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

Daniel de Souza Alcobia

**Produção de nanofibras
alinhadas de polímeros
biodegradáveis para crescimento
e regeneração de células neurais**

Versão corrigida da dissertação

São Paulo
Data do Depósito na SPG:
09/10/2013

Daniel de Souza Alcobia

Produção de nanofibras alinhadas de polímeros biodegradáveis para crescimento e regeneração de células neurais

*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

Daniel de Souza Alcobia

“Produção de nanofibras alinhadas de polímeros biodegradáveis para crescimento e regeneração de células neurais”

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: _____

*Dedico esse trabalho às pessoas de bom
coração, tão raras e tão necessárias.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à todos que colaboraram direta e indiretamente para a realização deste trabalho. Por isso esta é uma tarefa difícil: as pessoas envolvidas na consumação deste trabalho são inúmeras, numa longa e extensa cadeia de interconexão, que revela a unidade do Universo. Tudo é um. Acima como abaixo.

Agradeço à Deus por fazer este trabalho possível e por me dar saúde e sabedoria em medidas adequadas.

Agradeço aos meus familiares: meus avós e tio, meu pai e minha mãe e em especial aos meus irmãos Diogo e Ana Júlia.

Agradeço à minha querida namorada, Fernanda, por ser sempre uma fonte de alegria e ternura, por me ensinar os caminhos do amor e da abnegação e por me fazer sentir querido.

Agradeço aos meus bons amigos, que com sua alegria e presença (pequena ou grande, perto ou distante) tornaram a travessia desses tempos tenebrosos mais agradável: Thiago, Bruno, André, Victor, Wagner, Ricardo, Luana, Marcus, Sueli, Nazareth e toda turma da vila. Tenho muito que agradecer também aos meus amigos de Unicamp e da Rep Vinte, em especial ao Carlos e família, que foram sempre muito solícitos e prestativos e aos queridos Tiago, Raquel, Danilo, Lúcia, Edmilson, Fellipy, Luiz, Ana Carolina, Ariane, Michele, Paula, Lucas, Bruno, Eraldo, Gustavo, Alex, Érica, Thaís, Daniel, Renato, Paulo, Milena, e por aí vai... Agradeço também a acolhida e bons momentos com Carlos, Miriam, Luiz, Milla, Susana e, claro, minha querida Fernanda.

Agradeço profundamente aos amigos que fiz na USP, por tanto apoio e suporte nas lutas do dia-a-dia, e sem os quais também este trabalho não teria chegado ao fim favorável: Ana Paula, Mariana, Renata, Ricardo, Daniel, Mayara, Flávia C., Flávia G., Vânia, Vitor, Alliny, Henrique, Nathália, Danielle,

Jana, Patrícia, Silvinha, Romeu, Thomas. Quero agradecer muito também aos funcionários do IQ-USP por seu apoio providencial e irrestrito em tudo que precisei, em especial à Cibeles ao prof Josef Baader e Milton, Emiliano, Marcelo; aos profs Tibor e Breno pelas boas conversas.

Agradeço aos meus professores de Campinas, por terem me mostrado o altíssimo nível de excelência e competência a que se pode chegar (ainda que eu nem sempre – ou talvez mesmo nunca – tenha correspondido a tal padrão) e por terem me formado um bom químico. Gostaria de mencionar os profs Buffon, Munir, Jarbas, Rogério, Dias, Galembeck, Oswaldo, Newton e Fernando da Física, e as professoras da Faculdade de Educação.

Agradeço ao Arnaldo e à todo pessoal da Artron. E à Erica, Cassaro, Saladino e Trevisan, por sua arte inspiradora. E ao Jorge e à Esmeralda, e Caetano e Ravi.

Agradeço ao prof Ronaldo por todo suporte e entendimento, e pelas proveitosas e agradáveis discussões. Agradeço também ao Wonder pela ajuda e discussões igualmente interessantes.

Agradeço ao prof Catalani pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e pelas lições ensinadas.

Agradeço à Talita, Micheli e à todo pessoal do Laboratório de Neurociências pela colaboração e atenção.

Agradeço à FAPESP pela bolsa concedida.

Agradeço à CAPES pela bolsa concedida.

*“Whoever is born has to die;
whoever are together have to separate;
whatever is saved has to be used;
whatever is created is impermanent.
So do not be upset over these laws of
nature.”
Nagarjuna*

RESUMO

ALCOBIA, D. de S., **Produção de nanofibras alinhadas de polímeros biodegradáveis para crescimento e regeneração de células neurais**. 2013. 125. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A eletrofiação é uma celebrada técnica de processamento de polímeros, capaz de produzir fibras de diâmetro nanométrico. A montagem comum do sistema de eletrofiação permite a captação de fibras aleatórias sob a forma de um não-tecido. Diversas modificações nessa montagem permitem a obtenção de diferentes morfologias de fibras. Tais modificações são revisadas e discutidas neste trabalho.

Na produção de suportes de crescimento de células neurais, é interessante que seja incorporada alguma anisotropia no meio. Assim, um aparato de eletrofiação, capaz de produzir fibras alinhadas, foi construído e a variação dos parâmetros de seu processamento permitiu a obtenção de diferentes qualidades de alinhamento das fibras para dois polímeros biodegradáveis. Diversos parâmetros influenciaram a qualidade desse alinhamento, porém a velocidade de captação das fibras mostrou ser o mais impactante, em acordo com dados reportados na literatura.

A morfologia das fibras foi avaliada quanto ao seu diâmetro, com o auxílio de micrografias de MEV e do software de edição de imagens ImageJ. Adicionalmente buscou-se avaliar a qualidade do alinhamento de tais fibras. Para tanto, foi desenvolvida uma metodologia de quantificação de qualidade de alinhamento de fibras, baseado nas micrografias e na ferramenta de FFT do ImageJ. A metodologia proposta foi capaz de ordenar de maneira objetiva e consistente a qualidade do alinhamento das fibras obtidas, mesmo quando a análise visual (usada como referência) se provava ineficiente.

A metodologia proposta foi incorporada num plugin para ImageJ, via algoritmo computacional escrito em Java. Com o uso do plugin, foi possível processar diversas micrografias, obtidas em diferentes pontos das malhas eletrofiadas e com variadas magnificações, a fim de se criar uma estatística dos resultados obtidos para qualidade de alinhamento das fibras, algo inédito na literatura.

Malhas eletrofiadas com diferentes qualidades de alinhamento de suas fibras foram utilizadas como substrato na cultura de células precursoras neurais, provenientes de neuroesferas.

Foi feita a cultura de células progenitoras neurais, provenientes de neuroesferas, tendo como substrato malhas eletrofiadas com diferentes qualidades de alinhamento, a fim de se avaliar o impacto dos contatos físicos das fibras sobre a migração e diferenciação de tais células.

Palavras-chave: eletrofiação, suportes celulares, fibras alinhadas, quantificação, células neurais

ABSTRACT

ALCOBIA, D. de S., **Produção de nanofibras alinhadas de polímeros biodegradáveis para crescimento e regeneração de células neurais**. 2013. 125. Dissertation – Post Graduate Program in Chemistry. Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Electrospinning is a celebrated technique of polymer processing, able to produce fibers with nanometric diameter. Common assembly of electrospinning apparatus allows collection of random fibers in a non-woven matt. Several modifications on this assembly enable different fiber morphologies to be obtained. Such modifications are revised and discussed in this work.

In the production of cell growth scaffolds, it's interesting that some anisotropy is incorporated in the medium. Therefore, an electrospinning apparatus capable of producing aligned fibers was constructed. Variation of processing parameters of said apparatus enabled different alignment qualities of fibers to be attained for two biodegradable polymers. Many parameters influenced on the quality of said alignment; fiber collection speed, however, proved more impacting, in accordance with literature data.

Fiber morphology was assessed in regard to its diameter with the aid of MEV micrographs and ImageJ software. Furthermore, assessment of fiber alignment quality was sought. For this matter, it has been developed a quantification methodology for fiber alignment quality, based on micrographs and ImageJ's FFT tool. The proposed methodology was able to objectively and consistently rank fiber alignment quality, even when visual analysis (used as reference) failed to do so.

This methodology was incorporated in a plugin for ImageJ, via Java script algorithm. With the aid of this plugin it was feasible to process several micrographs, taken from electrospun mats at different spots and magnifications. This helped create statistics about obtained results of fiber alignment quality, on an unprecedented approach in written literature.

Electrospun mats with varying quality in fiber alignment were used as substrate in the culture of neural precursor cells from neurospheres to assess the influence of contact guidance on migration and differentiation of such cells.

Keywords: electrospinning, cell scaffolds, fiber alignment, quantification, neural cells

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

m/m – razão massa por massa

v/v – razão volume por volume

m/s – metros por segundo

rpm – rotações por minuto

ddp – diferença de potencial

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

ECM – Extracelular Matrix, a matriz extracelular

hMSC – células-tronco humanas mesenquimais

MEV – Microscópio Eletrônico de Varredura

FTIR – Fourier Transform Infrared, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

NMR – Nuclear Magnetic Resonance, ressonância nuclear magnética

PLLA – poli(L-lactideo)

PCL – poli(ϵ -caprolactona)

PLGA – poli(ácido-láctico-co-glicólico)

PHB – poli(hidroxibutirato)

PVA – álcool polivinílico

PU – poliuretano

FT – Fourier Transform, transformada de Fourier

DFT – Differential Fourier Transform, transformada discreta de Fourier

FFT – Fast Fourier Transform, algoritmo de transformada rápida de Fourier

EP – espectro de potências

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: diversas fotografias, publicadas em trabalhos da literatura, do processo de eletrofiação. A primeira foto foi capturada com uma câmera de baixa velocidade, as demais com uma de alta velocidade. Figura retirada de (Burger, Hsiao, & Chu, 2006).	23
Figura 2: representação esquemática da evolução do jato de eletrofiação. Imagem retirada de [88].	25
Figura 3: esquema do aparato de eletrofiação coaxial utilizado por Yu e colaboradores. No detalhe, uma fotografia da agulha. Retirado de [134].	29
Figura 4: Nanofibras ocas de titânio, obtidas pela eletrofiação de nanofibras coaxiais e posterior remoção seletiva de interior orgânico. Retirado de [67].	30
Figura 5: Esquema de montagem de eletrofiação para alinhamento de fibras usando uma moldura na frente do coletor. Ao lado micrografia das fibras assim obtidas. Figura e micrografia retiradas de [50].	33
Figura 6: esquema de eletrofiação usando duas barras espaçadas como coletores. Ao lado são mostradas as linhas de potencial do campo elétrico. Retirado de [69].	34
Figura 7: fibras eletrofiadas sobre um par de anéis metálicos, usados como coletores. Ao lado, uma micrografia do fio obtido pela torção das fibras depositadas sobre os anéis. Imagens retiradas de [25].	35
Figura 8: esquema do aparato de eletrofiação usado por Jah e colaboradores. Retirado de [54].	36
Figura 9: esquema do aparato de eletrofiação usando um disco chanfrado como coletor. Abaixo são mostradas as linhas de potencial do campo elétrico. Figuras retiradas de [108].	37
Figura 10: representação esquemática da estrutura de uma laminina. Retirada de http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/structural-proteins/laminin.html	43
Figura 11: esquema de montagem do aparato de eletrofiação.....	49
Figura 12: fotografia do aparato de eletrofiação construído.....	50

Figura 13: perfil típico do espectro de potência adquirido pela ferramenta de FFT do ImageJ. As retas mostradas apenas demonstram algumas das retas traçadas por outra ferramenta do software para medir intensidades de pixels. 52

Figura 14: distribuição de orientação das fibras de uma malha eletrofiada, obtida pelo tratamento descrito, aplicado ao espectro de potências da Figura 13 53

Figura 15: Microscopias representativas das malhas obtidas pelas condições da Tabela 1. (A) Malha_01, (B) Malha_02, (C) Malha_03, (D) Malha_04, (E) Malha_05, (F) Malha_06, (G) Malha_07, (H) Malha_08, (J) Malha_09. Aumento de 2000 vezes em todas as imagens 61

Figura 16: Imagem de MEV das malhas obtidas pelas condições da Tabela 2 (A) Malha_06, (B) Malha_12, (C) Malha_10 e (D) Malha_11. Aumento de 2.000 em todas as microscopias. 62

Figura 17: microscopias representativas das amostras eletrofiadas nas condições da **Tabela 3**. (A) Malha_13, (B) Malha_14, (C) Malha_15 e (D) Malha_16. Aumento de 1000 vezes em todas as imagens 64

Figura 18: Imagens de MEV para as malhas obtidas pelas condições mostradas na Tabela 4. (A) Malha_14, (B) Malha_17 e (C) Malha_18. 65

Figura 19: exemplo de utilização da ferramenta de FFT do ImageJ para correção de defeitos de micrografias. Imagem extraída do manual online do software 67

Figura 20: imagem típica de um espectro de potências de uma micrografia de nanofibras poliméricas alinhadas 71

Figura 21: etapas básicas no tratamento de imagens digitais com o auxílio de filtros. Imagem extraída da referência de Gonzalez [145]. 72

Figura 22: micrografia de uma malha eletrofiada contendo fibras bem alinhadas. Sistemas de coordenadas cartesianas foram desenhados para facilitar visualização de ângulos de orientação. No inserto, as intensidades dos pixels num segmento da micrografia. Ao lado o EP da micrografia original. 74

Figura 23: gráfico da distribuição de orientação das fibras de uma malha eletrofiada 75

Figura 24: comparação entre as microscopias e respectivos espectros de potência de duas malhas eletrofiadas. Abaixo o gráfico da distribuição de orientação das fibras 77

Figura 25: representação esquemática mostrando a área sob a curva do gráfico de distribuição de orientação utilizada para o cálculo do índice de alinhamento das fibras, bem como os limites superior e inferior das intensidades médias dos pixels.....	79
Figura 26: Espectros de potência das microscopias da Figura 15. (A) Malha_01, (B) Malha_02, (C) Malha_03, (D) Malha_04, (E) Malha_05, (F) Malha_06, (G) Malha_07, (H) Malha_08, (J) Malha_09	80
Figura 27: gráfico de distribuição de orientações, obtido dos espectros de potência da Figura 26 (A, B e J).....	81
Figura 28: gráfico de distribuição de orientações, obtido dos espectros de potência da Figura 26 (E, G e H).....	81
Figura 29: gráfico de distribuição de orientações, obtido dos espectros de potência da Figura 26 (C, D e F)	82
Figura 30: Espectros de potência das microscopias da Figura 16. (A) Malha_06, (B) Malha_12, (C) Malha_10 e (D) Malha_11.....	83
Figura 31: distribuição de orientação de malhas de PCL, obtidos dos espectros de potência da Figura 30	84
Figura 32: Espectros de potência das microscopias da Figura 17. (A) Malha_13, (B) Malha_14, (C) Malha_15 e (D) Malha_16.....	85
Figura 33: gráfico de distribuição de orientações de fibras de PLLA, obtidos dos espectros de potência da Figura 32.....	86
Figura 34: Espectros de potência obtidos das microscopias da Figura 18. (A) Malha_14, (B) Malha_17 e (C) Malha_18.....	87
Figura 35: gráfico de distribuição de orientação de fibras de PLLA, obtidos dos espectros de potência da Figura 34.	88
Figura 36: gráfico de valores de índice de alinhamento das micrografias da malha alin00, obtidas nos pontos A, B e C. As micrografias são mostradas acima.....	94
Figura 37: valores das médias dos valores de índice de alinhamento para micrografias da malha alin00. Barras indicam o desvio-padrão. À esquerda, médias dos diferentes spots e à direita médias das diferentes magnificações.	95

Figura 38: gráfico de valores de índice de alinhamento das micrografias da malha alin03, obtidas nos pontos F e G. As micrografias são mostradas acima..... 97

Figura 39: valores das médias dos valores de índice de alinhamento para micrografias da malha alin03. Barras indicam o desvio-padrão. À esquerda, médias dos diferentes spots e à direita médias das diferentes magnificações. 98

Figura 40: valores das médias dos valores de índice de alinhamento para micrografias da malha alin02. Barras indicam o desvio-padrão. À esquerda, médias dos diferentes spots e à direita médias das diferentes magnificações. 100

Figura 41: histogramas dos diâmetros de fibras medidos para malhas de PCL 105

Figura 42: histogramas dos diâmetros de fibras medidos para malhas de PLLA 106

Figura 43: imagens de fluorescência de GFAP obtidas das culturas sobre os substratos eletrofiados. O marcador indica a presença de astrócitos migrando radialmente a partir do núcleo das neuroesferas. O tracejado azul indica o núcleo e o vermelho os limites da migração. Os substratos usados foram, respectivamente da esquerda para a direita: alin00, alin02 e alin03... 109

Figura 44: imagens de fluorescência para marcadores GFAP (verde, astrócitos), β -3-tubulina (vermelho, neurônios) e a sobreposição de ambas. Sobre cada trio de imagens é indicado o substrato sobre o qual foi feita a cultura das neuroesferas. Especialmente em alin02 e alin03, as setas indicam direções preferenciais de migração e desenvolvimento de neuritos. 109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: resumo dos parâmetros de eletrofiação de PCL.....	60
Tabela 2: condições de eletrofiação de PCL, variando-se a velocidade de captação das fibras. A distância de trabalho foi de 12 cm e a tensão aplicada de 16,5 kV em todas as condições.....	62
Tabela 3: resumo dos parâmetros de eletrofiação de PLLA.....	63
Tabela 4: condições de eletrofiação do PLLA variando-se a velocidade de captação das fibras. Em todas d=12cm, fluxo = 4 mL/h e ddp = 16,5 kV....	64
Tabela 5: valores para índices de alinhamento obtidos para malhas de PCL	82
Tabela 6: valores para índices de alinhamento obtidos para malhas de PCL	84
Tabela 7: valores para índices de alinhamento obtidos para malhas de PLLA	86
Tabela 8: valores para índices de alinhamento obtidos para malhas de PLLA	88
Tabela 9 – valores de índice de alinhamento de fibras para micrografias rotacionadas, obtidos por tratamento manual e por plugin, a incrementos de 10 e 3°.....	90
Tabela 10 – Anova dos valores de índice de alinhamento obtidos pelo tratamento manual e pelo uso do plugin com incremento angular de 10° e 3°	90
Tabela 11 – valores de índice de alinhamento de fibras para as micrografias obtidas das malhas eletrofiadas alin00, alin02 e alin03	92
Tabela 12 – valores de índice de alinhamento das fibras da malha alin00, com médias e desvios-padrão.....	95
Tabela 13 – Anova dos valores de índice de alinhamento da malha alin00, fator ponto de focalização (spot).....	96
Tabela 14 – Anova dos valores de índice de alinhamento da malha alin00, fator magnificação.....	96
Tabela 15 – valores de índice de alinhamento das fibras da malha alin03, com médias e desvios-padrão.....	98

Tabela 16 – Anova dos valores de índice de alinhamento da malha alin03, fator ponto de focalização (spot).....	99
Tabela 17 – Anova dos valores de índice de alinhamento da malha alin03, fator magnificação.....	99
Tabela 18 – valores de índice de alinhamento das fibras da malha alin02, com médias e desvios-padrão.....	100
Tabela 19 – Anova dos valores de índice de alinhamento da malha alin00, fator ponto de focalização (spots).....	101
Tabela 20– Anova dos valores de índice de alinhamento da malha alin00, fator magnificação.....	101
Tabela 21: dados de diâmetro das fibras eletrofiadas de PCL. Apresentado o diâmetro médio $\pm$ desvio-padrão, n é o número de medidas realizadas	104
Tabela 22: dados de diâmetro das fibras eletrofiadas de PLLA. Apresentado o diâmetro médio $\pm$ desvio-padrão, n é o número de medidas realizadas	106

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	20
1.1.	Eletrofiação	20
1.1.1.	Histórico da eletrofiação	20
1.1.2.	Eventos envolvidos no fenômeno.....	21
	Modificações dos parâmetros de eletrofiação	26
	Modificações do sistema de eletrofiação	28
	Modificações no tipo de coletor	32
1.1.4.	Materiais eletrofiados e suas características	38
1.2.	Sistema Nervoso.....	40
1.2.1.	Componentes do Sistema Nervoso.....	40
1.2.2.	Neuroesferas.....	43
1.2.3.	Dano ao Sistema Nervoso.....	44
1.3.	Estratégias de Regeneração Neural	46
2.	OBJETIVOS.....	48
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
3.1.	Materiais.....	48
3.2.	Obtenção das fibras eletrofiadas.....	49
3.3.	Caracterização das malhas.....	50
3.3.1.	Medidas de diâmetro	51
3.3.2.	Determinação do grau de alinhamento.....	51
3.4.	Cultura de neuroesferas nas malhas eletrofiadas	54
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1.	Eletrofiação dos polímeros.....	57
4.1.1.	Obtenção das primeiras fibras.....	57
4.1.2.	Variação dos parâmetros de eletrofiação de PCL	59

4.1.3. Eletrofiação de PLLA.....	63
4.2. Caracterização das fibras poliméricas	65
4.2.1. Determinação do grau de alinhamento.....	65
4.2.1.1. Considerações sobre a metodologia	65
4.2.1.2. Aplicação da metodologia de quantificação de alinhamento às malhas de PCL obtidas	80
4.2.1.3. Aplicação da metodologia de quantificação de alinhamento às malhas de PLLA obtidas.....	85
4.2.1.4. Criação e avaliação de desempenho de algoritmo computacional de quantificação	89
4.2.1.5. Utilização do plugin para avaliação de representatividade estatística do método de quantificação	91
4.2.2. Determinação do diâmetro das fibras.....	102
4.3. Experimento com cultura de neuroesferas sobre malhas eletrofiadas	107
5. CONCLUSÕES.....	110
6. REFERÊNCIAS	112

1. INTRODUÇÃO

1.1. Eletrofiação

Entre as diversas técnicas de processamento de polímeros, a eletrofiação foi escolhida neste trabalho, devido às suas vantagens inerentes. Tais vantagens, assim como um histórico da técnica e as características dos materiais por ela obtidos são discutidos nas próximas seções.

1.1.1. Histórico da eletrofiação

O processo de eletrofiação é conhecido pelo menos desde o princípio do século XX, muito embora pouco tenha sido documentado em seus primórdios [10, 26]. Inicialmente o processo foi estudado por físicos interessados nas propriedades intrigantes de soluções expostas a grandes potenciais elétricos [86, 136]. O marco no desenvolvimento da técnica geralmente é tido com a série de patentes [37-41] que Formhals depositou nas décadas de 1930 e 1940 [10, 50].

Muitos anos depois, em 1966, Simons patenteou um aparato que permitia a obtenção, através da eletrofiação, de malhas finas e ultraleves, contendo fibras não tramadas [99]. Além disso, dependendo da viscosidade da solução empregada, as fibras poderiam ser menores e finas ou mais grossas e relativamente contínuas.

Um pouco mais adiante, Taylor publicou um importante trabalho [106] em que detalhou o estudo de um jato produzido a partir da aplicação de uma grande diferença de potencial (ddp) à uma gota de solução polimérica. Quando a força do campo elétrico iguala as forças de tensão superficial da gota, esta adquire um formato cônico, com uma inclinação específica, e o jato é produzido [7]. Desde então, o formato peculiar da gota é referido pelo termo “cone de Taylor”.

Em 1971, Baumgarten [5] demonstra a utilização de um aparato de eletrofiação capaz de produzir fibras de acrílico de diâmetros variando de 50 a

1100 nanômetros. Nesse mesmo trabalho, é destacada a relação direta entre o diâmetro da fibra e a concentração da solução, bem como os efeitos da variação da diferença de potencial aplicado. A maioria dos trabalhos subsequentes, de outros pesquisadores, utiliza uma configuração bastante similar à deste trabalho.

Já em 1995, Doshi e Reneker [31] fizeram um trabalho bastante detalhado e, por consequência, bastante referenciado em outras publicações, buscando entender profundamente o funcionamento da técnica. Nele, as condições de eletrofiação de diversos polímeros foram variadas e os efeitos de tais variações no diâmetro das fibras obtidas foram discutidos.

