



Ricardo da Conceição Ribeiro

Licenciatura em Ciências de Engenharia Biomédica

Produção de fibras de policaprolactona (PCL) por fiação centrífuga

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia
Biomédica

Orientador: João Paulo Borges, Professor Auxiliar, DCM – FCT/UNL
Co-orientador: Jorge Carvalho e Silva, Professor Auxiliar, DF – FCT/UNL
Co-orientador: José Luís Ferreira, Professor Auxiliar, DF – FCT/UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Mário Forjaz Secca
Arguente: Prof^a. Doutora Maria Helena Godinho
Vogais: Prof. Doutor João Paulo Borges
Prof. Doutor José Luís Ferreira



**FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

Novembro, 2013

Ricardo da Conceição Ribeiro

Licenciatura em Ciências de Engenharia Biomédica

**Produção de fibras de policaprolactona
(PCL) por fiação centrífuga**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientador: João Paulo Borges, Professor Auxiliar, Departamento de Ciência dos Materiais da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Co-orientador: Jorge Carvalho e Silva, Professor Auxiliar, Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Co-orientador: José Luís Ferreira, Professor Auxiliar, Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Constituição do júri

Presidente: Prof. Doutor Mário Forjaz Secca, Professor Associado, Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Arguente: Prof^a. Doutora Maria Helena Godinho, Professor Auxiliar com Agregação, Departamento de Ciência dos Materiais da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Vogal: Prof. Doutor João Paulo Borges, Professor Auxiliar, Departamento de Ciência dos Materiais da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Vogal: Prof. Doutor José Luís Ferreira, Professor Auxiliar, Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Produção de fibras de policaprolactona (PCL) por fiação centrífuga

Copyright © 2013. Todos os direitos reservados. Ricardo da Conceição Ribeiro, Faculdade de Ciências e Tecnologia e Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

O término deste projecto e desta tese conclui a última etapa escolar da minha vida. Ao longo destes cinco anos e, principalmente, durante o decorrer deste trabalho final e desta escrita, senti-me acompanhado, apoiado e acarinhado por várias pessoas que, de uma maneira ou de outra, me ajudaram a chegar ao topo da montanha. Aos que aqui encontram o meu profundo agradecimento, quero que saibam que este trabalho não é apenas meu, mas de todos vós. Um muito obrigado.

Quero começar por expressar a minha gratidão ao meu orientador Professor João Paulo Borges que, com muito entusiasmo, me deu a conhecer o tema no qual trabalhei durante estes últimos meses, bem como por todo o seu apoio, ajuda e conselhos, boa disposição e paciência (caixas de fibras para o SEM), que permitiram que este trabalho chegasse a bom porto.

Agradeço também aos meus dois co-orientadores, Professor Jorge Carvalho e Silva e Professor José Luís Ferreira por toda a ajuda, simpatia, disponibilidade e entusiasmo com que me co-orientaram desde o início deste projecto: desde a construção do aparelho, componente por componente, ao *babysitting* das minhas/nossas crianças.

Devo também um muito obrigado, um obrigado do tamanho de um torno e de uma fresa industrial ao Faustino que muito amavelmente e com muita paciência acompanhou “o sombra” durante todo o processo de construção do aparelho, construindo, furando e montando grande parte dos componentes. Ao Eduardo, um muito obrigado por toda a sua ajuda, apoio e simpatia em todo o processo realizado nas oficinas. Espero que o seu Benfica ganhe todos os jogos, exceptuando contra o Sporting! Sem a vossa ajuda ainda estaria a fazer cortes em acrílico sem as dimensões correctas.

Ao Sr. Mesquita, agradeço-lhe as conversas, a ajuda electrónica, a simpatia e toda disponibilidade que sempre teve para comigo. É sem dúvida merecedor não de uma mas de um balde de pipocas.

À Professora Hélia Neves, da Faculdade de Medicina de Lisboa, agradeço imenso a disponibilização da linhagem de células C2C12, a ajuda dada e toda a simpatia, interesse, preocupação, disponibilidade e tempo utilizado comigo. Estou-lhe muito grato por tudo isto.

Ao Professor Domingos Henrique, da Faculdade de Medicina de Lisboa, agradeço a ajuda dada na procura e obtenção das células para o meu projecto.

À Professora Maria João Gama, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, agradeço imenso a simpatia e a disponibilização da linhagem de células SH-SY5Y.

À malta do laboratório de Biomateriais e do laboratório de Microelectrónica – Teresa, Fonseca, Margarida, Beatriz, Jennifer, Carlos, Xana e Marisa – agradeço toda a companhia feita ao longo destes últimos meses e o entusiasmo que partilhámos cada vez que um de nós dava mais um passo no seu trabalho. Um especial agradecimento à dupla Teresa e Fonseca pelas conversas (as de interesse científico e as de interesse de coisa nenhuma) e tempo partilhado mais exaustivamente nos últimos e críticos meses de tese. Um agradecimento especial ao Tiago pelo tempo e paciência que teve ao medir a viscosidade de todas as minhas soluções — grande paciência a tua!

Ao pessoal do laboratório de Polímeros – Ana Almeida, Augusta, Ana Catarina, João Canejo, Esther, Susete, Pedro, Paula, Fred, Francisco e Daniela – agradeço toda a simpatia, ajuda e bom ambiente durante o decorrer do projecto. Um obrigado especial para a Ana Almeida e para a Susete pela ajuda e tempo despendido durante os ensaios da tensão superficial.

À quase Doutora Ana Baptista agradeço as conversas, a preocupação, a simpatia e boa disposição, a ajuda laboratorial (Já não há diclorometano!) e a manutenção conjunta do ar condicionado, sempre importante para a frescura e purificação do ar do laboratório.

Ao quase Doutor Carlos João agradeço a simpatia, as discussões efectuadas acerca do trabalho e orientação inicial do mesmo que, sem dúvida alguma, foram importantes no decorrer do projecto.

À Doutora Joana Loureiro, um muito obrigado pela disponibilidade e tempo utilizado para a análise de DRX efectuada às minhas fibras.

À Professora Célia Henriques agradeço as discussões e sugestões acerca do meu trabalho, nomeadamente no que toca à fase da cultura celular.

Agradeço à Professora Ana Sofia Matos a simpatia e a disponibilidade demonstrada em toda a ajuda dada para a minha compreensão do *Design of Experiments*: Método de *Taguchi*.

Ao Sr. Gaspar, um muito obrigado pela prontidão e disponibilidade com que cortou a base do aparelho.

Aos meus amigos FCTenses – ao grupo (auto)denominado “As Mais Lindas”, Sara, Joana, Carolina, Inês e Catarina, Diana, Mateus, Fábio, César, Rémi, João Carmo, Queirós, Morais, Patrícia Mota, Filipa Ferreira, Guilherme e Carina – que acompanharam o meu percurso, sempre com camaradagem, preocupação, entreaajuda e o seu q.b. de diversão, o meu muito obrigado. Foi sem dúvida um prazer ter passado todo este tempo convosco, seja em aula, seja na fatídica cantina, seja noutro sítio qualquer.

Aos meus amigos Massamaenses – Elsa, Rita, Hélder, Marta, Nuno Salgueiro, Nuno Santos, Raquel, Vanessa, Diana e Mateus, Ana Cláudia e Zé Pedro – um obrigado pela amizade e paciência face à minha ausência.

Finalmente, os agradecimentos a quem me dá todo o amor e carinho deste mundo, à minha família. Aos meus avós Irene e Américo, obrigado pela preocupação e por todo o amor e carinho que constantemente me dão. Aos meus pais António e Ana e ao meu irmão João, que aturam, já há algum tempo, as minhas qualidades e defeitos dando-me tudo o que alguma vez precisei e o que não precisei, fazendo os sacrifícios necessários para que tudo corresse bem e com muito amor e carinho, o meu muito obrigado.

Finalmente, fica o agradecimento a tudo o que tens representado para mim, Sara. Uma amiga, uma confidente, alguém que sempre me encoraja a nunca baixar os braços – nem os dedos no computador, durante a escrita da tese –, tendo sempre uma palavra de apreço e um gesto meigo cheio de amor e carinho para comigo. Tenho também que te agradecer toda a ajuda que me deste ao longo desta tese, principalmente

nas formatações: simplificaste-me em muito a vida (e a cabeça)! Foste, és e sempre serás, sem dúvida alguma, a maior e melhor surpresa desta faculdade, destes cinco curtos anos. Obrigado por tudo e por seres quem és.

Fibras poliméricas de diâmetros nanométricos têm tido um grande impacto a nível médico e industrial, dado possuírem características que permitem a regeneração e substituição de tecido humano, podendo ser usadas para filtrar microorganismos ou como protecção em vestuário militar, entre outras.

Existem várias técnicas que permitem a obtenção de fibras poliméricas de diâmetros reduzidos, de onde se destaca a fiação centrífuga. A grande vantagem desta nova técnica reside na elevada taxa de produção, sem a perda de qualidade das fibras. Possibilita ainda um alinhamento das fibras, característica vantajosa no processo de migração celular. Este trabalho teve como objectivo a produção de fibras poliméricas através da técnica de fiação centrífuga.

Foi projectado um sistema de fiação centrífuga composto por componentes de rotação e transmissão de movimento, sistema de controlo de temperatura e estruturas de suporte.

Com o sistema construído foram produzidas fibras poliméricas de policaprolactona. Foram estudados vários parâmetros, nomeadamente o tipo de solvente e sua concentração, a velocidade de rotação e o diâmetro dos orifícios do reservatório e o diâmetro do colector cilíndrico, analisando de que modo é que a morfologia das fibras é influenciada.

As fibras produzidas foram observadas em SEM para uma análise morfológica, tendo-se verificado que a melhor amostra foi obtida a partir de uma solução de policaprolactona em diclorometrano a 12%, a uma velocidade de rotação de 10350 rpm, com um reservatório com orifícios de 0,5 mm e um colector cilíndrico com um diâmetro de 47,5 cm. Esta amostra foi caracterizada por um alinhamento elevado, fibras com um diâmetro de $(8,9 \pm 2,3) \mu\text{m}$ e sem contas ou defeitos. Através de análises de DRX verificaram-se diferenças de cristalinidade em fibras formadas a partir de soluções com

solventes diferentes. Foram realizadas culturas celulares da linhagem C2C12 em fibras produzidas, para estudo da sua adesão e diferenciação.

Palavras-chave: fiação centrífuga; policaprolactona; fibras poliméricas; fibras alinhadas; linhagem celular C2C12.

Abstract

Polymeric fibers with nanometric diameters are having a huge impact in the medical and the industrial fields. Their characteristics assist regeneration of human tissue, enhance filtration of microorganisms or the produce military protection clothes, among others.

There are several techniques which allow producing polymeric fibers with small diameters. One of these techniques is the centrifugal spinning, which has a high production rate without losing fiber qualities, an advantage when faced with other techniques. It enables a directional fiber orientation, beneficial in cell migration control. The main objective of this work is to produce polymeric fibers using centrifugal spinning technique.

A centrifugal spinning system was designed comprising: rotation and movement transmission components, temperature control system and support structures.

After the system was built, polycaprolactone (PCL) fibers were produced. Several parameters were studied, namely polymer concentration, type of the solvent, reservoir's rotation speed, diameter of the reservoir's orifices and collector's diameter. The main goal of these studies was to check how fiber morphology would be affected by these factors.

The morphology of the fibers was analysed by SEM, where it was observed that the best sample was obtained from a 12 wt./wt.% solution of PCL with dichloromethane, using a rotation speed of 10350 rpm, a 0,5 mm diameter of the reservoir's hole and a 47,5 cm diameter collector. This sample was characterized by a high fiber alignment, with diameters in the range $(8,9 \pm 2,3) \mu\text{m}$ and absence of beads.

Crystallinity differences were observed between fibers from solutions of different solvents. Cells from myoblastic cell line (C2C12) were cultured in produced fibers to study their adhesion and differentiation.

Keywords: centrifugal spinning; polycaprolactone; polymeric fibers; aligned fibers; C2C12 cell line.

Índice de Matérias

<i>Agradecimentos</i>	v
<i>Resumo</i>	ix
<i>Abstract</i>	xi
<i>Índice de Matérias</i>	xiii
<i>Lista de Figuras</i>	xvii
<i>Lista de Tabelas</i>	xxi
<i>Siglas e Acrónimos</i>	xxiii
<i>Lista de Símbolos</i>	xxv
1. Introdução	1
2. Fiação centrífuga para produção de fibras	7
2.1. Equipamento e funcionamento do processo de fiação centrífuga	8
2.2. Investigação já realizada	8
2.3. Análise dos processos físicos da fiação centrífuga	12
2.3.1. Etapas para a formação de nanofibras por fiação centrífuga [28]	13
2.3.2. A importância da viscosidade e da velocidade angular	15
3. Equipamento para fiação centrífuga de fibras	17
3.1. Constituição do sistema de fiação centrífuga	18
3.2. Componentes de rotação e transmissão de movimento	19
3.2.1. Motor	20
3.2.2. Veio adaptador do motor	21
3.2.3. Polias e correias	21
3.2.4. Veio de rotação do reservatório cilíndrico	22
3.2.5. Reservatório cilíndrico	23
3.2.6. Rolamentos do veio do reservatório cilíndrico	24

3.2.7.	Batente do veio do reservatório cilíndrico.....	25
3.3.	Sistema de aquecimento do reservatório cilíndrico	26
3.4.	Componentes de suporte	28
3.4.1.	Base e estrutura de suporte	28
3.4.2.	Painéis.....	29
3.5.	Outros componentes	30
3.6.	As duas gerações do aparelho de fiação centrífuga	32
3.6.1.	Reservatório cilíndrico	33
3.6.2.	Suporte do rolamento do veio do reservatório cilíndrico	33
3.6.3.	Sistema de ligação indirecta com duas polias e uma correia.....	34
3.6.4.	Veio de rotação do reservatório cilíndrico.....	35
3.6.5.	Base em ardósia.....	35
4.	Materiais e métodos	37
4.1.	Materiais.....	37
4.2.	Obtenção de fibras de PCL.....	37
4.2.1.	Preparação das soluções	38
4.2.2.	Fiação Centrífuga	38
4.3.	Caracterização das soluções	40
4.3.1.	Reologia	40
4.3.2.	Tensão superficial.....	41
4.4.	Caracterização das fibras	42
4.4.1.	Microscopia Electrónica de Varrimento	43
4.4.2.	Difracção de raios-X	43
4.4.3.	Culturas Celulares	44
5.	Caracterização das soluções poliméricas	45
5.1.	Tensão superficial	46

5.2. Viscosidade de corte	46
6. Análise e discussão de resultados: Caracterização de fibras de PCL obtidas por fiação centrífuga.....	49
6.1. Descrição dos parâmetros estudados	50
6.1.1. Influência da concentração da solução na formação de fibras PCL	51
6.1.2. Influência da velocidade de rotação na formação de fibras de PCL.....	56
6.1.3. Influência do diâmetro do colector na formação de fibras	60
6.1.4. Influência do solvente na formação de fibras de PCL	61
6.2. Culturas celulares	64
7. Conclusão	69
8. Bibliografia	73
<i>Apêndice A</i> – Tabelas de apoio ao texto.....	77
<i>Apêndice B</i> – Aparelho de fiação centrífuga de fibras de primeira geração	89
<i>Apêndice C</i> – Protocolo da cultura celular	93
<i>Apêndice D</i> – Sistematização de resultados	97
<i>Apêndice E</i> – Desenho técnico de componentes	113

Lista de Figuras

Figura 1.1 As várias técnicas de <i>scaffolding</i> existentes: <i>Scaffolds</i> porosos pré-fabricados, descelularização da ECM de tecidos nativos, utilização de folhas celulares com ECM secretada e a utilização de hidrogéis de auto-montagem (adaptado de Chan e Leongm [10])	3
Figura 2.1 Diagrama das forças aplicadas durante a primeira etapa de formação de nanofibras pelo método de fiação centrífuga — iniciação do jacto (adaptado de Mellado <i>et al</i> [28]).	14
Figura 2.2 Diagrama das forças aplicadas durante a segunda etapa de formação de nanofibras pelo método de fiação centrífuga — alongamento do jacto (adaptado de Mellado <i>et al</i> [28]).	14
Figura 2.3 Diagrama das forças aplicadas durante a terceira etapa de formação de nanofibras pelo método de fiação centrífuga — evaporação do solvente (adaptado de Mellado <i>et al</i> [28]).	15
Figura 3.1 Equipamento de fiação centrífuga.	18
Figura 3.2 Componentes do aparelho de fiação centrífuga. A) 1 – Base do colector; 2 – Reservatório cilíndrico; 3 – Varão de suporte do colector; 4 – Grelha de aço inox com resistências de aquecimento (não se encontra visível); 5 – Rolamentos e seu suporte (não se encontra visível); 6 – Cúpula de protecção. B) 7 – Polia; 8 – Varão de 12 mm de diâmetro; 9 – Correia; 10 – Abraçadeira; 11 – Motor (<i>Dremel 4000</i>); 12 – Perfil <i>Rose+Krieger 4005000 30x30</i> . C) 13 – Fusível de 2 A; 14 – Local de inserção do cabo de alimentação para o controlo de temperatura; 15 – Controlador de temperatura <i>Red Lion T16</i> ; 16 – Botão <i>on/off</i> do circuito de controlo de temperatura. D) 17 – Base em ardósia.....	19
Figura 3.3 Representação, em <i>AutoCAD 2013</i> , do veio adaptador do motor à polia dentada mandante.....	21
Figura 3.4 Polia dentada do sistema de transmissão de movimento entre o motor e o reservatório.....	22
Figura 3.5 Correia em poliuretano <i>Synchroflex</i> para transmissão de movimento entre o motor e o reservatório da solução polimérica.	22
Figura 3.6 Representação do veio para ligação do reservatório cilíndrico à polia mandada em <i>AutoCAD 2013</i>	23
Figura 3.7 Representação da versão optimizada (segunda versão) do reservatório cilíndrico em <i>AutoCAD 2013</i>	24

Figura 3.8 Representação do suporte para rolamentos do veio de rotação do reservatório cilíndrico em <i>AutoCAD 2013</i>	25
Figura 3.9 Representação do batente do veio de rotação do reservatório cilíndrico em <i>AutoCAD 2013</i>	26
Figura 3.10 Fluxograma ilustrativo do funcionamento do sistema de controlo de temperatura do reservatório cilíndrico.	27
Figura 3.11 Resistências de aquecimento do reservatório cilíndrico (setas a vermelho).	28
Figura 3.12 Perfil 30x30 <i>Rose+Krieger 40050000</i> utilizado na estrutura do equipamento.	29
Figura 3.13 Representação da estrutura de suporte de topo em <i>AutoCAD 2013</i>	29
Figura 3.14 Representação do painel frontal do equipamento em <i>AutoCAD 2013</i>	30
Figura 3.15 Representação do painel traseiro do equipamento em <i>AutoCAD 2013</i>	30
Figura 3.16 Representação dos espaçadores da grelha de resistências, à esquerda, e da cúpula de protecção, à direita, em <i>AutoCAD 2013</i>	31
Figura 3.17 Representação dos varões para suporte do colector, em <i>AutoCAD 2013</i>	31
Figura 3.18 Representação da base do colector em <i>AutoCAD 2013</i>	32
Figura 3.19 Reservatório cilíndrico de 2º geração, à esquerda, e reservatório cilíndrico de 1º geração, à direita.	33
Figura 3.20 Suporte dos rolamentos do veio do reservatório (vista de baixo e sem tampa).....	34
Figura 3.21 Ligação directa (A) e ligação indirecta (B) para transmissão de movimento entre o motor e o reservatório cilíndrico.	34
Figura 3.22 Veio de rotação do reservatório cilíndrico da 1ª geração (A) e da 2ª geração (B) à direita.	35
Figura 4.1 Curvas de fluxos de materiais newtonianos (1), pseudoplásticos (2), plásticos (3) e dilatantes (4) (Adaptado de Rheotec [30]).	40
Figura 4.2 Diagrama representativo da interacção molecular de um líquido com uma interface, o ar (adaptado de Atension [31]).	41
Figura 4.3 Perfil de gota obtida pelo aparelho <i>CAM101</i> da <i>KSV NIMA</i>	42
Figura 4.4 Amostras de fibra para análise morfológica por SEM.	43
Figura 5.1 Variação da tensão superficial com a concentração de polímero na solução.....	46
Figura 5.2 Variação da viscosidade de corte com a aplicação de uma tensão de corte para soluções de 1, 8 – 16%.	47

Figura 6.1 Imagens SEM de fibras de PCL a 10350 rpm usando DCM como solvente, um colector de 47,5 cm de diâmetro e o reservatório com orifícios de 0,5 mm de diâmetro. Concentrações de PCL: A) 10 %; B) 11 %; C) 12 %; D) 13 %; E) 14 %.	52
Figura 6.2 Imagens SEM de fibras de PCL a 16800 rpm usando 1,4 - dioxano como solvente, um colector de 47,5 cm de diâmetro e o reservatório com orifícios de 0,5 mm de diâmetro. Concentrações de PCL: A) 10 %; B) 15 %; C) 20 %.	52
Figura 6.3 Variação dos diâmetros de fibras formadas com uma solução de PCL dissolvida em DCM com uma concentração variável, com uma velocidade fixa de 10350 rpm, um colector de 47,5 cm de diâmetro e o reservatório com orifícios de 0,5 mm de diâmetro.	54
Figura 6.4 Variação dos diâmetros de fibras formadas com uma solução de PCL dissolvida em 1,4 - dioxano com uma concentração variável, com uma velocidade fixa de 16800 rpm, um colector de 47,5 cm de diâmetro e o reservatório com orifícios de 0,5 mm de diâmetro.	55
Figura 6.5 Variação dos diâmetros e da existência ou não de contas e/ou defeitos em fibras, com a variação da concentração, usando o reservatório com orifícios de 0,5 mm de diâmetro e uma velocidade de rotação fixa.	56
Figura 6.6 Imagens SEM de fibras de PCL a 12 % usando DCM como solvente, um colector de 47,5 cm de diâmetro e o reservatório com orifícios de 0,5 mm de diâmetro. Velocidade de rotação do reservatório: A) 4100 rpm; B) 10350 rpm; C) 16800 rpm.	57
Figura 6.7 Imagens SEM de fibras de PCL a 15 % usando 1, 4 - dioxano como solvente, um colector de 47,5 cm de diâmetro e o reservatório com orifícios de 0,5 mm de diâmetro. Velocidade de rotação do reservatório: A) 4100 rpm; B) 10350 rpm; C) 16800 rpm.	57
Figura 6.8 Variação dos diâmetros de fibras formadas com uma solução de PCL dissolvida em DCM, com uma velocidade variável, uma concentração fixa de 12 %, um colector de 47,5 cm de diâmetro e o reservatório com orifícios de 0,5 mm de diâmetro.	58
Figura 6.9 Variação dos diâmetros de fibras formadas com uma solução de PCL dissolvida em 1,4 - dioxano com uma velocidade variável, uma concentração fixa de 15 % de PCL e o reservatório com orifícios de 0,5 mm de diâmetro.	59
Figura 6.10 Variação dos diâmetros e da existência ou não de contas e/ou defeitos em fibras, com a variação da velocidade de rotação do reservatório, reservatório com orifícios de 0,5 mm de diâmetro e uma concentração fixa.	60
Figura 6.11 Imagem SEM de fibras de PCL a 10 %, 2100 rpm, colector de 37,5 cm de diâmetro e reservatório com orifícios de 1 mm de diâmetro, usando DCM como solvente.	62

- Figura 6.12** Fibras de PCL obtidas a partir de uma solução de PCL a 15 % com 1,4 - dioxano, a uma velocidade de 4100 rpm, um colector de 47,5 cm de diâmetro e o reservatório com orifícios de 0,5 mm de diâmetro.63
- Figura 6.13** Espectro normalizado de difracção de raios-X do PCL a 12 % em DCM (a vermelho – curva inferior) e em 1,4 - dioxano (a azul – curva superior).63
- Figura 6.14** Células da linhagem C2C12 em proliferação (A) e em diferenciação (B)..65
- Figura 6.15** Média das absorvâncias medidas nas três réplicas de cada amostra e no controlo ao longo de sete dias.66
- Figura 6.16** Células da linhagem C2C12 aderentes a fibras obtidas a partir de uma solução de 12 % de PCL com DCM, a uma velocidade de 10350 rpm, um colector de 47,5 cm e o reservatório com orifícios de 0,5 mm de diâmetro.67
- Figura 6.17** Células da linhagem C2C12 aderentes a fibras obtidas a partir de uma solução de 10 % de PCL com DCM, a uma velocidade de 16800 rpm, um colector de 47,5 cm e o reservatório com orifícios de 0,5 mm de diâmetro.67
- Figura 6.18** Células da linhagem C2C12 aderentes e diferenciadas em fibras obtidas a partir de uma solução de 11 % de PCL com DCM, a uma velocidade de 10350 rpm, um colector de 47,5 cm e o reservatório com orifícios de 0,5 mm de diâmetro.68
- Figura 6.19** Células da linhagem C2C12 aderentes e diferenciadas em fibras obtidas a partir de uma solução de 11 % de PCL com DCM, a uma velocidade de 10350 rpm, um colector de 47,5 cm e o reservatório com orifícios de 0,5 mm de diâmetro.68

Lista de Tabelas

Tabela 4.1 Equipamento e material utilizado num ensaio de fiação centrífuga.	38
Tabela 4.2 Correspondência entre as velocidades de rotação seleccionadas no motor com as velocidades de rotação real, obtidas pelo tacómetro <i>RS 163-5348</i>	39
Tabela 6.1 Parâmetros utilizados nos ensaios com as soluções de PCL e DCM como solvente.	50
Tabela 6.2 Parâmetros utilizados nos ensaios com as soluções de PCL e 1,4 - dioxano como solvente.	51

Siglas e Acrónimos

ECM	Matriz Extracelular
PLA	Poli (ácido láctico)
PGA	Poli (ácido glicólico)
PLGA	Poli (lactato-co-glicolato)
PCL	Policaprolactona
PEO	Polietileno glicol
PAA	Poli (ácido acrílico)
PP	Polipropileno
ABS	Acrilonitrilo butadieno estireno
PVP	Polivinilpirrolidona
PS	Poliestireno
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
DMAc	Dimetilacetamida
BEH-PPV	Poli[2,5-(2'-oxietilohexilo)]-1,4-fenilenovinileno
PBT	Polibutileno tereftalato
DCM	Diclorometano

Lista de Símbolos

Ω_{th}	Velocidade angular crítica
Ω	Velocidade angular
P	Densidade
s_0	Diâmetro interno do reservatório
a	Raio do orifício
σ	Tensão superficial
V	Velocidade de ejeção do jacto
r	Raio do jacto de fibra
μ	Viscosidade extensional
x	Distância da fibra ao orifício
R_c	Raio do colector
U	Velocidade axial inicial
D	Coefficiente de difusão
J	Taxa de evaporação do solvente

1.Introdução

Com o avançar da Ciência e da Tecnologia mais e novos estudos foram realizados nas mais diversas áreas e disciplinas e, assim, novos conhecimentos foram sendo adquiridos pela comunidade científica. Este desenvolvimento possibilitou a aproximação entre diferentes áreas científicas, criando melhores e mais recentes métodos e técnicas que têm em vista a solução de problemas concretos que afectem a Humanidade. A Engenharia de Tecidos é uma das ciências interdisciplinares mais recentes, resultando de conhecimentos das mais diversas áreas, passando pela Química e pela Física, indo da Biologia e Anatomia à Ciência dos Materiais.

A Engenharia de Tecidos tem sido reconhecida como uma área promissora na medicina, nomeadamente na criação e reparação de órgãos e tecidos. A definição que é usada para esta ciência é, usualmente, a utilizada por Langer e Vacanti: “a Engenharia de Tecidos é um campo interdisciplinar que aplica os princípios da engenharia e das ciências da vida para o desenvolvimento de substitutos biológicos que recuperem, mantenham ou melhorem a função de um tecido ou de um órgão completo” [1]. Esta, ainda jovem área científica, actua, normalmente, através da tríade células, *scaffolds* e factores de crescimento. As células são necessárias para a formação e crescimento do tecido que é desejado recuperar ou formar, pelo que a escolha das mesmas será sempre realizada mediante o tecido a que estas serão aplicadas. Os factores de crescimento são

substâncias, normalmente naturais, capazes de estimular a proliferação, a diferenciação e o crescimento celular. Já os *scaffolds* são locais artificiais produzidos pelo homem que têm como função mimetizar a matriz extracelular (ECM). Na Tabela A.1, presente no apêndice A, são descritas as funções da ECM, as funções desempenhadas pelos *scaffolds* e as suas arquiteturas e propriedades biológicas e mecânicas. A escolha dos materiais para o *scaffold* e do tipo de *scaffold* é então realizada de acordo com o órgão ou tecido a intervir, isto é, escolhendo as propriedades intrínsecas de cada material que otimizem a formação ou regeneração do tecido. Os aspectos mais importantes a ter em conta são a biocompatibilidade, a biodegradabilidade, as propriedades mecânicas, a arquitetura do *scaffold* e a tecnologia existente para o fabricar [2].

Para o fabrico de *scaffolds* podem ser utilizados materiais naturais como o quitosano, o colagénio, a hidroxiapatite ou a gelatina, ou então materiais sintéticos, de onde se destacam os polímeros como o PLA, PGA, PLGA ou PCL.

