

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS**

**NANOFIBRAS DE PVA/PAA COM INCORPORAÇÃO DE
HIDROXIAPATITA VISANDO SUA APLICAÇÃO EM SISTEMAS
OSTEOCONDUTORES**

Jaqueline Rocha Limberger

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, julho de 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

**NANOFIBRAS DE PVA/PAA COM INCORPORAÇÃO DE
HIDROXIAPATITA E SUA APLICAÇÃO EM SISTEMAS
OSTEOCONDUTORES**

Jaqueline Rocha Limberger

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Prof.^a Dr.^a Rosane Michele Duarte Soares e apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em preenchimento parcial dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Materiais.

Porto Alegre, julho de 2015

Dedico este trabalho à todos que me apoiaram e me incentivaram para chegar a esse momento, em especial aos meus pais Moacyr e Diana, meus irmãos Débora, Francisco e Otávio e meu marido Samuel.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora Rosane M. D. Soares pela oportunidade, paciência, por acreditar no meu trabalho e por todo o conhecimento repassado durante esse período. Obrigada também pelo carinho e amizade.

À todos os colegas do laboratório K-208A deixo meu sincero agradecimento. Além de tornar meus momentos no laboratório mais divertidos, todos repassavam suas experiências sem nenhuma restrição. Em especial à Nataly, Joice e Gislene, pois sem o auxílio delas eu não chegaria tão logo ao final desse trabalho. Elas sempre estavam dispostas e com muito bom humor para ajudar. Com certeza, levarei a lembrança desses bons momentos, levarei o conhecimento adquirido e a amizade de todo o pessoal do laboratório, como também da Jéssica, Luana, Andressa e Gisele.

Agradeço com muito carinho ao diretor da empresa que trabalho, Fábio, que me deu a oportunidade de realizar esse mestrado ao mesmo tempo em que trabalhava. Obrigada pelas liberações em alguns dias para que eu pudesse comparecer à universidade para a participação das aulas e realização do trabalho prático. Aos colegas de trabalho que trabalhavam por mim na minha ausência e ainda assim, me apoiavam como todo o entusiasmo, são eles o Décio, Jéssica, Bruna, Maycon, Mateus, Dario e Inajara.

Pelos primeiros ensinamentos dentro do laboratório, por todo o conhecimento repassado, pela paciência e amizade agradeço a Ketlin.

Ao Felipe Ornaghi pelas valiosas ajudas nas horas de desespero.

Ao Professor Vinicius Rosa da Universidade Nacional de Singapura pelos ensaios de viabilidade celular e ao Professor Otavio Bianchi da UCS pelos ensaios de microscopia.

Ao Júlio, técnico do LAMAT, por dicas na compreensão dos ensaios de TGA e DSC e ao Guilherme Belmonte pela ajuda no ensaio de Ângulo de Contato.

À minha família e aos meus amigos, que me apoiavam a todo o momento nesse período de tantas correrias e trabalho.

Aos funcionários e professores do PGCIMAT, por aumentar o meu conhecimento em Ciência dos Materiais.

Aos membros da Banca de Avaliação por aceitar o convite e de certa forma contribuir para o meu crescimento e aperfeiçoamento do trabalho.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul e seus funcionários.

A Deus!

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
SUMÁRIO	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 O OSSO	4
2.2 BIOMATERIAIS E SISTEMAS OSTEOCONDUTORES	6
2.3 NANOFIBRAS	7
2.4 POLI (ÁLCOOL VINÍLICO)	8
2.5 POLI (ÁCIDO ACRÍLICO)	11
2.6 PVA/PAA	11
2.7 HIDROXIAPATITA	12
2.8 MINERALIZAÇÃO	13
2.9 ENGENHARIA DO TECIDO OSSEO	14
3. OBJETIVOS	16
3.1 OBJETIVO GERAL	16
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
4. PARTE EXPERIMENTAL	17
4.1 MATERIAIS	17
4.2 MÉTODOS	17
4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS MATRIZES	18
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	25
5.1 TESTES PRELIMINARES E SOLUBILIDADE	25
5.2 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER	26
5.3 MICROSCOPIA ELETRONICA DE VARREDURA E VISCOSIDADE	30
5.4 ÂNGULO DE CONTATO COM A ÁGUA (WCA)	38

5.5	ANÁLISES TÉRMICAS – TG e DSC	39
5.6	ENSAIO MECÂNICO DE TRAÇÃO.....	45
5.7	VIABILIDADE CELULAR (MTS)	47
6.	CONCLUSÕES	49
7.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	50
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A estrutura do osso...	4
Figura 2. Classificação de Biomateriais.	6
Figura 3. Interação do suporte com a célula.....	7
Figura 4. Partes do equipamento de eletrofição..	8
Figura 5. Reação de obtenção do PVA.	9
Figura 6. Cadeias poliméricas; (a) lineares, (b) ramificadas e (c) reticuladas.	9
Figura 7. Reticulação de polímero contendo grupos hidroxilas com glutaraldeído em meio ácido.	10
Figura 8. Estrutura do BTCA.	10
Figura 9. Estrutura do PAA.....	11
Figura 10. Estrutura da HA.	12
Figura 11. Esquema representando a deposição da HA na nanofibra.....	13
Figura 12. Esquema da mineralização.....	14
Figura 13. Esquema da metodologia empregada para construção das matrizes poliméricas...	18
Figura 14. Matriz de nanofibras formada de PVA.PAA 2 BTCA: (a) Após ser retirada da estufa, (b) Mergulhada em água, (c) Após 48 h mergulhada em água.....	25
Figura 15. Espectro de FTIR-ATR para as nanofibras poliméricas de PVA com e sem a adição do BTCA. A seta indica o estiramento C-O do éster.	26
Figura 16. Reação de esterificação esperada entre o PVA e o BTCA	27
Figura 17. Espectro de FTIR-ATR para as nanofibras de PAA.PVA com e sem a adição de BTCA.	28
Figura 18. Interação entre o PVA com BTCA e o PAA.	29
Figura 19. Espectros das nanofibras poliméricas antes e após de 48 horas de imersão em água.	30
Figura 20. Micrografias de MEV das matrizes de PVA e PAA puros e quando misturados e respectivos gráficos de frequência dos diâmetros: (a) PVA, (b) Distribuição dos diâmetros do PVA, (c) PAA, (d) Distribuição dos diâmetros do PAA, (e) PVA.PAA sem reticulação, (f) Distribuição dos diâmetros da matriz PVA.PAA e (g) Médias dos diâmetros das respectivas nanofibras. (Magnificação 5000x).	32
Figura 21. Micrografias de MEV das matrizes de PVA.PAA com 2% de BTCA e adição de 10 e 15% de HA e respectivos gráficos de frequência dos diâmetros: (a) PVA.PAA 2 BTCA, (b) Distribuição dos diâmetros do PVA.PAA 2 BTCA, (c) PVA.PAA 2 BTCA 10HA, (d)	

Distribuição dos diâmetros do PVA.PAA 2 BTCA 10HA, (e) PVA.PAA 2 BTCA 15HA, (f) Distribuição dos diâmetros do PVA.PAA 2 BTCA 15HA e (g) Médias dos diâmetros das respectivas nanofibras. (Magnificação 5000x).....	33
Figura 22. Micrografias de MEV das matrizes de PVA.PAA com 6% de BTCA e adição de 10 e 15% de HA e respectivos gráficos de frequência dos diâmetros: (a) PVA.PAA 6 BTCA, (b) Distribuição dos diâmetros do PVA.PAA 6 BTCA, (c) PVA.PAA 6 BTCA 10HA, (d) Distribuição dos diâmetros do PVA.PAA 6 BTCA 10HA, (e) PVA.PAA 6 BTCA 15HA, (f) Distribuição dos diâmetros do PVA.PAA 6 BTCA 15HA e (g) Médias dos diâmetros das respectivas nanofibras. (Magnificação 5000x).....	34
Figura 23. Micrografias de MEV da matriz de PVA.PAA 2 BTCA e 10 HA: a) Antes da imersão em água e b) Após 48 horas imerso em água. (Magnificação 5000x).....	36
Figura 24. Micrografias de MEV-FEG com gráfico de EDS para amostra PVA.PAA 6 BTCA 15 HA: a) Micrografia da matriz com destaque para a HA; b) Micrografia da matriz com a região demarcada para análise de EDS; c) Gráfico do EDS para a região demarcada como Spectrum 2; d) Gráfico do EDS para a região demarcada como Spectrum 3 e e) Gráfico do EDS para a região demarcada como Spectrum 4.	37
Figura 25. Ângulo de contato (a) PVA.PAA sem reticulação, (b) PVA.PAA 2 BTCA, e (c) PVA.PAA 2 BTCA 15 HA.	38
Figura 26. Curvas termogravimétricas de perda de massa das matrizes de nanofibras.	40
Figura 27. Curvas termogravimétricas (a) TG/DTG para PVA e PVA antes do processamento, (b) TG/DTG para PAA e PAA antes do processamento e (c) TG/DTG para PVA.PAA nanofibras.	41
Figura 28. Termogramas de DSC para as nanofibras poliméricas sem reticulação (2º ciclo de aquecimento).	43
Figura 29. Termogramas de DSC para as nanofibras reticuladas (2º ciclo de aquecimento) ..	44
Figura 30. Propriedades mecânicas sob tração (a) Módulo de Young, (b) Elongação e (c) Tensão máxima na ruptura.	46
Figura 31. Ensaio de MTS nas matrizes e o PS como controle utilizando células-tronco de polpa de dente. Teste Anova: diferença significativa * (p < 0,05); ** (p < 0,01); *** (p < 0,001).....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Nomenclatura utilizada no trabalho.	178
Tabela 2. Caracterizações realizadas para cada matriz.	19
Tabela 3. Resultados da viscosidade e valores do diâmetro médio das nanofibras poliméricas.	36
Tabela 4. Valores de ângulo de contato (WCA) para as nanofibras poliméricas.....	38
Tabela 5. Resultados das curvas TG/DTG para as amostras.....	42
Tabela 6. Temperatura de transição vítrea para as nanofibras de PVA.PAA e os polímeros puros, antes e após o processamento.	45
Tabela 7. Resultados das propriedades mecânicas sob tração obtidas para as matrizes.	47

LISTA DE ABREVIATURAS

ATR	Refletância Total Atenuada
Anova	Análise de variância de uma via
BTCA	Ácido butano 1,2,3,4-tetracarboxílico
Ca	Cálcio
cm	Unidade de comprimento
cm ⁻¹	Unidade de comprimento de onda
COL	Colágeno
cP	Unidade de viscosidade Centipoise
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMA	Análises dinâmico-mecânicas
E	Módulo Young
ECM	Matriz Extracelular
EDS	Energia dispersiva
ϵ	Deformação
F	Força
FEG	<i>"Field Emission Gun"</i>
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
g/mol	Unidade de massa molar gramas/mol
h	Horas
HA	Hidroxiapatita
kV	10 ³ volts
keV	10 ³ elétron-volt
mg	miligramas
min	Minutos
mL	mililitros
mm	milímetros
mm.min ⁻¹	milímetros/minuto
mm/h	milímetros/hora
m/m	massa/massa
mol·L ⁻¹	Unidade de Concentração Molar
M _w	Massa Molecular

MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MPa	Megapascal
nm	nanometros
OD	Optical density
P	Fósforo
PAA	Poli (ácido acrílico)
PCL	Poli (ϵ - caprolactona)
PLLA	Poli L-ácido láctico
PS	penicilina/estreptomicina
PVA	Poli (álcool vinílico) ou álcool polivinílico
s	Segundos
SEI	Elétrons secundários
SBF	Soro bovino fetal
TG	Termogravimetria
T_g	Temperatura de transição vítrea
μm	micrometros
μL	microlitros
λ	Comprimento de onda
σ	Tensão
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
$^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$	Taxa de aquecimento

RESUMO

Esse trabalho tem por objetivo o desenvolvimento de um biomaterial constituído de poli (álcool vinílico) (PVA) e poli (ácido acrílico) (PAA) contendo hidroxiapatita (HA) visando a aplicação em sistemas osteocondutores. As nanofibras poliméricas foram produzidas pelo método de eletrofiação a fim de mimetizar a matriz extracelular do osso (ECM), além de obter um material com maior relação área superfície quando comparada a materiais de maiores escalas, o que melhora a adesão e proliferação da célula óssea. Para essa finalidade foi utilizado uma matriz de PVA e PAA variando a concentração da HA na matriz.

Pelas características hidrofílicas do PVA, foi necessária sua reticulação, por isso o ácido butano 1,2,3,4-tetracarboxílico (BTCA) foi utilizado e estudado variando sua concentração em duas proporções diferentes, 2 % e 6 % (m/m). A reticulação foi efetiva para a matriz PVA/PAA/HA com no mínimo 2 % BTCA, sendo que o FTIR-ATR comprovou a permanência dos principais grupamentos como a carbonila e a hidroxila e a análise de MEV comprovou a estabilidade física das nanofibras após 48 h de imersão em água. Os diâmetros médios das fibras variaram entre 273 a 437 nm, com menor tamanho e menor variação dos diâmetros das fibras na matriz com a presença de HA.

Os resultados da matriz obtidos pela análise mecânica foram semelhantes com as propriedades mecânicas do osso. Os ensaios de análise térmica realizados comprovaram uma mistura homogênea na matriz PVA/PAA/HA.

Os testes de viabilidade celular mostraram que na matriz com a presença da HA a atividade celular é maior quando comparada a matriz PVA/PAA, o que indica que a HA na matriz tem papel fundamental na atividade celular.

ABSTRACT

This study aims to develop a biomaterial composed of poly (vinyl alcohol) (PVA) and poly (acrylic acid) (PAA) containing hydroxyapatite (HA) for application in osteoconductive systems. Polymeric nanofibers were prepared by electrospinning method to mimic bone extracellular matrix (ECM), in addition to obtaining a material with large surface area to volume ratio, which improve the adhesion and proliferation of bone cells. For this purpose we used PVA and PAA matrix by varying the concentration of HA in the matrix.

For the hydrophilic characteristics of the PVA, a crosslinking has been required, so BTCA was used and studied by varying its concentration in two different proportions of 2 % and 6 % (w/w). The crosslinking is effective for the PVA/PAA/HA matrix with at least 2 % BTCA, and the FTIR-ATR demonstrated the permanence of the main groups such as hydroxyl and carbonyl and SEM analysis confirmed the stability of nanofibers after 48 hours immersion in water. The medium diameters ranged from 273-437 nm with smaller size and smaller variation of fiber diameters in the array with the presence of HA.

The results of the mechanical analysis matrices obtained were very similar to the mechanical properties of bone. The thermal analysis of trials proved one miscible mixture in the PVA/PAA/HA matrix.

The cell viability tests showed that the matrix in the presence of HA has higher cellular activity when compared to PVA/PAA matrix, which proves that the HA in the matrix has a fundamental role in cellular activity.

1. INTRODUÇÃO

Novos materiais surgem a todo o momento a fim de suprir necessidades da população moderna. Pesquisadores têm mostrado interesse em biomateriais que abrange diversas aplicações como a substituição da lente intraocular e restaurações dentárias. Dentre os empregos dos biomateriais no cenário atual destacam-se o avanço das pesquisas em áreas como células e biologia molecular, química, ciência dos materiais e engenharia¹.

Os biomateriais exercem um papel essencial no campo da engenharia de tecidos, atuando como uma matriz extracelular artificial que apoia a regeneração¹⁻². A engenharia de tecidos tem como finalidade permitir a reparação ou regeneração de tecidos através de combinações de células, suportes, fatores de regulação e estímulos ambientais. A fim de enfrentar os desafios dessa área de rápido crescimento, várias áreas interdisciplinares estão abrangidas como a engenharia, química, biologia, medicina e os biomateriais³.

Como consequência do envelhecimento da população no mundo industrializado, a engenharia de tecido ósseo com o desenvolvimento de biomateriais está se tornando cada vez mais importante. Uma característica bem peculiar do osso é a sua capacidade de regeneração, porém em alguns casos são necessários enxertos ósseos. Nesses casos, é necessária a utilização de enxertos que provém de um mesmo indivíduo, conhecido como o auto-enxerto, de um doador externo, chamado de aloenxerto, ou ainda a partir de ossos de animais, o xenotransplante⁴. Dentro desta perspectiva, o tratamento do problema ósseo possui algumas limitações, tais como: área doadora, morbidade, disponibilidade de doadores limitada, resposta imunológica inadequada e transferência de patógenos⁵. Com isso, os materiais de enxertos artificiais estudados no campo da engenharia de tecido ósseo estão em ascensão provocando grandes avanços nesse campo⁴.

O osso natural é composto, principalmente, pelo colágeno (COL) tipo I, que fornece ao osso elasticidade e flexibilidade, também importante na adesão e migração celular, e por cristais de fosfato de cálcio, em escala nanométrica, muitas vezes na forma de minerais de hidroxiapatita (HA) que é a responsável pela rigidez e resistência óssea⁶. Para imitar a estrutura e essas funções da matriz extracelular natural (ECM), as nanofibras poliméricas estão sendo utilizadas para restaurar, manter ou melhorar a função dos tecidos humanos e são de grande interesse na engenharia de tecidos, como materiais de suporte⁷. Sendo assim, tem se tornado um dos maiores desafios para os cientistas de biomateriais a busca pela mimetização

de uma ECM e a fabricação de materiais para regeneração óssea com mesmo comportamento estrutural, mecânico e biológico do osso natural⁸.

