objeto de estudo de inúmeros trabalhos científicos, uma vez que proporciona a obtenção de materiais constituídos de fibras de diâmetro nanométrico a submicrométrico, a partir de um aparato simples e de custo baixo^{33,34}.

A eletrofiação, é uma técnica de fiação que utiliza forças eletrostáticas para produzir fibras finas a partir de soluções ou fundido de polímeros. O aparato de um sistema de eletrofiação é constituído por: bomba de infusão, uma seringa contendo a solução ou o fundido do polímero, uma agulha na ponta da seringa cujo diâmetro precisa ser especificado e um sistema coletor (que pode ser um aparato metálico estático aterrada ou diversos tipos de aparatos rotacionais). O sistema de eletrofiação pode ser montado na horizontal ou na vertical. A Figura 4 representa o aparato de eletrofiação na horizontal.

Figura 4. Esquema de um equipamento utilizado em eletrofiação

As fibras produzidas por eletrofiação encontram-se entrelaçadas tridimensionalmente de forma que os materiais eletrofiados apresentam características de elevada área superficial, elevada porosidade e pequenos tamanhos de poro³⁴.

Devidos às propriedades dos materiais eletrofiados, a técnica de eletrofiação vem sendo utilizada para a obtenção de materiais para diferentes aplicações, tais como: (1) na área biomédica³⁴, como suportes para a engenharia de tecidos, como curativos para feridas crônicas, como biosensores e na liberação controlada de drogas; (2) na área biotecnológica³⁴, como materiais de suporte para enzimas de importância catalítica para reações; (3) na área tecnológica³⁴, para a produção de roupas protetoras, para a fabricação de dispositivos eletrônicos minúsculos e células fotovoltaicas, e na fabricação de filtros de ar.

Na eletrofiação, a solução ou o fundido de polímero é submetido a um potencial elétrico de maneira a criar um desbalanço de cargas e, conseqüentemente, injeção de cargas no líquido, que é forçado através da agulha. Inicialmente, a tensão superficial forma uma gota com superfície semi-circular ou esférica na extremidade da agulha. Quando a força de atração supera a tensão superficial do líquido, a gota alonga-se formando um cone, conhecido como cone de Taylor, sendo então ejetada em direção ao pólo oposto - tipicamente um anteparo aterrado. A repulsão das cargas na superfície do jato é o principal fenômeno que provoca o estiramento e a redução do seu

diâmetro³⁵. Além disso, a alta densidade de carga gerada na superfície do jato da solução, associado a uma instabilidade mecânica durante o vôo, faz com que ocorra o chicoteamento do jato, fenômeno este conhecido como *whipping instability*, auxiliando no estiramento. O jato tem seu diâmetro reduzido ao mesmo tempo em que o solvente é eliminado e as fibras formadas com valores de diâmetro que variam de dezenas a centenas de nanômetros³⁶.

Estudando-se o processo de eletrofiação minuciosamente podemos dividi-lo em 3 etapas:

1. Evolução do jato de solução polimérica

- 1.1. Formação da gota na ponta da agulha³⁷

Se a solução polimérica for ejetada sem que exista a aplicação de um campo elétrico entre a agulha e o coletor ou que o campo não seja intenso o suficiente, a solução polimérica irá formar gotas na ponta da agulha que cairão por gravidade.

Se houver a atuação de um campo elétrico que não seja suficiente para iniciar o processo de eletrofiação, a solução polimérica continuará a formar gotas que cairão por ação da gravidade.

Esses fenômenos observados mostram que a força da gravidade e a força elétrica são forças que trabalham contra a força de tensão superficial na superfície da gota. Portanto o processo de eletrofiação somente é iniciado quando a força de tensão superficial se iguala à soma da força elétrica com a força gravitacional, porque neste momento gera-se uma instabilidade que é

dependente do balanço da tensão superficial e a força de repulsão das cargas na superfície.

1.2. Formação do cone de Taylor³⁷

A mudança da forma da gota de esférica para cônica define o início do estiramento, este ocorre porque se torna necessário o aumento da área superficial para acomodar as cargas em repulsão.

Uma fina fibrila emana do cone para criar uma área superficial adicional e esta viaja até atingir a superfície do coletor. Dependendo de quão estirado ou não o jato é tem-se o fenômeno de eletropulverização ou de eletrofiação.

Uma vez que o jato se torna mais fino este apresenta um aumento na relação de área superficial por massa e uma diminuição na relação carga de superfície por área. Paralelo a estes efeitos de estiramento do jato, temos o efeito da evaporação do solvente que trabalha no sentido contrário ao do estiramento e eleva a relação carga superficial por área.

2. Chicoteamento da fibra³⁷

Reneker e Chun propuseram que, devido à repulsão de cargas no jato, este se dividiria em muitos jatos mais finos que gerariam as fibras de aproximadamente mesmo diâmetro por carga por unidade de área. O diâmetro final da fibra seria portanto uma dependência de quantos jatos mais finos foram gerados³⁸.

Rutledge e colaboradores estudaram o processo de eletrofiação minuciosamente com câmeras que fazem aquisições de fotos em tempos inferiores a 18 ns, e provaram que o jato formador das fibras é único e instável^{39,40}. O grupo modelou o comportamento do jato com base em três tipos de instabilidade: a instabilidade de Rayleigh e mais dois modos condutores. A instabilidade axisimétrica de Rayleigh é governada pela tensão superficial que pode ser suprimida pela presença de altos campos elétricos ou altas densidade de carga³⁹. Os modos condutores são independentes da tensão superficial e são dominados por forças elétricas; um deles é o modo axisimétrico e o outro é o modo não axisimétrico que é o modo predominante no estiramento do jato (*whipping instability*)^{39,41}.

É o efeito de chicoteamento chamado de *whipping instability* que gera rapidamente um aumento drástico na área superficial acompanhado de uma acentuada diminuição de densidade de carga.

Este processo ocorre rapidamente e dependendo das condições experimentais pode ser gerada uma distribuição de carga desigual, neste caso podemos ter um material com uma morfologia que apresenta diferentes diâmetros.

Durante o chicoteamento do jato carregado 6 forças encontram-se em ação e a combinação destas forças é a responsável pela morfologia do material eletrofiado coletado³⁷. Essas forças são: (1) Força gravitacional (F_g); (2) Força eletrostática (F_E), que é decorrente das propriedades da solução que está sendo

eletrofiada e da voltagem aplicada; (3) Força coulômbica de repulsão (F_c), localizada na superfície do jato, esta induz a instabilidade e o chicoteamento, a magnitude desta força é característica do polímero e do solvente; (4) Forças viscoelásticas que trabalham contra a elongação do jato que está sobre a atuação do campo elétrico, é uma função do peso molecular do polímero, do solvente e do tipo de polímero; (5) Forças de tensão superficial que trabalham contra o estiramento do jato, e que é dependente das características do solvente, do polímero e da presença de aditivos; e (6) Forças de atrito estão presentes na interface da superfície do jato com o ar.

3. Solidificação do jato na forma de fibra no coletor³⁷

O tempo de elongação do jato pelo chicoteamento é governado pela relação de taxa de evaporação do solvente, distância, voltagem e fluxo da solução polimérica. Considerando-se distância, fluxo e voltagem constantes, o tipo de solvente será o único parâmetro responsável por eventuais diferenças na morfologia das fibras. Solventes com elevadas pressões de vapor tem suas fibras mais rapidamente vitrificadas e, normalmente, geram fibras com maior diâmetro do que solventes com baixa pressão de vapor, considerando-se as mesmas condições de processamento.

Foram relatados na literatura uma série de 13 aparatos diferentes utilizados para a coleta das fibras dependendo da necessidade de obtenção de

malhas eletrofiadas com fibras alinhadas e malhas eletrofiadas randomicamente⁴².

Muitas propriedades das soluções poliméricas e condições de processamento podem ser controladas para a obtenção de fibras com as características desejadas. Doshi and Reneker dividiram estes parâmetros em 3 grupos⁴³: (1) propriedades intrínsecas das soluções (viscosidade, concentração da solução, peso molecular do polímero, condutividade elétrica, tensão superficial); (2) condições de processamento (voltagem aplicada, distância da agulha ao coletor, fluxo da solução, diâmetro da agulha); e (3) condições ambientes (temperatura, umidade, pressão atmosférica).

Controlar e entender a influência de cada um destes parâmetros é um passo crucial para a obtenção das fibras eletrofiadas com características específicas para a aplicação desejada⁴⁴. A seguir descreveremos o efeito dos parâmetros de extrema relevância para o processo de eletrofiação.

1. Parâmetros da solução

1.1 Concentração

Para que ocorra a formação de fibras durante o processo de eletrofiação, uma concentração mínima de polímero na solução é necessária³⁴.

Pesquisadores relataram que a eletrofiação de soluções de baixas concentrações, produz malhas constituídas de fibras e esferas. À medida que a concentração da solução aumenta as esferas passam a adquirir uma forma mais

esticada, até se atingir uma solução de concentração ideal que produzirá fibras com diâmetro uniforme mais espessas do que as fibras obtidas a partir de soluções menos concentradas. Este fenômeno pode ser bem explicado, uma vez que o aumento da concentração acarreta em um aumento de viscosidade, que leva a uma maior resistência ao estiramento⁴⁵.

Em soluções muito concentradas a eletrofiação torna-se difícil pela dificuldade de manter o fluxo de solução através da agulha, o que resulta em fibras muito espessas⁴⁶, ou até mesmo impedindo por completo o processo de eletrofiação por evaporação do solvente na ponta da agulha⁴⁷.

1.2 Viscosidade

A viscosidade das soluções (controlada pela variação do polímero em solução) tem se mostrado em inúmeros estudos como sendo um dos principais fatores para a determinação da morfologia e diâmetro de fibra em estudos de eletrofiação³³.

Em geral, o aumento da concentração além de elevar a viscosidade da solução altera a tensão superficial desta. No entanto, estudos realizados com soluções de poliestireno com tensão superficial constante, mostraram que a quantidade de esferas diminui à medida que a viscosidade aumenta, resultado este que implica que a variação de viscosidade é a responsável pela mudança morfológica das fibras⁴⁸.

McKee e colaboradores⁴⁵ sugeriram que para a obtenção de malhas com fibras uniformes seriam necessárias soluções de 2 a 2,5 vezes mais concentradas que a solução de concentração *entanglement* (c_e), que é a concentração limite onde a interação polímero-polímero ainda é predominante à interação polímero-solvente.

Gupta e colaboradores⁴⁹ confirmaram a teoria de McKee e, além disso, a partir de estudos com polimetilmetacrilato (PMMA), sugeriram que existiria uma concentração crítica mínima de polímero em solução na qual existe o início de sobreposição de cadeias poliméricas (c^*). Gupta e colaboradores propuseram que soluções de concentrações abaixo de c^* não geram fibras, uma vez que não existe suficiente sobreposição entre as cadeias poliméricas, neste caso temos o fenômeno de eletropulverização. Em regiões semi-diluídas de concentrações maiores que c^* e menores que c_e , obtêm-se fibras e gotas; e somente, em soluções de concentração de pelo menos 2 vezes c_e , tem-se uma malha eletrofiada completamente uniforme⁴⁹.

1.3 Massa molar

A massa molar do polímero tem elevada importância em efeitos reológicos (viscosidade, tensão superficial) e em efeitos elétricos (condutividade)⁵⁰. Esta reflete no número de interações polímero-polímero e, conseqüentemente, no emaranhado entre as cadeias que estão em solução, o que afeta diretamente os valores de viscosidade.

Em geral, foi observado que soluções de polímeros com massa molar muito baixa geram materiais com predominância de esferas, enquanto que soluções de polímeros com alta massa molar podem formar malhas de fibras uniformes³⁴. A explicação deste fenômeno estaria justamente na possibilidade de entrelaçamento ideal entre as cadeias do polímero, que possibilitaria o estiramento da fibra.

Altos valores de massa molar não são essenciais para a eletrofiação. Polímeros de baixa massa molar, e que, conseqüentemente, apresentam baixa conectividade entre as cadeias podem ser eletrofiados desde que existam interações intermoleculares que, no sistema efetuem a mesma função das forças de entrelaçamento entre as cadeias poliméricas. Fosfolipídeos oligomerizados preparados a partir de soluções de lecitina têm sido eletrofiados utilizando-se tal conceito⁵¹.

1.4 Tensão superficial

A tensão superficial é um parâmetro dependente da composição do solvente na mistura. Em geral, a redução da tensão superficial leva a obtenção de fibras sem esferas, isto porque a tensão superficial é uma força contrária ao estiramento do jato de solução polimérica, portanto elevados valores de tensão superficial podem inibir ou provocar uma instabilidade no jato³⁴.

Soluções com baixa tensão superficial são interessantes pois necessitam da aplicação de um campo elétrico menor para serem eletrofiadas³⁴, no

entanto, não é possível afirmar generalizar que solventes com baixa tensão superficial são os mais adequados para a eletrofiação, uma vez que outros fatores estão correlacionados à eletrofiação.

1.5 Condutividade/Densidade de carga superficial

A condutividade das soluções poliméricas é determinada pelo tipo de polímero, pelo solvente e pela presença e/ou ausência de espécies iônicas. Em geral, o aumento da condutividade das soluções é realizado pela adição de sais, surfactantes aniônicos e surfactantes catiônicos.

A literatura relata que o aumento da condutividade elétrica da solução polimérica eletrofiada acarreta na diminuição do diâmetro das fibras, o comportamento oposto é observado para soluções de baixa condutividade³⁴.

2. Parâmetros de processamento

2.1 Voltagem aplicada

Um dos parâmetros de extrema relevância para o processo de eletrofiação é a voltagem aplicada. Somente após a aplicação de uma voltagem na qual a força do campo elétrico vence a força da tensão superficial, o jato é ejetado. Além disso, após a ejeção da solução polimérica, a ação do campo torna-se fundamental para a desestabilização do jato até sua chegada ao coletor.

Renecker e Chun proporam que não existe influência da voltagem sobre a eletrofiação do óxido de polietileno³⁸, enquanto Zhang⁵² e Demir⁵³ observaram

que maiores voltagens levam a uma maior ejeção de polímero o que leva a obtenção de fibras mais espessas. A maioria dos autores têm reportado que o aumento da voltagem leva a um aumento das forças de repulsão eletrostática no jato o que levaria a obtenção de fibras mais finas³⁴.

2.2 Fluxo

O fluxo é o parâmetro que determina a velocidade de ejeção da solução polimérica e a taxa de transferência de massa³⁴. Sabe-se que deve existir um fluxo contínuo de solução ao mesmo tempo que o solvente tenha tempo suficiente para evaporar⁵⁴ até que a fibra seja coletada. Alguns estudos mostraram que a elevada taxa de fluxo levou a obtenção de malhas eletrofiadas constituídas de fibras e esferas^{54,55,56}.

2.3 Distância da agulha ao coletor

A distância da agulha ao coletor é um parâmetro de eletrofiação importante uma vez que é necessário adaptar ao sistema uma distância ideal na qual o solvente tenha tempo para evaporar antes que as fibras atinjam o coletor.

Estudos relatam que distâncias muito pequenas ou muito grandes podem levar a obtenção de malhas que contêm esferas^{57,58}, ou malhas com fibras achatadas⁵⁹, ou malhas com fibras de menor diâmetro. A partir daí podemos

dizer que o efeito da distância na morfologia da malha eletrofiada é característico para cada sistema em estudo.

3. Parâmetros ambientais

Mit-Uppatham e colaboradores provaram em seus estudos de eletrofiação que à medida que a temperatura aumenta ocorre uma diminuição da viscosidade e como consequência são obtidas fibras mais finas⁶⁰.

Casper e colaboradores estudaram o efeito da umidade e observaram que o aumento da umidade leva a um surgimento de pequenos poros na superfície das fibras⁶¹. Estudos de eletrofiação sob condições de vácuo já foram relatados e mostraram que geram fibras de maior diâmetro que as fibras produzidas sob condições ambientes³⁸.

Colágeno

O colágeno é a proteína mais abundante no corpo humano e um componente chave da matrix extracelular (ECM). Ele é responsável por conferir integridade estrutural e resistência mecânica aos tecidos. Danos graves provocados nos tecidos necessitam de colágeno para a sua reparação, no entanto, o excesso ou a falta de colágeno na área que necessita ser reparada pode gerar problemas como fibrose, perda de atividade funcional ou até mesmo ruptura do tecido danificado⁶².

Colágeno é o nome genérico de uma classe de proteínas que compõe diversos tipos de tecido. No ser humano o número de tipos de colágeno excede a 20, mas todos os colágenos apresentam em comum a estrutura tripla hélice¹³.

Os colágenos mais importantes para a engenharia de enxertos vasculares são os colágenos tipo I, III e IV. Dentre estes, o tipo mais abundante é o colágeno tipo I que compõe tendões, cartilagens, dentina, córnea, tecido conjuntivo, tecido ósseo e vasos sanguíneos¹³.

Colágeno tipo I é formado por 3 cadeias α (2 cadeias α_1 e uma cadeia α_2) constituídas principalmente pela seqüência básica de 3 aminoácidos: glicina-prolina-hidroxiprolina (Figura 5), essas 3 cadeias α formam a estrutura terciária helicoidal do colágeno⁶³.

Figura 5. Principais aminoácidos constituintes do colágeno tipo I

A estrutura formada pelas três cadeias polipeptídicas α entrelaçadas é o tropocolágeno, este apresenta a forma de um bastão com comprimento e largura de aproximadamente 300 e 1,5nm, respectivamente, e peso molecular de 300kD (Figura 6b).

Figura 6 . (a) Fibras de colágeno <http://pbm.ct.utwente.nl/dopdrachten/yang.htm> (b) Tripla hélice do colágeno (Tropocolágeno) (c) Microfibrilas

O empacotamento ordenado das moléculas de tropocolágeno para formação das microfibrilas ocorre de forma regular e específica, onde a quinta molécula coincide com a primeira (Figura 6c). Esta configuração é alcançada principalmente devido à presença de interações de grupos hidrofóbicos e polares. Essas forças são suficientes para juntar as microfibrilas, mas não dão ao colágeno estabilidade mecânica suficiente. Essa última é alcançada pela formação de ligações cruzadas covalentes, que pode ser intramolecular (entre a mesma unidade de tropocolágeno) ou intermolecular (entre unidades de tropocolágenos). As fibras de colágeno são formadas pela associação das fibrilas de colágeno e fazem do colágeno uma proteína fibrosa de pouca extensibilidade e de alta resistência à tração⁶⁴.