1.1.2. Eventos envolvidos no fenômeno

Formação do cone de Taylor

Muito embora a técnica de eletrofiação possa ser utilizada tanto para materiais solubilizados à temperatura ambiente quanto para materiais puros aquecidos acima de sua temperatura de fusão, esta última opção raramente é utilizada, dada as complicações inerentes de se trabalhar em tais condições. Por esta razão, quase que a totalidade dos trabalhos na área envolve a eletrofiação de materiais solubilizados.

Dessa forma, a primeira etapa na eletrofiação é a solubilização do material em solvente apropriado. Isso envolve a obtenção de uma solução com concentração e viscosidade adequadas. Naturalmente essas propriedades estão relacionadas: uma solução mais concentrada apresenta, também, uma viscosidade maior. Isso é importante porque a produção de fibras depende de uma viscosidade mínima, abaixo da qual a alta extensibilidade da solução, associado a perturbações na distribuição de cargas em sua superfície, podem levar a formação de gotas (*beads*), um artefato indesejado, similar à eletropulverização (*electrospray*).

Uma vez obtida a solução polimérica, esta deve ser forçada, por gravidade ou pelo uso de uma bomba peristáltica, através de um orifício,

geralmente uma agulha metálica (*spinnerette*). A esta agulha é conectado um terminal de alta tensão e posicionada a certa distância de um alvo aterrado. O contato da solução com o metal da agulha permite a passagem de cargas elétricas, carregando a solução. Conforme a solução passa através do orifício, forma-se uma gota em sua extremidade.

Inicialmente, tal gota é mantida pelas forças coesivas da tensão superficial da solução. Na medida em que as cargas elétricas são acumuladas nesta gota, devido ao campo elétrico presente, a gota começa a sofrer uma deformação característica, assumindo a forma de um cone (cone de Taylor).

No momento em que a força eletrostática, de ação repulsiva, supera a tensão superficial, de ação coesiva, um jato de material é ejetado da ponta do cone em direção ao alvo.

Formação do jato

O caminho percorrido pelo jato, no entanto, é extremamente complexo e sujeito a diversas instabilidades, oriundas das muitas forças envolvidas no estiramento da solução. Essas instabilidades foram estudadas por diversos grupos, com o intuito de se esclarecer e modelar a natureza exata do evento.

Reneker e Chun [87], reportaram que o jato se dividia em dois ou mais sub-jatos durante seu caminho, num processo chamado de *splaying* ou *branching*, em inglês.

Outros pesquisadores, contudo, defendem que a propagação do material eletrofiado se dá num jato único. De fato, Shin e colaboradores [95,96] realizaram experimentos com captura de imagens a intervalos muito curtos de tempo, e demonstraram a propagação do material num único jato, sujeito a um chicoteamento (*whipping instability*, em inglês).

Diversas fotografias tiradas durante a eletrofiação mostram uma variedade de formatos dos caminhos do jato [10, 88]. Mas é reconhecido pela academia que existem três variedades de instabilidade: (1) instabilidade de Rayleigh, (2) uma segunda instabilidade axisimétrica e (3) instabilidade não-axisimétrica (que causa o chicoteamento) [10, 50, 96, 49].

Figura 1: diversas fotografias, publicadas em trabalhos da literatura, do processo de eletrofiação. A primeira foto foi capturada com uma câmera de baixa velocidade, as demais com uma de alta velocidade. Figura retirada de (Burger, Hsiao, & Chu, 2006).

No processo de eletrofiação, o passo fundamental é a geração de cargas na solução, o que lhe permite responder à presença de um campo elétrico externo [23].

Tais cargas são geradas, tipicamente, por processos de dissociação (que ocorrem por toda a solução) e por processos de emissão unipolar (que ocorrem próximo à agulha metálica). Os carregadores de carga são praticamente sempre íons [23] e, portanto, dispõem de mobilidade na solução.

Uma vez formadas, tais cargas acumulam-se sobretudo na interface da solução com o ar e, ao serem expostas a um campo elétrico externo, realizarão um trabalho elétrico ao se moverem em direção do campo. Contrapondo-se a esse movimento, existe a viscosidade da solução, que, por causa disso, adquire uma energia cinética também na direção ao campo. Essa é a origem do fenômeno eletrohidrodinâmico do processo [23]. Fica evidente, pois, que as propriedades reológicas da solução têm papel crucial no processo.

Além disso, deve-se atentar para a concorrência entre a eletropulverização e eletrofiação. No cerne do processo de desmembramento do jato (*splaying*) está a instabilidade de Rayleigh, causada pelo jogo entre as forças repulsivas e coesivas atuantes no líquido em ejeção. De um lado, as repulsões eletrostáticas das cargas acumuladas na superfície do líquido forçam-no a aumentar sua área superficial, o que acontece quando o diâmetro da fibra em formação é reduzido. De outro lado, as forças coesivas da tensão

superficial tendem a diminuir a área superficial do líquido, dividindo o jato em gotas menores. Quando as forças coesivas prevaleçam, tem-se a eletropulverização, em que o material ejetado da agulha é depositado no anteparo na forma de gotas.

Quando se fala em soluções poliméricas de eletrofiação, a alteração do comportamento viscoelástico do fluido pode ser atribuído ao emaranhamento das cadeias poliméricas do soluto. O número desses emaranhamentos aumenta com o peso molecular e a sua densidade (número de emaranhamentos por unidade de volume) aumenta com a concentração polimérica na solução [23].

Esses emaranhamentos causam um aumento da viscosidade da solução, o que diminui os efeitos da instabilidade de Rayleigh à medida que o jato de solução atravessa a distância entre a agulha e o anteparo. Como consequência, o jato se estende numa estrutura filamentosa coerente ao invés de se dividir em pequenas gotas.

Conforme o jato de solução de eletrofiação percorre seu caminho em direção ao anteparo, o solvente evapora e o polímero é solidificado. Neste processo, muito similar à fiação via seca, as cadeias poliméricas se estendem na direção do filamento formado, dando origem a fibras. Essas fibras acumulam-se de forma aleatória no coletor, formando malhas de não-tecido, onde as fibras não possuem qualquer organização.

Figura 2: representação esquemática da evolução do jato de eletrospiação. Imagem retirada de [88].

A técnica de eletrospiação descrita até aqui é passível de diversas modificações, as quais permitem a fina personalização do tipo de material obtido. Tais modificações podem ser, grosso modo, divididas em 3 categorias: (1) modificações nos parâmetros de eletrospiação, que permitem ajustar as dimensões e qualidade das fibras; (2) modificação nas estratégias de eletrospiação, que permitem a obtenção de diferentes tipos de fibra; e (3) modificação do tipo de coletor, que permite ajustar a disposição das fibras na malha eletrofiada.

Todavia, os parâmetros que governam a eletrospiação são muito dependentes do sistema utilizado, equipamentos e materiais, de modo que generalizações, embora úteis no sentido de balizar escolhas e prever tendências, devem ser tomadas com cautela. Nas próximas seções tais generalizações são apresentadas, baseadas em trabalhos publicados.

1.1.3. Parâmetros de Eletrofiação

Modificações dos parâmetros de eletrofiação

Muitos são os parâmetros envolvidos no processo de eletrofiação, de modo que eles geralmente são subdivididos em três categorias: (1) condições ambientais, tais como temperatura e umidade; (2) propriedades intrínsecas das soluções, tais como viscosidade, concentração, condutividade elétrica, tensão superficial; e (3) parâmetros de processamento, tais como tensão aplicada, distância entre agulha e anteparo, diâmetro da agulha e fluxo de injeção da solução.

As condições ambientais afetam o comportamento da solução de eletrofiação, em especial na questão de formação de grumos. Dessa maneira, é interessante que a eletrofiação seja conduzida num ambiente de condições controladas (uma sala com ar condicionado e desumidificador) e, de preferência, reservado para essa finalidade. Adicionalmente, um sistema de exaustão é recomendado, devido aos vapores de solvente emanados da solução eletrofiada.

As propriedades da solução podem ser ajustadas pela escolha do solvente, do polímero dissolvido e sua concentração.

A viscosidade da solução tem papel fundamental na capacidade dessa solução em ser eletrofiada, conforme discutido anteriormente. De fato, Reneker e colaboradores [31] mostraram que existe uma faixa de viscosidade em que a eletrofiação ocorre, e que essa faixa depende do polímero solubilizado.

Outra propriedade da solução que pode impedir a eletrofiação é sua tensão superficial, cujas influências na instabilidade de Rayleigh afetam a concorrência entre eletropulverização e eletrofiação. De maneira geral, soluções com menor tensão superficial favorecem a ocorrência desta última.

Além disso, a viscosidade da solução também depende da massa molar do polímero dissolvido. Polímeros de massa molar menos elevada podem ser eletrofiados, contanto que suas interações intermoleculares sejam fortes o suficiente para compensar o menor entrelaçamento físico entre suas cadeias poliméricas, em relação ao dos polímeros de maior massa molar [23, 7].

Da mesma forma, a concentração da solução influencia o tipo de fibra obtido. Existe uma faixa de concentração mínima em que a eletrofiação acontece [45, 105]. Se uma solução muito diluta for utilizada, pode não haver material suficiente no jato para que uma fibra contínua se forme, e o que geralmente ocorre é que são coletadas fibras descontínuas, quebradiças e/ou contendo defeitos de gota (*beads*). Por outro lado, se uma solução muito concentrada for utilizada, a agulha pode entupir, ou então a bomba pode não ter força para bombear a solução muito viscosa, situações que terminam o processo de eletrofiação.

Já a condutividade elétrica está intimamente ligada à quantidade de carga na solução. Soluções de maior condutividade permitem maior fluidez de carga e sofrem uma aceleração eletrostática maior, sob mesmo campo elétrico [105]. Dessa forma, soluções de maior condutividade elétrica geralmente produzem fibras de menor diâmetro [7, 105]. Por essa mesma razão, é muito comum utilizar uma mistura de solventes na solubilização do polímero. Solventes de alta constante dielétrica, como o DMF e metanol ou etanol, são frequentemente adicionados à solução para aumentar sua condutividade [141, 129, 105]. Outras estratégias de manipulação de condutividade incluem a adição de sais e tensoativos iônicos, estes últimos tendo efeito também sobre a tensão superficial da solução [55].

Assim, nota-se que muitos dos parâmetros da solução estão interligados de maneira íntima e, por vezes, conflitante.

Por fim, as modificações de processamento são efetuadas após se obter a solução de eletrofiação, e compreendem alterações nas condições de operação do sistema de eletrofiação.

O fluxo de injeção da solução, juntamente com sua concentração, influencia na quantidade de material (polímero) que chega à agulha e também

na velocidade em que esse material lá chega. É necessário que haja um fluxo contínuo de material para a ponta da agulha. Por outro lado, se o fluxo de solução que chega à agulha for muito elevado, pode não haver tempo para a evaporação total do solvente, o que, por sua vez, pode acarretar na deposição de fibras úmidas e/ou de má qualidade no coletor. Dessa maneira, existe um intervalo de trabalho para os valores de fluxo de injeção de solução, sendo que valores de fluxo maior tendem a formar fibras de diâmetro maior [7, 50].

A distância de trabalho, que corresponde à distância entre a ponta da agulha e o anteparo, é outro parâmetro de processamento facilmente ajustável. Junto com a forma do alvo, ela determina o formato do campo elétrico, isto é, sua distribuição espacial, que pode ser representada por suas linhas de potencial. O formato do campo, por sua vez, determina a dispersão ou concentração de fibras.

Finalmente, a tensão elétrica aplicada entre os terminais de eletrofiação (a agulha metálica e o coletor), pode ser facilmente ajustável, e é o fator determinante da intensidade do campo elétrico. O processo de eletrofiação acontece em campos elétricos da ordem de 1-5 kV/cm, dependendo das propriedades de solução e distância de trabalho. Isto significa trabalhar com tensões de ordem de quilovolts; podendo variar de 1 a até 30 kV, tipicamente, para distâncias 5-30 cm.

Modificações do sistema de eletrofiação

O esquema básico de montagem do sistema de eletrofiação prevê uma fonte de alta tensão conectada a uma agulha metálica, de um lado, e a um anteparo metálico plano (ou mesmo diretamente a uma folha de papel alumínio), de outro. Essa montagem pode ser feita tanto na horizontal quanto na vertical e, dadas as condições adequadas, as fibras são formadas de maneira aleatória e coletadas no anteparo sob a forma de um não-tecido [7, 10].

Dependendo da aplicação, pode ser desejável a obtenção de fibras com mais de um componente. Aplicações típicas com essa demanda incluem a produção de suportes celulares compostos de polímeros distintos, onde os

polímeros constituintes diferem em seus tempos de degradação e/ou em suas propriedades mecânicas e de superfície. Alternativamente, pode-se buscar a liberação controlada de componentes, que podem ser fármacos, proteínas, hormônios, fatores de crescimento, entre outros. Outras vezes pode ser interessante a obtenção de fibras com morfologia de *core-shell*, ou coaxial. Todas essas variações de fibras são possíveis com modificações no sistema de eletrofiação, conforme apresentado adiante.

A eletrofiação coaxial recebe este nome por causa da morfologia das fibras geradas por essa modificação da eletrofiação [44, 104, 140, 120]. Essas fibras possuem uma estrutura coaxial, ou *core-shell*, em que o miolo (*core*) da fibra é composto de um material diferente do de sua superfície ou casca (*shell*). Existem diversas maneiras de se conseguir esse efeito. Numa dessas maneiras, pode-se utilizar uma seringa coaxial também, que na realidade consiste de uma seringa inserida dentro da outra. Alternativamente, pode-se utilizar uma seringa com embolo modificado para conter, separadamente, duas soluções [140].

Yu e colaboradores [134], por sua vez, espetaram um tubo de sílica gel com uma agulha metálica ligada à fonte de alta tensão. Enquanto uma bomba empurrava a solução de superfície da fibra pelo tubo de sílica gel, outra bomba empurrava a solução do miolo pela seringa de agulha metálica. A montagem desse sistema é mostrada na Figura 3.

Figura 3: esquema do aparato de eletrofiação coaxial utilizado por Yu e colaboradores. No detalhe, uma fotografia da agulha. Retirado de [134].

Com essa modificação, Sun e colaboradores [104] eletrofiaram fibras coaxiais feitas de polímeros diferentes, polímeros iguais (cada parte contendo um corante distinto), além de materiais híbridos com casca de polímero e miolo inorgânico. No trabalho de Zhang [140], o interior das fibras de PCL continha gelatina. Li e Xia [67] também eletrofiaram fibras contendo uma parte orgânica (miolo) e outra inorgânica (casca). Após a eletrofiação, o interior das fibras foi seletivamente dissolvido resultando em nanofibras ocas de titânio, mostradas na Figura 4.

Figura 4: Nanofibras ocas de titânio, obtidas pela eletrofiação de nanofibras coaxiais e posterior remoção seletiva de interior orgânico. Retirado de [67].

A eletrofiação coaxial é útil quando um material não é muito susceptível à eletrofiação, pois ao se usar um material mais susceptível como solução externa, ele carrega a solução de miolo [44]. Outra vantagem da modificação é a possibilidade de se criar nanofibras de estrutura core-shell bicomponente. Posteriormente, pode-se remover seletivamente a casca ou o miolo das fibras assim formadas [68, 74]. Adicionalmente, a morfologia permite a liberação controlada de drogas [47].

Uma maneira mais simples de se obter malhas eletrofiadas contendo dois componentes é a solubilização direta dos componentes na solução de eletrofiação.

Geralmente, os componentes que se deseja ter na malha eletrofiada são dissolvidos separadamente, em solventes diferentes ou não, e depois misturados numa única solução. Se os solventes utilizados forem distintos, há que haver compatibilidade entre eles, isto é, há que haver a formação de uma

co-solução. A eletrofiação dessa co-solução origina uma malha com fibras formadas de uma blenda entre os dois materiais, em que a extensão da blendagem depende da miscibilidade e proporção entre eles. Pode haver domínios de um material disperso no outro, numa mesma fibra, ou mesmo uma única fase por toda a fibra [30].

Ainda que não haja compatibilidade entre os solventes, nem miscibilidade entre os componentes, é possível eletrofiar não uma co-solução, mas uma suspensão (ou emulsão) dos componentes, desde que um deles esteja em quantidades diminutas [11, 18].

Dong e colaboradores [30] aliaram a eletrofiação com a produção de nanopartículas para um controle fino na liberação de biomoléculas. Em seu trabalho, foram sintetizadas, pelo método de emulsão única, dois conjuntos de nanopartículas de álcool polivinílico (PVA). Cada conjunto possuía nanopartículas carregadas de uma única proteína, diferente da proteína do outro conjunto. Tais nanopartículas, em suspensão, foram dispersas na solução de eletrofiação de um poliuretano (PU). Assim, foi eletrofiada uma solução de PU contendo os dois conjuntos de nanopartículas. O resultado obtido foi uma malha contendo fibras de PU, nas quais se encontravam, continua e uniformemente dispersas, ambos os tipos de nanopartículas. Para demonstrar o resultado, as proteínas foram ligadas a corantes fluorescentes distintos e imagens de fluorescência das fibras eletrofiadas foram obtidas.

Alternativamente, podem-se utilizar duas seringas de ejeção, cada qual carregada com uma solução diferente, apontadas para um único alvo, o que se chama de co-eletrofiação. Embora isso elimine o problema de miscibilidade e compatibilidade de solventes, cria-se um novo problema da interferência física e eletrostática entre os jatos, uma vez que o campo elétrico de um jato influencia no comportamento do outro, o que pode fazer a coleta não acontecer no alvo [114]. O resultado que se obtém é o emaranhamento físico das fibras dos dois materiais, mas cada fibra é composta de um único material [109].

Uma forma de melhorar a dispersão das fibras de cada componente por toda a extensão da malha obtida é a utilização de um coletor na forma de cilindro rotatório. Conforme o cilindro gira, as fibras coletadas de uma solução

são recobertas com as fibras coletadas da outra solução e vice-versa, continuamente [28].

Essas duas abordagens, a eletrofiação de co-solução e a co-eletrofiação, são úteis para a formação de malhas com fibras de composições distintas, especialmente interessantes na liberação controlada de drogas. Por exemplo, um dos componentes pode ser um polímero biodegradável, cujo tempo de degradação é controlado e que tem função estrutural, e outro poderia ser uma biomolécula que se deseja liberar. Conforme o polímero é degradado, o fármaco é liberado da superfície das fibras ou do emaranhado de fibras estruturais [19, 30].

Modificações no tipo de coletor

Um inconveniente do processamento por eletrofiação é a deposição de fibras fora da área do coletor. Uma explicação para isso pode estar na acumulação de cargas residuais nas fibras depositadas no coletor, de tal sorte que as novas fibras, à caminho do anteparo, são repelidas devido à repulsão eletrostática [50, 69]. Para contornar o problema, Reneker e colaboradores utilizaram 3 eletrodos auxiliares em forma de anéis, todos eles ligados também a fontes de alta tensão na mesma polaridade da agulha metálica [26]. Tais eletrodos foram alinhados concentricamente ao caminho do jato e espaçados entre si de maneira regular.

O efeito de tais eletrodos é o de moldar o campo elétrico experimentado pelo jato, de modo formar uma “parede elétrica cilíndrica” que prende o jato dentro de si e focaliza sua deposição. De fato, o trabalho reportou a diminuição da área de deposição das fibras para um círculo de 1 cm de raio, contra 7 cm sem o uso dos eletrodos auxiliares. Embora tenha sido direcionado, o jato de eletrofiação não produziu fibras muito alinhadas.

Baseados nesse trabalho, outros pesquisadores utilizaram um sistema similar, com apenas um eletrodo auxiliar, também em forma de anel [100, 12, 56]. Buttafoco e colaboradores utilizaram o eletrodo auxiliar para direcionar o

jato sobre pequenos cilindros rotatórios, de modo a produzir pequenos tubos ocos de material eletrofiado [12].

Nessas estratégias de eletrofiação, porém, o alinhamento das fibras foi muito pequeno. Uma alternativa para o alinhamento das fibras é a utilização de molduras, ou *frames*, próximos ao coletor [50].

Z.-M. Huang et al. / Composites Science and Technology 63 (2003) 2223–2253

Figura 5: Esquema de montagem de eletrofiação para alinhamento de fibras usando uma moldura na frente do coletor. Ao lado micrografia das fibras assim obtidas. Figura e micrografia retiradas de [50].

Os pesquisadores reportam ainda que o material de que é feito a moldura afeta a qualidade do alinhamento das fibras. Embora esta seja uma estratégia bastante simples, o uso de molduras não produz fibras muito alinhadas, tampouco as produz em quantidade apreciável, uma vez que apenas uma parte do material eletrofiado é captada na moldura. Adicionalmente, o mecanismo de alinhamento dessa estratégia pode estar fora do ângulo de inclinação da moldura, como sugerem os pesquisadores, mas no fato de haver duas barras paralelas no formato da moldura.

De fato, é reportado na literatura que o uso de barras paralelas como coletoras produz fibras bastante alinhadas [54, 69, 70]. Tal estratégia de eletrofiação é por vezes designada como “*(air) gap electrospinning*” em inglês, algo como eletrofiação com espaçamento.

Nessa configuração, os eletrodos coletores, que são as barras espaçadas e aterradas, causam uma deformação no campo elétrico existente entre a agulha e o alvo, de modo a fazer as linhas de potencial convergirem para as extremidades da fenda. Essa deformação do campo pode ser

observada na ilustração dos vetores de linhas de força do campo elétrico, na figura abaixo.

Figura 6: esquema de eletrofiação usando duas barras espaçadas como coletores. Ao lado são mostradas as linhas de potencial do campo elétrico. Retirado de [69].

Em seu trabalho [69] com esse tipo de coletor, Dan Li e colaboradores argumentam que além desse efeito de direcionamento de deposição das fibras causado pela deformação do campo elétrico entre agulha e coletor, existe outro efeito favorecendo o alinhamento das fibras através da fenda. Este efeito advém da acumulação de cargas nas fibras depositadas. Quando o coletor é uma placa contínua, ele serve de escoadouro para as cargas residuais presentes nas fibras recém-depositadas. No espaço entre os eletrodos, contudo, não há uma maneira eficiente de dispersão de tais cargas, de modo que as fibras ali depositadas permanecem carregadas. Como consequência, as fibras que chegam posteriormente enfrentam uma repulsão eletrostática das fibras já depositadas e buscam um alinhamento paralelo a elas, por ser esta uma configuração de menor energia. Ainda segundo os autores, as cargas residuais das fibras depositadas induzem cargas opostas nas extremidades das barras, de modo que a atração eletrostática entre elas força as fibras a se esticarem em direção perpendicular a borda das barras, aumentando ainda mais o seu alinhamento [69].

Duas variações interessantes desse sistema de montagem com eletrodos paralelos são as apresentadas por Dalton e colaboradores [25], que consiste no uso de dois anéis alinhados paralelamente como eletrodos coletores, e por Teo e Ramakrishna [107], que consiste no uso de duas lâminas paralelas como eletrodos coletores.

Dalton e seu grupo apresentaram uma modificação interessante ao sistema de barras paralelas, em que um par de anéis alinhados foi usado como eletrodos coletores. A agulha metálica aponta na direção perpendicular ao eixo (imaginário) que liga os anéis. De maneira análoga às barras, os anéis deformam o campo elétrico experimentado pelo jato de eletrofiação, forçando-o a depositar as fibras na direção da fenda entre os eletrodos, conforme mostrado na Figura 7. A diferença no uso de anéis é que isso permite a formação de uma estrutura tridimensional, com as fibras formando um pequeno cilindro oco. Além disso, ao se girar um dos anéis após a deposição das fibras, é possível se obter um fio de múltiplos filamentos.

Figura 7: fibras eletrofiadas sobre um par de anéis metálicos, usados como coletores. Ao lado, uma micrografia do fio obtido pela torção das fibras depositadas sobre os anéis. Imagens retiradas de [25].