Dentre os polímeros que podem ser utilizados na elaboração de nanofibras, destaca-se o poli (álcool vinílico) (PVA), um biopolímero quem vem sendo muito utilizado como um material de suporte. Sua aplicação no campo da engenharia de tecidos dá-se tanto na forma de nanofibras quanto hidrogéis, como peles artificiais, matrizes de entrega de drogas, curativos de queimaduras, lentes de contato flexíveis, implantes de cartilagens, entre outras⁸⁻⁹. As propriedades do PVA são essenciais para a substituição do tecido ósseo conferindo boas propriedades mecânicas, ausência de toxicidade, não carcinogênico, biocompatibilidade, biodegradabilidade e hidroflicidade¹⁰⁻¹¹.

Outro polímero com grande potencial em sistemas osteocondutores é o poli (ácido acrílico) (PAA), um polímero que possui em sua estrutura grupos carboxílicos que podem agir com outros grupos doadores de prótons, como por exemplo, os grupos hidroxila do PVA. O PAA, inclusive, já foi utilizado como um aditivo em preparações sol-gel para servir como sítio de nucleação de cálcio¹².

O sistema PVA/PAA permite a formação de ligações de hidrogênio resultante da interação interpolímeros. Este tipo de sistema já foi estudado para imobilização de enzimas¹³. As superfícies de polímeros sintéticos são em sua maioria hidrofóbicas, o que proporciona condições desfavoráveis para adesão celular, para alguns tipos de células¹⁴. Por possuir grupos hidroxilas o PVA é altamente hidrofílico, por isso é necessária sua reticulação para que sistemas elaborados a partir deste polímero sejam estáveis quando imersos em meios biológicos. Com essa finalidade o ácido butano 1,2,3,4-tetracarboxílico (BTCA), que possui grupamentos carboxílicos e já foi utilizado em um sistema sol-gel foi escolhido para a reticulação do PVA. Entre a característica principal do BTCA é sua não toxicidade^{9, 15}. A interação entre o PVA e o BTCA ocorre através da esterificação, ou seja, da desidratação entre o ácido carboxílico e um grupo hidroxilo, ativada termicamente¹³.

Na busca de novos materiais que promovam ou auxiliem no processo de regeneração óssea, diferentes biomateriais nanoestruturados vêm sendo investigados combinando alguns polímeros com a hidroxiapatita (HA). A HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, é um material de boa biocompatibilidade e bioatividade, quimicamente e estruturalmente semelhante ao componente inorgânico do osso, por isso tem sido utilizada com sucesso como agente de enchimento de ossos¹⁶⁻¹⁷. Estudos demonstraram um melhor desempenho das células onde a HA é incorporada à nanofibra, principalmente na diferenciação e mineralização das mesmas¹⁴.

Na busca por reproduzir a escala nanométrica da ECM do osso, utilizou-se a eletrofiação, que se destaca na última década como um método relativamente simples e barato para a preparação de nanofibras poliméricas, quando comparado a outras formas de fabricação de fibras. Essa técnica permite o emprego de polímeros naturais, sintéticos ou a mistura deles, bem como a obtenção de maior área de superfície¹⁸. A eletrofiação consiste na aplicação de um potencial elétrico em uma solução polimérica. Quando as cargas eletrostáticas em solução ultrapassam a tensão superficial da mesma, um jato de solução é ejetado e direcionado a um coletor. Nesta trajetória, o solvente evapora e são formadas nanofibras na superfície do coletor. Os parâmetros que afetam esse processo são muitos, mas em condições adequadas, no coletor haverá a formação de fibras poliméricas com um diâmetro que varia de dezenas de nanômetros a micrometros¹⁹.

Com base no exposto, o desenvolvimento do biomaterial precisa ser biocompatível, mecanicamente forte, poroso e biodegradável. É importante ressaltar que após processado, a taxa à qual ocorre a degradação da matriz polimérica precisa ser, tanto quanto possível, a mesma da velocidade de formação do tecido biológico. Desta forma, um sistema osteocondutor com características adequadas para engenharia do tecido ósseo irá prever a fixação das células, proliferação, diferenciação e mineralização da ECM²⁰.

Sendo assim, foi preparado através da técnica de eletrofiação um biomaterial utilizando o poli (álcool vinílico) e o poli (ácido acrílico) modificadas com BTCA e com a incorporação da hidroxiapatita visando a aplicação em sistemas osteocondutores.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O OSSO

O osso natural é um tecido do corpo humano rígido e ao mesmo tempo dinâmico, é altamente vascularizado e organizado e tem como sua principal função ajudar na locomoção. Ele é composto por componentes orgânicos e inorgânicos⁸. A matriz orgânica é principalmente o colágeno (COL) tipo I, que fornece ao osso elasticidade e flexibilidade, a fase inorgânica é composta por uma forma cristalina de fosfato de cálcio, principalmente na forma de minerais de hidroxiapatita (HA) que é a responsável pela rigidez e resistência óssea⁶.

Três tipos de células constituem um osso, que estão ilustradas na Figura 1: osteoblastos, responsáveis pela formação de osso; osteócitos, que fazem a desintegração da matriz óssea e; osteoclastos multinucleadas, responsáveis pela síntese de enzimas lisossomais. Diferentemente dos outros tecidos conjuntivos o osso constitui um menor número de células embebidas em uma matriz de fibras de colágeno e substâncias inorgânicas, em escala nanométrica²¹.

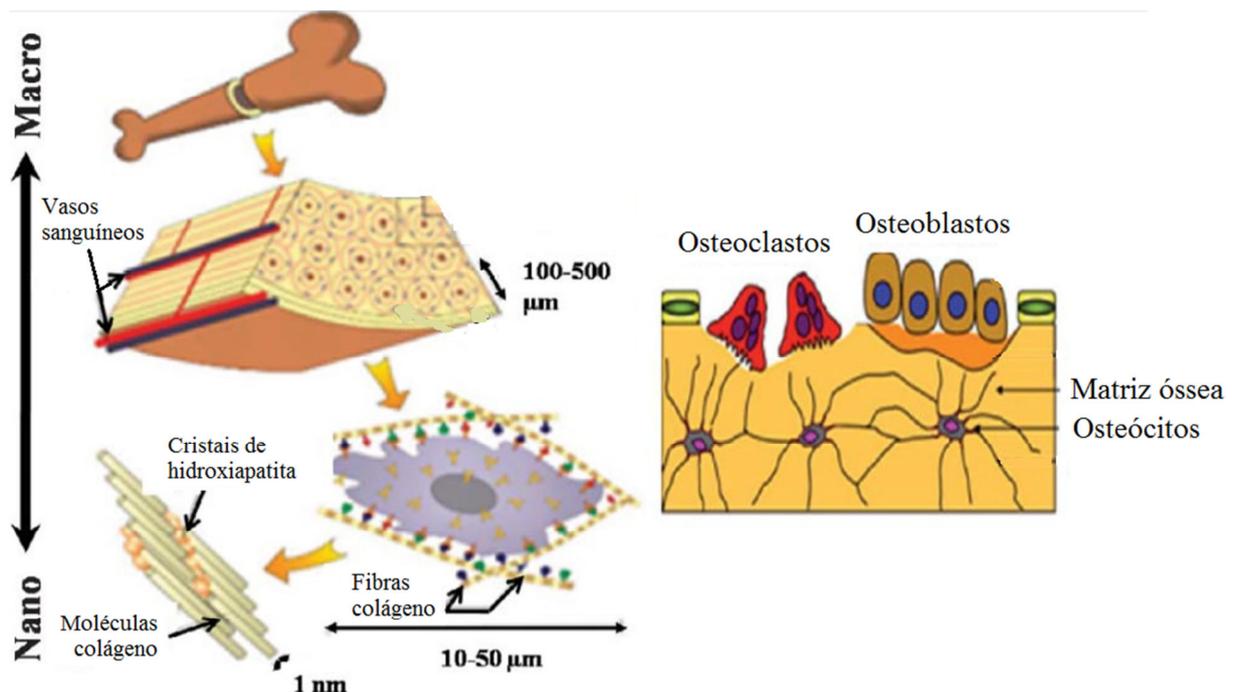


Figura 1. A estrutura do osso. Adaptado de Mitra²¹.

2.1.1 Matriz Extracelular Natural do Osso (ECM)

A matriz extracelular natural (ECM) do osso natural é estruturada por nanocristais de fosfato de cálcio incorporadas a nanofibras de colágeno²². Além de regular as funções celular, a ECM fornece sinais físico-químicos essenciais na adesão celular, proliferação, migração e diferenciação²¹.

Para imitar a estrutura e essas funções da ECM, as nanofibras poliméricas estão sendo utilizadas para restaurar, manter ou melhorar a função dos tecidos humanos e são de grande interesse na engenharia de tecidos como materiais de suporte⁷. Sendo assim, os cientistas de biomateriais têm buscado a imitação de uma ECM e fabricação de materiais para regeneração óssea com mesmo comportamento estrutural, mecânico e biológico do osso natural⁸.

As propriedades dos materiais de nanofibras eletrofiadas estão sendo consideradas adequadas em termos de aspectos mecânicos e biológicos, para os tecidos calcificados rígidos. O processo de regeneração consistiria em uma composição de materiais que imitaria a ECM, assim as células poderiam reconhecer e utilizar o substrato artificial. Estruturalmente a parte orgânica proporciona a resistência, enquanto os cristais inorgânicos endurecem a matriz, contribuindo assim para uma ECM forte e resistente. Uma característica essencial do tecido duro é o processo de calcificação, desde que a presença de uma matriz artificial facilite ou possibilite esse processo¹⁴.

2.1.2 Danos ósseos

É um desafio para os médicos tratar com eficácia um dano ósseo resultante de malformação, osteoporose e tumores. É muito difícil o osso curar naturalmente, principalmente em casos de fraturas e defeitos graves nos doentes idosos e complicações como má união ou a não união do osso. Geralmente para esses casos, são realizadas cirurgias invasivas com pinos metálicos, parafusos ou placas, que podem estender o tempo de cura, ou exigir várias cirurgias¹⁹. Além disso, os estabilizadores metálicos ou implantes podem causar dores crônicas. Outra opção para a cura dos defeitos ósseos é a substituição do osso a partir de doadores humanos, porém surgem outros problemas nas propriedades físicas e biológicas entre a hospedeira e o doador. Sendo assim, existe o risco da infecção, a rejeição e a transmissão de doenças²³.

Os objetivos dos estudos na área médica são melhorar a saúde e as condições de cura. É por isso que muitas pesquisas são realizadas para o desenvolvimento de um novo tipo de biomaterial para a regeneração do tecido ósseo. Ou seja, uma alternativa para tratar esses

defeitos é o desenvolvimento de substitutos temporários nas áreas danificadas que tenha uma estrutura específica chamada de suporte²⁴.

É dito que uma reparação óssea de sucesso é quando se obtém a restituição do espaço e integridade mecânica, isso em função da recuperação²⁵. Apesar de vários estudos nessa área, a construção de suportes que imitam as propriedades físicas e biológicas do osso, ainda apresenta alguns desafios²⁶.

2.2 BIOMATERIAIS E SISTEMAS OSTEOCONDUTORES

Um biomaterial é toda a substância ou combinação delas, exceto os fármacos, cuja origem pode ser natural ou sintética, que pode ser usada durante qualquer período de tempo, como parte ou como sistema que trata, aumenta ou substitui qualquer tecido, órgão ou funções do corpo²⁷.

O principal uso dos biomateriais é na produção de implantes, porém são utilizados para culturas de células em laboratórios, produção de dispositivos de diagnóstico, aparelho extracorporal e muitas outras aplicações. O uso de biomateriais teve seu início através de implantes dentários, porém com os crescentes novos biomateriais, principalmente poliméricos, eles podem ser classificados, de acordo com a Figura 2²⁸.

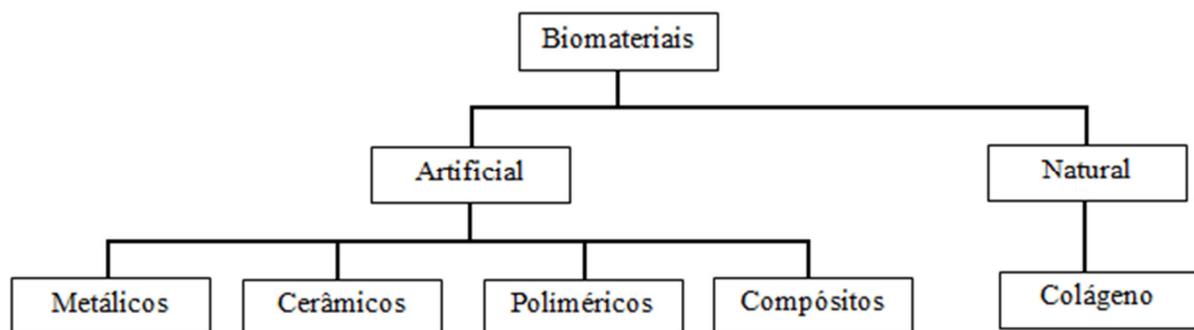


Figura 2. Classificação de Biomateriais. Adaptado de Biomedical²⁸.

Na engenharia de tecidos ósseos um biomaterial com características ideais deve englobar os sinais apropriados para dirigir o processo de osteogênese, ou seja, promover a fixação das células, a proliferação e mineralização da ECM²⁰.

O termo osteocondução significa o crescimento do osso sobre uma superfície que permite seu desenvolvimento tanto na face superior, quanto na inferior através de poros, canais ou tubos²⁹. A forma, a composição e o volume da matriz são essenciais para o domínio de um sistema osteocondutor²⁵.

É importante ressaltar que um material para sistemas osteocondutores deve ter uma ótima taxa de degradação, lenta o suficiente para fornecer um suporte para o crescimento celular, mas não rápido o suficiente para impedir o processo de mineralização¹.

2.3 NANOFIBRAS

As nanofibras são fibras com grande proporção de área superficial por volume ou massa, com uma estrutura porosa, sem limite de comprimento e com ótimas características mecânicas e flexíveis³⁰. Os nanomateriais, em sua morfologia, demonstram melhores interações e adesão com as células, conforme é observado na Figura 3, quando comparado com materiais em outras escalas³¹.

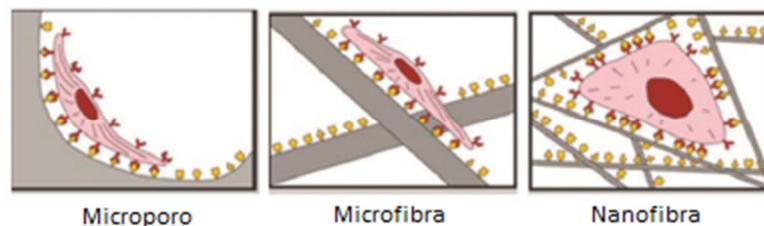


Figura 3. Interação do suporte com a célula. Adaptado de Mitra²¹.

Essa grande área de superfície em relação ao volume fornece aos suportes, grande volume de poros com diferentes tamanhos e são esses poros que facilitam o carregamento de moléculas bioativas e o transporte dos nutrientes e resíduos. As propriedades das nanofibras tornam as mesmas uma importante classe de biomateriais³¹.

2.3.1 Método de fabricação: Eletrofiação

A eletrofiação foi inventada no início do século 20, mas é no final desse século que se viu o aumento dos estudos na fabricação de nanofibras poliméricas utilizando essa técnica³¹. Este método de preparação de nanofibras tem sido altamente útil na construção de suportes para a cultura de células do tecido e do tratamento de tecidos doentes e danificados, incluindo, entre outros, os tecidos ósseos¹⁴.

A técnica da eletrofiação consiste na aplicação de um potencial elétrico a uma solução de polímero armazenada em uma seringa com uma agulha de metal. Quando o campo elétrico é ligado, com um fluxo de corrente pré-determinada, ocorre um aumento da intensidade do campo eletrostático até um valor crítico, onde uma gota é formada na ponta da agulha de forma cônica. Após a formação da gota ocorre a ejeção de um fluxo de líquido carregado, a

evaporação do solvente e a deposição de fibras ultrafinas em um coletor³². Na Figura 4 é possível verificar as partes do equipamento de eletrofição.

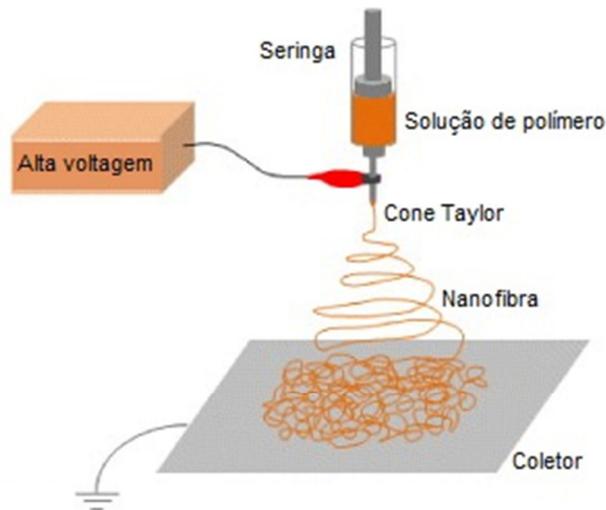


Figura 4. Partes do equipamento de eletrofição. Adaptado de Terada³³.

Para um bom resultado de obtenção de nanofibras fabricadas por eletrofição, muitos parâmetros devem ser levados em consideração, que abrangem as características da solução, como a viscosidade, os parâmetros de processo e as condições do meio ambiente³⁰.