O colágeno tem sido utilizado em biomateriais para diversas aplicações devido à sua predominância na ECM. Suas fibras apresentam importantes propriedades estruturais, uma vez que dão estabilidade mecânica, além disso funcionam como sinalizador biológico para células adjacentes que regulam importantes propriedades funcionais dos tecidos. O colágeno é um biopolímero indispensável na engenharia de tecidos por ter características como: é reabsorvível, tem alta afinidade por água, provoca baixa resposta do sistema imunológico, apresenta elevada compatibilidade com células de diferentes tecidos, e é capaz de promover a regeneração de um tecido danificado⁶⁵.

Blenda eletrofiada PET/colágeno

O colágeno nativo é uma proteína estrutural que confere a integridade mecânica do tecido. O colágeno eletrofiado não apresenta a mesma resistência mecânica, devido ao baixo grau de ligações cruzadas entre as cadeias α . Com isto, muitos pesquisadores propuseram a utilização de glutaraldeído como agente reticulante, tendo em vista a melhora na resistência mecânica do material pelo aumento das ligações cruzadas. No entanto, a utilização de agentes como glutaraldeído leva um aumento do risco de citotoxicidade e de calcificação quando o material for implantado *in vivo*¹³.

Neste contexto, a eletrofiação de blendas à base de colágeno se mostraram uma alternativa bastante interessante visto que, trata-se de um

processo simples, que requer um aparato de baixo custo e que utiliza uma diversidade menor de reagentes. Além disso, a presença de colágeno na superfície externa e interna do material promove um maior espalhamento das células pelo material.

Uma característica interessante dos materiais eletrofiados é que o diâmetro das fibras é da mesma ordem de magnitude que o diâmetro das fibrilas da matrix extracelular⁶⁶, o que mimetiza o tecido vivo e promove uma efetiva adesão e proliferação das células no suporte.

Blendas poliméricas são misturas físicas de dois ou mais polímeros, sem que haja ligação química entre estes. Uma das vantagens na produção de blendas é o desenvolvimento, de forma mais simples. Neste caso, *“a finalidade da mistura é a obtenção de um material de características físicas, químicas e físico-químicas diferenciadas, combinadas de modo a conservar as vantagens de cada polímero”*.

Wesolowski e colaboradores foram os primeiros a introduzir o conceito de um enxerto vascular bioreabsorbível, em 1960. Os primeiros materiais estudados foram aqueles compostos por uma variedade de Dacron e colágenos. O Dacron seria a parte permanente do implante que garante a estabilidade mecânica, enquanto o colágeno adiciona bioatividade e promove o crescimento do tecido nativo à medida que é degradado e refeito^{67,68}.

O desenvolvimento de um biomaterial híbrido de PET e colágeno eletrofiado pretende reunir as propriedades mecânicas e biocompatíveis do

PET, às propriedades de biocompatibilidade, elevada adesão e proliferação celular na presença do colágeno⁶⁹. Associado à propriedade dos materiais a técnica de eletrofiação, que permite a obtenção de materiais tridimensionais nanoestruturados com elevada porosidade que permitem a passagem de nutrientes e metabólitos, necessários para o recobrimento celular do material⁷⁰.

Uma outra vantagem da técnica de eletrofiação é a possibilidade de obtenção de tubos sem emendas¹³, que são necessários para a aplicação como enxerto vascular. Estes tubos podem ser criados em diferentes diâmetros dependendo unicamente do diâmetro da vaso que necessita ser reparado.

O desenvolvimento de biomateriais para a engenharia de tecidos a serem utilizados como enxertos vasculares está correlacionado à parâmetros intrínsecos do material como: propriedades de superfície^{71,72}, porosidade⁷⁰, rugosidade^{73,74}, propriedades mecânicas⁷⁵ e a compatibilidade de interface do material com o sangue⁷³, isto porque estas propriedades estão diretamente relacionadas à fatores como: adesão e crescimento de células endoteliais na superfícies do suporte, vascularização do enxerto e à não formação de trombos pela adsorção de proteínas no sangue.

2 Objetivos

O presente trabalho propõe a busca de novos materiais poliméricos a base de biomacromoléculas, com vistas a sua aplicação como biomateriais. Neste contexto, nos propomos ao estudo da produção de uma blenda PET/colágeno, e sua posterior eletrofiação, como modelo de um suporte para crescimento de células endoteliais, visando a produção de enxertos vasculares. Nestes termos, o estudo visa a produção de um material que combina as excelentes propriedades mecânicas do PET com as propriedades biológicas do colágeno.

Como objetivos específicos, nos propomos:

- (i) a estudar a eletrofiação do PET sob diversas condições de concentração, solvente, fluxo, voltagem e distância da agulha ao coletor, e entender como controlar os parâmetros de eletrofiação a fim de obter malhas eletrofiadas de diferentes diâmetros;
- (ii) utilizar o estudo da eletrofiação do PET como base para a produção de uma blenda PET/colágeno eletrofiada;
- (iii) variar condições de eletrofiação da blenda PET/colágeno afim de que sejam obtidas malhas eletrofiadas química e morfologicamente diferentes;
- (iv) caracterizar a blenda PET/colágeno morfologicamente, quimicamente e biologicamente, segundo os fatores que estão intrínsecos à sua aplicação como enxerto vascular;

(v) elucidar a distribuição polímero-colágeno nas fibras dos materiais e entender a disponibilidade do colágeno nos materiais eletrofiados.

3 Materiais

PET (em pellets), colágeno tipo I (em fibras), ácido trifluoroacético (TFA), álcool hexafluoroisopropanol (HFIP), rosa bengala, tampão TES (ácido N-[tris(hidroximetil)-metil]-2-aminoetanosulfônico), collagenase bacteriana para colágeno tipo I, tampão PBS (tampão fosfato salino), waffers de silício, glicerol, dodecil sulfato de sódio (SDS), bromofenol, tris-HCl e beta-mercaptoetanol foram obtidos da Aldrich.

O hidróxido de amônio (NH_4OH), a água oxigenada (H_2O_2) 20% (v/v), o cloreto de cálcio, o fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), o etanol, o diclorometano, a formalina, a acetona, o acetato de etila e o DMSO (dimetil-sulfóxido) foram obtidos da Synth. O diclorometano (CH_2Cl_2) obtido da Synth foi submetido à secagem com cloreto de cálcio por 12 horas, filtrado e destilado sob refluxo à temperatura de 40°C . O solvente foi armazenado em frasco escuro com peneira molecular 3A.

O padrão de baixa massa molar (Page Ruler) para eletroforese foi obtido da Fermentus.

O padrão de alta massa molar (HiMark) para eletroforese, *Dulbecco's modified Eagle's* (DMEM), o soro fetal bovino, a estreptomicina e a penicilina foram obtidos da Invitrogen.

O comassie azul brilhante R 250 foi obtido da Merck.

O MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)) foi obtido da Sigma.

Os fibroblastos 3T3-L1 foram gentilmente cedidos pela Prof^a Mari Cleide Sogayar do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP). As células endoteliais *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (HUVEC) foram gentilmente doadas pela Prof^a Dulcineia Saes Parra Abdalla do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP).

4 Métodos

4.1 Obtenção dos materiais eletrofiados

4.1.1 Eletrofiação do Poliéster

O aparato utilizado na eletrofiação é composto de uma fonte de alta voltage (Glassman High Voltage, Inc. Series EH high-voltage), uma bomba de infusão (Cole Parmer, Hz 50/60) conectados a uma seringa que contém uma agulha metálica de diâmetro 0,84 mm em sua ponta, por onde a solução polimérica é ejetada, e a uma placa metálica onde as fibras foram recolhidas. O processo foi realizado sob temperatura de 22 °C e umidade menor do que 40%. O aparato descrito foi mostrado na Figura 4.

4.1.2 Eletrofiação da co-solução PET-colágeno

As soluções das blendas de PET-colágeno foram preparadas seguindo o procedimento: foram pesadas a massa de PET e de colágeno, e adicionou-se o volume de solvente, afim de serem obtidas as soluções na concentração desejadas. A solução final foi agitada em Vortex periodicamente e mantida em banho termostatizado a 40 °C durante 3 dias.

Foi realizada uma varredura de proporção em massa de PET e colágeno na blenda variando-se a massa total de polímero em solução (0,675-1,125 g),

distância da agulha ao coletor (12,5-20 cm), fluxo de solução polimérica (0,1-5,0 mL/h) e voltagem aplicada (25-40 kV), utilizando-se como solventes HFIP e HFIP/TFA 7:2.

Foram eletrofiadas blendas de PET-colágeno, em HFIP, sob uma mesma condição: fluxo de 3,0 mL/h, distância de 30 cm e voltagem de 25 kV, afim de manter constante o parâmetro de transferência de massa. As soluções das blendas PET-colágeno preparadas foram solubilizadas em HFIP, mantendo-se a massa total polímero-colágeno constante, no entanto, a correlação entre a massa de PET e a massa de colágeno na solução foi variada de 100% PET até 100% de colágeno.

4.2 Obtenção dos filmes de PET/colágeno por revestimento rotacional

As placas de silício utilizadas na fabricação dos filmes foram previamente submetidas à fervura durante 30 minutos com solução oxidativa $\text{H}_2\text{O}_2/\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ 1:1:5 (v/v)⁷⁶.

As placas de silício foram lavadas 3x com 30 μL de acetona e 3x com 30 μL de acetato de etila. Os filmes foram obtidos por revestimento rotacional a partir de soluções de concentração de 30 mg/mL até 7,5 mg/mL. 30 μL de solução foram depositados na superfície das placas de silício (de dimensões 1cm x 1cm), que foram submetidas a uma rotação de 2800 rpm durante 1 minuto. Para cada

concentração foram preparadas triplicatas com e sem o tratamento térmico a 130 °C.

4.3 Obtenção do colágeno desnaturado, colágeno pós-solubilizado e colágeno eletrofiado

O colágeno tipo I nativo (**C**) foi solubilizado em HFIP. Borbulhou-se nitrogênio gasoso na solução até que praticamente todo o solvente fosse eliminado. O sólido residual foi liofilizado por 4 dias. Este colágeno foi chamado de colágeno pós-solubilização (**Cs**).

C foi solubilizado em HFIP, em seguida eletrofiado sob fluxo de 3mL/h, 25 kV e 30 cm. O material foi liofilizado por 3 dias para eliminar eventuais resíduos de solvente. Este colágeno foi chamado de colágeno pós-eletrofiação (**Ce**).

C foi solubilizado em HFIP, em seguida, foi colocado em banho termostático a 100 °C durante 30 minutos, este colágeno foi chamado de colágeno desnaturado (**Cdn**).

4.4 Caracterização das malhas eletrofiadas e filmes

4.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os materiais produzidos via eletrofiação foram liofilizados por 48 horas e as amostras foram recobertas com Au (2 nm de espessura) para análise via MEV utilizando um microscópio da marca Jeol, modelo FEG 7401F. Utilizou-se para

todas as análises de microscopia o detector de elétrons secundários no modo LEI.

4.4.2 Distribuição de diâmetros e Porosidade das Malhas eletrofiadas

Os materiais eletrofiados tiveram seus diâmetros medidos (100-200 fibras/amostra) obtendo-se curvas gaussianas das medidas de diâmetro.

A porosidade da malha eletrofiada foi calculada com base na Equação 1²³.

$$\text{Porosidade} = \left[1 - \frac{(\text{Densidade aparente})}{(\text{Densidade absoluta})} \right] \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

onde a densidade aparente foi calculada a partir da massa e dimensões da malha eletrofiada, densidade absoluta do PET⁷⁷ e densidade absoluta do colágeno⁷⁸ foram consideradas iguais a 1,4 g/cm³.

4.4.3 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

As análises de FTIR foram feitas em pastilhas de KBr, em equipamento FTIR Bomen MB100 com faixa de operação entre 350-4000 cm⁻¹ (resolução de 4 cm⁻¹).

4.4.4 Análise Térmogravimétrica (TGA)

As curvas termogravimétricas foram obtidas na faixa de temperatura que vai de 25 até 700 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min e fluxo de nitrogênio de 50 mL/min. O equipamento utilizado foi Hi-Res TGA 2950 Termogravimetric Analyzer TA Instruments. As curvas obtidas foram tratadas no programa TA Analysis.

4.4.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas de DSC foram obtidas na faixa de temperatura de 25-280 °C, sob taxa de aquecimento de 20 °C/min e fluxo de nitrogênio de 50 mL/min. Foi realizada a rampa de aquecimento /resfriamento/ aquecimento. O equipamento utilizado foi o Q10-0535-DSC da TA Instruments. Para cada amostra foram realizadas 3 corridas. As curvas obtidas foram tratadas no programa TA Analysis.

4.4.6 Ensaio de digestão das malhas com colagenase

O protocolo utilizado baseou-se em relatos da literatura^{79,80}. No entanto, o controle utilizado para o tempo do experimento foi o tempo de digestão de **C** e **Ce**.

Foram pesados 25 mg das amostras de **C**, **PET** eletrofiado, **S_{8,2}**, **S_{4,6}** e **Ce**. Estas amostras foram imersas em 5 mL da solução tampão TES 50mM com 0,36 mM de Cloreto de Cálcio a 37 °C, pH 7,4 e 0,1 mL de solução de colagenase 0,1 mg/mL solubilizada na solução tampão de TES.

As malhas após a digestão por 7 e 16 dias foram analisadas via Microscopia eletrônica de Varredura.

4.4.7 Microscopia Confocal Raman (MCR)

Para as análises utilizou-se um Microscópio Raman Confocal da marca *Witec* com laser de excitação em 532 nm na faixa de 0 a 4000 cm⁻¹, potência máxima de 100 mW e harmônica em 1046 nm com potência máxima em 50 mW. A objetiva utilizada possui aumento 100 vezes e resolução lateral de 400 nm.

Esta análise foi realizada pelo método Basis Analysis⁸¹ que compara o espectro da amostra como a contribuição dos espectros dos compostos puros isolados. A área scaneada foi de 15 x 13 µm, sendo 112 pontos por linha e 97 linhas por imagem, dando um total de 10864 espectros adquiridos com tempo de aquisição individual de 0,33 segundos.

4.4.8 Medidas de ângulo de contato

Os filmes foram produzidos por revestimento rotacional (spin-coating). As medidas de ângulo de contato foram realizadas utilizando-se o método da gota sésil⁸². O ângulo de contato de avanço (θ_A) foi medido após o depósito de uma gota de 8 μL . O ângulo de recesso (θ_R) foi medido após a retirada de 4 μL do volume da gota depositada inicialmente. Foram tiradas fotos das gotas na superfície dos materiais. Utilizou-se o programa ImageJ para a medida do ângulo formado da gota com a superfície do material.

A histerese (δ) dos filmes foi calculada a partir da Equação 2 mostrada abaixo.

$$\delta = \theta_A - \theta_R \quad (\text{Equação 2})$$

Os resultados mostrados foram obtidos através de 1 medida em 6 diferentes filmes de uma mesma amostra.

4.4.9 Cálculo da energia de superfície

A medida da energia de superfície dos materiais foi obtida pelo método de Owens-Wendt por medida indireta através do método da gota sésil e da equação da média harmônica de Wu^{83,84}.

A medida dos ângulos de avanço foi realizada com os líquidos-teste água e diiodometano. A energia de superfície (γ_s) foi decomposta em duas

componentes: uma componente dispersiva (γ_s^D) e uma componente não-dispersiva ou polar (γ_s^P)^{83,84}. Os resultados mostrados foram obtidos pela análise de 6 filmes para cada amostra.

4.4.10 Ensaio mecânico de tração

Amostras com dimensões aproximadamente iguais a 15 por 6 mm foram submetidas ao ensaio de tração. Este consistiu em uma rampa de força (1N/min), sendo a força inicial de 0,0010 N, monitorando-se a deformação do material em função da força aplicada. A temperatura foi mantida constante e igual a 27 °C. O torque aplicado foi de 3 libras/polegada². Para cada amostra o ensaio foi realizado em quadruplicata. O equipamento utilizado foi o DMA Q 800 da TA Instruments.

A partir dos gráficos de força versus deformação obtidos foi calculado o Módulo de Young (E), a força de ruptura (σ_b) e a deformação de ruptura (ϵ_b) utilizando-se o programa TA Analysis.

4.4.11 Ensaio de adesão, viabilidade e proliferação celular com fibroblastos (3T3-L1) e HUVECS

As membranas foram cortadas, colocadas em placas de cultura e expostas à luz UV, por 15 minutos, para esterilização. O meio de cultura utilizado foi DMEN suplementado com 10% de soro de bezerro (CS), 1% de antibiótico

(penicilina 10000 unidades/mL estreptomicina 10000 µg/mL) e 0,1 % de antifúngico (anfotericina 50 mg/mL). Foi adicionado meio de cultura nas amostras e estas foram incubadas na estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após 20 horas o meio foi retirado e adicionou-se uma suspensão de 5 x10⁴ células/mL. O material foi mantido na estufa a 5% CO₂ e 37 °C. O meio foi trocado todos os dias. Os fibroblastos utilizados foram da linhagem 3T3-L1.

Para o ensaio de adesão retirou-se as membranas da cultura após 1 dia de incubação. Estas foram lavadas com PBS e as células fixadas com formalina 10% por 15 minutos. Para a microscopia eletrônica de varredura, o material foi desidratado em soluções crescentes de etanol (25, 50, 70, 90, 95, 100, 100), 10 minutos em cada concentração. As amostras foram liofilizadas.

Para o ensaio de viabilidade e proliferação celular foi utilizado o ensaio com MTT⁸⁵. O ensaio de MTT é específico para a determinação da viabilidade e da proliferação das células no suporte, uma vez que o corante dentro da mitocôndria das células ativas sofre redução, passando de uma coloração amarela para uma coloração roxa. A solução final teve sua absorbância determinada em 490 nm. Cada medida foi realizada em triplicata. A significância dos dados foi obtida pelo two-way ANOVA teste.