Recentemente, Jah e colaboradores modificaram este sistema de coleta, permitindo a rotação individual dos suportes de cada anel coletor, além da translação de tais suportes [54]. Isso possibilita a rotação dos anéis em sentidos opostos, como no caso anterior, para produzir fios por torção; ou a rotação no mesmo sentido, para produzir um cilindro oco de diâmetro igual ao dos anéis coletores.

Figura 8: esquema do aparato de eletrofição usado por Jah e colaboradores. Retirado de [54].

O grupo de Teo, por sua vez, utilizou um par de lâminas alinhadas no lugar das barras paralelas. O detalhe importante dessa montagem é que a intensidade do campo elétrico intensifica-se na ponta da lâmina, aumentando a atração das fibras em sua direção. Além disso, as lâminas foram colocadas em potencial negativo (de polaridade oposta ao do jato), de modo a aumentar ainda mais o direcionamento do jato. Ainda segundo os autores, a imersão das fibras (pós eletrofição e com as fibras ainda depositadas nas lâminas) em água comprime-as, formando um feixe compacto de fibras alinhadas [107].

O princípio de acumulação de potencial no fio da lâmina, usado por Teo e Ramakrishna na montagem anterior, foi também explorado por Theron e colaboradores, com algumas modificações [108]. Neste sistema de eletrofição, o coletor usado foi um disco de borda chanfrada (na forma de lâmina), conforme a ilustração.

Figura 9: esquema do aparato de eletrofiação usando um disco chanfrado como coletor. Abaixo são mostradas as linhas de potencial do campo elétrico. Figuras retiradas de [108].

Com esse sistema, foi possível enovelar as fibras na borda do chanfro na medida em que eram depositadas. As fibras foram coletadas em trilhas paralelas e com espaçamento regular entre si. Esse espaçamento, argumentam os autores, é causado pela repulsão eletrostática entre as fibras que chegam e a carga residual das fibras já depositadas. Além disso, o alinhamento das fibras foi bastante apreciável, ainda que sua densidade por unidade de área tenha sido modesta.

Um tipo de coletor muito utilizado, quando o objetivo é a obtenção de nanofibras alinhadas por eletrofiação, é um cilindro metálico em rotação. O mecanismo de alinhamento das fibras nesta montagem é a tração fornecida pela velocidade de rotação do cilindro.

Para a obtenção de fibras alinhadas, contudo, é necessária uma equiparação entre a velocidade tangencial do cilindro coletor em rotação e a

velocidade de aceleração do jato de eletrofiação. Quando isso acontece, a fibra em estiramento é coletada e ao mesmo tempo esticada ao redor do cilindro coletor [50].

Quando o cilindro é rotacionado a uma velocidade muito baixa, seu comportamento se assemelha ao de um coletor estático e plano, em que não há mecanismos de orientação das fibras. Assim, as fibras coletadas apresentam-se de forma aleatória, característica da eletrofiação clássica. Matthews e colaboradores [73] reportaram esse comportamento, ao usarem velocidades reduzidas na rotação do cilindro (500 rpm) para produzir malhas eletrofiadas de colágeno sem alinhamento das fibras. No mesmo trabalho, os autores eletrofiaram colágeno em malhas contendo fibras alinhadas e compararam seu desempenho mecânico com o das malhas sem fibras alinhadas. Para a produção das fibras alinhadas, as mesmas condições foram usadas, exceto pela velocidade de rotação do cilindro, que foi de 4500 rpm (equivalendo a uma velocidade tangencial de 1,4 m/s).

A partir de uma certa velocidade de rotação, porém, o mecanismo de alinhamento das fibras perde efeito, e as fibras são coletadas de forma descontínua e inconsistente. Uma velocidade muito alta pode, inclusive, impedir a formação de uma malha [73, 58].

1.1.4. Materiais eletrofiados e suas características

Uma infinidade de materiais foram eletrofiados com sucesso, muitos dos quais revisados em Huang e Burger [50, 10]. Embora a maioria tenha sido de materiais poliméricos, é possível obter malhas eletrofiadas de compósitos [32, 119, 65], materiais inorgânicos [69, 70], nanotubos [60] e até nanopartículas [4, 139, 63].

Adicionalmente, a técnica de eletrofiação é bastante versátil, podendo-se utilizar o mesmo sistema de eletrofiação para processar diferentes materiais, sintéticos ou naturais, com ou sem a adição de componentes biológicos como proteínas, fatores de crescimento e elementos da matriz extracelular [50, 7, 10].

Tais características singulares tornam a técnica extremamente atraente para a produção de materiais de aplicações tecnológicas das mais variadas. Dentre elas, destacam-se a produção de filtros de alta eficiência [53, 112], tecidos tecnológicos de alta resistência [92], dispositivos eletrônicos [121, 85], geração de energia [20] e biosensores [122]. A maior área de aplicação, e talvez a que melhor emprega o potencial da técnica e das propriedades de seus materiais, é a engenharia de tecidos.

A engenharia de tecidos é um campo multidisciplinar que busca, através da integração de princípios de engenharia com conhecimentos das ciências naturais, o desenvolvimento de substitutos para tecidos vivos, bem como sua manutenção, restauração e melhoria [7, 64, 89].

Dentro da engenharia de tecido o estudo e desenvolvimento de biomateriais tem papel fundamental por fornecer matrizes para crescimento celular, proliferação e formação de novos tecidos [7]. Biomaterial pode ser entendido como qualquer substância, ou conjunto de substâncias, que não um fármaco e que possa ser utilizada, como parte ou como um todo, no tratamento ou substituição de um tecido, órgão ou função do corpo humano.

As malhas eletrofiadas possuem uma elevada área superficial, devido ao pequeno diâmetro de suas fibras e ao fato de elas formarem um não-tecido. Além disso, as malhas possuem alta porosidade, devido à presença de poros tanto em suas fibras quanto entre o emaranhado de fibras, que forma uma estrutura tridimensional e totalmente interconectada por toda a extensão da malha [50, 10, 82].

A estrutura criada nas malhas eletrofiadas assemelha-se bastante com o ambiente natural das células no corpo humano, a matriz extracelular (ECM). Dessa maneira, o implante de materiais eletrofiados tem maior chance de favorecer a adesão e proliferação de células endógenas, facilitando o processo de cura ou regeneração de tecidos. Adicionalmente, podem-se cultivar células nesses materiais pré-implante, permitindo a terapia celular.

Além disso, a técnica permite a customização do suporte celular, misturando materiais sintéticos, que geralmente possuem melhores propriedades físicas e estruturais, com materiais naturais, que possuem melhor biocompatibilidade e aceitação imunológica. O suporte pode ser enriquecido

ainda mais, com a inclusão de componentes biológicos como proteínas, hormônios ou outras biomoléculas, de modo a sintonizar finamente suas propriedades com as necessidades demandadas.

Nesse sentido, o uso de polímeros biocompatíveis é mandatório, uma vez que não se deseja uma resposta inflamatória do implante. Além disso, o uso de materiais biodegradáveis é especialmente interessante em aplicações em que se busca, com o implante, apenas um suporte regenerativo temporário. Isso porque, idealmente, na medida em que a regeneração do tecido lesionado ocorre, o suporte é degradado sem a liberação de agentes tóxicos, deixando para trás apenas o novo tecido regenerado. Tal abordagem elimina, ainda, a necessidade de segunda intervenção operatória, para a retirada do suporte de regeneração.

A engenharia de tecidos já empregou materiais eletrofiados para a produção de curativos para queimaduras [115, 16], na enxertia vascular [110, 48, 93, 126], para regeneração de tecido ósseo [94, 57] e de tecido nervoso [127-133].

1.2. Sistema Nervoso

1.2.1. Componentes do Sistema Nervoso

O sistema nervoso é dividido em sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP). Fazem parte do SNC o cérebro e a medula espinhal, enquanto que o SNP é formado pelos nervos cranianos, que partem do cérebro, pelos nervos espinhais, que partem da medula espinhal, e pelos gânglios nervosos. A extensa rede do SNP inerva o tecido muscular e órgãos, permitindo a comunicação destes com o SNC. O SNC é responsável pelo controle e interpretação dos sinais trazidos por essa rede de nervos, além de enviar respostas e estímulos aos tecidos terminais.

Há dois tipos de células componentes do sistema nervoso: os neurônios e as células gliais [90, 71, 138].

Os neurônios são a unidade básica do sistema nervoso e existem em grande diversidade, diferindo em tamanho e morfologia. Contudo, todo neurônio possui um corpo celular, onde a maioria possui dendritos e nunca mais de um axônio.

Um neurônio típico é constituído pelo corpo celular, também chamado soma, pelos dendritos e o axônio. O soma compreende o núcleo e demais organelas celulares, e é dele que se ramificam os dendritos e o axônio. Enquanto que um neurônio pode possuir diversos dendritos que se ramificam e afinam, ele possui no máximo um axônio, de largura praticamente constante e comprimento muito maior que o dos dendritos, podendo chegar a 1 m ou mais de comprimento em seres humanos.

Os neurônios são divididos em três categorias, de acordo com sua função e o sentido de transmissão de sinal: (1) os neurônios sensitivos (ou aferentes) transmitem os sinais sensoriais provenientes dos órgãos para o SNC; (2) os neurônios motores (ou eferentes) conduzem os impulsos estimulatórios, codificados no encéfalo, até o órgão efector; (3) os interneurônios são mais comumente encontrados no SNC e possuem funções tanto aferentes como eferentes, priorizando a comunicação entre múltiplos neurônios.

Antes de terminar, o axônio pode se ramificar diversas vezes, criando várias conexões, chamadas de sinapses, com outros neurônios. Essas sinapses podem ser do tipo axônio-dendrito, como é mais comum, mas também podem ocorrer entre dois axônios ou dois dendritos.

É através das sinapses que ocorre a transferência de informação, na forma de impulsos elétricos. Esses impulsos são gerados através de um gradiente de potencial elétrico entre os dois lados da membrana plasmática neural. Esse gradiente é carregado e descarregado pelo transporte de íons através de canais e bombas iônicas, em especial a bomba de sódio/potássio, e é mediado por proteínas de superfície específicas para cada íon. Além disso, a manutenção desse gradiente está sujeito a uma fina regulação através da secreção e recepção de neurotransmissores nas fendas sinápticas. Os neurotransmissores podem ser amplamente divididos em excitatórios ou inibidores, de acordo com seu efeito na propagação dos impulsos elétricos.

As células gliais existem em maior número que os neurônios e são compostas pelas células de Schwann, pelos astrócitos e pelos oligodendrócitos. A função básica das células gliais é a de suporte e manutenção dos neurônios [90, 71, 138].

Diferentemente dos neurônios adultos, as células gliais são capazes de sofrer mitose, daí a motivação de diversos trabalhos no sentido de se estudar a capacidade de indução regenerativa destas células.

Células de Schwann e oligodendrócitos possuem funções semelhantes: a formação da bainha de mielina, uma capa gordurosa que envolve e isola eletricamente o axônio, favorecendo, assim, a transmissão dos impulsos elétricos. Enquanto os oligodendrócitos associam-se aos neurônios do SNC, as células de Schwann associam-se aos neurônios do SNP, além de possuírem atividade fagocitária e estarem possivelmente associados à regeneração neuronal e tratamento de esclerose múltipla [42].

Já os astrócitos são o tipo mais abundante de glia. Eles possuem a forma de estrela, como o nome sugere, e dentre suas funções está à manutenção do balanço iônico extracelular, a reciclagem de neurotransmissores, assim como o suprimento de nutrientes aos neurônios através de suas projeções conectadas a corrente sanguínea. Os astrócitos estão também envolvidos na formação da barreira hematoencefálica, que separa o SNC da corrente sanguínea.

Lamininas

As lamininas pertencem a uma família de glicoproteínas da membrana basal, e estão presentes em quase todos os tecidos do corpo humano. Elas são, ainda, um dos componentes principais da matriz extracelular e fornecem pontos de ancoragem para células e órgãos.

As lamininas são proteínas triméricas compostas de uma cadeia alfa, uma cadeia beta e uma cadeia gama. Existem, ao todo, 14 combinações dessas cadeias identificadas no corpo humano. A estrutura básica das lamininas é mostrada abaixo. Na figura, observa-se que as cadeias formam uma cruz, o que facilita a ligação com membranas celulares e outros

componentes da ECM. Os braços menores, localizados na ponta, são mais adequados à ligações com outras moléculas de laminina, o que permite a formação de estruturas de folha, característica da proteína. O braço longo, por sua vez, é capaz de se ligar à células. O papel proeminente das lamininas no desenvolvimento das células neurais já foi reconhecido em diversos trabalhos [61, 82, 29]. Inclusive alguns de seus fragmentos peptídeos foram isolados e usados na ligação de células neurais [135, 97, 131, 1, 81].

Figura 10: representação esquemática da estrutura de uma laminina. Retirada de <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/structural-proteins/laminin.html>

1.2.2. Neuroesferas

Existem diversos modelos de diferenciação neural, desde células de carcinoma (células P19) até células-tronco embrionárias [149-152]. O modelo utilizado neste trabalho foi o de neuroesferas. À parte as questões éticas envolvidas em todos esses modelos, o uso das neuroesferas possui algumas vantagens em relação às alternativas, tais como menor custo e maior facilidade de obtenção e manuseio, por ser de origem primária. Além disso, elas são multipotentes, garantindo uma diferenciação exclusiva em células neurais, sem a necessidade de protocolos específicos de diferenciação [149].

As neuroesferas são obtidas por extração do telencéfalo de embrião de rato e cultivo em meio adequado, como descrito na metodologia.

Quando se deseja que as células se diferenciem, a suplementação dos fatores de crescimento é removida e as neuroesferas são transferidas para uma nova garrafa, contendo meio adequado e tratada com uma camada de poli-L-lisina e laminina, a fim de favorecer a adesão celular. As novas células, então, começam a migrar radialmente para fora da esfera e, concomitantemente, diferenciam-se em células neurais.

Figura 10a: esquema indicando condições de cultura e eventos envolvidos desde a obtenção das neuroesferas até sua diferenciação. Imagem adaptada de [149]. Reproduzida com autorização.

1.2.3. Dano ao Sistema Nervoso

Quando um nervo se rompe, devido a trauma ou acidente, os neurônios constituintes sofrem a axotomia, que é a perda da ligação entre seu soma e axônio. A extremidade do nervo cindido que fica mais próxima do soma recebe o nome de terminação proximal, ao passo que a extremidade mais distante recebe o nome de terminação distal.

Como praticamente toda a maquinaria metabólica da célula se encontra no soma, a porção distal degenera rapidamente, perdendo a estrutura

citoesquelética e tendo dissolvida a membrana celular. Após essa desestruturação, os macrófagos e células de Schwann entram em ação, limpando dejetos celulares e liberando citocinas, sinalizadores que promovem o crescimento axonal [90, 71, 138, 101, 15]. A terminação proximal, por sua vez, sofre poucos danos estruturais e, após a limpeza de dejetos do trauma, começa regeneração na direção da terminação distal [79, 71].

Após o dano ao nervo, as células de Schwann se infiltram na fenda e ocorre uma reorganização dessas células e lamininas próximas, formando uma coluna alinhada longitudinalmente na direção que seguia o nervo cindido. Essa complexa estrutura recebe o nome de banda de Bungner e é um elemento chave para a regeneração bem sucedida do nervo [33, 59, 6].

A banda de Bungner tem o papel de fornecer um meio físico de direcionar o crescimento do axônio em direção ao seu alvo distal, além de prover fatores neurotróficos, de adesão celular e componentes da ECM.

Por causa da natureza inerentemente anisotrópica dos nervos, e de seus mecanismos de regeneração, é bastante claro que a condução física dos axônios é imprescindível para a regeneração neural. Além disso, a provisão de componentes biológicos, incluindo fatores de crescimento, proteínas constituintes da ECM e células gliais, possui grande potencial para melhorar o desempenho de suportes para restauração de danos ao sistema nervoso. Finalmente, a disposição (isotrópica ou anisotrópica), a apresentação e a disponibilização desses elementos constituem parâmetros chave no estudo e desenvolvimento de trabalhos na área [102, 6].

Outros tipos celulares também se beneficiam da anisotropia do substrato e do alinhamento de suas fibras [65, 143, 91, 126, 123].

Recentemente, Kuo e colaboradores usaram o método de deposição de metal sem eletrodo para lixiviar placas de silício na forma de nanofios [62]. As estruturas tridimensionais obtidas foram então usadas para se estudar o efeito da estéreo-topografia do substrato na diferenciação de células-tronco humanas mesenquimais (hMSC).

1.3. Estratégias de Regeneração Neural

O tratamento padrão para a reconstrução de um nervo seccionado é a sutura direta entre as terminações nervosas separadas. Quando a distância dentre as terminações é grande, ou há muita perda de material biológico, o auto-enxerto é a opção padrão. Nesse procedimento, um nervo do próprio paciente é removido e suturado nas terminações do nervo danificado. Conquanto as taxas de regeneração e reconexão nervosa sejam altas com esse procedimento, ele está longe de ser ideal, uma vez que ele requer uma intervenção cirúrgica adicional, para obter o auto-enxerto, além de causar a perda da conexão nervosa do local doador.

Assim, há muito que se busca uma alternativa satisfatória aos auto-enxertos. Nesse sentido, talvez a estratégia mais robusta seja o uso de canais tridimensionais, na forma de canudos, que ligam e envelopam as duas extremidades do nervo cindido.

Diversos materiais foram utilizados na confecção de tais canais, com inúmeras modificações de composição e preenchimento.

Um dos primeiros materiais a serem usados na construção desses canais foi o silicone [98, 83, 36, 116, 76]. Apesar da boa aceitação desse material pelo corpo, ele não é biodegradável, o que impõe uma grande desvantagem a esse material [102, 113]. Dessa forma, polímeros biodegradáveis, são preferíveis como constituintes dos canais de condução. Entre esses polímeros, destacam-se PLLA, PLGA, PCL e PHB, bem como seus copolímeros [133, 77, 3, 34, 35, 8, 19]. Colágeno, um polímero natural e biodegradável, também já foi usado na construção dos conduítes [2, 52, 14].

De maneira geral, o uso de tubos ocos possui pior desempenho quando comparados com tubos preenchidos [111]. Materiais utilizados, na forma de géis, para o preenchimento dos tubos incluem colágeno, laminina, fibronectina, alginato e células de Schwann [127, 14, 34, 46, 78, 116, 84, 80]. Menos comum, é o uso destes materiais na forma de fibras [132, 17, 13].

Na busca de fornecer contatos físicos adicionais ao suporte de regeneração neural, foram incorporadas ranhuras micrométricas às paredes do

canal de condução [43, 137]. Nanofibras poliméricas também foram usadas com esse intuito.

Kim e colaboradores, por exemplo, usaram um filme de nanofibras alinhadas de poli(acrilonitrila-co-metilacrilato) no interior do canal [59]. Para efeito de comparação, foi criado um suporte cujo filme do interior possuía nanofibras não alinhadas. Os testes com ratos cobaia revelaram uma significativa melhora na regeneração do suporte de nanofibras alinhadas. Num trabalho posterior, o grupo testou o uso de mais de um filme de nanofibras alinhadas no interior do canal, mas os resultados não foram tão bons quanto no suporte de apenas um filme [22].

Chew e colaboradores recobriram as paredes internas do tubo com nanofibras de poli(caprolactona-co-etil etileno fosfato) (PCL-EEP), e testaram em ratos o desempenho do suporte sem as nanofibras na parede e com nanofibras alinhadas de maneira longitudinal e circumferencial [18]. O uso de nanofibras alinhadas melhorou a regeneração dos nervos danificados, apesar de a orientação das fibras não impactar significativamente nessa regeneração.

É consenso entre pesquisadores que os conduítes devem ser porosos, para permitir o fluxo de nutrientes e dejetos para dentro e fora do canal. Além disso, na construção dos suportes, procura-se incorporar tantos fatores de condução quanto possível. Frequentemente são adicionados tanto fatores físicos (ranhuras, fibras alinhadas) como moleculares (laminina, colágeno, peptídeos de reconhecimento celular, fatores de crescimento) ou biológicos (células de Schwann, fibroblastos, células-tronco). A anisotropia desses fatores de condução também é apontada como um fator crítico no sucesso desses suportes [29, 6].

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho consiste na produção de materiais poliméricos eletrofiados para aplicação como biomateriais. Como o uso desses materiais se destina ao suporte para crescimento do tecido neural, é de suma importância que suas fibras constituintes estejam alinhadas e tenham tamanho submicrométrico.

Enquanto que o controle do diâmetro e alinhamento das fibras eletrofiadas é relativamente fácil e bem descrito na literatura, o mesmo não pode ser dito sobre a avaliação da qualidade de tal alinhamento. Dessa forma, buscou-se desenvolver um método de quantificação da qualidade de alinhamento de fibras constituintes de malhas eletrofiadas.

Dessa forma, os objetivos específicos do trabalho envolvem:

- (i) Construção de um aparato de eletrofiação capaz de produzir malhas de fibras poliméricas alinhadas;
- (ii) Variação dos parâmetros de eletrofiação neste aparato, de modo a se obter malhas com fibras de diferentes qualidades de alinhamento;
- (iii) Avaliação da morfologia das fibras das malhas obtidas;
- (iv) Desenvolvimento de uma metodologia capaz de avaliar objetiva e quantitativamente a qualidade do alinhamento das fibras nas malhas eletrofiadas;
- (v) validação estatística da metodologia desenvolvida;
- (vi) avaliação da metodologia com testes *in vitro* utilizando-se células neurais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Os polímeros poli(ϵ -caprolactona) e poli(L-lactídeo) foram obtidos da Sigma Aldrich e utilizados sem purificação prévia.

Os solventes clorofórmio (CHCl_3), diclorometano (CH_2Cl_2) e N,N-dimetilformamida (DMF) foram obtidos da Synth.

Os solventes foram submetidos ao procedimento de secagem, que consistiu na adição, por 24 horas, de cloreto de cálcio anidro (CaCl_2), obtido também da Synth, seguido de filtragem e destilação do solvente.

3.2. Obtenção das fibras eletrofiadas

Para a produção das fibras poliméricas alinhadas, foi construído um aparato de eletrofiação, cujo esquema de montagem é mostrado na Figura 11

Figura 11: esquema de montagem do aparato de eletrofiação

O aparato construído consiste de um cilindro de aço inox de 60 mm de diâmetro externo, suportado de cada lado por dois mancais isolantes com rolamentos livres. Esse cilindro é revolucionado por um motor DC, que transmite seu torque ao eixo do cilindro por meio de uma correia. O motor é controlado por um potenciômetro que permite o ajuste da tensão enviada ao motor, de modo a permitir a variação da velocidade de rotação do cilindro. A Figura 12 mostra uma foto do aparato construído.

O cilindro metálico em rotação foi usado como alvo para o jato de eletrofiação. Para tanto, um dos terminais de uma fonte de alta tensão foi ligado a um conector na lateral de um dos mancais para contato elétrico do cilindro metálico. O outro terminal da fonte de alta tensão foi conectado à agulha da seringa de eletrofiação. A agulha utilizada nas eletrofiações possui um orifício de 22 gauge de ponta reta.

O polímero em questão foi dissolvido em solvente apropriado e acondicionado na seringa de eletrofiação. A seringa, por sua vez, foi empurrada por uma bomba de injeção, a um fluxo constante e ajustável. A solução polimérica acumula carga elétrica devido à tensão aplicada pela fonte de alta tensão, e é acelerada pelo campo elétrico, estabelecido entre o cilindro coletor e a seringa, em direção ao cilindro coletor em rotação e nele se deposita na forma de malhas contendo fibras poliméricas alinhadas.

