



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Desenvolvimento e Simulação Computacional de Nanomateriais Poliméricos para Aplicações Biomédicas

Pedro Emanuel Marques Videira

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biomédicas
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Professora Doutora Joana Maria Rodrigues Curto

Covilhã, Outubro de 2015

Agradecimentos

Queria agradecer há minha orientadora Professora Joana Curto por toda a disponibilidade e generosidade demonstrada ao longo deste ano. Foi sem dúvida um ano desafiante e divertido e sem o seu apoio nada do que foi atingido teria sido possível.

Um agradecimento especial à Engenheira Paula Gomes e ao Mestre João Pedro Matos por todas as horas disponibilizadas no centro de ótica. Sem a sua ajuda a obtenção das imagens de microscopia eletrónica e o tratamento a elas feito não teria sido possível.

Aos meus amigos por toda a paciência e encorajamento que me foram transmitindo ao longo do último ano. Mas sem duvida um agradecimento especial aos meus grandes amigos Rui e ao André que sempre me incentivaram a fazer mais e melhor.

E por último mas não menos importante há minha família e em especial aos meus pais e há minha irmã por toda a compreensão, suporte e conselhos. O seu encorajamento foi fundamental para a realização desta dissertação.

Resumo

O desenvolvimento de materiais poliméricos porosos nos quais é possível otimizar a porosidade e a espessura é muito importante no desenvolvimento de materiais para aplicações biomédicas, tais como sistemas de entrega de medicamentos e estruturas de suporte para crescimento celular.

Neste trabalho foram produzidas várias estruturas porosas de polivinil álcool e poliamida-6 por “electrospinning”. Estas estruturas foram caracterizadas utilizando o microscópio eletrônico de varrimento. Efetuou-se um estudo sistemático para analisar a homogeneidade e espessura da estrutura, quantificar o tamanho dos poros e as dimensões transversais das fibras. Além dos planos XY das estruturas efetuaram-se preparações de amostras no eixo do Z e determinaram-se várias dimensões da espessura da estrutura 3D. As estruturas foram analisadas utilizando um programa de análise de imagens, o Esprit 1.9. Efetuou-se um estudo que teve em conta o tamanho da amostra, a escolha de filtros e a escala de cinzentos. Quantificou-se a porosidade do material utilizando diferentes parâmetros de medição: o comprimento, a largura, o diâmetro médio, diâmetro equivalente, projeção no X e projeção no Y. Compararam-se os diferentes diâmetros de poros obtidos por análise de imagem com as medições que foram obtidas por microscopia eletrônica de forma manual, através da colocação de vetores. Conclui-se que os mais representativos são a projeção no X e a projeção no Y e que os resultados obtidos por análise de imagem são mais completos que os obtidos pelo método manual.

Utilizando os valores das medições experimentais das fibras efetuaram-se simulações computacionais das estruturas em estudo num simulador criado em Matlab®. O simulador computacional utilizado, já previamente validado, permitiu obter estruturas idênticas às estruturas porosas de polivinil álcool e poliamida-6 em estudo. Realizaram-se estudos de simulação e otimização utilizando 1000 estruturas simuladas nas quais se variaram alguns dos parâmetros de entrada tais como a largura da fibra e a sua flexibilidade. Com essas simulações construíram-se árvores de regressão/decisão para estabelecer e quantificar as relações entre as propriedades das fibras e as propriedades finais das estruturas, tais como a porosidade e a espessura. Conclui-se que a flexibilidade é a propriedade das fibras que mais influencia a porosidade e a espessura das estruturas.

Palavras-chave

Estruturas poliméricas porosas, poliamida-6, polivinil álcool, simulação computacional de estruturas porosas, árvores de decisão/regressão de nanomateriais porosos.

Abstract

The development of polymeric porous materials, in which it is possible to optimize porosity and thickness, is very important for the development of materials for biomedical applications such as drug delivery systems and scaffolds.

In this work, several porous structures of polyvinyl alcohol and polyamide-6 have been produced by “electrospinning”. These structures were characterized using the scanning electron microscope. A systematic study has been conducted to examine the homogeneity and thickness of the structure, pore size quantification and fiber transversal dimensions. In addition to the XY cut the samples were also prepared using a transversal cut, i.e. the third, or Z dimension was also characterized. The structures were also analyzed using an image analysis program called Esprit 1.9. We have conducted a study that took into account the optimization of the image, the sample size, the choice of filters and the contrast in the greyscale. We have quantified the porosity of the material using different measurement parameters: length, width, average diameter, equivalent diameter, X-projection and Y-projection. We concluded that the most representative dimensions are the X-projection and the Y-projection of the pore diameter and that the porous characterization obtained using the image analysis method is more complete than the one using the manual method.

Using the experimental values for fiber dimensions and flexibility, a computer simulation of the structures was performed in a simulator created in Matlab[®]. This simulator has been previously validated, and was able to create identical structures to real polyvinyl alcohol and polyamide-6 porous structures in study. A computational study using 1000 simulated structures was done, where input parameters like fiber width and fiber flexibility were changed according to a computational experiments plan. With these 1000 simulations regression/decision trees were constructed to establish and quantify the relationship between fiber properties and final properties of the structures such as porosity and thickness. We concluded that the fiber flexibility is the property that most influences the porosity and the thickness of the structures.

Keywords

Porous polymeric structures, polyamide-6, polyvinyl alcohol, computer simulation of porous structures, decision/regression trees for porous nanomaterials.

Índice

I. Introdução	1
1.1 Polímeros	2
1.1.1 Polivinil Álcool	2
1.1.2 Poliamida-6	3
1.2 Nanofibras	4
1.3 “Electrospinning”	6
1.4 Suportes de crescimento	8
1.5 Sistema de entrega de moléculas	10
1.6 Microscopia eletrónica de Varrimento (MEV)	11
1.7 Modelação de redes de materiais em 3D	14
1.7.1 Simulação computacional	15
1.7.2 Área de superfície e tamanho dos poros	16
1.7.3 Contacto inter-fibras e Flexibilidade	17
II. Materiais e Métodos	18
2.1 Materiais	19
2.2 Métodos	19
2.2.1 “Electrospinning”	19
2.2.2 Microscopia eletrónica de varrimentos	19
2.2.3 Espectroscopia de Raio-X por dispersão de energia	20
2.2.4 Simulação computacional	20
2.2.5 Árvores de regressão/decisão	20
2.2.6 Análise estatística	20
III. Resultados e Discussão	21
3.1 Caracterização no microscópio eletrónico de varrimento	22
3.2 Análise de EDX das amostras	30
3.3 Simulações computacionais	31
3.4 Árvores de regressão/decisão	35
IV. Conclusões e Trabalho Futuro	38
V. Bibliografia	40

Lista de Figuras

Figura 1: Fórmula química e disposição atômica da molécula de vinil álcool.....	2
Figura 2: Fórmula química e disposição atômica da molécula de amida.....	3
Figura 3: Reação de formação da poliamida-6.....	3
Figura 4: Esquemas de montagem de um sistema de “electrospinning”.....	6
Figura 5: Efeito da concentração, caudal e voltagem em estruturas de “electrospinning”/”electrospray”.....	7
Figura 6: Tipos de radiação e electroes formados em MEV	13
Figura 7: Imagens obtidas por SEM de fibras de Polivinil álcool e Poliamida-6 aumentadas 4000x.....	13
Figura 8: Imagem 3D gerada pelo simulador e imagem do modelo de Niskanen	15
Figura 9: Deposição das fibras.....	15
Figura 10: Gráfico de validação do simulador computacional em que se pode ver que as estruturas reais feitas com fibras de celulose (“experimental paper”) e as estruturas computacionais (“virtual paper”) tem a mesma espessura.....	16
Figura 11: Matriz de imagens MEV das fibras de Polyamida-6 e Polivinil álcool criadas por “electrospinning”.....	23
Figura 12: Imagem de uma rede polimérica de polivinil álcool a partir da qual se analisou usando o programa de análise de imagem Esprit 1.9.....	24
Figura 13: Gráfico de diferentes médias dos diâmetros com o erro respetivo.....	25
Figura 14: Gráficos do polivinil álcool feitos pelo programa Esprit 1.9. A) Diâmetro médio versus diâmetro médio. B) Diâmetro médio versus diâmetro equivalente.....	26
Figura 15: Histograma que relaciona o número de partículas versus área.....	26
Figura 16: Imagem MEV de Poliamida-6 e polivinil álcool.....	27
Figura 17: Imagem MEV de Poliamida-6 e polivinil álcool.....	27
Figura 18: Comparação entre imagens de uma matriz de ácido poliláctico-I com uma simulação computacional.....	29
Figura 19: Comparação entre a porosidade de uma nanopartícula de alginato e comparação com uma simulação computacional.....	30
Figura 20: Fibras ocas feitas de PCL e PVA com uma fase aquosa no interior e comparação com uma simulação computacional.....	30
Figura 21: Gráficos da análise de espectroscopia de raio-X de energia dispersiva	31
Figura 22: Imagem radiográfica da densidade de poros obtida computacionalmente.....	31
Figura 23: Imagem 3D da rede criada em computador.....	32
Figura 24: Deposição de uma primeira fibra.....	32
Figura 25: Deposição de uma fibra. Através desta imagem podemos ver que uma fibra não se deposita sobre outras. O espaço ocupado por outras fibras não vai ser sobreposto.	

Figura 26: Localização espacial de várias fibras na rede criada.....	33
Figura 27: Estruturas de diferentes tamanhos	33
Figura 28: Árvore de regressão porosidade. Número de simulações n=1000 simulações....	36
Figura 29: Árvore de regressão/decisão da Espessura. Número de simulações n=1000.....	37

Lista de Tabelas

Tabela 1: Vários métodos/técnicas de produção de nanofibras.....	4
Tabela 2: Média do diâmetro dos poros em μm , erros, desvio padrão e nº de poros medidos através do método manual.....	22
Tabela 3: Valores obtidos através da análise realizada pelo programa Esprit para o PVA.....	24
Tabela 4: Comparação entre os valores de dimensões de poros.....	25

Lista de Acrónimos

2D	Duas dimensões
3D	Três dimensões
$CH_2CH(OAc)$	Polivinil Acetato
ARN	Ácido ribonucleico
$CHCO_2$	Ácido Fórmico
C_2H_5OAC	Acetato de etilo
$CH_2CH(OH)$	Polivinil Álcool
C_2H_5OH	Etanol
MEV	Microscópio eletrônico de varrimento
nm	Nanómetros
$NH(CH_2)_5CO$	Poliamida-6
PVA	Polivinil Álcool
PCL	Poli(ϵ -caprolactona)
μm	Micrómetros

I. Introdução

1.1 Polímeros

Um polímero é composto por várias unidades estruturais ligadas entre si. Cada uma dessas unidades estruturais é designada de monómero. Dependendo dos grupos funcionais os polímeros podem ter diferentes características como a hidrofiliabilidade, hidrofobicidade, polaridade, etc. Existem diferentes reações de polimerização, entre as mais comuns encontram-se as reações de condensação e as de adição. Na polimerização por adição não ocorre libertação de água. Os polímeros mais comuns como o PVC e o poliestireno são assim criados. No caso da polimerização por condensação ocorre a libertação de uma molécula, como por exemplo a água. Alguns dos polímeros formados por condensação mais conhecidos são a celulose e as poliamidas.

1.1.1 Polivinil Álcool

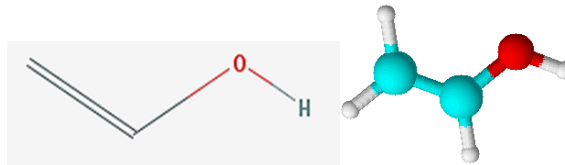
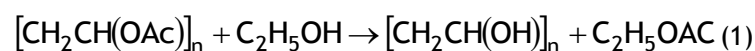


Figura 1: Fórmula química e disposição atômica da molécula de vinil álcool.

O polivinil álcool (PVA) é um polímero sintético, solúvel em água e amigo do ambiente. Forma facilmente filmes e tem elevada resistência ao óleo, gorduras e solventes. Tem sido extensivamente usado na indústria como adesivo, acabamento têxtil e revestimento de papel, entre outros (Yano *et al.*, 2012). Tem elevada resistência à tração, e flexibilidade, no entanto estas propriedades são dependentes da humidade. Tem como ponto de fusão 230°C e a sua densidade varia entre 1.19 e 1.31 g/cm³.