Os resultados obtidos no ensaio de MTT foram tratados estatisticamente, os materiais foram comparados com relação aos valores de significância (p). Valores de p> 0.05 são não significativos (ns), para valores de 0.01<p<0.05 (*),

para valores de $0.001 < p < 0.01$ (**) e para valores $p < 0.001$ (***), de tal forma que o nível de significância é maior para os menores valores de p.

Os ensaios com células HUVECS imortalizadas provenientes do cordão umbilical foram realizados utilizando o mesmo procedimento usado para as células 3T3-L1. Para o ensaio de adesão com as células HUVECS as membranas foram retiradas da cultura após 1 dia, 4 dias e 7 dias.

4.5 Caracterização do colágeno eletrofiado

4.5.1 Eletroforese (SDS-page)

Foram preparadas as seguintes soluções a fim de verificar-se a influência do solvente na degradação da estrutura do colágeno.

Solução 1 – **C** solubilizado em tampão de amostra

Solução 2 – **C** solubilizado em HFIP

Solução 3 – **C** solubilizado em HFIP/TFA 7:2

Para cada 5 μ L de cada uma das soluções adicionou-se 5 μ L de tampão de amostra. As soluções que apresentaram pH abaixo de 7 foram neutralizadas com tris-HCl. As soluções finais de colágeno foram colocadas em um banho termostático a 95 °C durante 10 minutos e aplicadas no gel. As amostras foram diluídas em tampão de amostra 1X concentrado (glicerol, SDS, bromofenol, tris-HCl, beta-mercaptoetanol, pH 6,8) e utilizou-se o padrão de

peso molecular Page Ruler da Fermentus. As amostras foram submetidas a uma diferença de potencial de 80 V durante 60 min e, logo depois, 100 V 90 min.

Um segundo experimento de SDS-page foi realizado para a verificação de qual etapa do processamento do colágeno é a responsável por sua degradação. Foram preparadas soluções de **C**, **Cs** e **Ce** em NaH_2PO_4 0,01 M pH 7,1 . As amostras foram diluídas em tampão de amostra 1X concentrado (glicerol, SDS, bromofenol, trisHCl, beta-mercaptoetanol, pH 6,8) e utilizou-se o padrão de peso molecular HiMark da Invitrogen. As amostras foram fervidas por 10 minutos e submetidas a uma diferença de potencial de 80 V durante 60 min, seguido de 100 V por 90 min.

Para ambas as análises foram utilizados gel de corrida de SDS-PAGE (Dodecil sulfato de sódio/Poliacrilamida) 10% e, logo acima deste, um gel de empacotamento de 4%. Os géis foram revelados com Comassie Blue.

4.5.2 *Dicroísmo circular (CD)*

As amostras **Ce** e **Cdn** foram solubilizadas em NaH_2PO_4 0,01M pH 7,1. A concentração da solução foi de 1 mg/mL. Foram realizadas 6 aquisições utilizando-se um caminho óptico de 0,2 mm, a velocidade de obtenção do espectro de 0,5 nm/s e fluxo de N_2 4 L/min. A região de espectro analisada foi de 190-260 nm. O equipamento utilizado foi da marca Jasco – modelo J720.

5 Resultados e Discussão

5.1 Eletrofiação do Poliéster

O PET é um polímero insolúvel nos solventes mais usuais, como: clorofórmio, água, etanol, dimetilformamida, e para a sua solubilização é necessário um solvente com caráter ácido, como TFA e HFIP. No entanto, a solubilização do PET em meio fortemente ácido necessita o cuidado de que tanto solvente como soluto estejam secos, pois a presença de água ou umidade no meio ácido pode provocar a reação de hidrólise do poliéster.

A maioria dos autores que tratam sobre eletrofiação do PET utilizam como solvente ácido o TFA⁴⁴, tanto na forma pura, como em misturas com outros solventes, como o diclorometano.

Diversos autores já propuseram a eletrofiação do PET^{44,86,87} seja ele puro, sob forma de compósito ou sob a forma de blendas. Veleirinho *et al.*⁴⁴ estudou o efeito do solvente e da concentração da solução de PET as seguintes condições:

- Fluxo: 0,2 mL/min
- Distância: 20 cm
- Voltagem: 26 kV
- Faixa de Concentração: 10% - 30%
- Solvente: TFA/CH₂Cl₂ (diversas proporções v/v)

Considerando-se as possibilidades de eletrofiação descritas por Veleirinho *et al.*⁴⁴, foram realizados experimentos para que fosse verificado a importância dos (1) parâmetros de processamento: fluxo, voltagem, distância da agulha ao coletor; e dos (2) parâmetros de solução: concentração e solvente.

Estudos comparativos da eletrofiação do PET em HFIP em TFA/CH₂Cl₂ foram realizados tendo como objetivo a comparação da morfológica das malhas obtidas. Além disso, o estudo da eletrofiação do PET em HFIP foi utilizado como ponto de partida para a eletrofiação da blenda PET-colágeno, uma vez que a literatura relata a eletrofiação do colágeno utilizando como solvente HFIP⁸⁸.

5.1.1 Estudo dos parâmetros de eletrofiação do PET

As eletrofiações de soluções de PET 10% (m/v) em HFIP, assim como a eletrofiação das soluções de PET 10% em (m/v) TFA/CH₂Cl₂ 30:70, não foram bem sucedidas, visto que nestas concentrações as esferas são predominantes em relação às fibras, o que inviabiliza esta condição de trabalho para a aplicação desejada.

A literatura explica que nestes casos o fenômeno de eletropulverização foi predominante ao da eletrofiação, pois a solução encontrava-se num regime diluído em que as interações polímero-solvente são predominantes às interações polímero-polímero, sendo estas últimas necessárias para que as cadeias poliméricas encontrem-se entrelaçadas em solução e durante o

estiramento do jato estas possam deslizar umas sobre as outras a fim de permitir um jato estirado contínuo⁴⁹.

A Tabela 1 mostra algumas das condições de eletrofiação utilizadas para a verificação do efeito da concentração de PET no sistema.

Tabela 1. Condições de eletrofiação das soluções de PET 15% e 24% em HFIP

Condição	%PET (m/v)	Fluxo (mL/h)
1	15	3,0
2	15	1,0
3	24	1,0

Voltagem: 25 kV; Distância: 30 cm; Temperatura: 20 ± 2 °C; Umidade: $45 \pm 5\%$

Soluções de PET 15% (m/v), em HFIP, produzem malhas eletrofiadas que, dependendo do fluxo, podem ter ausência ou presença de gotas, como pode ser observado pelas imagens de MEV presente nas Figura 7 e Figura 8. Nesta concentração, a solução estaria em um regime semi-diluído, em que existe sobreposição das cadeias poliméricas mas ainda não foi atingida a concentração *entanglement* (c_e).

Aumentando a concentração de PET até 24% em HFIP, somente fibras foram observadas sob todas as condições de processamento estudadas (Figura 9). Portanto, pode-se inferir, que esta condição de concentração é a condição ideal para a obtenção de fibras uniformes, uma vez que deve ter sido atingida a sobreposição das cadeias e a formação de emaranhados.

Figura 7. Imagens de MEV da amostra obtida a partir da condição 1

Figura 8. Imagens de MEV da amostra obtida a partir da condição 2

Figura 9. Imagens de MEV da amostra obtida a partir da condição 3

Observou-se que a medida que a concentração da solução aumenta, ocorre aumento do diâmetro da fibra, em vista do aumento da viscosidade da solução que é uma força contrária ao estiramento da fibra. Este efeito do aumento da concentração da solução versus morfologia da malha eletrofiada obtida foi relatado anteriormente para o PET⁴⁴ e para outros polímeros^{29,48,58,89}.

A Tabela 2 mostra a série de experimentos realizados a fim de verificar o efeito do fluxo sob a eletrofiação do PET em TFA/CH₂Cl₂ 30:70.

Tabela 2. Efeito do fluxo na eletrofiação do PET

Condição	Fluxo (mL/h)
4	12
5	9
6	5
7	1,5
8	0,5
9	0,1

Solução de PET 15% (m/v); Solvente -TFA/CH₂Cl₂ 30:70; Distância - 20 cm; Voltagem - 25 kV
Temperatura: 20 ± 2 °C; Umidade: 45 ± 5%

Observou-se que em fluxos superiores a 5 mL/h, obtêm-se somente gotas. No entanto, à medida que o fluxo diminui, a correlação entre o número de fibras e o número de esferas é cada vez maior, ou seja, o número de gotas diminui à medida que o fluxo diminui. A condição 9 foi a melhor condição de eletrofiação obtida, pois apresentou-se ausente de gotas.

Estes resultados do efeito do fluxo na eletrofiação do PET são compatíveis com resultados descritos na literatura em que fluxos elevados, ao invés do fenômeno de eletrofiação têm-se o processo de eletropulverização e à medida que o fluxo diminui o número de gotas torna-se cada vez menor^{55,56,57}. Alguns pesquisadores sugeriram que a obtenção de malhas eletrofiadas que contêm esferas estaria associada a uma elevada concentração de solvente que teria

como consequência a não completa secagem do jato até o momento em que este atinge o coletor^{54,55,56}.

O efeito da voltagem aplicada foi relatado por Ramakrishna *et al.*⁹⁰ como interligado à quantidade e à forma das gotas. O efeito da voltagem sobre a quantidade de esferas é controverso, e não existe uma generalização. Existem relatos em que o aumento da voltagem gera um aumento das forças repulsivas no jato, e este sofreria um maior estiramento durante sua viagem até o coletor; em outras observações o aumento da voltagem foi correlacionado ao aumento do número de esferas^{29,50,53,57}.

A Tabela 3 mostra uma série de experimentos realizados para observar o efeito da voltagem aplicada sob a malha eletrofiada obtida a partir de soluções de PET em TFA/CH₂Cl₂ 30:70. Os parâmetros de concentração, solvente, fluxo e distância foram fixados e variou-se a voltagem aplicada.

Tabela 3. Estudo da influência da voltagem na eletrofição do PET

Condição	Voltagem (kV)
10	10
11	20
12	30
13	40

Solução de PET 15% (m/v); Solvente -TFA/CH₂Cl₂ 30:70; Distância - 20 cm; Fluxo – 0,1 mL/h
Temperatura: 20 ± 2 °C; Umidade: 45 ± 5%

As malhas 10, 11, 12 e 13, obtidas nas condições da Tabela 3, foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura. Para cada condição, estão mostradas as fotos com ampliação de 500 e 5000. Os resultados estão mostrados abaixo nas Figuras de 10 a 13.

Figura 10. Imagens de MEV da amostra obtida na condição 10

Figura 11. Imagens de MEV da amostra obtida na condição 11

Figura 12. Imagens de MEV da amostra obtida na condição 12

Figura 13. Imagens de MEV da amostra obtida na condição 13

A partir das imagens de MEV foram realizadas as medidas de diâmetro das fibras. Estes resultados estão mostrados na Figura 14.

Figura 14. Distribuição dos diâmetros das fibras obtidas pelo estudo da influência da voltagem. Valores de diâmetro médio obtido pelo máximo populacional da distribuição gaussiana (‡) limites superiores e inferiores da gaussiana.

Através do MEV concluiu-se que somente a amostra submetida a uma voltagem de 10 kV (condição 10; campo elétrico = 500 V/cm) apresentou malha ausente de esferas. Através do gráfico mostrado na Figura 14 concluiu-se que a malha ausente de esferas (condição 10) apresenta um diâmetro médio de fibra

que corresponde, em média, ao dobro daquele apresentado pelas demais amostras, e que tem uma maior faixa de distribuição de diâmetros.

A presença de esferas na malha eletrofiada é característica da distribuição desigual de cargas na solução polimérica durante o estiramento do jato. As fibras de diâmetro bem pequeno seriam de regiões do jato que foram muito mais estiradas do que as esferas, portanto acaba ocorrendo uma distribuição desigual de massa do polímero.

Sob condições de voltagem menor, portanto de campo elétrico menor, a força elétrica exercida sobre o jato é menor e, conseqüentemente, a repulsão de cargas na superfície do jato será menor e este estirará menos, o que produzirá fibras mais espessas do que as obtidas sob maiores voltagens. A condição 10, provavelmente ainda não é a condição ideal de eletrofiação do PET, pois apesar da ausência de esferas tem uma larga distribuição de diâmetros.

Foi proposto um planejamento fatorial qualitativo do tipo 2^3 , mostrado na Tabela 4, para a verificação mais acurada dos parâmetros que influenciam na obtenção de malhas ausentes de gotas. Foram variados: o fluxo, a voltagem e a distância da agulha ao coletor.

Na Figura 15 e na Figura 16, estão mostradas fotos de MEV de 2 malhas eletrofiadas, obtidas através do planejamento da Tabela 4. A partir destas, concluiu-se que o fluxo é o parâmetro de maior importância, dentre os parâmetros de processamento, visto que, todas as malhas eletrofiadas sob fluxo

de 0,5 mL/h, independente da voltagem e da distância, apresentaram grande quantidade de gotas. As malhas eletrofiadas sob fluxo de 0,1 mL/h, apresentaram pequena quantidade de gotas (sob 30 kV), ou ausente de gotas (sob 10 kV).

Tabela 4. Planejamento fatorial de eletrofiação do PET

Condição	Distância (cm)	Voltagem (kV)	Fluxo (mL/h)	Resultados
14	+	+	+	-
15	+	+	-	-
16	+	-	+	-
17	+	-	-	+
18	-	+	-	-
19	-	-	+	-
20	-	+	+	-
21	-	-	-	+

Solução de PET 15% (m/v); Solvente -TFA/CH₂Cl₂ 30:70; Distância: (+) 30 cm (-) 20 cm; Voltagem: (+) 30 kV (-) 10 kV Fluxo: (+) 0,5 mL/h (-) 0,1 mL/h; Resultados: Ausência de gotas (+) Presença de gotas (-); Temperatura: 20 ± 2 °C; Umidade: 45 ± 5%

Figura 15. Imagens de MEV da malha obtida pela condição 15

Figura 16. Imagens de MEV da amostra obtida pela condição 20

A distância mostrou ser um parâmetro de pouca influência na formação de gotas e na distribuição de diâmetros. Supomos que isto ocorra porque embora a distância tenha variado, os valores continuaram dentro de uma janela de trabalho que permitia dois fenômenos básicos da eletrofiação continuarem a ocorrer sem alterações: (1) a evaporação do solvente até que a fibra atingisse o coletor e (2) a força do campo elétrico, resultante da relação voltagem aplicada e distância, seria suficiente para vencer a tensão superficial da gota formada na ponta da agulha o que permitiria o a ejeção e o estiramento do jato.

O estudo dos parâmetros que influenciam a eletrofiação do PET foram fundamentais para um conhecimento prévio do sistema e para a obtenção de malhas eletrofiadas de diâmetro micro- e nanométrico, dependendo das condições de processamento, como mostrado na Tabela 5.

Apesar do comportamento geral observado através de variações de fluxo, voltagem e concentração foram os mesmos para ambos os solventes utilizados na eletrofiação do PET. No entanto, as condições ideais de eletrofiação de PET

em HFIP não foram idênticas para eletrofiar soluções de PET em TFA/CH₂Cl₂ 30:70 e vice-versa.

Tabela 5. Malhas eletrofiadas de PET de diâmetro micrométrico e de diâmetro nanométrico

Condição	Concentração % m/v	Solvente	Fluxo (mL/h)	Voltagem (kV)	Distância (cm)	Diâmetro médio (μ m)
2	15	HFIP	1,0	25	30	1,5
10	15	TFA/CH ₂ Cl ₂ 30:70	0,1	10	20	0,45

O solvente utilizado na eletrofiação tem forte influência no processo, devido aos seus parâmetros como tensão superficial, pressão de vapor e constante dielétrica. A Tabela 6 compara os parâmetros de importância para a eletrofiação, considerando-se os solventes puros e os solventes utilizados na eletrofiação.

Podemos verificar pelos dados da Tabela 6, que TFA/CH₂Cl₂ 70:30 e HFIP apresentam valores próximos de pressão de vapor e de tensão superficial o que explica a similaridade dos efeitos dos parâmetros de relevância da eletrofiação para os dois sistemas de solvente utilizados. Não foram realizadas as medidas de viscosidade das soluções de PET em HFIP e em TFA/CH₂Cl₂ 70:30, mas

observamos que a diferença de viscosidade entre soluções de mesma concentração de PET em cada um dos solventes é visualmente muito diferente.

Tabela 6. Parâmetros comparativos dos solventes puros e dos solventes utilizados na eletrofiação, à 25 °C

Solvente	Pressão de vapor (P) (kPa)	Constante dielétrica	Tensão Superficial (10⁻³J/m²)
CH₂Cl₂	47 ⁴⁴	8,9	13,4 ⁴⁴
TFA	14 ⁴⁴	42,1 ⁴⁴	27,2 ⁴⁴
CH₂Cl₂/TFA 70:30 (v/v)	25 *	-	24 **
HFIP	21 ^a	16,7 ⁴⁵	20 **

*Valor calculado a partir da Lei de Raoult ($P_{\text{mist}} = x_{\text{CH}_2\text{Cl}_2}P^{\circ} + x_{\text{TFA}}P^{\circ}$), onde P° representa a pressão de vapor dos solventes puros

a. http://www.chemicalbook.com/ProductMSDSDetailCB3251829_EN.htm

** Valores determinados experimentalmente à temperatura de 20 °C em tensiômetro da marca Kruss

O efeito da diferença de viscosidade devido o solvente já poderia ser previsto considerando-se que o TFA/CH₂Cl₂ 70:30 representa um solvente com maior possibilidade de interações polímero-solvente, já que o TFA além de ser uma molécula de elevado momento dipolar apresenta pKa próximo de zero, o que representaria a possibilidade de quebra de ligações de hidrogênio intramoleculares do PET, responsáveis pela alta coesão da sua estrutura no estado sólido. Assim, a mistura TFA/CH₂Cl₂ seria capaz de promover um maior desenovelamento da cadeia do polímero devido a formação de ligações

polímero-solvente mais estáveis do que as ligações polímero-polímero. A consequência disto é que soluções de PET em TFA/CH₂Cl₂ teriam maior tendência à formação de esferas e à formação de fibras em condições de diâmetro não uniformes.