O PCL é um poliéster alifático semi-cristalino [3], muito usado na concepção de *scaffolds* em Engenharia de Tecidos devido às várias propriedades vantajosas que o tornam aplicável, sozinho ou em combinação com outros materiais, em diferentes tecidos. O PCL prima por ser biocompatível e biodegradável, sendo degradado hidrolítica e enzimaticamente formando produtos não tóxicos para o meio fisiológico. É de fácil processamento, de baixo custo, apresenta uma boa permeabilidade a medicamentos, bem como excelentes propriedades mecânicas [3-6]. Este polímero tem sido essencialmente utilizado na produção de *scaffolds* para a reconstrução de variados tecidos como o osso, a pele, o nervo ou a retina [5]: Choi *et al.* [7] criaram com sucesso um *scaffold* de nanofibras de PCL e colagénio que facilita a regeneração de células musculares em lesões do músculo-esquelético; Porter *et al.* [8] verificaram que nanofibras de PCL oferecem um ambiente favorável à resposta a curto e longo prazo das células mesenquimais, bem como o aumento da produção de proteínas não colagénias da ECM, favorecendo os enxertos ósseos; Zamani *et al.* [9] encapsularam com sucesso um antibiótico em nanofibras de PCL, ideal para o tratamento de doenças periodontais; Luong-Van *et al.* [3] utilizaram-no, com sucesso, como material principal em sistemas de libertação controlada de heparina. Com base nos exemplos dados é possível verificar

a importância do PCL devido à diversidade de aplicações que este polímero tem e poderá vir a ter.

A técnica de obtenção de *scaffolds* a aplicar em Engenharia de Tecidos é de elevada importância, pois condiciona algumas propriedades do mesmo. Assim, é algo que deve ser primeiramente pensado, tendo sempre em vista quais as propriedades essenciais e necessárias que a aplicação do referido *scaffold* necessita de satisfazer. A partir da Figura 1.1 é possível observar a existência de vários métodos possíveis para a obtenção de um *scaffold* para aplicar em Engenharia de Tecidos. Este trabalho será focado nos *scaffolds* porosos pré-fabricados. Estes podem ser obtidos através de reacções químicas ou a partir de processos de produção de nanofibras que formem *scaffolds* 3D, sendo esta última técnica a estudada neste projecto.

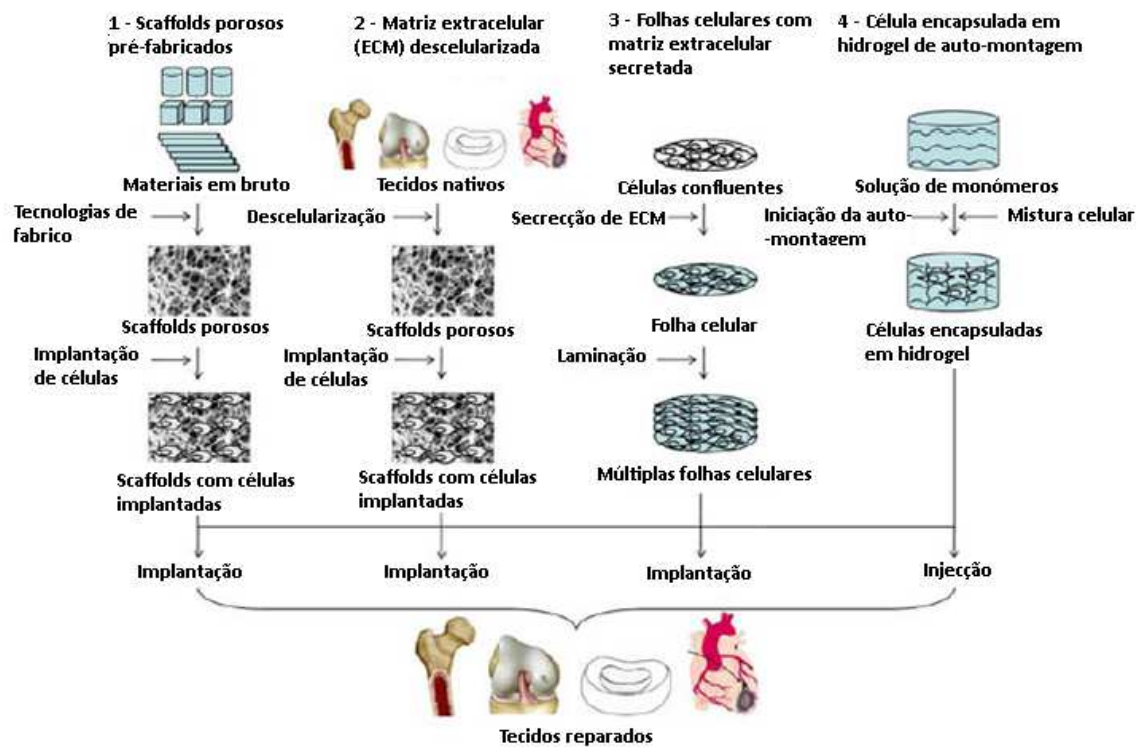


Figura 1.1 As várias técnicas de *scaffolding* existentes: *Scaffolds* porosos pré-fabricados, descelularização da ECM de tecidos nativos, utilização de folhas celulares com ECM secretada e a utilização de hidrogéis de auto-montagem (adaptado de Chan e Leongm [10])

As nanofibras possuem propriedades vantajosas que as tornam úteis em variadas áreas como a engenharia de tecidos, biossensores, aplicações electrónicas, dispositivos de filtração, entre outros. Possuem uma elevada área de superfície face ao seu volume, elevada flexibilidade, poros de pequenas dimensões, boa interconectividade entre poros e

excelentes propriedades mecânicas [11, 12].

Um dos factores a ter em conta na escolha de um *scaffold* e do material é, como já referido, a tecnologia existente para o fabricar. Existe um elevado número de técnicas que possibilitam a produção de *scaffolds* à base de nanofibras, sendo as de maior destaque, seja pelo elevado uso ou pela inovação, a electrofiação, o *wet spinning*, etc (ver Tabela A.2, no apêndice A). Algumas técnicas que possibilitam a formação de *scaffolds* sem recorrer a nanofibras são, por exemplo, as que se baseiam na eliminação de agentes porogénios sólidos (*solvent casting/porogen leaching*) ou gasosos (*gas foaming*), a liofilização (*freeze drying*), ou a prototipagem rápida (*rapid prototyping*) [13].

Actualmente, a técnica mais utilizada na produção de nanofibras com vista à aplicação em Engenharia de Tecidos é a electrofiação, em muito devido à sua versatilidade e potencial aplicação em diversas áreas [15]. Esta tem sido a técnica de produção de nanofibras de eleição, uma vez que consegue produzir nanofibras com uma morfologia controlada pelo operador, como o diâmetro (que pode chegar às dezenas de nanómetros) e a porosidade das nanofibras, está associada a um baixo custo, possui um rendimento mais elevado que as outras técnicas de produção de nanofibras [18] e é um processo já amplamente estudado, tendo sido já caracterizadas nanofibras de mais de 200 polímeros [15]. Porém é uma técnica altamente dependente de um elevado número de parâmetros, sendo estes divididos em parâmetros da solução, parâmetros do processo e parâmetros do ambiente, como se pode verificar pela Tabela A.3, presente no apêndice A, e, apesar de tudo, possui um rendimento muito baixo para produção em massa.

Na procura de uma solução para os problemas apresentados pela electrofiação, uma nova técnica de produção de nanofibras surgiu, em 2010, desenvolvida por Badrossamay *et al.* e Sarkar *et al.*, chamada de *Rotary Jet-Spinning*, pelos primeiros, e de fiação centrífuga, pelos segundos. Esta técnica vem revolucionar a produção de nanofibras no que toca à menor quantidade de parâmetros de que está dependente, da produtividade que lhe está associada e dos diferentes tipos de materiais a partir dos quais podem ser obtidas nanofibras [19]. A fiação centrífuga utiliza o efeito centrífugo para promover o alongamento das fibras, permitindo que tanto soluções poliméricas condutoras como não condutoras, bem como polímeros fundidos e sem adição de

qualquer solvente, possam ser utilizados para produzir fibras sem a necessidade de campos eléctricos. A solução é ejectada pelos orifícios do reservatório quando a tensão superficial for insuficiente para gerar a força centrípeta necessária para manter o polímero em movimento circular no interior do reservatório. É este efeito, centrífugo, que permite a iniciação da produção das fibras. Esta técnica consegue produzir cerca de 1 grama por minuto de nanofibras por orifício, contra as 0,1 grama por hora de um sistema de electrofiação típico [20].

Face a tudo isto, o principal objectivo do trabalho consistiu na produção de fibras de PCL a partir do aparelho de fiação centrífuga projectado e construído.

A presente tese estrutura-se em oito capítulos:

- A introdução, no presente capítulo, onde é realizada uma reflexão sobre a Engenharia de Tecidos e Biomateriais, bem como um apanhado sobre a produção de *scaffolds*, sendo destacado e caracterizado de forma breve a electrofiação e apresentada a técnica de fiação centrífuga. É, assim, contextualizado o trabalho desenvolvido;

- No capítulo 2 são referidos, de forma breve e destacando os pontos-chave, os trabalhos já publicados, incidindo não só nos resultados experimentais mas também nos aparelhos utilizados para os obter. É também efectuada uma abordagem física ao sistema de fiação centrífuga;

- O capítulo 3 surge da necessidade de caracterizar o aparelho projectado, bem como os seus componentes. Aqui é também possível observar as diferenças entre duas gerações distintas do aparelho;

- O capítulo 4 dá a conhecer os procedimentos experimentais utilizados em laboratório. São também discutidas as técnicas de caracterização utilizadas no decorrer do projecto;

- No capítulo 5 são analisadas duas propriedades das soluções utilizadas: a tensão superficial e a viscosidade de corte;

- O capítulo 6 contempla a apresentação dos resultados obtidos, bem como a sua discussão;

- Finalmente, a finalizar a presente tese, o capítulo 7 apresenta as conclusões retiradas com o trabalho efectuado, sendo mencionadas algumas sugestões com vista a melhorias e trabalhos futuros.

2.Fiação centrífuga para produção de fibras

Com a descoberta das propriedades e, assim, da importância das aplicações possíveis das nanofibras, tornou-se necessário produzir em massa este tipo de fibra, de maneira a conseguir corresponder às necessidades e expectativas do mercado: esperou-se um crescimento de 175 milhões de dólares até 2012 e espera-se que atinja os 825 milhões de dólares em 2017 [21]. Até há relativamente pouco tempo, a electrofiação era o único método com potencial para a produção em massa de nanofibras, sendo que 50% dos artigos acerca deste tipo de fibras eram baseados neste método [19]. Face ao fraco rendimento e à elevada quantidade de parâmetros e limitações da electrofiação, nunca seria possível apresentar tais perspectivas de crescimento de mercado, indo os valores para 2017 parecer utópicos. Assim, como é que é possível perspectivar um crescimento de 650 milhões de dólares em apenas 5 anos?

Em 2010, Badrossamay *et al.* [22] e Sarkar *et al.* [19] criam uma nova técnica de produção de nanofibras: a fiação centrífuga de fibras. Esta nova técnica vem revolucionar o mundo das nanofibras pois consegue ultrapassar vários problemas e limitações da electrofiação. As grandes vantagens deste novo sistema de produção são o aumento da taxa de produção de nanofibras, não perdendo estas as características por que são conhecidas, e o permitir alargar o espectro de materiais e soluções a partir das quais se podem produzir nanofibras.

2.1. Equipamento e funcionamento do processo de fiação centrífuga

Apesar de ainda muito recente, esta técnica já tem um equipamento definido e que tem sido, quase na sua totalidade, repetido pelos vários grupos de investigação que têm como principal tema de estudo a fiação centrífuga. Alguns dos componentes principais de um sistema de fiação centrífuga são o motor e o reservatório com orifícios, entre outros (ver tabela A.4, no apêndice A). Na tabela A.5, no apêndice A, faz-se a comparação entre vários sistemas de fiação centrífuga usados por diferentes grupos de investigação.

Nesta técnica as fibras são formadas graças à acção de um efeito centrífugo. A rotação do reservatório a elevadas velocidades angulares conduz o fluido, solução polimérica ou fundido, por orifícios de diâmetro calibrado. Quando o efeito centrífugo e a pressão hidroestática do fluido que se encontra no reservatório excedem as forças capilares que restringem a saída de fluido pelos orifícios, o polímero é ejectado. O jacto que se forma solidifica rapidamente, formando nanofibras, que são recolhidas no colector do aparelho [23]. Este processo será explicado com maior pormenor num subcapítulo seguinte, onde são analisadas as questões físicas inerentes a esta técnica.

2.2. Investigação já realizada

Apesar da fiação centrífuga ser uma técnica ainda muito recente e ainda se encontrar em estudo, existem já vários trabalhos publicados nesta área, tendo estes conseguido, com sucesso, a formação de nanofibras de vários materiais, algumas delas de difícil ou impossível produção usando a electrofiação.

Badrossamay *et al.* [22] fazem parte do primeiro grupo de investigadores, em 2010, a reportar que a partir de uma solução polimérica num reservatório a elevadas velocidades de rotação é possível obter-se nanofibras desse mesmo material. Identificaram como principais desafios a optimização das propriedades da solução (viscoelasticidade e tensão superficial), a volatilidade do solvente, o diâmetro do capilar e o raio do colector, não só para a produção fibras muito finas mas, também, para

evitar a ruptura do jacto e a formação de defeitos nas fibras obtidas. Obtiveram vários tipos de fibras: de PLA (Poli (ácido láctico)), PEO (Polietileno glicol), PAA (Poli (ácido acrílico)) e gelatina. Foram produzidas fibras de PLA contínuas e alinhadas, com diâmetros entre 50 nm e 3500 nm, a partir de soluções (em clorofórmio) com várias concentrações de polímero (4 wt.%, 6 wt.%, 8 wt.% e 10 wt.%) e rotações de 4000 rpm, 8000 rpm e 12000 rpm. Verificou-se que à medida que se aumentou a velocidade de rotação, o diâmetro da fibra diminuiu. Foi observado que a baixas concentrações, 4 wt.% e 6 wt.%, formaram-se apenas contas ou fibras com contas, respectivamente, enquanto a 10 wt.% formaram-se fibras de maior diâmetro. Posteriormente à produção das fibras, estas foram utilizadas como *scaffold* para miócitos ventriculares de ratos neonatais com sucesso, conseguindo orientar o citoesqueleto contráctil destas células e auto-organizá-las num tecido multicelular, mimetizando a arquitectura do músculo cardíaco.

É com Sarkar *et al.* [19] que surge, também em 2010, o conceito de fiação centrífuga. O grupo anuncia a criação de nanofibras de vários polímeros — PEO, PLA, PP (Polipropileno), ABS (Acrilonitrila butadieno estireno), PVP (Polivinilpirrolidona) e PS (Poliestireno), entre outros — a partir de um aparelho que utiliza um efeito centrífugo em vez de forças electroestáticas, como as que estão envolvidas na electrofiação. Identificam que os parâmetros chave desta nova técnica são a velocidade de rotação do reservatório, o sistema colector e a temperatura do processo. Notam que as grandes vantagens desta nova técnica é o facto de aumentar a escolha de materiais de que se pode obter nanofibras, pois tanto soluções condutoras como não condutoras, bem como polímeros sem uso de solvente, são passíveis de originar nanofibras, de aumentar a taxa de produção e de diminuir os custos. Verificaram que a concentração de PEO em água desionizada tem que ser um pouco superior à usada em electrofiação (passando de 5 % - 12 % para 7 % - 16 %), dependendo do tipo de reservatório, peso molecular e velocidade de rotação, entre outros parâmetros. Com velocidades de rotação de 3000 rpm a 5000 rpm obtiveram fibras de PEO com um diâmetro médio de 300 nm. Obtiveram ainda fibras de PS a 3000 rpm e fibras de PP, algo quase impossível de obter através do processo convencional de electrofiação sem o uso de um solvente à

temperatura ambiente. Verificaram que esta técnica possibilita a produção em massa de nanofibras, ao conseguirem produzir 1 grama por minuto de fibras por orifício do reservatório. Concluem então que fiação centrífuga ultrapassa as limitações apresentadas pela electrofiação, sendo uma técnica versátil para uso tanto de soluções como para fundidos. A possibilidade da utilização de materiais fundidos elimina custos (não existe necessidade de recuperação do solvente) e uso de solventes nocivos para a saúde e/ou ambiente. Notaram ainda que o diâmetro médio das fibras produzidas depende do inverso do quadrado da velocidade de rotação.

Hurrunen e Kellomäki [26] usaram uma simples máquina para fabrico de algodão doce, sem possibilidade de controlar qualquer parâmetro associado ao aparelho, para produzir fibras de PLA, sem a utilização de qualquer solvente. Este grupo constatou que o peso molecular do polímero era um importante parâmetro na formação de fibras, pois a partir da utilização de PLA com dois pesos moleculares diferentes, um elevado e outro mais baixo, apenas o de baixo peso molecular formou fibras. Estes investigadores constatarem que tal aconteceu uma vez que a viscosidade intrínseca do PLA com baixo peso molecular era menor que a do PLA com elevado peso molecular. Hurrunen e Kellomäki concluíram, assim, que para que seja possível a produção de fibras a partir de polímeros puros em estado fundido é necessário que a sua viscosidade intrínseca seja, aproximadamente, de 0,8 dl/g – 1,2 dl/g.

Raghavan *et al.* [21] utilizaram Nylon 6 e PVDF (Fluoreto de polivinilideno) em solução e PP em fundido para produção de fibras. Identificaram como parâmetros de controlo da morfologia e diâmetro das fibras a concentração da solução (no caso da produção de fibras a partir de soluções), a viscosidade do fundido (em caso de produção de fibras a partir de fundidos), a velocidade de rotação do reservatório, as dimensões do orifício, a temperatura do reservatório (em caso de produção de fibras a partir de fundidos) e o sistema colector.

Vazquez *et al.* [25] produziram nanofibras de PVDF. Usaram um reservatório cilíndrico com capacidade de 2 mL com orifícios de 250 µm de diâmetro e um colector de 304,8 mm de diâmetro. As soluções poliméricas foram preparadas usando PVDF com solvente de 1/1 wt./wt. acetona/DMAc. Verificou-se que a uma concentração mais

baixa (18 wt.% de PVDF) obteve-se um diâmetro menor mas com maior produção de contas. Já a concentrações mais elevadas (25 wt.% de PVDF) obtiveram-se diâmetros 3 a 4 vezes maiores, quando comparadas com as fibras obtidas a baixas concentrações, mas sem contas e outros defeitos. Verificou-se, assim, que a formação de fibras de PVDF está mais dependente das mudanças de concentração e, assim, das propriedades reológicas da solução, do que da velocidade de rotação que o reservatório experimenta.

Padron *et al.* [24] produziram com sucesso nanofibras de BEH-PPV (Poli[2,5-(2'-oxietilohexilo)]-1,4-fenilenovinileno), material com importância a nível biomédico (biocompatibilidade e capacidades biomiméticas) e na optoelectrónica (essencial em comunicação óptica). Os resultados mostram um elevado rendimento na produção de nanofibras quando comparado com qualquer um dos outros métodos existentes para a produção do mesmo tipo de fibras. Este grupo de investigação concluiu que os resultados mostram que a velocidade de rotação reduz os diâmetros das fibras até um determinado limite, onde a fibra quebra. Observaram, também, que a taxa de produção por orifício foi superior a 1 g/min.

Shanmuganathan *et al.* [23] utilizaram a técnica de fiação centrífuga para produção de nanofibras de PBT (Polibutileno tereftalato), um polímero termoplástico semicristalino, conhecido pela sua excelente resistência química, estabilidade térmica, comportamento mecânico e resistência eléctrica. Este tipo de material não é aconselhável para ser usado em electrofiação pois apenas se dissolve em solventes orgânicos nocivos e tóxicos: ácido trifluoroacético e hexafluoropropanol. Com a fiação centrífuga e sem a utilização de qualquer solvente foram produzidas nanofibras de PBT através da extrusão do fundido. Foi, também, verificado que a temperatura de cristalização das fibras aumentou face à temperatura de cristalização do *pellet*, enquanto a temperatura de fusão desceu face à do *pellet* do material puro.

McEaching e Lozano [4] produziram nanofibras de PCL (Policaprolactona) por fiação centrífuga. Para tal utilizaram PCL dissolvido em diclorometano em concentrações de 16 wt.% e 18 wt.%. Utilizaram dois reservatórios com capacidades diferentes, ambos com agulhas de 0,255 mm de diâmetro a servirem de orifícios de saída e um colector formado por varetas de politetrafluoroetileno, igualmente distanciadas. As

velocidades rotacionais variaram de 3000 rpm a 9000 rpm. A uma velocidade mais baixa, 3000 rpm, os ciclos têm duração aproximada de 30 s, enquanto a velocidade mais elevadas, 9000 rpm, os ciclos têm duração aproximada de 10 s. As fibras de PCL a uma concentração de 16 wt.% mostraram ser melhores que as de uma concentração a 18 wt.%. Verificaram que, para a solução de PCL a 16 wt.%, a 3000 rpm, 6000 rpm e 9000 rpm formaram-se fibras com um diâmetro médio de (264 ± 125) nm, (326 ± 112) nm e (220 ± 98) nm, respectivamente. Observaram que as fibras obtidas a 3000 rpm apresentaram a maior quantidade de contas, contas estas que diminuíram com a velocidade rotacional, pelo que as fibras produzidas a 9000 rpm apresentaram menos contas. Notaram que as fibras colhidas em menores intervalos de tempo (5 s) possuem maiores diâmetros, na ordem dos 2000 nm, enquanto fibras colhidas com um intervalo de tempo maior (30 s) possuem diâmetros bastante inferiores, na ordem dos 350 nm. Verificaram ainda que, com o aumento da velocidade de rotação, ocorreu uma diminuição de cristalinidade, em comparação com o PCL puro, para fibras a 16 wt.%.

Em jeito de resumo do estado da arte, na tabela A.6 do apêndice A é possível observar uma comparação entre as diferentes características verificadas nos artigos acerca de fiação centrífuga analisados ao longo deste trabalho.

2.3. Análise dos processos físicos da fiação centrífuga

Uma das principais desvantagens do processo de electrofiação é a elevada quantidade de parâmetros de que esta técnica depende, influenciando, assim, as características das fibras produzidas. Porém, apesar das significativas melhorias que se obtêm na fiação centrífuga de fibras, este método de produção está também dependente de alguns parâmetros: o diâmetro do reservatório, o diâmetro e forma do/s orifício/s, as propriedades reológicas da solução, a velocidade de rotação do reservatório, a temperatura, o sistema colector, a distância do/s orifício/s ao sistema colector e o ambiente onde se desenrola o processo [4][19][21][24].

Revedo o processo de formação de nanofibras com mais algum detalhe: quando o reservatório roda em torno do seu eixo de simetria, a uma taxa maior do que um

limite determinado pelo equilíbrio entre a força capilar e efeito centrífugo, a solução ou fundido é ejetado através do/s orifícios/s existentes no mesmo. Este jacto vai sendo expelido ao longo de uma trajectória espiral à medida que o solvente, caso se trate de uma solução, vai evaporando. Ao longo deste processo o jacto vai sendo alongado e o solvente evapora a uma taxa J , dependente do coeficiente de difusão D do solvente no polímero. O jacto vai ser recolhido num colector estacionário, geralmente com uma geometria cilíndrica, de raio R_c . Uma vez no colector, o solvente que resta no jacto evapora e a fibra solidifica, estando pronta para ser removida [25]. Porém, a formação da nanofibra é mais complexa do que a descrição anterior aparenta, estando dependente de várias condicionantes em que se podem distinguir três etapas.

2.3.1. Etapas para a formação de nanofibras por fiação centrífuga [28]

Durante o processo de formação de nanofibras o polímero/solução polimérica passa por diversos processos até que se transforma em nanofibra com as propriedades morfológicas desejadas. Estes processos dependem da tensão superficial do fluido, da força inercial, da força não inercial e da força viscosa. O facto de estas forças actuarem em momentos diferentes na formação da nanofibra possibilita analisar este processo em três fases distintas: iniciação do jacto, alongamento do jacto e evaporação de solvente, como é possível observar pelas Figura 2.1, Figura 2.2 e Figura 2.3.

2.3.1.1 Iniciação do jacto

A primeira etapa para a formação de nanofibras por fiação centrífuga designa-se de iniciação do jacto. Esta é caracterizada pelo tempo característico de ejeção $\tau_1 \sim 1/\Omega_{th}$, proporcional ao inverso da velocidade crítica angular, Ω_{th} , necessária a que o jacto possa sair pelo orifício.

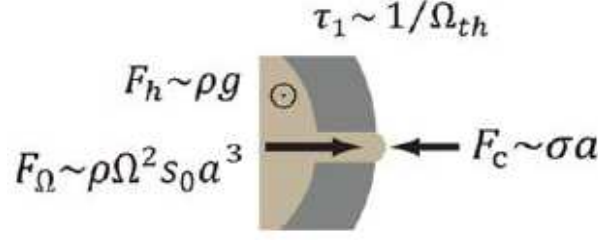


Figura 2.1 Diagrama das forças aplicadas durante a primeira etapa de formação de nanofibras pelo método de fiação centrífuga — iniciação do jacto (adaptado de Mellado *et al* [28]).

Caso a pressão hidroestática, ρgh , no orifício seja três ordens de grandeza menor que a força centrípeta, $\rho \Omega^2 s_0 a$, no orifício de raio a do reservatório de raio s_0 , o seu papel na primeira etapa da formação de nanofibras é desprezável. Assim, equilibrando a força inercial, $\rho \Omega^2 s_0 a^3$, com a força capilar no orifício do reservatório, σa , produz uma velocidade rotacional crítica para a ejeção do jacto $\Omega_{th} \sim \sqrt{\sigma/a^2 s_0 \rho}$, e uma velocidade de ejeção do jacto $V \sim \Omega_{th} s_0$.

2.3.1.2 Alongamento do jacto

A segunda etapa para a formação de nanofibras designa-se de alongamento do jacto. Esta é caracterizada pelo tempo característico viscoso $\tau_2 \sim r^2 \rho / \mu$, onde μ é a viscosidade extensional e ρ a densidade.

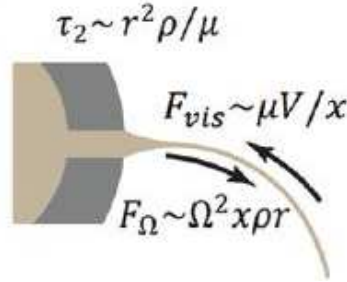


Figura 2.2 Diagrama das forças aplicadas durante a segunda etapa de formação de nanofibras pelo método de fiação centrífuga — alongamento do jacto (adaptado de Mellado *et al* [28]).

Quando o jacto de polímero sai do pelo orifício, o seu alongamento é controlado pelo equilíbrio entre as forças centrífugas e viscosas. É na segunda etapa que se dá a formação de nanofibras. Observa-se que a tensão de alongamento viscosa de um jacto de raio r e a velocidade V é realizada axialmente e é proporcional a $\mu V / x$, onde x é a distância ao orifício e a conservação de massa implica que $U a^2 = V r^2$, sendo obtida a

expressão do raio do jacto de nanofibra formado em função dos parâmetros experimentais:

$$r \sim \frac{aU^{1/2}v^{1/2}}{R_c^{3/2}\Omega} \quad (2.1)$$

onde a é o raio inicial do jacto, $v = \mu/\rho$ é a viscosidade cinemática e $x \sim R_c$ é o raio do colector ($R_c \gg s_0$).

2.3.1.3 Evaporação do solvente

A terceira e última etapa na formação de nanofibras é designada por evaporação do solvente. Esta etapa é caracterizada pelo tempo característico de evaporação de solvente $\tau_3 \sim r^2/D$, dependente da difusão do solvente através do polímero.

A taxa de evaporação do solvente está dependente da sua volatilidade. Se o solvente é muito volátil, o jacto forma fibras de maior diâmetro, já que uma rápida evaporação do solvente potencia uma rápida solidificação do jacto. A distância do/s orifício/s ao colector é também determinante, pois caso esta seja demasiado curta, o solvente não evapora completamente sendo obtido fibras com maior diâmetro.

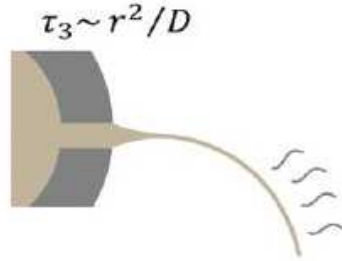


Figura 2.3 Diagrama das forças aplicadas durante a terceira etapa de formação de nanofibras pelo método de fiação centrífuga — evaporação do solvente (adaptado de Mellado *et al* [28]).

2.3.2.A importância da viscosidade e da velocidade angular

Melado *et al.* [28] verificaram a importância da viscosidade e da velocidade angular, μ e Ω , na formação das nanofibras, sendo responsáveis pelo aparecimento de três regimes. No primeiro regime, onde μ , Ω ou ambos os parâmetros têm valores suficientemente elevados, são formadas fibras contínuas, com poucas contas ou outros defeitos. Quando μ , Ω ou ambos os parâmetros diminuem para valores mais moderados sobressai o segundo regime de formação de fibras, sendo estas fabricadas com contas e/ou outros

defeitos. As contas e os defeitos que as fibras possam apresentar são formados quando o efeito centrífugo não é suficiente para ultrapassar a tensão superficial e alongar o jacto antes de este chegar ao colector. O terceiro regime é caracterizado por um valor baixo dos parâmetros μ , Ω ou ambos, não possibilitando o fabrico de fibras.

A equação 2.1 descreve o comportamento do raio da fibra, à medida que se aumenta μ e Ω , dentro do primeiro e segundo regimes. A transição entre os segundo e terceiro regime está associada ao tempo que o jacto demora a romper, dependente da tensão superficial, $\tau_c \sim \mu r / \sigma$. Estes autores verificaram que a velocidade angular mínima para que haja formação de fibra é descrita pela equação 2.2,

$$\Omega_c \sim \frac{\rho R_c^2 \sigma^2}{a^2} \mu^{-3} \quad (2.2)$$

Esta lei de potência determina a transição entre o segundo e terceiro estados.

3. Equipamento para fiação centrífuga de fibras

Neste capítulo é apresentado o projecto dos componentes que constituem o aparelho que permitirá a fiação centrífuga de fibras, sendo observadas e discutidas as alterações efectuadas ao longo da sua construção. Como o próprio nome indica, as fibras serão obtidas através de um efeito centrífugo. Assim, uma vez que esta está dependente da rotação, é necessário criar um movimento de rotação no reservatório cilíndrico, para que a solução ou fundido nele contido seja expelida e a fibra seja formada. Foi ainda incluído um sistema de aquecimento e controlo de temperatura para que seja possível a obtenção de fibras a partir de fundidos.