A técnica de eletrofição vem sendo utilizada por alguns pesquisadores, como no preparo de nanofibras de HA e quitosana, sendo que foram obtidas matrizes com diâmetro médio de 214 nm para a matriz HA/quitosana³⁴. Em outro estudo com diâmetro das fibras de 100 nm, um suporte com PVA e quitosana foi preparado por eletrofição¹¹. Também pela técnica da eletrofição, quitosana, PVA e fibroína de seda foram utilizadas para a fabricação de nanofibras de diâmetros de 126 a 643 nm para a regeneração da pele lesionada por feridas³⁵. Novamente a quitosana, agora com a gelatina e o PVA, foram usados na produção de nanofibras de diâmetro médio 150 nm e sua utilização na engenharia de tecidos³⁶. Em outro estudo com PCL e quitosana, suportes foram fabricados por eletrofição para aplicação na engenharia de tecidos. Os diâmetros das menores nanofibras ficaram na faixa de 200 nm³⁷.

2.4 POLI (ÁLCOOL VINÍLICO)

Poli (álcool vinílico) (PVA) é um polímero obtido pela hidrólise do poli (acetato de vinila) com metanol ou etanol. Conforme mostrado na Figura 5, esta reação pode ser catalisada por base, por ser mais rápida e livre de reações laterais³⁸.

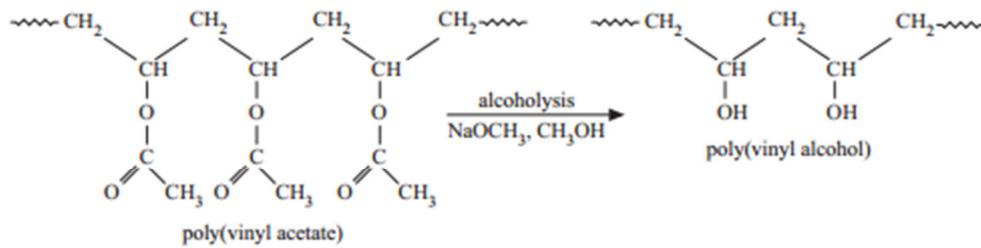


Figura 5. Reação de obtenção do PVA³⁸.

Esse polímero semicristalino e altamente hidrofílico que tem em sua estrutura grupamentos hidroxila (OH) é muito utilizado como um adesivo solúvel em água, com poder de ligação em materiais como o papel. O PVA é adquirido em diferentes formas que são determinadas pelo seu peso molecular e pelo seu grau de hidrólise³⁸.

As propriedades do PVA são excelentes para a formação de nanofibras e ainda para aplicação na engenharia tecidual, pois é atóxico, não cancerígeno, biocompatível, biodegradável, hidrofílico, e possui boas propriedades mecânicas¹⁰.

2.4.1 Reticulação do Poli (Álcool Vinílico)

O PVA por ser solúvel em água é um material de fácil manuseio, porém essa característica pode ser uma limitação. A fim de ser útil em aplicações médicas e farmacêuticas, a estabilidade do PVA deve ser controlada em meios aquosos por reticulação química ou fisicamente³⁹.

A reticulação consiste em ligações covalentes cruzadas de polímeros lineares, sem as quais o polímero se deformaria permanentemente. Um exemplo comum é a borracha que escoia como um líquido extremamente viscoso à temperatura ambiente, caso não haja reticulação. A exemplo do que acontece no polímero em rede, a estrutura torna-se mais rígida à medida que aumenta a quantidade de reticulação⁴⁰. A Figura 6 ilustra os tipos de cadeias poliméricas.

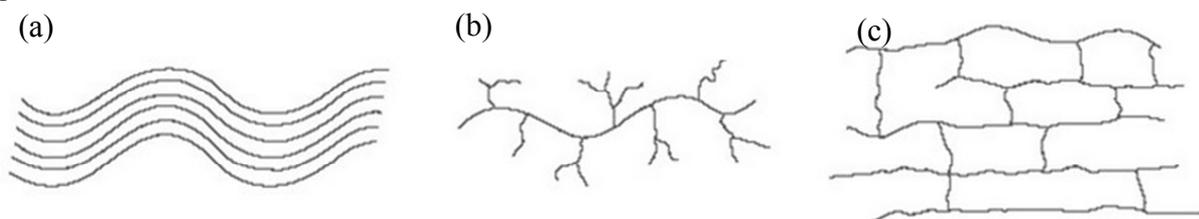


Figura 6. Cadeias poliméricas; (a) lineares, (b) ramificadas e (c) reticuladas.

Várias formas de reticulação utilizando o PVA na forma de hidrogel já foram registradas, dentre estas: irradiação, congelamento, tratamento com metanol e reticulação química⁹.

Como exemplo da reticulação química, o glutaraldeído já foi utilizado como agente reticulante do PVA, conforme mostrado no esquema da Figura 7. Quando adicionado na solução do polímero este reagente pode provocar um aumento na viscosidade da solução, sendo uma característica não desejada para eletrofiação. Além disso, esse reticulante é tóxico o que não é admitido na engenharia de tecido⁴¹.

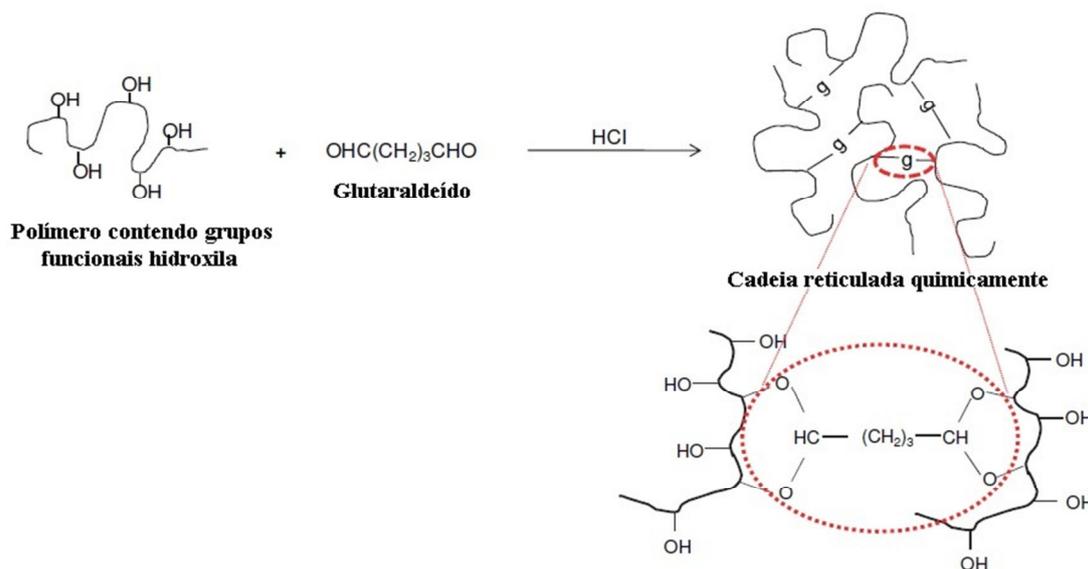


Figura 7. Reticulação de polímero contendo grupos hidroxilas com glutaraldeído em meio ácido⁴².

O uso do BTCA (ácido 1,2,3,4 butanotetracarboxílico) (Figura 8), como agente reticulante do PVA é uma alternativa interessante. O BTCA é atóxico e possui quatro grupamentos de ácido carboxílico, os quais podem contribuir para formar ligação éster quando combinado com grupos hidroxila, no caso do PVA. A reação de esterificação pode ser acelerada pela adição de um catalisador, que pode ser um sal de ácido fraco e finalizado por um tratamento de calor⁹.

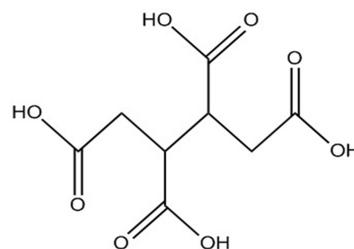


Figura 8. Estrutura do BTCA.

Estudos apontam o BTCA como um agente reticulante em algodão, se tornando uma boa opção para tal aplicação⁴³⁻⁴⁴⁻⁴⁵. Recentemente o BTCA foi utilizado para reticulação do PVA, com a técnica de eletrofiação, porém sem algum objetivo de aplicação⁹.

2.5 POLI (ÁCIDO ACRÍLICO)

O poli (ácido acrílico) (Figura 9) é um polímero com grupamentos carboxílicos em sua estrutura⁴⁶.

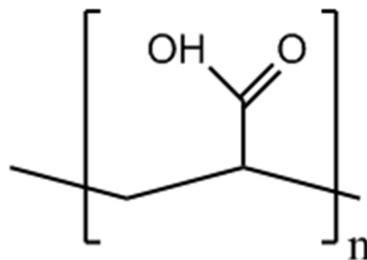


Figura 9. Estrutura do PAA.

O PAA é solúvel em água e pode ser utilizado na indústria como dispersante, espessante e polímero superabsorvente. Na forma reticulado esse polímero absorve uma grande quantidade de água sendo utilizado no controle de umidade e em fraldas de bebês⁴⁷⁻⁴⁸. O PAA é biodegradável e estudos recentes apontam que também é antimicrobiano⁴⁹⁻⁵⁰.

Esse polímero semicristalino, que pode ser chamado de aditivo, interage como doador de prótons para os íons na solução através dos grupos carboxílicos de sua estrutura. O PAA possui propriedades que quando empregado na engenharia de tecidos ósseos passa a atuar como um nucleador para o cálcio, uma das características mais relevantes para a escolha desse polímero¹².

Quando comparada a membranas sem a presença de PAA, um estudo mostrou que a calcificação foi mais intensa em amostras tratadas com o polímero¹². O PAA também foi utilizado para acelerar a nucleação de cristais de carbonato de cálcio em uma membrana de quitosana, onde se mostrou mais eficiente quando utilizado esse aditivo⁵¹.

2.6 PVA/PAA

O PVA com o PAA é uma blenda típica em que a miscibilidade em nível molecular é obtida por fortes interações de ligação de hidrogênio interpolímero entre o grupo hidroxila do

PVA e o grupo carboxila de PAA, por isso a fase cristalina de PVA pode ser completamente destruída quando a razão molar de álcool vinílico é igual ou menor do que a do ácido acrílico na mistura⁵².

Espera-se que a contribuição do PAA seja, também, a de fortalecer a mistura PVA/PAA, já que o PVA tem propriedades de um polímero mais elástico. Em dois estudos ficou comprovado que o aumento da concentração do PAA ao PVA diminui o módulo de Young⁵³⁻⁵⁴.

Um estudo já foi realizado com o sistema PVA/PAA em que por ligação de hidrogênio via interações interpolímeros, obteve-se a reticulação pela reação de esterificação ativada por aquecimento¹³. PVA/PAA também foi pesquisado para aplicação em hidrogéis⁵⁵.

2.7 HIDROXIAPATITA

A hidroxiapatita (HA), Figura 10, é uma cerâmica de fosfato de cálcio de composição $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ com uma relação de cálcio para fósforo de 5/3. Ela possui boas propriedades mecânicas e uma excelente biocompatibilidade. Como já comentado anteriormente, a HA é muito parecida ao constituinte mineral do osso⁵⁶.

Os cientistas de biomateriais têm estudado a HA por ser quimicamente e estruturalmente semelhante ao componente do osso e por possuir duas características muito importantes nessa área que é a bioatividade e osteocondutividade. Sua aplicação já é comprovada como um biomaterial⁵⁷.

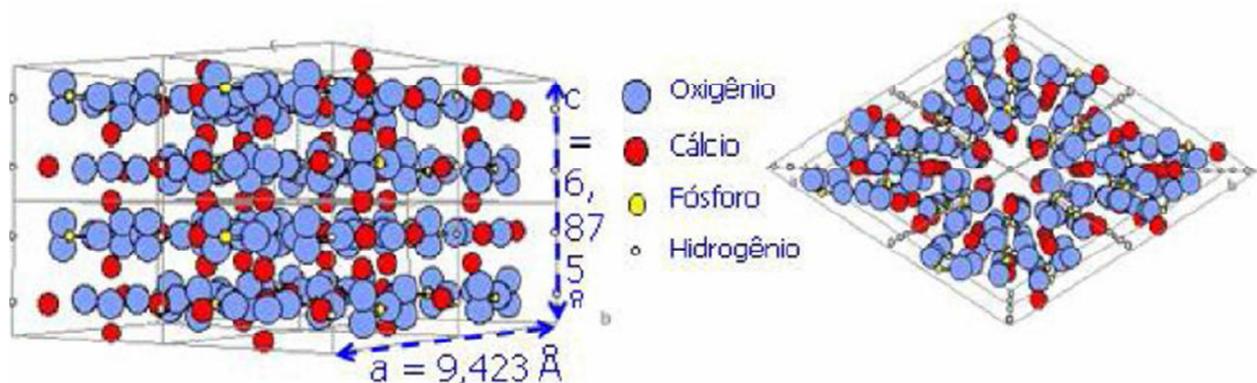


Figura 10. Estrutura da HA⁵⁸.

A tendência dos cristais de HA é de se depositarem nas nanofibras formadas, conforme representado na Figura 11⁵⁹.

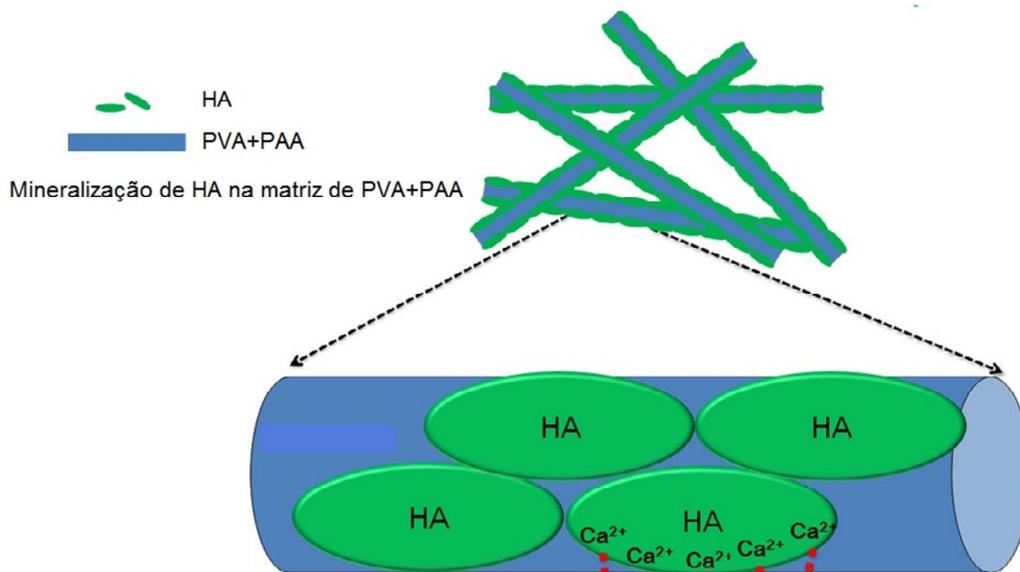


Figura 11. Esquema representando a deposição da HA na nanofibra. Adaptado de Li⁵⁹.

Estudos realizados com o PVA e a HA, comprovaram que a HA tem forma de haste em nanoescala e se distribui na nanofibra de PVA, de uma forma alinhada no sentido da fibra e que esta orientação se assemelha à orientação dos cristais de HA na ECM mineralizado⁸. Além disso, a superfície áspera provocada pela HA pode proporcionar locais de ancoragem para a adesão das células durante a regeneração do tecido⁶.

Estudos comprovam que a adição da HA em um suporte para a engenharia de tecido ósseo aumenta o potencial de diferenciação osteogênica⁶⁰. Em outro estudo as nanofibras contendo nanocristais de apatita demonstraram melhor comportamento de células osteoblásticas, especialmente nas fases de diferenciação funcional e mineralização¹⁴.

2.8 MINERALIZAÇÃO

Alguns estudos mostram como acontece a mineralização da HA e a interação e função do PAA neste processo^{16, 61}.

A Figura 12 representa um esquema proposto da nucleação de cristais de fosfato de cálcio. Basicamente a nanopartícula da matriz de PVA/PAA está rodeada de grupos carboxilatos (COO⁻), provenientes do PAA e ancoradas à superfície do PVA, que por interação eletrostática atrai os íons de cálcio Ca²⁺, resultante da HA. Os grupamentos fosfato (PO₄⁻), também da HA, interagem eletrostaticamente se agregando à superfície. Assim, a superfície fica totalmente coberta de uma camada de fosfato de cálcio e, então ocorre a cristalização secundária de CaP no topo de locais de nucleação inicial. Os grupos carboxilato

das moléculas do PAA tem sua disposição sobre a matriz orientada pela estrutura dos grupos hidroxila (OH) do PVA^{16, 62}.