Como foi citado anteriormente, um dos fatores mais importantes para que ocorra a eletrofiação de uma solução é que se obtenha um jato contínuo de polímero. Para que isto ocorra, um dos fatores necessários é a sobreposição das cadeias do polímero alcançada somente quando as interações polímero-polímero são predominantes às interações polímero-solvente. Uma forma de tentar contornar o problema seria a eletrofiação de soluções de PET em TFA/CH₂Cl₂ de concentração mais elevada .

Fazendo-se um paralelo entre os resultados obtidos neste trabalho e os resultados obtidos por Veleirinho *et al.*⁴⁴, observamos resultados semelhantes. Ambos concluem que a concentração de PET em TFA/CH₂Cl₂ necessária para a obtenção de materiais eletrofiados deve ser superior a 10%. A faixa de variação de diâmetro das fibras obtidas foram de 200-700 nm, em TFA/CH₂Cl₂, e à medida que a concentração da solução polimérica aumenta, o diâmetro das fibras também aumenta e as malhas tornam-se mais uniformes. Assim, o aumento da concentração leva a um aumento de viscosidade dificultando o estiramento do jato e levando à formação de fibras mais espessas.

5.2 Eletrofiação da co-solução de PET-colágeno

Os estudos de eletrofiação da co-solução PET-colágeno foram iniciados a partir do estabelecimento de uma janela de trabalho entre os resultados obtidos previamente dos parâmetros de eletrofiação do PET e os estudos relativos à eletrofiação do colágeno⁸⁸ propostos por Matthews *et al.*

Matthews *et.al.*⁸⁸ obteve nanofibras de colágeno puro a partir da técnica de eletrofiação utilizando como solvente o HFIP. No entanto, o presente trabalho utilizou além deste solvente, a mistura HFIP/TFA 7:2 (v/v). A tentativa da utilização de HFIP/TFA 7:2 como solvente para a blenda foi realizada em busca de uma facilidade na solubilização do colágeno e, também, para a comparação das características morfológicas do material produzido.

Um fator importante a ser considerado é o valor de pK_a dos solventes, o pK_a do TFA é 0,5 enquanto o do HFIP⁸⁸ é 9,4; logo o TFA é 10^9 vezes mais forte que o HFIP, e que portanto, levaria a uma solubilização do colágeno mais rápida.

No colágeno nativo as interações intermoleculares são as responsáveis por sua estrutura primária densamente compactada e hierarquicamente complexa, que gera estruturas superiores auto-montadas dependentes, principalmente, de ligações de hidrogênio. No caso específico do colágeno, a perda da estrutura extremamente organizada do colágeno - na forma de fibras, fibrilas e microfibrilas - devido à perda da estrutura tripla hélice leva à perda das propriedades mecânicas.

Segundo a literatura⁹¹ o HFIP atua na solubilização de duas formas: (1) os grupos CF_3 atuam na quebra das interações hidrofóbicas, e (2) a hidroxila do álcool atua na quebra das ligações de hidrogênio entre as cadeias. Como o pK_a do TFA é bem menor do que o pK_a do HFIP, provavelmente a extensão de quebras das ligações intramoleculares de hidrogênio no colágeno será muito maior na presença de TFA, devido à maior força do ácido.

Uma vez desenovelado (desnaturado), a sua estrutura primária fica mais suscetível a degradação. Portanto, a solubilização da mistura pela adição de TFA ocorre mais rapidamente, e pode estar associada a uma perda de estrutura terciária mais rápida, além de uma possível perda de estrutura primária. É importante ressaltar que o processo de solubilização do colágeno é um processo dinâmico e, portanto, desnaturação e degradação podem ocorrer simultaneamente.

A variação do tipo de solvente na eletrofiação da co-solução de PET-colágeno forneceu resultados iniciais bastante interessantes, visto que pôde ser observado desde uma malha com fibras totalmente uniformes até uma malha heterogênea, com fibras de diferentes morfologias.

Observou-se uma variação da homogeneidade da solução, com eventual formação de uma solução bifásica. Observou-se, também, que a homogeneidade visual da solução PET/col é dependente de 2 fatores: (1) da relação massa-massa de cada um dos polímeros e (2) do solvente utilizado. Isto nos levou a considerar que o processo de eletrofiação poderia gerar dois

materiais distintos: quando os dois polímeros eram fiados em uma mesma fibra ou em fibras separadas.

As soluções obtidas a partir do solvente HFIP/TFA 7:2, independente da relação massa-massa de PET e colágeno, mostraram-se sempre visualmente homogêneas. Por outro lado, as soluções obtidas utilizando HFIP mostraram-se visualmente homogêneas até a mistura equivalente a 80% de PET e 20% em colágeno, para uma concentração de total de PET e colágeno de 15% (m/v). Nesta mesma condição, misturas contendo teores superiores a 20% de colágeno somente formaram misturas heterogêneas. Quando a concentração total de PET e colágeno foi de 20% (m/v) todas as proporções PET e colágeno foram visualmente heterogêneas.

As condições utilizadas na eletrofição da mistura PET-col em função da massa total de polímero em solução e do solvente utilizado estão mostradas na Tabela 7.

Tabela 7. Soluções PET-colágeno eletrofiadas sob diferentes parâmetros de eletrofição

Amostra	% PET	% colágeno	Massa total* (g)	Solvente	Distância (cm)	Voltagem (kV)	Fluxo (mL/h)
$S_{4,6}^{HFIP/TFA}$	40,0	60,0	1,125	HFIP/TFA 7:2	12,5 - 18	25- 40	0,1 – 3,0
$S_{5,5}^{HFIP/TFA}$	50,0	50,0	0,90	HFIP/TFA 7:2	18	40	0,1 – 0,8
$S_{7,3}$	66,7	33,3	0,675	HFIP	12,5 - 15	25 – 30	3,0 - 5,0
$S_{7,3}^{HFIP/TFA}$	66,7	33,3	0,675	HFIP/TFA 7:2	12,5 - 20	25 – 40	0,1 – 3,0
$S_{9,1}^{HFIP/TFA}$	88,9	11,1	1,000	HFIP/TFA 7:2	12,5 - 15	25	0,8 - 5,0

*Massa total de polímero = Massa de PET + Massa de colágeno utilizada no preparo de 4,5 mL de solução

As soluções $S_{4,6}^{HFIP/TFA}$, $S_{7,3}^{HFIP/TFA}$, $S_{5,5}^{HFIP/TFA}$ e $S_{9,1}^{HFIP/TFA}$ não apresentaram separação de fase, mesmo quando deixadas por um longo período em repouso, enquanto $S_{7,3}$ apresentou separação de fase.

A fim de se observar o efeito da variação da relação massa de PET/massa de colágeno no solvente HFIP, foram eletrofiadas soluções de PET-colágeno em HFIP sob os mesmos parâmetros de fluxo e concentração total de soluto- a fim de manter constante o parâmetro de transferência de massa - assim como de campo elétrico (voltagem e distância). As soluções de PET-colágeno preparadas mantiveram a massa total de soluto constante porém variando-se a razão entre a massa de PET e a massa de colágeno de 100% a 0% de PET. A descrição das soluções eletrofiadas estão mostradas na Tabela 8.

Tabela 8. Correlação de massas utilizadas na preparação das blendas PET-colágeno com massa total constante, utilizando HFIP como solvente

Amostra	%massa de PET	%massa de colágeno	Massa de PET utilizada* (g)	Massa de colágeno utilizada* (g)
PET ($S_{10,0}$)	100	0	0,750	0
$S_{9,1}$	90	10	0,675	0,075
$S_{8,2}$	80	20	0,600	0,175
$S_{7,3}$	70	30	0,525	0,225
$S_{6,4}$	60	40	0,450	0,300
$S_{5,5}$	50	50	0,375	0,375
$S_{4,6}$	40	60	0,300	0,45
$S_{3,7}$	30	70	0,225	0,525
$S_{2,8}$	20	80	0,175	0,600
$S_{1,9}$	10	90	0,075	0,675
Colágeno ($S_{0,10}$)	10	90	0,075	0,675

*Massa utilizada no preparo de 5 mL de solução

A eletrofiação da blenda PET/colágeno em HFIP/TFA 7:2 produziu malhas eletrofiadas de fibras de diâmetros uniformes (Figura 17) e somente na malha eletrofiada PET/col ($S^{HFIP/TFA}_{7,3}$), mostrada na Figura 18, foi possível a observação de algumas poucas esferas. Comparando-se a malha eletrofiada $S_{7,3}$ (Figura 19) pelas mesmas condições $S^{HFIP/TFA}_{7,3}$, podemos confirmar que a formação de esferas pode ser favorecida pela presença de TFA no co-solvente. Este mesmo efeito foi observado para a eletrofiação das soluções de PET.

Figura 17. Imagens de MEV da malha eletrofiada de PET-colágeno ($S^{HFIP/TFA}_{4,6}$) sob condições de fluxo 0,8 mL/h distância de 18 cm e voltagem de 40 kV

Figura 18. Imagens de MEV da malha eletrofiada de PET-colágeno ($S^{HFIP/TFA}_{7,3}$) sob condições de fluxo 3,0 mL/h distância de 15 cm e voltagem de 25 kV

Figura 19. Imagens de MEV da malha eletrofiada de PET-colágeno ($S_{7,3}$) sob condições de fluxo 3,0 mL/h distância de 15 cm e voltagem de 25 kV

A explicação para o fenômeno observado pode consistir na forte interação polímero-solvente, que resulta na diminuição das interações polímero-polímero e por consequência em um maior desenovelamento das cadeias, o que gera uma diminuição de viscosidade. Uma sobreposição mínima entre as cadeias (c^*) são necessárias para o estiramento contínuo do jato e formação de fibras uniformes sem esferas.

Uma observação à respeito da eletrofiação de soluções de PET ou de PETcolágeno, em que o TFA é constituinte do cosolvente, é que estas necessitam ser eletrofiadas sob condições de baixo fluxo para que sejam obtidos materiais sem esferas. Uma outra correlação que pode ser feita entre o estudo da eletrofiação do PET e a eletrofiação da blenda PETcolágeno, utilizando-se como solvente HFIP, é que a presença do colágeno na solução diminui a tendência de formação de esferas, como pode ser comparado pelo MEV da Figura 20 e da Figura 21.

Figura 20. Imagens de MEV da amostra PET ($S_{10,0}$)

Figura 21. Imagens de MEV da amostra PET-col ($S_{9,1}$)

Se continuarmos aumentando o teor de colágeno nas blendas mantendo a concentração total PETcolágeno constante, observamos que chegam a se formar fitas em meio das fibras, como pode ser comparado pelo MEV da Figura 21 e da Figura 22. O fator predominante neste caso é que a presença do colágeno está aumentando consideravelmente a viscosidade da solução, e consequentemente a morfologia dos materiais obtidos.

A formação de fitas provavelmente deve-se à elevada viscosidade da solução que dificulta o estiramento do jato durante a eletrofiação. Paralelo a isso temos a rápida evaporação do solvente devido à sua elevada pressão de vapor que, associada à elevada viscosidade da solução, promove à formação de fitas.

Figura 22. Imagens de MEV da amostra PET-col ($S_{1,9}$)

As condições de processamento da eletrofiação de todas as blendas foram muito semelhantes. No entanto, os materiais obtidos apresentaram-se morfológicamente bem diferentes, como mostrado nas imagens de MEV da Figura 23.

Figura 23. Imagens de MEV das malhas eletrofiadas (A) $S_{8,2}$ (B) $S_{5,5}$ (C) $S_{2,8}$

A malha eletrofiada $S_{8,2}$ (Figura 24) mostrou ser a de maior relação massa-massa que mantém-se uniformemente distribuída em fibras, por isso sendo selecionada para estudos posteriores de caracterização morfológica, química, mecânica e biológica.

Figura 24. Imagens de MEV da amostra PET-col ($S_{8,2}$)

As malhas eletrofiadas com teor de colágeno superior a 20% e inferior a 90% (de $S_{7,3}$ a $S_{1,9}$) mostraram-se todas bastante heterogêneas, com a presença de fibras de diversos diâmetros, teias entre as fibras, e até mesmo fitas. As

malhas eletrofiadas de PET/col ($S_{2,8}$ e $S_{1,9}$) mostraram-se bastante quebradiças e difíceis de serem manipuladas devido ao elevado teor de colágeno processado.

Em vista da aplicação desejada, a malha eletrofiada com maior conteúdo de colágeno que manteve propriedades plásticas e que ainda permitia relativa facilidade de manipulação, foi a blenda $S_{4,6}$ (Figura 25), e por ser uma malha eletrofiada de diâmetro de fibras heterogêneo de elevado teor de colágeno foi utilizada para estudos posteriores de caracterização morfológica, química, mecânica, biológica.

Figura 25. Imagens de MEV da amostra PET-col ($S_{4,6}$)

5.3 Estudo de FTIR do PET e do Colágeno nativo

No espectro de infravermelho do PET (FTIR) 3 bandas são bem características e estão mostradas na Figura 26. As bandas vibracionais características da deformação axial da ligação C=O, em 1743 cm^{-1} , e as deformações axiais dos grupos CH_2 alifáticos, simétrica, em 2848 cm^{-1} , e assimétrica, em 2926 cm^{-1} . Estas observações estão compatíveis com o descrito na literatura⁹².

Figura 26. FTIR do PET

No espectro de infravermelho do colágeno (FTIR), são observadas as bandas de amida I, amida II e amida III, que estão diretamente relacionadas com a conformação da proteína. A banda de amida I está relacionada com a deformação axial da ligação C=O do grupo amida do peptídeo e pode ser situada entre 1600 -1700 cm^{-1} , sendo a localização desta banda resultante das ligações de hidrogênio da proteína com o meio⁹³. A banda em 1560 cm^{-1} está relacionada à amida II, devido à deformação angular da ligação N-H acoplada à deformação axial C-N⁹⁴. A banda em 1235 cm^{-1} é correspondente às vibrações no plano da amida III, deformação axial C=O acoplado à deformação axial N-H; em 1450 cm^{-1} a banda é correspondente à estereoquímica dos anéis pirrolidínicos⁹³; e próximo a 3450 cm^{-1} , devido à deformação axial O-H. Estas bandas foram observadas experimentalmente, como mostra o espectro de infravermelho do colágeno na Figura 27.

Figura 27. FTIR do colágeno (Região de 4000 a 500 cm^{-1})

5.4 Estudo por FTIR das frações da mistura

As soluções de PET e colágeno solubilizadas em HFIP, com teor de colágeno superior a 20%, apresentaram-se na forma de uma mistura bifásica. Esta mistura estava disposta da forma como mostrado na Figura 28.

Figura 28. Representação da mistura heterogênea de PET e colágeno em HFIP

O volume de cada uma das fases A e B variou em função do teor de PET e de colágeno na mistura. As frações A e B foram analisadas por FTIR em busca de diferenças de composição. A solução utilizada para a análise das frações foi a

solução com igual teor de PET e colágeno, sendo a concentração total equivalente a 15% (m/v).

No espectro do colágeno as bandas em 1647 cm^{-1} e em 1555 cm^{-1} são bandas características do grupo amida, como já citadas anteriormente. Além disso, são bandas que não se superpõem a nenhuma banda do PET. Já as bandas em torno de 1450 cm^{-1} e em 1260 cm^{-1} sofrem influência de superposição, pois estão presentes tanto no PET como no colágeno.

Analisando-se o espectro de FTIR do colágeno e das frações A e B na região de $2000\text{ a }1000\text{ cm}^{-1}$, pode-se observar que tanto na fração A, como na fração B, PET e colágeno estão presentes, conclusão obtida pela identificação das bandas na Figura 30 e na Figura 31. Portanto, a diferença entre a fração A e a fração B é de constituição, com razões PET/Col diferentes entre elas.

Figura 29. Espectro de FTIR do Colágeno (Região de $2000\text{ a }1000\text{ cm}^{-1}$)

Figura 30. Espectro de FTIR da Fração A (Região de 2000 a 1000 cm^{-1})

Figura 31. Espectro de FTIR da Fração B (Região de 2000 a 1000 cm^{-1})

Observando-se o espectro de FTIR da fração A, vemos que a intensidade relativa da banda em torno de 1200 cm^{-1} é bem maior do que a intensidade da banda de amida I em torno de 1600 cm^{-1} . Comparativamente, as mesmas bandas no espectro do colágeno apresentam uma diferença de intensidade considerável em que a banda de amida I é mais intensa do que a banda de

amida III. Um outro fator a ser observado é a baixa intensidade da banda de amida II, em torno de 1560 cm^{-1} , quando comparada com a carbonila do PET em torno de 1720 cm^{-1} . Portanto, podemos inferir que a fração A contém PET e colágeno, no entanto, o componente majoritário é o PET.

Observando-se o espectro de FTIR da fração B, vemos que a intensidade relativa entre a banda de carbonila do PET e a banda de amida II do colágeno é bem próxima. O que pode ser um reflexo da presença de colágeno como componente majoritário da fração.

Uma outra abordagem para a verificação da constituição de cada uma das fases seria a o estudo da razão entre as intensidades das bandas de carbonila do PET (X) e as bandas de amida I (Y) e amida II (Z), nas frações A e B e no colágeno nativo. Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 9.

Quanto menor a razão X/Y e a razão X/Z, maior será o teor de colágeno na mistura, o que nos leva a concluir que a fração B é mais rica em colágeno do que a fração A.

Tabela 9. Estudo da correlação entre as bandas de PET e colágeno nas frações A e B

Amostra	Razão (X/Y)	Razão (X/Z)	Razão (Y/Z)
Colágeno	-	-	1,03
Fração A	1,05	1,11	1,06
Fração B	1,01	1,00	1,00

5.5 Estudo do Colágeno

O colágeno é uma das proteínas mais importantes na arquitetura de um vaso sanguíneo porque confere a estrutura e dá resistência às paredes dos vasos. Inúmeras pesquisas tem sido conduzidas para a eletrofiação dos diversos tipos de colágeno, afim de reproduzir propriedades estruturais, biológicas e mecânicas da matrix extracelular.