A construção do aparelho envolveu dimensionamento e desenho de parte dos seus componentes, enquanto outros foram adquiridos e usados tal como fabricados. O desenho destes foi realizado em *AutoCAD 2013*, uma vez que este mostrou ser um *software* bastante versátil e completo para o desenho técnico de componentes. Neste capítulo serão descritos todos os componentes, apresentando em detalhe as suas especificações.

3.1. Constituição do sistema de fiação centrífuga

Uma vez que o sistema de fiação centrífuga é constituído por vários componentes, é primeiramente apresentado o aparelho no seu todo, seguindo-se uma apresentação de cada componente, como se pode observar pela Figura 3.1 e Figura 3.2, respectivamente.

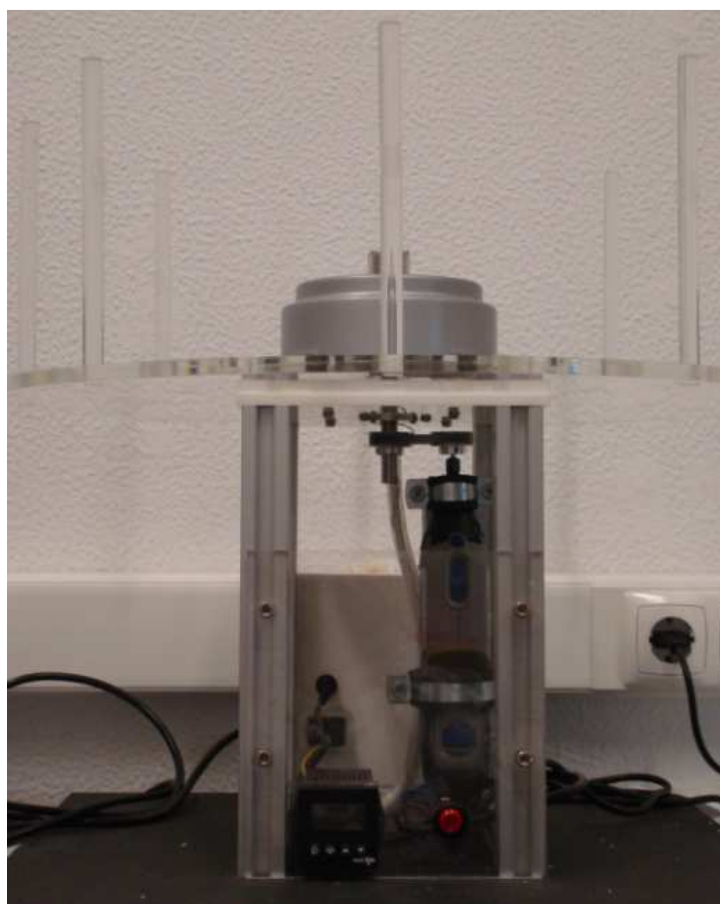
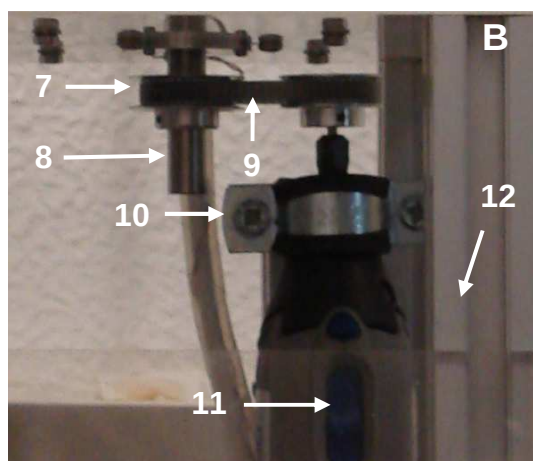
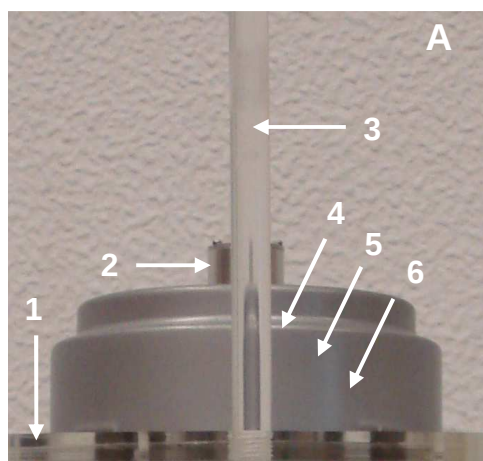


Figura 3.1 Equipamento de fiação centrífuga.



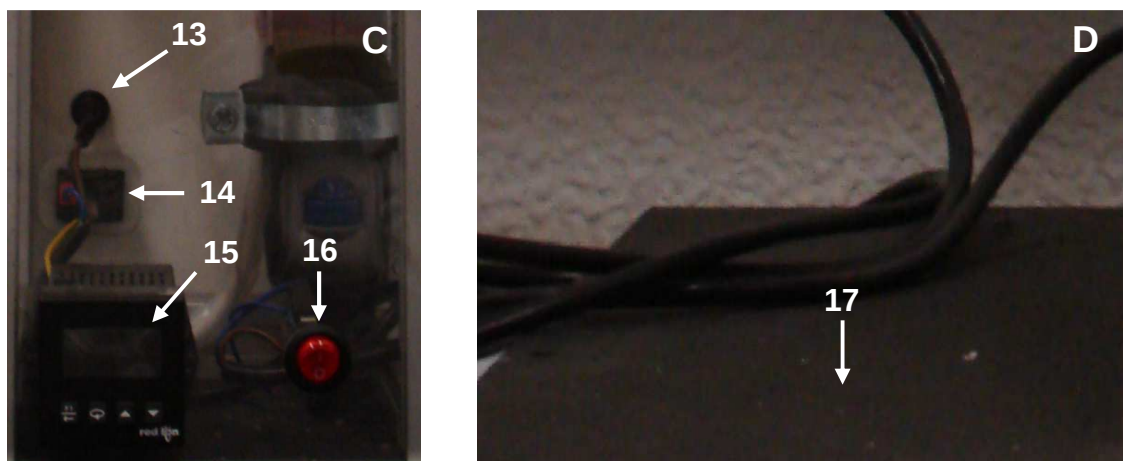


Figura 3.2 Componentes do aparelho de fiação centrífuga. A) 1 – Base do colector; 2 – Reservatório cilíndrico; 3 – Varão de suporte do colector; 4 – Grelha de aço inox com resistências de aquecimento (não se encontra visível); 5 – Rolamentos e seu suporte (não se encontra visível); 6 – Cúpula de protecção. B) 7 – Polia; 8 – Varão de 12 mm de diâmetro; 9 – Correia; 10 – Abraçadeira; 11 – Motor (*Dremel 4000*); 12 – Perfil *Rose+Krieger 4005000 30x30*. C) 13 – Fusível de 2 A; 14 – Local de inserção do cabo de alimentação para o controlo de temperatura; 15 – Controlador de temperatura *Red Lion T16*; 16 – Botão *on/off* do circuito de controlo de temperatura. D) 17 – Base em ardósia.

Uma vez apresentado o sistema e os seus componentes, os subcapítulos seguintes descrevem, com pormenor, cada componente a nível da sua função e das suas características.

3.2. Componentes de rotação e transmissão de movimento

Para a formação de fibras a partir da técnica de fiação centrífuga, a solução necessita de ser ejectada pelos orifícios do reservatório. Assim, o reservatório cilíndrico terá que girar em torno do seu próprio eixo a elevadas velocidades rotacionais. Uma forma de se conseguir um resultado aceitável é montar um sistema envolvendo um motor, eixos calibrados e maquinados, polias e correia. A velocidade de rotação terá que ser regulável, bastante elevada (entre os 5000 e 25 000 rpm) e o motor deverá ter uma potência suficiente para a atingir.

Em relação à montagem de componentes que possibilitem a rotação do reservatório, efectuaram-se ensaios para dois tipos de transmissão de movimento entre o motor e o reservatório: ligação directa e ligação indirecta. A primeira representa a ligação entre o motor e o reservatório apenas por um veio calibrado, directamente

inserido em ambos os componentes. A segunda reflecte uma montagem em que o veio que permite a rotação do reservatório se encontra inserido numa polia, dentada, que é posta a girar por intermédio de uma correia ligada a uma polia dentada aplicada no veio do motor. Após a realização de vários ensaios utilizando uma ligação directa entre o motor e o reservatório, verificou-se que este tipo de montagem não é o mais indicado, uma vez que, em caso de empeno (mesmo que ligeiro) do veio, o reservatório descreverá um movimento orbital em que o desequilíbrio de massas gera forças de atrito bastante elevadas que provocam um rápido desgaste do equipamento. Este desgaste prematuro aumenta o risco de falha do equipamento, o que por sua vez gera insegurança no seu manuseamento, para além de afectar a qualidade das fibras produzidas. Assim, como se verificou mais vantajoso, adoptou-se um sistema de ligação indirecta entre o motor e o reservatório cilíndrico com transmissão de movimento através de uma correia dentada.

3.2.1.Motor

Como referido anteriormente, para a produção de fibras é necessário que o reservatório cilíndrico gire a elevadas velocidades de rotação, pelo que o motor terá que poder ser controlado e ter uma potência máxima suficiente para permitir obter velocidades entre as 5000 e 25000 rpm. Por fim o factor preço foi também tomado em atenção na escolha final.

Após pesquisa de vários motores de fábrica, escolheu-se o *Dremel 4000* como motor a ser utilizado neste projecto, uma vez que, além de possuir todas as características inicialmente desejadas, já se encontra electronicamente pronto a usar, bastando, para isso, ligar o aparelho à tomada eléctrica e a sua estrutura é a ideal para satisfazer o projecto do aparelho inicialmente idealizado.

A nível de características técnicas deste motor, deve-se salientar a velocidade rotacional variável entre 5000 e 35000 rpm e a potência de 175 W.

3.2.2. Veio adaptador do motor

Para estabelecer a ligação indirecta entre o *Dremel 4000* e o reservatório cilíndrico é necessário projectar um adaptador para ser inserido na sua bucha e que na outra extremidade permita a ligação à polia mandante do sistema de transmissão de movimento.

O adaptador foi produzido, nas dimensões adequadas, por maquinação num torno mecânico a partir dum varão de latão. O adaptador (ver Figura 3.3) consiste num cilindro de 26 mm de altura, tendo, em extremidades opostas, diâmetros diferentes: 3 mm na base e 6 mm no topo. O latão foi escolhido por ser um material leve, económico, resistente e de fácil maquinação.



Figura 3.3 Representação, em *AutoCAD 2013*, do veio adaptador do motor à polia dentada mandante.

3.2.3. Polias e correias

Para a ligação entre veios, o do motor e o do reservatório cilíndrico, são utilizadas para transmissão de velocidade duas polias e uma correia dentadas. Os componentes foram adquiridos através do portal da empresa Belting Online na internet.

As polias (ver Figura 3.4) são de alumínio, sendo iguais entre si, ambas possuindo 30 dentes, espaçados 2,5 mm. Possuem ainda, cada uma, uma rosca fêmea M3 com o respectivo perno roscado que permite o bloqueio da polia no veio em que está inserida. A diferença reside no orifício central para encaixe dos veios. No caso da polia que encaixa no veio adaptador do *Dremel 4000*, esta possui um furo de 6 mm de diâmetro, enquanto a polia que encaixa no veio do reservatório cilíndrico tem uma furação com 12 mm de diâmetro.



Figura 3.4 Polia dentada do sistema de transmissão de movimento entre o motor e o reservatório.



Figura 3.5 Correia em poliuretano *Synchroflex* para transmissão de movimento entre o motor e o reservatório da solução polimérica.

Foi escolhida uma correia (ver Figura 3.5) em poliuretano *Synchroflex* reforçada com fio de aço, com um perímetro de 180 mm e com 72 dentes, para ligar as duas polias. Como estas possuem o mesmo número de dentes a razão de transmissão é unitária, ou seja, as suas velocidades de rotação são iguais.

3.2.4. Veio de rotação do reservatório cilíndrico

Finalmente, é necessário um veio para ligação da polia dentada mandada ao reservatório cilíndrico. Este veio necessita de uma especial atenção uma vez que as suas características, sejam elas a nível do material escolhido ou em relação à sua massa e diâmetro, a sua frequência de ressonância e, conseqüentemente, a sua vibração, afectarão o normal funcionamento do equipamento.

Inicialmente foi usado um veio de 12,5 cm de comprimento, 6 mm de diâmetro e de aço inox, soldado a uma pequena peça de latão com cerca de 3,3 cm de comprimento, com 3 mm de comprimento de veio roscado M8, em ligação directa com o motor. Porém, após vários ensaios, esta não se mostrou ser a melhor solução tanto a nível de segurança como a nível de produção de fibras, pois foi observada uma vibração elevada do sistema veio-reservatório a velocidades do motor na ordem das 10000 a 12500 rpm. A vibração sentida no veio, na peça de latão e, em especial, na rosca da peça de latão, era tal que, após vários ensaios, a rosca da peça de latão partiu, sendo o reservatório projectado.

Assim, para além de ter sido escolhido um sistema de ligação indirecta entre o reservatório cilíndrico e o motor, foi também projectado um novo veio de ligação ao reservatório, com características diferentes das do anterior. É, então, usado um varão de

aço inox da SKF com 12 mm de diâmetro, 20 cm de comprimento e com uma das extremidades do veio com rosca M10 ao longo de 9 cm, como mostra a representação em *AutoCAD 2013* na Figura 3.6.



Figura 3.6 Representação do veio para ligação do reservatório cilíndrico à polia mandada em *AutoCAD 2013*.

O aço inox da SKF foi escolhido devido à sua elevada resistência à flexão e durabilidade, apesar da sua maquinação exigir a utilização de tornos mecânicos de maior potência e ferramentas de corte de elevada qualidade.

3.2.5. Reservatório cilíndrico

O reservatório cilíndrico é o componente onde é colocada a solução polimérica ou fundido que irá ser fiado. Esta peça foi fabricada a partir de um varão de alumínio, tendo um diâmetro interno de 24 mm e um diâmetro externo de 30 mm, uma altura de 20 mm, com paredes de 3 mm de espessura, dois orifícios de 0,5 mm de diâmetro localizados na parede e distando 180° um do outro, por onde é expelida a solução, e uma rosca fêmea M10 na base que possibilita enroscar o reservatório ao veio. Adicionalmente, para que a solução permaneça no interior do reservatório, uma tampa com um furo de 10 mm de diâmetro é aparafusada no topo do mesmo.

Ao longo deste trabalho foram utilizados dois reservatórios cilíndricos, com dimensões e orifícios de diferente diâmetro. Inicialmente o reservatório utilizado era constituído por um cilindro de 35 mm de altura, 40 mm de diâmetro, uma espessura de paredes de 3 mm e uma rosca fêmea M8 na base com 4 mm de comprimento. Já os orifícios tinham 1 mm de diâmetro. Este reservatório, aliado ao veio anteriormente utilizado, mostrou que, apesar de produzir fibras poliméricas, não era o mais acertado devido à sua elevada massa, causando vibrações excessivas no sistema e pondo em risco a segurança do operador. Outro facto que veio apoiar tal constatação foi o elevado diâmetro das fibras produzidas. Assim, foi projectado um novo reservatório cilíndrico (ver Figura 3.7) com novas dimensões.

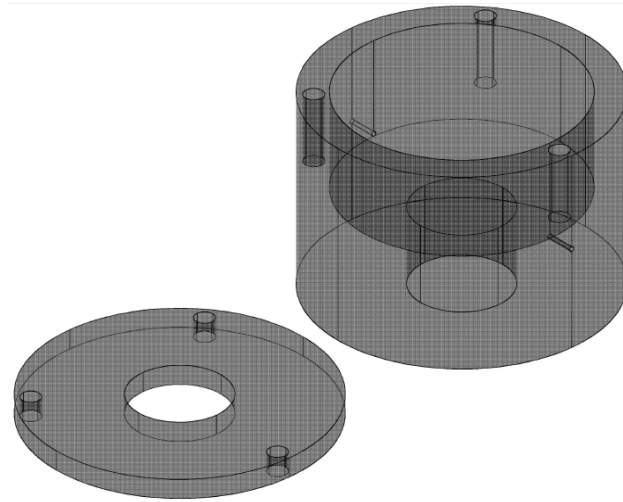


Figura 3.7 Representação da versão otimizada (segunda versão) do reservatório cilíndrico em *AutoCAD 2013*.

Todas as dimensões, sem excepção, foram reduzidas de maneira a reduzir a massa e, assim, a vibração existente no sistema. Esta mudança foi crucial no desenvolvimento do trabalho pois veio trazer mais segurança e durabilidade do aparelho.

3.2.6. Rolamentos do veio do reservatório cilíndrico

Devido aos problemas do primeiro veio de rotação, causados pelas vibrações, e de maneira a criar mais estabilidade e segurança no equipamento, foi projectado um sistema de rolamentos e respectivo suporte para minimizar a flexão do veio de rotação.

A partir de um varão de alumínio, utilizado pelas características já descritas, foi criado um suporte para fixação de dois rolamentos com um diâmetro interno de 12 mm. Este é constituído por dois locais para encaixe, sob pressão, dos rolamentos, em lados opostos do suporte, sendo atravessado de um lado ao outro por um furo de 13 mm que permite a passagem do veio de 12 mm. Para garantir que com a vibração ou velocidade de rotação elevada os rolamentos permaneçam imóveis e encaixados, estes locais de encaixe são fechados com tampas próprias para o efeito. Este componente, acompanhado pelas duas tampas, tal como foi descrito, pode ser observado na representação presente na Figura 3.8.

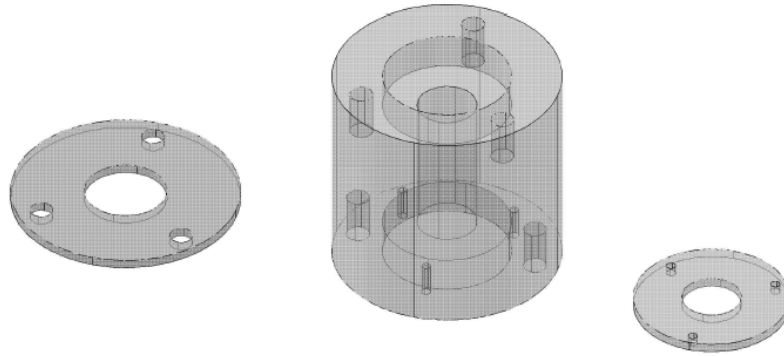


Figura 3.8 Representação do suporte para rolamentos do veio de rotação do reservatório cilíndrico em *AutoCAD 2013*.

Os rolamentos escolhidos foram o modelo 6001 2Z da NSK, encomendados no portal da internet da *RS Components*. Estes rolamentos além de possuírem um diâmetro interno de 12 mm, necessário para que o veio fique encaixado no rolamento, têm um diâmetro externo e altura de reduzidas dimensões, 28 mm e 8 mm respectivamente, uma velocidade máxima admissível de 32000 rpm e uma velocidade máxima aceitável para o óleo existente no interior dos rolamentos de 28000 rpm, sendo estas velocidades muito superiores às que irão suportar.

3.2.7. Batente do veio do reservatório cilíndrico

Após colocado em funcionamento todo o sistema verificou-se que, a rotações superiores a 10 000 rpm, o veio roscado ao reservatório cilíndrico deslizava pelos rolamentos, não permitindo uma correcta rotação do reservatório. Assim, foi projectado um batente inspirado na forma das polias utilizadas, como é observado na representação presente na Figura 3.9. Este componente não permite o deslizamento anteriormente verificado uma vez que se encontra preso ao veio, por meio de um perno roscado M3, e sob a zona de rotação do rolamento localizado no topo do suporte. Esta localização permite que o batente esteja solidário com o rolamento, garantindo um movimento sincronizado com o mesmo, não prejudicando o movimento do veio.

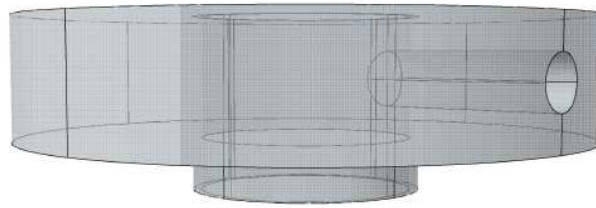


Figura 3.9 Representação do batente do veio de rotação do reservatório cilíndrico em *AutoCAD 2013*.

3.3. Sistema de aquecimento do reservatório cilíndrico

De maneira a ser possível obter fibras de polímeros fundidos, é necessário que o reservatório cilíndrico seja aquecido e que atinja temperaturas que permitam a fusão dos polímeros ou mantenham os polímeros fundidos com uma viscosidade que torne possível a sua ejeção pelos orifícios existentes no reservatório. Assim, foram usadas duas resistências de aquecimento de $70\ \Omega$, capazes de dissipar $10\ \text{W}$ de potência, inseridas numa grelha de aço inox.

O sistema de controlo da temperatura baseia-se na temperatura medida por um termopar, fazendo com que as resistências sejam ligadas, aquecendo, ou desligadas, até que seja atingida a temperatura pretendida. Verifica-se então um pseudo-controlo do tipo *On/Off*. O fluxograma presente na Figura 3.10 ilustra o modo de funcionamento deste sistema de aquecimento e controlo de temperatura.

O aquecimento do reservatório cilíndrico é então feito através do calor transportado pelo ar aquecido pelas resistências, aquecendo através dos fenómenos de condução e convecção. Como tal, a temperatura medida do termopar não é a do reservatório mas sim do ar que circunda as resistências.

Para controlar a temperatura medida no local onde se encontra o termopar, controlando a temperatura interna do reservatório, é necessário controlar as resistências, ligando-as e desligando-as. Para tal adquiriu-se um controlador de temperatura *T16100000*, da *Red Lion*.

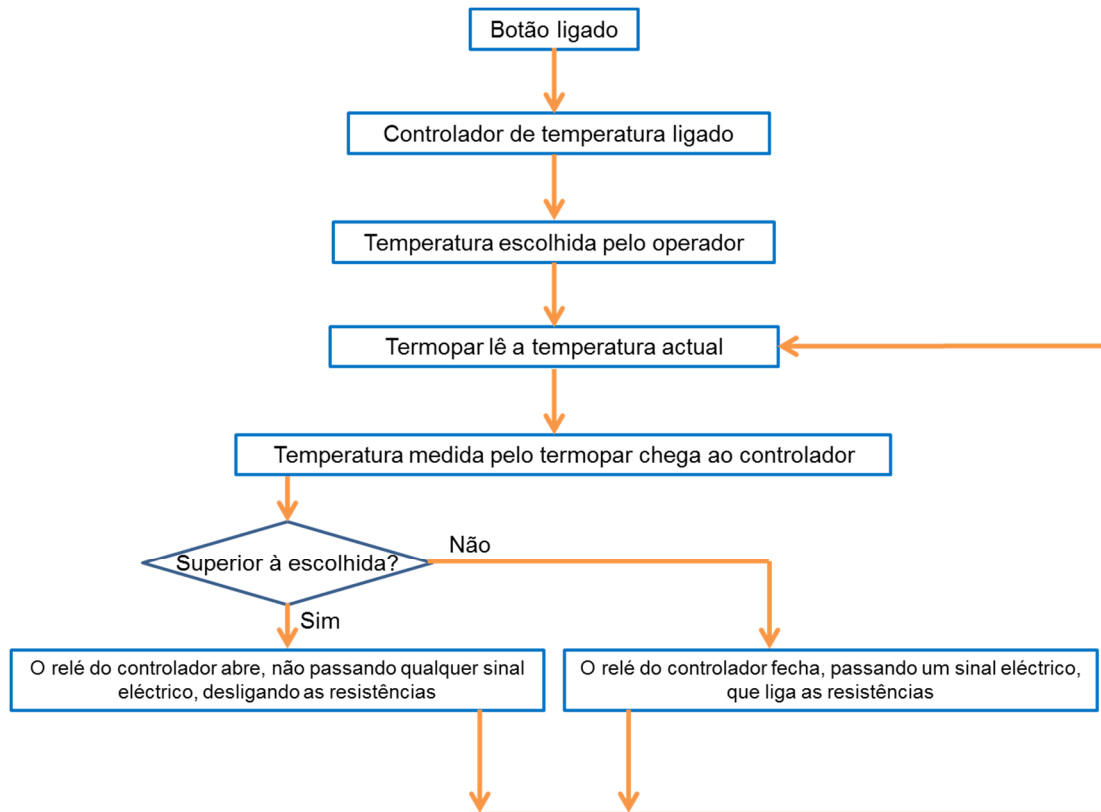


Figura 3.10 Fluxograma ilustrativo do funcionamento do sistema de controlo de temperatura do reservatório cilíndrico.

O sistema de controlo deste aparelho é efectuado por um relé que fecha ou abre o circuito de alimentação eléctrica das resistências de aquecimento. O funcionamento deste relé é semelhante ao de um interruptor, ligando a alimentação das resistências de aquecimento sempre que a temperatura medida no termopar é inferior à temperatura seleccionada pelo operador e desligando sempre que a temperatura lida pelo termopar é superior à seleccionada no controlador de temperatura. O controlador de temperatura é alimentado directamente a partir da rede eléctrica e foi montado no painel frontal do equipamento, onde se instalou também o respectivo interruptor da alimentação eléctrica. A sua instalação, conexão e programação foram efectuadas conforme as indicações do fabricante, disponíveis na folha de especificações do aparelho.

Para medição da temperatura foi escolhido um termopar T, constituído por uma liga de cobre e constantan, adequado para medir temperaturas entre -200°C e 400°C.

As resistências de aquecimento e a grelha de aço inox em que estão inseridas são adaptadas de um aparelho de algodão doce *Princess 292993* (ver Figura 3.11).

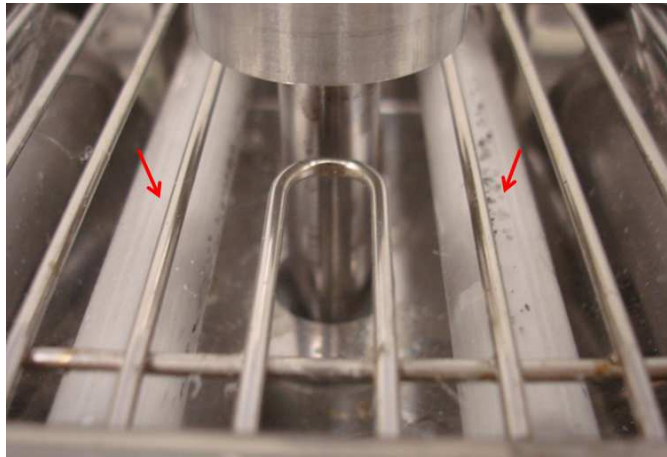


Figura 3.11 Resistências de aquecimento do reservatório cilíndrico (setas a vermelho).

3.4. Componentes de suporte

Para que o equipamento de fiação centrífuga funcione nas melhores condições possíveis, é necessário que os componentes sejam fixados numa estrutura rígida capaz de absorver as vibrações do motor. O dimensionamento da estrutura teve em conta a altura do *Dremel 4000*, uma vez que este, para facilidade de construção e manuseamento se encontra montado na vertical. Foram então dimensionados vários componentes, nomeadamente a base, em ardósia, a estrutura em perfil *Rose+Krieger* 30x30, e os painéis frontal, traseiro e de topo. Os painéis foram fabricados em acrílico, uma vez que este é um bom isolador, resistente, de fácil maquinação e esteticamente agradável à vista.

3.4.1. Base e estrutura de suporte

Devido à elevada vibração inicialmente verificada no equipamento, considerou-se necessário fixar a estrutura de apoio a uma base rígida, resistente à flexão, e com uma massa elevada, para permitir uma maior absorção da energia de vibração. A escolha recaiu sobre uma pedra de ardósia, quadrada, com cerca de 60 cm de lado e 5 cm de espessura, pesando aproximadamente 40 kg, onde foram feitos quatro furos com rosca M10 para ligação ao perfil *Rose+Krieger* que suporta os vários componentes do equipamento.

A versatilidade do perfil 4005000 30x30, da *Rose+Krieger* (ver Figura 3.12), possibilita criar diferentes estruturas. Este perfil tem uma elevada robustez pelo que foi o escolhido para construir a estrutura de suporte do equipamento de fiação centrífuga.

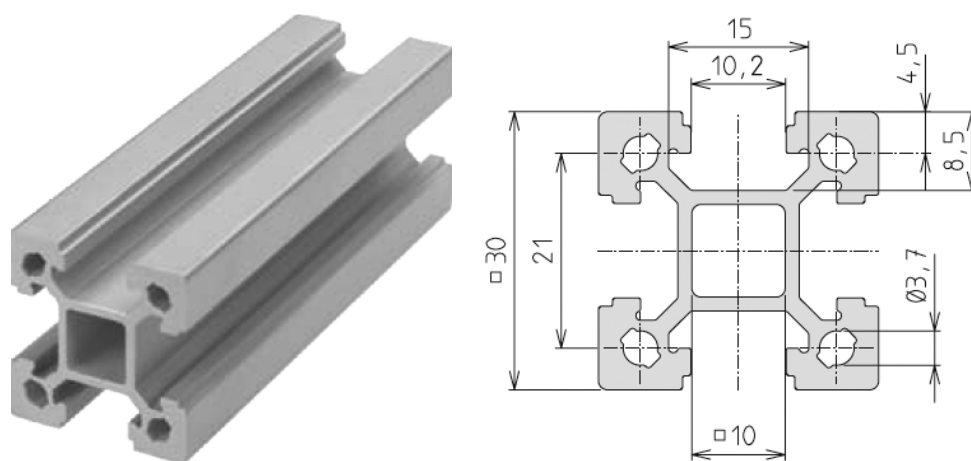


Figura 3.12 Perfil 30x30 *Rose+Krieger* 40050000 utilizado na estrutura do equipamento.