É fabricado através da polimerização do monómero de acetato de vinil já que o monómero álcool vinílico é muito instável (Yano *et al.*, 2012; Chiellini *et al.*, 2003). O acetato de vinil é polimerizado a polivinil acetato e depois convertido em PVA. Como indicado na equação da reação que se segue, equação da reação 1, o polivinil acetato é convertido em PVA através de uma reação de transesterificação com o etanol (Chiellini *et al.*, 2003).



1.2 Nanofibras

As nanofibras podem ser fabricadas usando diferentes métodos. Entre esses métodos encontram-se a eletrofiação ou “electrospinning”, separação por fases, automontagem ou reações com péptidos (Beachley and Wen, 2010). Na tabela 1 encontram-se os vários métodos para a produção de nanofibras poliméricas.

Tabela 1: Vários métodos/técnicas de produção de nanofibras. (Adaptado de Beachley and Wen, 2010).

Técnica	Vantagens	Desvantagens
Electrofiação “electrospinning”	Execução fácil Método barato Bastante versátil Podem ser usados vários polímeros	Solventes tóxicos (nos casos em que são usados) As células tem dificuldade em migrar para o interior da matriz
Automontagem “Self-assembly”	As células são facilmente incorporadas durante a fabricação de fibras Os poros são 3D A montagem pode dar-se in vivo	Procedimento complexo Dificuldade em controlar a forma como as fibras se orientam no meio Diâmetro das fibras
Separação de fases “Phase-separation”	Os poros são 3D	Procedimento complexo Dificuldade de controlar a forma como as fibras se orientam no meio
Produção através de bactérias (celulose bacteriana.)	Baixo Custo Elevado rendimento	Materiais Limitados Falta de versatilidade para funcionalizar
Molde “Templating”	Vasta escolha de materiais Controlo sobre o diâmetro e o comprimento	Materiais de sacrifício Limitações nas dimensões das fibras e arranjos
Desenho “Drawing”	Vasta seleção de materiais Procedimento simples	Baixa produtividade (uma fibra de cada vez) Dificuldade em formar fibras de diâmetro consistente
Extração	Materiais naturais	Escolha de materiais limitadas Dificuldade em controlar o diâmetro e comprimento das fibras

Polimerização vapor-fase	Polímeros sintetizados diretamente em nano fibras	Escolha de materiais limitadas Dificuldade em controlar o diâmetro e comprimento das fibras Procedimentos complicados
Síntese de soluções controlada cineticamente	Polímeros sintetizados diretamente em nano fibras	Escolha de materiais limitadas Dificuldade em controlar o diâmetro e comprimento das fibras Procedimentos complicados
Polimerização química da Anilina	Polímeros sintetizados diretamente em nano fibras	Escolha de materiais limitadas Dificuldade em controlar o diâmetro e comprimento das fibras Procedimentos complicados

1.3 “Electrospinning”

A técnica de “electrospinning” é a forma mais popular de produzir nanofibras devido a sua simplicidade, custo benefício, flexibilidade, potencial de ampliação e uso de uma elevada gama de polímeros (Zamani *et al.*, 2013). Na figura 3 pode ver-se que inclui um jato eletricamente carregado de uma solução de um polímero (Zheng *et al.*, 2014), uma seringa para ejetar a solução a uma taxa contínua, uma agulha, uma fonte de alimentação e um coletor (Liu *et al.*, 2012). Quando a alta voltagem proveniente da fonte de alimentação é aplicada à agulha e se atinge a voltagem crítica formam-se repulsões electrostáticas segundo a lei de Coulomb e um cone de Taylor é formado permitindo assim a formação de um fio de polímero (Liu *et al.*, 2012, Lim and Pyo 2010, Franco *et al.*, 2010). Este fio é posteriormente recolhido num coletor dando origem a uma membrana interconectada, com elevada porosidade, elevada razão superfície/volume, possibilidade de funcionalização e morfologia de superfície ajustável. (Franco *et al.*, 2009).

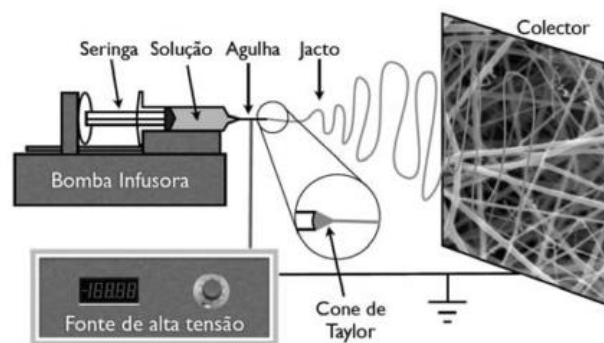


Figura 4: Esquemas de montagem de um sistema de “electrospinning”. (Adaptado de Franco *et al.*, 2009)

A criação de uma rede de fibras é influenciada por vários fatores ou parâmetros de entrada, tais como as propriedades da solução: viscosidade, condutividade e tensão de superfície (Guo *et al.*, 2013; Franco *et al.*, 2009). Além destas há variáveis controláveis, como a pressão hidrostática no capilar, o potencial elétrico da ponta do capilar, e a distância entre a ponta do capilar e o coletor (Guo *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2014). Os parâmetros ambientais incluem a temperatura, humidade e a velocidade do ar na câmara de “electrospinning” (Guo *et al.*, 2013). Na figura 5 está representada a forma como alguns fatores afeta a forma das estruturas.

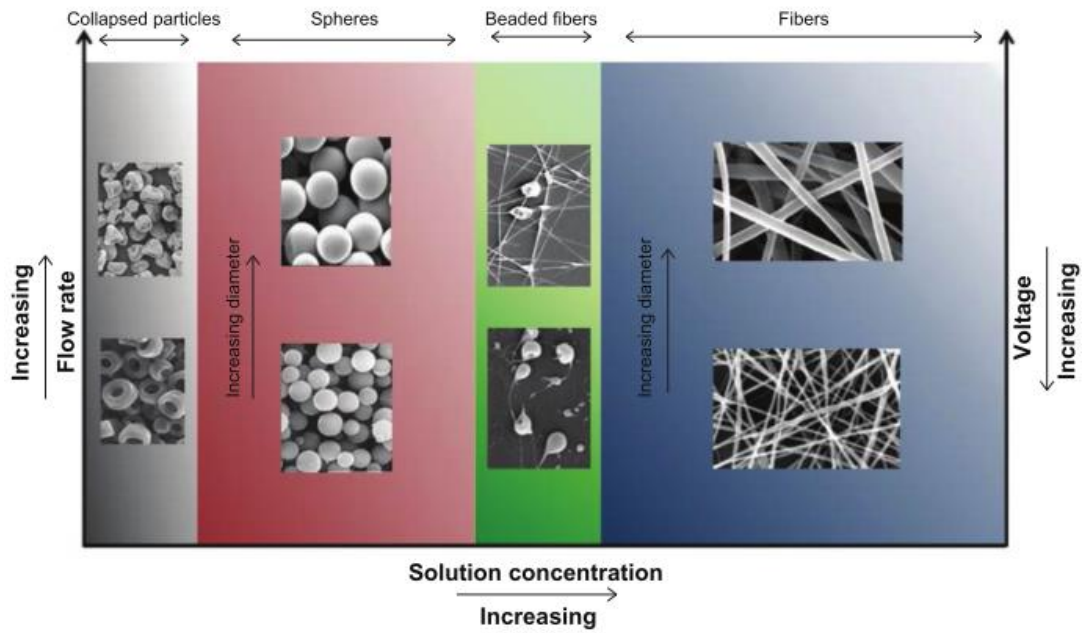


Figura 5: Efeito da concentração, caudal e voltagem em estruturas de “electrospinning”/electrospray.
(adaptado de Zamani *et al.*, 2013)

São usados vários polímeros, desde os naturais como o colagénio ou o quitosano, a polímeros artificiais como o polivinil álcool e o poliácido lácteo, para fabricar matrizes com diferentes propriedades específicas para varias áreas, como a regeneração de tecidos ou sistemas de entrega de medicamentos (Liu *et al.*, 2012). Estas matrizes podem ter aplicação tópica como no caso da regeneração de feridas, ou serem colocadas como implantes para libertação controlada, ou ainda funcionar como sistemas de entrega de medicamentos em terapias anti cancro ou genéticas (Zamani *et al.*, 2013) (Putti *et al.* 2015).

1.4 Suportes de crescimento

A engenharia de tecidos pode ser definida como uma atividade cujo objetivo é suplementar ou reparar uma lesão num tecido ou órgão que esteja comprometido ou em falta (Ayres et al. 2010; Tsang et al. 2010). A elevada área de superfície e a sua porosidade permitem potenciar a adesão celular (Vasita and Katti 2006) . A criação de matrizes 3D com todos os fatores morfológicos e fisiológicos permitem um crescimento e um desenvolvimento mais rápido, com o meio mais adequado a cada tecido (Dong et al. 2009; Rexeisen et al. 2010). A interação das células com o micro ambiente da matriz extracelular promove a sua diferenciação (Dvir et al. 2011) .

A produção de matrizes de nanofibras tem várias aplicações desde a produção de matrizes cujo objetivo é produzir novo osso ou cartilagem a matrizes para a criação de tecidos como vasos sanguíneos ou reparação de órgãos (Moroni et al. 2008). No caso de se querer induzir a regeneração de um osso as matrizes devem ter em conta as propriedades dos ossos como a resistência mecânica, o tamanho dos poros ou a arquitetura 3D (Hollister 2005; Cheng et al. 2006; Casper et al. 2007). A cartilagem articular tem pouca capacidade de regeneração devido a falta de vascularização e de células capazes de produzir nova cartilagem, neste caso um dos métodos usados é o uso de produzir matrizes que já tenham as células necessárias para produzir nova cartilagem (Barnes et al. 2007; Kunzmann et al. 2011). No caso dos tecidos conjuntivos responsáveis pelo movimento articular e estabilidade, o uso de matrizes cujas nano fibras se encontram alinhadas promovem a regeneração destes tecidos (Ayres et al. 2010). No caso dos músculos esqueléticos quando sofrem uma lesão em adultos a sua regeneração é lenta e por vezes não é completa (Ayres et al. 2010; Dvir et al. 2011; Vasita and Katti 2006).

A matriz extracelular é uma elaborada rede de proteínas, glicídios e lípidos com as mais variadas funções, desde oferecer suporte as células que formam os tecidos a influenciar o fenótipo das células que compõem os tecidos (Zeng et al. 2005; Wittmer et al. 2014). Um dos desafios da produção de matrizes é a necessidade de mimetizar estes complexos meios intercelulares (Kunzmann et al. 2011). Atualmente os métodos mais usados para a produção de matrizes de nanofibras são: “self-assembly”, “phase-separation” e “electrospinning” (Ayres et al. 2010; Beachley and Wen 2010).

Os polímeros usados para produzir matrizes devem possuir algumas características como serem semelhantes a nível estrutural, promoverem a adesão celular, serem biocompatíveis e serem eliminados de forma não tóxica (Beachley and Wen 2010).

Entre os polímeros usados encontram-se:

- ✓ Acido polilacteo
- ✓ Acido poliglicolico
- ✓ Polydioxanone
- ✓ Polycaprolactona
- ✓ Quitosano
- ✓ Polivinil álcool
- ✓ Elastina
- ✓ Colagénio

1.5 Sistemas de entrega de moléculas

Nos últimos anos o desenvolvimento de sistemas de entrega de moléculas tem sofrido um grande avanço. Prova disso são os diferentes tipos de transportadores que vêm sendo desenvolvidos (Hu et al. 2014; Gadde et al. 2014; Croisier et al. 2014). O desenvolvimento destes transportadores tem como objetivo fornecer um maior direcionamento dos fármacos e prolongamento dos seus tempos de ação (Kreuter 2014; Jorfi and Foster 2015; Chik et al. 2014). Ao usar estes tipos de transportadores à nanoescala, normalmente com tamanhos entre os 10-100 nm, estamos a aumentar a biodisponibilidade dos fármacos, ou seja, estamos a prolongar o seu efeito terapêutico e também estamos a reduzir a qualquer tipo de efeitos adversos que os fármacos tenham noutras células (Kwon et al. 2012; Kreuter 2014). Os nanotransportadores também podem servir para entregar outro tipo de moléculas, tais como ARN's, e até mesmo enzimas, funcionando assim como pequenos bioreatores (Kwon et al. 2012; Moritz and Geszke-Moritz 2015; Hu et al. 2014; Zamani et al. 2013).