O solvente que tem sido mais proposto para a eletrofiação dos diversos tipos de colágeno é o HFIP⁹⁵. Este trabalho também propôs a utilização de um outro solvente, HFIP/TFA 7:2, não relatado na literatura. Os experimentos propostos a seguir visam exatamente provar como se encontra a estrutura do colágeno após a solubilização e após o processo de eletrofiação.

5.5.1 Eletroforese (SDS-page)

A técnica de eletroforese baseia-se na separação de espécies carregadas que apresentam diferentes velocidades de migração quando submetidos a um campo elétrico. Essa diferença de mobilidade do soluto é inversamente proporcional à força retardante, forças estas que são determinadas pelo tamanho, forma e viscosidade do meio. As propriedades do solvente como força iônica, pH e constante dielétrica também são importantes porque podem afetar

a carga efetiva do soluto, e para moléculas maiores podem afetar a forma e o volume hidrodinâmico.

Em geral, as amostras de um mesmo gel seguem com o mesmo solvente que elimina eventuais desequilíbrios de carga. Considerando-se que as amostras estão igualmente carregadas, as amostras que menos se deslocam no gel são as de maior massa molar.

Sabe-se que o colágeno tipo I é constituído por 2 cadeias $\alpha 1(I)$ e 1 cadeia $\alpha 2(I)$ ^{96,97}. No entanto, estas cadeias alfa podem formar dímeros ($\beta 1_2$ ou $\beta 1,2$) e trímero ($\gamma 1_2 2$) dependendo das condições de preparação da amostra a ser aplicada no gel.

Os experimentos iniciais de eletroforese foram realizados com o objetivo de verificar se o colágeno sofre degradação quando solubilizado nos solventes HFIP e HFIP/TFA 7:2. A Figura 32 mostra o resultado obtido e aponta para a parcial degradação do colágeno quando o solvente utilizado era HFIP e para uma total degradação quando o solvente utilizado era HFIP/TFA 7:2.

Um segundo experimento de eletroforese (Figura 33) comparou o colágeno pós-solubilização e o colágeno eletrofiado ao colágeno nativo, com o intuito de observar em que grau de desnaturação estaria o colágeno eletrofiado, que seria efetivamente a forma do colágeno nas malhas eletrofiadas.

A Figura 33 mostra para o colágeno nativo (C) uma banda em aproximadamente 300 kDa referente a um dos dímeros, enquanto que as duas

bandas em torno de 150-130 kDa são referentes as cadeias $\alpha 1(I)$ e $\alpha 2(I)$, resultados compatíveis com a literatura⁹⁸.

Figura 32. SDS-page comparativo do colágeno nativo com o colágeno solubilizado em HFIP e o colágeno solubilizado em HFIP/TFA 7:2

A Figura 33 mostra para o colágeno nativo (C) uma banda em aproximadamente 300 kDa referente a um dos dímeros, enquanto que as duas bandas em torno de 150-130 kDa são referentes as cadeias $\alpha 1(I)$ e $\alpha 2(I)$, resultados compatíveis com a literatura⁹⁸.

Figura 33. SDS-page (C) Colágeno Nativo (Cs) Colágeno pós-solubilização (Ce) Colágeno pós-eletroforseção

Observa-se que as cadeias alfa da proteína nativa ainda estão presentes mesmo após o processo de solubilização e o processo de eletrofiação; no entanto, boa parte dessas cadeias alfa sofreram degradação pois é possível observar diversas bandas de massa molar menor do que a massa molar esperada para as cadeias alfa de 150-130 kDa (Figura 33). Pode-se inferir que a degradação do colágeno ocorre no processo de solubilização já que os colágenos **Cs** e **Ce** apresentaram a mesma distribuição de massa molar no gel, ou seja, a eletrofiação não causa ao colágeno uma degradação adicional à que já havia sido realizada pelo solvente no processo de solubilização.

Estes resultados são compatíveis com resultados descritos na literatura em que colágeno eletrofiado em HFIP apresentou estruturas de degradação semelhantes às observadas no colágeno eletrofiado em tampão PBS⁹⁹. O que comprova que a degradação realizada por HFIP e PBS são inerentes do processo de solubilização e não ocorre em função necessariamente do baixo pK_a do HFIP. Por outro lado, já foi sugerido que o colágeno eletrofiado em HFIP é totalmente transformado em gelatina, pois apresenta-se em uma forma hidrosolúvel que é digerida por pepsina¹⁰⁰.

5.5.2 Dicroísmo Circular (CD)

A gelatina é um derivado do colágeno obtida pela desnaturação da estrutura em tripla hélice do colágeno^{101,102}. A técnica de dicroísmo circular foi

utilizada para a verificação do efeito do solvente na estrutura terciária da molécula e em que grau de desnaturação encontra-se **Ce**. É importante ressaltar que este efeito foi estudado somente para o HFIP (que manteve bandas das cadeias alfa presentes no colágeno nativo).

As cadeias α do colágeno são orientadas à esquerda com três resíduos de aminoácidos por volta; duas cadeias $\alpha 1(I)$ e uma cadeia $\alpha 2(I)$ enrolam-se uma ao redor da outra em uma torção orientada à direita, formando a estrutura em tripla hélice predominantemente estabilizada por ligações de hidrogênio⁹³, conhecida como tropocolágeno.

Devido à forma de associação das cadeias α , não existe espaço interno ou cavidade interior na tripla hélice, desta forma todos os resíduos de aminoácido ficam na superfície e os grupos C=O e NH ficam expostos e disponíveis para interação com o solvente. Esta estrutura em tripla hélice do colágeno nativo quando colocada em solução adquire uma conformação conhecida como conformação randômica. A conformação randômica do colágeno é constituída por largos resíduos de estrutura tripla hélice espaçados. Essa distribuição axial heterogênea na estrutura tripla hélice promove uma microheterogeneidade na estabilidade desta, o que explica variações de intensidade no espectro de CD do colágeno em diferentes solventes¹⁰³.

O espectro de Dicroísmo Circular dessa estrutura tripla hélice do colágeno apresenta bandas $\pi\pi^*$ e $n\pi^*$ comparáveis às da poliprolina, e deve mostrar uma banda negativa em 190 nm e uma banda positiva em torno de 220 nm. Em uma

estrutura desnaturada como a gelatina, as duas bandas diminuem de intensidade, mas a banda positiva deve diminuir de intensidade chegando a zero^{100,104}.

A Figura 34 compara os espectros do colágeno **Ce** e **Cdn**. Nestes espectros pode-se observar que as estruturas terciária e secundária do colágeno em **Cdn** estão desnaturadas, enquanto que em **Ce** temos uma estrutura em tripla hélice preservada.

Figura 34. Espectro de Dicroísmo Circular comparativo entre o Ce e Cdn

Podemos concluir que a estrutura do colágeno pós-eletrofiação, em HFIP, que reflete a forma estrutural do colágeno nas malhas eletrofiadas PETcolágeno não corresponde à estrutura da gelatina. Este resultado é de grande importância uma vez que colágeno e gelatina apresentam propriedades químicas e mecânicas diferentes.

É importante ressaltar que provavelmente o colágeno encontra-se parcialmente em forma de gelatina e parcialmente preservado em sua forma nativa, nos materiais eletrofiados. No entanto, ainda não foi possível calcular o teor efetivo de estrutura tripla hélice nos materiais eletrofiados.

5.6 Caracterização Morfológica

A malha eletrofiada $S_{8,2}$ mostrou ser a de maior relação massa_{PET}/massa_{col} que mantém suas fibras uniformes, por isso foi selecionada para estudos posteriores de caracterização.

As malhas eletrofiadas de $S_{7,3}$ – $S_{1,9}$ mostraram-se todas bastante heterogêneas, com a presença de fibras de diversos diâmetros e “teias” entre as fibras. Em concentrações de colágeno bastante elevadas foi possível observar a formação de fitas.

Os materiais que apresentaram composição de colágeno maior que 60% na mistura polímero-proteína, cujo solvente foi HFIP, mostraram-se bastante quebradiços, com extrema dificuldade de manipulação, portanto a mistura PET/col 40:60 ($S_{4,6}$), foi a de maior conteúdo de colágeno a ser estudada e caracterizada.

As microscopias dos materiais que foram estudados, caracterizados e comparados estão mostradas na Figura 35.

Figura 35. Microscopia Eletrônica de Varredura (A) PET (Condição 1); (B) PETcol 80:20 (S_{8,2}); (C) PETcol 40:60 (S_{4,6}); (D) Colágeno

5.6.1 Distribuição de diâmetros e porosidade

A partir das microscopias foram obtidas a distribuição de diâmetros e a porosidade dos materiais, mostradas na Tabela 10. A porosidade é um parâmetro de relevância visto que materiais porosos permitem uma melhor infiltração das células para o interior do material, isto mantém a troca de gases e de nutrientes⁷⁰.

Foi sugerido que as células não podem migrar para o interior do suporte se este apresentar poros inferiores a 10 μm , pois nestas condições os poros seriam pequenos comparados ao tamanho de uma célula¹⁰⁵. Diversos estudos *in vivo* e *in vitro* foram capazes de mostrar que a formação de uma monocamada de

células na superfície do suporte, mas também ocorre uma infiltração das células para dentro do material. O mecanismo no qual células conseguem se infiltrar para dentro do suporte não é claro, mas uma sugestão é que as células aderidas são capazes de empurrar as fibras durante o sua migração^{2,106}.

Os materiais apresentaram uma diminuição da porosidade quando aumentou-se a proporção de colágeno, provavelmente devido à presença de fibras muito finas entrelaçadas às fibras mais grossas e à própria característica de porosidade que é específica para cada um dos materiais. Entretanto, é importante ressaltar que em vistas da aplicação, estes níveis de mudanças na porosidade não são significativamente diferentes.

Tabela 10. Distribuição de diâmetros e porosidade das malhas eletrofiadas			
PET/col	Diâmetro Médio	Largura da meia altura	Porosidade
	(μm)	(μm)	(%)
100:0	1,5	0,3	83 ± 1
80:20	0,8	0,2	83 ± 2
40:60	0,2	0,5	$77,9 \pm 0,8$

A análise de Microscopia Eletrônica de Varredura não possibilita inferir sobre a distribuição do PET e do colágeno nas fibras. Na eletrofiação do PET puro, as fibras extremamente finas não estão presentes e quanto maior o teor de colágeno maior a frequência dessas fibras finas (Figura 35). Este fato levanta a hipótese de que o material pode conter fibras de colágeno puro, que estariam

totalmente sendo separadas das fibras de PET durante a evolução do jato. Levantamos a hipótese de que estivesse ocorrendo um fenômeno de *splay* em que PET e colágeno estariam originando jatos diferentes. Este fenômeno de *splay* já foi relatado na literatura como causa da distribuição bimodal de diâmetros de fibras eletrofiadas²⁹. Tendo em vista estes resultados, realizou-se a caracterização química mais específica para elucidar a distribuição de PET e colágeno nas mesmas.

5.7 Caracterização Química

5.7.1 Caracterização das malhas eletrofiadas de PET-colágeno por FTIR

A caracterização química por FTIR dos materiais eletrofiados visa verificar o efeito da constituição da mistura e o efeito do solvente utilizado, podendo-se assim verificar como o polímero e a proteína estão dispostos no material e qual o efeito do solvente.

Todas as bandas atribuídas ao PET e ao colágeno foram observadas nos materiais eletrofiados PET/col. Os espectros de infravermelho (FTIR) dos materiais estão mostrados na Figura 36 e na Figura 37.

Os estudos de FTIR mostraram que os materiais apresentavam um comportamento geral, independente do soluto majoritário ou do solvente. Nos

materiais híbridos de polímero-proteína, a banda da carbonila do PET ($\nu_{C=O}=1743\text{ cm}^{-1}$) foi deslocada para regiões de menor energia, enquanto que a banda da carbonila da amida I, presente no colágeno (**C**) em 1645 cm^{-1} , foi deslocada para regiões de maior energia.

Figura 36. FTIR dos materiais PET/col eletrofiados em HFIP

Figura 37. FTIR dos materiais PET/col eletrofiados em HFIP/TFA 7:2

A possível razão para este efeito é a formação de ligações de hidrogênio da amida com a carbonila do éster, cuja representação está mostrada abaixo na

Error! Reference source not found..

Figura 38. Ligação de hidrogênio entre a carbonila do PET e a amida do colágeno

É importante ressaltar que as ligações de hidrogênio formadas entre o PET e o colágeno competem com as ligações entre as cadeias de PET e as ligações entre as cadeias do colágeno. Daí a importância do solvente utilizado, pois o solvente irá atuar na quebra das ligações entre as cadeias do PET e irá desenovelar a estrutura do colágeno. Uma vez que a estrutura tripla hélice do colágeno é mantida por ligações de hidrogênio, somente a quebra dessa estrutura terciária liberará o grupo N-H da amida para formar ligações de hidrogênio com o solvente e com o PET. Como durante o processo de eletrofiliação o solvente é eliminado, podemos descartar que os efeitos de deslocamento de banda sejam relativos a uma possível interação do PET ou do colágeno com o solvente.

O efeito relatado consiste numa substituição das ligações de hidrogênio éster-éster, presentes no PET, e ligações de hidrogênio amida-amida, presentes no colágeno por ligações de hidrogênio éster-amida. A deformação axial da

ligação C=O é dependente de diversos fatores como, entre eles iremos citar: (1) os efeitos eletrônicos e (2) ligações de hidrogênio.

A deformação axial da ligação C=O do éster sempre é observada em regiões de maior energia que as deformações axiais de C=O das amidas, pois nos grupos ésteres o efeito eletrônico predominante será o efeito indutivo retirador de elétrons, enquanto nas amidas o efeito eletrônico predominante é o efeito mesomérico doador de elétrons¹⁰⁷.

O efeito indutivo retirador de elétrons provoca na carbonila uma diminuição em sua densidade eletrônica, o que diminui o tamanho da ligação e leva a absorção para regiões de maior energia. O efeito mesomérico doador de elétrons das amidas leva a uma diminuição do caráter da ligação dupla C=O, o que aumenta a distância entre os átomos e gera deformações axiais em regiões de menores energias¹⁰⁷.

Nas ligações de hidrogênio entre PET e colágeno teremos a atenuação destes dois efeitos, uma vez que o átomo de oxigênio da carbonila do éster teria uma maior capacidade de retirar elétrons do átomo de hidrogênio e de nitrogênio da amida, devido o grupo OR do éster. Por sua vez, este é um grupo retirador de elétrons por efeito indutivo mais forte do que o grupo NR. Isto levaria a um aumento da densidade eletrônica sobre o oxigênio da carbonila, o que atenuaria o efeito indutivo retirador de elétrons sobre a mesma, e consequentemente, levaria a vibração para regiões de mais baixa energia.

Devido ao efeito retirador mais forte provocado pela carbonila do éster, os átomos de nitrogênio das amidas teriam uma menor disponibilidade de seus elétrons livres, acarretando numa menor conjugação com a carbonila e aumento do caráter de ligação dupla. Isto atenuaria o efeito mesomérico doador de elétrons e provocaria uma diminuição da ligação C=O, o que deslocaria esta vibração para regiões de maior energia.

Para os materiais eletrofiados de PET/colágeno em HFIP observou-se variações nas bandas de carbonila do éster, amida I, amida II e amida III quando a razão polímero-proteína se alterava. No entanto, para as malhas eletrofiadas em HFIP/TFA 7:2 estas mesmas bandas não apresentaram variações de número de onda dependente do teor dos constituintes no material eletrofiado. Possivelmente, quando o solvente utilizado é o HFIP/TFA 7:2, existe um desenovelamento máximo da estrutura do colágeno, o que facilitaria a interação polímero-colágeno.

O colágeno solubilizado em HFIP mantém alguns domínios de estrutura tripla hélice espaçados, como confirmado pelo experimento de Dicroísmo Circular e, portanto, a ligação de hidrogênio entre o polímero e a proteína seria dependente de uma disponibilidade dos grupos envolvidos. Também seria, dependente de uma estabilidade da conformação adquirida quando estes estiverem ligados, sendo esta última dependente do teor de cada um dos constituintes na solução.

Figura 39. FTIR comparativo do PET, $S_{8,2}$, $S_{4,6}$ e Colágeno (C)

Quando comparados os materiais eletrofiados sob as mesmas condições (fluxo de 3mL/h voltagem 25 kV e distância de 30 cm) a partir de soluções 15% (m/v) utilizando-se HFIP como solvente, Figura 39, observou-se que a carbonila do PET puro apresentou banda em 1740 cm^{-1} . Com o aumento do teor de colágeno observou-se o deslocamento desta banda para região de menor energia. A amida I do colágeno passou de 1646 cm^{-1} no colágeno puro, para 1656 cm^{-1} nas misturas de colágeno com PET. A amida II de 1558 cm^{-1} , no colágeno puro, foi deslocada para 1550 cm^{-1} nas misturas de PET com colágeno. A amida III se encontra em 1235 cm^{-1} no colágeno puro, em 1244 cm^{-1} para o material $S_{8,2}$ e 1246 cm^{-1} para o material $S_{4,6}$.

5.7.2 Análise Termogravimétrica – TGA

A partir das análises termogravimétricas foi possível analisar a perda de massa dos materiais em função da temperatura, bem como a estabilidade térmica dos materiais. As curvas de TG foram derivadas e obtiveram-se as curvas de DTG que apresentam os eventos de decomposição por perda de massa de forma mais visível. Estas curvas estão mostradas na Figura 40. Os dados obtidos a partir das curvas estão mostrados na Tabela 11.

Para todos os materiais PET/colágeno estudados foi observado um único estágio de decomposição. Observa-se que quanto menor a razão (m/m) PET/colágeno, maior é a temperatura *onset* de decomposição, o que indica que quanto maior a quantidade de colágeno, menor será a estabilidade térmica do material eletrofiado. Além disso, pode ser observado que a estabilidade térmica das malhas são semelhantes à do componente majoritário.