3.4.2. Painéis

No painel de topo (ver Figura 3.13) localiza-se tanto a grelha com as resistências como o suporte para os rolamentos. Como estes componentes necessitam de se encontrar correctamente fixados, é de elevada importância a correcta execução da peça.

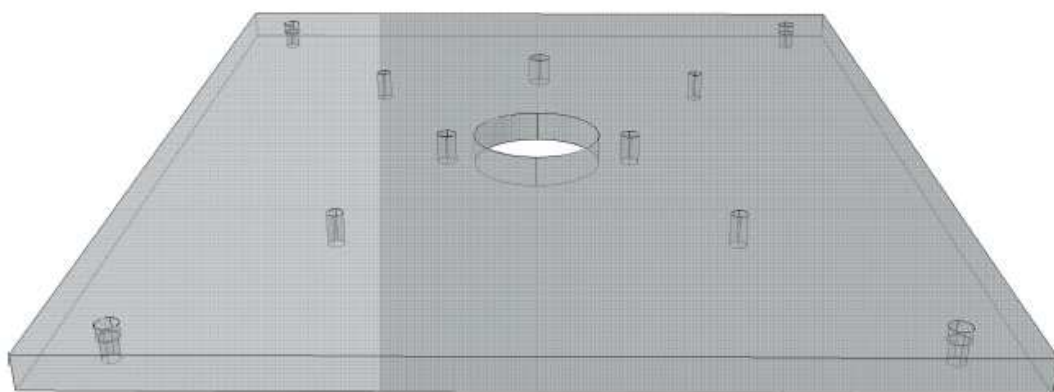


Figura 3.13 Representação da estrutura de suporte de topo em *AutoCAD 2013*.

No painel frontal, observável na Figura 3.14, situam-se os locais para encaixe do controlador de temperatura, bem como para o encaixe do respectivo interruptor de ligação da alimentação eléctrica. Outra funcionalidade deste painel é criar uma barreira

de protecção entre as ligações eléctricas efectuadas para funcionamento do aparelho, nomeadamente o funcionamento do sistema de controlo de temperatura, e o utilizador.

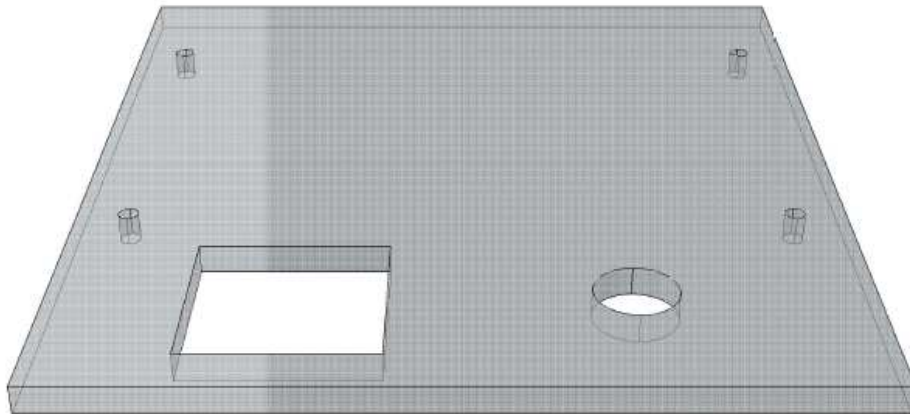


Figura 3.14 Representação do painel frontal do equipamento em *AutoCAD 2013*.

À semelhança do painel anterior, também o painel traseiro (ver Figura 3.15) possui locais de encaixe para componentes do equipamento: um fusível e uma tomada que permite a alimentação do sistema de aquecimento e controlo da temperatura. Também aqui está presente a funcionalidade de barreira de protecção às ligações eléctricas do aparelho.

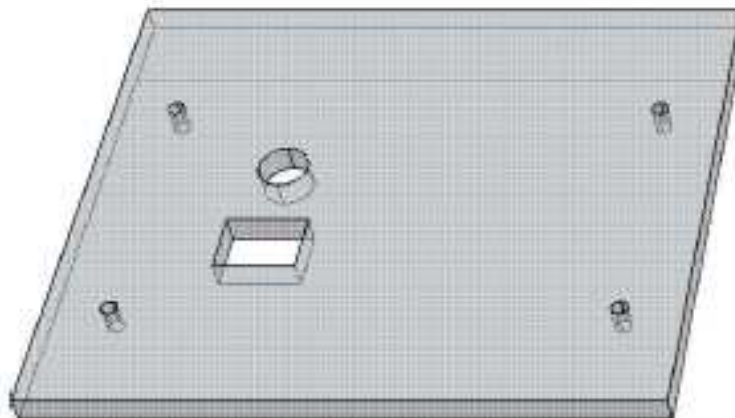


Figura 3.15 Representação do painel traseiro do equipamento em *AutoCAD 2013*.

3.5. Outros componentes

O fusível foi dimensionado tendo em conta que a potência consumida pelas resistências é de 10 W e que a tensão de entrada é de 230 V eficazes. Então, se admitirmos não

existirem perdas, a corrente eficaz de entrada será de 0,04 A. Para garantir a segurança do circuito, caso haja algum pico de corrente, é utilizado um fusível de 2 A.

Para fixar o *Dremel 4000* na vertical foram utilizadas duas abraçadeiras de diâmetros diferentes e adaptáveis, com uma porca de conexão M10. A vantagem destas abraçadeiras é o seu revestimento, que absorve uma grande parte das vibrações do motor, atenuando a sua transmissão para a estrutura. Possuem ainda um fecho controlável, por meio de dois parafusos, que facilita a sua montagem no motor.

A cúpula de protecção das resistências de aquecimento é um componente útil para a protecção da grelha com as resistências e do suporte dos rolamentos. Este componente foi, à semelhança de outros, retirado de uma máquina de algodão doce *Princess 292993*.

Os espaçadores da grelha de resistências (ver Figura 3.16) têm como função colocar a grelha e a cúpula de protecção a alturas devidas, de maneira a que todos os componentes tenham um encaixe correcto.

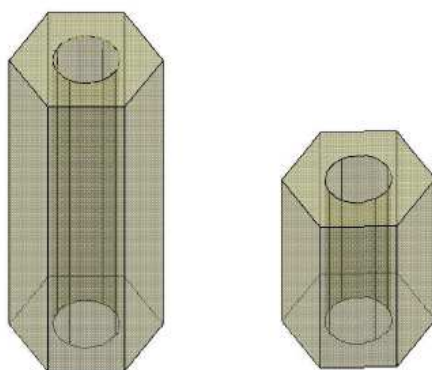


Figura 3.16 Representação dos espaçadores da grelha de resistências, à esquerda, e da cúpula de protecção, à direita, em *AutoCAD 2013*.

Para proteger o operador e/ou colectar as fibras poliméricas produzidas, foram projectados e construídos oito varões de acrílico (ver Figura 3.17), iguais entre si. Estes varões enroscam na base do colector, criando os suportes necessários para a colocação do colector, têm um comprimento de 20 cm e um diâmetro de 12 mm, dispendo de uma rosca M10.



Figura 3.17 Representação dos varões para suporte do colector, em *AutoCAD 2013*.

Para se montar um colector amovível, existindo possibilidade de o mover entre várias formações geométricas e diferentes diâmetros, dimensionou-se uma base com 55 cm de diâmetro, com um furo central de 15 cm de diâmetro e com 24 furos roscados M10 correspondendo a três circunferências com diferentes diâmetros, 27,5 cm, 37,5 cm e 47,5 cm, tendo cada uma 8 furos. O desenho desta base foi efectuado em *AutoCAD 2013*, tendo sido entregue a oficinas de corte de acrílico para devida construção, como é possível observar na Figura 3.18.

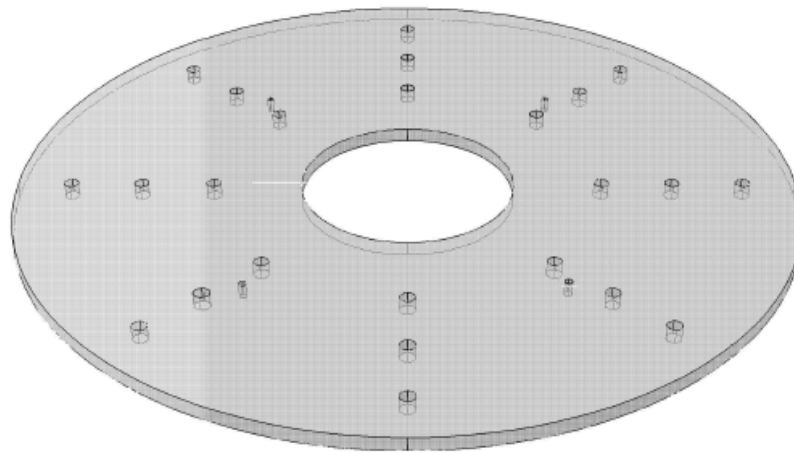


Figura 3.18 Representação da base do colector em *AutoCAD 2013*.

3.6. As duas gerações do aparelho de fiação centrífuga

Ao longo deste trabalho foram sendo projectados, adicionados e substituídos alguns componentes ao sistema de fiação centrífuga, de maneira a corrigir falhas detectadas, com vista a melhorias do desempenho do aparelho e à obtenção de fibras com características o mais próximo do desejado.

Neste subcapítulo será observada a evolução do aparelho de fiação centrífuga ao longo do projecto, apresentando-se de forma breve as razões pelas quais cada componente foi substituído ou adicionado. É possível desde já referir que todas as mudanças efectuadas permitiram diminuir a vibração verificada anteriormente, tornando o aparelho de 2^o geração muito mais fiável, resistente e seguro, oferecendo melhores resultados. No apêndice B é possível observar o aparelho de primeira geração.

3.6.1. Reservatório cilíndrico

Após vários ensaios verificou-se a necessidade urgente de conceber um novo reservatório cilíndrico. Esta urgência deriva do facto do reservatório presente na 1ª geração do aparelho ter elevadas dimensões, fazendo com que este possua uma massa elevada, sendo esta uma das causas para a vibração do eixo. Outro problema que suportou a mudança deste componente reside nas características das fibras obtidas, tendo estas diâmetros superiores aos desejados. Como resolução das adversidades verificadas foi projectado um novo reservatório cilíndrico com características melhoradas, como é possível observar na Figura 3.19. Observa-se uma redução das dimensões do reservatório para cerca de metade. De salientar que a rosca criada na base do reservatório para a ligação ao veio foi aumentada de M8 para M10 e de uma profundidade de 4 mm para 9 mm, oferecendo uma melhor fixação e consequentemente, maior segurança. Já em relação aos orifícios, de maneira a garantir fibras mais finas, o diâmetro foi reduzido de 1 mm para 0,5 mm.



Figura 3.19 Reservatório cilíndrico de 2ª geração, à esquerda, e reservatório cilíndrico de 1ª geração, à direita.

3.6.2. Suporte do rolamento do veio do reservatório cilíndrico

Este componente foi idealizado para evitar a vibração susceptível de ser causada pela massa do reservatório e do veio. Para esta prevenção, o suporte para rolamentos (ver Figura 3.20) e os rolamentos permitem que a trajectória do veio seja realizada com a menor flexão do veio possível, diminuindo a ocorrência de vibrações. De notar que este componente não se encontrava presente na 1ª geração do aparelho.



Figura 3.20 Suporte dos rolamentos do veio do reservatório (vista de baixo e sem tampa).

3.6.3. Sistema de ligação indirecta com duas polias e uma correia

Na 1ª geração (ver Figura 3.21-A) foi utilizado um sistema de ligação directa entre o motor e o reservatório cilíndrico. Porém, após vários ensaios, verificou-se que este tipo de ligação não era o aconselhável para este sistema, uma vez que ao mínimo empeno do veio a vibração aumentava drasticamente, danificando não só o equipamento mas também prejudicando a formação de fibras poliméricas.

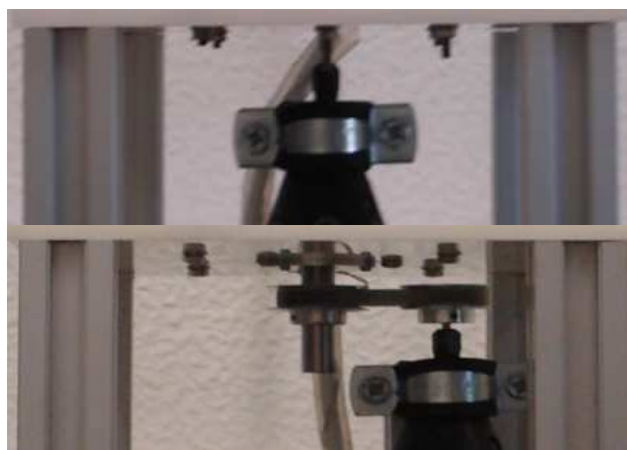


Figura 3.21 Ligação directa (A) e ligação indirecta (B) para transmissão de movimento entre o motor e o reservatório cilíndrico.

Para evitar as desvantagens do empeno do veio foi projectado um sistema de transmissão indirecta de movimento (ver Figura 3.21-B) entre o motor e o reservatório, tendo-se para isso recorrido a duas polias dentadas, uma correia, também dentada, e um veio adaptado ao motor. Este tipo de ligação veio dar mais firmeza à rotação do reservatório, diminuindo a vibração.

3.6.4. Veio de rotação do reservatório cilíndrico

À semelhança das mudanças efectuadas no reservatório cilíndrico, também o veio de rotação foi mudado pois, após vários ensaios, a vibração sentida pelo veio era tal que a peça de latão soldada ao mesmo quebrou, tendo o reservatório sido projectado pelo ar.

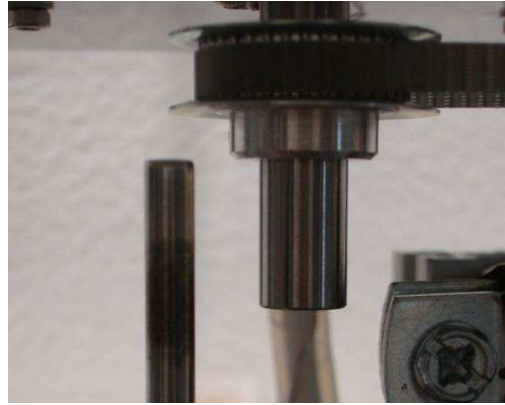


Figura 3.22 Veio de rotação do reservatório cilíndrico da 1ª geração (A) e da 2ª geração (B) à direita.

Assim, concebeu-se um novo veio (ver Figura 3.22), mais resistente, com o dobro do diâmetro, tendo o comprimento da rosca passado para o dobro e de M8 para M10. Com estas alterações a vibração foi minimizada e a segurança aumentada.

3.6.5. Base em ardósia

Devido à elevada vibração provocada pelo reservatório cilíndrico e pelo veio, toda a estrutura de suporte em perfil, do aparelho de 1ª geração, vibrava, prejudicando o seu funcionamento. Para que tal não ocorra, foi projectada uma base em ardósia, com 60 cm de comprimento e largura, que eficazmente estabiliza o equipamento.

4. Materiais e métodos

Neste capítulo são descritos os materiais e métodos utilizados para a produção de fibras de PCL através da técnica de fiação centrífuga, bem como os métodos utilizados para a caracterização das referidas fibras.

4.1. Materiais

No decorrer deste trabalho foi utilizada a policaprolactona (PCL) com um peso molecular de 70000-90000 kDa, da empresa *Sigma-Aldrich* e dois solventes, o diclorometano (DCM), da empresa *António M. S. Cruz, Material Laboratório, Lda*, e o 1,4 - dioxano, marca *Panreac* e com um grau de pureza de 99,5 %.

4.2. Obtenção de fibras de PCL

As fibras de PCL são obtidas através da ejeção da solução polimérica ou polímero fundido pelos orifícios existentes no reservatório cilíndrico, quando este gira a elevadas velocidades rotacionais. Assim, primeiramente é necessário preparar as soluções antes de se colocar o equipamento em funcionamento.

4.2.1.Preparação das soluções

Neste trabalho foram produzidas dois tipos de soluções: soluções de PCL em DCM, variando a concentração de PCL entre 1 % e 20 %, e soluções de PCL em 1,4 - dioxano, produzindo-se quatro soluções com concentrações de, 5 %, 10 %, 15 % e 20 % de PCL. Todas as concentrações referidas neste trabalho referem-se à razão entre a massa de PCL relativamente à massa total da solução.

Para a preparação das soluções, após efectuados os cálculos das quantidades necessárias de polímero e de solvente necessários para obtenção da solução com a concentração desejada, colocaram-se os grânulos de PCL em DCM ou em 1,4 - dioxano. As misturas foram colocadas, durante algumas horas, em agitação, por agitadores magnéticos e placas de agitação, até ser possível observar a total dissolução do polímero e, assim, observarem-se soluções homogêneas.

4.2.2.Fiação Centrífuga

Para a fiação centrífuga de fibras e a sua recolha, além do aparelho projectado é necessário utilizar outros equipamentos e materiais que se encontram identificados na Tabela 4.1. De seguida é descrito o protocolo utilizado para a obtenção de fibras a partir de soluções poliméricas.

Tabela 4.1 Equipamento e material utilizado num ensaio de fiação centrífuga.

Equipamento/Material	Fabricante – Modelo/Especificações
Equipamento de fiação centrífuga	-----
Cartão	-----
Folha de alumínio comercial	-----
Solução polimérica	-----
Seringa graduada	Braun 1 mL, 5mL, 10 mL

1. Coloca-se a folha de alumínio comercial, com recurso a fita-cola, nos varões de acrílico, de maneira a montar-se o colector/protecção para o operador;
2. Forra-se o cartão, que serve de colector das fibras produzidas, com folha de alumínio comercial, sendo colocado a circundar o reservatório;

3. Coloca-se a solução polimérica, previamente preparada, na seringa, escolhendo o volume dependendo do tipo de deposição desejada;
4. Liga-se o motor do aparelho (*Dremel 4000*), seleccionando a velocidade de rotação desejada;
5. Insere-se a solução polimérica no reservatório em rotação, com um caudal o mais constante possível;
6. Após toda a solução ter sido ejectada pelos orifícios do reservatório, diminui-se a velocidade de rotação do motor até ao mínimo, desligando-se o aparelho.
7. Recolhe-se a folha de alumínio com as fibras produzidas.
8. Retira-se a tampa do reservatório, procedendo-se à sua limpeza com papel e acetona.

Devido à massa e atrito dos componentes intervenientes na ligação indirecta entre o reservatório e o motor, a velocidade seleccionada no *Dremel 4000* não corresponde à velocidade do reservatório. Como tal, recorrendo-se a um tacómetro RS 163-5348, obteve-se os valores reais de velocidade de rotação do reservatório. Estes valores encontram-se na Tabela 4.2, apresentada abaixo.

Tabela 4.2 Correspondência entre as velocidades de rotação seleccionadas no motor com as velocidades de rotação real, obtidas pelo tacómetro RS 163-5348.

Velocidade de rotação indicada no <i>Dremel 4000</i> (rpm)	Velocidade de rotação real (rpm)
5000	2100
7500	2550
10000	4100
12500	6900
15000	10350
17500	16500
20000	16800
22500	17200
25000	18500

4.3. Caracterização das soluções

Para melhor compreensão dos resultados, é necessário caracterizar as soluções poliméricas quanto à sua viscosidade de corte e tensão superficial. Neste subcapítulo são explicados os métodos utilizados na determinação destas características.

4.3.1. Reologia

Segundo a sociedade europeia de reologia (ESR), a reologia é a ciência que estuda a deformação e fluxo da matéria [29].

A viscosidade de corte de um fluido representa a sua resistência à deformação gradual que sofre quando colocado em situações de tensão, descrevendo a fricção que existe internamente entre moléculas. Quantitativamente, a viscosidade de corte é definida por dois parâmetros: a tensão de corte τ e a taxa de corte $\dot{\gamma}$. A relação entre estas duas grandezas é indicativa do comportamento do fluido como newtoniano, não newtoniano, pseudoplástico ou dilatante, como é observado na Figura 4.1.

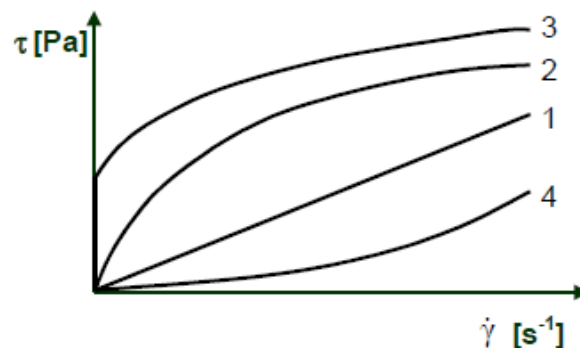


Figura 4.1 Curvas de fluxos de materiais newtonianos (1), pseudoplásticos (2), plásticos (3) e dilatantes (4) (Adaptado de Rheotec [30]).

Para se obter as medidas de viscosidade de corte e as curvas de fluxo das soluções utilizou-se o reómetro rotacional *Bohlin Gemini^{nano}* com sistema de prato e cone do fabricante *Malvern Instruments*. Este tipo de reómetro aplica uma tensão de corte crescente entre duas superfícies sendo que uma delas, o cone, se encontra em rotação. Este aparelho permite obter curvas de fluxo de dois métodos diferentes: o método de força controlada e o método de deformação controlada.

As medições foram efectuadas em modo de deformação controlada. Nestas medidas é aplicada uma deformação de corte à solução, resultante do movimento de rotação do cone sobre o prato fixo, e é medido o torque resultante. O torque dá origem à força de corte e através desta determina-se a viscosidade de corte da solução. Para efectuar as medições, utiliza-se um sistema de cone e prato (diâmetro de 50 mm e 1° de inclinação, para as soluções de concentrações de 1 % e 2 % de PCL e diâmetro de 40 mm e 2° de inclinação para as restantes), sendo aplicado um pré-corte para garantir um estado estacionário.

4.3.2. Tensão superficial

A tensão superficial é a medida de energia de coesão presente numa interface. Isto é, as moléculas de um líquido atraem-se umas às outras, interagindo entre si e estando em equilíbrio devido à existência de uma força atractiva presente em todas as direcções, como se pode evidenciar na Figura 4.2 [31].

A medição da tensão superficial das soluções utilizadas no decorrer do trabalho foi efectuada num dispositivo de medição óptica *CAM101* do fabricante KSV NIMA. As medidas foram obtidas mediante uma análise computadorizada de uma gota da solução na ponta de uma agulha - o método *Pendant Drop*.

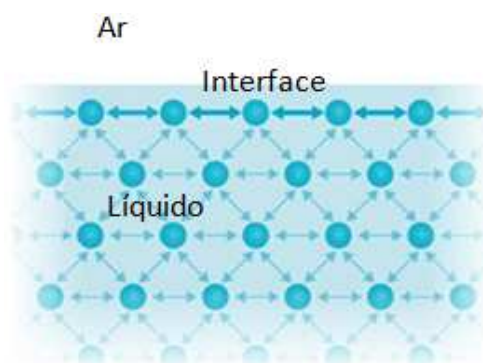


Figura 4.2 Diagrama representativo da interacção molecular de um líquido com uma interface, o ar (adaptado de Atension [31]).

Este tipo de aparelhos com o sistema *Pendant Drop* é extremamente útil na medição da tensão superficial, não só pela sua fiabilidade e rapidez, mas também porque possibilita a análise da tensão superficial apenas com uma gota, ideal para situações em

que a quantidade de solução é limitada. De referir que, para um resultado mais exacto, foram realizadas cinco medidas para cada concentração.

Num aparelho típico de medição de tensão superficial, é usada uma câmara CCD para capturar as imagens das gotas formadas na seringa ou capilar, sendo visionadas em tempo real no ecrã de um computador e podendo ser guardadas e tratadas posteriormente. Para obtenção da tensão superficial de um fluido, o *software* de processamento de imagem é usado, transformando a imagem da gota obtida num perfil [32], como é observado na Figura 4.3.



Figura 4.3 Perfil de gota obtida pelo aparelho *CAM101* da *KSV NIMA*.

4.4. Caracterização das fibras

Para a análise e discussão dos resultados obtidos são analisadas e caracterizadas as fibras produzidas. As fibras são caracterizadas a nível morfológico, a nível estrutural e, finalmente, a nível biológico (adesão e proliferação celular).

A nível morfológico, através da microscopia electrónica de varrimento, é possível observar os diâmetros, a porosidade, o alinhamento e os defeitos das fibras. A nível estrutural, é utilizada a difracção de raios-X para quantificar a cristalinidade de fibras provenientes de soluções com solventes diferentes, o DCM e o 1,4 - Dioxano. Por fim são utilizadas as fibras como sementeiras de células, de forma a observar o comportamento destas a nível de aderência, proliferação e orientação nas fibras.

4.4.1. Microscopia Electrónica de Varrimento

Desde a sua invenção, o microscópio electrónico tem sido uma ferramenta de elevada utilidade no desenvolvimento da actividade científica, nomeadamente em medicina, biologia e ciências materiais, pois possibilita a observação e caracterização de materiais à escala micro e submicrométrica. Este tipo de microscópios foi desenvolvido devido às limitações dos microscópios ópticos [33].

A microscopia electrónica de varrimento é então utilizada devido à sua elevada resolução, possibilitando a caracterização morfológica das fibras produzidas, tendo sido utilizado o aparelho Zeiss DSM 962, do CENIMAT/I3N.

Antes de se obter qualquer imagem neste aparelho, é necessário ter especial cuidado no tratamento da amostra. Esta é colocada num suporte adequado constituído por discos de alumínio com 4 cm de diâmetro, em contacto com fita de carbono da *Agar Scientific*. Após esta montagem, a amostra é revestida com ouro, tendo sido utilizado o aparelho *Agar Sputter* da *Agar Scientific* para este efeito. A fita de carbono e a camada de ouro na amostra são utilizadas para que as amostras se tornem condutoras, melhorando o contraste da imagem obtida. Na Figura 4.4 é possível observar uma imagem da montagem das amostras.

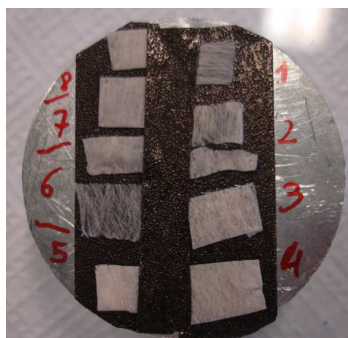


Figura 4.4 Amostras de fibra para análise morfológica por SEM.

4.4.2. Difracção de raios-X

A difracção de raios-X é uma técnica que permite analisar estruturalmente um material, sendo usada para identificação qualitativa de substâncias cristalinas, determinação da estrutura cristalina do material, determinação do tamanho da cristalite, entre outros [34]. Neste caso, a difracção de raios-X é utilizada como meio de análise do tamanho da

cristalite e, assim, na quantificação da cristalinidade das fibras produzidas utilizando solventes diferentes.

As medições efectuadas foram realizadas no difractómetro X’Pert PRO MRD, do CENIMAT/I3N.

4.4.3. Culturas Celulares

Foram realizados testes de cultura celular com o objectivo de se avaliar a adesão e proliferação celular nas fibras produzidas e verificar sua organização pós-diferenciação. Utilizou-se a linhagem celular C2C12, uma linhagem de mioblastos de rato. A utilização destas células é justificada pelo facto de se poderem diferenciar em miofibrilas, organelos tubulares dispostos em feixes longitudinais, tal como as fibras produzidas. É, assim, de elevado interesse verificar se a diferenciação das células em miofibrilas é orientada pelo alinhamento das fibras que lhes servem de substrato.

No apêndice C encontra-se o protocolo experimental utilizado nas culturas celulares realizadas.

5. Caracterização das soluções poliméricas

Como a técnica de fiação centrífuga de polímeros é ainda muito recente, os parâmetros das soluções que influenciam a formação de fibras poliméricas ainda não se encontram totalmente descritos na literatura, que prima por ser ainda escassa. Após revisão bibliográfica, verifica-se que o único parâmetro estudado para este sistema e para a solução utilizada é a concentração da mesma, tendo sido demonstrado por McEachin e Lozano [4] que a concentração de polímero ideal é de 18 %. Uma vez que o aparelho de fiação centrífuga projectado não possui todas as características do aparelho apresentado McEachin e Lozano, é necessário determinar a concentração ideal para produzir fibras poliméricas no aparelho construído, devido à possibilidade desta poder ser diferente. Neste capítulo são analisadas as propriedades das soluções utilizadas, nomeadamente a tensão superficial e a viscosidade de corte, parâmetros com um papel preponderante na formação de fibras através deste sistema

Produziram-se vinte soluções com concentrações diferentes de PCL, entre 1 % e 20 %, usando DCM como solvente. A análise da morfologia das fibras produzidas irá determinar a concentração e os parâmetros de funcionamento do equipamento que permitirão obter os melhores resultados.

5.1. Tensão superficial

A partir das medidas de tensão superficial obtidas construiu-se o gráfico representado na Figura 5.1, mostrando a relação entre a tensão superficial e a concentração de PCL.