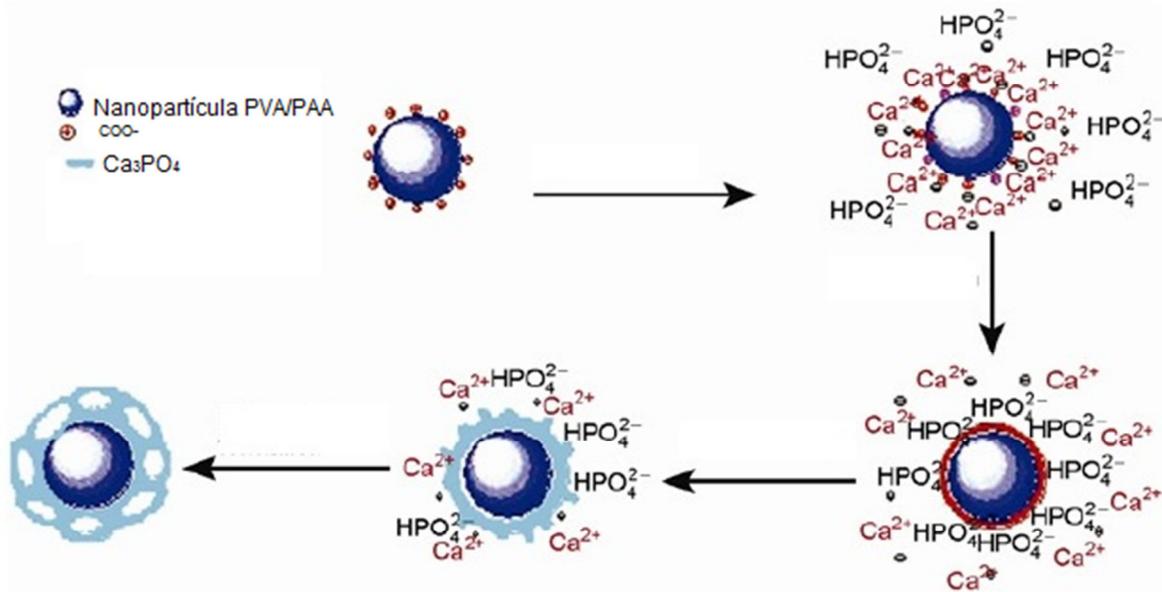


Figura 12. Esquema da mineralização. Adaptado de Chen⁶².

2.9 ENGENHARIA DO TECIDO OSSEO

Para o desenvolvimento de suportes para a engenharia de tecidos do osso existem alguns requisitos necessários aos materiais de escolha, como serem porosos, biocompatíveis e permitirem a adesão de células. Esse suporte deve facilitar a troca de nutrientes no seu interior através de uma estrutura de rede interconectada de poros para o crescimento celular¹⁶. Uma superfície porosa é essencial para a formação do tecido. Os poros permitem transporte de oxigênio, migração, proliferação das células e a vascularização, além disso, proporcionam uma maior estabilidade mecânica⁶³.

A biodegradabilidade é uma característica muito importante, pois se espera que o suporte seja absorvido sem a necessidade de cirurgias para removê-lo. A degradação deve ocorrer na mesma velocidade de formação do tecido, pois enquanto as células estão trabalhando o suporte deve ser capaz de proporcionar uma integridade estrutural e, gradativamente, permitir que o novo tecido assumira a carga mecânica²⁰.

Já a biocompatibilidade, outra propriedade fundamental, está associada à química da superfície do material que irá interferir na adsorção de moléculas biológicas que irão regular as atividades celulares como a adesão e migração⁶³.

De um modo geral a engenharia de tecidos é uma área de pesquisa que traz otimismo para tratamento de várias doenças. Como uma área em crescimento para a medicina regenerativa, apresenta alternativas para o transplante de tecidos e órgãos, a qual busca aliviar a dor dos pacientes⁶⁴.

Entre os materiais usados para construção óssea estão polímeros sintéticos como PCL e PLLA e sua combinação com polímeros naturais tais como o colágeno e a fibroína de seda²⁶. Outro exemplo em regeneração óssea foi a utilização de HA contendo quitosana reticulada com genipina, este material foi utilizado para formar nanofibras, especificamente para reconstrução do crânio e maxilar facial¹⁷.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de um biomaterial constituído de PVA/PAA contendo a HA visando a utilização para a regeneração tecidual.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desenvolver nanofibras poliméricas a partir de PVA/PAA com incorporação de HA;
Encontrar as melhores condições de processamento para a fabricação de nanofibras pelo método de eletrospinning;

Realizar a reação de reticulação do PVA com BTCA para uma matriz PVA/PAA/HA;

Investigar a eficiência do processo de reticulação através da espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier;

Avaliar a influência da reticulação na superfície das nanofibras através da análise de superfície com medidas de ângulo de contato com a água;

Investigar a morfologia das nanofibras formadas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV);

Acompanhar a estabilidade das nanofibras e sua morfologia após um período imersas em água, através de microscopia eletrônica de varredura (MEV);

Avaliar a presença da hidroxiapatita na matriz e a forma de deposição pelo técnica de microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV-FEG).

Estudar a estabilidade térmica das nanofibras poliméricas através de análises de termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC);

Investigar as propriedades mecânicas das nanofibras por meio do ensaio de tração comparando com as propriedades mecânicas do osso humano;

Entender o comportamento das matrizes fabricadas através do ensaio biológico para a viabilidade celular (MTS).

4. PARTE EXPERIMENTAL

A parte experimental está dividida em três etapas sendo que primeiramente serão apresentados os materiais utilizados para obtenção das nanofibras, posteriormente será mostrado o método para a preparação e obtenção das matrizes e, então, serão descritas todas as técnicas de caracterização aplicadas ao estudo.

4.1 MATERIAIS

Para a realização deste trabalho foram utilizados os seguintes materiais: poli(álcool vinílico) de massa molar (M_w) de aproximadamente 146.000 a 186.000 g/mol e 99% hidrolisado, poli(ácido acrílico) (PAA) (M_w : 450.000 g/mol), ácido butano 1,2,3,4,-tetracarboxílico (BTCA) de massa molar de 234,16 g/mol, hipofosfito monohidratado ($M_w = 105,99$ g/mol) e hidroxiapatita ($M_w = 502,31$ g/mol). Os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich. O álcool etílico (95 % PA) foi adquirido da empresa Nuclear.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparação das soluções e matrizes poliméricas

PVA foi dissolvido em água destilada sob agitação magnética a temperatura ambiente durante 24 h para se preparar uma solução a 6 % m/m. O PAA foi diluído em etanol (6 % m/m) e deixado sob agitação à temperatura ambiente durante 24 h. Após o período de agitação das soluções, prosseguiu-se com a reação de reticulação do PVA, adicionando-se BTCA diretamente à solução com o Hipofosfito de sódio monohidratado, na razão de 2:1 (m/m), seguido por agitação por 15 minutos. Para investigar o efeito da concentração do agente de reticulação na reação foram escolhidas as concentrações de 2 e 6 % de BTCA (m/m). Em seguida, as soluções de PVA reticulado e PAA foram misturadas na proporção 1:1. A mistura resultante foi agitada à temperatura ambiente por 30 min.

Para estudar o efeito de diferentes concentrações de HA, 10 e 15 % (m/m) foram adicionados à solução PVA/PAA 6 %.

Na Tabela 1, encontram-se descritas todas as variações das matrizes estudadas e sua respectiva nomenclatura.

Tabela 1. Nomenclatura utilizada no trabalho.

MATRIZ	NOMENCLATURA
--------	--------------

PVA 100 %	PVA
PAA 100 %	PAA
PVA/PAA 50/50 % (m/m)	PVA.PAA
PVA 2% BTCA / PAA 50/50 % (m/m)	PVA.PAA 2 BTCA
PVA 6% BTCA / PAA 50/50 % (m/m)	PVA.PAA 6 BTCA
PVA 2% BTCA / PAA 50/50 % (m/m) 10 % HA	PVA.PAA 2 BTCA 10 HA
PVA 6% BTCA / PAA 50/50 % (m/m) 10 % HA	PVA.PAA 6 BTCA 10 HA
PVA 2% BTCA / PAA 50/50 % (m/m) 15 % HA	PVA.PAA 2 BTCA 15 HA
PVA 6% BTCA / PAA 50/50 % (m/m) 15 % HA	PVA.PAA 6 BTCA 15 HA

4.2.2 Eletrofiação

Depois de homogeneizadas, as soluções foram colocadas em uma agulha de 1 mL para a eletrofiação. Foi aplicada uma voltagem de 25 kV com uma distância de 15 cm entre a agulha e o coletor de alumínio. A taxa de alimentação foi entre 21 a 58 mm/h, de acordo com a solução empregada. As nanofibras formadas foram destacadas do coletor de alumínio e então levadas para a estufa a 180 °C por 4 min para permitir a efetividade da reação de esterificação. Um esquema da metodologia aplicada pode ser observado na Figura 13.

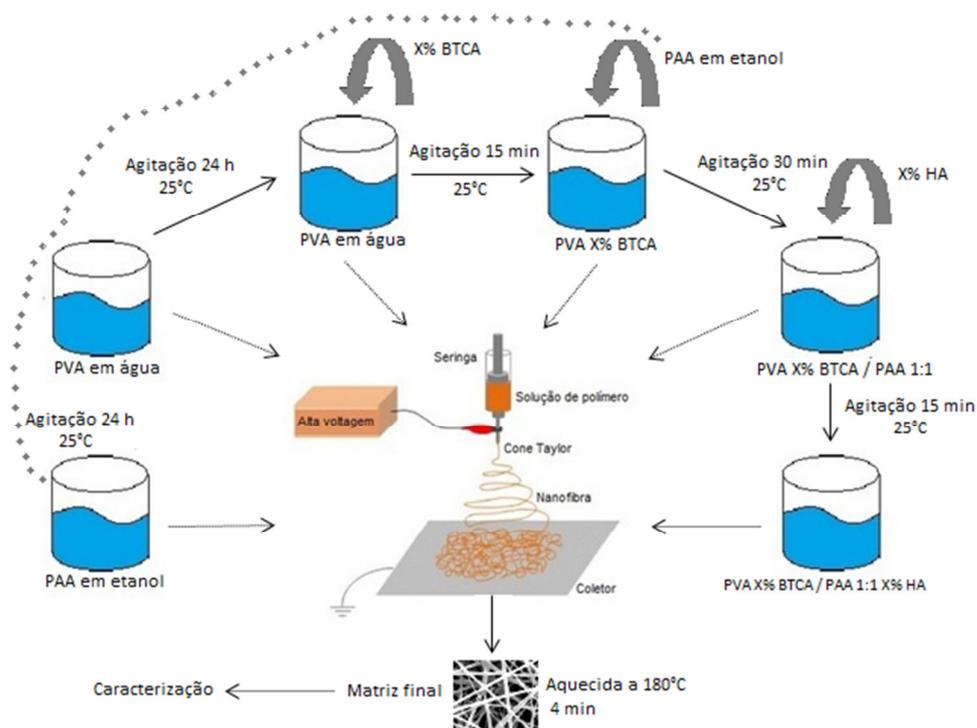


Figura 13. Esquema da metodologia empregada para construção das matrizes poliméricas.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS MATRIZES

As técnicas aplicadas para a caracterização das matrizes foram realizadas, em sua maioria, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O ensaio de viabilidade celular foi

realizado na Universidade Nacional de Singapura (NUS) e o ensaio de microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo em Universidade de Caxias do Sul.

Para melhor compreensão das caracterizações realizadas nas matrizes e polímeros, a Tabela 2 ilustra as técnicas empregadas neste trabalho.

Tabela 2. Caracterizações realizadas para cada matriz.

MATRIZ	Solubilidade	FTIR-ATR	MEV	DSC	TG	Tração	WCA	Viscosidade	MTS	FEG-MEV
PVA	X	X	X	X	X	X	X	X		
PVA 2 BTCA	X	X								
PVA 6 BTCA	X	X								
PAA	X	X	X	X	X	X	X	X		
PVA.PAA	X	X	X	X	X	X	X	X		
PVA.PAA 2 BTCA	X	X	X	X	X	X	X	X		
PVA.PAA 6 BTCA	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
PVA.PAA 2 BTCA 10 HA	X	X	X	X	X	X	X	X		
PVA.PAA 6 BTCA 10 HA	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
PVA.PAA 2 BTCA 15 HA	X	X	X	X	X	X	X	X		
PVA.PAA 6 BTCA 15 HA	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

4.3.1 Solubilidade

Inicialmente as amostras foram testadas quanto a sua solubilidade. O objetivo foi verificar sua estabilidade em água. Para isso foi retirado um pedaço da amostra e colocada em um Becker com água destilada, a temperatura ambiente por 48 horas. Após esse período, a amostra era removida e transferida para um vidro relógio que permanecia a temperatura ambiente até sua secagem. Esse procedimento foi realizado antes e após a matriz permanecer em estufa a 180 °C por 4 minutos.

4.3.2 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR-ATR)

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho baseia-se na absorção de frequências de radiação na região vibracional do infravermelho que inclui comprimentos de onda (λ) entre 2,5 μm e 25 μm . A unidade utilizada para se referir à radiação na região do infravermelho vibracional do espectro eletromagnético é chamada número de onda ($\bar{\nu}$), que é expresso em centímetros recíprocos (cm^{-1}). O número de onda é diretamente proporcional à energia, assim, o infravermelho vibracional vai de 4000 a 400 cm^{-1} . Transformada de Fourier (FT) é uma operação matemática que pode separar as frequências das absorções individuais,

obtendo-se um interferograma em menos de um segundo, sendo possível obter dezenas de leituras que quando somadas obtêm-se um espectro com uma razão melhor sinal/ruído. O preparo não destrutivo da amostra por Refletância Total Atenuada (ATR) é uma técnica de contato utilizada para análise de polímeros, onde se utiliza um cristal com alto índice de refração (superior a da amostra) e baixa absorção na região do infravermelho⁶⁵.

Para a realização destas análises foi utilizado o equipamento marca Bruker Alpha. As medidas foram realizadas na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras no modo de Refletância Total Atenuada (ATR), com cristal de Seleneto de Zinco. Todas as amostras permaneceram em estufa à vácuo por 24 horas na temperatura ambiente, antes de serem analisadas no FTIR-ATR. As análises foram realizadas também nas amostras submetidas ao ensaio de solubilidade, ou seja, após a imersão em água por 48 horas. O equipamento está localizado no Laboratório de Multiusuário de Análise Térmica (LAMAT), do Instituto de Química da UFRGS.

4.3.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura é um método de imagem de superfícies para caracterização da morfologia de amostras sólidas, utilizando uma alta resolução quanto à ampliação e profundidade do campo de até 100.000 vezes quando comparado à microscopia a luz visível. O modo de imagem por elétrons secundários fornece as imagens da morfologia da superfície em que a variação da intensidade da interação dos elétrons da amostra e dos elétrons incidentes cria o contraste que revela a imagem da superfície⁶⁶.

Para visualizar a morfologia das matrizes obtidas pelo método da eletrofição, foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura. As matrizes foram metalizadas com ouro e as micrografias foram obtidas no modo SEI (imagem por elétrons secundários) utilizando um microscópio JEOL JSM 6060. O potencial de aceleração do feixe foi mantido constante no valor de 10 kV. O equipamento encontra-se no Centro de Microscopia Eletrônica desta Universidade. Os diâmetros das nanofibras a partir das micrografias foram analisados utilizando o software de análise de imagem (Image J, National Institutes of Health, EUA). Foram realizadas 100 medidas para cada imagem.

4.3.4 Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FEG-MEV)

Em geral a resolução do MEV está determinada pelo diâmetro do feixe de elétrons, quanto menor seja este, maior a resolução alcançada, sendo limitante o valor teórico imposto pelas lentes objetivas e o fato de que à medida que se diminui o diâmetro do feixe, diminui-se simultaneamente a corrente, produzindo imagens com ruído muito alto. Este último problema é resolvido com o uso de canhões de elétrons por emissão de campo (FEG - “*Field Emission Gun*”) que produzem um feixe de alta corrente e com diâmetros de 5-10 nm. Consequentemente, a combinação de um canhão de elétrons por emissão de campo com uma lente objetiva de maior desempenho proporciona o estudo de superfícies com uma resolução extremamente alta. Essa técnica permite realizar um corte ortogonal de superfícies, para uma observação em 3D. Pode ser realizada a análise quantitativa no MEV utilizando um espectrofotômetro por dispersão de energia de raios-X (EDS). O EDS é a microanálise química que detecta raios-X emitido da amostra durante o bombardeio de um feixe de elétrons para caracterizar a composição elementar do analisado⁶⁶⁻⁶⁷.

Um microscópio eletrônico de varredura de emissão de campo foi utilizado para investigar a morfologia da matriz com a Hidroxiapatita. A matriz foi metalizada com ouro e as micrografias foram obtidas no modo SEI (imagem por elétrons secundários) utilizando um microscópio FEG-SEM MIRA III, da TESCAN. O potencial de aceleração do feixe foi mantido constante no valor de 15 kV. O equipamento encontra-se na Universidade de Caxias do Sul.

4.3.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Na análise de DSC, o fluxo de calor é medido em uma amostra em função da temperatura e do tempo. A amostra é colocada em um recipiente de alumínio que é aquecido de forma controlada, assim como um material de referência, geralmente um recipiente de alumínio vazio. O DSC é particularmente utilizado para investigar os pontos de fusão e cristalização e a temperatura de transição vítrea do material estudado⁶⁶.

As medidas de DSC foram realizadas em um equipamento DSC Q2000 TA Instruments, utilizando atmosfera de nitrogênio. Para a realização das análises foram utilizadas em torno de $2,0 \pm 1,0$ mg de amostra. Elas foram aquecidas da temperatura ambiente até 130-200 °C, conforme a amostra, com isoterma de cinco minutos. As amostras foram então resfriadas até 0 °C e aquecidas novamente até 200 °C. As análises foram conduzidas a uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹. O equipamento está localizado no Laboratório de Multiusuário de Análise Térmica (LAMAT), do Instituto de Química da UFRGS.