Figura 12: fotografia do aparato de eletrofiação construído

3.3. Caracterização das malhas

As malhas obtidas por eletrofiação foram levadas ao microscópio eletrônico de varredura (MEV). Para tanto, um pedaço da malha foi cortado com a ajuda de um bisturi e o mesmo foi colado sobre um suporte para amostras de microscopia (*stub*) com o auxílio de uma fita adesiva de cobre. Depois que todos os pedaços de malha a serem analisados foram colados no suporte, o mesmo foi recoberto com uma camada de ouro de 2 nm de altura com o auxílio de um *sputter*.

As imagens foram adquiridas num microscópio da marca Jeol, modelo FEG 7401F, usando-se 10 kV de tensão.

A partir das imagens adquiridas, foram feitas as caracterizações morfológicas das fibras constituintes dessas malhas. Todas as imagens foram tratadas pelo software livre ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

3.3.1. Medidas de diâmetro

Utilizando a barra de escala da própria microscopia e a ferramenta de calibração de distâncias do ImageJ, foi possível obter as medidas dos diâmetros das fibras em unidades métricas. Para cada malha, foram usadas 3 imagens representativas de sua morfologia e os diâmetros das fibras visíveis foram medidos e anotados. Um total de pelo menos 150 medidas de diâmetro foram feitas para cada malha.

3.3.2. Determinação do grau de alinhamento

Método manual

Para avaliar o grau de alinhamento das fibras, recorreu-se à ferramenta de FFT do ImageJ. Tal ferramenta aplica na imagem um algoritmo de transformada de Fourier, que transforma as informações de intensidade de pixels da imagem de um domínio espacial para um domínio de frequências, apresentado no espectro de potências. Tal espectro permite uma melhor interpretação de como as fibras se posicionam espacialmente na imagem.

Antes de se aplicar a ferramenta de FFT, porém, a microscopia foi girada de maneira tal que a maioria das fibras alinhadas ficasse paralela à horizontal. Tal procedimento foi adotado para padronizar o perfil dos espectros de potência obtidos das microscopias, isto é, para que os pixels de maior intensidade se agrupassem próximos a 90 graus, como mostrado na Figura 13.

Figura 13: perfil típico do espectro de potência adquirido pela ferramenta de FFT do ImageJ. As retas mostradas apenas demonstram algumas das retas traçadas por outra ferramenta do software para medir intensidades de pixels.

Neste espectro de potências, é traçada uma reta partindo do centro até a borda e, utilizando outra ferramenta do software, as intensidades dos pixels pertencentes a essa reta são registrados em planilha eletrônica para posterior tratamento. A reta é deslocada em um incremento angular, mantendo sempre o mesmo comprimento de reta e a origem no centro do espectro. As intensidades dos pixels desta nova reta são registradas sob o incremento angular e repete-se o incremento e registro até que se perfaçam 180 graus.

A Figura 13 mostra um perfil típico do espectro de potências e demonstra algumas das retas traçadas para a aquisição das intensidades dos pixels, conforme descrito no parágrafo anterior.

Para cada reta traçada no espectro de potências, calculou-se a média da intensidade dos pixels pertencentes a essa reta. Essa média representa a contribuição relativa das fibras orientadas nessa direção. Dessa forma, um gráfico das intensidades médias de pixel das retas traçadas em função do ângulo tomado, fornece a distribuição de orientação das fibras na malha, conforme mostrado na Figura 14. O grau de alinhamento das fibras é proporcional à área sob a curva de distribuição de orientações.

Figura 14: distribuição de orientação das fibras de uma malha eletrofiada, obtida pelo tratamento descrito, aplicado ao espectro de potências da Figura 13

Criação de algoritmo computacional de quantificação de alinhamento de fibras

Foi escrito em Java um script para realizar as operações descritas na seção anterior, com a diferença de que a micrografia não é girada antes de se aplicar o FFT. Por causa disso, o pico de intensidade de pixel no gráfico de distribuição de orientação não fica centrado em 90°, como ocorre no método manual.

Além disso, a micrografia inteira é utilizada na avaliação do grau de alinhamento das fibras. Isso não ocorre no método manual porque ao se girar a imagem a fim de que a orientação preferencial esteja na horizontal, parte da imagem é cortada (tanto mais quanto maior for o ângulo de inclinação da orientação preferencial na micrografia com a horizontal).

Tendo ciência disso, um estudo sobre a equivalência dos métodos foi realizado, aplicando-se ambas as opções de tratamento no mesmo conjunto de imagens e aplicando testes estatísticos para diferenças.

Avaliação de representatividade estatística da análise proposta

Com o uso do script descrito na seção anterior, foi possível analisar rapidamente uma grande quantidade de micrografias de malhas eletrofiadas. Assim, foram eletrofiadas três malhas com diferentes qualidades de alinhamento de fibras e, de cada malha, foram escolhidos aleatoriamente 10 pontos de focalização do microscópio. Em cada ponto focalizado, foram obtidas imagens em 4 magnificações diferentes e pré-estabelecidas, tendo sido obtidas 140 micrografias no total (a terceira malha foi focalizada em 8 pontos aleatórios, cada qual nas 4 magnificações).

Análises estatísticas foram utilizadas para avaliar a influência dos fatores de magnificação e localização da imagem nesses valores.

3.4. Cultura de neuroesferas nas malhas eletrofiadas

As malhas eletrofiadas com diferentes qualidades de alinhamento foram entregues à pesquisadora colaboradora deste trabalho, Micheli Mainardi, que realizou os experimentos de obtenção e cultura das células neurais no Laboratório de Neurociência do Instituto de Química da USP. A cultura celular foi feita em placas de cultura de 12 poços, contendo pedaços de malha eletrofiada como substrato e seguindo metodologia descrita abaixo.

Obtenção e cultivo de células precursoras neurais

Utilizamos células precursoras neurais, que proliferam em agregados chamados neuroesferas, como modelo da diferenciação neural, extraídas de embriões com 13 dias de gestação (E13) de camundongos C57BL/6 selvagens e *knockout* para o receptor B2 de cininas B2BkR^{-/-} (Bdkrb2^{tm1Jfh}) (The Jackson Laboratory, EUA). Os animais foram eutanasiados e os telencéfalos dos embriões foram isolados com o auxílio de uma lupa de dissecação e materiais cirúrgicos em condições assépticas. Posteriormente, o tecido foi incubado com

tripsina por 5 min a 37°C. Em seguida a digestão enzimática foi interrompida com a adição de Soro Fetal Bovino (SFB)(Cultilab, Campinas, Brasil) e as células foram dissociadas mecanicamente para obtenção de células individualizadas. Seguida a filtração por poros de 40 µm, uma alíquota da suspensão celular foi diluída em Trypan Blue (Life Technology, Carlsbad, EUA) para avaliação da viabilidade em câmara de Neubauer, então as células foram cultivadas em suspensão na densidade de 2×10^5 células/mL de meio DMEM-F12 (Life Technology), suplementado com 2% B-27 (Life Technology), 20 ng/mL EGF (Sigma-Aldrich), 20 ng/mL FGF2 (Sigma-Aldrich), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich). No 5º dia de cultura, sob condições ideais (37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade), é possível observar a formação de neuroesferas, sendo que apenas uma pequena proporção das células totais é capaz de formá-las.

Diferenciação das neuroesferas

Primeiramente as neuroesferas foram lavadas duas vezes com DMEM para completa remoção dos fatores de crescimento EGF e FGF2 que as mantem proliferando e indiferenciadas. Posteriormente as células foram semeadas em membranas eletrofiadas, placas ou garrafas tratadas com poli-L-lisina (1 mg/mL, Sigma-Aldrich) e laminina (20 µg/mL, Sigma-Aldrich) que forma uma matriz aderente. Para a diferenciação celular foi utilizado o meio de cultura DMEM-F12 (Life Technology), suplementado com 2 % de B-27 e antibióticos na ausência dos fatores de crescimento EGF e FGF2. Após início da diferenciação, o meio de cultura foi trocado a cada dois dias em um total de 7 dias de diferenciação. Os inibidores das vias de sinalização foram acrescentados com o meio de cultura, já a BK e HOE-140 foram adicionados todos os dias. Em condições de co-tratamento com inibidores de vias de sinalização na presença de BK, os primeiros sempre eram acrescentados ao meio de cultura 1 hora antes da cinina.

Imunocitoquímica

As células foram fixadas com 4 % paraformaldeído (PFA) em PBS (*Phosphate Buffered Saline*), lavadas em PBS e, posteriormente, incubadas em PBS com 0,1% de Triton X-100 para permeabilizar as membranas e 3 % SFB por 20 min para o bloqueio de sítios inespecíficos. As células foram incubadas com os anticorpos primários (Tabela 3.1) em 0,1% de Triton X-100, 3% SFB, PBS por 2 horas em temperatura ambiente e então foram removidos por meio de duas lavagens com PBS. As amostras foram incubadas com anticorpos secundários conjugados a fluoróforos (Alexa Fluor 488 e 555 – Tabela 3.1) por 1 hora, seguida de duas lavagens com PBS e incubação durante 5 min com DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole*) (1:10.000 em PBS) para a visualização dos núcleos celulares. As membranas eletrofiadas foram novamente lavadas e montadas em lâminas utilizando-se o meio de montagem DPX (*1,3-diethyl-8-phenylxanthine*) (Sigma-Aldrich). Os controles negativos foram feitos com a adição dos anticorpos controle de Isotipo dos primários e os secundários conjugados correspondentes. As imagens foram capturadas com a câmera digital Nikon DXM1200F acoplada ao microscópio Axiovert 200 (Zeiss) utilizando-se o programa NIS-Elements. As imagens foram posteriormente analisadas e sobrepostas através do software ImageJ. Os experimentos foram realizados em triplicatas e repetidos por três vezes.

Tabela 3.1– Anticorpos primários utilizados em ensaios de imunocitoquímica

Antígeno	Produzido em	Empresa
GFAP	Coelho	DAKO Systems
β 3-tubulina	camundongo	Sigma-Aldrich

Tabela 3.2 – Anticorpos secundário utilizados em ensaios de imunocitoquímica

Antígeno	Fluoróforo	Produzido em	Empresa
IgG de coelho	Alexa Fluor 488	cabra	Life Techlonogy
IgG de camundongo	Alexa Fluor 555	cabra	Life Techlonogy

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Eletrofiação dos polímeros

4.1.1. Obtenção das primeiras fibras

Uma vez construído o aparato de eletrofiação, foram conduzidos os testes de obtenção das fibras alinhadas com tal equipamento. Num primeiro momento, o polímero utilizado foi o poli(ϵ -caprolactona) (PCL), disponível comercialmente. Tal escolha foi feita por permitir se trabalhar com um material tanto abundante como de baixo custo, o que se constituiu em vantagem, uma vez que se utilizava uma estratégia de eletrofiação até então inédita no grupo.

Nessa fase do projeto, foram variados os seguintes parâmetros: sistema de solvente utilizado, concentração da solução polimérica, e condições de operação (distância entre seringa e alvo, tensão aplicada, fluxo de injeção da solução polimérica, velocidade de rotação do cilindro).

Seguindo algumas referências [50, 9, 144], em especial a [19], o polímero foi dissolvido em diclorometano a uma concentração de 12% m/m e submetido à eletrofiação. Tal solução, no entanto, não foi capaz de produzir fibras, mas apenas grumos ou “*beads*”. Uma possível razão para isso pode ser a alta volatilidade do solvente, aliada à baixa viscosidade da solução. Devido a tais características da solução, ao invés de se obter um fluxo contínuo de material ejetado da seringa em direção ao alvo, o que se obteve foram espirros intermitentes de solução, que por sua vez tiveram o solvente evaporado muito antes de alcançar o alvo e lá se acumularam na forma de grumos.

De fato, existe uma concorrência entre a eletropulverização e a eletrofiação, baseada nas propriedades viscoelásticas da solução, conforme revisado recentemente [23]. É possível, portanto, haver uma transição gradual entre tais extremos fenomenológicos [72, 103, 75].

Dessa forma, a concentração polimérica da solução de eletrofiação foi aumentada para 15% m/m. O aumento nessa concentração proporcionou um aumento visível na viscosidade da solução, o que é benéfico para o processo de eletrofiação, de modo que esta foi definida como a concentração de

trabalho. Adicionalmente, trocou-se o solvente para uma mistura de clorofórmio (CHCl_3) e N,N-dimetilformamida (DMF) na razão de 9:1 v/v.

O clorofórmio possui uma menor volatilidade (menor pressão de vapor) que o diclorometano. Já a adição de DMF é bem comum na literatura [141, 129, 105], justamente por seu efeito em diminuir a volatilidade do sistema de solventes, bem como em aumentar sua constante dielétrica. Além disso, o DMF possui elevada constante dielétrica, de modo que sua presença na mistura de solventes aumenta a mobilidade de cargas na solução de eletrofiação, conforme também é reportado em outros trabalhos [142, 129, 124]. Esses efeitos combinados favorecem a eletrofiação e melhoram o fluxo de material em direção ao alvo.

Tal condição de solubilização do polímero permitiu a efetiva eletrofiação do mesmo em fibras contínuas, acumuladas na forma de malhas maleáveis no cilindro coletor.

O passo seguinte na avaliação dos parâmetros de eletrofiação foi a variação da velocidade de rotação do cilindro. O segredo para o alinhamento das fibras com essa estratégia é a da compatibilização entre a velocidade de coleta das fibras, isto é, a velocidade tangencial do cilindro, com a velocidade da deposição das fibras recém-formadas pela evaporação do solvente [19, 73, 58, 50]. Assim, se a velocidade de captação das fibras for suficientemente baixa, o coletor se portará como um anteparo fixo, em que o caos da instabilidade do jato ditará a morfologia obtida pela deposição das fibras, isto é, elas estarão depositadas na forma de malhas não tramadas. Por outro lado, se a velocidade de coleta for demasiadamente alta, a coleta de fibras contínuas será impossibilitada.

Dessa forma, a velocidade de rotação do cilindro coletor foi aumentada gradativamente a fim de se determinar os limites de velocidade em que as fibras começam a se alinhar (limite inferior de velocidade) e o limite em que elas deixam de ser contínuas (limite superior de velocidade). Durante os experimentos, foi constatado que as fibras alinhavam-se com frequências rotacionais do cilindro acima de 3000 rpm. Todavia, por mais que se aumentasse essa frequência (até 3600 rpm), as malhas eletrofiadas continuavam sendo obtidas como fibras alinhadas.

Para calcular a velocidade tangencial em função da rotação do cilindro, ou a velocidade de captação das fibras, calculamos primeiro a velocidade angular de rotação, abaixo exemplificada para uma taxa de 3250 revoluções por minuto:

$$\omega = 2\pi \times (\text{freq rot}) = (2\pi \times 3250)/60 = 340 \text{ rad/seg}$$

Como o cilindro possui um diâmetro de 60 mm, a velocidade linear é:

$$V = \omega R = 340 \times 0,030 = 10,2 \text{ m/s}$$

Dessa forma, a velocidade de trabalho foi definida em 3250 rpm por permitir já o alinhamento das fibras, e não promover instabilidade vibracional nos suportes do cilindro nem muita poluição sonora.

4.1.2. Variação dos parâmetros de eletrofiação de PCL

A partir do momento em que se obteve sucesso na produção de fibras eletrofiadas no cilindro coletor, os parâmetros de distância e fluxo de injeção foram variados, cada qual, aos pares, a saber: distância de trabalho de 18 ou 12 cm, e fluxo de injeção de 1 ou 2 mL/h.

A tensão aplicada ao sistema, por sua vez, foi variada de tal sorte que a força do campo elétrico (E) assumisse um valor de 1,4 ou de 1,0 kV/cm (embora nos experimentos Malha_05 e Malha_09 ela tenha assumido, para efeitos de estudo, o valor intermediário de 1,2 kV/cm). Esse cuidado foi tomado para que o jato de material experimentasse a mesma força de aceleração rumo ao anteparo. As condições usadas na eletrofiação do PCL são mostradas na Tabela 1 e as microscopias obtidas são apresentadas na Figura 15.

Tabela 1: resumo dos parâmetros de eletrofiação de PCL

Id	Fluxo [mL/h]	Dist [cm]	ddp [kV]	E [kV/cm]
Malha_01	2	18	25	1,4
Malha_02	2	18	18	1,0
Malha_03	2	12	16,5	1,4
Malha_04	1	18	25	1,4
Malha_05	1	18	22	1,2
Malha_06	1	12	16,5	1,4
Malha_07	2	12	12	1,0
Malha_08	1	18	18	1,0
Malha_09	2	18	22	1,2

É interessante ressaltar que nessas condições, a velocidade de captação das fibras foi mantida constante em 10,2 m/s. Tal procedimento foi adotado para que se avaliasse primeiro o efeito dos demais parâmetros da eletrofiação. Todavia, não foi possível compatibilizar os efeitos de todos os parâmetros num modelo holístico do processo, uma vez que a alteração de qualquer parâmetro modifica o efeito de todos os demais parâmetros.

Ademais, os fenômenos da eletrofiação são muito particulares do sistema soluto/solvente em questão, de modo que um modelo matemático da influência de parâmetros não é, via de regra, facilmente estendido para outro sistema, mormente quando se utiliza um aparato ou um polímero diferente.

De toda forma, durante o estudo da variação dos parâmetros de eletrofiação foram obtidas diversas qualidades de alinhamento (definidas por análise visual) das fibras das malhas produzidas, o que forneceu material para a aplicação do protocolo de quantificação de grau de alinhamento de fibras, discutido mais adiante.

Figura 15: Microscopias representativas das malhas obtidas pelas condições da Tabela 1. (A) Malha_01, (B) Malha_02, (C) Malha_03, (D) Malha_04, (E) Malha_05, (F) Malha_06, (G) Malha_07, (H) Malha_08, (J) Malha_09. Aumento de 2000 vezes em todas as imagens

Posteriormente, algumas das condições de eletrofiação de PCL que produziram fibras mais alinhadas foram selecionadas para que fossem reproduzidas, mas agora com velocidades diferentes de rotação do cilindro. Isso foi feito para que se avaliasse separadamente o impacto desse parâmetro na qualidade do alinhamento das fibras.

A Tabela 2 resume as condições de eletrofiação utilizadas nesse conjunto de experimentos. Observando-a, percebe-se que as condições para obtenção das malhas Malha_06 e Malha_10 diferem entre si apenas quanto à velocidade de rotação do cilindro, assim como acontece para o par Malha_12 e Malha_11. Analogamente, ao se analisar as condições para o par Malha_12 e Malha_06, nota-se que a diferença ocorre no fluxo de vazão da solução polimérica.

Tabela 2: condições de eletrofiação de PCL, variando-se a velocidade de captação das fibras. A distância de trabalho foi de 12 cm e a tensão aplicada de 16,5 kV em todas as condições

Id	Fluxo [mL/h]	Velocidade [m/s]
Malha_06	1	10,2
Malha_12	4	10,2
Malha_10	1	8,3
Malha_11	4	5,5

Com base nas imagens de MEV das malhas assim obtidas, mostradas na Figura 16, observa-se que tanto o fluxo de injeção quanto a velocidade de rotação do cilindro afetam a qualidade do alinhamento das fibras. Todavia, fica claro que a velocidade de rotação afeta mais significativamente essa qualidade de alinhamento. Outro ponto interessante, o aumento do fluxo de injeção não impactou tanto no diâmetro médio das fibras. Esses pontos serão discutidos mais adiante, na seção de caracterização das fibras obtidas.

Figura 16: Imagem de MEV das malhas obtidas pelas condições da Tabela 2 (A) Malha_06, (B) Malha_12, (C) Malha_10 e (D) Malha_11. Aumento de 2.000 em todas as microscopias.

4.1.3. Eletrofiação de PLLA

Com os resultados obtidos na eletrofiação do PCL, foi possível direcionar as condições iniciais para a variação dos parâmetros de eletrofiação do PLLA, ainda que se tenha tido em mente que as condições de eletrofiação são marcadamente sensíveis ao polímero utilizado. Por exemplo, o mesmo sistema de solventes foi utilizado na solubilização do PLLA. Além disso, a distância de trabalho foi fixada em 12 cm e a força do campo elétrico não foi utilizada em valores abaixo de 1,4 kV/cm.

Tais critérios foram tomados baseados nas qualidades micro e macroscópicas das malhas de PCL. Dessa forma, foram utilizadas menos condições de eletrofiação para o PLLA, as quais são apresentadas na Tabela 3, abaixo. A velocidade de rotação do cilindro coletor foi de 10,2 m/s para todas essas condições.

Tabela 3: resumo dos parâmetros de eletrofiação de PLLA

Id	Fluxo [mL/h]	Dist [cm]	ddp [kV]	E [kV/cm]
Malha_16	2	12	16,5	1,4
Malha_13	3	12	16,5	1,4
Malha_14	4	12	16,5	1,4
Malha_15	4	12	21,0	1,7

Como esperado, essas condições geraram fibras bastante alinhadas, conforme pode ser observado nas microscopias da Figura 17. Ainda assim, houve alguma variação na qualidade do alinhamento das fibras, especialmente na condição em que se usou uma intensidade de campo maior, Malha_15.

Figura 17: microscopias representativas das amostras eletrofiadas nas condições da Tabela 3. (A) Malha_13, (B) Malha_14, (C) Malha_15 e (D) Malha_16. Aumento de 1000 vezes em todas as imagens

Assim como foi feito com o PCL, a velocidade do rotor foi variada numa segunda fase de avaliação de parâmetros. As condições utilizadas são mostradas na tabela abaixo.

Tabela 4: condições de eletrofiação do PLLA variando-se a velocidade de captação das fibras. Em todas $d=12\text{cm}$, $\text{fluxo} = 4 \text{ mL/h}$ e $\text{ddp} = 16,5 \text{ kV}$

Id	Velocidade [m/s]
Malha_14	10,2
Malha_17	8,3
Malha_18	5,5

Também como ocorreu com o PCL, a velocidade de rotação do cilindro coletor impactou significativamente na qualidade do alinhamento das fibras obtidas, como pode ser inspecionado visualmente nas microscopias das malhas obtidas pelas condições da Tabela 4, mostradas na Figura 18. A

observação da velocidade de captação das fibras como sendo o fator principal na determinação da qualidade de seu alinhamento está de acordo com o encontrado na literatura, como por exemplo nos trabalhos de Inai [51] e Mathews [73].

Figura 18: Imagens de MEV para as malhas obtidas pelas condições mostradas na Tabela 4. (A) Malha_14, (B) Malha_17 e (C) Malha_18.

Tais evidências corroboram com a explicação para o alinhamento das fibras quando se utiliza a estratégia do cilindro rotativo, qual seja a de que as fibras são captadas no cilindro ao mesmo tempo em que são estiradas pela rotação do mesmo. Assim, quando as velocidades de rotação e de coleta estão sintonizadas, ocorre a maior eficiência do alinhamento das fibras. Se, por outro lado, a velocidade de rotação está muito acima da velocidade de coleta, as fibras se partem e a malha obtida apresentará fibras descontínuas e quebradiças. Finalmente, se a velocidade de rotação for muito baixa, o coletor se comportará como um coletor fixo, não exercendo nenhum efeito de alinhamento nas fibras.

4.2. Caracterização das fibras poliméricas

4.2.1. Determinação do grau de alinhamento

4.2.1.1. Considerações sobre a metodologia

Para a medição do diâmetro das fibras eletrofiadas escolheu-se o programa ImageJ, um programa de domínio público desenvolvido pelo National Institutes of Health para processamento de imagens de microscopia. Este

programa, escrito em Java, permitiu, ao longo do seu desenvolvimento, a inclusão de uma série de operações lógicas e aritméticas, além de clássicas ferramentas de otimização de imagens.

As primeiras evidências de que a ferramenta de FFT do ImageJ poderia ser utilizada para obtenção de uma medida quantitativa vieram do próprio manual do software. Especificamente, esse documento demonstra como usar a ferramenta para medir a distância entre planos atômicos em imagens de microscópio de transmissão eletrônica (TEM).