Existem diversos tipos de sistema de entrega de moléculas, como as micelas ou os lipossomas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas de sílica ou estruturas de nanocelulose (Jorfi and Foster 2015; Hu et al. 2014; Hamori et al. 2014; Parambadath et al. 2011; Richardson et al. 2015).

1.6 Microscopia Eletrônica de Varrimento

A microscopia eletrônica de varrimento (MEV) é uma ferramenta complexa capaz de fornecer imagens com elevada resolução, análises elementares e análises de cristalografia (Durán *et al.*, 2006). Tem uma resolução na ordem dos 10 nm. Nas análises de microfibras permite observar o arranjo estrutural, a distribuição espacial, a densidade das fibras e a sua geometria (Suzuki *et al.* 2007; Wang & Zhao 2012).

O SEM é composto por 3 partes:

- a) Coluna ótica de eletrões;
- b) Sistema de vácuo;
- c) Detetor de sinais e display.

A coluna ótica de eletrões é constituída pela fonte de eletrões, lentes magnéticas que enfraquecem o raio, bobinas magnéticas para controlar e modificar o feixe de eletrões e aberturas para definir o raio e prevenir a dispersão dos eletrões. O sistema de vácuo consiste numa câmara para manter o vácuo, numa bomba e válvulas. O sistema de deteção e “display” inclui os vários detetores de sinais, e a parte eletrónica que cria a imagem do sinal.

As amostras para serem analisadas pelo microscópio eletrónico de varrimento têm que sofrer um pré-tratamento. Às amostras deve ser removida toda a água, e também serem revestidas a ouro, para que os eletrões atravessem a amostra sem interferências, de forma a serem conduzidos através dela. Outro fator importante é a espessura da amostra, pois quanto mais fina for amostra melhor será a qualidade da imagem (Durán *et al.*, 2006).

Para se obter uma imagem no MEV os eletrões têm que ser produzidos numa fonte no topo do microscópio. Estes eletrões são acelerados através de uma coluna de alta voltagem, 10000 a 50000 Volt, mantida em vácuo. As imagens são obtidas em duas dimensões (Durán *et al.*, 2006). A taxa de varrimento pode variar entre 1/60 e 20 segundos, sendo este tempo determinado pelo operador. Existem vários tipos de detetores que permitem que quantificar os vários sinais emitidos pelas amostras (Rand 2004). Quanto mais forte for o sinal mais claras são as imagens obtidas no monitor.



Figura 6: Tipos de radiação e elétrons formados em MEV. Adaptado de (<http://micelectro.fc.ul.pt/page2/page2.html> disponível em:03/05/15)

Existem diferentes tipos de elétrons e radiações formadas quando o feixe de elétrons incidente atinge a amostra. Os elétrons secundários são elétrons que escapam da amostra quando os elétrons primários a atingem (Durán et al. 2006) . Os elétrons secundários são pouco energéticos e para serem considerados têm que ter menos de 50 eV de energia. Apenas podem ser detetados se forem criados junto a superfície da amostra daí a importância de a amostra ser plana. A maior densidade de elétrons secundários é criado pelo feixe primário antes que ele tenha a possibilidade de se espalhar e por isso a resolução espacial é muito alta (Rand 2004).

Se os elétrons primários interagem com o núcleo de um átomo, esse elétron pode espalhar-se para qualquer direção com pouca perda de energia. Os elétrons retrodifundidos “backscattered” são mais energéticos que os secundários (têm mais de 50 eV) e quanto mais positiva for a carga do núcleo de um átomo maior será a probabilidade de formar um elétron deste tipo (Rand 2004).

Quando o elétron produzido pelo feixe colide com um átomo da amostra um elétron desse átomo é expulso. Este vazio vai ser preenchido por um elétron de uma camada energética mais elevada do átomo. Quando o elétron desce para o nível mais baixo de energia ele vai perder energia e essa energia aparece sob a forma de radiação eletromagnética (raio X). Cada elemento da amostra vai apresentar uma emissão de energia única. Os raios X atravessam maiores distancias que os elétrons secundários e os elétrons backscattered o que dá as imagens obtidas por este método uma menor resolução espacial (Rand 2004).

Nas figuras 7 encontram-se exemplos de imagens de estruturas de fibras de PVA e Poliamida-6 obtidas por “electrospinning” e caracterizadas no MEV. Nestas estruturas

mediram-se os diâmetros das fibras e o tamanho dos poros. Pode ver-se que os segmentos de fibra das fibras obtidas por “electrospinning” têm distribuição espacial aleatória.

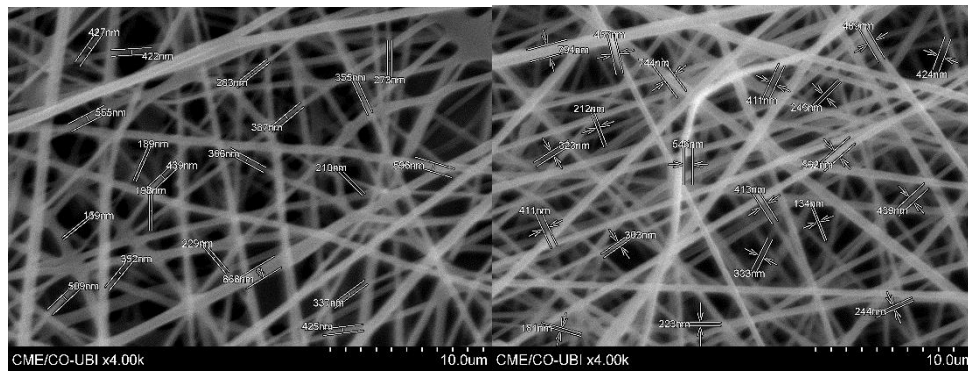


Figura 7: Imagens obtidas por SEM de fibras de Polivinil álcool e Poliamida-6 aumentadas 4000x.

1.7 Modelação de Redes de Materiais em 3D

Por vezes não é possível realizar um grande número de experiências, pelo que o uso de modelos estatísticos com elevada fiabilidade para se prever de forma correta o resultado de uma experiência pode ser determinante. Foi certamente com isto em mente que em 1962 Corte e Kallmes começaram a modelação de materiais fibrosos propondo um modelo estatístico que consistia em várias camadas 2D de fibras rígidas (Kallmes & Corte 1960). Outros modelos 2D foram propostos, por exemplo por Wang and Shaler (1998). Na universidade de Manchester os professores W. W. Sampson e C. T. J. Dobson dedicaram muito do seu trabalho à modelação de materiais 2D (Eichhorn and Sampson 2010; . Podemos ainda incluir outros trabalhos de outros autores que trabalharam num pseudo 3D, ou seja, usaram várias fatias 2D para criar um 3D. Estes modelos apenas consideram a posição da fibra no plano e não no espaço .

O recurso ao 3D é o mais recente avanço nesta área, por isso em 1994 Niskanen e Alava propuseram um modelo a 3D, o KCL-Pakka. Neste modelo as fibras são depositadas aleatoriamente, e para além da área da fibra no plano xy, a flexibilidade de cada fibra também é considerada. Sendo assim, cada fibra também ocupa a dimensão z, permitindo assim obter estruturas 3D. Este modelo foi melhorado ao longo dos anos sendo umas das mais importantes atualizações a trazida por Provatás e Useaka em 2003, em que apresentaram uma regra de deposição para as fibras (Provatás and Uesaka 2003).

Em 2011 Curto e colaboradores apresentaram um modelo 3D baseado no KCL-Pakka. Na figura 8 está representado uma imagem do modelo em cima e em baixo uma imagem do modelo do Niskanen 1994 (Niskanen and Alava 1994; Curto et al. 2011). Este novo modelo baseia-se num autómato celular no qual existe uma divisão cartesiana das células para que cada fibra seja representada como uma sequência de células, ou voxéis. Cada voxel ocupa um volume pré estabelecido definido pelo utilizador. É neste parâmetro que se define o comprimento, largura e a espessura que vai originar a rede de fibras. Este modelo permite que se modifiquem vários parâmetros, como o comprimento, diâmetro da fibra, diâmetro da parede, diâmetro do lúmen, flexibilidade e resolução (número de fibras por camada). As fibras são depositadas uma a uma, e cada fibra ocupa o seu espaço. Caso alguma fibra não seja aceite o processo de deposição repete-se.

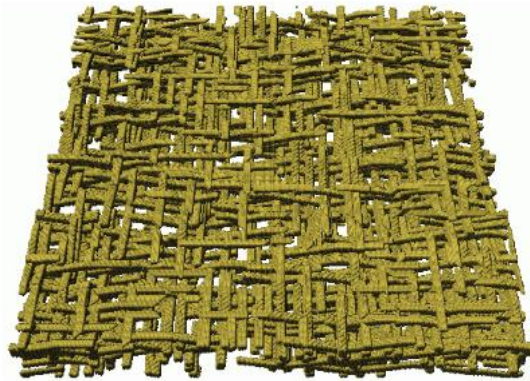
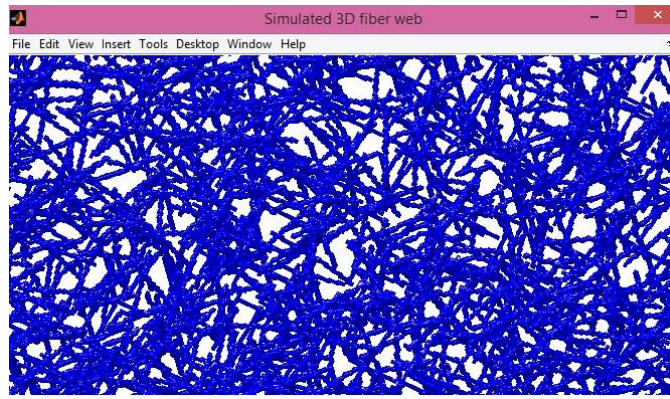


Figura 8: Imagem 3D gerada pelo simulador(Curto *et al.*, 2011) e imagem do modelo de Niskanen.(Niskanen and Alava 1994)

1.7.1 Simulação computacional

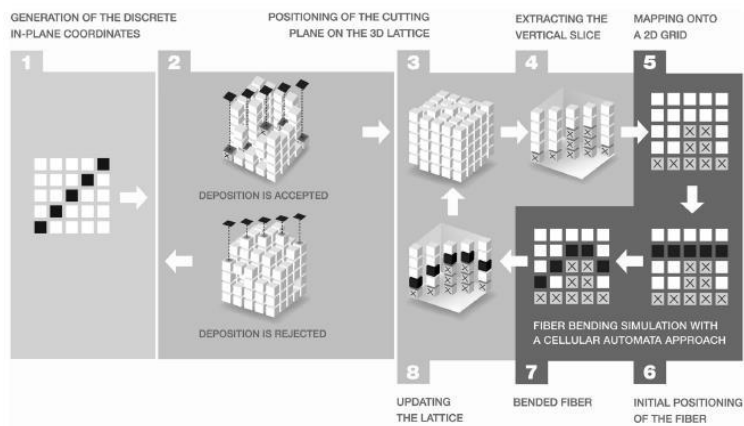


Figura 9: Deposição das fibras (Adaptado de Curto *et al.*, 2009)

O simulador foi criado com recurso à programação em Matlab® e o procedimento da formação das simulações que está na figura 9 pode ser descrito como:

- Criação de uma fibra no plano XY;
- Teste da regra da deposição: se a fibra não for aceite uma nova deposição é testada;
- Extração do plano para a rede 3D onde a Flexibilização ocorre;
- Deposição de uma fibra de acordo com a sua flexibilidade e conformação na superfície de deposição;
- Atualização da rede 3D.

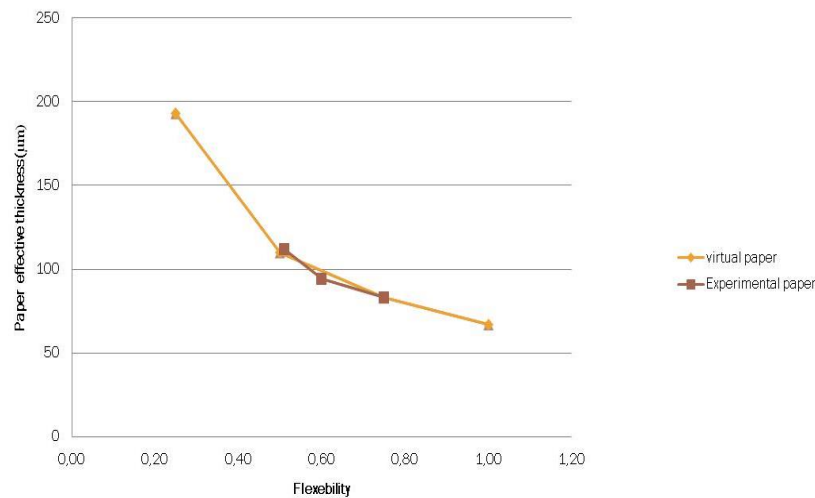


Figura 10: Gráfico de validação do simulador computacional em que se pode ver que as estruturas reais feitas com fibras de celulose (“experimental paper”) e as estruturas computacionais (“virtual paper”) tem a mesma espessura (Curto *et al.*, 2011).