Tabela 11. Dados obtidos nas curvas de TG e DTG dos materiais

PET/col	% perda de massa	T_{onset} (°C)	T_{endset} (°C)
100:0	77,1 ± 0,1	366 ± 5	471,1 ± 0,1
80:20	75,1 ± 0,4	257 ± 14	467 ± 2
40:60	68,0 ± 0,9	238 ± 6	498 ± 2
0:100	61,2 ± 0,7	230 ± 8	509 ± 2

Figura 40. Curva Termogravimétrica do PET, Colágeno, S_{8,2} e S_{4,6}

5.7.3 Calorimetria Exploratória Diferencial

As ligações de hidrogênio responsáveis pela estrutura terciária e secundária do colágeno são quebradas à medida que ocorre o aquecimento, levando à estrutura monomérica da proteína, que é amorfa. A literatura relata que o primeiro aquecimento na corrida do DSC apresentaria um pico endotérmico referente à desnaturação do colágeno, (T_d)¹⁰⁸, que corresponde à temperatura em que a proteína atinge o estado amorfo. No entanto, a

temperatura de desnaturação do colágeno não corresponde à sua temperatura de decomposição.

Uma vez que o colágeno atinge sua forma amorfa, em uma segundo aquecimento é possível observar a temperatura de transição vítrea (T_g). Os valores de T_g relatados na literatura para colágeno sem tratamentos com glutaraldeído seria por volta de 180°-195° C, enquanto que colágenos tratados com glutaraldeído apresentariam uma T_g de aproximadamente 190°-200° C¹⁰⁸.

Os resultados obtidos por FTIR indicam uma ligação de hidrogênio entre o polímero e a proteína, mostrando maiores deslocamentos das bandas do éster e da amida I com o aumento do teor de colágeno na mistura, como reportado anteriormente na Figura 39.

Figura 41. DSC das amostras de PET, colágeno, S_{8,2} e S_{4,6}

Tabela 12. Resultados obtidos por DSC

PET:COL	T_g^1 (°C)	T_g^2 (°C)	T_g^3 (°C)	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)
PET (pellet)	79,2 ± 0,1	-	-	245,2 ± 0,1	45,2 ± 0,6
PET (eletrofiado)	72,4 ± 0,1	-	-	241,8 ± 0,1	46,7 ± 0,5
80:20	-	-	-	232,1 ± 0,2	27,4 ± 0,4
40:60	99,2 ± 0,3	126 ± 2	154 ± 5	239,8 ± 0,1	14,8 ± 0,5
Colágeno	-		191,2 ± 0,2	-	-
PET literatura ¹⁰⁹	81,0	-		250,0	51,0
Colágeno literatura ¹⁰⁸	-	-	195,0	-	-

A amostra **S_{4,6}** mostra uma primeira transição vítrea com aproximadamente 20°C acima da temperatura de transição vítrea esperada para o PET, e uma terceira transição vítrea com aproximadamente 30°C abaixo da temperatura de transição vítrea esperada para o colágeno, além destas transições vítreas já esperadas, observou-se uma transição vítrea intermediária. Estes dados indicam que a amostra **S_{4,6}** é constituída por domínios de miscibilidade e parcial miscibilidade.

A temperatura de fusão (**T_m**) e o Calor de fusão (**ΔH_m**) diminuíram pela presença de colágeno na mistura, comportamentos esperados já que o somente o PET apresenta cristalinidade. Deve-se observar que a diminuição da **T_m** é praticamente desprezível, enquanto que a variação de **ΔH_m** é enorme.

Calculando-se os valores de ΔH_m em função somente do percentual de PET presente na amostra, $S_{8,2}$ apresentou ΔH_m de 34,25 J/g de PET e $S_{4,6}$ apresentou ΔH_m de 37 J/g. Este resultado é de grande valia, visto que o calor de fusão representa o calor necessário para passagem da fase sólida para a fase líquida, durante esta transição grande parte das ligações intermoleculares são quebradas para que as moléculas adquiram maior liberdade. O maior calor de fusão em função da massa de PET observado para a amostra $S_{4,6}$, comparada com $S_{8,2}$ confirma uma maior energia envolvida na quebra das suas ligações intermoleculares, o que é compatível com a idéia de que $S_{4,6}$ seria uma blenda que apresentaria uma miscibilidade maior entre PET e colágeno, proposta através das observações das transições vítreas.

5.7.4 Ensaio de Digestão com Colagenase e Microscopia Confocal Raman

A distribuição polímero-proteína em cada uma das fibras do material foi analisada a partir do experimento de digestão das malhas com colagenase associado aos resultados da Microscopia Confocal Raman. O objetivo era tentar testar a presença de fibras de colágeno puro, através de sua digestão completa pela colagenase adicionada.

Como mostrado na Figura 42, as amostras eletrofiadas de PET e $S_{8,2}$ não apresentaram modificação morfológica significativa que indicasse a presença de

fibras puras de colágeno, enquanto que a amostra $S_{4,6}$ apresentou-se bem destruída sugerindo que boa parte das fibras, em especial as de diâmetros pequenos, eram constituídas de alto teor de colágeno.

Figura 42. Microscopia Eletrônica de Varredura das amostras eletrofiadas após 16 dias de digestão com collagenase (A) PET (B) $S_{8,2}$ (C) $S_{4,6}$

É importante ressaltar que a amostra $S_{4,6}$ teve a sua distribuição de diâmetros alterada uma vez que as fibras de diâmetro reduzido diminuíram em frequência e as fibras de maior diâmetro tiveram seu diâmetro reduzido, como está mostrado na Figura 43, no entanto não foi possível observar variação de diâmetro com as amostras de PET e $S_{8,2}$.

Figura 43. Gaussianas das distribuições de diâmetro antes e depois de 16 dias de digestão com a collagenase para $S_{4,6}$

A colagenase atua na quebra das ligações peptídicas presentes no colágeno, levando a obtenção de resíduos de menor massa molar¹¹⁰. Portanto, se há uma interação entre o PET e o colágeno de tal forma que estes se encontrem totalmente miscíveis, a enzima encontrará os sítios ativos necessários para a sua ação bloqueados.

Pelo mesmo raciocínio podemos inferir que as amostras $S_{8,2}$ e $S_{4,6}$ estão sendo digeridas em seus sítios em que o colágeno encontra-se exposto. Estes sítios correspondem a pequenas áreas nas fibras mais espessas e às fibras extremamente finas que desaparecem após a digestão na amostra $S_{4,6}$, e algumas fibras na amostra $S_{8,2}$ que aparecem aglomeradas. Na superfície das fibras de $S_{8,2}$ não são observados buracos resultantes de um desgaste da superfície pela ação da enzima.

A Microscopia Confocal Raman (MCR) foi utilizada como técnica de mapeamento funcional das amostras eletrofiadas, respeitadas as limitações de resolução da técnica. A partir dos espectros Raman dos materiais puros e do espectro Raman da amostra em cada ponto da área selecionada, os quais estão mostrados na Figura 44 e na Figura 45, foi possível obter uma visão mais clara da contribuição de cada um dos materiais na fibra das amostras eletrofiadas $S_{8,2}$ e $S_{4,6}$.

Figura 44. Amostra $S_{8,2}$ (A) Área scaneada (B) Espectro Raman; Vermelho – Espectro do Colágeno; Verde - Espectro do PET; Amarelo – Espectro do amostra em um ponto da área varrida (C) $S_{8,2}$ – Microscopia Confocal Raman - em verde, temos o PET puro; em vermelho, o colágeno puro; e em amarelo, a mistura entre os dois compostos.

Deve-se observar que na Figura 44 B a contribuição do espectro do colágeno, no espectro da amostra, é muito pequena, chegando a ser da mesma magnitude do erro. Uma vez que a MCR está investigando a contribuição do colágeno nativo, podemos associar que o teor de colágeno nativo na amostra $S_{8,2}$ é bem pequeno.

Figura 45. Amostra $S_{4,6}$ (A) Área scaneada (B) Espectro Raman; Vermelho – Espectro do Colágeno; Verde - Espectro do PET; Amarelo – Espectro do amostra em um ponto da área varrida (C) $S_{4,6}$ – Microscopia Confocal Raman - em verde, temos o PET puro; em vermelho, o colágeno puro; e em amarelo, a mistura entre os dois compostos.

Confrontando-se os resultados obtidos pelo ensaio de digestão da malha eletrofiada $S_{8,2}$ com o resultado da MCR (Figura 46), na qual a malha eletrofiada é formada majoritariamente por domínios de imiscibilidade.

Figura 46. A) $S_{8,2}$ antes da digestão com collagenase B) $S_{8,2}$ após 16 dias de digestão com collagenase C) $S_{8,2}$ – Microscopia Confocal Raman - em verde, temos o PET puro; em vermelho, o colágeno puro; e em amarelo, a mistura entre os dois compostos.

A solução de $S_{8,2}$ era macroscopicamente homogênea, no entanto, podemos propor que PET e colágeno formavam uma suspensão estável, mas microscopicamente estes componentes estariam separados. Nesta condição de correlação massa/massa PET colágeno haveria um máximo de estabilidade da suspensão, em que o polímero e a proteína encontravam-se num nível de solvatação que limitava a interação entre as cadeias dispersas. À medida que a quantidade de colágeno aumentava na mistura, a suspensão estável dava lugar a misturas heterogêneas bifásicas, em que ocorre um maior entrelaçamento entre as cadeias de PET e colágeno, por apresentarem estabilização maior que a inicial estabilização conferida pela solvatação.

Propomos que a solução $S_{8,2}$ apresenta uma interação mais forte macromolécula-solvente do que macromolécula-macromolécula, isto explicaria o fato de que durante a eletrofiliação formam-se *splays* separados de PET e colágeno que dá origem a uma malha totalmente imiscível. Para a solução $S_{4,6}$ a interação macromolécula-macromolécula é mais forte do que a interação

macromolécula-solvente e neste contexto, PET e colágeno seriam eletrofiados em uma mesma fibra.

Confrontando-se os resultados obtidos pelo ensaio de digestão da malha $S_{4,6}$ com o resultado da Microscopia Confocal Raman (Figura 47), observamos que a malha eletrofiada é constituída por regiões de miscibilidade mais ricas em PET e outras mais ricas em colágeno além de algumas poucas regiões de total imiscibilidade. Este resultado pode confirmar a proposta inicial de que nas misturas bifásicas PETcolágeno uma das frações é mais rica em PET e a outra mais rica em colágeno.

Figura 47. A) $S_{4,6}$ antes da digestão com collagenase B) $S_{4,6}$ após 16 dias de digestão com collagenase C) $S_{4,6}$ – Microscopia Confocal Raman - em verde, temos o PET puro; em vermelho, o colágeno puro; e em amarelo, a mistura entre os dois compostos.

Vale ressaltar que a MCR utilizada tem resolução lateral de 400 nm, fibras com diâmetro menor ou igual a 400 nm não foram mapeadas. Em resumo, os resultados confrontados confirmam que as fibras mais finas são constituídas de colágeno e que as fibras mais grossas são constituídas de majoritariamente por misturas de PET e colágeno.

Ainda não foram reportados na literatura materiais eletrofiados de PET com colágeno. Na literatura encontram-se diversos tipos de materiais eletrofiados à base de colágeno^{111,112,113,114}, tanto associados a polímeros biodegradáveis como a polímeros biocompatíveis não degradáveis, cujos estudos realizados consistem na caracterização da blenda eletrofiada miscível e sua possível aplicação como um material para suporte de crescimento celular.

Os materiais eletrofiados e reportados neste trabalho têm seu grande diferencial por apresentar regiões de imiscibilidade que implicam em fibras de colágeno puro, que é de grande valia para a adesão e crescimento celular. O material híbrido imiscível de PET-colágeno possibilita uma maior exposição do colágeno na forma pura. Estes materiais ainda não foram descritos na literatura.

5.8 Caracterização de Superfície

5.8.1 Medidas de Ângulo de contato

Tendo em vista a importância da superfície do material para o crescimento celular, as amostras foram caracterizadas em termos de energia de superfície, hidrofiliicidade e hidrofobicidade^{71,72}.

Foram produzidos filmes por revestimento rotacional em diversas condições de concentração, com e sem tratamento térmico. Os filmes obtidos foram analisados segundo ângulo de avanço, ângulo de recesso e histerese de

ângulo de contato, no entanto, a condição que forneceu menores resultados de histerese de ângulo de contato foi a condição obtida com soluções de concentração 30 mg/mL sem tratamento térmico.

As soluções de menor concentração geraram filmes de maior histerese, provavelmente por uma cobertura não uniforme da superfície de silício.

Os substratos de silício foram tratados com solução oxidativa para ativar os grupos OH superficiais. Podemos observar que os filmes tratados termicamente apresentaram um aumento do ângulo de avanço o que indica uma diminuição da hidrofiliabilidade. Isto se deve a um rearranjo das cadeias de forma a direcionar suas cabeças hidrofílicas polares em direção à superfície do silício rica em grupos OH. Devido a esta modificação dos ângulos pelo tratamento térmico, optou-se por não realizar o tratamento térmico.

O estudo de superfície por ângulo de contato está mostrado na Tabela 13.

Tabela 13. Medidas de ângulo de avanço ângulo de recesso e histerese dos filmes produzidos por revestimento rotacional de soluções 30 mg/mL sem recozimento

Amostra	θ_A	θ_R	Δ
	graus	graus	graus
PET	68 ± 1	52 ± 3	16 ± 2
S_{8,2}	55 ± 3	$31,1 \pm 0.4$	24 ± 2
S_{4,6}	43 ± 4	24 ± 2	19 ± 3
Colágeno	37 ± 2	21 ± 3	16 ± 2
Colágeno literatura¹¹⁵	33 ± 3	-	-

As medidas de ângulo de contato refletem a molhabilidade da superfície, ou seja, quanto maior os valores de ângulo de contato entre a superfície e uma gota de água, por exemplo, mais hidrofóbica é essa superfície enquanto que quanto menor o valor do ângulo de contato, mais hidrofílica a superfície.

A histerese de ângulo de contato reflete o grau de rugosidade do filme. Observou-se experimentalmente que os filmes obtidos de co-soluções PETcolágeno apresentam maior rugosidade do que aqueles dos materiais puros. Este resultado já seria esperado, pois o colágeno, após a sua solubilização, apresenta elevada dispersão de valores de massa molar e, em paralelo, ainda apresenta resíduos de estrutura nativa. Pode-se inferir também que a hidrofiliabilidade dos filmes aumenta de acordo com o aumento do teor de colágeno, o que pode ser explicado pela presença dos grupos NH e OH hidrofílicos dos aminoácidos prolina e hidroxiprolina na sua estrutura primária.

5.8.2 Cálculo da Energia de Superfície

Utilizando-se como segundo líquido teste o diiodometano foi possível calcular a energia de superfície para os materiais. O método de Owens-Wendt foi utilizado para o cálculo da energia de superfície total (γ_s), e estimar o valor das componentes dispersiva (γ_s^D) e polar (γ_s^P).

A energia de superfície total (γ_s) foi calculada a partir de medidas de ângulo de contato, que mede forças não covalentes entre a superfície do

material e o líquido. Este parâmetro representa a medida das forças atrativas que estão presentes na superfície.

Os resultados obtidos de energia de superfície estão mostrados na Tabela 14, os valores de ângulo de avanço em água utilizados foram mostrados anteriormente na Tabela 13.

Tabela 14. Valores de Energia de superfície total e das suas componentes polar e dispersiva

Amostra	θ_A (diiodometano) (graus)	γ_s^D	γ_s^P	γ_s
PET	23 ± 2	47.0 ± 0.6	12.8 ± 0.4	60 ± 1
S_{8,2}	31 ± 4	44 ± 2	19 ± 2	63 ± 3
S_{4,6}	32 ± 4	44 ± 2	25 ± 2	69 ± 4
Colágeno	32 ± 1	43.6 ± 0.4	28 ± 1	72 ± 1
Colágeno	37 ± 3	42 ± 1^a	30 ± 1^a	71 ± 3^a
literatura¹¹⁵				

^a Os valores foram calculados pelo método de Owens-Wendt de acordo com os ângulos que foram descritos na literatura¹¹⁵

Quando decompomos a energia de superfície total em suas componentes observa-se que na medida em que o teor de colágeno aumenta na mistura, ocorre uma pequena diminuição da componente dispersiva, indicando apenas uma ligeira modificação no caráter hidrofóbico do material. Em paralelo, a componente polar tem um aumento considerável pelo aumento do teor de colágeno na mistura. Isto confirma os dados obtidos nas medidas de ângulo de

contato que sugerem o aumento do caráter hidrofílico pela presença dos grupos NH e OH presentes na prolina e hidroxiprolina. Relatos da literatura^{85,115} mostram que quanto mais próximo o valor da componente polar do material em relação ao valor da componente polar para o colágeno melhor a interface para a adesão celular, no entanto, não existe um consenso absoluto sobre isso, uma vez que a interface material-célula é totalmente dependente da célula em estudo.

5.9 Caracterização Mecânica através de Ensaio de Tração

A partir das curvas de tensão versus deformação foram obtidos os parâmetros de Módulo de Young, elongação e tensão de ruptura. Estas curvas representam a resposta do material à força imposta na elongação e podem ser divididas em duas partes: (a) onde o ponto divisor é o ponto de escoamento, também conhecido como *yield point*, abaixo do ponto de escoamento temos um comportamento elástico onde força aplicada (σ) e deformação sofrida (ϵ) são diretamente proporcionais, comportamento este regido pela Lei de Hooke (Equação 3).

$$\sigma = E \cdot \epsilon \quad (\text{Equação 3})$$

e (b) acima do ponto de escoamento temos um comportamento plástico, onde não existe a proporcionalidade entre a força e deformação. Continuando a

submeter o material à elongação, a deformação sofrida pelo material não é mais reabsorvida, indicando que o material não retornará à sua forma original. Este comportamento é conhecido como deformação plástica.

O módulo de Young, também conhecido como módulo de elasticidade, corresponde à razão entre a tensão de tração nominal e a deformação correspondente, abaixo do limite de proporcionalidade do material. Quanto maior o valor do Módulo de Young mais rígido é o material e portanto menor será a deformação sofrida.

Observou-se que, quanto maior o teor de colágeno nos materiais, menor a resistência mecânica, já que as malhas eletrofiadas mostraram-se mais quebradiças. Estes resultados foram confirmados pelo aumento do módulo de Young (E) e pela diminuição da tração de ruptura e por menores valores de deformação na ruptura. Estes resultados estão mostrados na Tabela 15.