4.3.6 Termogravimetria (TG)

Um material é submetido à análise termogravimétrica (TG) para medir continuamente a perda de massa em função da temperatura e do tempo. As alterações de peso são medidas ao colocar a amostra em um pequeno recipiente ligado a uma microbalança e aquecida de maneira controlada por um tempo especificado. A perda ou a mudança de peso durante um determinado tempo ou temperatura são correlacionadas com as propriedades de estabilidade térmica, a volatilização de componentes da amostra, umidade ou conteúdo de solvente, temperaturas de oxidação/redução ou de decomposição⁶⁶.

Para análise de termogravimetria utilizou-se um equipamento SDT Q600, utilizando atmosfera de nitrogênio. Para a realização das análises foram utilizadas em torno de 10,0 mg de amostra. Elas foram aquecidas 10 °C (equilíbrio de 5 min) até 600 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹. O equipamento está localizado no Laboratório de Multiusuário de Análise Térmica (LAMAT), do Instituto de Química da UFRGS.

4.3.7 Ensaio de tração

O ensaio de tração foi realizado para avaliar o comportamento mecânico da matriz formada, investigando os seguintes parâmetros: a tensão máxima na ruptura (σ), que é a razão entre a carga ou força de tração (F) e a área da seção transversal inicial do corpo de prova (A_0) expresso em MPa (Megapascal); a Elongação percentual (ΔL) que é o incremento da distância entre marcas a um determinado estágio de extensão (L) quando comparado ao comprimento original (L_0), expresso em percentual (%); e o Módulo de elasticidade ou Módulo de Young (E) que é a razão entre a tensão de tração nominal (σ) e a deformação correspondente (ϵ), abaixo do limite de proporcionalidade, expressa em MPa⁶⁷.

Esse ensaio foi feito através da análise dinâmico-mecânica (DMA) utilizando um equipamento T.A. Instruments modelo QA800 operando em modo “*single cantilever*”. As amostras foram recortadas em forma de retângulo e mantidas a temperatura ambiente no momento da análise. O equipamento para essa análise fica localizado no Laboratório da UFRGS.

4.3.8 Ângulo de contato com a água (WCA)

O formato que uma gota de líquido assume em contato com uma superfície sólida depende do ângulo θ que a gota de líquido faz com a superfície sólida. O líquido molhará completamente a superfície quando o ângulo for igual a 0° , pois a nova superfície criada possui energia de superfície γ menor do que a superfície original sólido-vapor (SV) (isto é, $\gamma_{SV} > \gamma_{SL} + \gamma_{VL}$). No outro extremo, a ausência completa de molhamento ocorre quando o ângulo for igual a 180° e o molhamento parcial existe no intervalo de ângulos de contato compreendidos entre 0° e 90° . Quando a interação entre as moléculas do líquido com a interface sólida é maior do que a interação das moléculas entre si, ocorre o molhamento por um líquido em uma superfície sólida. De modo geral, as energias são menores do que as correspondentes e porque numa interface Sólido-Líquido (SL) quase todas as ligações atômicas e moleculares são completadas. O ângulo de contato trará o dado de molhabilidade, o quanto hidrofílico ou hidrofóbico é o material, através do ângulo formado por uma gota de água na superfície do material⁴⁰.

Para o ensaio de ângulo de contato com a água foi utilizado um equipamento da Krüss modelo DSA30, em que uma gota de água deionizada foi depositada na superfície das amostras, enquanto que a imagem era capturada por uma câmera. O ângulo de contato para todas as amostras foi medido imediatamente após o processo de deposição da água na matriz. Foi obtido um valor médio de 5 pontos de cada gota calculada de três medidas de cada amostra, obtidas a partir do software SurfTens 3.0.

4.3.9 Viscosidade da solução

A viscosidade foi investigada por estar relacionada diretamente ao diâmetro da nanofibra e parâmetros de eletrofiação¹⁶.

Os testes de viscosidade foram realizados em um viscosímetro digital DV-II+ PRO (Brookfield). A temperatura de trabalho foi de 25°C , a faixa de torque variou para cada amostra e teve média de 71%, o modelo da ponteira utilizada é SC4-18 e foram realizadas uma média de 10 medidas.

4.3.10 Viabilidade celular (MTS)

O MTS 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio foi aplicado para verificação da viabilidade celular. O MTS é um método de quantificação colorimétrico para a quantificação sensível de células viáveis em proliferação e

análise de citotoxicidade. O método baseia-se na redução de MTS composto de tetrazólio por células viáveis para gerar um produto colorido de formazano que é solúvel em meio de cultura celular. O corante formazano produzido por células viáveis pode ser quantificado por medição da absorvância a 490 nm. Geralmente o MTS é reduzido de amarelo para púrpura em células vivas. Os produtos de degradação do polímero pode exercer um efeito tóxico nas células provocando uma redução do número de células viáveis refletindo na diminuição da quantidade de formazano formado, principalmente nas 120 horas de cultura⁶⁸.

As amostras em um corpo de prova de 8 mm de diâmetro foram colocadas numa placa de 96 poços e esterilizadas com luz UV por 30 minutos, em seguida, as células tronco de polpa dentária foram semeadas sobre as fibras (4000) por poço e cultivadas em DMEM suplementado com 10% SFB. Após os períodos de 24, 72 e 120 horas foram adicionados em cada poço 100 uL de uma solução de MTS. Depois de 3 horas na estufa, alíquotas de 200 uL foram recolhidas e vertidas em novas placas de 96 poços de cultura de células, de modo a medir a absorvância a 490 nm. Os dados apresentados são as médias calculadas a partir de três amostras. A significância das diferenças foi avaliada através da análise de variância de uma via (ANOVA). Os resultados foram considerados significantes quando $p < 0,05$. Nas mesmas condições foi realizado teste ao controle de penicilina/estreptomicina (PS) a fim de comparação com as amostras. Os ensaios foram realizados na Universidade de Singapura (*National University of Singapore*).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 TESTES PRELIMINARES E SOLUBILIDADE

Inicialmente foram testadas proporções 30/70, 40/60, 60/40, 70/30 m/m de PVA/PAA, porém nenhuma dessas matrizes obteve resultado satisfatório para dar continuidade ao estudo, pois todas elas se desfaziam em água. A concentração de 6 % m/m para o PVA e PAA estabelecida, foi baseada em dados da literatura e testes realizados. A escolha do solvente para o PVA foi baseado na literatura, já o PAA foi testado em água e álcool, sendo que a utilização do álcool como solvente do PAA tornou a solução melhor com maior uniformidade das fibras no processo de eletrofiação. Foram preparados soluções 8, 10 e 12 % m/m tanto de PVA como de PAA, porém o aumento da concentração dificultava o manuseio no método de preparação das nanofibras. Por fim, conforme o teste da Figura 14, em que foi verificado que 2 % m/m de BTCA em relação ao PVA causava o efeito da reticulação esperada foi utilizada essa taxa mínima. A título de comparação foi estudada também a proporção 6% m/m de BTCA em relação ao PVA.

Foram realizados testes preliminares, onde as matrizes formadas foram imersas em água, antes e após terem sido armazenadas em estufa à 180 °C. Os ensaios comprovaram que as matrizes PVA/PAA 50/50 com a concentração de 2 % BTCA depois dos 4 minutos em estufa, mantinham-se íntegras após imersão em água. Na Figura 14 é possível verificar todas as etapas desse processo para a matriz PVA.PAA 2 BTCA.

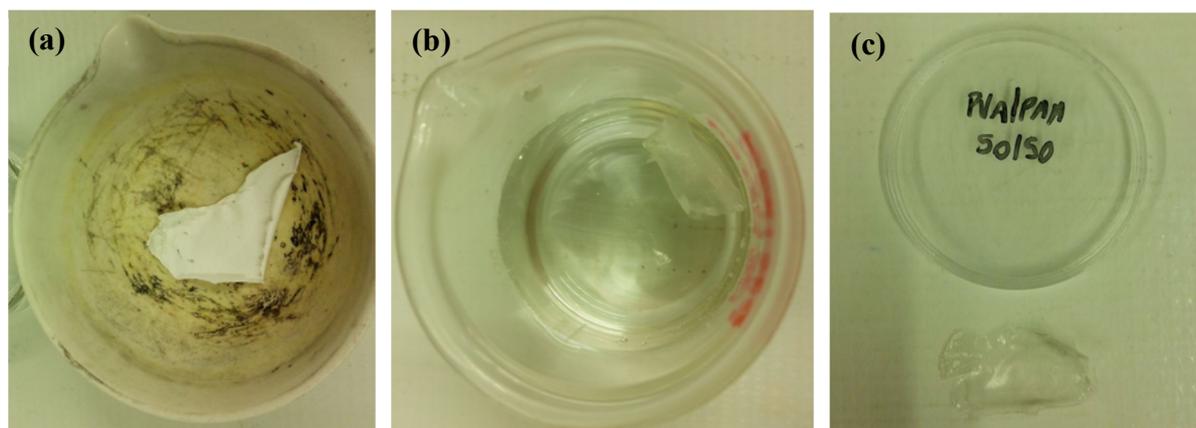


Figura 14. Matriz de nanofibras formada de PVA.PAA 2 BTCA: (a) Após ser retirada da estufa, (b) Mergulhada em água, (c) Após 48 h mergulhada em água.

As amostras imersas e secas foram investigadas por espectroscopia de infravermelho (FTIR-ATR) para verificar a possível reação de reticulação, conforme explicado no item 5.2.

O aspecto visual da matriz antes de imergir em água, Figura 14(a), é de um filme de coloração branca e opaca. Após um tempo submerso em água, observa-se um filme transparente, Figura 14(c). A fim de investigar a morfologia destas amostras e sua integridade física após imersão em água, foi realizada análise de microscopia eletrônica de varredura, conforme o item 5.3.

5.2 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

5.2.1 Reticulação do PVA com BTCA

O teste de solubilidade, conforme descrito em 5.1, realizado para as matrizes com somente o PVA e BTCA, demonstrou que elas se dissolveram em água. A Figura 15 apresenta os espectros dessas matrizes solúveis em água, antes e depois de serem armazenadas na estufa e comparadas ao PVA sem a adição do BTCA.

Na análise do FTIR-ATR, percebe-se que há um pequeno aumento de intensidade do pico em 1142 cm^{-1} , que no PVA puro esta banda é pouco percebida. A banda se justifica pela possível reação de esterificação que acontece entre os grupos hidroxila (OH) do PVA com os grupos carboxílicos (COOH) do BTCA, pois a região compreendida entre 1253 a 1025 cm^{-1} é caracterizada pela vibração de estiramento do C-O do éster⁶⁵.

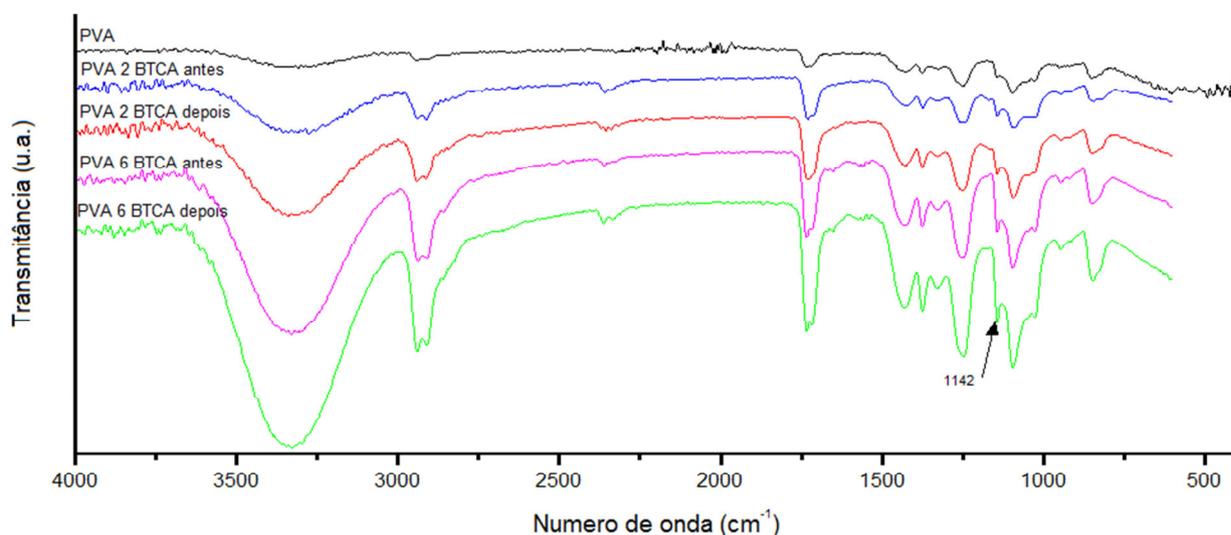


Figura 15. Espectro de FTIR-ATR para as nanofibras poliméricas de PVA com e sem a adição do BTCA. A seta indica o estiramento C-O do éster.

Esperava-se que a ligação de éster característica também fosse evidenciada na região entre 1730 - 1750 cm^{-1} , porém a mesma pode estar deslocada e sobreposta pela banda de

estiramento da carbonila, na região de 1710 cm^{-1} . A evidência do pico da carbonila indica a presença de BTCA nas matrizes de 2 e 6 % BTCA e o aumento de intensidade comprova a maior concentração de BTCA no meio, proveniente do grupo carboxílico. Outra observação é o aumento de intensidade e alargamento da banda OH compreendida na região entre $3300\text{-}3380\text{ cm}^{-1}$ no espectro da Figura 15. Esse comportamento é quando há o aumento da concentração do BTCA que pode ser um comportamento de ligações de hidrogênio.

A Figura 16 mostra a reação esperada para o PVA e o BTCA. No entanto, não é possível comprovar a reação de esterificação.

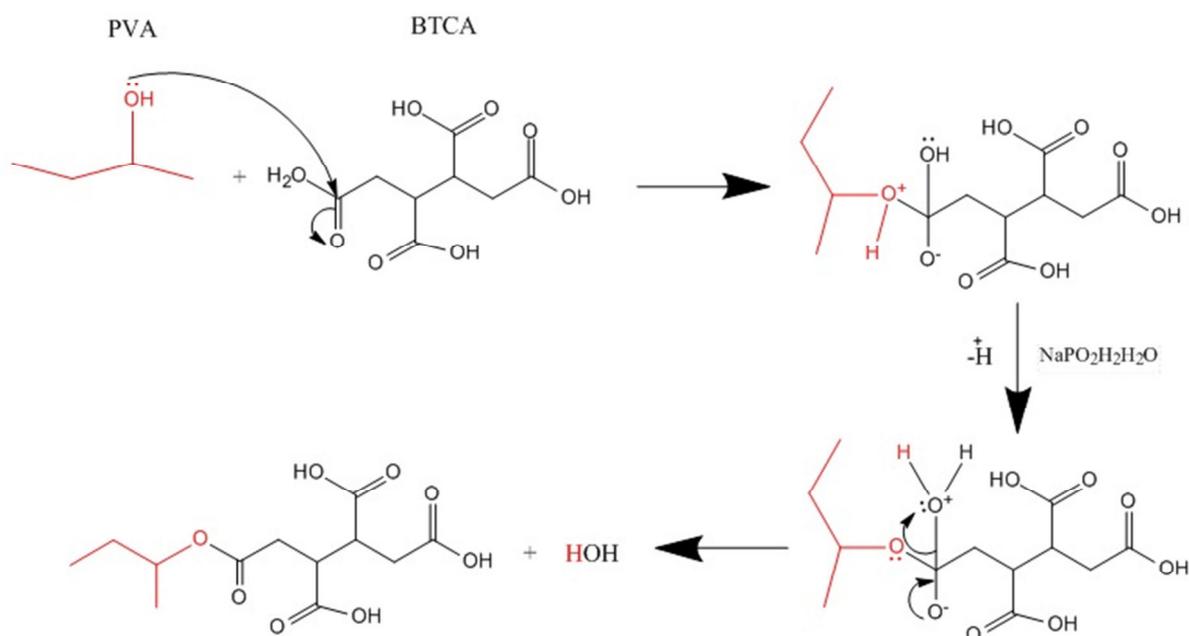


Figura 16. Reação de esterificação esperada entre o PVA e o BTCA

Na reação mostrada pela Figura 16, o grupo hidroxila (-OH) do ácido carboxílico do BTCA se une ao hidrogênio do álcool do PVA e forma o éster e água.

5.2.2 Adição do PAA

A estabilidade da amostra comprovada no teste preliminar (item 5.1), quando se tem a adição do BTCA à matriz PAA.PVA, pode ser discutida a partir dos espectros da Figura 17.