Tal procedimento utiliza a calibração de distâncias – que também foi usada no trabalho desta dissertação para a medição de diâmetros de fibra –, bem como uma característica do espectro de potências: o agrupamento dos padrões repetitivos da imagem original. No caso específico da demonstração mencionada, o espaçamento entre os planos atômicos é regular o bastante para formar, no espectro de potências, uma região clara, o que sinaliza um forte padrão de interferência claro/escuro dos pixels da imagem original. Como as distâncias da imagem em questão haviam sido previamente calibradas, a posição do cursor no espectro de potências (colocado sobre a região clara) indica a frequência de espaçamento entre planos em nanômetros (no exemplo citado, essa distância de espaçamento é de 0,19 nm).

Talvez a relação entre interferência claro/escuro dos pixels da imagem original e a criação de regiões claras no espectro de potências seja melhor entendida num outro exemplo de aplicação da ferramenta de FFT, também encontrado no manual do ImageJ. Neste exemplo, uma microscopia de microscópio confocal a laser (CLSM) com ruído foi “limpa” ao se aplicar uma máscara ao espectro de potências da imagem original.

Ruídos neste tipo de microscopia podem vir de oscilações do laser e aparecem na imagem sob a forma de linhas brancas paralelas. Uma vez que se aplique a ferramenta de FFT na micrografia original, o espectro de potências obtido apresenta pixels claros agrupados numa direção perpendicular ao do padrão original. No caso em questão, como as linhas eram horizontais, o espectro de potências apresenta pixels claros agrupados na direção vertical, como mostrado na Figura 19. Posteriormente, usando ferramentas do próprio ImageJ, aplica-se uma máscara no espectro de potência, “cobrindo” esses pixels claros que representam as ranhuras indesejadas. Finalmente, aplica-se

novamente a ferramenta de FFT, agora no espectro de potências contendo as máscaras, e o resultado é que se obtém a micrografia original, subtraída dos ruídos repetitivos e sem prejuízo de sua qualidade.

Este exemplo é interessante também por mostrar a reversibilidade da transformada de Fourier, isto é, a aplicação sucessiva da ferramenta de FFT numa imagem (desde que não sejam aplicados filtros ou sejam feitas outras alterações, naturalmente) não afeta as informações nela contidas. Adicionalmente, a aplicação de um número par de vezes da ferramenta faz retornar à imagem original.

Figura 19: exemplo de utilização da ferramenta de FFT do ImageJ para correção de defeitos de micrografias. Imagem extraída do manual online do software.

Antes de começar discussões e considerações acerca da metodologia, é proveitoso explicitar certas definições. A primeira definição é a respeito de imagem digital, que será representada por $f(x,y)$, e corresponde a uma matriz de M linhas e N colunas. Cada elemento dessa matriz representa a unidade

elementar da imagem, o pixel. Cada pixel possui um valor, quase sempre um número inteiro, que é definido como nível de cinza do pixel, às vezes também chamado intensidade de pixel.

Por questões de ordem técnica no armazenamento e processamento das imagens digitais, os valores de nível de cinza variam tipicamente de 0 a 2^k , sendo k um inteiro. Por convenção, um nível de cinza nulo representa a cor preta, e o nível de cinza 2^k representa a cor branca, sendo os valores intermediários as diversas tonalidades de cinza.

No início do século XIX, o físico e matemático Joseph Fourier elaborou sua mais preciosa contribuição para as ciências: o conceito de que toda função contínua periódica pode ser decomposta numa série de somas de funções trigonométricas. As implicações de tal ideia, absolutamente revolucionária, foram enormes e impactam ainda hoje. O estudo de tal decomposição é hodiernamente chamado de Análise de Fourier, e a série de somas recebe o nome de série de Fourier, em homenagem ao eminente físico.

O operador matemático que realiza a decomposição da função original em sua nova representação como uma série de somas recebe o nome de transformada de Fourier (FT).

Quando a função original $f(x)$ é contínua, a definição formal da FT é:

$$F(u) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(x) e^{-i2\pi ux} dx$$

Uma importante propriedade dessa transformada é sua reversibilidade, isto é, a possibilidade de se obter $f(x)$ a partir de $F(u)$, pelo uso da transformada inversa:

$$f(x) = \int_{-\infty}^{+\infty} F(u) e^{i2\pi ux} du$$

Essas duas equações são referidas como o par de transformadas de Fourier. Sua importância vem principalmente da formalização de que nenhuma informação da função original $f(x)$ é perdida pela transformação (seja a transformação direta ou inversa).

Mas talvez a maior utilização prática da FT esteja na aplicação em funções discretas, que possuem um número finito de valores (M) – como é o caso das imagens digitais. Nestas situações, a transformada é designada Transformada Discreta de Fourier (DFT) e é definida como:

$$F(u) = \frac{1}{M} \sum_{x=0}^{M-1} f(x) e^{-i2\pi ux/M} \text{ para } u = 0, 1, 2, \dots, M-1$$

Analogamente, a transformada inversa é definida como:

$$f(x) = \sum_{u=0}^{M-1} F(u) e^{i2\pi ux/M} \text{ para } x = 0, 1, 2, \dots, M-1$$

Conforme definido anteriormente, contudo, uma imagem digital é representada por uma matriz bidimensional, de modo que seu par de transformadas é definido como:

$$F(u, v) = \frac{1}{MN} \sum_{x=0}^{M-1} \sum_{y=0}^{N-1} f(x, y) e^{-i2\pi(ux/M + vy/N)}$$

e

$$f(x, y) = \sum_{u=0}^{M-1} \sum_{v=0}^{N-1} F(u, v) e^{i2\pi(ux/M + vy/N)}$$

para $x = 0, 1, 2, \dots, M-1$ e $y = 0, 1, 2, \dots, N-1$

Assim, fica clara a equivalência em se trabalhar com os dados da função original ou com os dados de sua transformada. Além disso, é importante notar que tanto a imagem $f(x, y)$ como seu espectro $F(u, v)$ são funções discretas, e possuem a mesma quantidade de dados (pixels). Enquanto as variáveis x e y pertencem ao domínio espacial, mapeando as variações de intensidade de pixel com a variação espacial, as variáveis u e v pertencem ao domínio de frequências e estão associadas às frequência de variação de intensidade de pixel em função do ângulo tomado.

O cálculo da DFT pela definição, no entanto, é proibitivamente lento, por envolver grande quantidade de operações matemáticas, mesmo em aplicações em que a quantidade de dados é pequena. A possibilidade de uso computacional e construção de algoritmos que exploram simplificações da FT permitiram um enorme ganho de velocidade no cálculo da DFT e, conseqüentemente, sua ampla utilização. O uso de tais algoritmos computacionais dá origem ao termo FFT (de Fast Fourier Transform).

Eventualmente, pode-se querer utilizar um sistema de coordenadas polares para a FT, em cujo caso o uso da fórmula de Euler é de grande valia.

$$F(u, v) = |F(u, v)|e^{-i\omega(u,v)}$$

$$e^{i\theta} = \cos \theta + i \sin \theta$$

A grande vantagem é que desse sistema derivam naturalmente os conceitos de magnitude (ou espectro) e fase angular (ou fase do espectro), definidos respectivamente pelas fórmulas abaixo:

$$|F(u, v)| = [R^2(u, v) + I^2(u, v)]^{1/2}$$

$$\omega = \tan^{-1} \left[\frac{I(u, v)}{R(u, v)} \right]$$

Onde $R(u,v)$ e $I(u,v)$ denotam, respectivamente, as partes real e imaginária de $F(u,v)$.

Outro conceito muito utilizado, inclusive neste trabalho, é o do espectro de potências (EP), também chamado densidade espectral e definido como

$$P(u, v) = |F(u, v)|^2 = R^2(u, v) + I^2(u, v)$$

Uma imagem típica de um EP de uma micrografia de nanofibras poliméricas alinhadas é mostrada abaixo.

Figura 20: imagem típica de um espectro de potências de uma micrografia de nanofibras poliméricas alinhadas

A imagem talvez ajude a mostrar outra importante propriedade do EP: sua simetria com respeito a um plano de reflexão. Tal propriedade também pode ser facilmente demonstrada matematicamente [145].

A simetria do EP, juntamente com a reversibilidade e a retenção de informação da FT, discutidos anteriormente, são propriedades essenciais para a apreensão da abordagem proposta neste trabalho.

Com efeito, a obtenção do espectro da imagem é passo fundamental no processamento de imagens digitais. O processamento de imagens se dá pela aplicação de filtros, conforme esquematizado na Figura 21. Muito embora a aplicação de filtros também possa ser feita no domínio espacial, sem a necessidade de se extrair o espectro da imagem, seu uso é menos intuitivo e potencialmente mais trabalhoso do ponto de vista computacional. Daí a preferência em se trabalhar no domínio espectral. A relação entre ambos os domínios, bem como os efeitos da aplicação de filtros em um ou em outro, é descrita pelo teorema de convolução. [145-147]

Figura 21: etapas básicas no tratamento de imagens digitais com o auxílio de filtros. Imagem extraída da referência de Gonzalez [145].

Estritamente falando do uso do FFT em tratamento de imagens, o uso de filtros espectrais pode ter os mais diversos propósitos e efeitos, entre os quais: melhorias da imagem (contraste, resolução, nitidez, remoção de ruídos de imagens de satélite, etc), reconhecimento de caracteres em textos escaneados (OCR), reconhecimento de placas em imagens de radares, compressão de dados (imagens JPEG) [145-148].

Na Química, a FT torna possível técnicas analíticas tais como FTIR (espectroscopia de infravermelho), NMR (espectroscopia de ressonância nuclear magnética), EPR (ressonância paramagnética de elétron), ESR (ressonância de spin de elétron) e MS (espectrometria de massas).

Ao se aplicar a ferramenta de FFT às microscopias de malhas eletrofiadas, observou-se uma marcante relação (visual) entre a qualidade do alinhamento das fibras e a dispersão dos pixels claros no EP.

Realmente, apenas pela avaliação da fórmula de cálculo da DFT, não é possível fazer relações diretas entre componentes específicos da imagem e seu EP. Todavia, algumas generalizações podem ser tomadas, em especial a relação direta entre as frequências do domínio espectral e taxa de variação na intensidade de pixels no domínio espacial [145].

Além disso, quando se observa uma micrografia de fibras eletrofiadas, somos capazes de dizer a localização de cada fibra devido a suas bordas, isto é, identificamos as fibras como a região dentro das bordas, denotadas como as

interfaces em que há grande variação de claro/escuro nos níveis de cinza da imagem. Esse argumento é suportado pela referência 145.

Um argumento adicional pode ser lançado, quando se aprecia o efeito de um filtro tipo *notch* numa imagem: se for um filtro do tipo *highpass*, o contraste aumenta, se for um filtro do tipo *lowpass*, a saturação aumenta e os contornos se perdem.

Finalmente, a Figura 22 elucida ainda mais a argumentação. Nela observamos fibras bastante alinhadas. Um sistema de coordenadas cartesianas foi desenhado (em amarelo), indicando a direção de orientação preferencial das fibras: paralelamente ao segmento OB. Um segundo sistema de coordenadas cartesianas foi desenhado (em vermelho) para facilitar a visualização do ângulo de inclinação de OB com a vertical, isto é, o ângulo de inclinação da orientação das fibras em relação ao referencial da imagem. É interessante notar que esse ângulo é o mesmo, naturalmente, que o ângulo de OA com a horizontal. O segmento OA representa a direção em que se encontra mais bordas de fibras (a direção em que elas são encontradas com maior frequência).

O EP da micrografia é mostrado à direita da figura. É proveitoso notar que a ocorrência de pixels claros no EP segue a orientação de OA e que o ângulo que a região clara do EP faz com a horizontal é o mesmo ângulo mencionado anteriormente. No inserto, observa-se a intensidade dos pixels entre o ponto A e a origem O, na micrografia original. Neles, verifica-se uma variação periódica na intensidade dos pixels, isto é, verifica-se uma interferência claro/escuro, que é indicativo da ocorrência das bordas das fibras.

Figura 22: micrografia de uma malha eletrofiada contendo fibras bem alinhadas. Sistemas de coordenadas cartesianas foram desenhados para facilitar visualização de ângulos de orientação. No inserto, as intensidades dos pixels num segmento da micrografia. Ao lado o EP da micrografia original.

Método manual

Para cada malha a ser analisada, uma microscopia representativa foi selecionada e nela se aplicou a ferramenta de FFT do ImageJ, o que gerou um espectro de potências da microscopia. As intensidades dos pixels de tal espectro foram registradas ao longo de diversos segmentos de reta, como descrito na metodologia.

O cuidado em se utilizar sempre o mesmo comprimento para os segmentos de reta que mediram as intensidades dos pixels foi tomado para que fossem medidas as mesmas quantidades de pixels para todos os incrementos angulares e, dessa forma, nenhum ângulo ou direção tivesse um peso maior no somatório dos ângulos de orientação.

Ao se tomar a média das intensidades dos pixels pertencentes a uma raia do espectro de potências a um dado ângulo, adquire-se a contribuição média das fibras orientadas segundo esse ângulo.

Conforme mencionado anteriormente, o EP é simétrico. Dessa forma, basta que se analise uma de suas metades, isto é, que sejam somadas as intensidades dos pixels ao longo de retas perfazendo um semicírculo (180 graus) para que se tenha a distribuição das orientações das fibras em todas as direções. Em outras palavras, isso quer dizer que a metodologia não faz distinção para o sentido de orientação da fibra, mas sim para sua direção de orientação, ou seja, é equivalente referir-se a uma fibra orientada a 10° ou a 190° .

Assim, ao se tomar as médias de intensidade dos pixels ao longo de raias perfazendo um semicírculo, obtém-se a distribuição da orientação das fibras em todas as direções. Essa distribuição é mais bem apreendida na forma de um gráfico, como o da Figura 23, onde se observa a intensidade média dos pixels do espectro de potência em função do ângulo tomado.

Figura 23: gráfico da distribuição de orientação das fibras de uma malha eletrofiada.

Naturalmente, quanto menor for o incremento angular, mais segmentos de reta comporão o semicírculo do somatório, e mais sensível será o gráfico da distribuição de orientação das fibras. Todavia, o incremento de 10 graus foi adotado neste trabalho por já fornecer sensibilidade suficiente sem, no entanto, demandar muitas medições, que são feitas manualmente e tomam considerável tempo.

A inspeção do gráfico de distribuição de orientação das fibras permite avaliar objetivamente a qualidade e extensão do alinhamento das fibras

presentes na malha analisada. Além disso, a inspeção desse gráfico facilita a comparação da qualidade do alinhamento de fibras de malhas diferentes.

Quanto mais uniformemente alinhadas estiverem as fibras, menor será a dispersão nas direções do alinhamento, o que, por sua vez, reflete-se numa menor dispersão dos pixels claros no espectro de potência da microscopia e num perfil mais esguio no gráfico de distribuição de orientações. Assim, uma qualidade maior no alinhamento das fibras se traduz numa área menor sob a curva de distribuição de orientação.

A Figura 24 demonstra a racionalização do parágrafo anterior. Nela, se observam as microscopias de duas malhas eletrofiadas, contendo graus de alinhamento bem diferentes. Os espectros de potência obtidos de tais microscopias são mostrados logo abaixo e apresentam perfis bastante distintos entre si. Finalmente, o gráfico de distribuição de orientação das fibras das duas malhas é apresentado mais abaixo, e também nele se observam duas curvas distintas e condizentes com os graus de alinhamento das fibras. A curva superior (ligando quadrados) representa a distribuição das intensidades médias de pixels da malha com fibras menos orientadas. Nesta malha, as fibras adotam orientações diversas e o espectro de potência de sua microscopia mostra pixels claros ao longo de diversas orientações angulares. Já a curva inferior (ligando losangos) representa a distribuição das intensidades médias de pixels da malha com fibras mais alinhadas. Nesta curva, percebe-se que o pico de intensidade média é mais sinuoso e mais bem definido. Na microscopia da malha, as fibras adotam poucas orientações, estando em sua grande maioria praticamente paralelas entre si. Seu espectro de potência, por sua vez, apresenta pixels claros concentrados numa pequena distribuição de orientações angulares.

Figura 24: comparação entre as microscopias e respectivos espectros de potência de duas malhas eletrofiadas. Abaixo o gráfico da distribuição de orientação das fibras

Um importante resultado no estudo do potencial e performance das nanofibras alinhadas foi feito por Corey e colaboradores [24]. Esse trabalho foi pioneiro no uso de células neurais de origem primária, isto é, células originárias de um explante, em oposição ao uso de células imortalizadas (como foi feito, por exemplo, por Yang e colaboradores [129] com as células c17.2). As células usadas nesse estudo foram extraídas diretamente do gânglio da raiz dorsal (DRG, no inglês) de embriões de rato.

Além disso, foram selecionados 3 qualidades distintas de alinhamento para o substrato do meio de cultura dos explantes: um substrato possuía fibras muito alinhadas, outro possuía fibras apenas um pouco alinhadas e um terceiro

possuía as fibras sem qualquer alinhamento. Tais substratos foram eletrofiados a partir de soluções de PLLA em clorofórmio, num aparato similar ao utilizado no trabalho desta dissertação.

Como resultado, foi verificado que, de fato, os neuritos emanando a partir do centro do gânglio continuavam a crescer seguindo as fibras alinhadas, tão logo as encontravam no caminho. Foi constatado, ainda, que houve uma significativa melhora na taxa de crescimento desses neuritos nos substratos de maior alinhamento, conforme os neuritos observados nestes substratos possuíam um maior comprimento, ainda que os tempos de cultura fossem iguais.

Tais resultados estão em acordo com os encontrados no trabalho de Xie e colaboradores [124]. Neste trabalho, os pesquisadores utilizaram células tronco embrionárias em meio de diferenciação para linhagem neural na presença de suportes celulares poliméricos contendo nanofibras alinhadas e não alinhadas. As células crescidas sobre os suportes de fibras alinhadas tinham neuritos mais longos e alinhados, seguindo a orientação das fibras. A diferenciação em astrócitos também foi mais pronunciada nas células crescidas sobre esses suportes.

Assim, conclui-se que substratos contendo contatos físicos alinhados, na forma de nanofibras, constituem alternativas interessantes quando se busca o desenvolvimento de neurônios periféricos, fornecendo tanto uma direção e um caminho de crescimento, como acelerando tal crescimento.

Todavia, devido à variação de parâmetros na aquisição das imagens, tais como foco, contraste, brilho e definição, os valores absolutos das intensidades dos pixels do espectro de potência não constituem bons elementos de comparação entre diferentes microscopias, especialmente se estas tiverem sido obtidas em ocasiões e condições diferentes. Antes, é melhor que se utilize a área compreendida entre a linha base e a curva do gráfico em questão.

Uma imagem esquemática de uma curva de distribuição de orientações indicando a área computada para o cálculo da área é mostrada na Figura 25. Na figura são indicados ainda os limites superior e inferior das intensidades

médias dos pixels. Esses valores são utilizados como parâmetros do fator de normalização.

Para se chegar ao número final, que quantifica o grau de alinhamento e permite uma comparação quantitativa e direta entre os alinhamentos das fibras de diferentes malhas, calcula-se a área sob a curva do gráfico de distribuição de orientações e divide-se pelo fator de normalização, cujo valor é a área compreendida entre os limites superior e inferior das intensidades médias dos pixels. Quanto menor for esse número, maior é o grau de alinhamento das fibras.

Assim, o cálculo do grau de alinhamento pode ser resumido na equação apresentada abaixo:

$$\text{Índice de alinhamento} = \text{área efetiva} / \text{fator_normalização}$$

Onde a área efetiva é a área hachurada em verde na Figura 25, e o fator de normalização equivale à área compreendida entre os limites superior e inferior das intensidades médias dos pixels, também mostrados na figura.

Figura 25: representação esquemática mostrando a área sob a curva do gráfico de distribuição de orientação utilizada para o cálculo do índice de alinhamento das fibras, bem como os limites superior e inferior das intensidades médias dos pixels.

A utilização do fator de normalização foi adotada para que o número final tivesse uma dimensão menor e facilitasse a comparação com valores obtidos de outras malhas. Além disso, o fator de normalização é um parâmetro intrínseco da distribuição de orientação e não um valor fixo arbitrário.

4.2.1.2. Aplicação da metodologia de quantificação de alinhamento às malhas de PCL obtidas

A metodologia proposta e discutida na seção anterior foi aplicada às malhas eletrofiadas obtidas de PCL. As condições de eletrofiação foram mostradas na Tabela 1 e as microscopias obtidas apresentadas na Figura 15.

Os espectros de potência dessas microscopias, obtidos pelo software ImageJ, são mostrados na Figura 26 abaixo. Nela é possível identificar que, de fato, as microscopias contendo fibras mais alinhadas produzem espectros de potência contendo uma menor dispersão dos pixels claros, conforme discutido previamente.

Figura 26: Espectros de potência das microscopias da Figura 15. (A) Malha_01, (B) Malha_02, (C) Malha_03, (D) Malha_04, (E) Malha_05, (F) Malha_06, (G) Malha_07, (H) Malha_08, (J) Malha_09

Após a medição das intensidades dos pixels do espectro de potências da maneira proposta neste trabalho, obtêm-se os gráficos de distribuição de orientação apresentados nas Figura 27, Figura 28 e Figura 29. Inspecionando esses gráficos juntamente com as microscopias que lhe geraram, também fica evidenciada a relação entre a dispersão dos pixels no espectro de potências e a qualidade do alinhamento das fibras das respectivas microscopias.

Figura 27: gráfico de distribuição de orientações, obtido dos espectros de potência da Figura 26 (A, B e J)

Figura 28: gráfico de distribuição de orientações, obtido dos espectros de potência da Figura 26 (E, G e H)

Figura 29: gráfico de distribuição de orientações, obtido dos espectros de potência da Figura 26 (C, D e F)

Finalmente, o cálculo do índice de alinhamento das fibras das malhas produzidas foi feito, resultando nos valores apresentados na Tabela 5 abaixo.

Tabela 5: valores para índices de alinhamento obtidos para malhas de PCL

Amostra	Índice
Malha_04	18,4
Malha_03	18,8
Malha_06	22,2
Malha_08	27,4
Malha_07	28,9
Malha_05	31,0
Malha_02	35,5
Malha_09	40,9
Malha_01	41,4

Observando a Tabela 5, nota-se que a ordem de valores obtidos foi compatível com a escala na qualidade visual de alinhamento das malhas. Nota-se que as malhas contendo fibras mais alinhadas apresentam valores menores de índice de alinhamento.

Assim, fica demonstrada a aplicabilidade da metodologia proposta na ordenação objetiva da qualidade do alinhamento das fibras constituintes das malhas eletrofiadas produzidas.

Essa é uma avaliação inédita na literatura, onde a qualidade do alinhamento das fibras é ordenada apenas de maneira subjetiva e visual.

Trabalhos futuros podem usar essa metodologia, ou um aprimoramento dela, para graduar e quantificar, objetivamente, o alinhamento das fibras de materiais para suporte de crescimento de células que se beneficiam da anisotropia do meio.

Nas microscopias obtidas dos experimentos de variação da velocidade de rotação do rotor na eletrofiação do PCL também foi aplicada a metodologia proposta. As microscopias foram apresentadas na Figura 16, ao passo que os seus respectivos espectros de potência são mostradas na Figura 30, abaixo.

Figura 30: Espectros de potência das microscopias da Figura 16. (A) Malha_06, (B) Malha_12, (C) Malha_10 e (D) Malha_11.

Figura 31: distribuição de orientação de malhas de PCL, obtidos dos espectros de potência da Figura 30

Tabela 6: valores para índices de alinhamento obtidos para malhas de PCL

Id	Índice	Fluxo [mL/h]	Velocidade [m/s]
Malha_06	12,6	1	10,2
Malha_12	22,2	4	10,2
Malha_10	24,7	1	8,3
Malha_11	32,6	4	5,5

A Figura 31 mostra as distribuições de orientação das fibras da Figura 16, obtidos pelo tratamento dos espectros de potência acima. A Tabela 6 mostra os índices de quantificação do alinhamento para tais malhas, bem como os dados de fluxo de injeção e velocidade de captação (já mostrados anteriormente). Os menores valores de índice correspondem aos espectros de potência obtidos das microscopias das malhas de fibras mais orientadas, em acordo com os resultados obtidos para os índices de quantificação para as outras malhas de PCL. Além disso, com a quantificação da qualidade de alinhamento das fibras fica facilitada a comparação e avaliação dos efeitos da variação dos parâmetros de eletrofiação nessa qualidade de alinhamento.