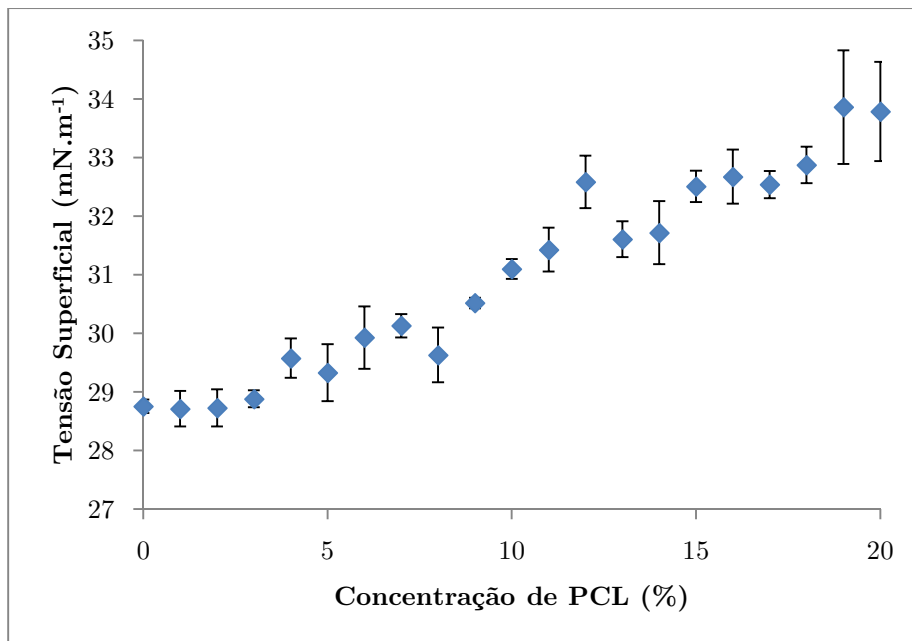


Figura 5.1 Variação da tensão superficial com a concentração de polímero na solução.

Constata-se, a partir da observação do gráfico, que a tensão superficial, de uma forma geral, vai aumentando à medida que a concentração de PCL também aumenta. Tal pode ser explicado pelo aumento do efeito atractivo entre as moléculas de polímero e as moléculas do DCM. Porém, é possível verificar que para 1 % e 2 % a tensão superficial da solução é um pouco menor que a tensão superficial do solvente no estado puro, sendo uma explicação possível o facto das moléculas de PCL estarem em muito menor número que as moléculas de DCM, havendo um arranjo molecular que favoreça a descida da tensão superficial.

5.2. Viscosidade de corte

Na Figura 5.2 encontram-se as curvas de fluxo de algumas das soluções estudadas.

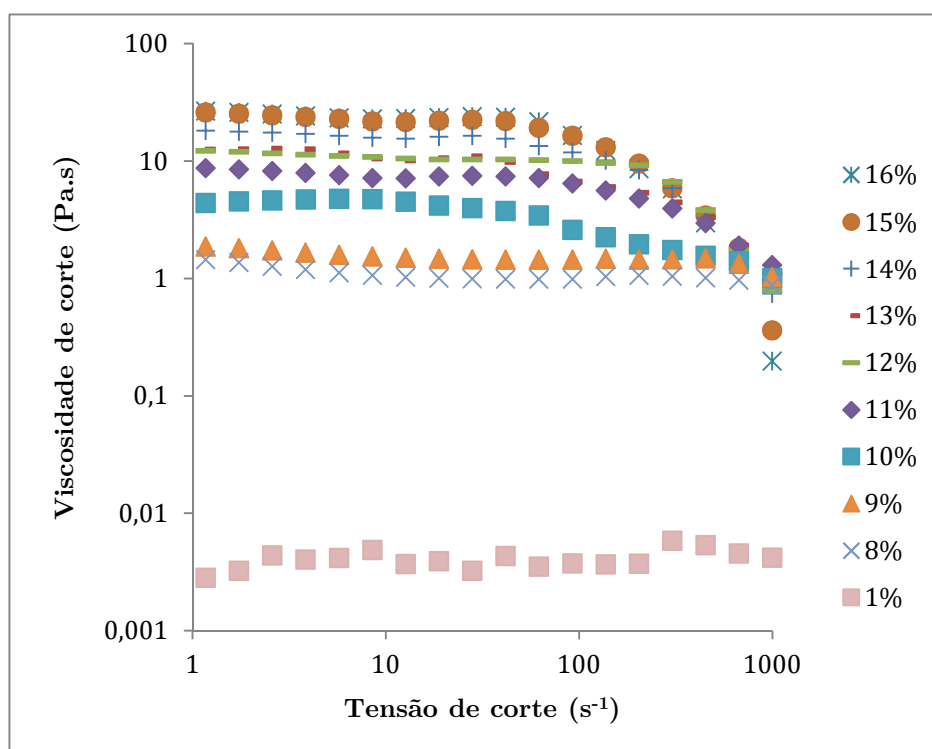


Figura 5.2 Variação da viscosidade de corte com a aplicação de uma tensão de corte para soluções de 1, 8 – 16%.

Através do cruzamento da informação proveniente das tabelas de resultados do apêndice D com este gráfico é possível concluir que apenas nas soluções que se afastam de um comportamento newtoniano (com comportamento pseudoplástico) é que é possível observar a formação de fibras poliméricas. O resultado observado não é de todo inesperado, uma vez que é a partir de soluções com características pseudoplásticas que é possível verificar o entrelaçamento entre as cadeias poliméricas, que possibilita o estiramento da solução e a formação da fibra.

6. Análise e discussão de resultados:

Caracterização de fibras de PCL obtidas por fiação centrífuga

Para a caracterização das fibras de PCL produzidas ao longo deste projecto foram realizados ensaios a vários parâmetros, não só do equipamento de fiação centrífuga mas também das soluções, de maneira a ser possível perceber de que modo é que cada parâmetro influencia as características das fibras de PCL produzidas, nomeadamente no seu diâmetro, no seu alinhamento e na formação de contas e/ou defeitos. Os parâmetros sobre o qual reflectiram o estudo realizado foram a concentração da solução, a velocidade de rotação do reservatório, o solvente utilizado na solução e diferentes diâmetros de colectores. Após a análise dos resultados obtidos, foi possível determinar quais os parâmetros ideais para a produção de fibras e de que modo é que estes influenciam essa mesma produção.

Ao longo deste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos, definindo um conjunto de parâmetros para a produção de fibras e procedendo-se à variação individual de cada um, mantendo-se os restantes constantes. Assim será possível determinar os intervalos de valores, para cada parâmetro, em que as fibras

produzidas apresentam resultados mais satisfatórios. Os estudos efectuados revelaram uma elevada dependência do processo de formação de fibras dos parâmetros testados.

6.1. Descrição dos parâmetros estudados

Como se verá nos subcapítulos seguintes, são analisados individualmente os vários parâmetros estudados ao longo do trabalho. Neste capítulo introdutório são apresentadas as alterações nas variáveis estudadas, em forma de tabela, para que o leitor tenha conhecimento de todos os ensaios realizados ao longo deste trabalho, de uma forma rápida e de fácil leitura. Os parâmetros e os valores usados nos ensaios podem ser consultados em pormenor no apêndice A e encontram-se resumidos nas Tabelas 6.1 e 6.2 em que se usou o DCM e o 1,4 - dioxano como solventes, respectivamente. De notar que a utilização do reservatório com orifícios de 1 mm de diâmetro foi efectuada em ligação directa. Neste tipo de ligação as velocidades atingidas pelo reservatório, apesar de não terem sido medidas com um tacómetro, mostraram ser visualmente superiores às atingidas com a utilização da ligação indirecta, pelo que apesar da velocidade marcada pelo *Dremel 4000* ser a mesma, a velocidade do reservatório é diferente. Assim não é possível comparar resultados provenientes dos dois reservatórios.

Tabela 6.1 Parâmetros utilizados nos ensaios com as soluções de PCL e DCM como solvente.

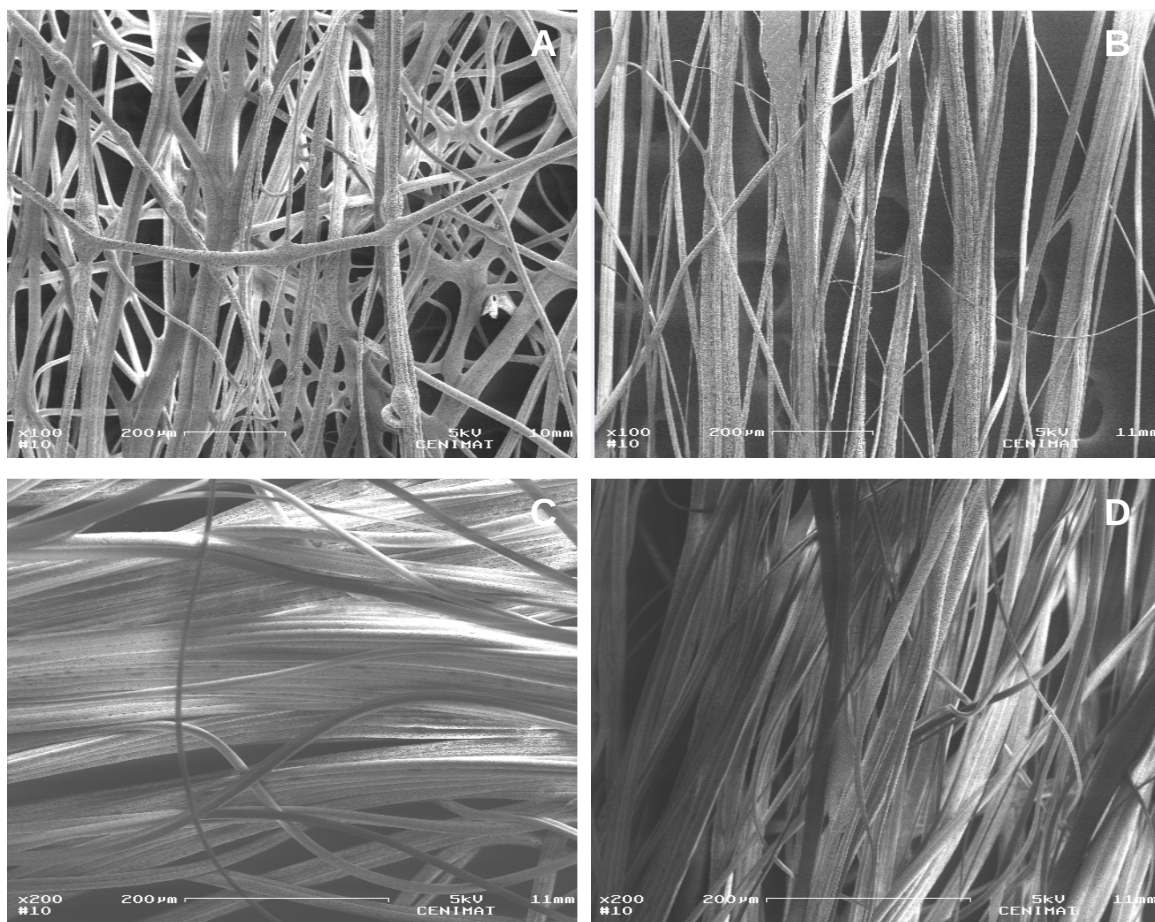
Parâmetros	
Velocidade de rotação do reservatório (rpm)	2100, 4100, 10350, 16800
Diâmetro do colector (cm)	27,5; 37,5; 47,5
Diâmetro dos orifícios do reservatório (mm)	0,5 e 1
Solvente	DCM
Temperatura (°C)	18-23
Concentração (%)	(1, 2, 3, ..., 20)

Tabela 6.2 Parâmetros utilizados nos ensaios com as soluções de PCL e 1,4 - dioxano como solvente.

Parâmetros	
Velocidade de rotação do reservatório (rpm)	2100, 4100, 10350, 16800, 18500
Diâmetro do colector (cm)	47,5
Diâmetro dos orifícios do reservatório (mm)	0,5
Solvente	1,4 - Dioxano
Temperatura (°C)	18-23
Concentração (%)	5, 10, 15 e 20

6.1.1. Influência da concentração da solução na formação de fibras PCL

A concentração de uma solução determina a sua viscosidade e tensão superficial, pelo que o escoamento da solução pelos orifícios do reservatório do equipamento de fiação centrífuga e a formação de fibras ocorrerá de formas diferentes consoante a concentração.



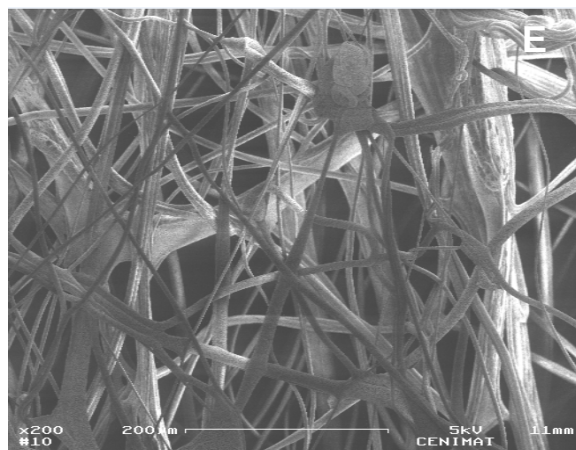


Figura 6.1 Imagens SEM de fibras de PCL a 10350 rpm usando DCM como solvente, um colector de 47,5 cm de diâmetro e o reservatório com orifícios de 0,5 mm de diâmetro. Concentrações de PCL: A) 10 %; B) 11 %; C) 12 %; D) 13 %; E) 14 %.

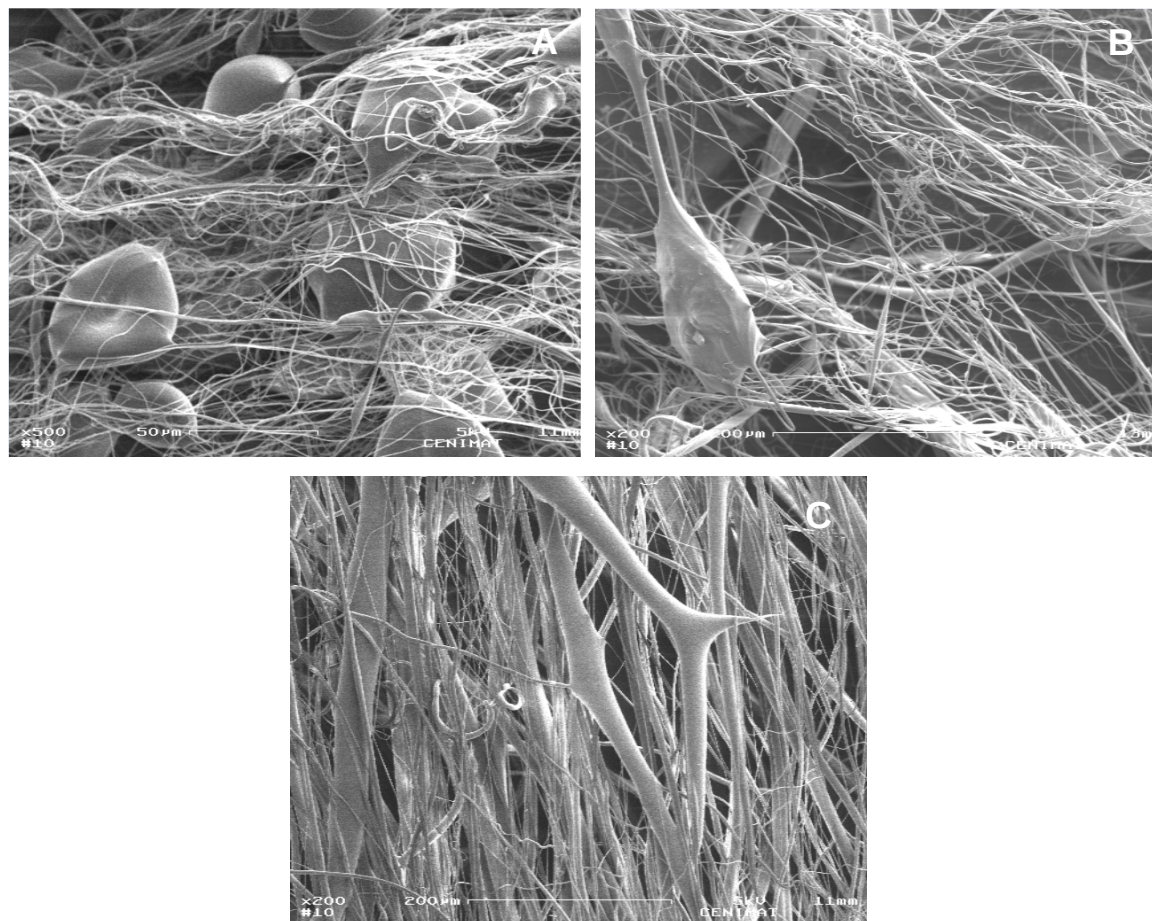


Figura 6.2 Imagens SEM de fibras de PCL a 16800 rpm usando 1,4 - dioxano como solvente, um colector de 47,5 cm de diâmetro e o reservatório com orifícios de 0,5 mm de diâmetro. Concentrações de PCL: A) 10 %; B) 15 %; C) 20 %.

A partir da observação dos dois conjuntos de imagens SEM obtidas, conclui-se de imediato que a concentração é um parâmetro de elevada importância na formação de

fibras, alterando-lhes o diâmetro e o alinhamento, sendo também responsável pela existência de contas e outros defeitos.

Com a solução de 10 % de PCL, na Figura 6.1-A, foram produzidas fibras com diâmetros variáveis, com baixo alinhamento da rede de fibras e com algumas contas originadas pela força centrípeta, insuficiente para ultrapassar a tensão superficial e estirar o jacto antes que este chegue ao colector [28].

Para uma solução com uma concentração de 11 % de PCL, Figura 6.1-B, foram obtidas fibras com diâmetros inferiores aos anteriores, continuando estes a ser pouco uniformes, existindo defeitos ao longo de uma ou outra fibra. De notar, ainda, a existência de um alinhamento na maioria das fibras obtidas. Na Figura 6.1-C, com uma solução de 12 % de PCL, foi obtida uma rede de fibras alinhada, onde a quase totalidade das fibras forma feixes compactos, sem a existência de contas e com diâmetros semelhantes. Na solução de 13 % de PCL, Figura 6.1-D, apesar de existir um alinhamento de fibras, nota-se que o mesmo não é tão elevado como nas fibras obtidas com a concentração anterior, existindo alguns defeitos em algumas fibras e uma menor uniformidade de diâmetros das fibras, apesar de esta ser semelhante ao da concentração anterior. Pela observação das fibras obtidas a partir de uma solução de 14 % de PCL, Figura 6.1-E, nota-se, de certo modo, um retrocesso, um recuo para as características obtida para a concentração de 10 % de PCL, Figura 6.1-A, uma vez que volta a existir uma desorganização na rede de fibras e a presença de defeitos. Porém, as fibras sem defeitos apresentam os menores diâmetros de fibras desta concentração.

Para medição de diâmetros das fibras ao longo deste trabalho foi utilizado o programa *ImageJ*, que fornece o valor do diâmetro da fibra em pixéis e os converte para unidades de comprimento. Os resultados são obtidos a partir de uma amostra aleatória de 25 a 50 fibras por cada imagem. A variação da população da amostra deve-se à dificuldade de selecção das fibras em determinadas imagens.

Os resultados obtidos para a relação entre o diâmetro das fibras e a concentração da solução podem ser observados no gráfico da Figura 6.3.

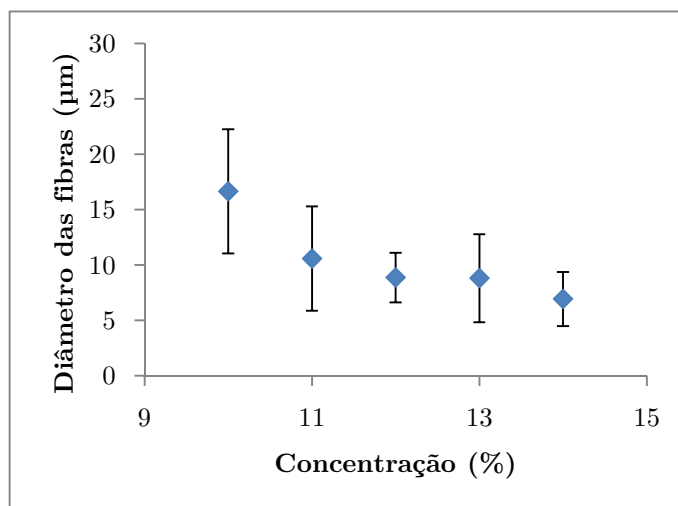


Figura 6.3 Variação dos diâmetros de fibras formadas com uma solução de PCL dissolvida em DCM com uma concentração variável, com uma velocidade fixa de 10350 rpm, um coletor de 47,5 cm de diâmetro e o reservatório com orifícios de 0,5 mm de diâmetro.

Com base em todos os dados analisados, é possível concluir que a solução com uma concentração de 12 % de PCL será a ideal para a produção fibras poliméricas de PCL, pois é aquela que apresenta a maior uniformidade de diâmetros, o melhor alinhamento de fibras, um diâmetro próximo do menor que foi atingido e a ausência de contas.

Em relação às soluções com 1,4 - dioxano como solvente, os resultados foram semelhantes, isto é, a concentração influencia de facto a morfologia das fibras. Porém, nota-se que as concentrações para as quais se obtêm as melhores características de fibras são diferentes das concentrações das soluções que utilizam o DCM como solvente. Em comparação com as fibras do primeiro conjunto de imagens, pode-se também verificar que as fibras produzidas a partir das soluções que utilizam o 1,4 - dioxano como solvente possuem um diâmetro menor do que as que utilizam soluções com o DCM como solvente, bem como um menor alinhamento.

Analisando a Figura 6.2, as fibras produzidas a partir de uma solução com uma concentração de 10 % de PCL, Figura 6.2-A, têm diâmetros pequenos e bastante semelhantes entre si. Porém, existem muitas contas e defeitos numa rede de fibras totalmente desorganizada. Em relação à concentração de 15 % de PCL, Figura 6.2-B, as fibras produzidas, à semelhança da concentração anterior, mantêm a desorganização da rede e a existência de defeitos, embora em menor quantidade. Os diâmetros são um

pouco maiores e menos uniformes que os das fibras da análise anterior. Finalmente, para as fibras formadas a partir de uma solução de 20 % de PCL, Figura 6.2-C, apesar da existência de alguns defeitos e dos diâmetros serem mais elevados e menos uniformes que as anteriores, a rede de fibras encontra-se muito mais alinhada. De notar que na Figura 6.4 podem ser confirmadas as observações efectuadas relativas aos diâmetros.

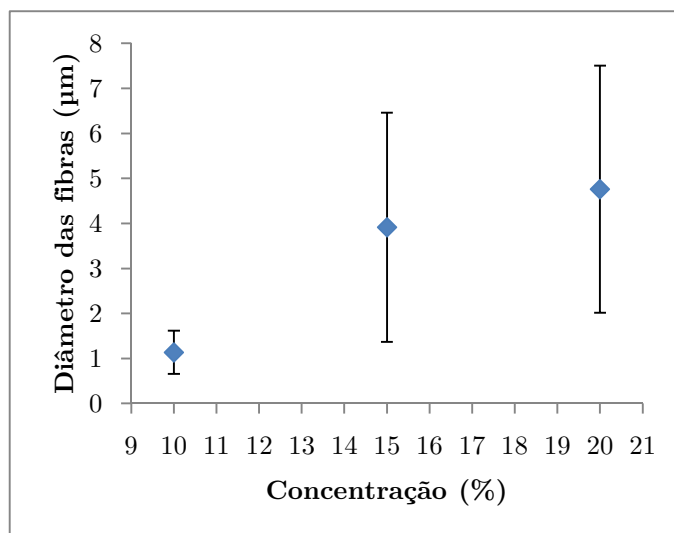


Figura 6.4 Variação dos diâmetros de fibras formadas com uma solução de PCL dissolvida em 1,4 - dioxano com uma concentração variável, com uma velocidade fixa de 16800 rpm, um colector de 47,5 cm de diâmetro e o reservatório com orifícios de 0,5 mm de diâmetro.

Para soluções com DCM como solvente verificou-se que o aumento de concentração conduziu a uma diminuição de diâmetro das fibras. Porém, não foi verificada a mesma linearidade em relação ao alinhamento das fibras e à quantidade de contas e/ou defeitos com o aumento da concentração. Já para soluções com 1,4 - dioxano como solvente, observou-se que o diâmetro das fibras produzidas aumentou com a concentração, tal como o alinhamento das fibras. Também o aparecimento de contas e/ou defeitos se mostrou dependente da concentração, tendo-se verificado uma diminuição com o aumento da concentração. Sistematizando e analisando ainda outra velocidade, 4100 rpm, apresenta-se a Figura 6.5.

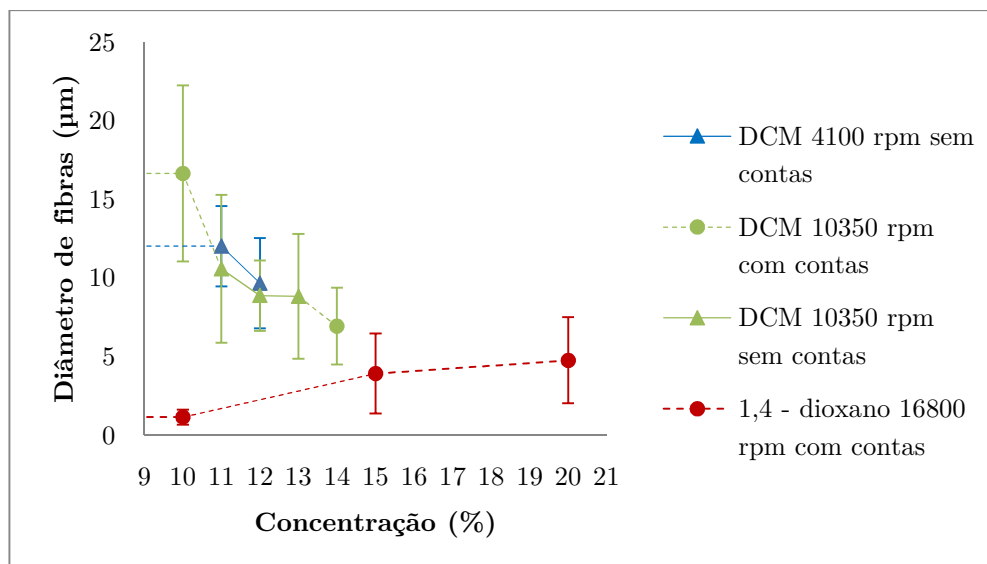
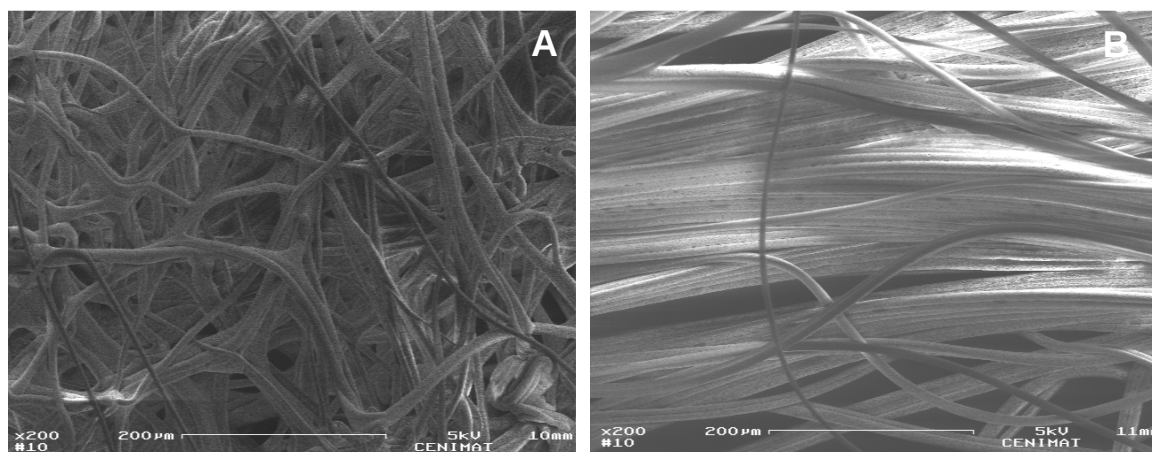


Figura 6.5 Variação dos diâmetros e da existência ou não de contas e/ou defeitos em fibras, com a variação da concentração, usando o reservatório com orifícios de 0,5 mm de diâmetro e uma velocidade de rotação fixa.

6.1.2. Influência da velocidade de rotação na formação de fibras de PCL

É razoável assumir que o escoamento da solução e a velocidade com que esta sai pelos orifícios é influenciado pela velocidade de rotação do reservatório, que influencia por sua vez a formação das fibras, tal como é observado nas equações 2.1 e 2.2.



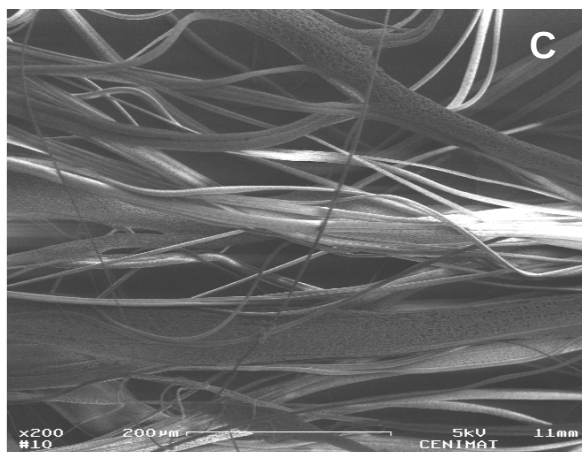


Figura 6.6 Imagens SEM de fibras de PCL a 12 % usando DCM como solvente, um colector de 47,5 cm de diâmetro e o reservatório com orifícios de 0,5 mm de diâmetro. Velocidade de rotação do reservatório: A) 4100 rpm; B) 10350 rpm; C) 16800 rpm.