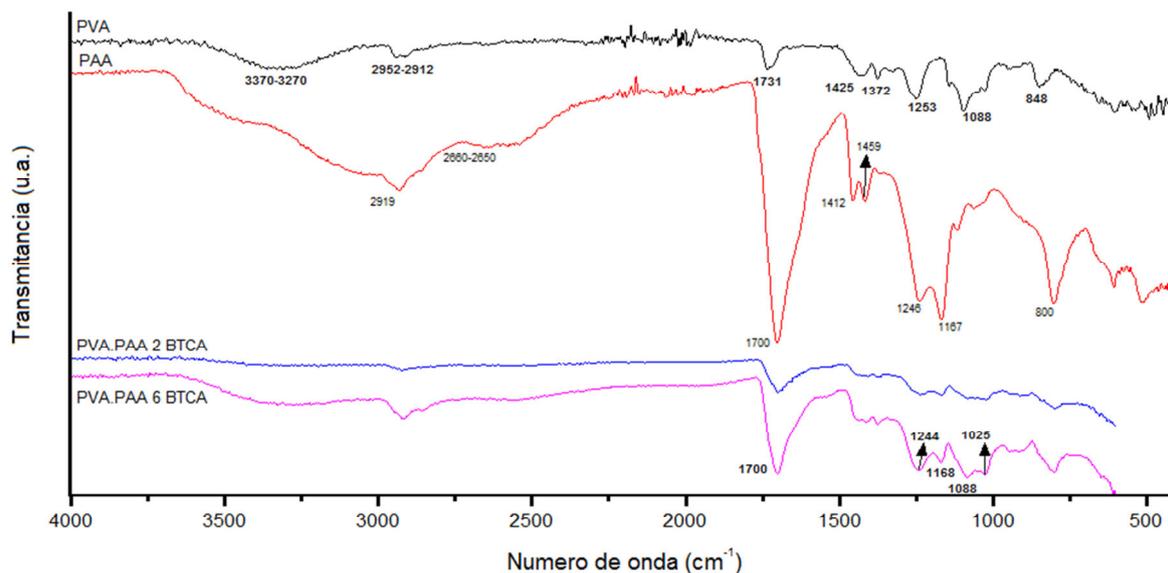


Figura 17. Espectro de FTIR-ATR para as nanofibras de PAA.PVA com e sem a adição de BTCA.

Na análise do espectro da Figura 17 para o PVA puro tem-se: a banda de absorção na região entre $3370-3270\text{ cm}^{-1}$ referente ao estiramento da hidroxila (OH); a banda localizada na região $2952-2912\text{ cm}^{-1}$ é referente ao estiramento C-H de alcanos; já em 1731 cm^{-1} observa-se uma banda referente à carbonila (C=O) do grupo acetil do PVA oxidado parcialmente; a banda em 1425 cm^{-1} caracteriza o estiramento COO^- (ion carboxilato que perde facilmente um H^+); em 1372 cm^{-1} observa-se a banda referente à deformação $-\text{CH}_2$; já em 1253 cm^{-1} é referente a vibração de estiramento C-O; a banda de 1088 cm^{-1} vibração de estiramento C-O; e por fim, em 848 cm^{-1} verifica-se a deformação da ligação (CH)- CH_2 .

Para o PAA puro, o espectro da Figura 17 mostra: em 2919 cm^{-1} uma banda referente ao estiramento C-H. Na região entre $2660-2650\text{ cm}^{-1}$ ocorre o estiramento C-H de alcanos; nessas regiões também pode aparecer o estiramento O-H de ácido carboxílico que vai de $3400-2400\text{ cm}^{-1}$. Em 1700 cm^{-1} aparece a banda de grande intensidade referente a vibração de estiramento da carbonila C=O. Em 1246 cm^{-1} há a banda de vibração de estiramento do C-O; em 1167 cm^{-1} se refere a vibração de estiramento do C-O; e em 800 cm^{-1} observa-se o OH fora do plano. Os dois picos 1459 cm^{-1} e 1412 cm^{-1} do espectro do PAA se referem ao estiramento simétrico e assimétrico de grupos COO^- . Este resultado confirma que os grupos carboxílicos do PAA são dissociados em grupos COO^- , o que é essencial para a aplicação desejada, pois a nanopartícula da matriz de PVA/PAA ficará rodeada de grupos carboxilato (COO^-), provenientes do PAA e ancorados à superfície do PVA, que por interação eletrostática atrai os íons de cálcio Ca^{2+} , resultantes da HA. Os grupamentos fosfatos (PO_4^-),

também da HA, interagem eletrostaticamente se agregando próximos à superfície. Assim, a superfície fica totalmente coberta de uma camada de fosfato de cálcio e, então ocorrerá a cristalização secundária de cálcio e fósforo no topo de locais de nucleação inicial. Os grupos carboxilato das moléculas do PAA têm sua disposição sobre a matriz orientada pela estrutura dos grupos hidroxilas (-OH) do PVA⁵⁷.

Ao visualizarmos o espectro, não fica clara a ocorrência da esterificação, possível reação entre o PVA com BTCA e o PAA, por isso espera-se que a interação entre o PVA reticulado com BTCA e PAA (Figura 18) se dê por ligações de hidrogênio entre os grupos carboxílicos do PAA com as hidroxilas do PVA. Uma banda esperada seria a ligação de éster na região entre 1730-1750 cm^{-1} , porém a mesma não apareceu. Podemos concluir que os grupamentos característicos principais do PVA e do PAA permanecem quando estes estão como mistura e na presença do BTCA.

Já foi relatado anteriormente que a interação do PVA com o PAA ocorre pelas fortes ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxilas do PVA com os grupos carbonilas do PAA⁶⁹. Em outra pesquisa, a comprovação da interação PVA e PAA em hidrogéis, foi através da análise do FTIR-ATR em que com as ligações de hidrogênio do PVA são substituídos pelas interações de ligações de hidrogênio entre o PVA e PAA⁵⁵.

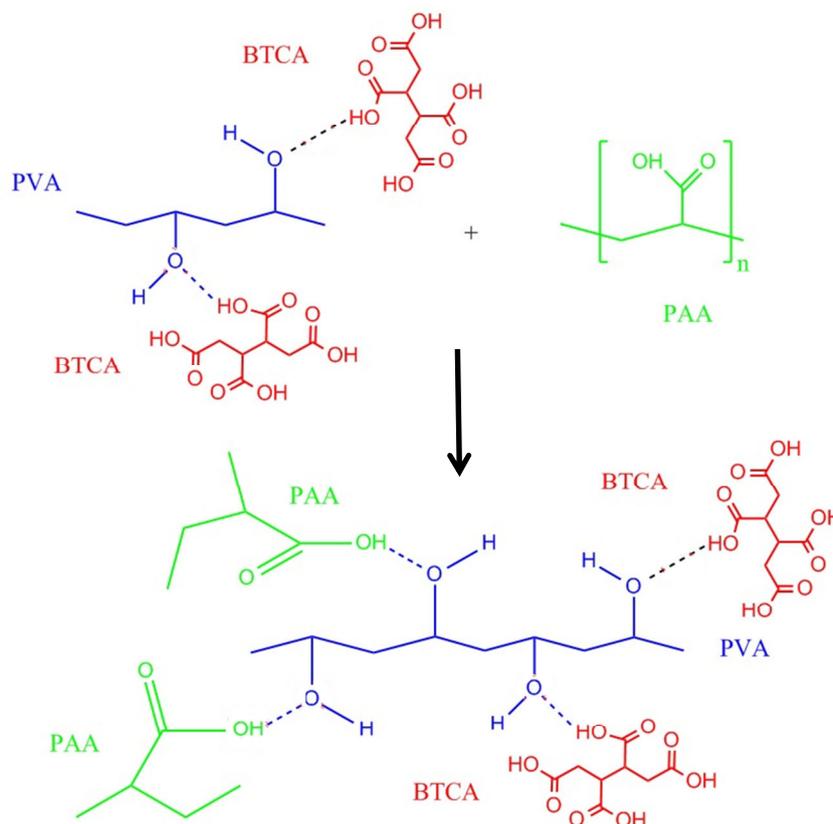


Figura 18. Interação entre o PVA com BTCA e o PAA.

Por fim, no espectro da Figura 17 é possível perceber o aumento da banda da carbonila quando comparado a matriz com 2 % BTCA com a de 6 % de BTCA, o que comprova o efeito do aumento da concentração do BTCA nas matrizes.

5.2.3 Permanência dos grupamentos característicos após as matrizes mergulhadas em água

A Figura 19 mostra os espectros de infravermelho de duas matrizes, antes e após 48 horas de imersão em água.

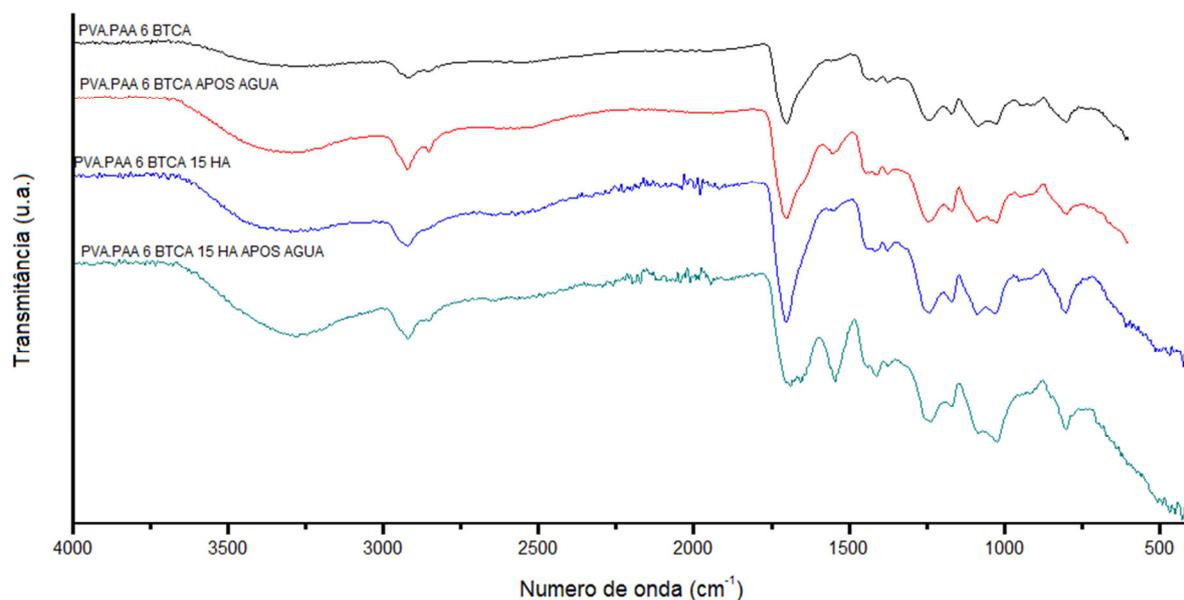


Figura 19. Espectros das nanofibras poliméricas antes e após de 48 horas de imersão em água.

O espectro da Figura 19 indica a permanência dos grupamentos principais dessas matrizes, mesmo após a imersão em água por 48 horas. Quando a matriz é composta pela HA, a banda de vibração da carbonila em 1700 cm^{-1} diminui sua intensidade, além disso, nota-se o aumento de intensidade da banda de COO^- , em 1538 cm^{-1} , possivelmente pela dissociação de grupos carboxílicos.

5.3 MICROSCOPIA ELETRONICA DE VARREDURA E VISCOSIDADE

A microscopia eletrônica de varredura comprovou a presença de fibras com uma média de diâmetro variando entre de 273 a 437 nm dependendo da composição de cada matriz. Para comparação foram estudadas as matrizes puras.

Quando analisada todas as micrografias que compreendem as Figuras 20, 21 e 22 observa-se que não foi possível realizar um controle do diâmetro das matrizes e sem alinhamento, pois verifica-se um gráfico com larga distribuição de tamanhos e visualmente fibras aleatórias.

Essas são algumas dificuldades de controle do processamento da eletrofiação. Sabe-se que o alinhamento das fibras poderia melhorar as propriedades mecânicas do material, pois quando a fibra é ordenada em um mesmo sentido as células do tecido se orientam dessa forma, influenciando o processo de diferenciação celular e a calcificação em tecidos ósseos¹⁴.

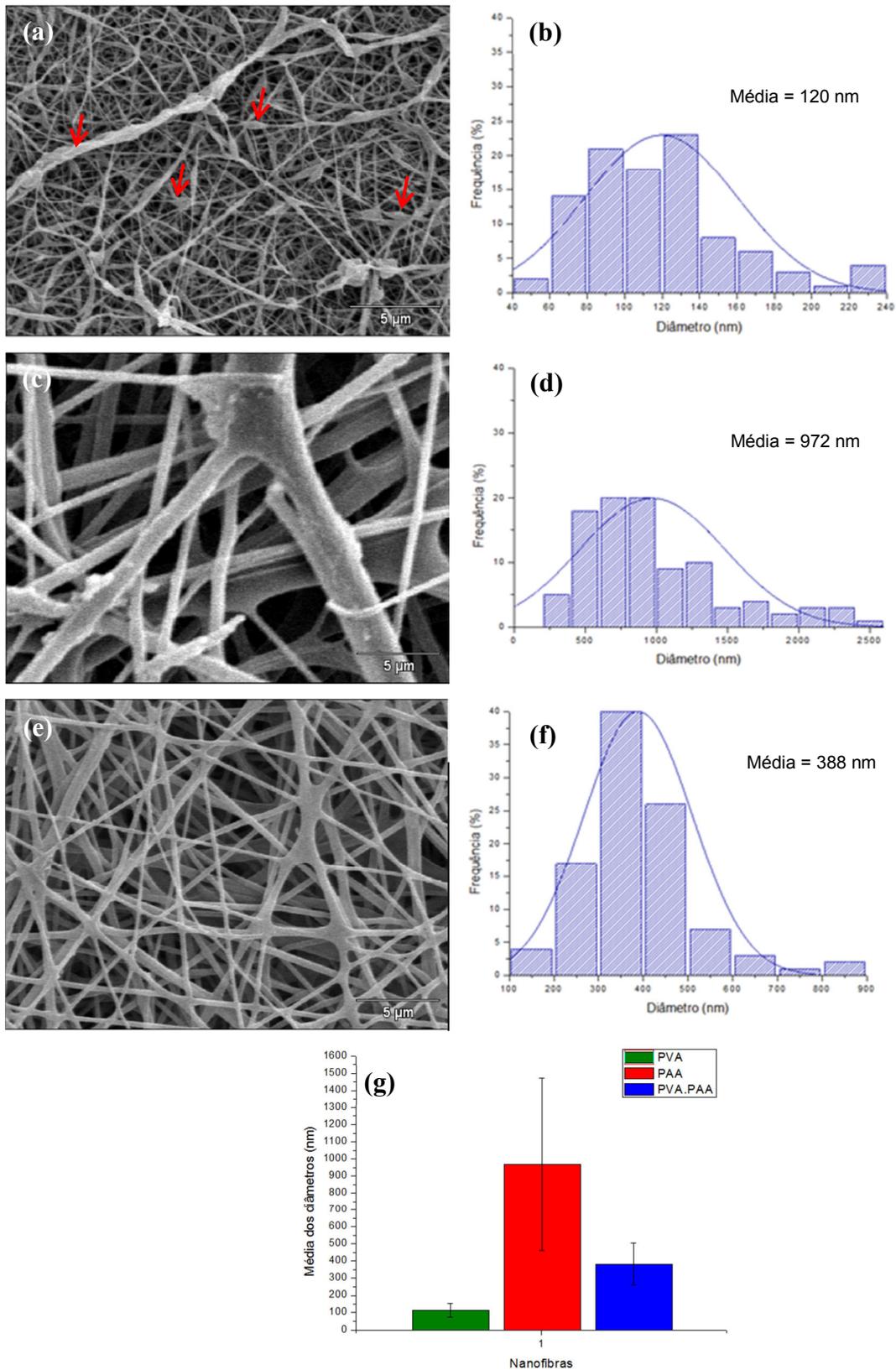


Figura 20. Micrografias de MEV das matrizes de PVA e PAA puros e quando misturados e respectivos gráficos de frequência dos diâmetros: (a) PVA, (b) Distribuição dos diâmetros do PVA, (c) PAA, (d) Distribuição dos diâmetros do PAA, (e) PVA.PAA sem reticulação, (f) Distribuição dos diâmetros da matriz PVA.PAA e (g) Médias dos diâmetros das respectivas nanofibras. (Magnificação 5000x).