O simulador foi validado inicialmente para papel e fibras celulósicas (Curto *et al.*, 2011) . Na figura 10 está um gráfico que mostra essa validação (Curto *et al.*, 2011).

1.7.2 Área de superfície e tamanho dos poros

O tamanho das fibras é muito importante, quanto mais pequenas elas forem maiores serão os poros, permitindo assim controlar as geometrias das redes produzidas (Sampson and Urquhart 2008; Niskanen and Rajatora 2002). Numa situação em que se utilizem matrizes de fibras de “electrospinning” esta questão é relevante pois as células precisam que as fibras tenham um tamanho mínimo para se poderem aderir (Sampson 2001; Sampson 2009). Por seu

lado os poros também não podem ser pequenos de mais, pois se tal acontece os nutrientes não se difundem ou o próprio crescimento celular não se dá (Eichhorn and Sampson 2005; Eichhorn and Sampson 2010).

1.7.3 Contacto inter-fibras e flexibilidade

Quando pensamos em fibras pensamos em fibras com tamanhos finitos, como o caso das fibras do papel ou das fibras têxteis, as quais seguem distribuições de Poisson, na sua distribuição no plano. No caso das fibras geradas por “electrospinning” produz-se um fio ou filamento que se designa por infinito. Neste caso passamos a ter segmentos de fibra, com direções aleatórias, que fazem parte de um fio maior.

Para as fibras serem aceites tem que ser definida uma regra de deposição (Provatas and Uesaka 2003). Esta regra diz-nos que uma fibra só é aceite se ela for depositada numa secção cuja altura é inferior à média

$$\xi \leq \alpha \bar{S} \quad (2)$$

Note-se que ξ é a espessura do papel no local de deposição da fibra, α é uma constante que varia entre $[0,1]$ e \bar{S} é a espessura de todo o papel. Caso não ocorra dentro dos valores de α a deposição passa a ser uma probabilidade p chamada probabilidade de aceitação. No caso de $p=1$ aparecem redes produzidas totalmente aleatórias quando $p=0$ as redes de fibras são mais uniformes o que pode levar a um aumento nos tempos de simulação

II. Materiais e Métodos

2.1 Materiais

A Poliamida-6 ($\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{CO}$)_n foi comprada à Acros Organics (Belgium) e como solvente usado ácido fórmico (CH_2O_2) a 90% da Fisher Scientific (United States). O Polivinil Álcool ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$)_n foi comprado à Sigma-Aldrich (United States).

2.2 Métodos

2.2.1 “Electrospinning”

Para este trabalho foram usados dois sistemas de “electrospinning” diferentes. Um situa-se em Moulhouse em França onde foram produzidas as matrizes poliméricas de Poliamida-6 e outro na Universidade da Beira Interior em Portugal onde foram produzidas as fibras de PVA. As fibras de Poliamida-6 foram produzidas a partir de uma solução base de 25 wt.% e foram coletadas a 20 cm num coletor de alumínio (25cmx25cm). Foi aplicada uma voltagem de 30kV numa agulha de ponta romba (0.7mmx40mm) de forma a produzir uma taxa de saída de 0.212 ml/h. Este “electrospinning” é montado verticalmente e a deposição é feita de cima para baixo. No sistema de “electrospinning” da UBI a deposição é feita horizontalmente. O caudal produzido neste caso é de 60 ml/h.

2.2.2 Microscopia eletrónica de varrimento

Para poder analisar a morfologia das matrizes poliméricas produzidas recorreu-se à microscopia eletrónica de varrimento (SEM). As amostras foram cortadas e colocadas num suporte de alumínio com o recurso a fita adesiva. De seguida foram cobertas de ouro usando um Sputter Quorum Q 15 OR ES (Quorum Technologies, United Kingdom) e analisadas num microscópio Hitachi S3400N-II (Tokyo, Japan).

2.2.3 Espectroscopia de raio-X por dispersão de energia

A análise elemental utilizada na caracterização química das amostras foi feita usando espectroscopia de raio-X por dispersão de energia. Esta técnica está acoplada ao microscópio eletrônico de varrimento e de forma resumida pode dizer-se que utiliza um feixe de elétrons acelerado para excitar os elétrons da camada de valência dos átomos da amostra. Como cada elemento químico tem os elétrons em diferentes níveis energéticos, estes são expulsos e substituídos por outros, quando são irradiados pelo feixe. As diferenças energéticas entre o elétron original e o elétron que o vai substituir são quantificadas pelo detetor do espectrômetro permitindo assim identificar os elementos da amostra. O feixe acelerado utilizado possui uma voltagem de 20 keV.

2.2.4 Simulação computacional

A simulação computacional foi feita usando um programa desenvolvido em Matlab® (Mathworks, United States) criado para analisar e criar matrizes fibrosas de celulose sendo posteriormente desenvolvido para nanomateriais (Curto et al 2011). As simulações foram feitas na versão R2014a do Matlab®.

2.2.5 Árvores de Decisão/regressão

As árvores de decisão/regressão foram feitas usando o Matlab®. Para se construir a árvore utiliza-se o comando: `tree = fitrtree` usando as definições padrão. O número de experiências a realizar foi 1000. Os parâmetros foram definidos usando as definições usadas por Curto *et al.*, 2011.

2.2.6 Análise estatística

Foi feita uma análise estatística usando o Excel®. Nesta análise foram feitas médias e calculados os desvios padrão e os erros associados para um intervalo de confiança de 95%.

III. Discussão de Resultados

3.1 Caracterização no microscópio eletrónico de varrimento

Recorreu-se ao MEV para observar e medir as matrizes previamente preparados por “electrospinning” de poliamida-6 e polivinil álcool.

Quando comparamos as duas diferentes matrizes dos materiais poliméricos (figura 11) observamos algumas diferenças como os diferentes diâmetros e largura de poros observados entre as duas estruturas ou matrizes. Os valores médios obtidos para o polivinil álcool foram para o diâmetro das fibras $(352 \pm 20,2)$ nm. No caso da poliamida-6 os valores médios foram $(381 \pm 16,9)$ nm. Para se obterem estes valores foram medidos cerca de 60 fibras medindo no microscópio cada uma das fibras. Na tabela 2 estão os valores da média, erro relativo, erro absoluto, desvio padrão e nº de poros, medidos através do método manual.

Tabela 2: Média do diâmetro dos poros em μm , erros, desvio padrão e nº de poros medidos através do método manual.

	<i>PVA</i>	<i>Poliamida-6</i>
Média do diâmetro dos poros em μm	1,30 μm	1,23 μm
Erro Absoluto	0,059	0,052
Erro Relativo %	4,54%	4,23%
Desvio Padrão	0,518	0,453
Nº poros	76	75

Um dos objetivo da análise das estruturas por MEV foi obter estes valores médios para posteriormente se poderem realizar as simulações computacionais onde as estruturas são criadas virtualmente. Esta análise permite criar uma estrutura 3D daí que também tenham sido obtidos dados da componente espacial da matriz polimérica.

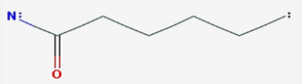

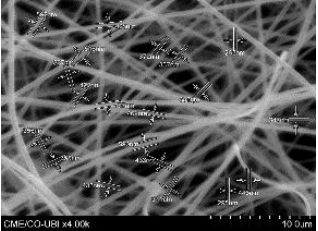
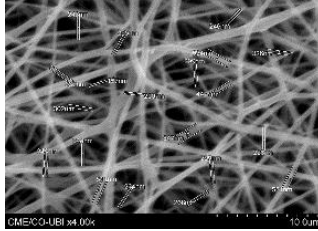
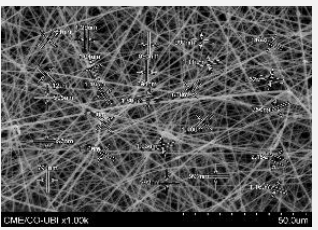
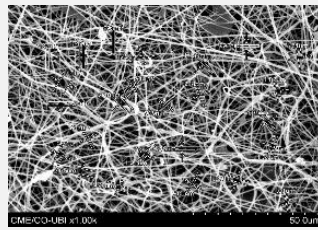
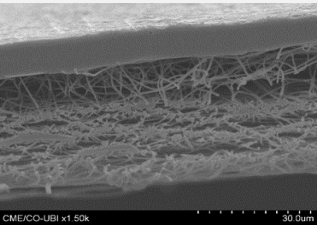
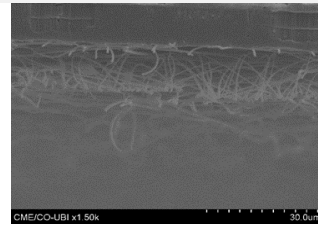
MATERIAL	POLIAMIDA-6	POLYVINYL ALCOHOL
Formula Química		
Tamanho das fibras ao longo do eixo-XY		
Tamanho dos poros ao longo do eixo-XY		
Espessura no eixo-Z		

Figura 11: Matriz de imagens MEV das fibras de Polyamida-6 e Polivinil álcool criadas por “electrospinning”.

Após analisar as imagens de MEV foi realizada uma análise (figura 12) através do programa de análise de imagens Esprit 1.9 (Bruker, Germany). Este programa transforma todos ou quase todos os poros em partículas e assim permite a medição de cada uma destas partículas de forma automática. Existem vários diâmetros de poros que podem ser obtidos através deste programa entre eles destacam-se o comprimento (a maior distancia em micrómetros), largura (a distancia mais estreita em micrómetros), diâmetro médio em micrómetros, o diâmetro equivalente de área (o diâmetro equivalente supõe que a partícula é circular), a projeção ao longo do eixo do X e a projeção ao longo do eixo do Y.

A tabela 3 apresenta os resultados obtidos para os diferentes diâmetros fornecidos pelo programa Esprit.

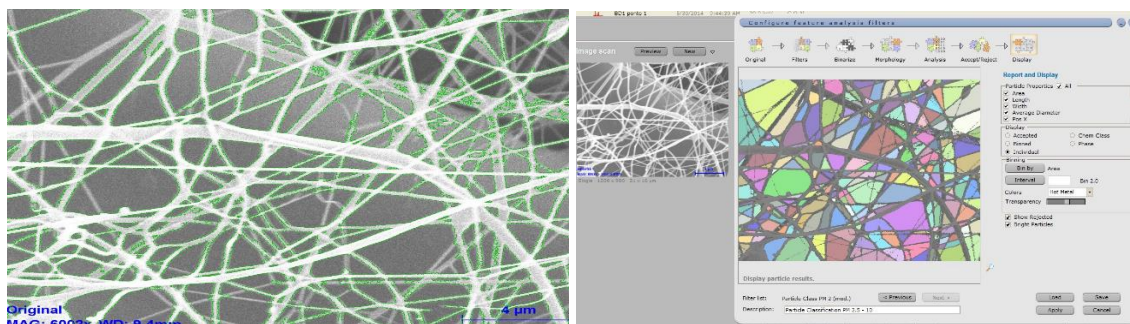


Figura 12: Imagem de uma rede polimérica de polivinil álcool a partir da qual se analisou usando o programa de análise de imagem Esprit 1.9.

Tabela 3: Valores obtidos através da análise realizada pelo programa Esprit para o PVA.