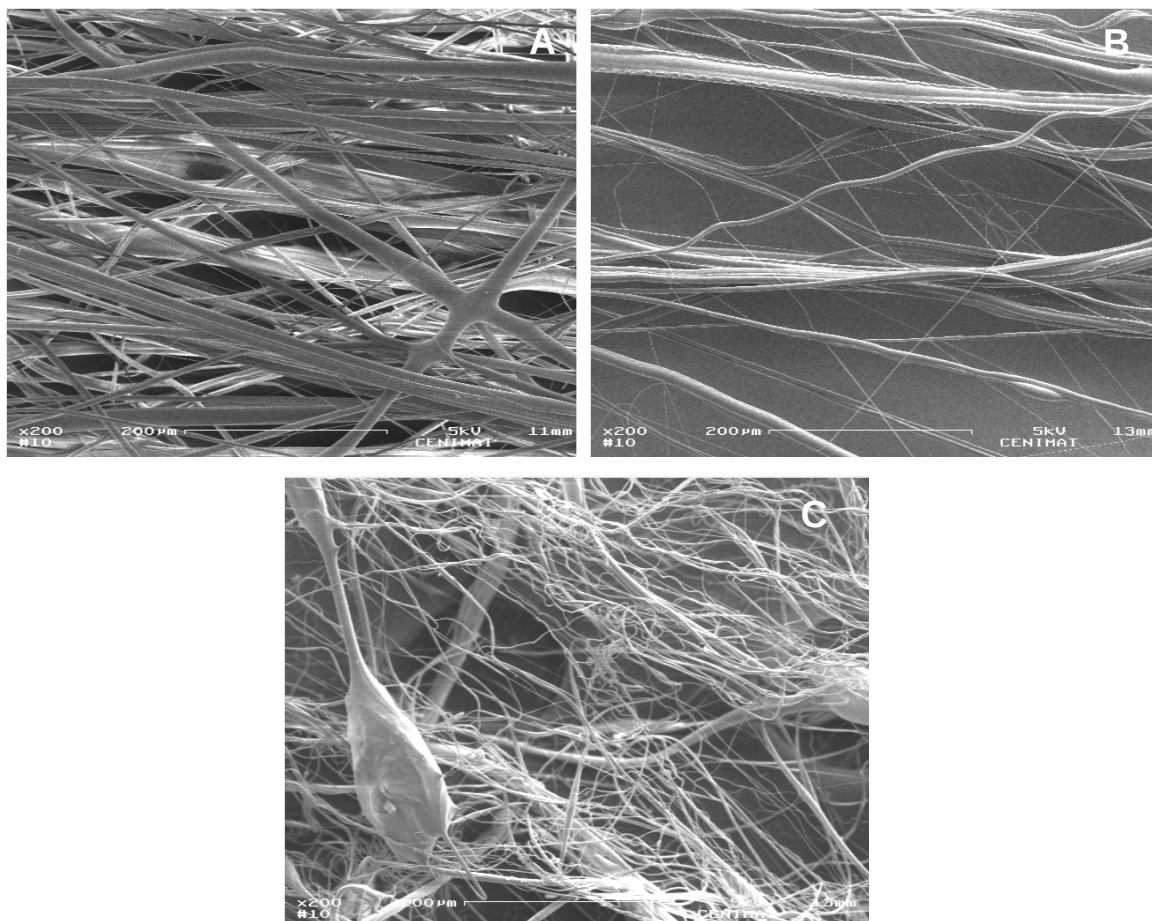


Figura 6.7 Imagens SEM de fibras de PCL a 15 % usando 1, 4 - dioxano como solvente, um colector de 47,5 cm de diâmetro e o reservatório com orifícios de 0,5 mm de diâmetro. Velocidade de rotação do reservatório: A) 4100 rpm; B) 10350 rpm; C) 16800 rpm.

A partir da observação dos dois conjuntos de imagens, verifica-se que, à semelhança da concentração da solução, a velocidade de rotação do reservatório é também um parâmetro importante no diz respeito à morfologia das fibras, ao seu

alinhamento e à existência ou não de contas e defeitos. Observando as fibras produzidas a 4100 rpm, Figura 6.6-A, não se verifica a existência de contas ou defeitos, porém o desalinhamento das fibras é claramente evidente. Quanto à Figura 6.6-B, a uma velocidade de 10350 rpm verificou-se um alinhamento de quase todas as fibras sem contas ou defeitos. A 16800 rpm, Figura 6.6-C, começa-se a verificar um desalinhamento das fibras, não existindo defeitos. Porém é possível observar algumas fibras com diâmetros muito superiores a todas as outras. Observando o gráfico da Figura 6.8 verifica-se que os diâmetros médios das três amostras diminuem com o aumento da velocidade de rotação, apresentando um baixo desvio padrão.

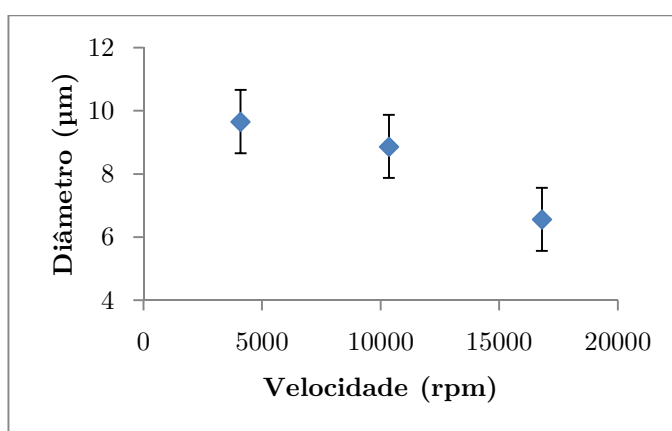


Figura 6.8 Variação dos diâmetros de fibras formadas com uma solução de PCL dissolvida em DCM, com uma velocidade variável, uma concentração fixa de 12 %, um colector de 47,5 cm de diâmetro e o reservatório com orifícios de 0,5 mm de diâmetro.

Em relação às fibras produzidas usando a solução de PCL a 20% com 1,4 - dioxano, para uma velocidade de 4100 rpm, Figura 6.7-A, observam-se fibras com diâmetros pouco uniformes, com uma orientação razoável da rede de fibra e a inexistência de defeitos. Para as fibras da Figura 6.7-B, a uma velocidade de 10350 rpm, começa-se a observar um maior desalinhamento das fibras face às anteriores. Porém, a baixa uniformidade de diâmetros continua a ser visível, bem como a inexistência de defeitos. Com uma velocidade de 16800 rpm, Figura 6.7-C, as fibras apresentam uma orientação ainda menor mas possuem um diâmetro inferior às anteriores. A partir da Figura 6.9 observa-se que o diâmetro das fibras a velocidades de 4100 rpm e 10350 rpm é relativamente semelhante, enquanto que a 16800 rpm o diâmetro das fibras é um pouco mais baixo que os anteriores.

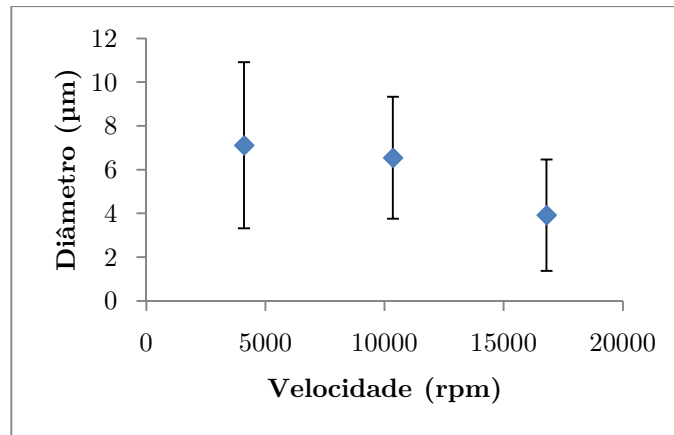


Figura 6.9 Variação dos diâmetros de fibras formadas com uma solução de PCL dissolvida em 1,4 - dioxano com uma velocidade variável, uma concentração fixa de 15 % de PCL e o reservatório com orifícios de 0,5 mm de diâmetro.

Foi assim verificado que a velocidade de rotação do reservatório é um importante parâmetro neste processo, afectando o diâmetro e o alinhamento das fibras e a existência ou não de defeitos. Em relação ao diâmetro é possível verificar, tanto visualmente como numericamente, o efeito da velocidade. Para a solução de 12 % de PCL observou-se um diâmetro menor para velocidades de rotação mais elevadas, tendo sido verificado um resultado semelhante para a solução de 15 % de PCL com 1,4 - dioxano. Quanto ao alinhamento, para soluções que usam DCM como solvente, verificou-se um bom alinhamento de fibras a uma velocidade de 10350 rpm, enquanto a 4100 rpm e a 16800 rpm o alinhamento não foi tão pronunciado. Para soluções com 1,4 - dioxano, à medida que se aumentou a velocidade de rotação do reservatório, o alinhamento das fibras foi diminuindo. Quanto à existência de contas e/ou defeitos, para o primeiro conjunto de imagens, com DCM como solvente, não foram verificadas quaisquer contas ou defeitos, não sendo possível concluir como é que a velocidade de rotação influencia a formação de contas e/ou defeitos. Já para as soluções com 1,4 - dioxano como solvente, verificou-se que o aumento da velocidade de rotação aumentou a quantidade de contas e defeitos. Sistematizando e analisando ainda outra concentração, 11 % de PCL numa solução com DCM, apresenta-se o gráfico da Figura 6.10.

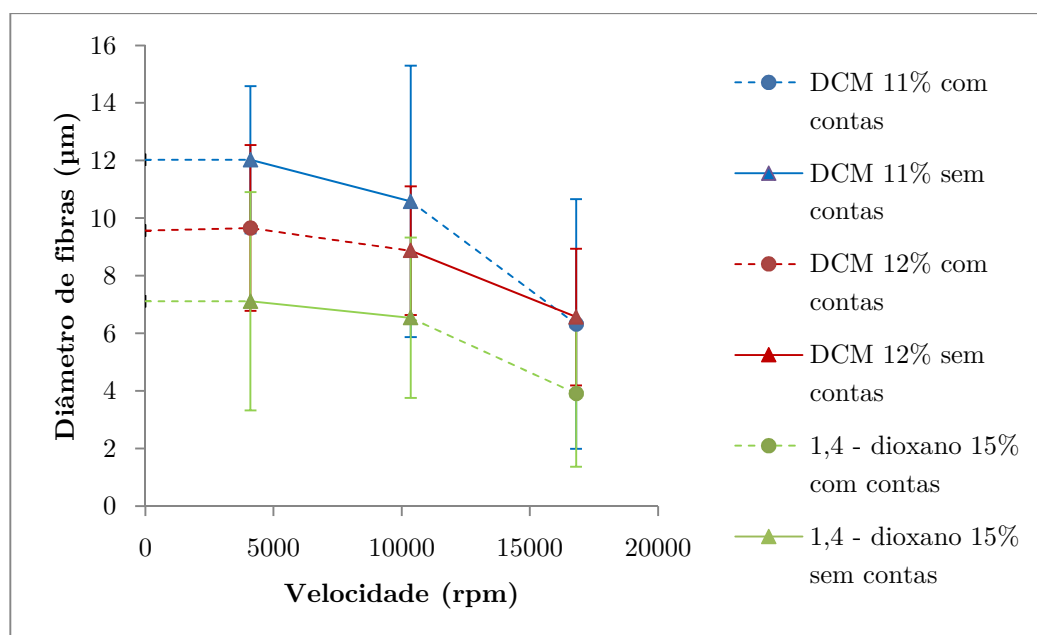


Figura 6.10 Variação dos diâmetros e da existência ou não de contas e/ou defeitos em fibras, com a variação da velocidade de rotação do reservatório, reservatório com orifícios de 0,5 mm de diâmetro e uma concentração fixa.

6.1.3. Influência do diâmetro do colector na formação de fibras

À semelhança da electrofiação, também a fiação centrífuga de fibras é afectada pela distância não da seringa ao colector, mas dos orifícios do reservatório ao colector, tal como demonstrado por Mellado *et al* [28]. O solvente, após a saída da solução pelo orifício, necessita de tempo para evaporar e, por isso, espaço, que depende da velocidade com que é ejectado. Caso a distância do orifício ao colector seja menor que a necessária, a fibra colectada estará cheia de contas e defeitos, podendo ocorrer, por vezes, a formação de filmes poliméricos, devido à não evaporação do solvente. Caso a distância do orifício ao colector seja superior à necessária, a fibra será formada mas não atinge o colector, caindo na base do colector devido à gravidade.

Para estudar o efeito da distância na formação das fibras foram usados três colectores com diâmetros diferentes. Os colectores são cilíndricos e compostos por folha de alumínio apoiada em varões de acrílico, tendo os diâmetros: 27,5 cm; 37,5 cm; 47, 5 cm.

Em todos os colectores as fibras não atingiram o colector, formando uma rede de fibras na base do colector devido à gravidade. Uma hipótese que pode justificar estes

resultados será a turbulência de ar criada em volta do reservatório, sendo esta mais elevada nos colectores com menor diâmetro. Uma vez que o colector encapsula, de certa forma, o reservatório, o ar em volta do mesmo não consegue passar livremente em todas as direcções, criando um efeito tipo *vortex*. Verificou-se que este efeito é prejudicial para a formação de fibras, uma vez que a barreira de ar em movimento funciona como uma parede impedindo o movimento da fibra e a correcta evaporação do solvente, não sendo produzidas fibras ou sendo formadas fibras muito defeituosas. À medida que o diâmetro dos colectores aumenta, mais espaço para circulação de ar existe, pelo que o efeito aqui descrito vai sendo cada vez mais atenuado, possibilitando uma produção de fibras com uma menor quantidade de defeitos, quando comparados com os resultados obtidos para diâmetros de colector menores. Assim, de maneira a recolher as fibras formadas, criou-se um colector amovível em cartão.

Com este estudo concluiu-se que o colector cilíndrico forrado a folha de alumínio com um diâmetro de 47,5 cm é aquele que permite obter melhores resultados. Verificou-se também a necessidade de utilização de um outro colector, localizado na base do colector, de maneira a serem recolhidas as fibras produzidas.

6.1.4. Influência do solvente na formação de fibras de PCL

Após a produção das primeiras fibras de soluções de PCL com DCM e da primeira análise morfológica das mesmas através de SEM, verificou-se que todas as fibras formadas são totalmente porosas, como é possível observar na Figura 6.11. Este resultado verificou-se para qualquer concentração ou velocidade testadas.

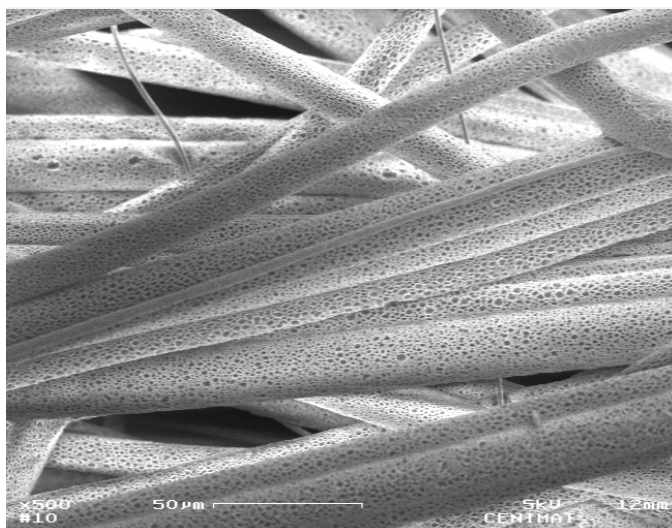


Figura 6.11 Imagem SEM de fibras de PCL a 10 %, 2100 rpm, colector de 37,5 cm de diâmetro e reservatório com orifícios de 1 mm de diâmetro, usando DCM como solvente.

Uma vez que as fibras formadas a partir de soluções contendo DCM nunca atingiram o colector, possivelmente devido à sua elevada taxa de evaporação, testou-se um outro solvente, o 1,4 - dioxano cuja taxa de evaporação é inferior. Porém, à semelhança do DCM, as fibras produzidas também não atingiram o colector cilíndrico de 47,5 cm de diâmetro. Apesar de não se ter conseguido obter o efeito desejado, verificaram-se diferenças, a nível morfológico, nas fibras de PCL produzidas em relação às obtidas a partir de soluções com DCM: as fibras de soluções com 1,4 - dioxano não são porosas mas sim lisas, como é observado na Figura 6.12, e têm menores diâmetros que as fibras de soluções com DCM.

De maneira a verificar de que maneira é que o solvente interage com o polímero e de que forma afecta a cristalinidade da fibra, duas fibras obtidas com solventes diferentes foram submetidas a difracção de raios-X, estando a normalização do espectro obtido representado na Figura 6.13.

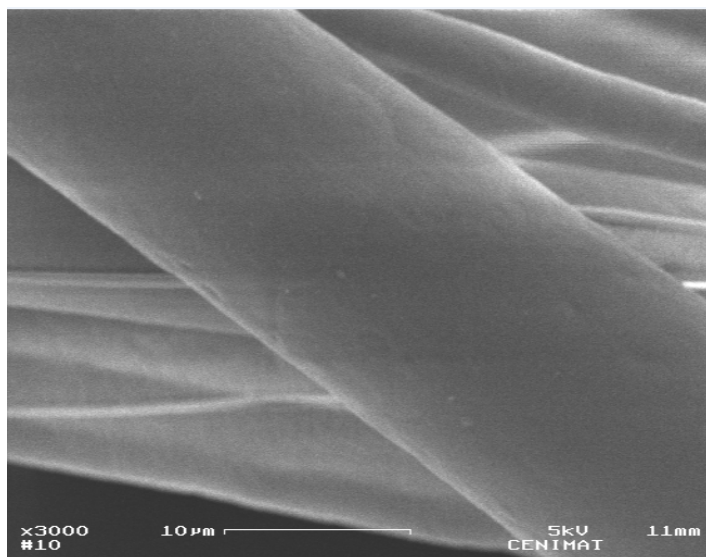


Figura 6.12 Fibras de PCL obtidas a partir de uma solução de PCL a 15 % com 1,4 - dioxano, a uma velocidade de 4100 rpm, um colector de 47,5 cm de diâmetro e o reservatório com orifícios de 0,5 mm de diâmetro.

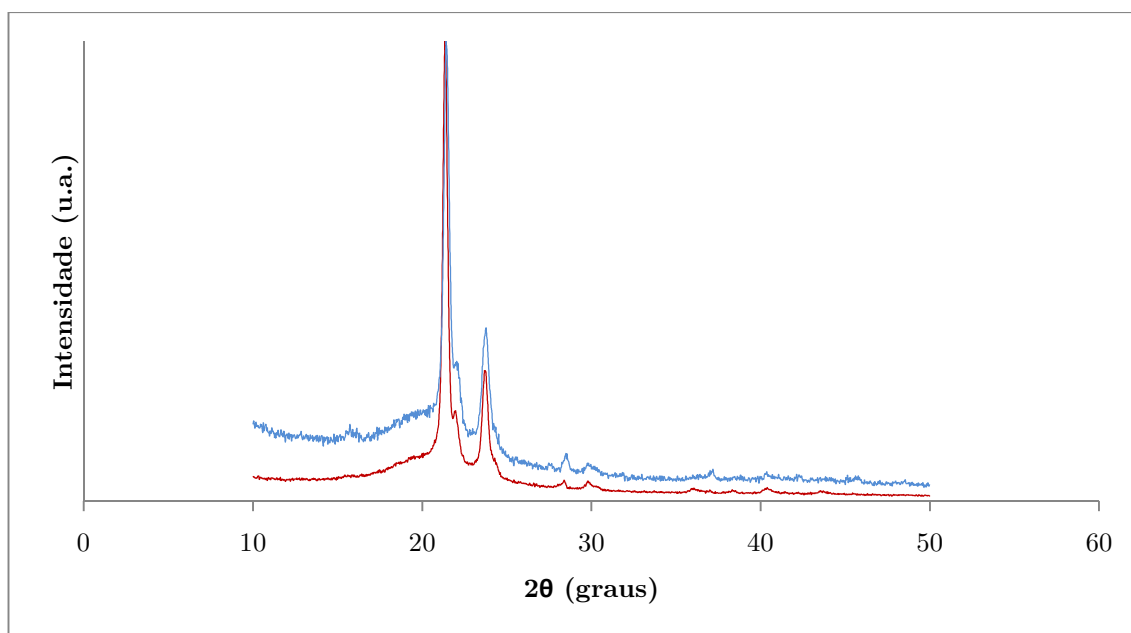


Figura 6.13 Espectro normalizado de difracção de raios-X do PCL a 12 % em DCM (a vermelho – curva inferior) e em 1,4 - dioxano (a azul – curva superior).

A partir do espectro acima foi possível calcular o tamanho da cristalite de ambas as fibras, recorrendo à equação 6.1:

$$tc(nm) = \frac{0,89 \lambda}{\beta \cos \theta} \quad (6.1)$$

onde,

$tc(nm)$ é o tamanho da cristalite, em nanómetros;

λ é o comprimento de onda dos raios-X, que neste caso foram emitidos a partir duma fonte de Cu, sendo de 1,541 nm;

β é a largura do pico de difracção de maior intensidade, medida a meia altura nos gráficos da Figura 6.19, sendo de $\beta = 0,361^\circ$ para fibras obtidas a partir de uma solução de PCL com DCM e $\beta = 0,454^\circ$ para fibras obtidas a partir de uma solução de PCL com 1,4 - dioxano;

Finalmente θ é o ângulo correspondente ao pico de maior intensidade, tendo-se verificado que para as fibras obtidas a partir de uma solução de PCL com DCM é de $21,334^\circ$ e para as fibras obtidas a partir de uma solução de PCL com 1,4 - dioxano é de $21,407^\circ$.

Realizando o cálculo, obtêm-se diferentes tamanhos de cristalite entre as fibras: 234 nm para as fibras obtidas a partir de uma solução de PCL com DCM e 186 nm para as fibras obtidas a partir de uma solução de PCL com 1,4 - dioxano. Ambas as fibras foram produzidas a partir de soluções com uma concentração de 12 % de PCL, a 10350 rpm, com o reservatório com orifícios de 0,5 mm e com o colector de 47,5 cm.

Com os dados acerca do tamanho da cristalite, é possível concluir que as fibras de PCL formadas a partir de uma solução com DCM são mais cristalinas que as formadas a partir de soluções com 1,4 - dioxano.

Com base nestas observações é possível concluir que a interacção do polímero com o solvente é também um importante factor a ter em conta pois as características morfológicas e a cristalinidade das fibras parecem variar dependendo dos solventes utilizados nas soluções precursoras.

6.2. Culturas celulares

Realizaram-se testes de cultura celular em cinco membranas com diferentes combinações de concentração de PCL e velocidade de rotação, nomeadamente 10 % a 10350 rpm, 11 % a 10350 rpm, 12 % a 10350 rpm, 12 % a 4100 rpm e 12 % a 16800 rpm, dispondo de três réplicas para cada combinação. Todas as soluções utilizadas têm DCM como solvente e foram produzidas utilizando o reservatório com orifícios de 0,5 mm de

diâmetro e um colector de 47,5 cm de diâmetro. A adesão e proliferação das células da linhagem C2C12 (Figura 6.14) nas membranas foram determinadas através do teste de viabilidade celular com o indicador resazurina.

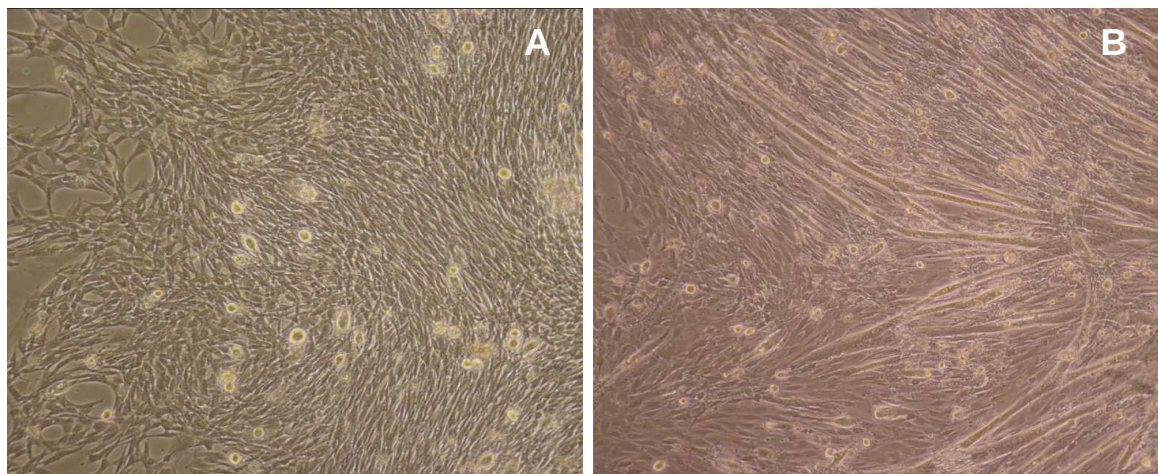


Figura 6.14 Células da linhagem C2C12 em proliferação (A) e em diferenciação (B).

Recorrendo ao aparelho BioTek ELX 800 mediram-se as absorvâncias do meio com resazurina ou resorufina (resazurina metabolizada pelas células), tendo-se obtido os valores de absorvância absolutos e relativos ao controlo. Estes testes foram realizados quatro vezes ao longo de sete dias, estando a variação dos valores de absorvância absoluta presentes no gráfico da Figura 6.15. As absorvâncias foram medidas a 570 nm e a 600 nm, valores de comprimento de onda onde a resorufina e a resazurina têm o máximo valor de absorção, respectivamente.

Com base nos resultados obtidos nos ensaios efectuados é possível concluir que as membranas testadas apresentam bons resultados a nível de adesão e proliferação celular, não sendo citotóxicas nem possuindo uma morfologia impeditiva da adesão das células. De notar que no teste realizado no sexto dia as células na lamela do controlo encontravam-se já em declínio, o que pode justificar-se se, por hipótese, as células tiverem atingido entretanto a confluência. Devido à estrutura tridimensional das membranas é de admitir que, nestas, as células, por disporem de uma maior área disponível quando comparada com a da lamela do controlo, atinjam a confluência ao fim de um tempo superior. Ao oitavo dia verificou-se que as células semeadas nas fibras produzidas a partir de uma solução de 12 % de PCL com uma velocidade de reservatório de 4100 rpm e 16800 rpm poderão ter entrado em confluência, entrando a

população em declínio, uma vez que a absorvância absoluta observada é menor que a do sexto dia. Pelas indicações dadas pela absorvância, as outras três amostras, pelo contrário, ao oitavo dia continuam a proliferar.

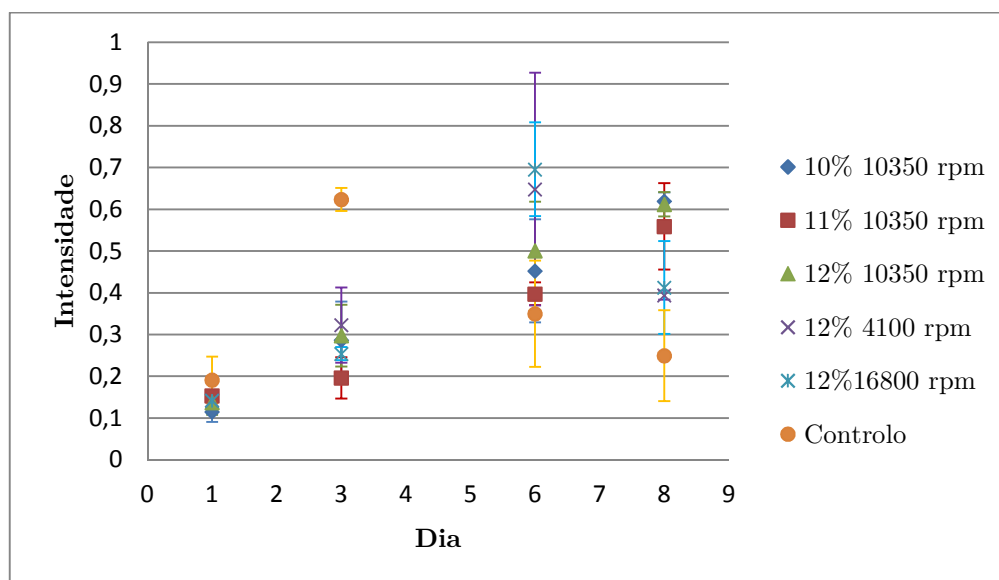


Figura 6.15 Média das absorvâncias medidas nas três réplicas de cada amostra e no controlo ao longo de sete dias.

Passados sete dias substituiu-se o meio por um outro com apenas 1 % de soro fetal bovino. Este é um meio fraco, estimulando a diferenciação celular. Seguiu-se a fixação das células com metanol a 100 %, glutaraldeído a 2,5 %, seguido de três lavagens com PBS e glutaraldeído e lavagens posteriores com etanol a 50 %, 70 %, 90 % e 100 %. Tanto o metanol como o glutaraldeído permaneceram 24 horas em contacto com as células nas membranas, enquanto as lavagens duraram apenas cinco minutos. Na Figura 6.16 e Figura 6.17 é possível observar imagens de SEM de células da linhagem C2C12 aderentes a membranas produzidas a partir de uma solução de 12 % de PCL e uma velocidade rotacional de 16800 rpm, e a partir de uma solução de 10 % de PCL e uma velocidade rotacional de 10350 rpm, respectivamente. As células representadas nestas figuras foram fixas após cinco dias em contacto com meio de diferenciação. Já na Figura 6.18 e Figura 6.19 observam-se imagens histológicas de microscopia de células C2C12 diferenciadas numa membrana produzida a partir de uma solução de 11 % de PCL, a uma velocidade rotacional de 10350 rpm e após 7 dias de diferenciação celular.