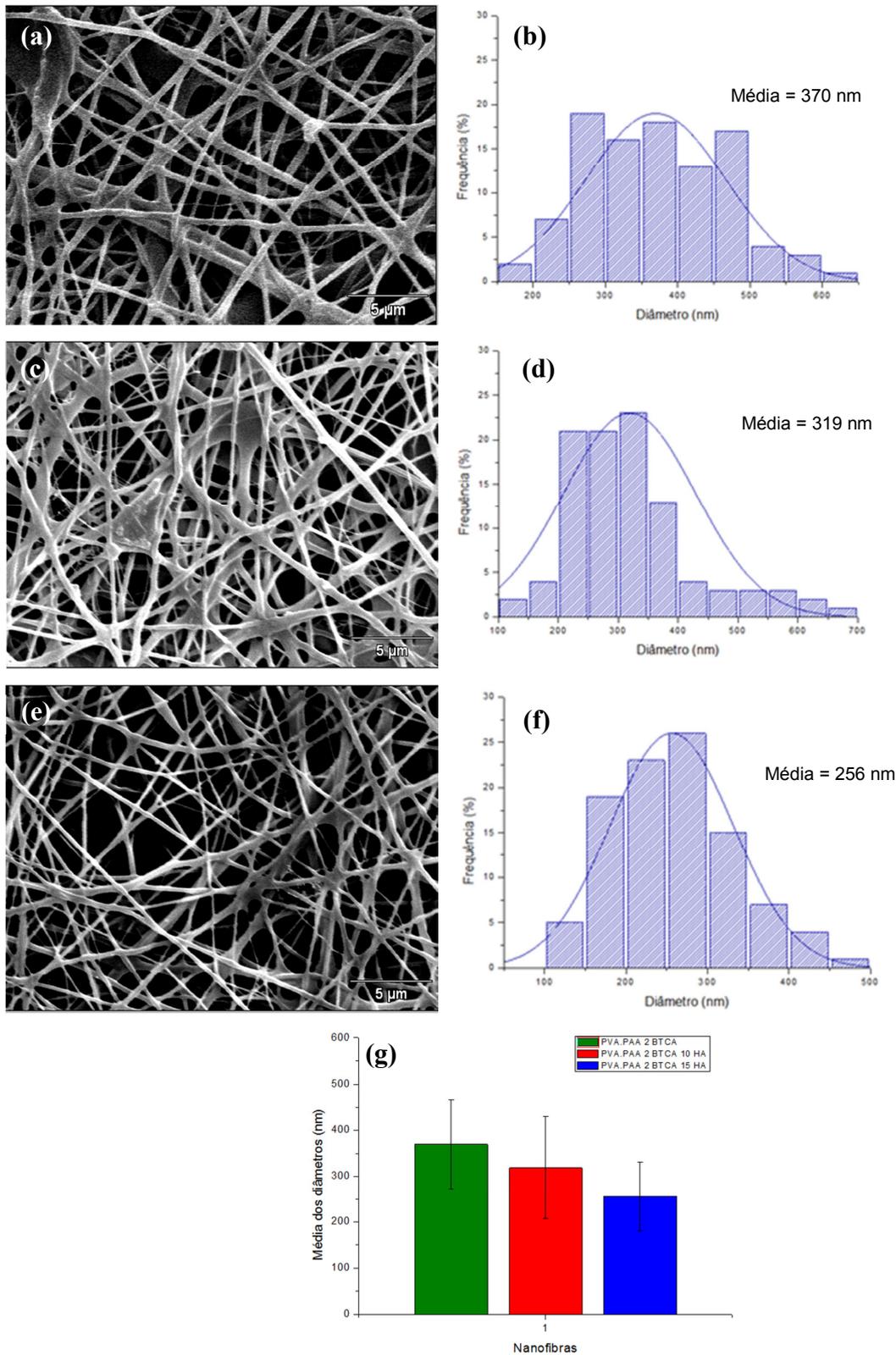


Figura 21. Micrografias de MEV das matrizes de PVA.PAA com 2% de BTCA e adição de 10 e 15% de HA e respectivos gráficos de frequência dos diâmetros: (a) PVA.PAA 2 BTCA, (b) Distribuição dos diâmetros do PVA.PAA 2 BTCA, (c) PVA.PAA 2 BTCA 10HA, (d) Distribuição dos diâmetros do PVA.PAA 2 BTCA 10HA, (e) PVA.PAA 2 BTCA 15HA, (f) Distribuição dos diâmetros do PVA.PAA 2 BTCA 15HA e (g) Médias dos diâmetros das respectivas nanofibras. (Magnificação 5000x).

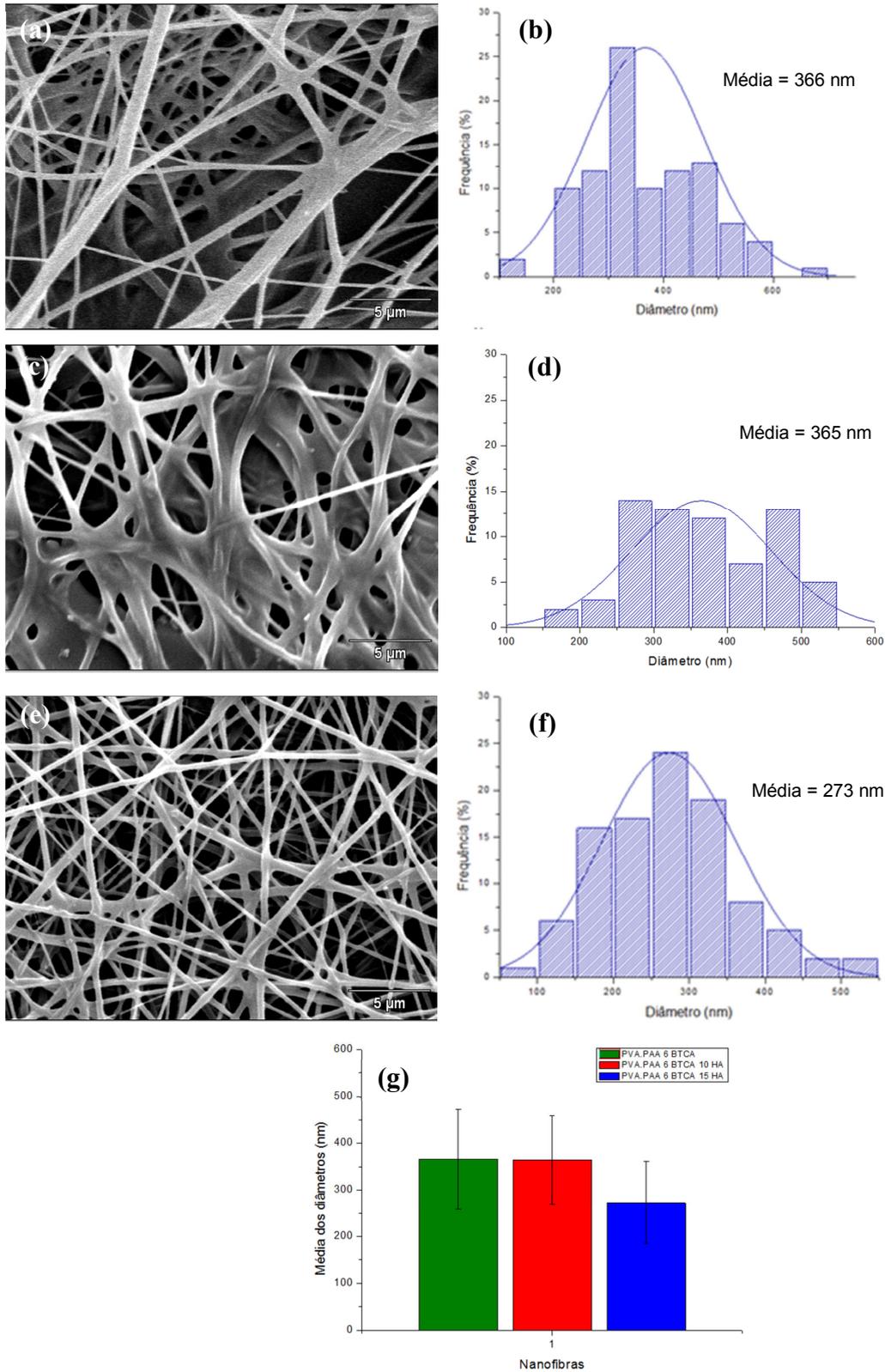


Figura 22. Micrografias de MEV das matrizes de PVA.PAA com 6% de BTCA e adição de 10 e 15% de HA e respectivos gráficos de frequência dos diâmetros: (a) PVA.PAA 6 BTCA, (b) Distribuição dos diâmetros do PVA.PAA 6 BTCA, (c) PVA.PAA 6 BTCA 10HA, (d) Distribuição dos diâmetros do PVA.PAA 6 BTCA 10HA, (e) PVA.PAA 6 BTCA 15HA, (f) Distribuição dos diâmetros do PVA.PAA 6 BTCA 15HA e (g) Médias dos diâmetros das respectivas nanofibras. (Magnificação 5000x).

Na Figura 20, comparam-se as matrizes sem a presença do agente reticulante. Na matriz de PVA, Figura 20a, percebe-se a presença de “beads”, destacadas por flechas na figura. Estas estruturas podem ser causadas pela baixa concentração da solução, ou seja, viscosidade não suficiente para permitir a formação de um jato estável no processo de eletrofiação⁷⁰⁻⁷¹. A distribuição de diâmetro das fibras da matriz de PVA situa-se entre 60-140 nm. Já a matriz de PAA apresenta diâmetros de fibras maiores quando comparadas ao PVA, o que pode ser causado pelo aumento da viscosidade da solução, pois para o PAA a viscosidade é de 579 cP. A imagem 20e, que se refere matriz formada pela mistura PVA e PAA, mostra nanofibras sem a presença de “beads”, o que pode ser causado pelo aumento de viscosidade, quando comparada as matrizes puras de PVA e PAA. A Figura 20g apresenta os diâmetros médios dessas nanofibras e o desvio padrão. O diâmetro médio da matriz PVA.PAA, 388 ± 122 nm, aumenta quando comparada ao PVA puro, 120 ± 40 nm, e diminui quando comparado ao PAA puro, 972 ± 505 nm. Esse comportamento é em função das fortes ligações intermoleculares de pontes de hidrogênio entre PVA e PAA.

Nas microfotografias de MEV das matrizes de 2 % BTCA com adição de 10 e 15 % de HA na matriz, observa-se que a presença da HA, e depois o aumento da sua concentração, diminui o diâmetro da fibra, conforme ilustra a Figura 21. O mesmo é observado na Figura 22, quando comparamos as matrizes PVA.PAA 6 BTCA com a presença de 10% e 15% HA. Verifica-se que a presença da HA nas matrizes provoca a diminuição do diâmetro médio, esse comportamento pode ser associado a viscosidade, que também diminuiu.

A discussão com base na viscosidade fica limitada no caso de PAA, PVA.PAA 2 BTCA 10 HA e PVA.PAA 6 BTCA 10 HA, pois a viscosidade destes não repercutiu em diâmetros elevados.

Quando comparado a matriz PVA.PAA 2 BTCA (Figura 21a) e a matriz PVA.PAA 6 BTCA (Figura 22a), percebe-se que esse aumento de concentração do BTCA na matriz, não causou nenhum impacto significativo para o diâmetro, o que está de acordo com o valor de viscosidade das soluções que também não sofreram variações com a adição de BTCA. O mesmo comportamento é observado quando comparado as matrizes PVA.PAA 2 BTCA 10 HA (Figura 21c) e PVA.PAA 6 BTCA 10 HA (Figura 22c) e, também, para as matrizes PVA.PAA 2 BTCA 15 HA (Figura 21e) e PVA.PAA 6 BTCA 15 HA (Figura 22e).

Tabela 3. Resultados da viscosidade e valores do diâmetro médio das nanofibras poliméricas.

MATRIZ	VISCOSIDADE (cP)	MÉDIA DOS DIÂMETROS (nm)
PVA	45 ± 0,2	120 ± 40
PAA	579 ± 17,4	972 ± 505
PVA.PAA	1244 ± 28,6	388 ± 122
PVA.PAA 2 BTCA	791 ± 7,0	370 ± 97
PVA.PAA 6 BTCA	789 ± 6,2	366 ± 107
PVA.PAA 2 BTCA 10 HA	1627 ± 96,2	319 ± 111
PVA.PAA 6 BTCA 10 HA	1818 ± 138,0	365 ± 94
PVA.PAA 2 BTCA 15 HA	667 ± 6,6	256 ± 76
PVA.PAA 6 BTCA 15 HA	546 ± 3,2	273 ± 88

Com as micrografias foi possível verificar fibras mesmo após 48 h imersas em água. A Figura 23 mostra a matriz PVA.PAA 2 BTCA 10 HA, antes (a) e depois da imersão em água (b). Nestas micrografias é possível observar que as fibras se apresentam coalescidas pelo efeito da água.

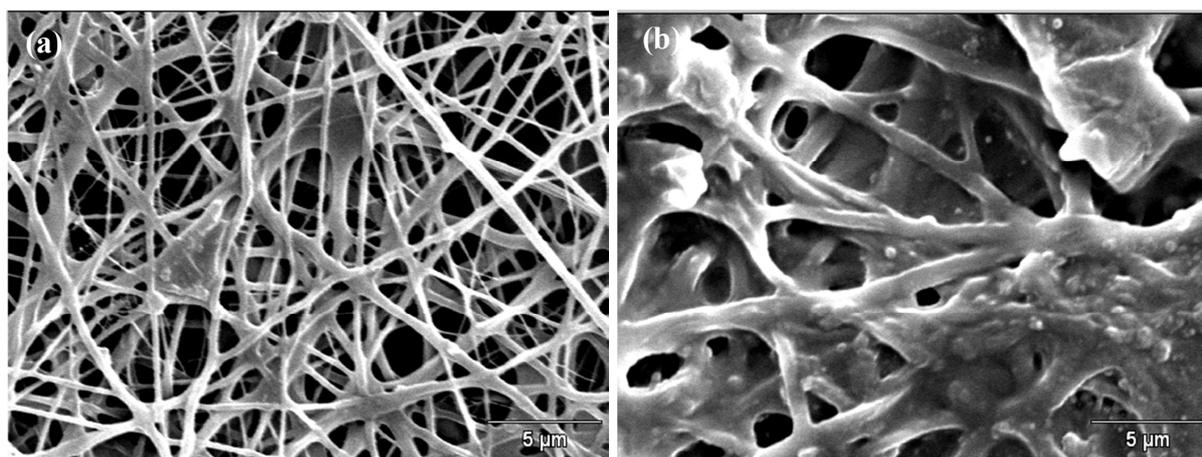


Figura 23. Micrografias de MEV da matriz de PVA.PAA 2 BTCA e 10 HA: a) Antes da imersão em água e b) Após 48 horas imerso em água. (Magnificação 5000x).

Com a análise de MEV-FEG foi possível verificar como a HA se deposita na matriz de nanofibras. Um aglomerado de cristais de HA foi visualizado de acordo com a imagem da Figura 24a, em um tamanho de 11 µm. Os cristais medidos do aglomerado tinham em média 457 nm. Com a ajuda do EDS na técnica MEV-FEG comprovou-se a presença de cálcio e fósforo na matriz PVA.PAA. Conforme mostra o gráfico da Figura 24c, é possível perceber o pico característico de cálcio (Ca), em 3,6 keV, na amostra de PVA.PAA 6 BTCA 15 HA e o pico de fósforo (P) em 2,1 keV. O ouro foi utilizado para o preparo da amostra, por isso os picos desse elemento estão destacados. A Figura 24b indica através do retângulo, o local onde foi feita a análise de EDS, no caso da Hidroxiapatita está indicada como Spectrum 2. As

outras duas áreas indicadas na Figura 24b mostram pode haver um pequeno cristal da HA depositado na matriz, conforme comprova os gráficos da Figura 24d e 24f pelo pequenos picos de Ca e P. A técnica de microscopia com EDS já foi utilizada para detectar a HA em uma matriz de nanofibras⁷².

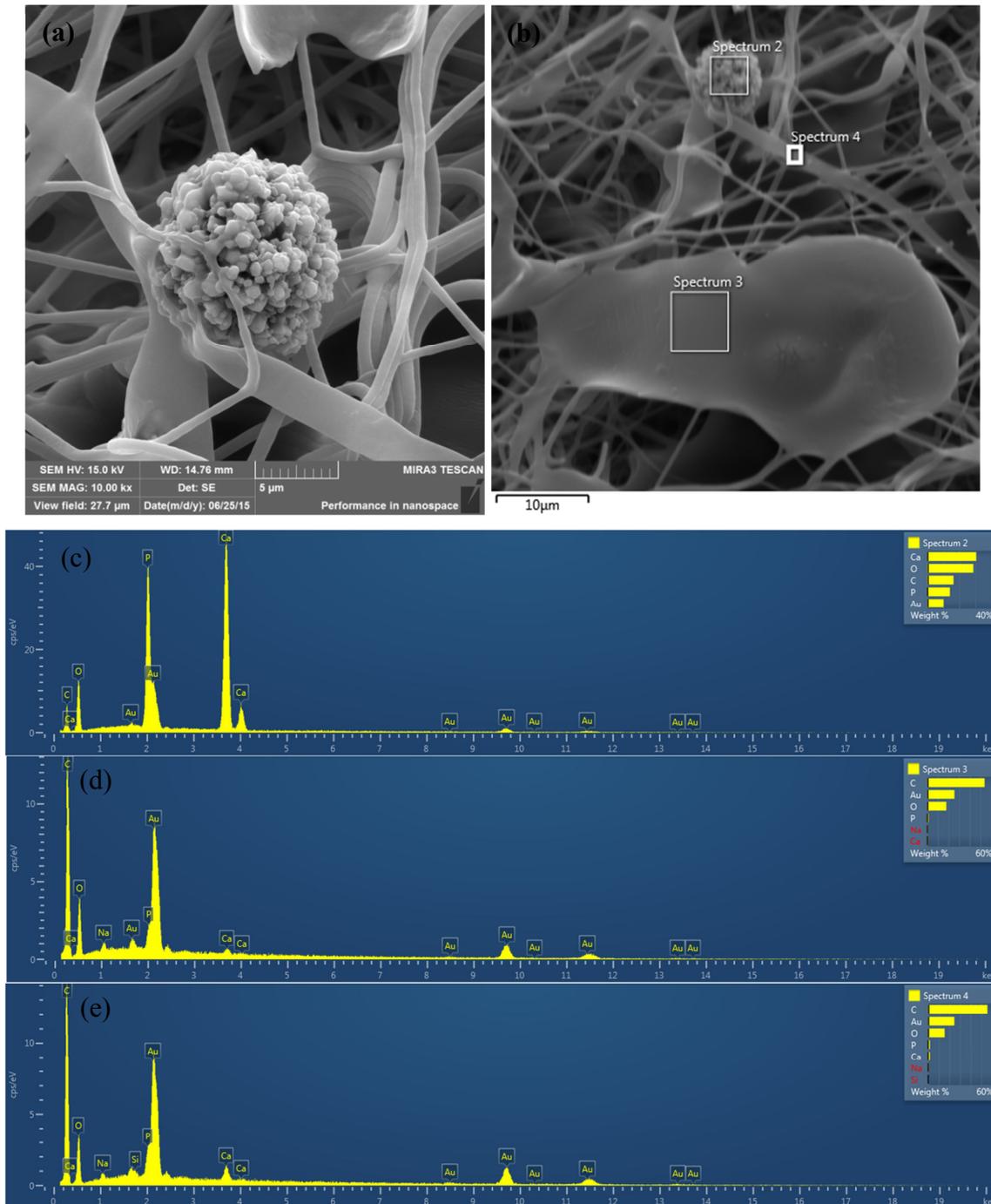


Figura 24. Micrografias de MEV-FEG com gráfico de EDS para amostra PVA.PAA 6 BTCA 15 HA: a) Micrografia da matriz com destaque para a HA; b) Micrografia da matriz com a região demarcada para análise de EDS; c) Gráfico do EDS para a região demarcada como Spectrum 2; d) Gráfico do EDS para a região demarcada como Spectrum 3 e e) Gráfico do EDS para a região demarcada como Spectrum 4.