	Comprimento (μm)	Largura (μm)	Diâmetro médio (μm)	Projeção no X (μm)	Projeção no Y (μm)	Diâmetro equivalente (μm)
Média do diâmetro do poro	0,92	0,50	0,74	1,56	1,48	0,59
Erro Absoluto	0,041	0,021	0,031	0,096	0,088	0,026
Erro Relativo %	4,40%	4,24%	4,22%	6,12%	5,93%	4,32%
Desvio Padrão	0,585	0,306	0,452	1,386	1,270	0,368
Nº de poros	425	425	425	425	425	425

Quando comparamos os resultados obtidos (Tabela 3) através da medição manual $1,30 \pm 0,059 \mu\text{m}$ e da medição realizada através do programa verificamos que os mais semelhantes são a projeção no X $1,56 \pm 0,096 \mu\text{m}$ e a projeção no Y $1,48 \pm 0,088 \mu\text{m}$. Na tabela 4 está um resumo das medições em comparação. Quando comparamos os desvios padrão também observamos diferenças significativas entre todos no entanto aqueles que mais se aproximam da medição manual $0,518$, é o comprimento com um desvio padrão de $0,5849$. Relativamente ao número de medições é importante referir que através do programa foram feitas 425 medições e através do método manual foram 76.

Tabela 4: Comparação entre os valores mais semelhantes de poros.

	Medição Manual do diâmetro do poro (μm)	Projeção no X do poro (μm)	Projeção no Y do poro (μm)
Média da dimensão do poro	1,30	1,56	1,48
Erro Absoluto	0,059	0,096	0,088
Erro Relativo %	4,58%	6,12%	5,93%
Desvio Padrão	0,518	1,386	1,270
Nº de poros	76	425	425

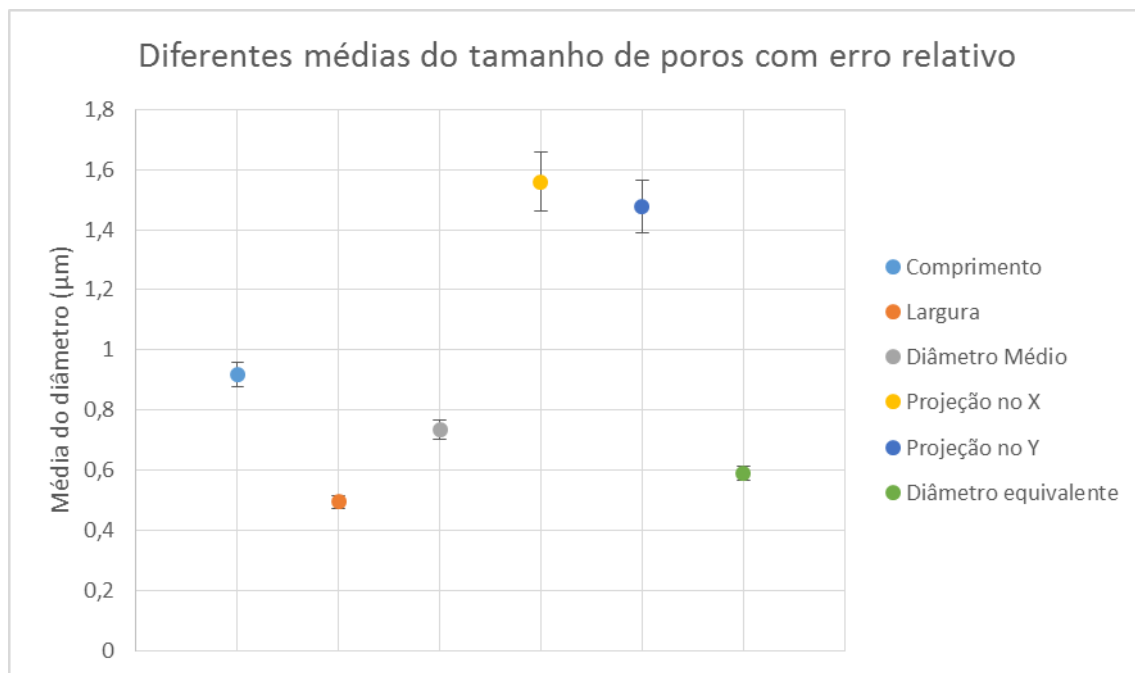


Figura 13: Gráfico de diferentes médias dos diâmetros com o erro respetivo.

Na figura 13 podem observar-se os valores médios e seu respetivo erro relativo. Como era de esperar os valores mais elevados são os que têm um maior erro.

O programa de análise de imagens Esprit também permite obter diferentes gráficos (figura 14) nos quais podemos comparar diversas propriedades e morfologias dos poros. Através destes podemos prever a forma dos poros e agrupar os poros em categorias conforme as suas dimensões.

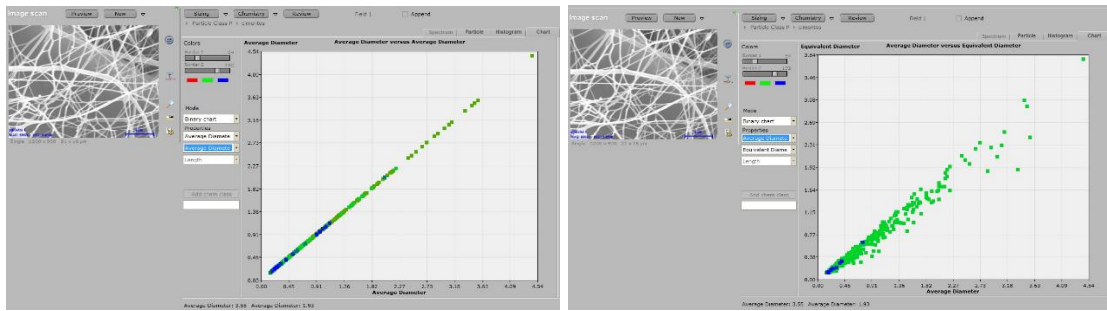


Figura 14: Gráficos do polivinil álcool feitos pelo programa Esprit 1.9. A) Diâmetro médio versus diâmetro médio. B) Diâmetro médio versus diâmetro equivalente.

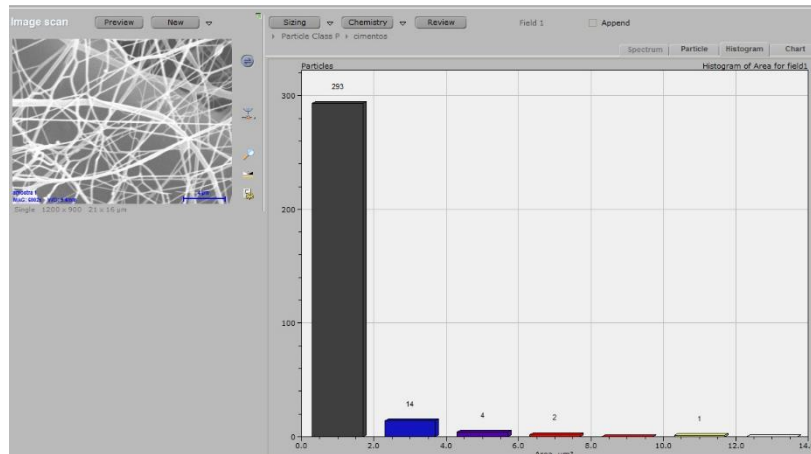


Figura 15: Histograma que relaciona o número de partículas versus Área

Na figura 15 temos um histograma que agrupa os poros por área. Ao fazer esta análise podemos depois comparar com as simulações e com a área dos poros nelas obtidas. Foi também feita uma análise no eixo do Z. Através desta análise podemos ver mais “fundo” e caracterizar o material no espaço, isto é em 3D.

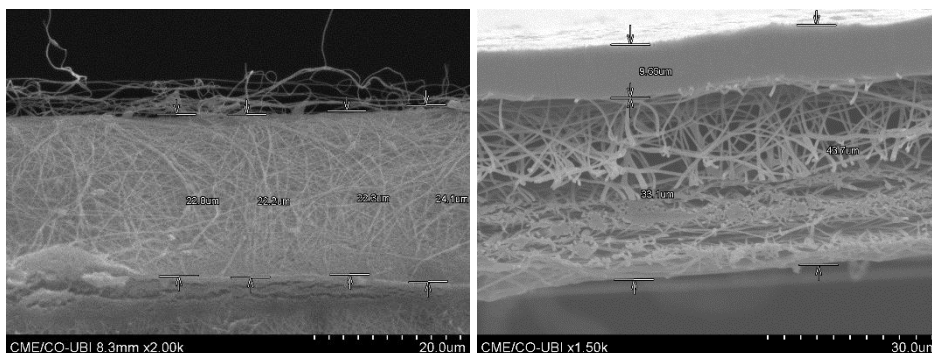


Figura 16: Imagem MEV de Poliamida-6 e polivinil álcool.

Nas Figuras 16 e 17 estão as imagens MEV da espessura das estruturas obtidas por “electrospinning” dos polímeros em estudo. São imagens de um corte no Z no qual se pode ver a espessura da estrutura criada. No caso da poliamida a estrutura tem cerca de 22 a 24 μm e a do polivinil álcool tem cerca de 33 a 43 μm de espessura.

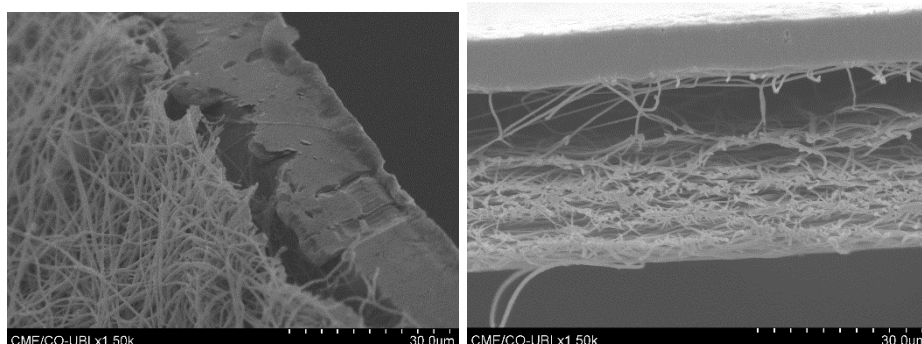


Figura 17: Imagem MEV de Poliamida-6 e polivinil álcool.

Na Figura 17 encontram-se imagens MEV das estruturas obtidas por “electrospinning” dos polímeros em estudo. São imagens de um corte no Z no qual se podem ver diferentes níveis de organização do material. No caso do polivinil álcool é notório que a estrutura sofre de maior compactação nos níveis superiores, sendo também visível em ambas que existe espaço livre junto a folha de alumínio do coletor.

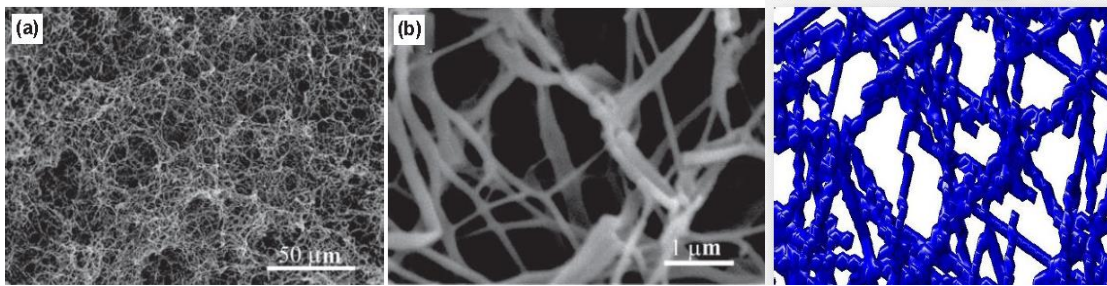


Figura 18: Imagens de uma matriz de ácido poliláctico-I e uma simulação computacional feita com o simulador. (adaptado de Smith *et al.*, 2009)

Na figura 15 encontram-se imagens das estruturas de suporte para crescimento celular obtidas por Smith *et al.*, 2009 e uma simulação computacional da mesma estrutura. Podemos ver a complexidade da rede 3D formada e como o simulador é capaz de simular a estrutura.

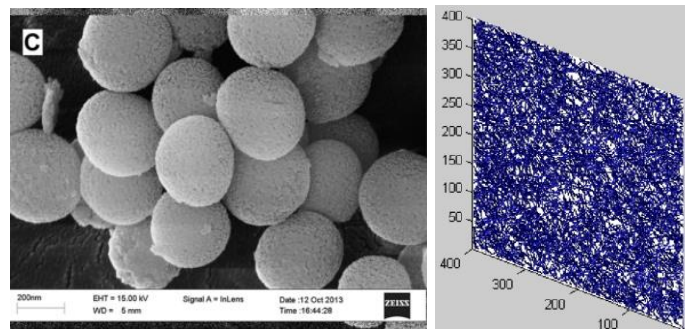


Figura 19: Imagem de uma nanopartícula de alginato e simulação computacional de uma secção do revestimento da partícula. (adaptado de (Hu et al. 2014))

Na figura 19 podem ver-se nanopartículas de alginato. Destas nanopartículas foi selecionada uma secção e feita uma simulação computacional. Estas nanopartículas são feitas de sílica e têm um revestimento polimérico poroso feito de alginato.