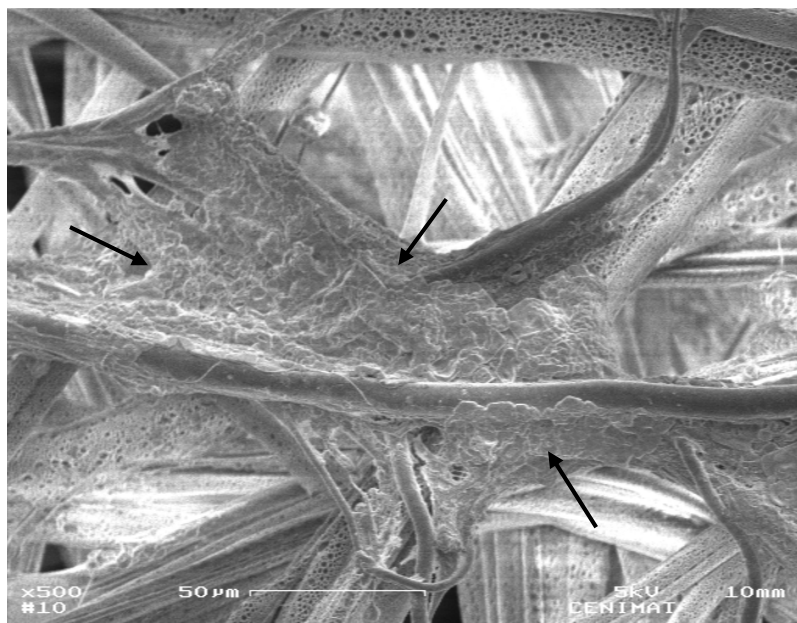


Figura 6.16 Células da linhagem C2C12 aderentes a fibras obtidas a partir de uma solução de 12 % de PCL com DCM, a uma velocidade de 10350 rpm, um colector de 47,5 cm e o reservatório com orifícios de 0,5 mm de diâmetro.



Figura 6.17 Células da linhagem C2C12 aderentes a fibras obtidas a partir de uma solução de 10 % de PCL com DCM, a uma velocidade de 16800 rpm, um colector de 47,5 cm e o reservatório com orifícios de 0,5 mm de diâmetro.

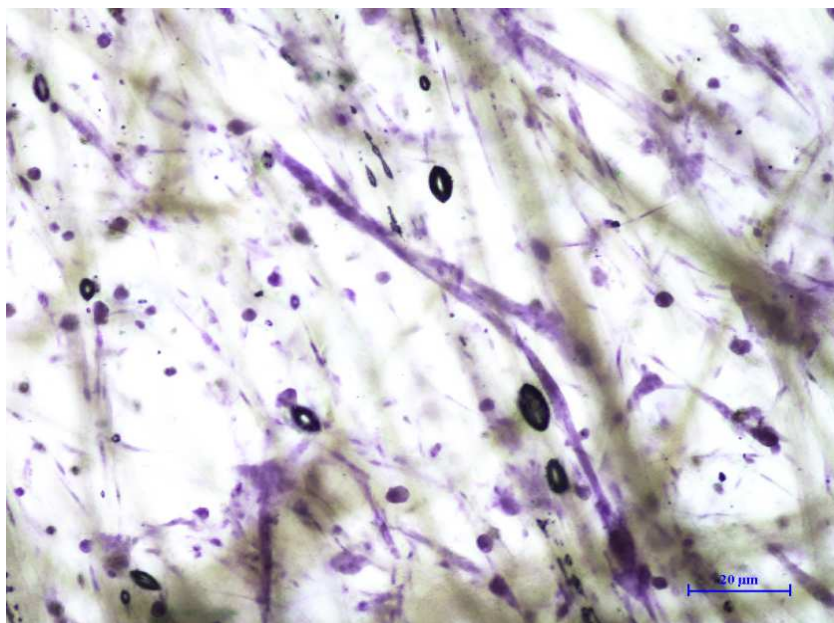


Figura 6.18 Células da linhagem C2C12 aderentes e diferenciadas em fibras obtidas a partir de uma solução de 11 % de PCL com DCM, a uma velocidade de 10350 rpm, um colector de 47,5 cm e o reservatório com orifícios de 0,5 mm de diâmetro.

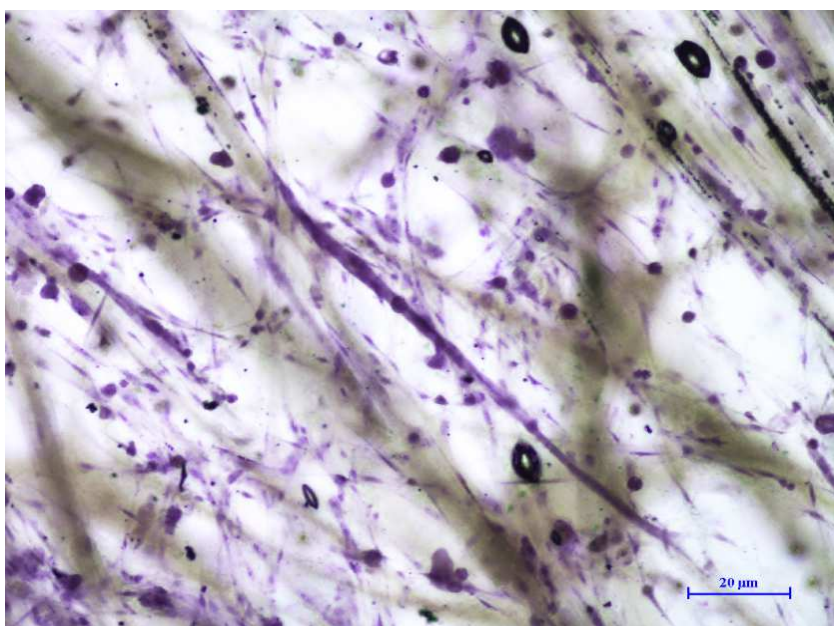


Figura 6.19 Células da linhagem C2C12 aderentes e diferenciadas em fibras obtidas a partir de uma solução de 11 % de PCL com DCM, a uma velocidade de 10350 rpm, um colector de 47,5 cm e o reservatório com orifícios de 0,5 mm de diâmetro.

7. Conclusão

Os trabalhos desenvolvidos nesta dissertação inserem-se na área de Biomateriais e Engenharia de Tecidos, áreas da Engenharia Biomédica relacionadas entre si, tendo como finalidade a construção de um aparelho de fiação centrífuga e a análise das suas potencialidades através da produção de fibras de PCL. Este tipo de sistema possibilita a produção de fibras poliméricas micrométricas a partir soluções poliméricas, possuindo uma taxa de produção muito superior à electrofiação e permitindo o alinhamento das fibras produzidas, ideal para a mimetização de substratos celulares alinhados e, assim, para aplicação médica em estruturas com as mesmas características.

O equipamento construído é constituído por três grupos distintos de componentes: componentes de rotação e transmissão de movimento, que permitem a transmissão de velocidade de rotação entre o motor e o reservatório cilíndrico onde é colocada a solução polimérica, pelo sistema de aquecimento, que permite o aquecimento e controlo da temperatura do reservatório cilíndrico e pelas estruturas de suporte do sistema.

Durante o processo de desenvolvimento do equipamento verificou-se que nem sempre as soluções encontradas se mostravam adequadas, tendo havido a necessidade de efectuar optimizações de vários componentes. Foram substituídos o reservatório

cilíndrico e o respectivo veio, alterada a forma de transmissão de velocidade entre o motor e o reservatório cilíndrico, substituindo a ligação directa por indirecta, adicionando-se duas polias, uma correia e um veio adaptador de latão. Foram ainda adicionados dois rolamentos e o respectivo suporte e uma base em ardósia para o equipamento. No processo de optimização gradual foram também substituídos ou adaptados alguns elementos da estrutura de suporte.

O controlo da velocidade de rotação do reservatório é efectuado directamente no motor, devido à existência de um controlador de velocidade integrado no *Dremel 4000*. A velocidade de rotação máxima marcada no mesmo é de 35000 rpm. Porém, devido à carga adicional introduzida pelas polias e correia, verificou-se, através da utilização de um tacómetro, que a velocidade seleccionada não corresponde à real. Já o controlo de temperatura das resistências é efectuado mediante um controlador de temperatura *T16* da *Red Lion* ligado a um termopar e às resistências responsáveis pelo aquecimento.

Para se verificar a eficiência do aparelho montado, foi utilizado PCL, um polímero sintético, biocompatível e biodegradável, profundamente estudado e com várias aplicações biomédicas. Para a realização de um estudo completo acerca do comportamento deste polímero neste novo sistema, foram analisados vários parâmetros, de maneira a ser possível determinar os ideais para a produção de fibras de PCL. Assim, os parâmetros que foram variados durante os ensaios foram a velocidade de rotação do reservatório, a concentração da solução utilizada, o diâmetro dos orifícios do reservatório, o diâmetro do colector e o solvente utilizado na solução.

Tanto a concentração da solução como a velocidade de rotação do reservatório afectam o alinhamento da rede de fibras, o diâmetro das fibras produzidas e a existência ou não de contas e/ou defeitos. Constatou-se que o diâmetro do colector utilizado também se mostrou importante, permitindo, ou não, a formação de fibras e afectando o seu alinhamento e quantidade de contas e/ou defeitos. Por último, verificou-se que o solvente utilizado na solução é também um parâmetro sobre o qual deve recair atenção, pois a interacção polímero-solvente parece influenciar tanto a nível morfológico, como a nível estrutural, as fibras produzidas.

Da variação individual dos parâmetros estudados verificou-se que as fibras ideais foram obtidas a partir de uma solução de 12 % de PCL, tendo DCM como solvente, a uma velocidade de rotação do reservatório de 10350 rpm, com o reservatório com orifícios de 0,5 mm de diâmetro e um colector cilíndrico com 47,5 cm de diâmetro. As fibras produzidas de acordo com estes parâmetros mostraram-se alinhadas, com diâmetros no intervalo $(8,87 \pm 2,23) \mu\text{m}$ e sem contas nem defeitos. Já as fibras obtidas a partir de soluções de PCL contendo 1,4 – dioxano mostraram-se menos alinhadas, com mais defeitos mas diâmetros menores, no intervalo $(1,14 \pm 0,48) \mu\text{m}$ e $(7,78 \pm 3,63) \mu\text{m}$.

Através da análise dos espectros obtidos pela difracção de raios-X de fibras de PCL formadas a partir de soluções com 12 % de PCL, utilizando DCM ou 1,4 - dioxano como solvente, verificou-se uma maior cristalinidade nas fibras de PCL obtidas a partir da solução que utiliza DCM, mostrando-se uma vez mais a importância da escolha do solvente na formação de fibras poliméricas por fiação centrífuga.

A partir de testes de adesão e proliferação celular, com a resazurina, verificou-se que as membranas não são citotóxicas, tendo as células aderido e proliferado durante os vários dias em que foram cultivadas. A adesão e proliferação celular foram também comprovadas através de imagens obtidas por SEM.

Apesar do sucesso do equipamento na produção de fibras, não foi possível obter fibras com diâmetros na ordem dos nanómetros, tais como as fibras produzidas através de electrofiação. Para que tal seja possível, devem ser estudados outros solventes, com taxas de evaporação diferentes da dos solventes utilizados. Devem ainda ser estudados reservatórios com diâmetros de orifícios diferentes, uma vez que não foi possível obter qualquer conclusão acerca da influência dos mesmos, devido às diferenças de ligações, directa e indirecta. Seria também importante aprofundar a influência não só do diâmetro mas também do número de orifícios em cada reservatório.

Com a substituição da ligação directa pela ligação indirecta foi possível diminuir vários efeitos secundários originados pelo funcionamento do aparelho, nomeadamente a vibração da estrutura e de vários componentes. Porém, verificou-se que existiu uma perda de velocidade devido à adição de carga a que o motor passou a estar sujeito.

Assim, sugere-se que possa ser feita uma optimização do sistema de transmissão com vista à diminuição das forças de atrito, diminuindo dessa forma a carga imposta ao motor. Uma alternativa passará por usar um motor com maior potência.

Um factor limitante do equipamento de fiação centrífuga de fibras construído é o facto de a velocidade do motor com carga ser completamente diferente da velocidade seleccionada no motor. Assim, sugere-se que o equipamento possa ser dotado de um tacómetro digital que permita a leitura, permanente, da velocidade de rotação a que o reservatório é sujeito. Outro factor restritivo deste equipamento encontra-se no facto do operador ter que colocar manualmente a solução no reservatório. Com este procedimento não é possível estudar o efeito da variação do caudal de entrada da solução no reservatório, bem como de o manter constante. Uma solução possível para este problema reside na utilização de uma bomba infusora associada a um veio oco que sirva de ligação ao reservatório e que permita a entrada e a circulação da solução num reservatório fechado, tendo como únicas saídas os orifícios nas suas paredes.

Seria interessante caracterizar a influência da temperatura ambiente, da humidade e da existência de vácuo na formação de fibras poliméricas, o que seria possível com a construção de uma câmara com capacidade de controlo atmosférico destas variáveis.

De maneira a verificar a utilidade e eficácia do equipamento construído, torna-se necessário realizar estudos para outros polímeros em trabalhos futuros, de maneira a ser verificada toda a potencialidade do sistema. O sistema de temperatura deve ainda ser testado com a utilização de polímeros fundidos, devendo o estudo ser começado com o PCL, de maneira a ser possível comparar com os resultados obtidos neste trabalho com o PCL em solução.

Um avanço tecnológico com interesse para este aparelho será automatizar o mesmo, criando um sistema de fiação centrífuga controlada por computador. A utilização de um microcontrolador, como por exemplo o *Arduino*, associado a um *software* prático e funcional, como por exemplo o *LabView*, potenciará um controlo mais eficiente da velocidade de rotação do reservatório e da temperatura, bem como do fluxo da solução, caso a sugestão atrás referida venha a ser concretizada.

8. Bibliografia

- [1] Langer, R., Vacanti, J.P. (1993). Tissue engineering. *Science* 260, 920-926;
- [2] O'Brien, F.J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today* 14, 88-95;
- [3] Luong-Vana, E., Grøndahla, L., Chuad, K.N., Leongd, K.W., Nurcombeb, V., Cool, S.M. (2006). Controlled release of heparin from poly(ϵ -caprolactone) electrospun fibers. *Biomaterials* 27, 2042-2050;
- [4] McEaching, Z., Lozano, K. (2012). Production and Characterization of Polycaprolactone Nanofibers via ForcespinningTM Technology. *Journal of Applied Polymer Science* 126, 473-479;
- [5] Ghasemi-Mobarakeh, L., Prabhakaran, M.P., Morshed, M., Nasr-Esfahani, M.H., Ramakrishna, S. (2010). Bio-functionalized PCL nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *Materials Science and Engineering C* 30, 1129-1136;
- [6] Croisier, F., Duwez, A.S., Jérôme, C., Léonard, A.F., van der Werf, K.O., Dijkstra, P.J., Bennink, M.L. (2012). Mechanical testing of electrospun PCL fibers. *Acta Biomaterialia* 8, 218-224;
- [7] Choi, J.S., Lee, S.J., Christ, G., Atala, A., Yoo, J. (2008). The influence of electrospun aligned poly(ϵ -caprolactone) collagen nanofiber meshes on the formation of self-aligned muscle myotubes. *Biomaterials* 29, 2899-2906;

- [8] Porter, J., Henson, A., Popat, K. (2009). Biodegradable poly(ϵ -caprolactone) nanowires for bone tissue engineering applications. *Biomaterials* 30, 780-788;
- [9] Zamani, M., Morshed, M., Varshosaz, J., Jannesari, M. (2010). Controlled release of metronidazole benzoate from poly epsilon-caprolactone electrospun nanofibers for periodontal diseases. *Eur J Pharm Biopharm* 75, 179-185;
- [10] Chan, B.P., Leongm K.W. (2008). Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *Eur Spine J* 17, S467-S479;
- [11] Han, J., Branford-White, C.J., Zhu, L.M. (2010). Preparation of poly(ϵ -caprolactone)/poly(trimethylene carbonate) blend nanofibers by electrospinning. *Carbohydrate Polymers* 79, 214–218;
- [12] Beachley, V., Wen, X. (2009). Effect of electrospinning parameters on the nanofiber diameter and length. *Materials Science and Engineering C* 29, 663–668;
- [13] Subia, B., Kundu, J., Kundu, S.C. (2010). Biomaterial Scaffold Fabrication Techniques for Potential Tissue Engineering Applications, *Tissue Engineering*, Daniel Eberli (Ed.), ISBN: 978-953-307-079-7, InTech, DOI: 10.5772/8581. Available from: <http://www.intechopen.com/books/tissue-engineering/biomaterial-scaffold-fabrication-techniques-for-potential-tissue-engineering-applications>;
- [14] Nayak, R., Padhye, R., Kyratzis, I.L., Truong, Y.B., Arnold, L. (2012) Recent advances in nanofibre fabrication techniques. *Textile Research Journal* 82, 129-147;
- [15] Bhardwaj, N., Kundu, S.C. (2010). Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances* 28, 325-347;
- [16] Li, D., Xia, Y. (2004). Electrospinning of nanofibers: reinventing the Wheel? *Adv.Mater.* 16, 1151-1170;
- [17] Li, X., Liu, H., Wang, J., Li, C. (2012) Preparation and characterization of poly(ϵ -caprolactone) nonwoven mats via melt electrospinning). *Polymer* 53, 248-253;
- [18] Ramakrishna, S., Fujihara, K., Teo, W.E., Yong, T., Ma, Z., Ramaseshan Ramakrishna. (2006). Electrospun nanofibers: Solving global issues. *Materials Today* 9, 40-50;

- [19] Sarkar, K., Gomez, C., Zambrano, S., Ramirez, M., de Hoyos, E., Vasquez, H., Lozano, K. (2010) Electrospinning to Forcespinning. *Materials Today* 13, 12-14;
- [20] Padron, S., Fuentes, A., Caruntu, D., Lozano, K. (2013). Experimental study of nanofiber production through forcespinning. *J. Appl. Phys.* 113, 024318;
- [21] Raghavan, B., Ner, Y., Stinson, G., Peno, E., Gomez, C., Lozano, K. Forcespinning: An importante advancement in Nanofiber Production, retirado de www.fiberiotech.com;
- [22] Badrossamay, M.R., McIlwee, H.A., Goss, J.A., Parker, K.K. (2010). Nanofiber assembly by rotary jet-spinning. *Nano Lett.* 10, 2257-2261;
- [23] Shanmuganathan, K., Fang, Y., Chou, D., Sparks, S., Hibbert, J. (2012). Solventless High Throughput Manufacturing of Poly(butylene terephthalate) Nanofibers. *ACS Macro Lett.* 1, 960-964;
- [24] Padron, S., Patlan, R., Gutierrez, J., Santos, N., Eubanks, T., Lozano, K. (2012) Production and Characterization of Hybrid BEH-PPV/PEO Conjugated Polymer Nanofibers by ForcespinningTM. *Journal of Applied Polymer Science* 125, 3610-3616;
- [25] Vasquez B., Vasquez, H., Lozano, K. (2012). Preparation and Characterization of Polyvinylidene Fluoride Nanofibrous Membranes by ForcespinningTM. *Polymer Engineering and Science* 52, 2260-2265;
- [26] Huttunen, M., Kellomäki, M. (2011). A simple and high production rate manufacturing method for submicron polymer fibres. *J Tissue Eng Regen Med* 5, e239-e243;
- [27] Chuanfang, Y. (2012) Aerosol Filtration Application Using Fibrous Media - an Industrial Perspective. *Chinese Journal of Chemical Engineering* 20(1), 1-9;
- [28] Mellado, P., McIlwee, A., Badrossamay, M.R., Goss, J.A., Mahadevan, L. (2011) A simple model for nanofiber formation by rotary jet-spinning. *Appl. Phys. Lett.* 99, 203107.
- [29] The European Society of Rheology. (2013). Consultado em 13/08/2013, de <http://rheology-esr.net/>
- [30] Rheotec. (2005). Introduction to Rheology. Consultado em 08/08/2013, de <http://www.dongjins.com/service/file/Introduction%20to%20rheology.pdf>

- [31] Attension. (2013). Attension – Precision made simple | Attension Tensiometers. Consultado em 25-08-2013, de <http://www.attension.com/surface-tension.aspx>.
- [32] Yeow, Y., Pepperell, C., Sabturani, F., Leong, Y. (2008). Obtaining surface tension from pendant drop volume and radius of curvature at the apex. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 315, 136-146.
- [33] Voutou, B., Stefanaki, E. (2008). Electron Microscopy: The Basis. Physics of Advanced Materials Winter School 2008. Consultado em 06/08/2013, de <http://www.mansic.eu/documents/PAM1/Giannakopoulos1.pdf>.
- [34] Texas A & M University. (2010). Introduction to X-ray power diffraction. Consultado em 05/08/2013, de http://xray.tamu.edu/pow_course.php.

Apêndice A – Tabelas de apoio ao texto

Tabela A.1 Funções da matriz extracelular (ECM) nos tecidos nativos e nos *scaffolds* em tecidos submetidos a técnicas de Engenharia de Tecidos.

Funções da ECM em tecidos nativos	Funções análogas dos <i>scaffolds</i> em tecidos submetidos a tratamento	Arquitectura e propriedades biológicas e mecânicas dos <i>scaffolds</i>
1 – Oferece suporte estrutural às células	Oferecem suporte estrutural para células exógenas para que estas adiram, cresçam, migrem e se diferenciem, tanto <i>in vitro</i> como <i>in vivo</i> .	Biomateriais com locais de ligação para células; estrutura porosa com interconectividade para a migração celular e para a difusão de nutrientes; resistência temporária à biodegradação após implantação.
2 – Contribui para as propriedades mecânicas dos tecidos.	Fornecer forma e estabilidade mecânica ao tecido lesado e dá rigidez e firmeza aos tecidos.	Biomateriais que preencham o espaço vazio da lesão e possuam propriedades mecânicas próximas das do tecido nativo.
3 – Fornece sinais químicos às células.	Interactua activamente com as células para facilitar actividades celulares como a proliferação e a diferenciação.	Sinais biológicos como locais de adesão celular; sinais como topografia da superfície do material.
4 – Actua como reservatórios de factores de crescimento e potencia as suas acções.	Funciona como veículo de transporte e reservatório para factores de crescimento aplicados exogenamente.	A existência de microestruturas e outros factores da matriz que retenham os agentes bioactivos no <i>scaffold</i> .
5 – Fornece um ambiente físico flexível que permite modelar a resposta do tecido a processos dinâmicos como a cura de uma ferida.	Fornecer um volume de vazio necessário à vascularização e à formação de tecido novo.	A existência de poros na microestrutura para a difusão de nutrientes e metabolitos; design da matriz com mecanismos e taxas de degradação controláveis; compatibilidade aceitável dos biomateriais e dos produtos degradados para com o tecido.

Adaptado de O'Brien [2].

Tabela A.2 Comparativo entre vários processos de produção de nanofibras.

Processo	Possibilidade de ampliação (<i>scale up</i>)	Repetibilidade	Controlo da dimensão da fibra	Vantagens	Desvantagens
Electrofiação (solução)	Sim	Sim	Sim	Fibras longas e contínuas	Problemas com o solvente, baixa produtividade, instabilidade do jacto.
Electrofiação (fundido)	Sim	Sim	Sim	Fibras longas e contínuas	Degradação térmica do polímero, problemas relacionados com descargas eléctricas
Meltblowing	Sim	Sim	Sim	Fibras longas e contínuas, elevada produtividade, sem problemas de solvente	Limitações a nível de polímeros, degradação térmica do polímero
Template synthesis	Não	Sim	Sim	Fácil mudança do diâmetro da fibra	Processo complexo
Drawing	Não	Sim	Não	Processo Simples	Processo descontinuado
Phase-Separation	Não	Sim	Não	Necessita apenas de equipamentos simples	Apenas trabalha com determinados polímeros
Self-Assembly	Não	Sim	Não	Obtém facilmente fibras com diâmetros muito pequenos	Processo complexo
Fiação centrífuga	Sim	Sim	Sim	Não necessita de alta voltagem, elevada produtividade	Por vezes pode necessitar de elevadas temperaturas

Adaptado de Nayak *et al* [14].

Tabela A.3 Influência dos parâmetros que influenciam a electrofiação na morfologia das nanofibras produzidas.

Parâmetros	Efeitos na morfologia da fibra
<i>Parâmetros da solução</i>	
- Viscosidade	Baixa – Geração de contas; Alta – Aumento do diâmetro das fibras, desaparecimento de contas.
- Concentração do polímero	Aumento do diâmetro da fibra à medida que a concentração aumenta.
- Peso molecular do polímero	Redução do número de contas e gotículas à medida que o peso molecular do polímero aumenta.
- Conductividade	Redução do diâmetro da fibra com o aumento da conductividade.
- Tensão superficial	Parece não afectar a morfologia da fibra, porém quanto maior for a tensão superficial maior é a instabilidade do jacto.
<i>Parâmetros de processamento</i>	
- Tensão aplicada	Diminuição do diâmetro da fibra com o aumento da tensão.
- Distância entre a ponta da agulha e o colector	Aparecimento de contas a distâncias muito curtas e muito elevadas, é necessária uma distância mínima para a formação de fibras uniformes.
- Caudal do polímero	Redução do diâmetro das fibras com a diminuição do caudal, aparecimento de contas com um caudal muito elevado.
<i>Parâmetros ambientais</i>	
- Humidade	Elevada humidade resulta na formação de poros circulares nas fibras.
- Temperatura	O aumento da temperatura resulta numa redução do diâmetro da fibra.

Adaptado de Bhardwaj e Kundu [15].

Tabela A.4 Componentes principais dum aparelho de fiação centrífuga e as respectivas funções.

Componente	Função
Motor	O motor é o responsável pela velocidade angular do reservatório onde a solução polimérica ou fundido se encontra, obrigando, através do efeito centrífugo, à saída da mesma solução ou fundido pelo/s orifício/s existente no reservatório. O motor está acoplado a um sistema de controlo, de maneira a ser possível regular a velocidade angular.
Reservatório com orifícios	É no reservatório que é colocada a solução polimérica ou fundido. Os orifícios permitem que a solução ou fundido saiam do reservatório. A taxa de produção de fibras está dependente do número de orifícios: cada orifício produz cerca de 1 grama de fibras por minuto [20].
Sistema térmico	O sistema térmico possibilita o aquecimento e o arrefecimento dos materiais colocados dentro do reservatório. O sistema térmico possui um controlador de temperatura, para que seja possível seleccionar a temperatura que o operador deseja. Este sistema é indispensável na formação de fibras de fundidos.
Colector	É no colector que são colectadas as nanofibras produzidas. Este componente circunda o reservatório na sua totalidade.
Câmara ambiental	Esta câmara permite a realização de vácuo e torna o ambiente que circunda o aparelho asséptico, não permitindo contaminações das nanofibras. Possibilita um melhor controlo de temperatura e humidade e serve ainda de protecção para o operador [19].

Tabela A.5 Comparação entre o equipamento de fiação centrífuga utilizado por vários grupos de investigação.

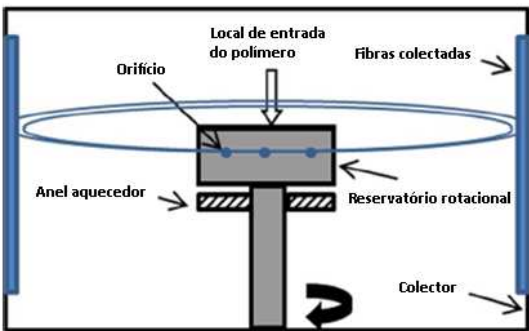
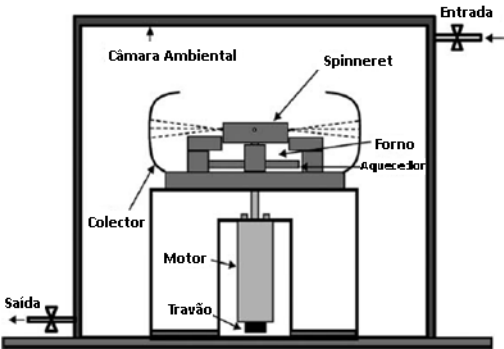
Ilustração	Equipamento	Referência
	- Motor; - Coletor cilíndrico a 15 cm do reservatório; - Sistema de aquecimento inferior controlável; - Reservatório de 89 mm de diâmetro, com 24 orifícios de 0,25 mm de diâmetro interno.	[23]
	- Motor; - Coletor cilíndrico; Vazquez <i>et al.</i> [25] utiliza um coletor cilíndrico com 304,8 mm de diâmetro; Padron <i>et al.</i> [24] utilizaram um coletor formado por 10 colunas; McEaching e Lozano [4] utilizaram um coletor constituído por varetas de politetrafluoroetileno igualmente espaçados; - Sistema de aquecimento inferior controlável; - Reservatório com 2 orifícios, sem informação disponível acerca das suas dimensões; Vazquez <i>et al.</i> [25] utiliza um reservatório cilíndrico de 2 mL com número desconhecido de orifícios com 0,250 mm de diâmetro; McEaching e Lozano [4] utilizam dois reservatórios com capacidades diferentes, com um número desconhecido de orifícios com 0,255 mm de diâmetro; - Câmara ambiental.	[4, 19, 24, 25]

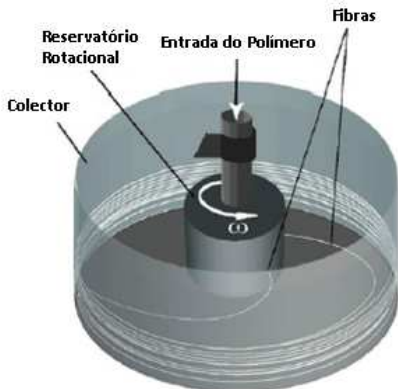
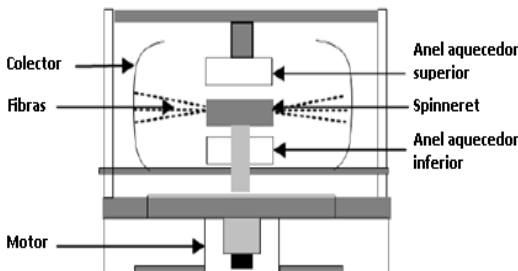
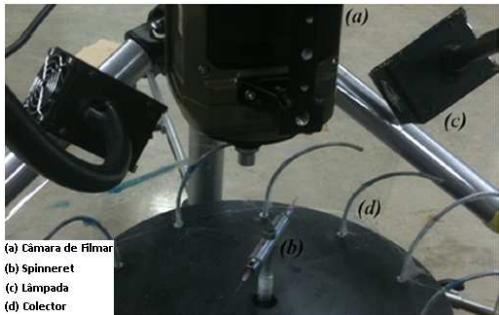
Ilustração	Equipamento	Referência
	- Motor; - Coletor cilíndrico com 300 mm de diâmetro; - Reservatório com um volume interno de 700 μL e um diâmetro externo de 12,5 mm, com 2 orifícios de 0,340 mm de diâmetro; - Fornecimento contínuo de solução polimérica, de maneira a manter a pressão hidrostática constante e o fluxo contínuo.	[22]
	- Motor - Coletor cilíndrico; - Reservatório com duas agulhas de 0,255 mm de diâmetro a servirem de dois orifícios; - Sistema de aquecimento superior e inferior controlável, utilizado para fundidos; - Reservatório para soluções diferente do reservatório para fundidos.	[21]
 (a) Câmara de filmar (b) Spinneret (c) Lâmpada (d) Coletor	- Motor; - Coletor formado por varetas (material não é referido), igualmente espaçadas; - Reservatório com duas agulhas de 0,838 mm de diâmetro a servirem de dois orifícios; - Câmara de alta velocidade Phantom Vision v12.1; - Lâmpadas de 120 W de alta intensidade.	[20]

Ilustração	Equipamento	Referência
 Reservatório Cilindro colector Botão On/Off	- Aparelho básico de produção de algodão doce; - Número de orifícios do reservatório e diâmetro dos orifícios desconhecido; - Sistema de aquecimento inferior, por meio de duas resistências, sem controlo possível; - Colector cilíndrico de plástico;	[26]

Tabela A.6 Análise comparativa dos diferentes trabalhos da literatura referentes à técnica de fiação centrífuga.