4.2.1.3. Aplicação da metodologia de quantificação de alinhamento às malhas de PLLA obtidas

As microscopias de malhas eletrofiadas de PLLA mostradas na Figura 17 produzem, ao se utilizar a ferramenta de FFT do ImageJ, os espectros de potência apresentados na Figura 32 abaixo.

Figura 32: Espectros de potência das microscopias da Figura 17. (A) Malha_13, (B) Malha_14, (C) Malha_15 e (D) Malha_16

Utilizando a metodologia descrita no trabalho, é possível medir as intensidades de pixels do espectro de potência e obter os gráficos de distribuição de orientação das fibras. Os gráficos são mostrados na Figura 33 abaixo.

Figura 33: gráfico de distribuição de orientações de fibras de PLLA, obtidos dos espectros de potência da Figura 32

Tabela 7: valores para índices de alinhamento obtidos para malhas de PLLA

Amostra	Índice
Malha_13	15,0
Malha_14	11,2
Malha_15	25,5
Malha_16	17,3

Finalmente, o índice de quantificação de alinhamento é calculado como descrito e discutido, gerando os valores encontrados na Tabela 7, acima. É interessante comparar os valores dos índices com os gráficos e as microscopias, de modo a se verificar a correlação entre dispersão de fibras na microscopia, dispersão de pixels claros no espectro de potências e o perfil da curva no gráfico de distribuição de orientação. Novamente, as microscopias das malhas contendo fibras mais alinhadas produzem espectros de potência de menor dispersão de pixels claros e gráficos de distribuição de orientação de perfil menos largo.

O ordenamento dos valores de índice de alinhamento está de acordo com um ordenamento visual da qualidade de alinhamento das fibras das microscopias, muito embora, neste conjunto de malhas, tal ordenação subjetiva seja mais discutível que a ordenação das malhas de PCL, posto que a variação dessa qualidade de alinhamento das fibras é menor aqui.

Analogamente, também se observa que a diferença numérica entre os valores de índice de alinhamento obtidos para este conjunto de malhas é menor que para o conjunto de malhas de PCL, refletindo a menor variação da qualidade do alinhamento mencionada. Disto sobressai uma vantagem da aplicação da metodologia desenvolvida: a quantificação da qualidade de alinhamento fornece maior fundamento e mais segurança para sua avaliação.

Da mesma forma, a metodologia de quantificação da qualidade de alinhamento das fibras foi aplicada aos experimentos de variação de velocidade de captação das fibras de PLLA. As microscopias das malhas foram mostradas na Figura 18, ao passo que seus respectivos espectros de potência são mostrados na Figura 34 abaixo.

Figura 34: Espectros de potência obtidos das microscopias da Figura 18. (A) Malha_14, (B) Malha_17 e (C) Malha_18.

Pelo tratamento descrito, chega-se aos gráficos de distribuição de orientação, mostrados na Figura 35, e aos índices de alinhamento mostrados na Tabela 8.

Figura 35: gráfico de distribuição de orientação de fibras de PLLA, obtidos dos espectros de potência da Figura 34.

Tabela 8: valores para índices de alinhamento obtidos para malhas de PLLA

Amostra	Índice	Velocidade [m/s]
Malha_14	11,2	10,2
Malha_17	22,9	8,3
Malha_18	33,6	5,5

Neste conjunto de experimentos, apenas a velocidade de captação das fibras foi variada, e nele se observa um efeito mais dramático na qualidade do alinhamento causado por essa variação.

Tal observação, qual seja a de um forte impacto da velocidade de captação das fibras na qualidade de seu alinhamento, segue em acordo com o observado para os demais conjuntos de experimentos de eletrofiação e com o reportado na literatura [51, 73]. Ademais, a metodologia de quantificação do alinhamento permanece capaz de fornecer valores de índices de alinhamento em concordância com uma ordenação visual.

4.2.1.4. Criação e avaliação de desempenho de algoritmo computacional de quantificação

Uma vez tendo-se avaliado o uso da ferramenta de FFT para quantificar a qualidade do alinhamento das fibras eletrofiadas, buscou-se empregar tecnologia para automatizar o processo. Dessa forma, foi escrito um script em Java para a medição dos valores de pixels do espectro de potências, como descrito na metodologia proposta neste trabalho. O código do algoritmo recebe como entrada uma imagem a ser processada (a micrografia da malha eletrofiada) e um valor de incremento angular, que é o deslocamento angular da reta de medição de intensidade de pixel em cada iteração do processo. Na metodologia manual, o incremento angular foi fixado em 10° , mas durante a utilização do algoritmo, foi utilizado também, para efeito de comparação, o incremento angular de 3° . Com o script escrito, é possível incorporar seu código no ImageJ como um plugin, que pode ser facilmente distribuído para a comunidade de usuários do programa.

O plugin desenvolvido apresenta os dados na forma de uma tabela e de um gráfico, além de fornecer o valor de índice de alinhamento, calculado como descrito na metodologia. A fim de se verificar que as duas abordagens, de tratamento manual (descrita na seção anterior) e utilizando o plugin escrito, produzem valores estatisticamente equivalentes para o índice de alinhamento, o conjunto de micrografias submetido ao tratamento manual foi submetido também ao tratamento com plugin, com incrementos angulares de 10° e 3° . Os valores obtidos são mostrados abaixo.

Deve ser ressaltado aqui que o plugin aplica a ferramenta de FFT do ImageJ na imagem tal como ela está, sem que a mesma seja rotacionada até que as fibras fiquem preferencialmente paralelas à horizontal, como é feito no procedimento manual. Tal expediente, no método manual, foi adotado meramente para que se padronizassem os gráficos de distribuição de orientação e ficasse facilitada sua comparação visual. Assim, neste estudo comparativo as micrografias foram rotacionadas manualmente, após o que elas foram avaliadas manualmente e via plugin, de maneira sequencial, de tal sorte que a mesma imagem foi avaliada pelas duas abordagens. As identificações

das imagens e os valores de índice obtidos pelos métodos são mostrados abaixo.

Tabela 9 – valores de índice de alinhamento de fibras para micrografias rotacionadas, obtidos por tratamento manual e por plugin, a incrementos de 10 e 3°

	manual	10°	3°
malha_03	18,8	19,9	19,4
malha_04	18,4	16,3	15,0
malha_05	31,0	30,7	30,7
malha_06	22,2	21,4	21,1
malha_07	28,9	25,6	31,3
malha_08	27,4	27,9	28,9
malha_09	40,9	40,0	42,9

Para se avaliar estatisticamente a equivalência dos valores, foi realizada uma análise de variância (Anova) entre os três tratamentos. O nível de significância adotado foi de 5% Os valores obtidos são mostrados abaixo.

Tabela 10 – Anova dos valores de índice de alinhamento obtidos pelo tratamento manual e pelo uso do plugin com incremento angular de 10° e 3°

<i>Varição</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	4,29	2	2,14	0,030	0,970	3,555
Dentro dos grupos	1.275,23	18	70,85			
Total	1.279,52	20				

Como pode ser observado, as duas abordagens são significativamente equivalentes, uma vez que os valores de F calculados ficam bem abaixo do valor crítico de F (tabelado). Assim, pode-se utilizar o plugin em detrimento do procedimento manual, mais trabalhoso e demorado. O uso da estatística do teste t pareado também foi realizado para testar a equivalência dos tratamentos. Os resultados, não mostrados, corroboram com a Anova e reforçam a equivalência entre os tratamentos do plugin em ambos os incrementos angulares. O nível de significância em todos os casos foi de 5%.

4.2.1.5. Utilização do plugin para avaliação de representatividade estatística do método de quantificação

A fim de se testar de maneira mais abrangente a aplicação do método de quantificação, foi criado um novo conjunto de micrografias de malhas eletrofiadas. Tal conjunto foi criado com base no conhecimento adquirido durante o trabalho, sobre as condições de fiação capazes de favorecer o alinhamento das fibras. Assim, foram obtidas 3 malhas eletrofiadas de PCL com crescente qualidade de alinhamento de fibras: alin00, alin02 e alin03. As micrografias dessas malhas foram obtidas como descrito na seção experimental.

Os valores de índice de alinhamento das fibras constituintes das malhas eletrofiadas, obtidos pelo plugin escrito, são apresentados nas tabelas abaixo. Neste estudo, buscou-se entender como a metodologia de quantificação do alinhamento de fibras é afetada (i) pela magnificação utilizada no microscópio e (ii) pela escolha do ponto de focalização na malha. Assim, é interessante analisar os dados com dois enfoques, a saber: agrupados por ponto de focalização (spot) e agrupados por magnificação aplicada (mag).

Mesmo uma malha de fibras pouco alinhadas terá um conjunto de fibras paralelas entre si, ainda que apenas numa pequena região. A focalização do microscópio exclusivamente nessas fibras paralelas induz a se pensar que todas as fibras da malha seguem tal padrão de alinhamento, o que pode não ser o caso.

Também por causa disso, foi realizada a aquisição das micrografias em diferentes pontos e magnificações. Intuitivamente, então, desejar-se-ia utilizar micrografias com a menor magnificação possível. A análise dos dados, porém, mostra que nem sempre essa é a magnificação de menor dispersão dos valores, avaliada pelo desvio-padrão.

Tabela 11 – valores de índice de alinhamento de fibras para as micrografias obtidas das malhas eletrofiadas alin00, alin02 e alin03

alin00	x250	x500	x1k	x2k	x4k
A	29,4	23,9	24,6	22,7	26,6
B	24,4	20,0	35,8	42,8	46,4
C	47,7	46,6	34,6	21,7	10,1
D	44,0	57,8	41,7	21,1	25,4
E	37,5	37,2	30,7	40,1	29,0
F	39,4	41,2	25,4	29,9	21,0
G	59,1	50,3	19,5	42,7	17,2
H	45,3	57,0	35,7	27,9	34,0
I	30,6	12,0	40,7	21,7	15,0
J	26,0	41,8	38,2	11,2	37,4

alin03	x250	x500	x1k	x2k	x4k
A	29,1	26,4	21,7	24,8	23,2
B	32,9	26,6	26,2	25,0	28,9
C	30,0	30,3	31,1	29,7	31,8
D	27,0	31,4	25,6	28,6	30,7
E	29,4	28,0	15,4	26,6	16,4
F	31,7	30,8	29,6	24,2	20,3
G	32,8	34,5	26,9	25,9	35,4
H	30,9	30,5	29,3	30,7	32,8
I	26,2	23,3	22,3	18,5	16,1
J	25,4	24,5	22,7	18,5	12,2

alin02	x250	x500	x1k	x2k	x4k
A	31,1	25,6	23,6	24,9	26,3
B	24,5	23,0	21,7	22,9	30,3
C	28,7	23,1	28,5	20,8	29,0
D	36,5	32,6	32,2	32,2	22,8
E	36,5	34,2	30,9	25,8	25,3
F	35,5	34,1	35,9	27,8	24,9
G	37,1	33,9	35,1	29,4	23,3
H	31,4	36,0	34,7	34,8	28,5

Na malha alin00, que contém as fibras com menor qualidade de alinhamento, observa-se que o agrupamento dos índices por spot revela o comportamento geral de o índice diminuir com o aumento da magnificação, exceto pela série focalizada no ponto B. Isso pode ser verificado através da inspeção da Tabela 12 e/ou do gráfico das médias agrupadas por

magnificação, mostrada na Figura 37. Tal comportamento é mantido nas outras malhas, também com exceções pontuais, mas menos pronunciadas. Isso pode ser explicado quando se percebe que o aumento de magnificação enquadra menos fibras, ao ponto de a maior magnificação (x4000) focalizar apenas algumas fibras.

Dependendo de como essas poucas fibras estão enquadradas na micrografia, pode-se focalizar um conjunto de fibras paralelas (o que gera um valor de índice menor) ou um ponto de divergência de fibras, em que elas se cruzam ou se torcem (o que gera um valor de índice maior). Dessa forma, uma magnificação muito grande pode mascarar a verdadeira distribuição de orientação das fibras no contínuo da malha. De fato, o incremento na magnificação do ponto B da malha alin00 vai enfatizando o entrelaçamento das fibras, ao passo que seu decremento “dilui” esse emaranhamento.

Nas micrografias dos outros spots da malha alin00, de maneira geral, observa-se que à medida que a magnificação aumenta, vão sendo enquadrados menos entrelaçamentos ao mesmo tempo em que fibras isoladas vão sendo focalizadas. Isso acaba por gerar valores de índice menores. Esse efeito é mais marcante no ponto C. Já o ponto A, gera praticamente o mesmo valor de índice em todas as magnificações. Isso pode ser melhor entendido quando se percebe que a proporção de entrelaçamentos se mantém razoavelmente constante em todas as micrografias do ponto A, sendo que a magnificação não favorece o enquadramento de nenhuma fibra em particular.

As três séries de micrografias mencionadas são mostradas na Figura 36 abaixo. Na mesma figura, mais abaixo, é mostrado um gráfico contendo os valores de índice de alinhamento das fibras dessas micrografias, onde as tendências discutidas podem ser verificadas com maior facilidade.

Figura 36: gráfico de valores de índice de alinhamento das micrografias da malha alin00, obtidas nos pontos A, B e C. As micrografias são mostradas acima.

Todas essas constatações podem ser apreendidas por uma análise da variância (Anova). A Tabela 12 abaixo mostra os valores de média e desvio-padrão dos valores de índice das micrografias da malha alin00. Esses dados são mostrados nos dois gráficos seguintes, na Figura 37. Observando esses gráficos, vemos que o ponto A é o que apresenta menor desvio-padrão, seguido de E. Já os pontos G e C são os de maior desvio-padrão. Como a variância é o quadrado do desvio-padrão, é equivalente usar qualquer dessas medidas para avaliar a dispersão dos dados ao redor da média. Quando se observa os dados agrupados por magnificação aplicada, vemos que a ampliação de mil vezes é a que resulta em menor variância. Além disso, as

variâncias das médias de valores de índice de alinhamento, agrupados por spot e por mag, são semelhantes.

Tabela 12 – valores de índice de alinhamento das fibras da malha alin00, com médias e desvios-padrão

alin00	x250	x500	x1k	x2k	x4k	Médias (spot)	D.P. (spot)
A	29,4	23,9	24,6	22,7	26,6	25,4	2,6
B	24,4	20,0	35,8	42,8	46,4	33,9	11,4
C	47,7	46,6	34,6	21,7	10,1	32,1	16,2
D	44,0	57,8	41,7	21,1	25,4	38,0	14,9
E	37,5	37,2	30,7	40,1	29,0	34,9	4,8
F	39,4	41,2	25,4	29,9	21,0	31,4	8,8
G	59,1	50,3	19,5	42,7	17,2	37,7	18,6
H	45,3	57,0	35,7	27,9	34,0	39,9	11,4
I	30,6	12,0	40,7	21,7	15,0	24,0	11,8
J	26,0	41,8	38,2	11,2	37,4	30,9	12,5
Médias	38,3	38,8	32,7	28,2	26,2	32,8	± 5,7
D.P.	11,0	15,6	7,4	10,7	11,0	± 5,2

Figura 37: valores das médias dos valores de índice de alinhamento para micrografias da malha alin00. Barras indicam o desvio-padrão. À esquerda, médias dos diferentes spots e à direita médias das diferentes magnificações.

Continuando com a Anova, que foi feita com um nível de significância de 5%, chega-se ao valor de F, que deve ser comparado a um valor tabelado, cujo valor depende dos graus de liberdade adotados na análise. Se o valor calculado de F for menor que o valor tabelado de F, a hipótese de que as médias do fator analisado são equivalentes entre si é mantida. Os fatores magnificação e localização (spot) foram avaliados separadamente, gerando os pares de valores de F mostrados nas tabelas abaixo. Como pode ser

observado, os valores calculados são menores que os tabelados, de modo que nenhum dos fatores afeta significativamente a média do grupo. Em outras palavras, os valores de índice obtidos pela metodologia são equivalentes independentemente de magnificação ou de ponto de focalização.

Tabela 13 – Anova dos valores de índice de alinhamento da malha alin00, fator ponto de focalização (spot)

<i>Varição</i>	<i>SQ</i>	<i>GL</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1.229,0	9	136,6	0,914	0,523	2,124
Dentro dos grupos	5.976,1	40	149,4			
Total	7.205,1	49				

Tabela 14 – Anova dos valores de índice de alinhamento da malha alin00, fator magnificação

<i>Varição</i>	<i>SQ</i>	<i>GL</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1.310,3	4	327,6	2,501	0,056	2,579
Dentro dos grupos	5.894,8	45	131,0			
Total	7.205,1	49				

Analisando os dados dos valores de índice de alinhamento obtidos a partir das micrografias da malha alin03, podemos identificar algumas similaridades em relação à malha alin00.

Por exemplo, alguns spots resultam em decréscimo do índice conforme se aumenta a magnificação, como o ponto F ou J; ao passo que outros apresentam relação inversa, e bem menos pronunciada, como os pontos C e G. Essas observações podem ser verificadas na Figura 38.

Além disso, alguns spots apresentam praticamente o mesmo valor de índice em todas as magnificações, enquanto que outros variaram grandemente. Embora isso também aconteça na malha alin00, tal observação é mais frequente nesta malha. Por causa disso, o desvio-padrão da média dos spots é bem superior ao da média das magnificações.

Ao se analisar os valores de índice de alinhamento das micrografias da malha alin03 agrupados por magnificação, nota-se, novamente, a tendência de diminuição do valor do índice com o aumento da magnificação. Essa tendência, contudo, é bem menos acentuada que para a malha alin00, uma vez que nas três maiores magnificações, os valores médios de índice são praticamente iguais. Relativo a esta variável, observa-se também que a maior magnificação produz maior variância, ao passo que a menor magnificação produz a menor variância. Isso pode ser acompanhado pela inspeção da Figura 39 e da Tabela 15.

Uma racionalização para o comportamento desses dois fatores, mag e spot, segue a discutida anteriormente, isto é, o aumento da magnificação enquadra menos fibras, o que aumenta o impacto de qualquer defeito ou entrelaçamento enquadrado no valor do índice de alinhamento. Como as fibras da malha alin03 são mais bem alinhadas que as da malha alin00, suas fibras constituintes se distribuem mais homogeneamente no contínuo da malha. Como consequência disso, suas variâncias (tanto de spot como de mag) são menores.

Figura 38: gráfico de valores de índice de alinhamento das micrografias da malha alin03, obtidas nos pontos F e G. As micrografias são mostradas acima.

Tabela 15 – valores de índice de alinhamento das fibras da malha alin03, com médias e desvios-padrão

alin03	x250	x500	x1k	x2k	x4k	Médias (spot)	D.P. (spot)
A	29,1	26,4	21,7	24,8	23,2	25,0	2,8
B	32,9	26,6	26,2	25,0	28,9	27,9	3,1
C	30,0	30,3	31,1	29,7	31,8	30,6	0,9
D	27,0	31,4	25,6	28,6	30,7	28,7	2,4
E	29,4	28,0	15,4	26,6	16,4	23,1	6,7
F	31,7	30,8	29,6	24,2	20,3	27,3	4,9
G	32,8	34,5	26,9	25,9	35,4	31,1	4,4
H	30,9	30,5	29,3	30,7	32,8	30,8	1,2
I	26,2	23,3	22,3	18,5	16,1	21,3	4,0
J	25,4	24,5	22,7	18,5	12,2	20,7	5,4
Médias	29,5	28,6	25,1	25,2	24,8	26,7	± 2,2
D.P.	2,6	3,5	4,7	4,2	8,2		± 3,9

Figura 39: valores das médias dos valores de índice de alinhamento para micrografias da malha alin03. Barras indicam o desvio-padrão. À esquerda, médias dos diferentes spots e à direita médias das diferentes magnificações.

A Anova para o conjunto de dados da malha alin03 apresenta os valores de F para os fatores spot e mag apresentados nas tabelas abaixo. O nível de significância é de 5%.

Tabela 16 – Anova dos valores de índice de alinhamento da malha alin03, fator ponto de focalização (spot)

<i>Variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	690,4	9	76,7	4,803	0,000	2,124
Dentro dos grupos	638,9	40	16,0			
Total	1.329,3	49				

Tabela 17 – Anova dos valores de índice de alinhamento da malha alin03, fator magnificação

<i>Variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	202,2	4	50,5	2,018	0,108	2,579
Dentro dos grupos	1.127,1	45	25,0			
Total	1.329,3	49				

O que se conclui dos resultados da Anova é que o fator magnificação continua não sendo significativamente impactante nos valores de índice de alinhamento de fibras obtidos, mas, diferentemente do que acontece com a malha alin00, o ponto de focalização gera valores de índice significativamente diferentes.

De posse desses resultados, pode-se dizer que a magnificação da micrografia não deve ser um fator de preocupação durante a aquisição das micrografias. O mesmo não pode ser dito da escolha do ponto de focalização, provavelmente pelo fato de a malha conter fibras bem mais alinhadas que a malha anterior, de tal sorte que pequenos defeitos, sob a forma de emaranhamentos e/ou entrelaçamentos locais, impactam significativamente na análise quando focalizados enfaticamente.

Os valores de índice obtidos para as micrografias da malha alin02 apresentam a menor variância em relação ao ponto de focalização dentre as três malhas.

Tabela 18 – valores de índice de alinhamento das fibras da malha alin02, com médias e desvios-padrão

alin02	x250	x500	x1k	x2k	x4k	Médias (spot)	D.P. (spot)
A	31,1	25,6	23,6	24,9	26,3	26,3	2,9
B	24,5	23,0	21,7	22,9	30,3	24,5	3,4
C	28,7	23,1	28,5	20,8	29,0	26,0	3,8
D	36,5	32,6	32,2	32,2	22,8	31,2	5,0
E	36,5	34,2	30,9	25,8	25,3	30,5	5,0
F	35,5	34,1	35,9	27,8	24,9	31,6	5,0
G	37,1	33,9	35,1	29,4	23,3	31,7	5,5
H	31,4	36,0	34,7	34,8	28,5	33,1	3,1

Médias	32,6	30,3	30,3	27,3	26,3	29,4	$\pm 2,6$
D.P.	4,5	5,4	5,3	4,7	2,7		$\pm 3,2$

Figura 40: valores das médias dos valores de índice de alinhamento para micrografias da malha alin02. Barras indicam o desvio-padrão. À esquerda, médias dos diferentes spots e à direita médias das diferentes magnificações.

A variância entre as diferentes magnificações é, para este conjunto de dados, um pouco maior do que a do conjunto da malha alin03, de modo que as variâncias das médias agrupadas por magnificação e por ponto de focalização são mais próximas uma da outra. Também se observa um decréscimo no valor

do índice de alinhamento com o aumento da magnificação, sendo que a magnificação de 4000 vezes é a de menor variância.

Os resultados da Anova, realizados com um nível de significância de 5%, seguem abaixo e tem a mesma interpretação da análise feita para a malha alin03.

Tabela 19 – Anova dos valores de índice de alinhamento da malha alin00, fator ponto de focalização (spots)

<i>Variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	366,6	7	52,4	2,817	0,021	2,313
Dentro dos grupos	595,0	32	18,6			
Total	961,6	39				

Tabela 20– Anova dos valores de índice de alinhamento da malha alin00, fator magnificação

<i>Variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	208,7	4	52,2	2,426	0,066	2,641
Dentro dos grupos	752,9	35	21,5			
Total	961,6	39				

Dessa maneira, o que se conclui do conjunto de dados para as três malhas do experimento estatístico é que, em todos os casos, o aumento da magnificação leva a menores valores de índice de alinhamento. Isso pode ser explicado pelo aumento do peso de influencia de cada fibra, já que menos fibras são enquadradas em maiores magnificações. Todavia, o nível de magnificação da micrografia não produziu médias significativamente diferentes, em nenhuma das malhas analisadas. Dessa forma, o uso de qualquer das magnificações analisadas gera valores de índice de alinhamento de fibras estatisticamente semelhantes. Não obstante, a magnificação de menor variância foi diferente para cada conjunto de dados.