Tabela 15. Ensaio mecânico de tração comparativo

Amostra	E (10^{-3} GPa)	σ_b (MPa)	ϵ_b (%)
PET	$10,9 \pm 1,1$	$5,0 \pm 1,1$	$82,0 \pm 10,0$
S_{8,2}	$15,3 \pm 2,9$	$5,2 \pm 0,5$	$40,7 \pm 12,0$
S_{4,6}	$124,5 \pm 18,4$	$2,5 \pm 1,2$	$1,8 \pm 0,4$
PTFE¹³	42-60	6-15	20-30
Veia safena¹³	43	3	11
Artéria	9-12	1-2	63-76
Femoral¹³			

Comparando-se os materiais em estudo com relatos da literatura para artérias, veias e PTFE comercial, podemos observar que a amostra **S_{8,2}**, tem elevada compatibilidade para a substituição da artéria femoral, uma vez que exhibe módulo elástico e pico de deformação com valores até mesmo ligeiramente superiores aos ideais. Enquanto que amostra **S_{6,4}** apresenta valores mais próximos aos da veia safena, no entanto, deveria ser melhorado o percentual de alongação até a ruptura; uma possível proposta para esse melhoramento seria a eletrofiação utilizando um coletor rotacional que permitisse um diferentes graus de alinhamento das fibras, uma vez que foi provado por Lee *et al.*^{116,117} que o grau e a direção de alinhamento do material provoca diferentes respostas mecânicas.

Venugopal *et al.*¹¹⁸. relatou estudos de materiais eletrofiados de blendas de PCL e colágeno tipos I e III, com fibras diâmetro por volta de 210-225 nm. Foi observado que o módulo elástico correspondia a 18 MPa, enquanto que o módulo de alongação correspondia a 7,79 MPa, de acordo com estes resultados foi proposta a utilização destes materiais como vasos sanguíneos conduites. Estes valores encontrados por Venugopal *et al.*¹¹⁸ são compatíveis com o material **S_{8,2}**.

5.10 Ensaio de adesão, viabilidade e proliferação celular com fibroblastos (3T3-L1) e HUVEC

Os fibroblastos são células do tecido conjuntivo que apresentam capacidade de sintetizar proteínas, como colágeno, glicosaminaglicanas e glicoproteínas componentes da matriz extracelular. Devido a estas propriedades estas células apresentam alta capacidade de aderência e resistência, podendo-se facilmente realizar testes de adesão, proliferação e viabilidade celular. As células de fibroblastos utilizados são da linhagem 3T3-L1 de camundongo.

A interação célula-material é regida pelo reconhecimento de determinados sítios ativos na superfície do material. A estes sítios são depositadas integrinas que permitem a adesão e a proliferação celular⁸³.

O ensaio de MTT com células de fibroblastos forneceu os seguintes resultados, de acordo com a Figura 48: (1) Os materiais eletrofiados constituídos de colágeno possuem a partir do segundo dia significância estatística da ordem de $p < 0.001$ (***) quando comparados com o PET puro; (2) No entanto, os materiais $S_{8,2}$ e $S_{4,6}$ não apresentaram diferença significativa entre eles. A adesão celular nos materiais pode ser comprovada através da Microscopia Eletrônica de Varredura (Figura 49), sendo que em todos os materiais foi observada a adesão dos fibroblastos.

Figura 48. Ensaio de MTT para os fibroblastos 3T3-L1

Figura 49. Microscopia Eletrônica de Varredura – 1 dia de cultura (A) PET (B) $S_{8,2}$ (C) $S_{4,6}$

As células HUVEC são células endoteliais de cordão umbilical, cuja principal função é o recobrimento dos vasos sanguíneos. Os materiais a serem utilizados como enxertos vasculares devem ser antitrombogênicos ou tromboresistentes. O método mais adequado para resolver este problema é a endotelialização¹¹⁰, sendo utilizado para melhorar a desobstrução de enxertos vasculares de diâmetro reduzido, pois as células endoteliais liberam fatores para controlar a trombogênese ou fibrinólise, a ativação ou inibição de plaquetas^{111,112}.

O ensaio de MTT para as células HUVEC estão mostrados na Figura 50.

Figura 50. Ensaio de MTT para as células HUVEC

Frente às células HUVEC, $S_{8,2}$ apresentou significância estatística da ordem de $p < 0.001$ quando comparada ao PET a partir do terceiro dia, enquanto que $S_{4,6}$ apresentou significância estatística da ordem de $p < 0.001$ somente no décimo quinto dia. Quando comparados entre si $S_{8,2}$ e $S_{4,6}$ os materiais apresentaram significância da ordem $p < 0.001$ no terceiro e no nono dia, e ao décimo quinto o valor de p foi de $p < 0.01$.

De acordo com os resultados obtidos podemos inferir que os dois materiais apresentam níveis de proliferação semelhantes e superiores ao PET. No entanto, os níveis de proliferação mostraram-se sempre superiores na amostra $S_{8,2}$ que apresenta uma menor quantidade de colágeno que $S_{4,6}$.

Os resultados de adesão e proliferação celular das células de fibroblastos e HUVEC são comparáveis com relatos da literatura em que células de fibroblastos de ratos proliferam melhor em substratos mais hidrofílicos,

enquanto que células endoteliais humanas aderem melhor em materiais com energia de superfície intermediária¹¹⁹.

Foram obtidas imagens de MEV para os diferentes materiais com células HUVEC com tempos de cultura que variaram de 1 a 7 dias (Figura 51, Figura 52, Figura 53). Tempos de cultura maiores que 7 dias não foram realizados, pois o material já estaria completamente recoberto.

Figura 51. Microscopia Eletrônica de Varredura PET – (A) 1 dia de cultura (B) 4 dias de cultura (C) 7 dias de cultura

Figura 52. Microscopia Eletrônica de Varredura S_{8,2} – (A) 1 dia de cultura (B) 4 dias de cultura (C) 7 dias de cultura

Figura 53. Microscopia Eletrônica de Varredura $S_{4,6}$ – (A) 1 dia de cultura (B) 4 dias de cultura (C) 7 dias de cultura

Estes resultados mostram que os materiais produzidos à base de colágeno com diferentes morfologias apresentaram praticamente o mesmo comportamento frente à adesão e a proliferação celular. Os materiais à base de colágeno apresentavam 20% e 60% em percentual de colágeno e não houve mudanças significativas em relação à adesão celular. Podemos justificar que as diferenças relativas à correlação hidrofobicidade/hidrofiliicidade ou a dispersão do colágeno na mistura não foram suficientes para a observação de elevada significância ($p < 0.001$) na proliferação celular comparativa entre os materiais $S_{8,2}$ e $S_{4,6}$.

6 Conclusões

O estudo da eletrofiação do PET funcionou como excelente modelo comparativo para o desenvolvimento da eletrofiação das co-soluções PET e colágeno, objetivo básico deste trabalho. Além disso, a determinação de parâmetros ideais da eletrofiação do PET é de grande importância para o grupo, uma vez que estão sendo desenvolvidos estudos da enxertia de grupos funcionais em sua superfície, com vistas a uma posterior interação de biomacromoléculas.

Malhas eletrofiadas de PET e colágeno foram obtidas por eletrofiação em dois sistemas de solvente: HFIP e HFIP/TFA 7:2. O solvente e o teor de colágeno na co-solução PET e colágeno eletrofiada mostraram ser os parâmetros de maior influência na morfologia dos materiais obtidos, como comprovado pelos experimentos de MEV e MCR. Isto provavelmente ocorre porque, em solução, PET e colágeno geram diferentes tipos de misturas tais como: co-soluções reais ou suspensões estáveis (visualmente homogêneas), porém bifásicas, e misturas visualmente bifásicas.

Nas malhas de PET e colágeno eletrofiadas em HFIP observou-se que, à medida que aumentava o teor de colágeno na mistura, havia uma maior tendência à formação de fitas e de fibras muito finas entrelaçadas às fibras. Além disso, o aumento do teor de colágeno levou a obtenção de malhas com distribuição de diâmetro bimodal. Estes últimos apresentaram menor

porosidade uma vez que as fibras mais finas conferiam um maior empacotamento ao material. No entanto, não foram prejudicados os níveis de adesão e proliferação celular, como confirmado no experimento de MTT com fibroblastos e HUVEC.

As análises de dicroísmo circular e eletroforese em *SDS-page* revelaram que a presença do TFA no co-solvente leva a uma total desnaturação de colágeno à gelatina, enquanto que em HFIP esta desnaturação foi parcial, quando PET está presente. Até o presente momento, não foi possível calcular o teor de colágeno e de gelatina nos materiais eletrofiados.

Duas evidências experimentais que indicam a parcial transformação do colágeno em gelatina seriam a solubilidade em água e a fragilidade mecânica. As excelentes propriedades mecânicas do colágeno nativo foram perdidas no processo de solubilização sendo que o material de maior teor de colágeno que ainda permitia manipulação foi o $S_{4,6}$. Para os materiais eletrofiados de PET e colágeno não se observou a dissolução de determinadas fibras com características do colágeno. Além disso, estudos de microscopia confocal Raman, assim como estudos de digestão com colagenase mostraram fortes evidências da presença de fibras de alto teor de colágeno. Ainda, PET e colágeno formam malhas de composição complexa, nas quais são encontradas fibras compostas de materiais puros, mas também formam blendas em que os dois materiais são encontrados em uma mesma fibra

Os materiais eletrofiados e reportados neste trabalho têm seu grande diferencial por apresentar regiões de imiscibilidade que sugerem a presença de fibras de colágeno puro, que é de grande valia para a adesão e crescimento celular. O material híbrido imiscível de PET-colágeno possibilita uma maior exposição do colágeno. Os materiais híbridos de PET e colágeno ainda não foram descritos na literatura, bem como uma descrição aprofundada de como ocorre a separação polímero-colágeno durante o processo de eletrofiação, sendo esta última a responsável pela obtenção de um material híbrido com arquitetura única.

Os suportes híbridos mostraram-se muito superiores como suportes de crescimento celular quando comparados ao PET puro, tanto para fibroblastos, (células 3T3-L1), quanto para células endoteliais (células HUVEC).

Considerando-se a utilização destes materiais como modelos de enxertos vasculares, a amostra $S_{8,2}$ apresentou-se como ideal, visto que apresentou ótima relação hidrofiliicidade/hidrofobicidade refletidas em suas excelentes propriedades de adesão e crescimento celular. Também apresentou excelentes propriedades mecânicas quando comparadas com as do PET. Além disso, $S_{8,2}$ mostrou ter valores de módulo de elasticidade e elongação máxima próximos ao da artéria femoral. O material $S_{4,6}$ apresentou-se como um possível material de revestimento de enxertos por suas propriedades de adesão ligeiramente superiores às do $S_{8,2}$, no entanto, com baixa resistência mecânica.

7 Referências Bibliográficas

1. ROSAMOND, W., *et al.*, 2008 Update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee, *Heart Disease and Stroke Statistics*, 2008, 25-146.
2. BOLAND, E.D., *et al.*, Electrospinning collagen and elastin: preliminary vascular tissue engineering, *Frontiers in Bioscience*, 9, 2004, 1422–1432.
3. SILVER, F. H., *Biomaterials Medical Devices and Tissue Engineering, Integrated Approach; Chapman and Hall: London*, 1994.
4. WILLIAMS, D., *Concise Encyclopedia of Medical and Dental Materials*; Pergamon Press: Oxford UK., 1990.
5. SZYCHER, M., *High Performance Biomaterials: a Comprehensive Guide to Medical and Pharmaceutical Applications*; Technomic Publishing Co.: Lancaster, Basel, 1991.
6. IKADA, Y. Surface modification of polymers for medical applications, *Biomaterials*, 1994, 725-736.
7. KANG, E. T., *et al.*, Grafting of polymers surfaces, *Encyclopedia of surface and colloid science*, Hubbard A. Ed., Marcel Dekker: New York, 2002, 2320-2340.
8. GUPTA, B., *et al.*, Plasma-induced graft polymerization of acrylic acid onto poly(ethylene terephthalate) films: characterization and human

- smooth muscle cell growth on grafted films, *Biomaterials*, 2002, 863-871.
9. KARAMUK, E., *et al.*, Partially degradable film/fabric composites: textile scaffolds for liver cell culture. *Artificial organs*, 1999, 881-884.
 10. MAYER, J., *et al.*, Matrixes for tissue engineering-scaffold structure for a bioartificial liver support system, *Journal of Controlled Release*, 2000, 81-90.
 11. YANG, M. R., *et al.*, The antibacterial activities of hydrophilic-modified nonwoven PET, *Material Science Engineering*, 2002, 167-173.
 12. YING, L., *et al.*, Immobilization of galactose ligands on acrylic acid graft-copolymerized poly(ethylene terephthalate) film and its application to hepatocyte culture, *Biomacromolecules*, 2003, 157-165.
 13. SELL, S. A., *et al.*, Electrospinning of collagen/biopolymers for regenerative medicine and cardiovascular tissue engineering, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2009, 1007–1019.
 14. LIAN, X., *et al.*, Biomaterial in the development and future of vascular grafts, *Journal of vascular surgery: official publication the society for vascular surgery and international society for cardiovascular surgery, North American Chapter*, 2003, 472-480.
 15. RATCLIFFE, A., Tissue engineering of vascular grafts, *Matrix Biology*, 2000, 353-357.

16. JARREL, B. E., *et al.*, Use of freshly isolated capillary endothelial cells for the immediate establishment of a monolayer on a vascular graft at surgery, *Surgery*, 1986, 392-399.
17. SHIN, H., *et al.*, Biomimetic materials for tissue engineering, *Biomaterials*, 2003, 4353-4364.
18. LUSCHER, T. F., *et al.*, Biology of the endothelium, *Clinical Cardiology*, 1997, 3-10.
19. DEUTSCH, M., *et al.*, Clinical autologous *in vitro* endothelialization of infrainguinal e PTFE grafts in 100 patients: a 9-year experience, *Surgery*, 1999, 847-855.
20. BISSON, I., *et al.*, Acrylic acid grafting and collagen immobilization on poly(ethylene terephthalate) surfaces for adherence e growth of human bladder smooth muscle cells, *Biomaterials*, 2002, 3149-3158.
21. HUEBSCH, J. B., *et al.*, Photoreactive analog of peptide FN-C/H-V from the carboxy-terminal heparin-binding domains of fibronectin supports endothelial cell attachment and spreading on biomaterial surfaces, *Journal of biomedical material research*, 1996, 555-567.
22. ITO, Y., *et al.*, Enhancement of cell growth on a porous membrane co-immobilized with cell-growth and cell adhesion factors, *Biomaterials*, 1997, 197-202.

23. MA, Z. W., *et al.*, Surface engineering of electrospun polyethylene terephthalate (PET) nanofibers towards development of a new material for blood vessel engineering, *Biomaterials*, 2005, 2527-2536.
24. FRANCESCHI, R.T., *et al.*, Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells, *Journal Bone Mineral Research*, 1992, 235-246.
25. LIU, X., *et al.*, Polymeric scaffolds for bone tissue engineering, *Annals of Biomedical Engineering*, 2004, 477-486.
26. SHARMA, B., *et al.*, Engineering structurally organized cartilage and bone tissues, *Annals of Biomedical Engineering*, 2004, 148-159.
27. ROSSO, F., *et al.*, Smart materials as scaffolds for tissue engineering, *Journal Cell Physiology*, 2005, 465-470.
28. SARKAR, S., *et al.*, Achieving the ideal properties for vascular bypass grafts using a tissue engineered approach: a review, *Medical & Biological Engineering & Computing*, 2007, 327-336.
29. DEITZEL, J.M., *et al.*, The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles, *Polymer*, 2001, 261-272.
30. SON, W.K., *et al.*, The effects of solution properties and polyelectrolyte on electrospinning of ultrafine poly(ethylene oxide) fibers, *Polymer*, 2004, 2959-2966.

- 31.FONG, H., *et al.*, Beaded nanofibers formed during electrospinning, *Polymer*, 1999, 4585-4592.
- 32.KOSKI, A., *et al.*, Effect of molecular weight on fibrous PVA produced by electrospinning, *Materials Letters*, 2004, 493-497.
- 33.PHAM, Q. P., *et al.*, Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review, *Tissue Engineering*, 2006, 1197-1211.
- 34.BHARDWAJ, N., *et al.*, Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique, *Biotechnology Advances*, 2010, 325-347.
- 35.YANG, Q., *et al.*, Influence of solvents on the formation of ultrathin uniform poly(vinyl pyrrolidone) nanofibers with electrospinning, *Journal of Polymer Science*, 2004, 3721-3726.
- 36.HUANG, Z. M., *et al.*, A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites, *Composites Science and Technology*, 2003, 2223-2253.
- 37.Andrady, A. L., *Science and Technology of Polymer Nanofibers*, John Wiley & Sons Inc., 2008.
- 38.RENEKER, D.H., *et al.*, Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning, *Nanotechnology*, 1996, 216-223.
- 39.SHIN, Y.M., *et al.*, Electrospinning: a whipping fluid jet generates submicron polymer fibers, *Applied Physics Letters*, 2001, 1149-1151.