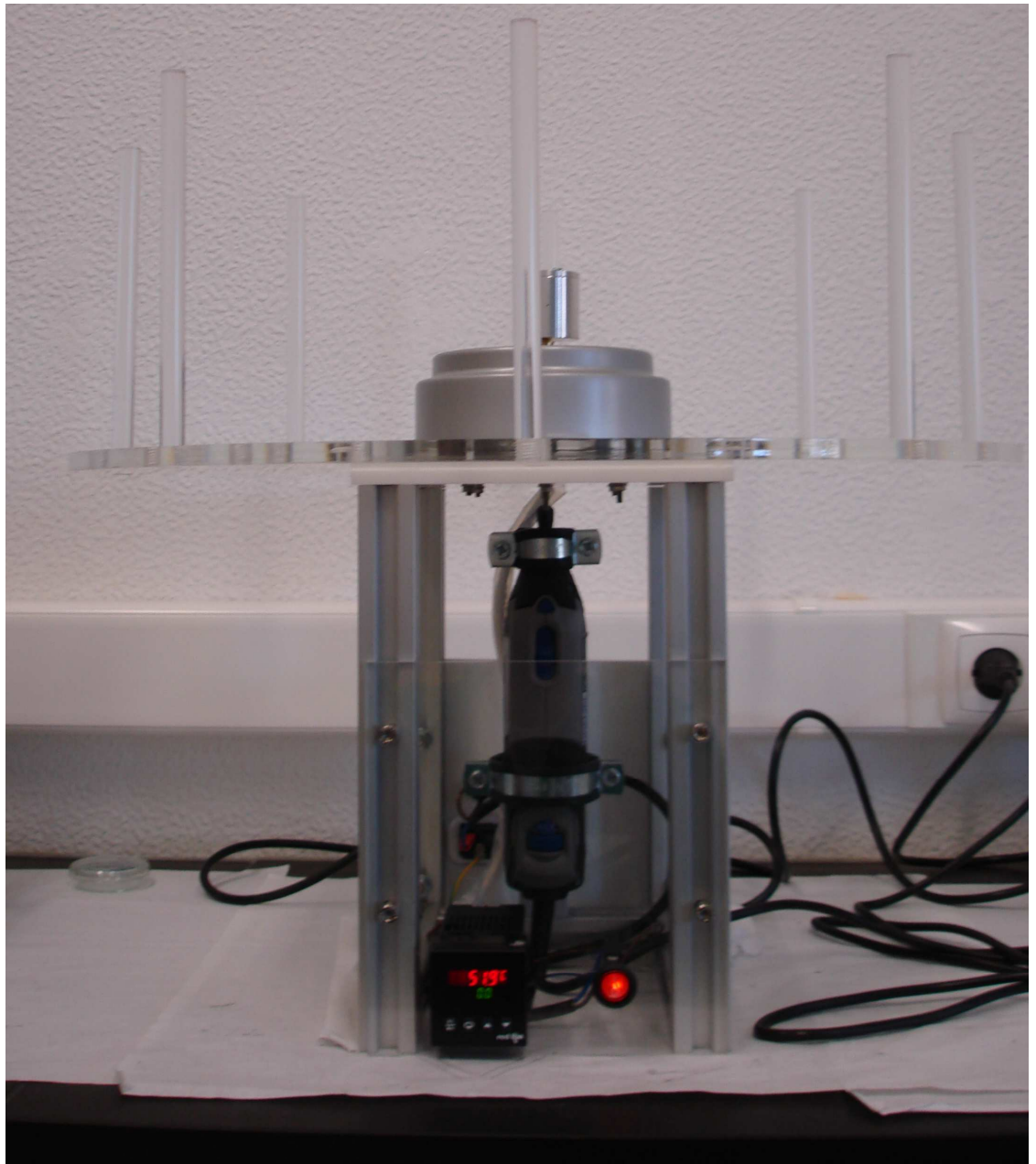
Ref. ¹	Material	Solvente	Diâmetro das fibras obtidas	Parâmetros estudados	Outras características relevantes
[26]	PLA.	Sem uso de solvente.	Variados. Entre 993 nm e 10-50 µm.	Peso molecular e viscosidade inerente.	Aparelho rudimentar para fabrico de algodão doce. Parâmetros do aparelho incontroláveis.
[19]	PEO, PP e PS.	PEO – água desionizada, 7% a 16%; PP – sem solvente; PS e bismuto sem informação.	PEO – 300 nm; PS e PP sem informação.	Tipo de reservatório, tipo de orifício, propriedades reológicas da solução, velocidade de rotação, temperatura, sistema colector e o ambiente circundante.	Aparelho protegido por uma câmara para controlo dos parâmetros ambientais e protecção do operador. Utilização de rotações entre 3000 e 5000 rpm para a produção de fibras de PEO. Produção de 1g/min por orifício.
[21]	Nylon 6, PVDF e PP.	Solução de 20 wt% de Nylon 6 em ácido fórmico; Solução de 13,5 wt% de PVDF em dimetilacetamida e acetona (1:1); PP sem uso de solvente.	Nylon 6 – 165 ± 55 nm; PVDF – 201 ± 86 nm; PP – 372 ± 238 nm.	Tipo de reservatório, propriedades reológicas da solução, velocidade de rotação, temperatura.	As fibras de Nylon 6 e PVDF foram formadas a 7000 rpm e usando agulhas de 0,255 mm como orifícios; Já as fibras de PP foram formadas a 12 000 rpm, a 225°C, em ciclos de 30 segundos, tendo agulhas semelhantes como orifícios de saída.
[22]	PLA.	Várias soluções: A 4, 6, 8 e 10 wt% de PLA em clorofórmio.	Entre 50 e 3500 nm; média a 4000 rpm: 1143 ± 50 nm; média a 12000 rpm 424 ± 41 nm.	Propriedades reológicas da solução, velocidade de rotação.	Uso de 3 velocidades de rotação diferentes: 4000, 8000, 12000 rpm.
[25]	PVDF.	Várias soluções: 18, 21,5 e 25 wt% de PVDF em acetona/DMAc.	Mais baixo – a 18 wt% e 8000 rpm: 311 ± 156 (com contas); Mais alto – a 25 wt% e 8000 rpm: 1709 ± 939 nm (sem contas).	Propriedades reológicas da solução, velocidade de rotação.	As fibras obtidas provêm de ciclos de 25 segundos (>1g/min); Foram utilizadas essencialmente duas velocidades de rotação: 4000 e 8000 rpm.

¹ Referência Bibliográfica

Ref. ²	Material	Solvente	Diâmetro das fibras obtidas	Parâmetros estudados	Outras características relevantes
[24]	BEH-PPV.	PEO e clorofórmio	A uma concentração ótima de 5 wt% e 4000 rpm as fibras possuem um diâmetro médio de 570 +- 120 nm.	Propriedades reológicas da solução, velocidade de rotação.	Obtiveram-se maiores rendimentos a velocidade de rotação mais elevadas a maiores concentrações de BEH-PPV (5 e 10 wt%). Para maiores velocidades os ciclos duram 10 s enquanto para baixas velocidades cada ciclo dura 30 s.
[23]	PBT.	Sem solvente.	A uma temperatura de 320°C e a uma velocidade de rotação de 12000 rpm, obtém-se $1,17 \pm 0,92 \mu\text{m}$.	Temperatura e velocidade de rotação	O diâmetro das nanofibras produzidas é muito mais dependente da temperatura do que da velocidade de rotação.
[4]	PCL.	Diclorometano.	A 9000 rpm e com a solução de 16 wt% é obtido o menor valor de médio de diâmetro das fibras: $220 \pm 98 \text{ nm}$.	Propriedades reológicas da solução e velocidade de rotação.	Verificou-se que as fibras colectadas pouco tempo (5 s) depois de se colocar o reservatório em rotação têm um diâmetro muito maior que aquelas colectadas com o reservatório em rotação há alguns segundos (30 s). Diminuição de cristalinidade com o aumento da velocidade de rotação.
[24]	BEH-PPV.	PEO e clorofórmio	A uma concentração ótima de 5 wt% e 4000 rpm as fibras possuem um diâmetro médio de 570 +- 120 nm.	Propriedades reológicas da solução, velocidade de rotação.	Obtiveram-se maiores rendimentos a velocidade de rotação mais elevadas a maiores concentrações de BEH-PPV (5 e 10 wt%). Para maiores velocidades os ciclos duram 10 s enquanto para baixas velocidades cada ciclo dura 30 s.
[23]	PBT.	Sem solvente.	A uma temperatura de 320°C e a uma velocidade de rotação de 12000 rpm, obtém-se $1,17 \pm 0,92 \mu\text{m}$.	Temperatura e velocidade de rotação	O diâmetro das nanofibras produzidas é muito mais dependente da temperatura do que da velocidade de rotação.

² Referência Bibliográfica

Apêndice B – Aparelho de fiação centrífuga de
fibras de primeira geração



Apêndice C – Protocolo da cultura celular

Esterilização das amostras

1. A partir de rede de fibras produzidas a 10350 rpm e 10 % de PCL, 10350 rpm e 11 % de PCL, 10350 rpm e 12 % de PCL, 4100 rpm e 12 % e 16800 rpm e 12 % de PCL, cortaram-se, em forma de disco de 12 mm de diâmetro, 8 réplicas de cada amostra.
2. Esterilizaram-se as réplicas de cada amostra com uma solução de isopropanol a 70 % em água ultra-pura, deixando-se em repouso durante 20 minutos.
3. Retirou-se, por meio de uma pipeta, a solução de isopropanol das amostras. Deixou-se secar.

Descongelamento das células

4. Adicionou-se 4 mL de meio DMEM com 10% de soro fetal bovino e penicilina e estreptomicina a 1 mL de meio de congelamento com células C2C12.
5. Contou-se o número de células, por meio de um hemocitómetro.
6. Passaram-se os 5 mL perfeitos anteriormente para um frasco de cultura celular T25, tendo-se colocado o mesmo numa incubadora a 37°C e com uma atmosfera a 5% de CO₂.
7. Acompanharam-se as células nos dias seguintes, não deixando que estas atinssem a confluência. Quando necessário mudou-se o meio celular e, na existência de uma elevada densidade celular, mudaram-se as células para um frasco de cultura celular T75.

Sementeira das células nas amostras

8. Selecionaram-se 3 réplicas de cada amostra, tendo estas sido colocadas no interior de um copo de teflon e presas por uma anilha de teflon.
9. Colocou-se 250 µL de meio em cada copo, de maneira a molhar as réplicas e a diminuir a hidrofobicidade natural do PCL. Deixou-se repousar durante 24 horas na incubadora.
10. Retirou-se 250 µL de meio em cada copo, colocando-se 250 µL de meio com cerca de 5000 células.

Determinação da adesão celular

11. 24h após a sementeira, adicionou-se 25 μL de resazurina a 0,5 % a cada copo.
12. Deixou-se a incubar durante 2 horas na incubadora.
13. Retirou-se 200 μL de meio com resazurina de cada copo, tendo-se colocado numa placa de 96 poços.
14. Juntou-se 200 μL de PBS às membranas dentro dos copos, de maneira a lavar as células.
15. Retirou-se 200 μL de PBS dos copos, tendo-se adicionado 250 μL de meio.
16. Colocou-se a incubar os copos com as células.
17. Colocou-se a placa de 96 poços num aparelho, BioTek ELX 800, de forma a medir a absorvância do meio a 570 nm e a 600 nm.

Determinação da proliferação celular

18. Passados dois, cinco e sete dias, retiraram-se os copos com meio e células da incubadora e repetiram-se os passos 11-17 de maneira a estudar a proliferação celular.

Fixação

19. Após sete dias em proliferação, retirou-se o meio de crescimento celular sendo este substituído por um meio fraco, pobre em BSA, tendo-se adicionado 250 μL do mesmo. Este meio foi mudado a cada dois dias.
20. Cinco e sete dias depois das células se encontrarem em meio de diferenciação, fixou-se as células às membranas de três maneiras diferentes: retirou-se o meio de diferenciação e juntou-se 250 μL de glutaraldeído (2,5 %), deixando-se repousar durante 24 horas. Realizaram-se três lavagens com PBS durante cinco minutos; retirou-se o meio de diferenciação e juntou-se 250 μL de glutaraldeído (2,5 %), deixando-se repousar durante 24 horas. Realizaram-se quatro lavagens com etanol (50 %, 70 %, 90 % e 100 %) durante cinco minutos; retirou-se o meio de diferenciação e juntou-se 250 μL de metanol (100%). Deixou-se secar.

Apêndice D – Sistematização de resultados

Foram realizados vários ensaios ao longo deste trabalho, tendo em conta os seguintes parâmetros variáveis:

- Velocidade de rotação, em rpm, do reservatório: 2100, 4100, 10350, 16800 e 18500 (apenas para 1,4 – dioxano);
- Diâmetro do colector: 27,5 cm, 37,5 cm, 47,5 cm;
- Concentração de PCL utilizadas: para soluções com DCM 1-20% wt.; para soluções com 1,4 – dioxano, 5 %, 10 %, 15 %, 20 % wt.; Cada ensaio foi realizado com cerca de 1-5 mL de solução.

Neste apêndice são reportados os ensaios realizados, de uma forma resumida, recorrendo a tabelas que descrevem se houve ou não formação de fibras. Quando necessário, será feita uma brevíssima descrição tendo em conta uma análise visual.

O primeiro grupo de tabelas e imagens corresponde a fibras produzidas no reservatório cilíndrico com dois orifícios de 1 mm. O segundo grupo corresponde a fibras produzidas no reservatório com dois orifícios de 0,5 mm, bem como numa renovação de todo o sistema de transmissão de velocidade e do reservatório.

Soluções de PCL utilizando DCM como solvente e o reservatório com orifícios de 1 mm de diâmetro

Solução (%wt)	Velocidade Dremel (rpm)	Diâmetro Colector (cm)	Tipo de Colector	Formação de Fibras?	Descrição
1 a 5	20000	47,5	Alumínio	Não	-----
	15000			Não	-----
	10000			Não	-----
	5000			Não	-----

Solução (%wt)	Velocidade Dremel (rpm)	Diâmetro Colector (cm)	Tipo de Colector	Formação de Fibras?	Descrição
6	20000	47,5	Alumínio	Sim	Mais fibras que as anteriores concentrações, sendo possível a sua recolha. Muito quebradiças.
	15000			Sim	Semelhante ao resultado anterior.
	10000			Não	Muito pouca fibra. Sem interesse.
	5000			Não	Nada

Solução (%wt)	Velocidade Dremel (rpm)	Diâmetro Colector (cm)	Tipo de Colector	Formação de Fibras?	Descrição
7	20000	47,5	Alumínio	Sim	Fibras muito finas, tipo electrofiação. Porém possuem contas.
	15000			Sim	Semelhante ao resultado anterior.
	10000			Não	Fibras cheias de contas. Sem interesse.
	5000			Não	Formação de fibras apenas à volta do copo.

Solução (%wt)	Velocidade Dremel (rpm)	Diâmetro Colector (cm)	Tipo de Colector	Formação de Fibras?	Descrição
8	20000	47,5	Alumínio	Sim	Fibras muito finas, semelhantes às da electrofiação. Porém possuem contas.
	15000			Sim	Fibras menos finas que as anteriores e com mais contas.
	10000			Não	Fibras com muitas contas. Sem interesse.
	5000			Não	Formação de fibras apenas em redor do copo.

Solução (%wt)	Velocidade Dremel (rpm)	Diâmetro Colector (cm)	Tipo de Colector	Formação de Fibras?	Descrição
9	20000	47,5	Alumínio	Sim	Fibras muito finas. Porém possuem algumas contas.
	15000			Sim	Fibras menos finas que as anteriores e com mais contas e mais espaçadas entre si. Sem grande interesse
	10000			Não	Sem interesse – com muitas contas.
	5000			Não	Sem interesse – fibras com um elevado diâmetro e espaçadas entre si.

Solução (%wt)	Velocidade Dremel (rpm)	Diâmetro Colector (cm)	Tipo de Colector	Formação de Fibras?	Descrição
10	20000	47,5	Alumínio	Sim	Fibras mais finas, com uma boa rede de fibra formada, mas cheias de contas.
	15000			Sim	Semelhante às anteriores.
	10000			Não	Muitas contas em muito pouca fibra.
	5000			Sim	Zona interna com fibras muito finas, enquanto a zona externa com fibras que ainda têm solvente – fundidas.

Solução (%wt)	Velocidade Dremel (rpm)	Diâmetro Colector (cm)	Tipo de Colector	Formação de Fibras?	Descrição
11	20000	47,5	Alumínio	Sim	Fibras finas.
	15000			Não	Fibras com muitas contas.
	10000			Não	Fibras com muitas contas.
	5000			Sim	Fibras semelhantes às de 15 % wt. a 10 000 rpm.

Solução (%wt)	Velocidade Dremel (rpm)	Diâmetro Colector (cm)	Tipo de Colector	Formação de Fibras?	Descrição
12	20000	47,5	Alumínio	Sim	Fibras finas mas com contas.
	15000			Sim	Fibras com muitas contas.
	10000			Sim	Fibras semelhantes às de 15 % wt. que, quando o copo deixa de ser alimentado, ficam com contas.
	5000			Sim	Fibras semelhantes às de 15 % wt. a 10 000 rpm.

Solução (%wt)	Velocidade Dremel (rpm)	Diâmetro Colector (cm)	Tipo de Colector	Formação de Fibras?	Descrição
13	20000	47,5	Alumínio	Sim	Fibras finas com contas.
	15000			Sim	Fibras com contas e ainda molhadas.
	10000			Sim	Zonas interiores com contas. Zonas mais exteriores semelhantes aos 15 % wt. a 10 000 rpm.
	5000			Sim	Fibras tipo 15 % wt. a 10 000 rpm mas muito molhadas.

Solução (%wt)	Velocidade Dremel (rpm)	Diâmetro Colector (cm)	Tipo de Colector	Formação de Fibras?	Descrição
14	20000	47,5	Alumínio	Sim	Fibras mais grossas e com algumas contas.
	15000			Sim	Várias contas nas fibras. Sem interesse.
	10000			Sim	Semelhante ao 15 % wt. a 10 000 rpm mas com mais contas.
	5000			Não	Fibras sem contas mas com um diâmetro elevado. Com desperdício no copo – formação de fibra no mesmo.

Solução (%wt)	Velocidade Dremel (rpm)	Diâmetro Colector (cm)	Tipo de Colector	Formação de Fibras?	Descrição
15	20000	47,5	Alumínio	Sim	Boa rede de fibras, mais ou menos orientadas. Porém diâmetro elevado e algumas contas.
	15000			Sim	Pouca fibra formada com bastantes contas. Sem interesse algum.
	10000			Sim	Fibras sem contas e orientadas, rede uniforme, boa rede, porém diâmetro um pouco elevado. Tamanho orifício?
	5000			Sim	Fibras à volta do copo. Fibras um pouco mais finas que as anteriores, orientadas e uniformes.

Solução (%wt)	Velocidade Dremel (rpm)	Diâmetro Colector (cm)	Tipo de Colector	Formação de Fibras?	Descrição
16	20000	47,5	Alumínio	Sim	Muito pouca fibra formada com 3 mL.
	15000			Sim	Fibras algo espaçadas mas com poucas contas.
	10000			Sim	Fibras inicialmente muito finas ma depois, com o final da alimentação do copo, ganham contas.
	5000			Sim	Poucas fibras. Quase tudo formado no copo (efeito bailarina).

Solução (%wt)	Velocidade Dremel (rpm)	Diâmetro Colector (cm)	Tipo de Colector	Formação de Fibras?	Descrição
17	20000	47,5	Alumínio	Sim	Fibras muito espaçadas e com contas.
	15000			Sim	Muitas contas. Sem interesse.
	10000			Sim	Fibra com contas e uma dispersão estranha. Desperdício = fibras à volta do copo.
	5000			Não	Fibra apenas formada em redor do recipiente.

Solução (%wt)	Velocidade Dremel (rpm)	Diâmetro Colector (cm)	Tipo de Colector	Formação de Fibras?	Descrição
18	20000	47,5	Alumínio	Sim	Fibras espaçadas, com um diâmetro elevado e contas.
	15000			Sim	Fibras com mais contas que as anteriores.
	10000			Sim	Fibras mais próximas entre si e com menos contas. Porém a malha não foi formada uniformemente
	5000			Não	Não houve fibra formada para além da do copo.

Solução (%wt)	Velocidade Dremel (rpm)	Diâmetro Colector (cm)	Tipo de Colector	Formação de Fibras?	Descrição
19	20000	47,5	Alumínio	Sim	Muito pouca fibra e muito espaçada.
	15000			Sim	Sem interesse – pouca fibra e muita conta.
	10000			Sim	Fibras muito espaçadas, grossas e com muitas contas.
	5000			Não	Nada.

Solução (%wt)	Velocidade Dremel (rpm)	Diâmetro Colector (cm)	Tipo de Colector	Formação de Fibras?	Descrição
20	20000	47,5	Alumínio	Não	A solução ficou toda na parede do colector.
	15000			Não	A solução ficou toda na parede do colector.
	10000			Sim	Fibras à volta do copo. Boa rede de fibras, diâmetro elevado e algumas contas.
	5000			Não	Não houve produção de qualquer tipo de fibras.

Soluções de PCL utilizando DCM como solvente e o reservatório com orifícios de 0,5 mm de diâmetro

Solução (%wt)	Velocidade (rpm)	Diâmetro Colector (cm)	Tipo de Colector	Formação de Fibras?	Descrição
1, 2	16800	47,5	Alumínio	Não	-----
	10350			Não	-----
	4100			Não	-----
	2100			Não	-----

Solução (%wt)	Velocidade (rpm)	Diâmetro Colector (cm)	Tipo de Colector	Formação de Fibras?	Descrição
3	16800	47,5	Alumínio	Sim	Fibras muito finas mas cheias de contas. Rede sem padrão.
	10350			Não	-----
	4100			Não	-----
	2100			Não	-----

Solução (%wt)	Velocidade (rpm)	Diâmetro Colector (cm)	Tipo de Colector	Formação de Fibras?	Descrição
4	16800	47,5	Alumínio	Sim	Fibras muito finas com contas muito pequenas. Rede sem padrão.
	10350			Não	Muitas contas.
	4100			Não	-----
	2100			Não	-----

Solução (%wt)	Velocidade (rpm)	Diâmetro Colector (cm)	Tipo de Colector	Formação de Fibras?	Descrição
5	16800	47,5	Alumínio	Sim	Fibras finas no interior da rede e muitas contas no exterior da rede.
	10350			Não	Muitas contas
	4100			Não	Gotas molhadas
	2100			Não	-----

Solução (%wt)	Velocidade (rpm)	Diâmetro Colector (cm)	Tipo de Colector	Formação de Fibras?	Descrição
6	16800	47,5	Alumínio	Sim	Fibras finas no interior da rede e muitas contas no exterior da rede.
	10350			Sim	Pouca fibra e muitas contas.
	4100			Não	Filme cheio de gotas.
	2100			Não	-----

Solução (%wt)	Velocidade (rpm)	Diâmetro Colector (cm)	Tipo de Colector	Formação de Fibras?	Descrição
7	16800	47,5	Alumínio	Sim	Fibras finas, com contas.
	10350			Sim	Fibras finas com algumas contas. Diâmetro da rede de fibras elevado.
	4100			Não	Formação de filme
	2100			Não	-----

Solução (%wt)	Velocidade (rpm)	Diâmetro Colector (cm)	Tipo de Colector	Formação de Fibras?	Descrição
8	16800	47,5	Alumínio	Sim	Fibras finas com algumas contas.
	10350			Sim	Fibras finas com o diâmetro da rede mais elevado do que a 7 % wt. e 10350 rpm.
	4100			Sim	Fibras finas e alinhadas. Também se formaram fibras à volta do copo.
	2100			Não	-----

Solução (%wt)	Velocidade (rpm)	Diâmetro Colector (cm)	Tipo de Colector	Formação de Fibras?	Descrição
9	16800	47,5	Alumínio	Sim	Fibras finas com algumas contas
	10350			Sim	Fibras finas com o diâmetro da rede mais elevado do que a 8 % wt. e 10350 rpm.
	4100			Sim	Fibras finas e alinhadas. Também se formaram fibras à volta do copo.
	2100			Não	-----

Solução (%wt)	Velocidade (rpm)	Diâmetro Colector (cm)	Tipo de Colector	Formação de Fibras?	Descrição
10	16800	47,5	Alumínio	Sim	Fibras com uma boa rede e sem contas.
	10350			Sim	Fibras finas e sem contas
	4100			Sim	Fibras à volta do copo. Pouca fibra formada na rede.
	2100			Não	-----

Solução (%wt)	Velocidade (rpm)	Diâmetro Colector (cm)	Tipo de Colector	Formação de Fibras?	Descrição
11	16800	47,5	Alumínio	Sim	Fibras finas e com muito poucas contas.
	10350			Sim	Fibras finas e sem contas
	4100			Sim	Fibras finas e sem contas
	2100			Não	-----

Solução (%wt)	Velocidade (rpm)	Diâmetro Colector (cm)	Tipo de Colector	Formação de Fibras?	Descrição
12	16800	47,5	Alumínio	Sim	Fibras muito finas e sem contas.
	10350			Sim	Fibras muito finas e sem contas.
	4100			Sim	Fibras finas sem contas.
	2100			Não	-----

Solução (%wt)	Velocidade (rpm)	Diâmetro Colector (cm)	Tipo de Colector	Formação de Fibras?	Descrição
13	16800	47,5	Alumínio	Sim	Fibras muito finas.
	10350			Sim	Fibras muito finas.
	4100			Não	-----
	2100			Não	-----

Solução (%wt)	Velocidade (rpm)	Diâmetro Colector (cm)	Tipo de Colector	Formação de Fibras?	Descrição
14	16800	47,5	Alumínio	Sim	Fibras finas.
	10350			Sim	Fibras finas.
	4100			Não	-----
	2100			Não	-----

Solução (%wt)	Velocidade (rpm)	Diâmetro Colector (cm)	Tipo de Colector	Formação de Fibras?	Descrição
15	16800	47,5	Alumínio	Sim	-----
	10350			Sim	Pouca fibra e rede desorganizada. Formaram-se fibras à volta do copo.
	4100			Não	-----
	2100			Não	-----

Solução (%wt)	Velocidade (rpm)	Diâmetro Colector (cm)	Tipo de Colector	Formação de Fibras?	Descrição
16	16800	47,5	Alumínio	Sim	Fibras com zonas mais ou menos uniformes.
	10350			Não	-----
	4100			Não	-----
	2100			Não	-----

Solução (%wt)	Velocidade (rpm)	Diâmetro Colector (cm)	Tipo de Colector	Formação de Fibras?	Descrição
17, 18, 19, 20	16800	47,5	Alumínio	Não	-----
	10350			Não	-----
	4100			Não	-----
	2100			Não	-----

Soluções de PCL utilizando 1,4 - dioxano como solvente e reservatório com orifícios de 0,5 mm de diâmetro

Solução (%wt)	Velocidade (rpm)	Diâmetro Colector (cm)	Tipo de Colector	Formação de Fibras?	Descrição
5	18500	47,5	Alumínio	Não	-----
	16800			Não	-----
	10350			Não	-----
	4100			Não	Filme

Solução (%wt)	Velocidade (rpm)	Diâmetro Colector (cm)	Tipo de Colector	Formação de Fibras?	Descrição
10	18500	47,5	Alumínio	Sim	Fibras muito finas, com contas e com uma secção da rede com bastante solvente por evaporar
	16800			Sim	Fibras muito finas mas com muitas contas
	10350			Não	Fibras muito molhadas e cheias de contas. Sem interesse
	4100			Não	Nada

Solução (%wt)	Velocidade (rpm)	Diâmetro Colector (cm)	Tipo de Colector	Formação de Fibras?	Descrição
15	18500	47,5	Alumínio	Não	Contas
	16800			Sim	Fibras com muitas contas
	10350			Sim	Fibras muito finas com contas.
	4100			Sim	Fibras muito finas com poucas contas.

Solução (%wt)	Velocidade (rpm)	Diâmetro Colector (cm)	Tipo de Colector	Formação de Fibras?	Descrição
20	18500	47,5	Alumínio	Não	Contas
	16800			Sim	Fibras finas com muitas contas
	10350			Sim	Fibras com muitas contas
	4100			Não	-----

Apêndice E – Desenho técnico de componentes