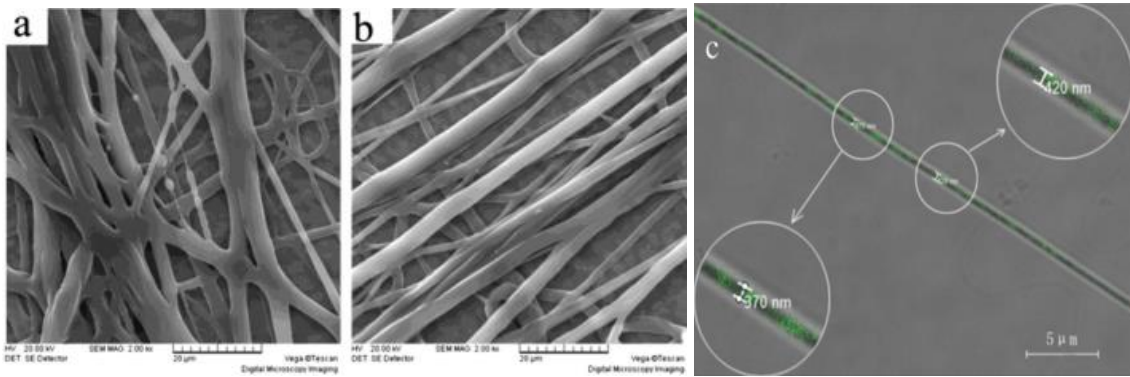


Figura 20: Fibras ocas feitas de PCL e PVA com uma fase aquosa no interior. (Adaptado de Wang *et al.*, 2014)

Na figura 20 estão fibras feitas de poly(ϵ -caprolactone) (PCL) e PVA. Trata-se de fibras ocas que transportam no seu interior um fármaco. Uma vez que o simulador computacional foi desenvolvido tendo a possibilidade de simular fibras que ocas, trata-se de mais um material diferente que também pode ser simulado.

3.2 Análise de Espectroscopia de Raios-X de dispersão de energia

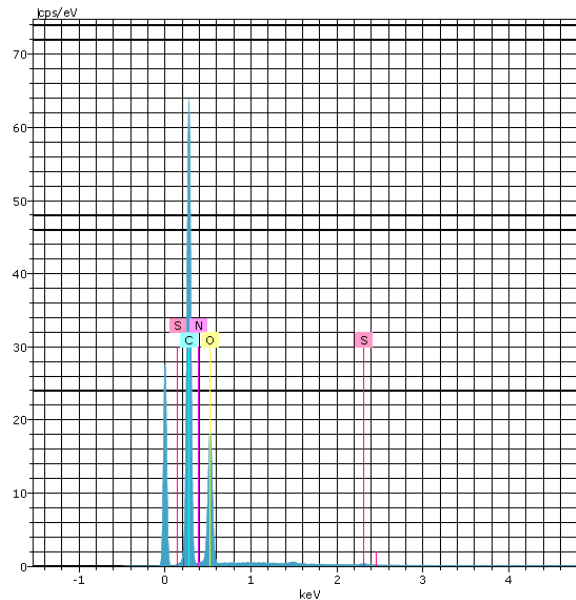


Figura 21: Gráficos da análise de espectroscopia de raio-X de dispersão de energia do polivinil álcool.

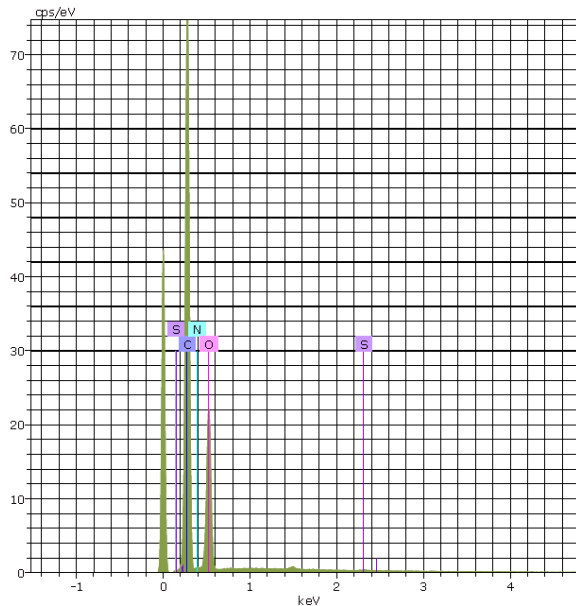


Figura 22: Gráficos da análise de espectroscopia de raio-X de dispersão de energia da poliamida-6

A espectroscopia de raio-X de dispersão de energia foi realizada com o intuito de identificar os elementos químicos presentes nas amostras. Nas figuras 21 e 22 estão os gráficos da análise da composição química elemental das amostras. Esta composição está de acordo com o tipo de polímeros utilizados. Verifica-se que não há contaminação do solvente.

3.3 Simulações computacionais

A simulação computacional foi feita num simulador criado na plataforma Matlab® por Curto *et al.*. Para perceber a porosidade do material simulado como um todo o programa fornece diversas imagens tal como uma imagem radiográfica da densidade dos poros (figura 23) e uma imagem 3D (figura 22). Através destas imagens vemos a distribuição dos poros e das fibras no material.

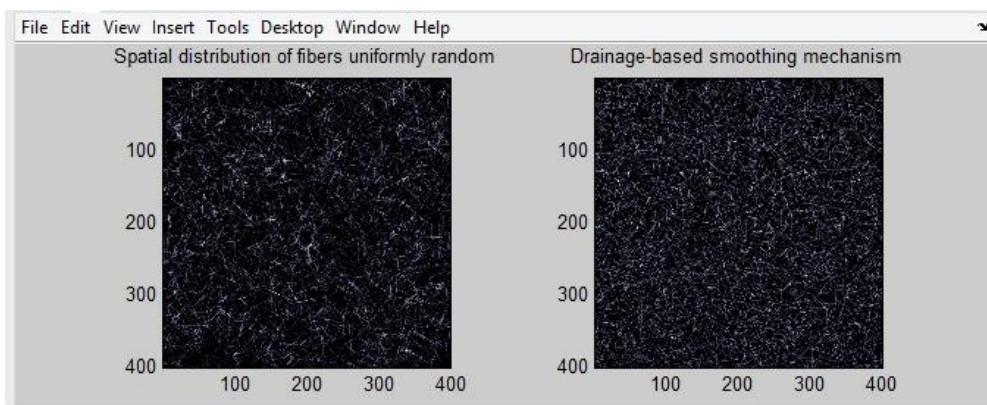


Figura 23: Imagem radiográfica da densidade de poros obtida computacionalmente.

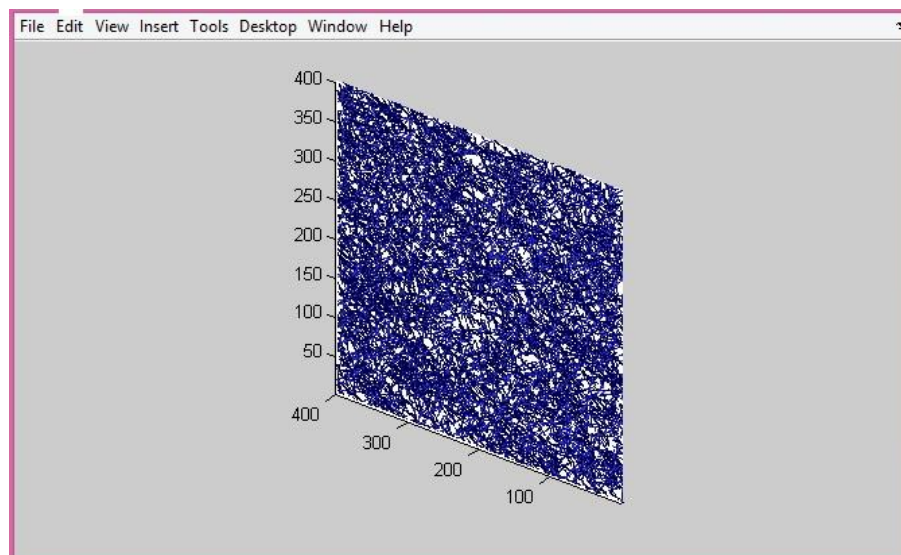


Figura 24: Imagem 3D da rede criada em computador.

A deposição das fibras dá-se de forma sistemática (figura 25) e uma vez depositada a fibra seguinte não vai ocupar o espaço que já foi previamente ocupado pela primeira fibra. Outras condições como o tamanho e a flexibilidade das fibras também têm que ser cumpridas. As fibras depositadas ao não ocuparem o mesmo espaço que outras (figura 26) vão formar uma rede 3D. Na figura 27 podemos identificar diferentes fibras espacialmente diferentes já depositadas.

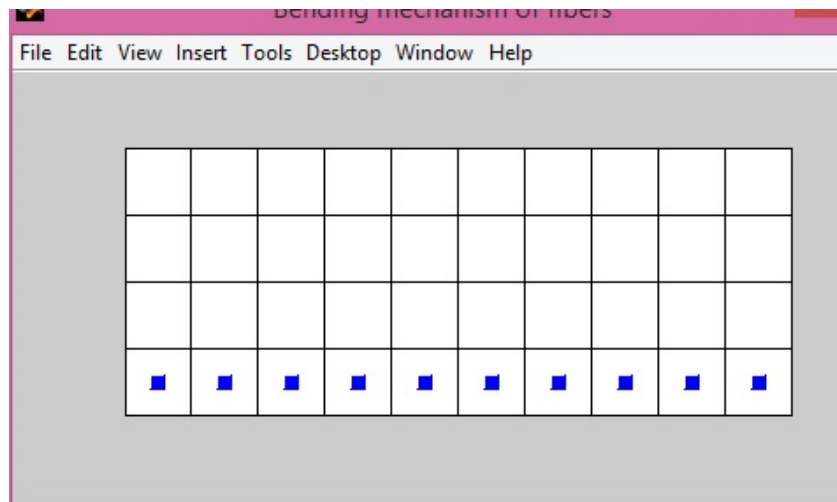


Figura 25: Deposição de uma primeira fibra.

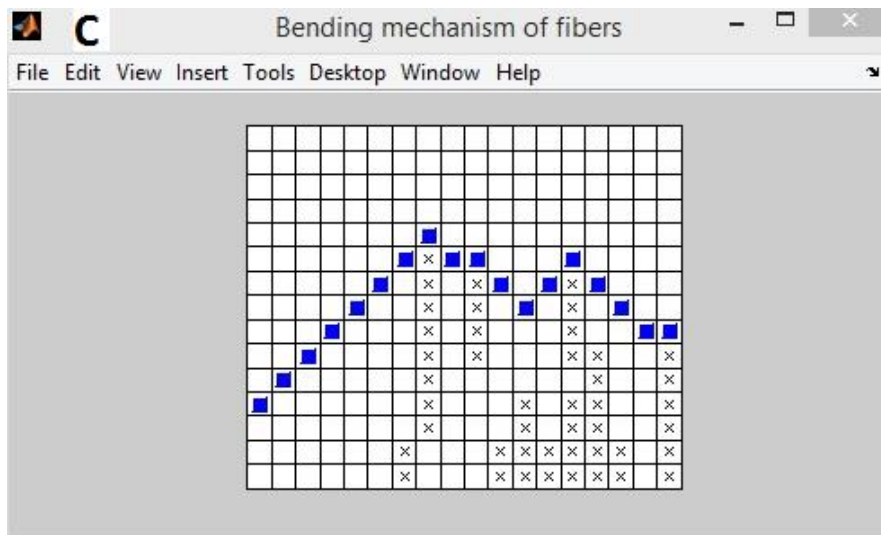


Figura 26: Deposição de uma fibra. Através desta imagem podemos ver que uma fibra não se deposita sobre outras. O espaço ocupado por outras fibras não vai ser sobreposto.

No entanto uma questão se coloca se estamos a depositar fibra a fibra como podemos comparar com o “electrospinning” em que se forma de um fio “infinito” na deposição. Nesse caso estamos a considerar os diferentes segmentos que formam esse fio. Quando analisamos uma imagem no microscópio estamos a seleccionar uma região, e fazer uma análise 2D.