- 40.SHIN, Y. M., *et al.*, Experimental characterization of electrospinning: the electrically forced jet and instabilities, *Polymer*, 2001, 9955-9967.
- 41.HOHMAN, M. M., *et al.*, Electrospinning and electrically forced jets. I. Stability theory, *Physics of Fluids*, 2001, 2201-2220.
- 42.TEO, W. E., *et al.*, A review on electrospinning design and nanofibre assemblies, *Nanotechnology*, 2006, 89-106.
- 43.DOSHI, J., *et al.*, Electrospinning process and applications of electrospun fibers, *Journal Electrostatics*, 1995, 151-160.
- 44.VELEIRINHO, B., *et al.*, Solvent and concentration effects on the properties of Poly(ethylene Terephthalate) nanofiber mats, *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics*, 2008, 460-471.
- 45.McKEE, M. G., *et al.*, Correlations of solution rheology with electrospun fiber formation of linear and branched polyesters, *Macromolecules*, 2004, 1760–1767.
- 46.SUKIGARA, S., *et al.*, Regeneration of Bombyx mori silk by electrospinning-part 1: processing parameters and geometric properties, *Polymer*, 2003, 5721–5727.
- 47.ZONG, X.H., *et al.*, Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes, *Polymer*, 2002, 4403-4412.
- 48.JARUSUWANNAPOOM, T., *et al.*, Effect of solvents on electrospinnability of polystyrene solutions and morphological appearance of

- resulting electrospun polystyrene fibers, *European Polymer Journal*, 2005, 409-421.
49. GUPTA, P., *et al.*, Electrospinning of linear homopolymers of poly(methylmethacrylate): exploring relationships between fiber formation, viscosity, molecular weight and concentration in a good solvent, *Polymer*, 2005, 4799-4810.
50. HAGHI, A. K., *et al.*, Trends in electrospinning of natural nanofibers, *Physica Status Solidi(a)*, 2007, 1830-1834.
51. McKEE, M. G., *et al.*, Phospholipid non-woven electrospin membranes, *Science*, 2006, 353-355.
52. ZHANG, C., *et al.*, Study on morphology of electrospun poly (vinyl alcohol) mats, *European Polymer Journal*, 2005, 423-432.
53. DEMIR, M. M., *et al.*, Electrospinning of polyurethane fibers, *Polymer*, 2002, 3303-3309.
54. YUAN, X. Y., *et al.*, Morphology of ultrafine polysulfone fibers prepared by electrospinning, *Polymer International*, 2004, 1704-1710.
55. WANNATONG, L., *et al.*, Effects of solvents on electrospun polymeric fibers: preliminary study on polystyrene, *Polymer International*, 2004, 1851-1859.

56. ZUO, W. W., *et al.*, Experimental study on relationship between jet instability and formation of beaded fibers during electrospinning, *Polymer Engineering & Science*, 2005, 704-709.
57. LEE, J. S., *et al.*, Role of molecular weight of a tactic poly (vinyl alcohol) (PVA) in the structure and properties of PVA nanofabric prepared by electrospinning, *Journal of Applied Polymer Science*, 2004, 1638-1646.
58. KI, C. S., *et al.*, Characterization of gelatin nanofiber prepared from gelatin-formic acid solution, *Polymer*, 2005, 5094-5102.
59. BUCHKO, C. J., *et al.*, Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films, *Polymer*, 1999, 7397-7407.
60. MIT-UPPATHAM, C., *et al.*, Ultrafine electrospun polyamide-6 fibers: effect of solution conditions on morphology and average fiber diameter, *Macromolecular Chemical and Physics*, 2004, 2327-2338.
61. CASPER, C. L., *et al.*, Controlling surface morphology of electrospun polystyrene fibers: effect of humidity and molecular weight in the electrospinning process, *Macromolecules*, 2004, 573-578.
62. BECKMAN, M. J., *et al.*, Collagen, *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, Marcel Dekker, New York, 2004.

63. GOISSIS, A. P. A., Dissertação de Mestrado em Bioengenharia, Análise estrutural do colágeno tipo I: correlação estrutura atividade biológica, Universidade de São Paulo São Carlos, 2007.
64. SENA, L. A., Tese de Doutorado, produção e Caracterização de compósitos hidroxiapatita-colágeno para aplicações biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.
65. KOLACNA, L., *et al.*, Biochemical and biophysical aspects of collagen nanostructure in the extracellular matrix, *Physiological Research*, 2007, 51-60.
66. FRIESS, W., Collagen - biomaterial for drug delivery, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 1998, 113-136.
67. WESOLOWSKI, S. A., *et al.*, The compound prosthetic vascular graft: a pathologic survey, *Surgery*, 1963, 19-44.
68. WESOLOWSKI, S. A., *et al.*, Arterial prosthetic materials, *Annals of The New York Academy of Sciences*, 1968, 325-344.
69. JOSE, M. V., *et al.*, Fabrication and characterization of aligned nanofibrous PLGA/Collagen blends as bone tissue scaffolds, *Polymer*, 2009, 3778-3785.

70. LUTOLF, M. P., *et al.*, Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering, *Nature Biotechnology*, 2005, 47-55.
71. KENNEDY, S. B., *et al.*, Combinatorial screen of the effect of surface energy on fibronectin-mediated osteoblast adhesion, spreading and proliferation, *Biomaterials*, 2006, 3817-3824.
72. VAN DER VALK, P., *et al.*, Interaction of fibroblasts and polymer surfaces: relationship between surface free energy and fibroblast spreading, *Journal of Biomedical Materials Research*, 1983, 807-817.
73. PARK, J. B., *Biomaterials an Introduction*, Plenum Press New York, 1979.
74. BLANCO, E. M., *et al.*, Simultaneous investigation of the influence of topography and charge on protein adsorption using artificial nanopatterns, *Langmuir*, 2008, 2284-2287.
75. MEGHRI, N. W., *et al.*, Directionally solidified biopolymer scaffolds: Mechanical properties and endothelial cells response, *Biological and biomedical Materials*, 2010, 71-75.
76. PETRI, D. F. S., *et al.*, An Improved Method for the Assembly of Amino-Terminated Monolayers on SiO₂ and the Vapor Deposition of Gold Layers, *Langmuir*, 1999, 4520-4523.

77. RULE, M., In Polymer Handbook, 4th ed.; BRANDRUP, J.; IMMERGUT, E. H.; GRULKE, E. A., Eds.; Wiley-Interscience: New York, 1999; 113-118.
78. PODRAZKY, V., *et al.*, Densities of collagen dehydrated by some organic solvents, *Specialia Experientia*, 1996, 792-792.
79. MANDL, I., *et al.*, Isolation and characterization of Proteinase and Collagenase from *Cl. Histolyticum*, *Journal of Clinical Investigation*, 1953, 1323-1329.
80. MOORE, S., *et al.*, Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids, *Journal of Biological Chemistry*, 1948, 367-388.
81. William H. Press, Saul A. Teukolsky, William T. Vetterling and Brian P. Flannery. Numerical Recipes in C, Chap. Savitzky-Golay Smoothing Filters, S. 650-655. The Press Syndicate of the University of Cambridge, 2. Aufl., 1999.
82. ADAMSON, A. W., *Physical Chemistry of Surfaces*, Third Edition, John Wiley & Sons, New York, 1976.
83. BOUALI, B., *et al.*, Acid-base approach to latex particles containing specific group based on wettability measurements, *Journal of colloid and interface Science*, 1998, 81-89.

84. YANG, J., *et al.*, Enhanced cell affinity of Poly (D,L-lactide) by combining plasma treatment with collagen anchorage, *Biomaterials*, 2002, 2607-2614.
85. CASARANO, R., *et al.*, Enhanced fibroblast adhesion and proliferation on electrospun fibers obtained from poly(isosorbide succinate-b-l-lactide) block copolymers, *Polymer*, 2009, 6218-6227.
86. CHEN, C., *et al.*, A novel shape-stabilized PCM: Electrospun ultrafine fibers based on lauric acid/polyethylene terephthalate composite, *Materials Letters*, 2008, 3515-3517.
87. HONG, K. H., *et al.*, Hydraulic Permeabilities of PET and Nylon 6 Electrospun Fiber Webs, *Journal of Applied Polymer Science*, 2006, 167-177.
88. MATTHEWS, J. A., *et al.*, Electrospinning of Collagen Nanofibers, *Biomacromolecules*, 2002, 232-238.
89. HUANG, L., *et al.*, Engineered collagen-PEO nanofibers and fabrics, *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, 2001, 979-993.
90. RAMAKRISHNA, S., *et al.*, *An introduction to electrospinning and Nanofibers*, World Scientific, 2005.
91. KESAVAN, V., *et al.*, Fluoro alcohol as reaction medium: one-pot synthesis of β -hydroxy sulfoxides from epoxides, *Tetrahedron Letters*, 2000, 2895-2898.

92. BECH, L., *et al.*, Chemical surface modification of poly(ethylene terephthalate) fibers by aminolysis and grafting of carbohydrates, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2007, 2172-2183.
93. GEORGE, A., *et al.*, FTIRS in H₂O demonstrates that collagen monomers undergo a conformational transition prior to thermal self-assembly in vitro, *Biochemistry*, 1991, 2372-2377.
94. PAYNE, K. J., *et al.*, Fourier transform ir spectroscopy of collagen and gelatin solutions: Deconvolution of the amide I band for conformational studies, *Biopolymers*, 1988, 1749-1760.
95. LIAO, S., *et al.*, Biomimetic electrospun nanofibers for tissue regeneration, *Biomedical Materials*, 2006, 45-53.
96. MU, C., *et al.*, Temperature Induced Denaturation of Collagen in acidic solution, *Biopolymers*, 2007, 86, 282-287.
97. BILGEN, G., *et al.*, Collagen content and electrophoretic analysis of type I collagen in Breast Skin of Heterozygous naked neck and normally feathered commercial broilers, *Turkish Journal of Veterinary and animal Sciences*, 1999, 483-487.
98. SINI, P., *et al.*, Role of decorin on in vitro fibrillogenesis of type I collagen, *Glycoconjugate Journal*, 1997, 871-874.

99. DONG, B., *et al.*, Electrospinning of collagen nanofiber scaffolds from benign solvents, *Macromolecular Rapid Communications*, 2009, 539-542.
100. ZEUGOLIS, D. I., *et al.*, Electro-spinning of pure collagen nanofibres – Just an expensive way to make gelatin?, *Biomaterials*, 2008, 2293-2305.
101. BARNES, C.P., *et al.*, Nanofiber technology: designing the next generation of tissue engineering scaffolds, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007, 1413-1433.
102. YOON, D.M., *et al.*, Polymeric scaffolds for tissue engineering applications, *Tissue Engineering*, 2007, 81-8-18.
103. FASSMAN, G. D., Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules, First Edition, Plenum Press, New York, 1996.
104. YANG, L., *et al.*, Mechanical properties of single electrospun collagen type I fibers, *Biomaterials*, 2008, 955-962.
105. BOLAND, E.D., *et al.*, Utilizing acid pretreatment and electrospinning to improve biocompatibility of poly(glycolic acid) for tissue engineering, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2004, 144-152.

106. BHATTARAI, S.R., *et al.*, Novel biodegradable electrospun membrane: Scaffold for tissue engineering, *Biomaterials*, 2004, 2595-2602.
107. Silverstein, R. M., *et al.*, Identificação espectrométrica de compostos orgânicos, *Editora Guanabara Koogan S. A.*, 5ª edição, 1994.
108. TATAGIRI, G. E., *et al.*, Spinning of collagen fibers and characterizing thermal, mechanical, tensile and structural properties, *Bioengineering Conference*, 2004, 134-135.
109. BALDISSERA, A. F., *et al.*, Reciclagem Química de PET Pós-Consumo: Síntese de Copolímeros Alifático-Aromáticos (PET-co-PEA), *Revista Matéria*, 2005, 577-585.
110. HORN, M., *et al.*, Interaction of anionic collagen with chitosan: Effect on thermal and morphological characteristics, *Carbohydrate Polymer*, 2009, 239-243.
111. BERRY, L., *et al.*, Bacterial Collagenase and Collagen identification, *Connective Tissue Research*, 1988, 153-158.
112. SCHOFER, M. D., *et al.*, Characterization of a PLLA collagen I Blend nanofiber scaffold with respect to growth and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, *The Scientific World Journal*, 2009, 118-129.

113. CHOI, J. S., *et al.*, The influence of electrospun aligned poly(ϵ -caprolactone)/collagen nanofiber meshes on the formation of self-aligned skeletal muscle myotubes, *Biomaterials*, 2008, 2899-2906.
114. CHEN, R., *et al.*, Electrospinning Thermoplastic Polyurethane-Contained Collagen Nanofibers for Tissue-Engineering Applications, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2009, 1513-1536.
115. HARNETT, E. M., *et al.*, The surface energy of various biomaterials coated with adhesion molecules used in cell culture, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2007, 90-97.
116. LEE, K. H., *et al.*, Influence of a mixing solvent with tetrahydrofuran and N, N-dimethylformamide on electrospun poly(vinylchloride) nonwoven mats, *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 2002, 2259-2268.
117. LEE, S. H., *et al.*, Design, synthesis and electrospinning of a novel fluorescent polymer for optical sensor applications, *Materials Research Society*, 2002, 403-408.
118. VENUGOPAL, Y. Z., *et al.*, Fabrication of modified and functionalized polycaprolactone nanofibre scaffolds for vascular tissue engineering, *Nanotechnology*, 2005, 2138-2142.
119. VELZENBERGER, E., *et al.*, Characterization of biomaterials polar interactions in physiological conditions using liquid-liquid contact

angle measurements Relation to fibronectin adsorption, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2009, 238-244.

ANEXOS

Sumula Curricular

Mariana Carvalho Burrows

Nascimento **13/03/1985 – Fortaleza/CE - Brasil**

Formação Acadêmica/Titulação

- 2008 – Presente** Mestrado em Química Orgânica.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
Título: Obtenção, caracterização e aplicação de suportes eletrofiados de PET-colágeno
Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Catalani
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2002 - 2007** Graduação em Bacharelado em Química
Universidade de Federal do Ceará, UFC, Ceará, Brasil
- 2002** Iniciação Científica em Química Orgânica
Título: Síntese de aminoácido através de Reações de adição de Michael
Orientação: Prof. Dr. Maria da Conceição Oliveira
Universidade Federal do Ceará (UFC)
Sem bolsa
- 2003 – 2005** Iniciação Científica em Polímeros

Título: Caracterização físico-química da goma de exsudatos regionais de *Schinopsis Brasiliensis*

Título: Síntese e caracterização de complexos polieletrólíticos de goma do chichá com quitosana

Orientadora: Prof. Dra. Regina Célia Monteiro de Paula

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Ceará e do PIBIC

Universidade Federal do Ceará (UFC)

2006

Trabalho de conclusão de curso

Título: Síntese de GRAFTS de goma do cajueiro e acrilamida e estudo cinético de sua degradação

Orientadora: Prof. Dra. Judith Feitosa

Atuação profissional

Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

2008 - Atual Aluna de Mestrado , Carga horária: 40, Regime: Dedicação Exclusiva, bolsista FAPESP.

2003 - 2005 Aluno de Iniciação Científica , Carga horária: 8, Regime: Dedicação Exclusiva, bolsista FUNCAP/PIBIC.

Prêmios e títulos

Medalha de Ouro Olimpíada Brasileira de Química - 2001.

Medalha de Prata Olimpíada Norte e Nordeste de Química - 2001.

Medalha de bronze na Olimpíada Norte e Nordeste de Química -2000.

Menção Honrosa na Olimpíada Brasileira de Química - 2000.

Medalhas na Olimpíada Cearense de Química – 1999 – 2000 - 2001.

Trabalhos publicados em anais de eventos

BURROWS, M. C., Catalani, L. H., Suportes eletrofiados de PET-colágeno: Potencial material para enxertos vasculares, II Encontro dos estudantes de Pós-graduação da USP, 2010, Brazil, São Paulo, Brasil.

BURROWS, M. C., Catalani, L. H., Polymer-Protein Hybrid Composites for Tissue Replacement, Proteins and Peptides Conference, 2010, Beijing, China.

BURROWS, M. C., Catalani, L. H., Estudo da modificação superficial de PET para aplicação médica de PET eletrofiado funcionalizado, 32ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química, 2009, Fortaleza, Brasil.

Silva, D. A., CARVALHO, M. C., Carvalho, M. L., Rosa, D.S ; de Paula R.C.M., Feitosa, Judith P A, Preparation and degradation behavior of cashew gum derivatives, 6th International Symposium on Natural Polymers and composites, 2007, Gramado, Brazil.

CARVALHO, M. C., Paula, R. C. M., Síntese de complexos polieletrólitos da goma de chichá com quitosana, XXIV Encontro Universitário de Iniciação à Pesquisa, 2005, Fortaleza, Brasil.

CARVALHO, M. C., Paula, R. C. M., Characterization of gum exsudate of *Schinopsis Brasiliensis*, PPS 2004 Americas Regional Meeting, 2004, Florianópolis, Brazil.

CARVALHO, M. C., Cavada, B. S., Duarte, C. A., Pinheiro, J. A., Oliveira, M. C. F., Pinheiro, J. R., Arruda, G. B., Soares, J. N. T., Dopagem da L-Alanina com Metais: Cristalização e caracterização, XXVI Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada, 2003, Caxambú, Brasil.

CARVALHO, M. C., Brito, A. C. F., Paula, R. C. M., Composição e características físico-química da goma exsudada da Braúna (*Schinopsis glabra*), 26^a Congreso Latinoamericano de Química e 27^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química), 2004, Salvador, Brasil.

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação em pôster realizada pelo orientador Luiz Henrique Catalani, no Zing Conference – Polymer Chemistry Conference, Polyethelene terephthalate-Collagen (PET-col) hybrid electrospun material: a potential material for vascular grafts, Cancun , México, 2010.
2. Apresentação oral no II Encontro dos estudantes de pós-graduação da USP, Suportes eletrofiados de PET-colágeno: Potencial material para enxertos vasculares, São Paulo, 2010.

3. Apresentação oral realizada pelo orientador Luiz Henrique Catalani, Polymer-Protein Hybrid Composites for Tissue Replacement, no PECon (Proteins and Peptides Conference), 2010, Beijing, China.
 4. Participação no International Workshop on Nanomaterials and Functional Materials (Brazil - Unicamp – São Paulo – 2009).
 5. Participação no 1º Workshop de Viscosidade Intrínseca (Brazil - USP – São Paulo - 2009).
 6. Apresentação em pôster no 32º Congresso da Sociedade Brasileira de Química, Estudo da modificação superficial de PET para aplicação médica de PET eletrofiado funcionalizado, (Brazil - Fortaleza - 2009).
 7. Apresentação em pôster no 6th International Symposium on Natural Polymers and Composites (Brazil - Gramado – 2007).
 8. Apresentação em poster no 7th International Conference on Polymer Processing - Americas Regional meeting (Brazil - Florianópolis – 2004).
 9. Participação no 15th International Surfactants Conference (Brazil - Fortaleza – 2004).
 10. Participação no 7º Congresso da Associação Brasileira de Polímeros - ABPOL – (Brazil - Belo Horizonte – 2003).
 11. Presentations at the Scientific Initiation Conference (Brazil UFC - Fortaleza) – 2002, 2003, 2004 and 2005.
-