O ponto de focalização não foi um fator significativo na malha alin00, de fibras menos alinhadas, mas o foi para as outras duas malhas.

Vale destacar que nas publicações típicas do campo, raramente, se alguma vez, uma estatística sobre a representatividade da imagem amostral é feita, de modo que a qualidade do alinhamento é feita baseada em uma única imagem, inspecionada visualmente. Neste trabalho, propõe-se que seja utilizada uma técnica objetiva, qual seja o uso da ferramenta de FFT; e que seja feito o tratamento em um grupo amostral contendo mais de uma imagem.

Esse estudo fornece evidências de que a preocupação com a magnificação do microscópio não é estatisticamente relevante para os valores de índice de alinhamento de fibras, calculados pela metodologia proposta. A escolha do ponto de focalização do microscópio, isto é, a escolha da imagem tida como representativa da distribuição das fibras na malha eletrofiada, contudo, é estatisticamente relevante. Isso fortalece a importância do cuidado em se obter uma amostra de mais de uma imagem na avaliação da qualidade do alinhamento das fibras eletrofiadas.

4.2.2. Determinação do diâmetro das fibras

A caracterização dos diâmetros das fibras é de grande importância pois este parâmetro influencia significativamente o tipo de interação das células com o suporte celular.

Christopherson e colaboradores, por exemplo, estudaram o efeito desse parâmetro tanto na proliferação como na diferenciação de células neurais progenitoras derivadas de hipocampo de ratos (rNSC) [21]. Neste trabalho, fibras de poli(éter sulfona) foram obtidas por eletrofiação em três diâmetros distintos e observou-se o efeito dessa variação de diâmetro na cultura das células rNSC. Como conclusão, verificou-se que conforme o diâmetro das fibras aumentava, a proliferação das células no meio de cultura diminuía. Por outro lado, quando cultivadas em fibras de menor diâmetro, as células diferenciavam em oligodendrócitos, assumindo formatos gliais, e apenas nas fibras mais grossas as rNSC diferenciavam em linhagens neurais e adotavam formato mais alongado, especialmente nas fibras de diâmetro intermediário (749 ± 153 nm). Todavia, este trabalho não utilizou fibras alinhadas, de modo

que o efeito sinérgico do alinhamento e diâmetro das fibras não pode ser estudado.

Num trabalho similar, Wang e colaboradores estudaram o efeito do diâmetro das fibras de PLLA em materiais alinhados [118]. Neste trabalho, verificou-se que fibras de diâmetro muito pequeno (em torno de 300 nm) não promoveram extensão de neuritos, enquanto que diâmetros um pouco maiores (em torno de 800 nm) promoveram a extensão prolongada e direcionada dos neuritos. Ainda neste trabalho, foi mostrado que fibras relativamente grossas (em torno de 1.300 nm), além de promoverem a extensão dos neuritos que as fibras intermediárias promovem, também direcionam a migração das células de Schwann.

Esses resultados, analisados conjuntamente, indicam que o diâmetro das fibras do suporte celular deve ser levado em consideração na sua construção, e de acordo com o objetivo que se busca. Além disso, esses resultados indicam que o impacto do diâmetro das fibras na condução do crescimento dos neuritos ocorre a partir de certo valor.

Uma racionalização para isso pode estar na análise do tamanho das células neurais: se o diâmetro das fibras for muito pequeno, a célula não reconhecerá o contato físico individual de cada fibra, mas sim o de um feixe de fibrilas, que, além disso, caso não estiverem bem alinhadas, podem exercer efeitos de condução antagônicos e minar o alongamento direcionado dos neuritos. Por outro lado, se o diâmetro das fibras for muito grande, as fibras parecerão como planos para as células, de modo que não haverá efeito de condução. Assim, quando as fibras tiverem diâmetros da ordem do tamanho da célula, esta poderá efetivamente se ancorar nas fibras e por elas ter seu crescimento conduzido.

Tabela 21: dados de diâmetro das fibras eletrofiadas de PCL. Apresentado o diâmetro médio $\pm$ desvio-padrão, n é o número de medidas realizadas

Id	Diam médio [μm]	n
Malha_01	$0,5 \pm 0,2$	211
Malha_02	$0,6 \pm 0,3$	205
Malha_03	$0,5 \pm 0,2$	150
Malha_04	1 ± 1	186
Malha_05	$0,6 \pm 0,2$	175
Malha_06	$0,4 \pm 0,2$	150
Malha_07	$0,8 \pm 0,3$	178
Malha_08	$0,4 \pm 0,1$	175
Malha_09	$0,4 \pm 0,4$	200

A Tabela 21 mostra os diâmetros das fibras obtidos das malhas de PCL, pelas condições mostradas na Tabela 1. A Figura 41 mostra os histogramas montados com esses dados.

Observando esses dados, podemos notar que as malhas com fibras mais alinhadas geralmente também produziram fibras mais finas e com menor dispersão de diâmetro. Além disso, as fibras apresentaram diâmetros médios próximos a 500 nm, um valor que pode ser considerado como adequado para a condução do crescimento de células neurais.

Figura 41: histogramas dos diâmetros de fibras medidos para malhas de PCL

Tabela 22: dados de diâmetro das fibras eletrofiadas de PLLA. Apresentado o diâmetro médio $\pm$ desvio-padrão, n é o número de medidas realizadas

Id	Diam médio [μm]	n
Malha_13	$2,2 \pm 0,6$	150
Malha_14	$2,5 \pm 0,4$	150
Malha_15	$2,4 \pm 1,0$	150
Malha_16	$1,9 \pm 0,4$	150

Figura 42: histogramas dos diâmetros de fibras medidos para malhas de PLLA

Como pode ser observado, as malhas de PLLA são constituídas de fibras mais grossas, apesar de mais alinhadas também. Isso pode ser entendido quando se pensa no fluxo de transferência de massa durante a eletrofiação: se o jato de material se concentra mais durante o estiramento, mais material comporá a fibra em formação. Como resultado, a fibra terá uma espessura maior, caso a velocidade de coleta seja mantida igual. Como as

velocidades de coleta para a eletrofição de PCL e PLLA foram as mesmas, mas as soluções de eletrofição de PLLA eram mais viscosas, as malhas deste material ficaram com fibras mais grossas.

Além disso, novamente se observa, ao se comparar os histogramas de Malha_14 e Malha_15, por exemplo, uma relação entre qualidade de alinhamento e menor dispersão de diâmetros.

4.3. Experimento com cultura de neuroesferas sobre malhas eletrofiadas

Uma das primeiras observações nesse experimento foi a constatação de que as células aderiam melhor na malha eletrofiada que nas superfícies tratadas com poli-L-lisina e laminina, que são os substratos usualmente utilizados na migração e diferenciação das neuroesferas. Essa é mais uma evidência da qualidade do material como suporte celular, por promover um ambiente adequado à ancoragem celular, e que possivelmente está ligado à menor hidrofobicidade do material.

Nos experimentos com a malha alin00, que possui fibras desalinhadas, foi observada a migração radial das células diferenciadas da neuroesfera, tal como ocorre na cultura usual, em garrafas de cultura, mas o mesmo não foi observado nos experimentos com as outras duas malhas.

Interessantemente, nos experimentos com a malha alin02, de fibras com alinhamento intermediário, a migração das células (bem como vários de seus processos) pareceu seguir a direção das fibras, como pode ser observado na Figura 44. Isso está em acordo com o encontrado em alguns trabalhos com células neurais de origem primária [24, 118].

Finalmente, nos experimentos com a malha alin03, que possui fibras bem alinhadas, a migração celular foi interrompida. Uma causa para isso pode ser o excesso de contato físico com as fibras, de modo que estas não apenas direcionam o crescimento das células, mas também impedem que ele ocorra em qualquer outra direção, acabando por suprimir a migração. Não obstante, em algumas neuroesferas, foi possível observar pequenos neuritos emanando

quase que exclusivamente na direção de alinhamento das fibras, como mostra a Figura 43.

Esses resultados todos, consideramos conjuntamente, apontam para a existência de um intervalo na qualidade do alinhamento das fibras do substrato, em que tal alinhamento beneficia a migração das células neurais. Nos substratos de fibras pouco alinhadas, não há benefício do substrato. Já nos substratos de fibras muito alinhadas, a migração celular, de natureza radial, é restringida pelo alinhamento excessivo das fibras. Finalmente, em substratos de fibras razoavelmente alinhadas, o contato físico das fibras direciona o crescimento dos neuritos. Assim, o substrato deve conter fibras que não estejam nem muito nem pouco alinhadas.

Nesse sentido, a possibilidade de se quantificar a qualidade do alinhamento das fibras do substrato representa grande vantagem por possibilitar uma avaliação objetiva sobre o efeito do substrato anteriormente ao cultivo celular.

Figura 43: imagens de fluorescência de GFAP obtidas das culturas sobre os substratos eletrofiados. O marcador indica a presença de astrócitos migrando radialmente a partir do núcleo das neuroesferas. O tracejado azul indica o núcleo e o vermelho os limites da migração. Os substratos usados foram, respectivamente da esquerda para a direita: alin00, alin02 e alin03

Alin00

Alin02

Alin03

Figura 44: imagens de fluorescência para marcadores GFAP (verde, astrócitos), β -3-tubulina (vermelho, neurônios) e a sobreposição de ambas. Sobre cada trio de imagens é indicado o substrato sobre o qual foi feita a cultura das neuroesferas. Especialmente em alin02 e alin03, as setas indicam direções preferenciais de migração e desenvolvimento de neuritos.

5. CONCLUSÕES

Foi construído um aparato de eletrofiação, que foi utilizado na produção de malhas poliméricas contendo fibras alinhadas. Ainda que esta não tenha sido uma inovação tecnológica do ponto de vista da literatura, sua construção representou um importante incremento na coleção de ferramentas do grupo de pesquisa. Outros tipos celulares, além das células neurais, recebem influência da anisotropia do meio, de modo que a produção de suportes celulares poliméricos de fibras alinhadas pode ser de grande interesse.

Adicionalmente, a variação dos parâmetros de eletrofiação permitiu a definição de condições que produzem malhas eletrofiadas contendo fibras com diversas qualidades de alinhamento para dois polímeros distintos. Destaca-se que a variação na qualidade de alinhamento das fibras foi obtida pela alteração de outros parâmetros de eletrofiação além da velocidade de captação de fibras. Este parâmetro, contudo, mostrou ser o fator dominante na qualidade do alinhamento das fibras, em acordo com dados reportados na literatura.

A morfologia das fibras eletrofiadas foi avaliada quanto ao seu diâmetro, revelando que seu valor está próximo àqueles reportados na literatura como ideais para o crescimento e desenvolvimento de células neurais. Tal avaliação é interessante e necessária, uma vez que se somam trabalhos apontando para a importância desse parâmetro nos materiais destinados ao suporte para crescimento de células neurais.

Foi desenvolvida uma metodologia capaz de avaliar objetiva e quantitativamente a qualidade do alinhamento das fibras constituintes das malhas eletrofiadas obtidas, através de suas microscopias e de um software livre e independente de plataforma.

A metodologia proposta foi incorporada ao software utilizado, por meio de algoritmo computacional, de modo a permitir sua utilização em um grande número de micrografias, a um tempo hábil. Foram realizados testes com o algoritmo, de modo a verificar que sua resposta é significativamente equivalente à utilização manual da metodologia.

O uso do algoritmo faz jus ao poder computacional disponível, além de permitir o fácil compartilhamento da metodologia. Além disso, a vantagem computacional adquirida pelo uso do algoritmo permite que seja avaliada a representatividade da análise de qualidade de alinhamento de fibras convencionalmente descrita na literatura, feita com base em apenas uma imagem.

As malhas eletrofiadas, contendo diferentes qualidades de alinhamento de suas fibras constituintes, foram utilizadas como substrato em cultura de células precursoras neurais a fim de se avaliar os efeitos de tal variável na diferenciação celular. Os resultados mostraram haver um intervalo na qualidade de tal alinhamento fora do qual não se verificam benefícios ao crescimento e diferenciação de células neurais.

Juntamente com a metodologia desenvolvida neste trabalho, esses resultados representam ganhos significativos no entendimento e controle dos parâmetros de substratos para cultura e regeneração de células neurais.

6. REFERÊNCIAS

1. Adams, D. N., Kao, E. Y.-C., Hypolite, C. L., Distefano, M. D., Hu, W.-S., & Letourneau, P. C. (2005). Growth cones turn and migrate up an immobilized gradient of the laminin IKVAV peptide. *Journal of Neurobiology*, Vol 62, pp. 134–147.
2. Ahmed, M. R., & Jayakumar, R. (2003). Peripheral nerve regeneration in RGD peptide incorporated collagen tubes. *Brain Research*, Vol. 1, pp. 208–216.
3. Aldini, N. N., Fini, M., Rocca, M., Giavaresi, G., & R., G. (2000). Guided regeneration with resorbable conduits in experimental peripheral nerve injuries. *International Orthopaedics*, Vol. 3, pp. 121–125.
4. Bai, J., Li, Y., Li, M., Wang, S., Zhang, C., & Yang, Q. (2008). Electrospinning method for the preparation of silver chloride nanoparticles in PVP nanofiber. *Applied Surface Science*, Vol. 15, pp. 4520–4523.
5. Baumgarten, P. (1971). Electrostatic spinning of acrylic microfibers. *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol 36, pp. 71–79.
6. Bellamkonda, R. V. (2006). Peripheral nerve regeneration: An opinion on channels, scaffolds and anisotropy. *Biomaterials*, Vol. 27, pp. 3515–3518.
7. Bhardwaj, N., & Kundu, S. C. (2010). Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*, Vol. 28, pp. 325–334.
8. Bini, T. B., Gao, S., Xu, X., Wang, S., Ramakrishna, S., & Leong, K. W. (2004). Peripheral nerve regeneration by microbraided poly(L-lactide-co-glycolide) biodegradable polymer fibers. *J Biomed Mater Res A*, Vol. 2, pp. 286–295.
9. Bognitzki, M., Czado, W., Frese, T., Schaper, A., Hellwig, M., Steinhart, M., et al. (2001). Nanostructured fibers via electrospinning. *Adv Mater*, Vol. 13, pp. 70-72.
10. Burger, C., Hsiao, S. B., & Chu, B. (2006). Nanofibrous materials and their applications. *Annu. Rev. Mater. Res.*, Vol 36, pp. 333–368
11. Burrows, M. C., Zamarion, V. M., Filippin-Monteiro, F. B., Schuck, D. C., Toma, H. E., Campa, A., et al. (2012). Hybrid Scaffolds Built From PET and Collagen as a Model For Vascular Graft Architecture. *Macromol. Biosci.*, Vol. 12, pp. 1660–1670.

12. Buttafoco, L., Kolkman, N. G., Engbers-Buijtenhuijs, P., Poot, A. A., Dijkstra, P. J., Vermes, I., et al. (2006). Electrospinning of collagen and elastin for tissue engineering applications. *Biomaterials*, Vol. 27, pp. 724–734.
13. Cai, J., Peng, X., Nelson, K., Eberhart, R., & Smith, G. (2005). Permeable guidance channels containing microfilament scaffolds enhance axon growth and maturation. *J Biomed Mater Res A*, Vol. 2, pp. 374–386.
14. Ceballos, D., Navarro, X., Dubey, N., Wendelschafer-Crabb, G., Kennedy, W. R., & Tranquillo, R. T. (1999). Magnetically aligned collagen gel filling a collagen nerve guide improves peripheral nerve regeneration. *Experimental Neurology*, Vol. 2, pp. 290–300.
15. Chaudhry, V., Glass, J. D., & Griffin, J. W. (1992). Wallerian degeneration in peripheral nerve disease. *Neurologic Clinics*, Vol. 3, pp. 613–627.
16. Chen, J. P., Chang, G. Y., & Chen, J. K. (2008). Electrospun collagen/chitosan nanofibrous membrane as wound dressing. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Vol. 1, pp. 183–188.
17. Chen, Y.-S., Hsieh, C.-L., Tsai, C.-C., Chen, T.-H., Cheng, W.-C., Hu, C.-L., et al. (2000). Peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers filled with collagen, laminin and fibronectin. *Biomaterials*, Vol. 15, pp. 1541–1547.
18. Chew, S. Y., Mi, R., Hoke, A., & Leong, K. W. (2007). Aligned Protein–Polymer Composite Fibers Enhance Nerve Regeneration: A Potential Tissue-Engineering Platform. *Adv. Funct. Mater.*, Vol. 17, pp. 1288–1296.
19. Chew, S. Y., Wen, J., Yim, E. K., & Leong, K. W. (2005). Sustained Release of Proteins from Electrospun Biodegradable Fibers. *Biomacromolecules*, Vol. 6, pp. 2017–2024.
20. Choi, S. W., Jo, M., S., Lee, W. S., & Kim, Y. R. (2003). An electrospun poly (vinylidene fluoride) nanofibrous membrane and its battery applications. *Adv. Mater.*, Vol. 15, pp. 2027–2032.
21. Christopherson, G. T., Song, H., & Mao, H.-Q. (2009). The influence of fiber diameter of electrospun substrates on neural stem cell differentiation and proliferation. *Biomaterials*, Vol. 30, pp. 556–564.

22. Clements, I. P., Kim, Y.-t., English, A. W., Lu, X., Chung, A., & Bellamkonda, R. V. (2009). Thin-film enhanced nerve guidance channels for peripheral nerve repair. *Biomaterials*, Vol. 30, pp. 3834–3846.
23. Collins, G., Federici, J., Imura, Y., & Catalani, L. H. (2012). Charge generation, charge transport, and residual charge in the electrospinning of polymers: A review of issues and complications. *J. Appl. Phys. Vol. 111*, pp. 044701.
24. Corey, J. M., Lin, D. Y., Mycek, K. B., Chen, Q., Samuel, S., Feldman, E. L., et al. (2007). Aligned electrospun nanofibers specify the direction of dorsal root ganglia neurite growth. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Vol. 1, pp. 636–645.
25. Dalton, P. D., Klee, D., & Moller, M. (2005). Electrospinning with dual collection rings. *Polymer*, Vol. 46, pp. 611-614.
26. Deitzel, J. M., Kleinmeyer, J. D., Hirvonen, J. K., & Tan, N. B. (2001). Controlled deposition of electrospun poly(ethylene oxide) fibers. *Polymer*, Vol. 42, pp. 8163-8170.
27. Deitzel, J., Kleinmeyer, J., Harris, D., & Beck Tan, N. (2001). The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer*, Vol. 42, pp. 261-272.
28. Ding, B., Kimura, E., Sato, T., Fujita, S., & Shiratori, S. (2004). Fabrication of blend biodegradable nanofibrous nonwoven mats via multi-jet electrospinning. *Polymer*, Vol. 45, pp. 1895-1902.
29. Dodla, M. C., & Bellamkonda, R. V. (2008). Differences between the effect of anisotropic and isotropic laminin and nerve growth factor presenting scaffolds on nerve regeneration across long peripheral nerve gaps. *Biomaterials*, Vol. 29, pp. 33–46.
30. Dong, B., Smith, M. E., & Wnek, G. E. (2009). Encapsulation of Multiple Biological Compounds Within a Single Electrospun Fiber. *Small*, Vol. 5, pp. 1508–1512.
31. Doshi, J., & Reneker, D. H. (1995). Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *J. Electrostat*, Vol. 35, pp. 151-160.
32. Ekaputra, A. K., Zhou, Y., Cool, S. M., & Hutmacher, D. W. (2009). Composite Electrospun Scaffolds for Engineering Tubular Bone Grafts. *Tissue Engineering Part A*, Vol. 15, pp. 3779–3788.
33. Evans, G. R. (2001). Peripheral nerve injury: a review and approach to tissue engineered constructs. *The Anatomical Record*, Vol. 263, pp. 396–404.

34. Evans, G., Brandt, K., Katz, S., Chauvin, P., Otto, L., Bogle, M., et al. (2002). Bioactive poly(L-lactic acid) conduits seeded with Schwann cells for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials*, Vol. 23 pp. 841-848.
35. Evans, G., Brandt, K., Niederbichler, A., Chauvin, P., Herrman, S., Bogle, M., et al. (2000). Clinical long-term in vivo evaluation of poly(L-lactic acid) porous conduits for peripheral nerve regeneration. *Journal of Biomaterials Science*, Vol. 11, pp. 869-878.
36. Fields, R., & Ellisman, M. (1986). Axons regenerated through silicone tube splices. I. Conduction properties. *Exp. Neurol.*, Vol. 92, pp. 48–60.
37. Formhals, A. (1934). *Patent No. 1.975.504*. USA.
38. Formhals, A. (1939). *Patent No. 2.160.962*. USA.
39. Formhals, A. (1940). *Patent No. 2.187.306*. USA.
40. Formhals, A. (1943). *Patent No. 2.323.025*. USA.
41. Formhals, A. (1944). *Patent No. 2.349.950*. USA.
42. Frostick, S. P., Yin, Q., & Kemp, G. J. (1998). Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. *Micro-surgery*, Vol. 18, pp. 397–405.
43. Gomez, N., Lu, Y., Chen, S., & Schmidt, C. E. (2007). Immobilized nerve growth factor and microtopography have distinct effects on polarization versus axon elongation in hippocampal cells in culture. *Biomaterials*, Vol. 28, pp. 271–284.
44. Greiner, A., & Wendoeff, J. H. (2007). Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. Vol. 46, *Angew. Chem., Int. Ed.*, pp. 5670-5703.
45. Gupta, P., Elkinsb, C., Longb, T. E., & Wilkes, G. L. (2005). Electrospinning of linear homopolymers of poly(methylmethacrylate): exploring relationships between fiber formation, viscosity, molecular weight and concentration in a good solvent. *Polymer*, Vol. 46, pp. 4799-4810.
46. Hashimoto, T., Suzuki, Y., Kitada, M., Kataoka, K., Wu, S., Suzuki, K., et al. (2002). Peripheral nerve regeneration through alginate gel: analysis of early outgrowth and late increase in diameter of regenerating axons. *Experimental Brain Research*, Vol. 146, pp. 356-368.
47. He, C.-L., Huang, Z.-M., Han, X.-J., Liu, L., Zhang, H.-S., & Chen, L.-S. (2006). Coaxial Electrospun Poly(L-Lactic Acid) Ultrafine Fibers for Sustained Drug Delivery. *Journal of Macromolecular Science, Part B: Physics*, Vol. 45, pp. 515-524.