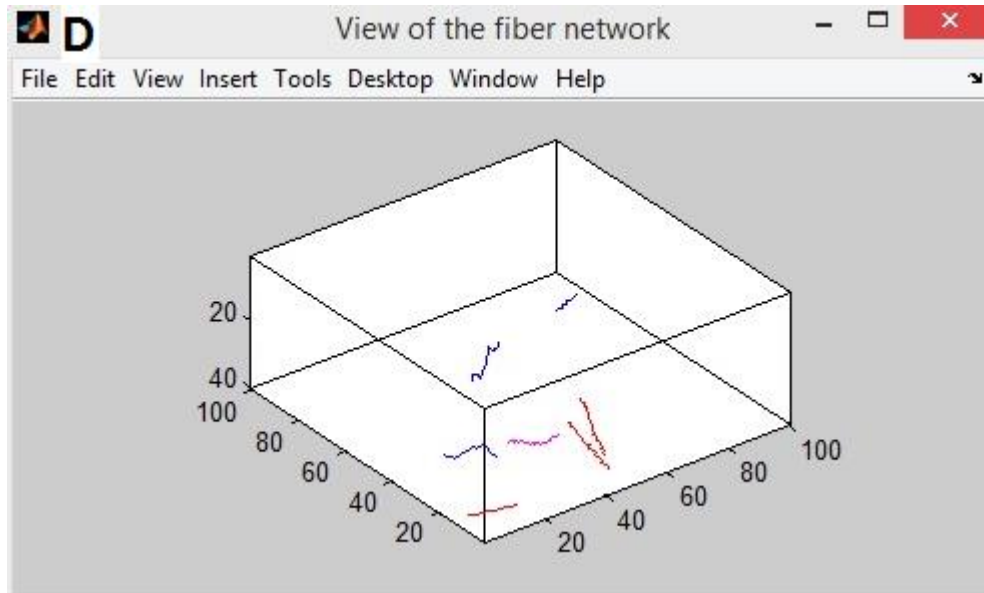


Figura 27: Localização espacial de várias fibras na rede criada.

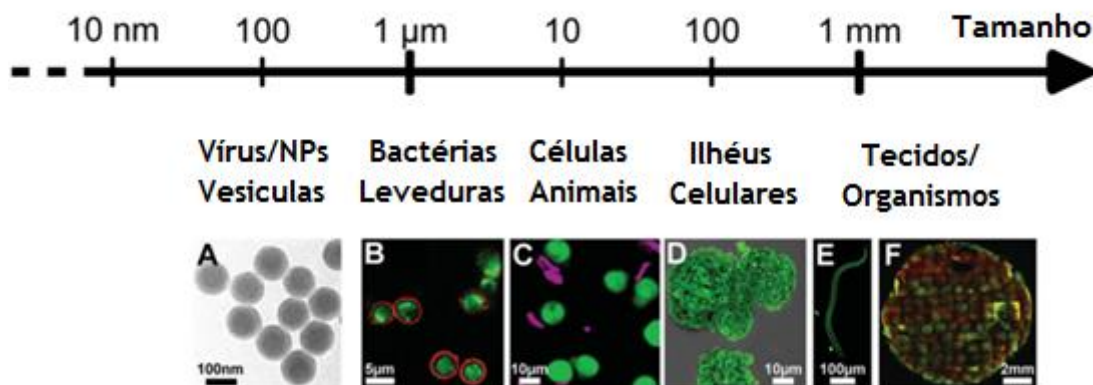


Figura 28: Estruturas de diferentes tamanhos. Adaptado de (Monge et al. 2015)

Com os materiais por nos produzidos conseguimos obter estruturas poliméricas com diversos diâmetros de fibra. As fibras nos nossos materiais variam entre os 0,15 e os 0,8 micrómetros. Como podemos ver comparando com a imagem 28 obtemos estruturas mais

pequenas que as células. Os poros são mais pequenos que as células, no entanto comparando com bactérias e leveduras, já são maiores. Estes aspetos têm que se ter em consideração nas diferentes aplicações biomédicas. No entanto como não se criam estruturas com apenas uma camada, mas sim estruturas 3D, além das dimensões dos poros obtidos tem que se ter em conta o caminho a percorrer e a otimização da estrutura nas três dimensões.

A rede 3D criada através do “electrospinning” tem cerca de 20 nanómetros, o que sendo maior que as células permite o seu uso em filtros.

Os materiais poliméricos porosos com dimensões de poros nestas gamas, são muito importantes em diversas aplicações biomédicas, como por exemplo nos suportes para crescimento celular, revestimento, materiais de substituição óssea.

No caso dos suportes para crescimento celular a porosidade é uma propriedade fundamental cuja otimização é uma mais-valia para o seu desenvolvimento, pois conseguir o suporte ideal significa conseguir uma porosidade otimizada sem comprometer a estrutura do material como a resistência.

3.4 Árvores de regressão/decisão

Uma árvore de decisão é um método computacional que tem como objetivo organizar os resultados de forma precisa a partir de um determinado método de cálculo baseado em testes de hipóteses. É um método com um resultado visual bastante simples e muito útil quando queremos apresentar resultados de forma rápida e resumida. Os resultados são apresentados sob a forma de árvore na qual partimos de uma condição inicial e no fim obtemos vários ramos com as diferentes previsões. Elas são muito úteis quando queremos encontrar relações entre variáveis de forma quantificada. As árvores de regressão/decisão possibilitam por exemplo assim encontrar relações entre variáveis que poderiam passar despercebidas.

O planeamento das experiencias computacionais foi feito utilizando o planeamento de experiencias computacionais designado por “Latin Hypercube Sampling design”. O planeamento das experiencias computacionais foi feito usando 1000 experiencias. Os resultados da porosidade e da espessura foram classificados usando árvores de regressão/decisão.

O primeiro nodulo o nodulo “pai” contém todos os dados e um teste vai ser feito para dividir os dados em 2 grupos mutuamente exclusivos, os nodulos filhos ou ramos. As observações que cumprem os requisitos seguem pelo ramo esquerdo as que não cumprem vão pelo direito. As separações dos nodulos “pai” em nodulos “filhos” continuam a ocorrer até que se atinja uma condição de terminação.

Nas figuras 29 e 230 podem ver-se as árvores de decisão/regressão feitas para a porosidade e a espessura.

Pode ver-se que a flexibilidade é a propriedade das fibras que mais influencia tanto a porosidade como a flexibilidade das estruturas. Relativamente à figura 29 que diz respeito à porosidade pode ver-se que a árvore obtida é bastante complexa, permitindo uma análise da importância relativa dos diferentes fatores que influenciam a porosidade tais como por exemplo o número de segmentos de fibras e o comprimento do segmento de fibra.

Na figura 30 apresenta-se a árvore de decisão/regressão relativamente à espessura da estrutura obtida por “electrospinning”. Pode constatar-se que esta é mais simples e que mais uma vez a flexibilidade das fibras é o parâmetro determinante, seguida do número de segmentos de fibra.

Estas árvores de decisão/regressão permitem relacionar os diferentes fatores de entrada com as propriedades finais que se pretendem otimizar.

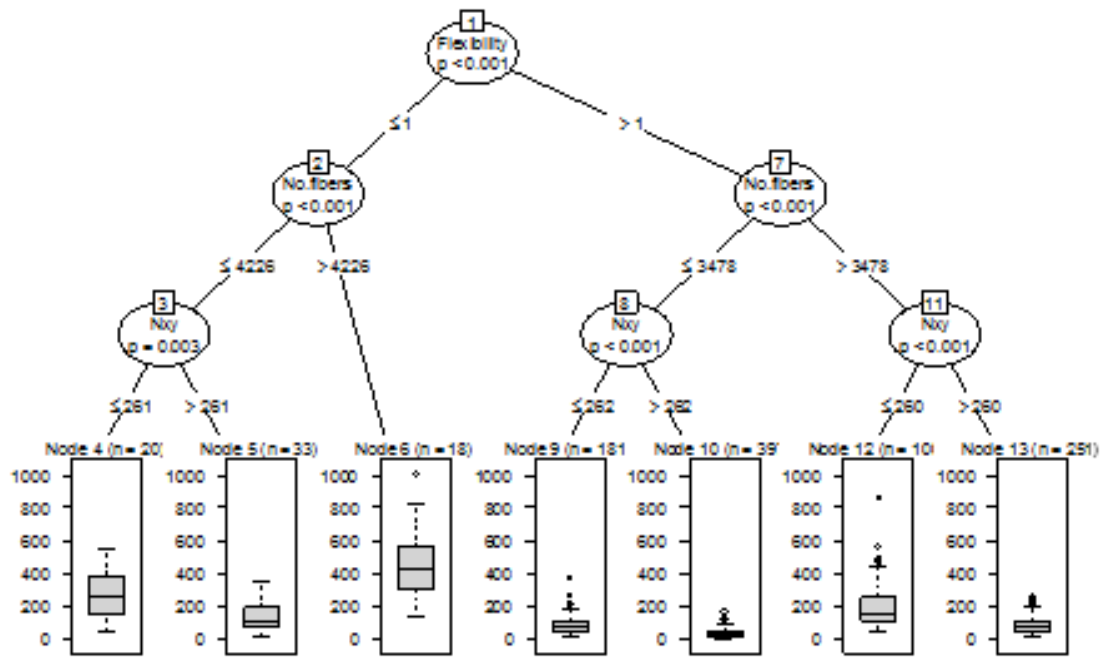


Figura 29: Árvore de regressão Espessura. Número de simulações n=1000 simulações.

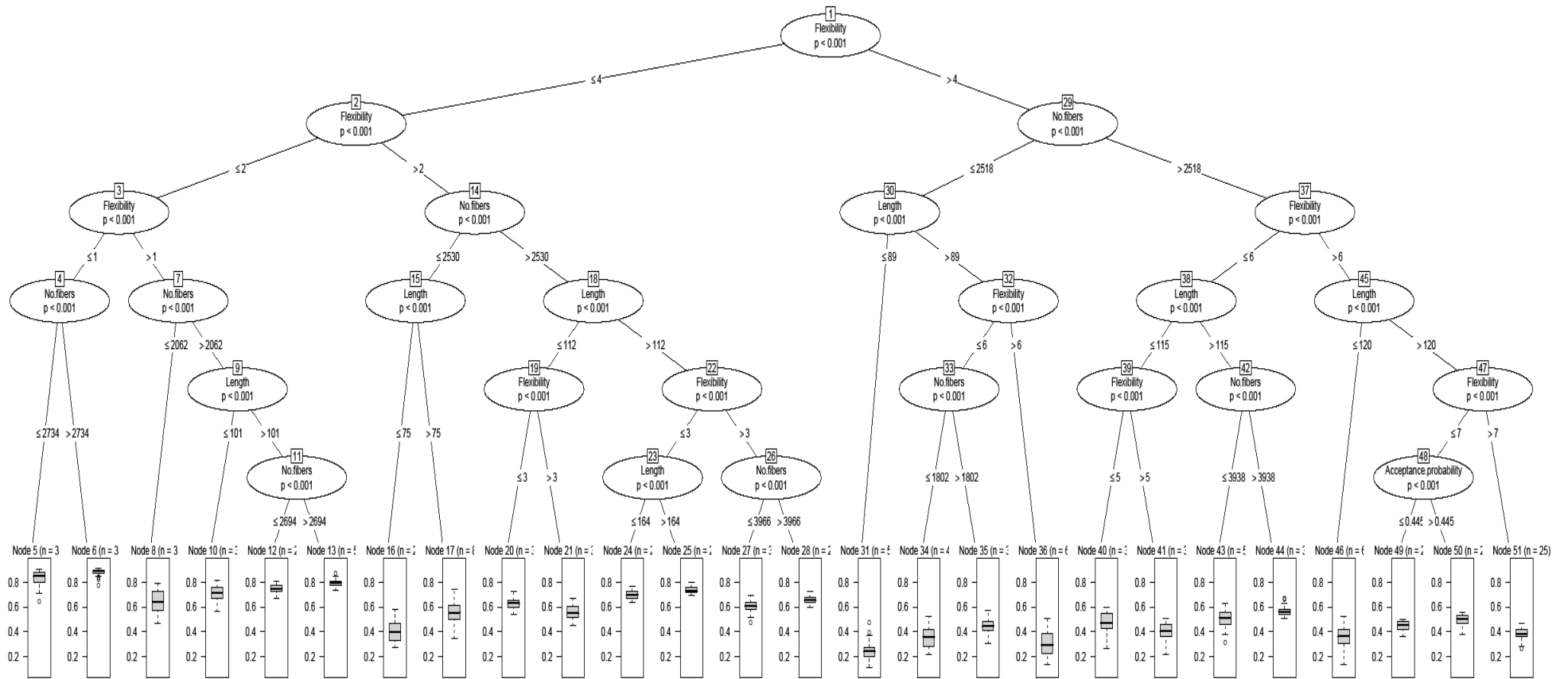


Figura 30: Árvore de regressão prosidade. Número de simulações n=1000 simulações.