48. He, W., Yong, T., Teo, W., Ma, Z., & Ramakrishna, S. (2005). Fabrication and Endothelialization of Collagen-Blended Biodegradable Polymer Nanofibers: Potential Vascular Graft for Blood Vessel Tissue Engineering. *Tissue Engineering*, Vol. 11, pp. 1574-1588.
49. Hohman, M. M., Shin, M., Rutledge, G. C., & Brenner, M. O. (2001). Electrospinning and electrically forced jets. I. Stability theory. *Phys. Fluids*, Vol. 13, pp. 2201-2221.
50. Huang, Z.-M., Zhang, Y.-Z., Kotaki, M., & Ramakrishna, S. (2003). A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology*, Vol. 63, pp. 2223–2253.
51. Inai, R., Kotaki, M., & Ramakrishna, S. (2005). Structure and properties of electrospun PLLA single nanofibres. *Nanotechnology*, Vol. 16, pp. 208-213.
52. Itoh, S., Takakuda, K., Kawabata, S., Aso, Y., Kasai, K., Itoh, H., et al. (2002). Evaluation of cross-linking procedures of collagen tubes used in peripheral nerve repair. *Biomaterials*, Vol. 23, pp. 4475–4481.
53. Jeong, E. H., Yang, J., & Youk, J. H. (2007). Preparation of polyurethane cationomer nanofiber mats for use in antimicrobial nanofilter applications. *Mater. Lett.*, Vol. 61, pp. 3991–3994.
54. Jha, B. S., Colello, R. J., Bowman, J. R., Sell, S. A., Lee, K. D., Bigbee, J. W., et al. (2011). Two pole air gap electrospinning: Fabrication of highly aligned, three-dimensional scaffolds for nerve reconstruction. *Acta Biomaterialia*, Vol. 7, pp. 203–215.
55. Kenneth, L., Chua, K., Christopherson, G. T., Lim, S., & Mao, H. (2007). Reducing electrospun nanofiber diameter and variability using cationic amphiphiles. *Polymer*, Vol. 48, pp. 6384-6394.
56. Kim, G. H. (2006). Electrospinning process using field-controllable electrodes. *J. Polym. Sci. B*, Vol. 44, pp. 1426–1433.
57. Kim, H. W., Song, J. H., & Kim, H. E. (2006). Bioactive glass nanofiber–collagen nanocomposite as a novel bone regeneration matrix. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, Vol. 79, pp. 698-705.
58. Kim, K. W., Lee, K. H., Khil, M. S., Ho, Y. S., & Kim, H. Y. (2004). The effect of molecular weight and the linear velocity of drum surface on the properties of electrospun poly(ethylene terephthalate) nonwovens. *Fibers and Polymers*, Vol. 5, pp. 122-127.

59. Kim, Y.-t., Haftel, V. K., Kumar, S., & Bellamkonda, R. V. (2008). The role of aligned polymer fiber-based constructs in the bridging of long peripheral nerve gaps. *Biomaterials*, Vol. 29, pp. 3117–3127.
60. Ko, F., Gogotsi, Y., Ali, A., Naguib, N., Ye, H., Yang, G., et al. (2003). Electrospinning of Continuous Carbon Nanotube-Filled Nanofiber Yarns. *Advanced Materials*, Vol. 15, pp. 1161–1165.
61. Koh, H., Yong, T., Chan, C., & Ramakrishna, S. (2008). Enhancement of neurite outgrowth using nano-structured scaffolds coupled with laminin. *Biomaterials*, Vol. 29, pp. 3574–3582.
62. Kuo, S.-W., Lin, H.-I., Ho, J. H.-C., Shih, Y.-R. V., Chen, H.-F., Yen, T.-J., et al. (2012). Regulation of the fate of human mesenchymal stem cells by mechanical and stereo-topographical cues provided by silicon nanowires. *Biomaterials*, Vol. 33, pp. 5013-5022.
63. Lala, N. L., Ramaseshan, R., Bojun, L., Sundarrajan, S., Barhate, R. S., Liu, Y. J., et al. (2007). Fabrication of nanofibers with antimicrobial functionality used as filters: protection against bacterial contaminants. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 97, pp. 1357–1365.
64. Langer, R., & Vacanti, J. P. (1993). Tissue Engineering. *Science*, pp. 920–926.
65. Lee, C., Shin, H., Cho, I., Kang, Y., Kim, I., Park, K., et al. (2005). Nanofiber alignment and direction of mechanical strain affect the ECM production of human ACL fibroblast. *Biomaterials*, Vol. 26, pp. 1261–1270.
66. Lee, Y. H., Lee, J. H., An, I. G., Kim, C., Lee, D. S., Lee, Y. K., et al. (2005). Electrospun dual-porosity structure and biodegradation morphology of montmorillonite reinforced PLLA nanocomposite scaffolds. *Biomaterials*, Vol. 26, pp. 3165–3172.
67. Li, D., & Xia, Y. (2004). Direct Fabrication of Composite and Ceramic Hollow Nanofibers by Electrospinning. *Nano Letters*, Vol. 4, pp. 933-938.
68. Li, D., McCann, J. T., & Xia, Y. (2005). Use of electrospinning to directly fabricate hollow nanofibers with functionalized inner and outer surfaces. *Small*, Vol. 1, pp. 83-86.
69. Li, D., Wang, Y., & Xia, Y. (2003). Electrospinning of Polymeric and Ceramic Nanofibers as Uniaxially Aligned Arrays. *Nano Letters*, Vol. 3, pp. 1167-1171.

70. Li, D., Wang, Y., & Xia, Y. (2004). Electrospinning Nanofibers as Uniaxially Aligned Arrays and Layer-by-Layer Stacked Films. *Adv. Mater.*, Vol. 16, pp. 361-366.
71. Li, G. N., & Kim, D. H. (2008). Tissue-Engineered Platforms of Axon Guidance. *Tissue Engineering Part B*, Vol. 14, pp. 33-51.
72. Luo, C., Nangrejo, M., & Edirisinghe, M. (2010). A novel method of selecting solvents for polymer electrospinning. *Polymer*, Vol. 51, pp. 1654–1662.
73. Matthews, J. A., Wnek, G. E., Simpson, D. G., & Bowlin, G. L. (2002). Electrospinning of collagen nanofibers. *Biomacromolecules*, Vol. 3, pp. 232-238.
74. Mccann, J. T., & Li, D. X. (2005). Electrospinning of nanofibers with core-sheath, hollow, or porous structures. *J. Mater. Chem.*, Vol. 15, pp. 735–738.
75. McKee, M. G., Elkins, C. L., & Long, T. E. (2004). Influence of self-complementary hydrogen bonding on solution rheology/electrospinning relationships. *Polymer*, Vol. 45, pp. 8705–8715.
76. Midgley, R., & Woolhouse, F. (1968). Silicone rubber sheathing as an adjunct to neural anastomosis. *Surg. Clin.*, Vol. 48, pp. 1149–1154.
77. Mohanna, P. N., Young, R. C., Wiberg, M., & Terenghi, G. (2003). A composite poly-hydroxybutyrate-glia growth factor conduit for long nerve gap repairs. *Journal of Anatomy*, Vol. 203, pp. 553–565.
78. Mosahebi, A., Simon, M., Wiberg, M., & Terenghi, G. (2001). A novel use of alginate hydrogel as Schwann cell matrix. *Tissue Engineering*, Vol. 7, pp. 525-534.
79. Mukhatyar, V., Karumbaiah, L., Yeh, J., & Bellamkonda, R. (2009). Tissue Engineering Strategies Designed to Realize the Endogenous Regenerative Potential of Periphera Nerves. *Advanced Matererials*, Vol. 21, pp. 4670–4679.
80. Musoke-Zawedde, P., & Shoichet, M. S. (2006). Anisotropic three-dimensional peptide channels guide neurite outgrowth within a biodegradable hydrogel matrix. *Biomed. Mater.*, Vol. 1, pp. 162–169.
81. Nomizu, M., Weeks, B. S., Weston, C. A., Kim, W. H., Kleinman, H. K., & Yamada, Y. (1995). Structure-activity study of a laminin $\alpha 1$ chain active peptide segment Ile-Lys-Val-Ala-Val (IKVAV). *Febs Letters*, Vol. 365, pp. 227–231.

82. Patel, S., Kurpinski, K., Quigley, R., Gao, H. F., Hsiao, B. S., Poo, M. M., et al. (2007). Bioactive nanofibers: synergistic effects of nanotopography and chemical signaling on cell guidance. *Nano Letters*, Vol. 7, pp. 2122–2128.
83. Phillips, J. B., Bunting, S. C., Hall, S. M., & Brown, R. A. (2005). Neural Tissue Engineering: A Self-Organizing Collagen Guidance Conduit. *Tissue Engineering*, Vol. 11, pp. 1611-1617.
84. Prang, P., Müller, R., Eljaouhari, A., Heckmann, K., Kunz, W., Weber, T., et al. (2006). The promotion of oriented axonal regrowth in the injured spinal cord by alginate-based anisotropic capillary hydrogels. *Biomaterials*, Vol. 27, pp. 3560–3569.
85. Ramanathan, K., Bangar, M. A., Yun, M., Chen, W., Myung, N. V., & Mulchandani, A. (2005). Bioaffinity sensing using biologically functionalized conducting-polymer nanowire. *J Am Chem Soc*, Vol. 127, pp. 496–497.
86. Rayleigh, L. (1882). On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity. *Philos. Mag.*, Vol. 14, pp. 184–186.
87. Reneker, D. H., & Chun, I. (1996). Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. *Nanotechnology*, Vol. 7, pp. 216–223.
88. Reneker, D. H., & Yarin, A. L. (2008). Electrospinning jets and polymer nanofibers. *Polymer*, Vol. 49, pp. 2387-2425.
89. Rosso, F., Marino, G., Giordano, A., Barbarisi, M., Parmeggiani, D., & Barbarisi, A. (2005). Smart materials as scaffolds for tissue engineering. *Journal Cell Physiology*, Vol. 203, pp. 465-470.
90. Schmidt, C. E., & Leach, J. B. (2003). Neural Tissue Engineering: Strategies for Repair and Regeneration. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, Vol. 5, pp. 293–347.
91. Schnell, E., Klinkhammer, K., Balzer, S., Brook, G., Klee, D., Dalton, P., et al. (2007). Guidance of glial cell migration and axonal growth on electrospun nanofibers of poly-epsilon-caprolactone and a collagen/ poly-epsilon-caprolactone blend. *Biomaterials*, Vol. 28, pp. 3012-3025.
92. Schreuder-Gibson, H., Gibson, P., Senecal, K., Sennett, M., Walker, J., Yeomans, W., et al. (2002). Protective textile materials based on electrospun nanofibers. *Journal of advanced materials*, Vol. 34, pp. 44–55.
93. Sell, S. A., McClure, M. J., Garg, K., Wolfe, P. S., & Bowlin, G. L. (2009). Electrospinning of collagen/biopolymers for regenerative medicine and

- cardiovascular tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 61, pp. 1007–1019.
94. Shih, Y., Chen, C., Tsai, S., Wang, Y. J., & Lee, O. K. (2006). Growth of Mesenchymal Stem Cells on Electrospun Type I Collagen Nanofibers. *Stem Cells*, Vol. 24, pp. 2391-2397.
 95. Shin, Y. M., Hohman, M. M., Brenner, M. P., & Rutledge, G. C. (2001). Electrospinning: a whipping fluid jet generates submicron polymer fibers. *Applied Physics Letters*, Vol. 78, pp. 1149-1151.
 96. Shin, Y. M., Hohman, M. M., Brenner, M. P., & Rutledge, G. C. (2001). Experimental characterization of electrospinning: the electrically forced jet and instabilities. *Polymer*, Vol. 42, pp. 9955-9967.
 97. Silva, G. A., Czeisler, C., Niece, K. L., Beniash, E., Harrington, D. A., Kessler, J. A., et al. (2004). Selective differentiation of neural progenitor cells by high-epitope density nanofibers. *Science*, Vol. 303, pp. 1352-1355.
 98. Silva, J. B. (2001). The use of silicone tubing in the late repair of the median and ulnar nerves in the forearm. *J. Hand Surg.*, Vol. 24, pp. 703-706.
 99. Simons, H. L. (1966). *Patent No. 3.280.229*. USA.
 100. Stankus, J. J., Guan, J., & Wagner, W. R. (2004). Fabrication of biodegradable elastomeric scaffolds with sub-micron morphologies. *J. Biomed. Mater. Res. A*, Vol. 70, pp. 603–614.
 101. Stoll, G., Griffin, J. W., Li, C. Y., & Trapp, B. D. (1989). Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. *Journal of Neurocytology*, Vol. 18, pp. 671–683.
 102. Subramanian, A., Krishnan, U. M., & Sethuraman, S. (2009). Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: Biomaterial mediated neural regeneration. *Journal of Biomedical Science* Vol 16, pp 108-119.
 103. Subramanian, C., Weiss, R., & Shaw, M. T. (2010). Electrospinning and characterization of highly sulfonated polystyrene fibers. *Polymer*, Vol. 51, pp. 1983–1989.
 104. Sun, Z. C., Zussman, E., Yarin, A. L., Wendorff, J. H., & Greiner, A. (2003). Compound core-shell polymer nanofibers by co-electrospinning. *Adv. Mater.*, pp. 1929–1932.

105. Tan, S.-H., Inai, R., Kotaki, M., & Ramakrishna, S. (2005). Systematic parameter study for ultra-fine fiber fabrication via electrospinning process. *Polymer*, Vol. 46, pp. 6128-6134.
106. Taylor, G. (1969). Electrically driven jets. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. A*, Vol. 313, pp. 453-475.
107. Teo, W. E., & Ramakrishna, S. (2005). Electrospun fibre bundle made of aligned nanofibres over two fixed points. *Nanotechnology*, Vol. 16, pp. 1878-1882.
108. Theron, A., Zussman, E., & Yarin, A. L. (2001). Electrostatic field-assisted alignment of electrospun nanofibres. *Nanotechnology*, Vol. 12, pp. 384–390.
109. Theron, S., Yarin, A., Zussman, E., & Kroll, E. (2005). Multiple jets in electrospinning: experiment and modeling. *Polymer*, Vol. 46, pp. 2889–2899.
110. Tillman, B. W., Yazdani, S. K., Lee, S. J., Geary, R. L., Atala, A., & Yoo, J. J. (2009). The in vivo stability of electrospun polycaprolactone-collagen scaffolds in vascular reconstruction. *Biomaterials*, Vol 30, pp. 583–588.
111. Tsai, E. C., Dalton, P. D., Shoichet, M. S., & Tator, C. H. (2006). Matrix inclusion within synthetic hydrogel guidance channels improves specific supraspinal and local axonal regeneration after complete spinal cord transection. *Biomaterials*, Vol 27, pp 519-533.
112. Tsaia, P. P., Schreuder-Gibson, H., & Gibson, P. (2002). Different electrostatic methods for making electret filters. *Journal of Electrostatics*, Vol 54, pp. 333–341.
113. Valero-Cabre, A., Tsironis, K., Skouras, E., Perego, G., Navarro, X., & Neiss, W. F. (2001). Superior muscle reinnervation after autologous nerve graft or poly-L-lactide-epsilon-caprolactone (PLC) tube implantation in comparison to silicone tube repair. *Journal of Neuroscience Research*, Vol. 63, pp. 214–223.
114. Varesano, A., Carletto, R. A., & Mazzuchetti, G. (2009). Experimental investigations on the multi-jet electrospinning process. *Journal of Materials Processing Technology*, Vol. 209, pp. 5178–5185.
115. Venugopal, J., & Ramakrishna, S. (2005). Biocompatible nanofiber matrices for the engineering of a dermal substitute for skin regeneration. *Tissue Engineering*, Vol. 11, pp. 847–854.

116. Verdú, E., Labrador, R. O., Rodríguez, F. J., Ceballos, D., Forés, J., & Navarro, X. (2002). Alignment of collagen and laminin-containing gels improve nerve regeneration within silicone tubes. *Restorative Neurology and Neuroscience*, Vol. 20, pp. 169–180.
117. Verdú, E., Labrador, R., Rodríguez, F., Ceballos, D., Forés, J., & Navarro, X. (2002). Alignment of collagen and laminin-containing gels improve nerve regeneration within silicone tubes. *Restorative Neurology and Neuroscience*, Vol. 20, pp. 169–180.
118. Wang, H. B., Mullins, M. E., Cregg, J. M., McCarthy, C. W., & Gilbert, R. J. (2010). Varying the diameter of aligned electrospun fibers alters neurite outgrowth and Schwann cell migration. *Acta Biomaterialia*, Vol. 6, pp. 2970–2978.
119. Wang, M., Hsieh, A. J., & Rutledge, G. C. (2005). Electrospinning of poly (MMA-co-MAA) copolymers and their layered silicate nanocomposites for improved thermal properties. *Polymer*, Vol. 46, pp. 3407–3418.
120. Wang, M., Yu, J. H., Kaplan, D. L., & Rutledge, G. C. (2006). Production of submicron diameter silk fibers under benign processing conditions by two-fluid electrospinning. *Macromolecules*, Vol 39, pp. 1102-1107.
121. Wang, X., Drew, C., Lee, S. H., Senecal, K. J., Kumar, J., & Samuelson, L. A. (2002). Electrospun nanofibrous membranes for highly sensitive optical sensors. *Nano Letters*, Vol. 2, pp. 1273–1275.
122. Wang, X., Kim, Y. G., Drew, C., Ku, B. C., Kumar, J., & Samuelson, L. A. (2004). Electrostatic assembly of conjugated polymer thin layers on electrospun nanofibrous membranes for biosensors. *Nano Letters*, Vol. 4, pp. 331–334.
123. Williamson, M., Black, R., & Kielty, C. (2006). PCL-PU composite vascular scaffold production for vascular tissue engineering: attachment, proliferation and bioactivity of human vascular endothelial cells. *Biomaterials*, Vol. 27, pp. 3608–3616.
124. Xie, J., Willerth, S. M., Li, X., Macewan, M. R., Rader, A., Sakiyama-Elbert, S. E., et al. (2009). The differentiation of embryonic stem cells seeded on electrospun nanofibers into neural lineages. *Biomaterials*, Vol. 30, pp. 354–362.

125. Xu, C. Y., Inai, R., Kotaki, M., & Ramakrishna, S. (2004). Aligned biodegradable nanofibrous structure: a potential scaffold for blood vessel engineering. *Biomaterials*, Vol. 25, pp. 877–886.
126. Xu, C., Inai, R., Kotaki, M., & Ramakrishna, S. (2004). Electrospun nanofiber fabrication as synthetic extracellular matrix and its potential for vascular tissue engineering. *Tissue Engineering*, Vol. 10, pp. 1160–1168.
127. Xu, X., Guenard, V., Kleitman, N., & Bunge, M. (1995). Axonal regeneration into Schwann cell-seeded guidance channels grafted into transected adult rat spinal cord. *J. Comp. Neurol.*, Vol. 351, pp. 145–160.
128. Yang, F., Murugan, R., Ramakrishna, S., Wang, X., Ma, Y., & Wang, S. (2004). Fabrication of nano-structured porous PLLA scaffold intended for nerve tissue engineering. *Biomaterials*, Vol. 25, pp. 1891–900.
129. Yang, F., Murugan, R., Wang, S., & Ramakrishna, S. (2005). Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. *Biomaterials*, Vol. 26, pp. 2603–10.
130. Yang, F., Xu, C. Y., Kotaki, M., Wang, S., & Ramakrishna, S. (2004). Characterization of neural stem cells on electrospun poly (L-lactic acid) nanofibrous scaffold. *J Biomater Sci Polym*, Vol. 15, pp. 1483–1497.
131. Yao, L., Damodaran, G., Nikolskaya, N., Gorman, A. M., Windebank, A., & Pandit, A. (2010). The effect of laminin peptide gradient in enzymatically cross-linked collagen scaffolds on neurite growth. *J. Biomed Mater Res Part A*, Vol. 92 pp. 484–492.
132. Yoshii, S., & Oka, M. (2001). Peripheral nerve regeneration along collagen filaments. *Brain Res.*, Vol. 1, pp. 158–62.
133. Young, R., Wiberg, M., & Terenghi, G. (2002). Poly-3-hydroxybutyrate (PHB): a resorbable conduit for long-gap repair in peripheral nerves. *J. Plast. Surg.*, Vol. 3, pp. 235–240.
134. Yu, D. G., Branford-White, C., White, K., Chatterton, N. P., Zhu, L. M., Huang, L. Y., et al. (2011). A modified coaxial electrospinning for preparing fibers from a high concentration polymer solution. *eXPRESS Polymer Letters*, Vol. 5, pp. 732–741.
135. Yu, T. T., & Shoichet, M. S. (2005). Guided cell adhesion and outgrowth in peptide-modified channels for neural tissue engineering. *Biomaterials*, Vol. 13, pp. 1507–14.
136. Zeleny, J. (1914). The electrical discharge from liquid points, and a hydrostatic method of measuring the electric intensity at their surfaces. *Phys. Rev.*, Vol. 3, pp. 69-91.

137. Zhang, J., Venkataramani, S., Xu, H., Song, Y.-K., Song, H.-K., Palmore, G. T., et al. (2006). Combined topographical and chemical micropatterns for templating neuronal networks. *Biomaterials*, Vol. 33, pp 5734-9
138. Zhang, N., Yan, H., & Wen, X. (2005). Tissue-engineering approaches for axonal guidance. *Brain Research Reviews*, Vol. 49, 48–64.
139. Zhang, Q., Wu, D., Qi, S., Wu, Z., Yang, X., & Jin, R. (2007). Preparation of ultra-fine polyimide fibers containing silver nanoparticles via in situ technique. *Materials Letters*, Vol. 61, pp. 4027–4030.
140. Zhang, Y., Huang, Z. M., Xu, X., Lim, C. T., & Ramakrishna, S. (2004). Preparation of core-shell structured PCL-r-Gelatin Bi-component nanofibers by coaxial electrospinning. *Chem. Mater.*, Vol. 18, pp. 3406–3409.
141. Zhu, Y., Cao, Y., Pan, J., & Liu, Y. (2009). Macro-Alignment of Electrospun Fibers For Vascular Tissue Engineering. *J. Biomedl Mater Res Part B: Applied Biomaterials*. Vol. 92, pp 508-516
142. Zhu, Y., Cao, Y., Pan, J., & Liu, Y. (2010). Macro-Alignment of Electrospun Fibers For Vascular Tissue Engineering. *J Biomed Mater Res Part B*, Vol. 92, pp. 508–516.
143. Zong, X., Bien, H., Chung, C.-Y., Yin, L., Fang, D., Hsiao, B., et al. (2005). Electrospun fine-textured scaffolds for heart tissue constructs. *Biomaterials*, Vol. 26, pp. 5330–5338.
144. Zong, X., Kim, K., Fang, D., Ran, S., Hsiao, B. S., & Chu, B. (2002). Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes. *Polymer*, Vol. 43, pp. 4403–4412.
145. Gonzalez, Rafael C.; Woods, Richard E.; “Digital Image Processing”, 2002.
146. Brigham, E. Oran; “Fast Fourier Transform and Its Applications”, 1988.
147. Bracewell, R.; “The Fourier Transform and Its Applications”, 1999
148. Mahmoud, Sabri A.; Mahmoud, Ashraf S. (2009). The use of Hartley transform in OCR with application to printed Arabic character recognition. *Pattern Analysis and Applications*, Vol. 12, pp 353-365
149. Trujillo, C.A.; (2011). Diferenciação neural in vitro: papel do receptor B2 de cininas. *Tese de Doutorado – Programa de Pós-*

Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

150. Ulrich H, Majumder P. (2006). Neurotransmitter receptor expression and activity during neuronal differentiation of embryonal carcinoma and stem cells: from basic research towards clinical applications. *Cell Prolif.* Vol. 39, pp 281-300.
151. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* Vol. 282, pp 1145-7.
152. Trujillo CA, Schwindt TT, Martins AH, Alves JM, Mello LE, Ulrich H. (2009). Novel perspectives of neural stem cell differentiation: from neurotransmitters to therapeutics. *Cytometry A.* Vol. 75, pp 38-53.

CURRICULUM VITAE

Daniel de Souza Alcobia

Brasileiro, nascido em 26 de Julho de 1985

Email: dalcobia@usp.br

Formação Acadêmica

Tecnólogo em Logística

FATEC Guarulhos

Conclusão prevista para Jul/2014

Mestrado *stricto sensu* em Química

Universidade de São Paulo – USP

Conclusão prevista para Dez/2013

Bacharelado em Química

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Concluído em 2008

Ensino Médio

Colégio Técnico CEFET-SP

Concluído em 2002

Experiência Profissional

(Ago/2010 – Jul/2012)

Universidade de São Paulo - USP

Bolsista do Programa de Mestrado

Financiamento pela agência de fomento FAPESP

(Set/2008 –Fev/2010)

QUIRIOS S.A.

Analista de Controle de Qualidade

Analista de Pesquisa e Desenvolvimento

(Jul/2006 –Jul/ 2007)

UNICAMP/IQ - Laboratório de Análise Instrumental

Bolsista de Iniciação Científica

Financiamento pela agência de fomento PIBIQ