IV. Conclusões e Trabalho Futuro

Tanto as técnicas de microscopia para medição de tamanho de poros, como as simulações computacionais destes materiais porosos, são fundamentais para a sua otimização. Prevê-se que as inovações e o desenvolvimento destes materiais poliméricos avançados possam beneficiar desta abordagem, que tanto inclui medições experimentais como simulações computacionais.

As simulações computacionais permitem criar um conjunto de 1000 amostras a partir das quais é possível construir árvores de regressão/decisão e assim relacionar as causas e os efeitos, de forma a otimizar os materiais. Os estudos envolvendo simulações computacionais e árvores de regressão/ decisão permitem descobrir novos materiais com as porosidades pretendidas, planejar experiências pra obter esses materiais e saber o que é possível conseguir com esses materiais. Um dos exemplos que se pode referir, é da otimização da porosidade, pois ao mudar a porosidade, a espessura, a área relativa de ligação e as propriedades mecânicas também mudam. As simulações e as árvores de permitem ter uma visão integrada do material.

Além da porosidade também a espessura dos materiais biomédicos para aplicações avançadas é muito importante. Por exemplo dependendo desta, estes podem ser colocados na corrente sanguínea ou colocados junto a um tumor.

Nos adesivos cirúrgicos a porosidade é importantes para permitir a exsudação das feridas. Também no revestimento de partículas esféricas, e revestimento de próteses ósseas, a espessura desse revestimento e a sua otimização é um dos temas de investigação mais atuais, no qual vários investigadores se debruçam. Pela primeira vez conseguem-se obter materiais com espessuras e porosidades que permitem abrir um grande leque de utilizações.

Relativamente ao trabalho futuro pretende-se continuar a completar este estudo integrando sempre a parte computacional com o trabalho experimental.

Um dos objetivos é continuar a explorar a capacidade do simulador computacional. Uma vez que com as simulações computacionais é possível obter um elevado número de experiências computacionais pretende-se continuar a utilizar as árvores de decisão/regressão para quantificar as relações entre as variáveis e otimizar as estruturas de acordo com as diferentes aplicações. Dentro das aplicações na área da biomedicina as mais importantes são os suportes para crescimento celular e os sistemas de entrega de moléculas. Também em outros materiais porosos como por exemplo em materiais ósseos se prevê que estes métodos possam ser muito uteis.

V. Bibliografia

- Ayres, C.E. et al., 2010. Nanotechnology in the design of soft tissue scaffolds: Innovations in structure and function. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2(1), pp.20-34.
- Barnes, C.P. et al., 2007. Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue engineering scaffolds. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(14), pp.1413-1433.
- Beachley, V. & Wen, X., 2010. Polymer nanofibrous structures: Fabrication, biofunctionalization, and cell interactions. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 35(7), pp.868-892.
- Casper, C.L. et al., 2007. Coating electrospun collagen and gelatin fibers with perlecan domain I for increased growth factor binding. *Biomacromolecules*, 8(4), pp.1116-1123.
- Cheng, Q. et al., 2006. Influence of point mutations on the flexibility of cytochrome b5: molecular dynamics simulations of holoproteins. *Biopolymers*, 83(3), pp.297-312.
- Chiellini, E. et al., 2003. Biodegradation of poly (vinyl alcohol) based materials. *Progress in Polymer Science*, 28(6), pp.963-1014.
- Chik, T.K. et al., 2014. Bioengineering a multicomponent spinal motion segment construct-A 3D model for complex tissue engineering. *Advanced Healthcare Materials*, pp.99-112.
- Croisier, F. et al., 2014. Polysaccharide-Coated PCL Nanofibers for Wound Dressing Applications. *Advanced Healthcare Materials*, 3(12), pp.2032-2039.
- Curto, J.M.R. et al., 2011. Three dimensional modelling of fibrous materials and experimental validation. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*, 42(5), pp.370-374.

- Dong, B., Smith, M.E. & Wnek, G.E., 2009. Encapsulation of multiple biological compounds within a single electrospun fiber. *Small*, 5(13), pp.1508-1512.
- Durán, N., Mattoso, L.H.C.. & Morais, P.C., 2006. *Nanotecnologia. Introdução, Preparação e Caracterização de Biomateriais e Exemplos de Aplicação* 1^a ed., São Paulo, Brazil: Artliber.
- Dvir, T. et al., 2011. Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nature nanotechnology*, 6(1), pp.13-22.
- Eichhorn, S.J. & Sampson, W.W., 2010. Relationships between specific surface area and pore size in electrospun polymer fibre networks. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 7(October), pp.641-649.
- Eichhorn, S.J. & Sampson, W.W., 2005. Statistical geometry of pores and statistics of porous nanofibrous assemblies. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 2(May), pp.309-318.
- Franco, P.Q., Silva, J.C. & Borges, J.P., 2009. Produção de fibras de hidroxiapatite por electrofiação. *Ciencia e Tecnologia dos Materiais*, 22(1/2), pp.57-64.
- Gadde, S. et al., 2014. Development of Therapeutic Polymeric Nanoparticles for the Resolution of Inflammation. *Advanced Healthcare Materials*, 3(9), pp.1448-1456.
- Guo, C., Zhou, L. & Lv, J., 2013. Effects of expandable graphite and modified ammonium polyphosphate on the flame-retardant and mechanical properties of wood flour-polypropylene composites. *Polymers and Polymer Composites*, 21, pp.449-456.
- Hamori, M. et al., 2014. Preparation and pharmaceutical evaluation of nano-fiber matrix supported drug delivery system using the solvent-based electrospinning method. *International Journal of Pharmaceutics*, 464(1-2), pp.243-251.
- Hollister, S.J., 2005. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nature materials*, 4(7), pp.518-524.

- Hu, L. et al., 2014. Alginate encapsulated mesoporous silica nanospheres as a sustained drug delivery system for the poorly water-soluble drug indomethacin. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9(4), pp.183-190.
- Jorfi, M. & Foster, E.J., 2015. Recent advances in nanocellulose for biomedical applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 41719, pp.1-19.
- Kallmes, O. & Corte, H., 1960. The structure of paper. I- The statistical geometry of an ideal two dimension fiber network. *Tappi Journal*, 43(9), pp.737-752.
- Kolesov, I. & Androsch, R., 2012. The rigid amorphous fraction of cold-crystallized polyamide 6. *Polymer*, 53(21), pp.4770-4777.
- Kreuter, J., 2014. Drug delivery to the central nervous system by polymeric nanoparticles: What do we know? *Advanced Drug Delivery Reviews*, 71, pp.2-14.
- Kunzmann, A. et al., 2011. Toxicology of engineered nanomaterials: Focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1810(3), pp.361-373.
- Kwon, D.Y. et al., 2012. Biodegradable stent. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 05(April), pp.208-216.
- Lim, Y. et al., 2010. Preparation of Cellulose-based Nanofibers Using Electrospinning.
- Liu, W., Thomopoulos, S. & Xia, Y., 2012. Electrospun nanofibers for regenerative medicine. *Advanced healthcare materials*, 1(1), pp.10-25.
- Monge, C. et al., 2015. Spatio-temporal Control of LbL Films for Biomedical Applications: From 2D to 3D. *Advanced Healthcare Materials*,
- Moritz, M. & Geszke-Moritz, M., 2015. Mesoporous materials as multifunctional tools in biosciences: Principles and applications. *Materials Science and Engineering: C*, 49, pp.114-151.
- Moroni, L. et al., 2008. 3D fiber-deposited electrospun integrated scaffolds enhance cartilage tissue formation. *Advanced Functional Materials*, 18(1), pp.53-60.
- Niskanen, K. & Alava, M., 1994. Planar random networks whit flexible fibers. *Physical Review Letters*, 73(25), pp.3475-3478.

- Niskanen, K. & Rajatora, H., 2002. Statistical Geometry of Paper Cross-Sections. *Science*, 28(7), pp.5-10.
- Parambadath, S. et al., 2011. N,N'-diureylenepiperazine-bridged periodic mesoporous organosilica for controlled drug delivery. *Microporous and Mesoporous Materials*, 141(1-3), pp.94-101.
- Provatas, N. & Uesaka, T., 2003. Modeling Paper structure and paper press interactions. *Journal of Pulp and Paper Science*, 29(10), pp.332-340.
- Putti, M. et al., 2015. Electrospinning poly(ϵ -caprolactone) under controlled environmental conditions: Influence on fiber morphology and orientation. *Polymer*, 63, pp.189-195.
- Rand, S.F., 2004. *Linting of filler in the offset printing process*. Monash University.
- Rexeisen, E.L. et al., 2010. Self-assembly of fibronectin mimetic peptide-amphiphile nanofibers. *Langmuir*, 26(3), pp.1953-1959.
- Richardson, J.J. et al., 2015. Versatile Loading of Diverse Cargo into Functional Polymer Capsules. *Advanced Science*, 2,
- Sampson, W.W., 2009. Materials properties of paper as influenced by its fibrous architecture. *International Materials Reviews*, 54(3), pp.134-156.
- Sampson, W.W., 2001. The structural characterization of fibre networks in papermaking processes - A review. *The Science of Papermaking*, (September 2001), pp.1205-1288.
- Sampson, W.W. & Urquhart, S.J., 2008. The contribution of out-of-plane pore dimensions to the pore size distribution of paper and stochastic fibrous materials. *Journal of Porous Materials*, 15, pp.411-417.
- Smith, I.O. et al., 2009. Nanostructured polymer scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Wires Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 1(April), pp.226-236.

- Suzuki, M., Yamada, T. & Yang, C.Y., 2007. Monte Carlo simulation of scanning electron microscopy bright contrast images of suspended carbon nanofibers. *Applied Physics Letters*, 90(8), p.083111. A
- Tian, L., Yan, T. & Pan, Z., 2015. Fabrication of continuous electrospun nanofiber yarns with direct 3D processability by plying and twisting. *Journal of Materials Science*, 50(21), pp.7137-7148. Available at:
- Tsang, K.Y. et al., 2010. The developmental roles of the extracellular matrix: Beyond structure to regulation. *Cell and Tissue Research*, 339(1), pp.93-110.
- Vasita, R. & Katti, D.S., 2006. Nanofibers and their applications in tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine*, 1(1), pp.15-30.
- Wang, S. & Zhao, G., 2012. Quantitative characterization of the electrospun gelatin-chitosan nanofibers by coupling scanning electron microscopy and atomic force microscopy. *Materials Letters*, 79, pp.14-17.
- Wang, Y. et al., 2014. A novel multiple drug release system in vitro based on adjusting swelling core of emulsion electrospun nanofibers with core-sheath structure. *Materials Science and Engineering: C*, 44, pp.109-116.
- Wittmer, C.R. et al., 2014. Well-organized 3D nanofibrous composite constructs using cooperative effects between electrospinning and electro spraying. *Polymer*, 55(22), pp.5781-5787.
- Yano, T. et al., 2012. Orientation of poly(vinyl alcohol) nanofiber and crystallites in non-woven electrospun nanofiber mats under uniaxial stretching. *Polymer*, 53(21), pp.4702-4708.
- Zamani, M., Prabhakaran, M.P. & Ramakrishna, S., 2013. Advances in drug delivery via electrospun and electro sprayed nanomaterials. *International Journal of Nanomedicine*, 8, pp.2997-3017.
- Zeng, J. et al., 2005. Poly (vinyl alcohol) Nanofibers by Electrospinning as a Protein Delivery System and the Retardation of Enzyme Release by Additional Polymer Coatings Poly (vinyl alcohol) Nanofibers by Electrospinning as a Protein Delivery Sistem and the Retardation of. , pp.1484-1488.

Zheng, Y. et al., 2014. Electric Field Design for Multijet Electrosinning with Uniform Electric Field. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 53(38), pp.14876-14884.