5.4 ÂNGULO DE CONTATO COM A ÁGUA (WCA)

A análise de WCA é um método rápido e fácil de examinar superfícies⁷³. Através da hidrofobicidade das nanofibras é possível avaliar as propriedades químicas da superfície⁷⁴. Além disso, as características hidrofóbicas e hidrofílicas das matrizes de nanofibras podem influenciar na adesão e proliferação da célula⁷⁵.

Quando realizado o ensaio para a matriz de PVA e PAA puros, não foi possível o cálculo de ângulo de contato, pois a gota de água foi rapidamente absorvida na superfície das matrizes. Já a medida de WCA para a matriz PVA.PAA, sem a adição de BTCA, pode ser observado na Figura 25a, com um valor de $58,5^\circ$. Esse valor ainda caracteriza uma superfície de molhabilidade parcial⁴⁰, ou seja, hidrofílica. Quando analisada a matriz de PVA.PAA com adição de 2 % de BTCA, Figura 25b, o ângulo de contato aumenta para $91,1^\circ$, caracterizando uma matriz hidrofóbica⁴⁰. Ou seja, o BTCA atuou de forma a modificar as propriedades da matriz polimérica. Ao observar a matriz PVA.PAA 2 BTCA 15 HA, Figura 25c, o valor de ângulo de contato foi de $109,2^\circ$, também caracterizando uma superfície hidrofóbica.

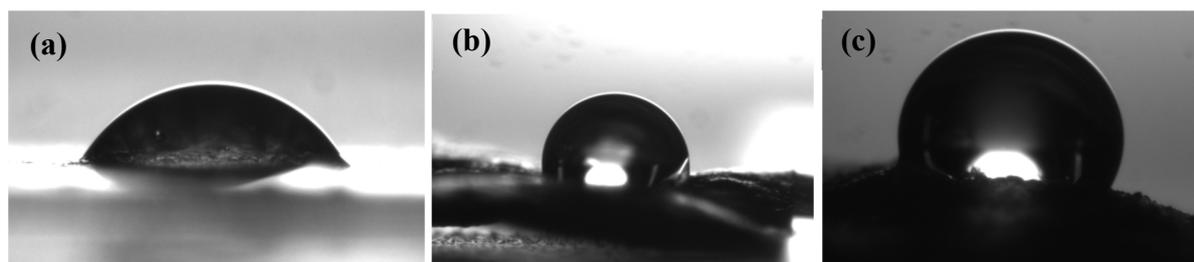


Figura 25. Ângulo de contato (a) PVA.PAA sem reticulação, (b) PVA.PAA 2 BTCA, e (c) PVA.PAA 2 BTCA 15 HA.

Os valores de WCA para todas as amostras analisadas estão resumidas na **Tabela 4**.

Tabela 4. Valores de ângulo de contato (WCA) para as nanofibras poliméricas.

MATRIZ	WCA
PVA	Não foi possível medir
PAA	Não foi possível medir
PVA.PAA	$58,5^\circ \pm 5,1^\circ$
PVA.PAA 2 BTCA	$91,1^\circ \pm 3,6^\circ$
PVA.PAA 6 BTCA	$91,6^\circ \pm 4,1^\circ$
PVA.PAA 2 BTCA 10 HA	$109,6^\circ \pm 4,0^\circ$
PVA.PAA 6 BTCA 10 HA	$112,2^\circ \pm 3,9^\circ$
PVA.PAA 2 BTCA 15 HA	$109,2^\circ \pm 6,3^\circ$
PVA.PAA 6 BTCA 15 HA	$110,6^\circ \pm 5,2^\circ$

Verifica-se que a grande diferença de valor de WCA está quando comparamos a matriz PVA.PAA sem o agente reticulante com as matrizes na presença do BTCA. O perfil da superfície muda, de hidrofílica para hidrofóbica. Não é possível verificar diferença significativa do valor do ângulo quando ocorre o aumento da concentração do BTCA na matriz, assim como o aumento da concentração da HA. Quando comparada as matrizes com BTCA sem HA e a matriz com a presença da mesma, percebe-se um pequeno aumento do valor de WCA. Esse comportamento já foi estudado, sendo justificado pelo aumento da rugosidade causada pela HA⁶.

De fato quando PVA e PAA formam a mistura, a forte interação intermolecular de ligações de hidrogênio formada entre o grupo hidroxila do PVA com o grupamento carboxílico do PAA causa a mudança da superfície e conseqüentemente o aumento do ângulo de contato quando comparadas com as matrizes puras. Portanto, é com a presença de BTCA que a matriz se torna hidrofóbica, pela maior quantidade de grupamentos carboxílicos provenientes do BTCA e conseqüentemente aumentando as interações intermoleculares de ligação de hidrogênio.

5.5 ANÁLISES TÉRMICAS – TG e DSC

As propriedades térmicas das matrizes de nanofibras foram determinadas através de análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e por análise termogravimétrica (TG). O comportamento térmico que mede a perda de peso em função da temperatura e do tempo de todas as matrizes estudadas, do PVA e PAA antes do processamento foi determinado a partir da análise termogravimétrica (TG). Ao observar a Figura 26, nota-se que em geral as amostras apresentam basicamente quatro etapas de perda de massa, com exceção dos componentes puros, que estão separados na Figura 27. Os resultados de e todas as amostras estão reunidos na Tabela 5.

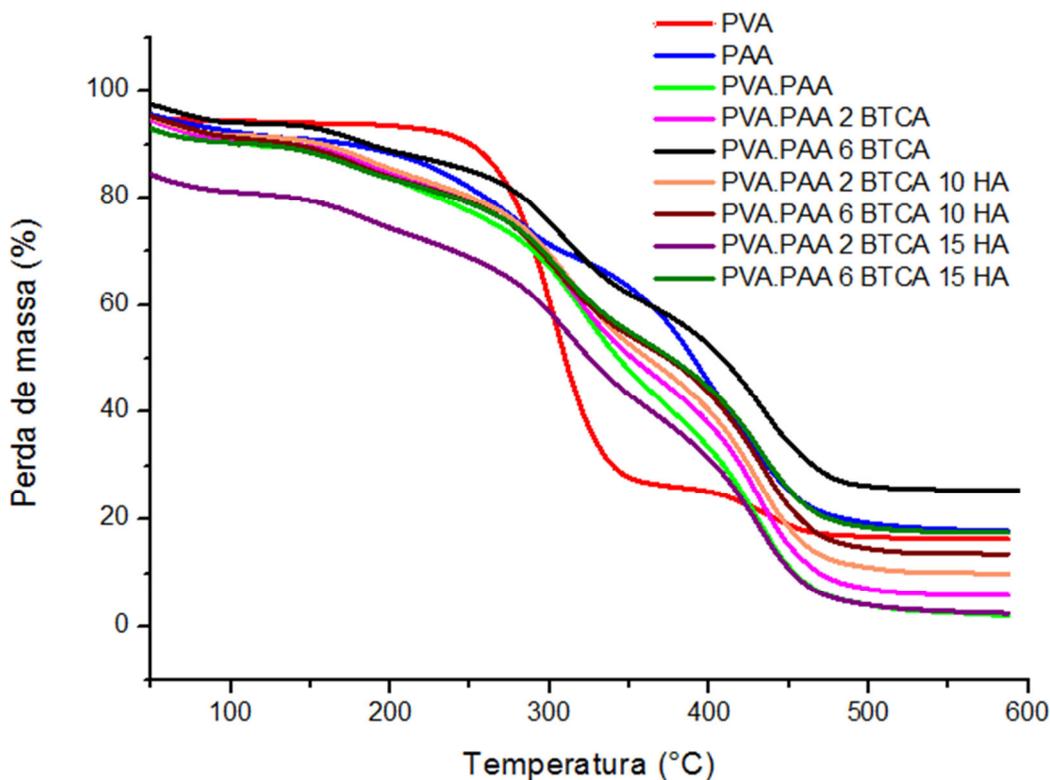


Figura 26. Curvas termogravimétricas de perda de massa das matrizes de nanofibras.

Nas curvas da matriz de PVA e do PVA antes do processamento, Figura 27a, observa-se a primeira etapa de degradação entre aproximadamente 30 e 200°C, que corresponde à perda de água. A segunda etapa em que a degradação ocorre a partir dos 200°C com pico máximo em 303 °C para o PVA nanofibra, é característica da decomposição de sítios e cadeias ligados à cadeia principal do PVA. A terceira etapa de decomposição térmica que ocorre com pico máximo em torno de 430 °C é característica da decomposição da cadeia principal de PVA. Após os 500 °C verifica-se a decomposição de resíduo orgânico. Do PVA nanofibra para o PVA antes do processamento, ocorre pequenos deslocamentos no pico máximo de degradação, provocados pelo aumento de tensão provocada pela eletrofiação.

Na Figura 27b, do PAA e do PAA antes do processamento, observa-se 5 etapas de decomposição, sendo o primeiro pico definido que ocorre a 79 °C e 49 °C respectivamente, determinado pela primeira derivada da perda de massa. Essa transição é consequente dos vapores de água desprendidos da molécula. Posteriormente no pico máximo de degradação a 201,6 °C para o PAA, ocorre a perda do (-COO⁻). A 282,7 °C ocorre a perda de massa pela formação de anidrido, em 395,6 °C ocorre a decomposição da cadeia principal e, por fim, com perda de massa de 21,6 % correspondente ao produto da decomposição por oxidação do material orgânico. A decomposição da cadeia principal iniciada em 390 °C já foi comprovada

por análise TG anteriormente, assim como o início da formação do anidrido do PAA a 250 °C⁶².

Verifica-se que do polímero processado ao polímero puro de PAA ocorrem algumas diferenças no comportamento térmico para as primeiras etapas de degradação, porém a cadeia principal se degrada na mesma temperatura para as duas formas de PAA, 395,6 °C e 395,0 °C. Nesse caso pode-se concluir que há uma pequena variação no comportamento térmico afetado pelas cargas estáticas do processo de eletrofiação.

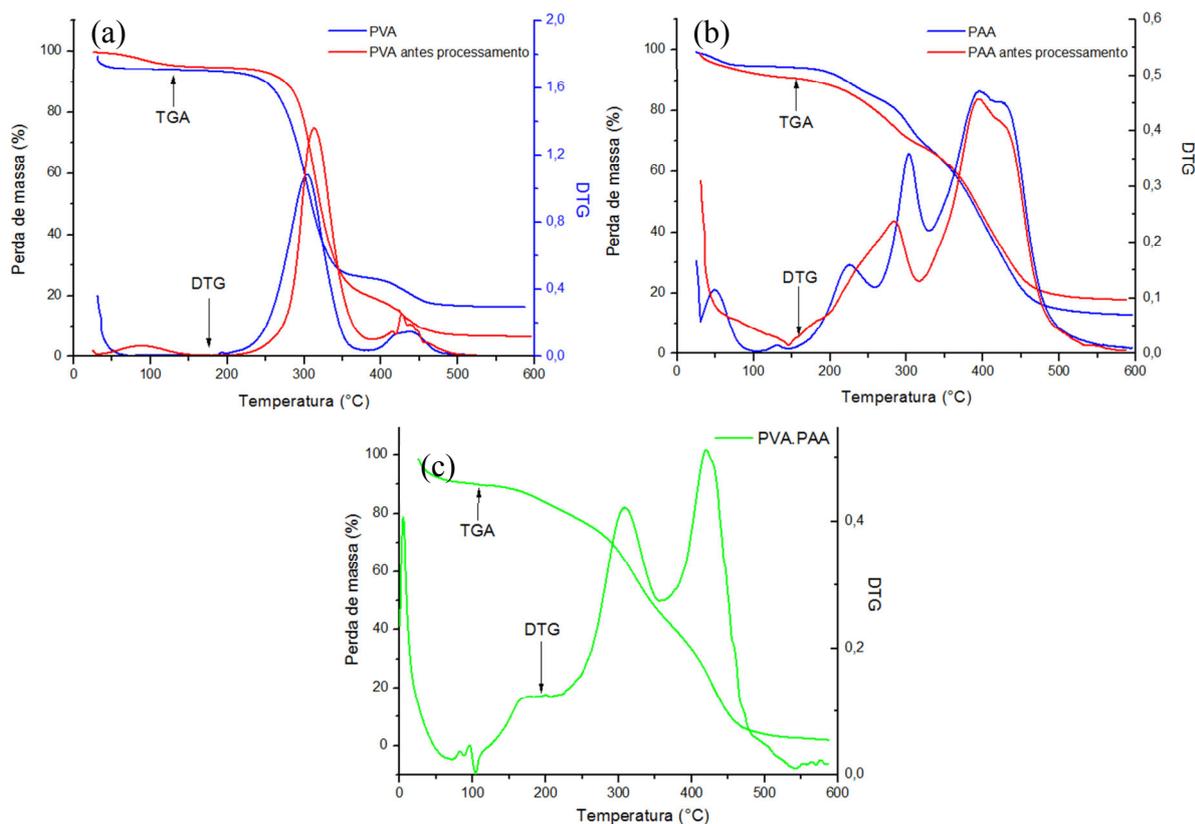


Figura 27. Curvas termogravimétricas (a) TG/DTG para PVA e PVA antes do processamento, (b) TG/DTG para PAA e PAA antes do processamento e (c) TG/DTG para PVA.PAA nanofibras.

Verifica-se que as matrizes PVA.PAA sem adição de qualquer componente como está ilustrado na Figura 27c, e quando compara-se as matrizes PVA.PAA com BTCA e HA, conclui-se que seguem a mesma tendência no comportamento térmico, contendo 4 etapas de degradação, conforme observado de forma geral na Figura 26. Na primeira etapa ocorre a perda de massa relativa ao desprendimento da água e na segunda, do $-\text{COO}^-$. A terceira etapa é relacionado à quebra da cadeia principal do PVA e por último do PAA. Os resíduos para as matrizes variaram bastante, obtendo-se o menor resíduo na matriz PVA. PAA 2 BTCA 15 HA. Essa variação é em função das pequenas diferenças das quantidades utilizadas no ensaio

e o resíduo formado são cinzas, não tendo maiores estudos relacionados a esse resíduo formado.

Tabela 5. Resultados das curvas TG/DTG para as amostras.

MATRIZ	Estágio 1		Estágio 2		Estágio 3		Estágio 4		Estágio 5		Resíduo (%)
	T(°C) ^a	L(%) ^b									
PVA	127,9	3,7	303,1	67,7	435,8	9,0	-	-	-	-	19,6
PVA antes proces.	92,1	5,6	313,9	74,4	427,3	12,9	-	-	-	-	7,1
PAA	79,1	7,4	201,6	7,1	282,7	16,2	395,6	28,0	424,5	21,6	19,7
PAA antes proces.	49,6	5,5	226,0	10,1	302,6	16,5	395,0	29,7	428,5	24,6	13,6
PVA.PAA	116,5	11,4	191,9	9,3	318,4	37,1	427,9	37,5	-	-	4,7
PVA.PAA 2 BTCA	87,0	7,4	186,3	7,5	313,3	35,2	431,3	39,9	-	-	10,0
PVA.PAA 6 BTCA	100,6	6,3	202,2	8,0	271,9	17,4	359,8	42,1	-	-	26,2
PVA.PAA 2 BTCA 10 HA	30,9	8,0	186,8	9,7	313,3	33,7	429,6	37,6	-	-	11,0
PVA.PAA 6 BTCA 10 HA	96,7	6,8	177,2	8,7	304,8	28,3	433,6	33,5	-	-	22,7
PVA.PAA 2 BTCA 15 HA	30,3	19,4	182,9	12,6	311,6	27,3	430,7	36,4	-	-	4,3
PVA.PAA 6 BTCA 15 HA	100,6	7,5	176,6	9,5	307,7	28,7	433,0	33,1	-	-	21,2

^a Temperatura máxima de degradação; ^b Percentual de massa perdida na etapa.

As Figuras 28 e 29 apresentam os termogramas de DSC para o segundo ciclo de aquecimento. No segundo ciclo de aquecimento é possível determinar a temperatura de transição vítrea das amostras, observando-se a variação da linha base da curva DSC.

A temperatura característica da transição do estado borrachoso para o rígido em um polímero é conhecido como temperatura de transição vítrea (T_g). A transição vítrea ocorre em polímeros amorfos e semicristalinos, e é devida a uma redução no movimento de grandes segmentos de cadeias moleculares causada pela diminuição da temperatura. Esses eventos ocorrem quando um material rígido é aquecido em uma temperatura abaixo da T_g . É importante a determinação da T_g , pois influencia nos parâmetros para a fabricação e de processamento do material⁷⁶. O resumo dos valores de T_g das amostras é encontrado na Tabela 6.

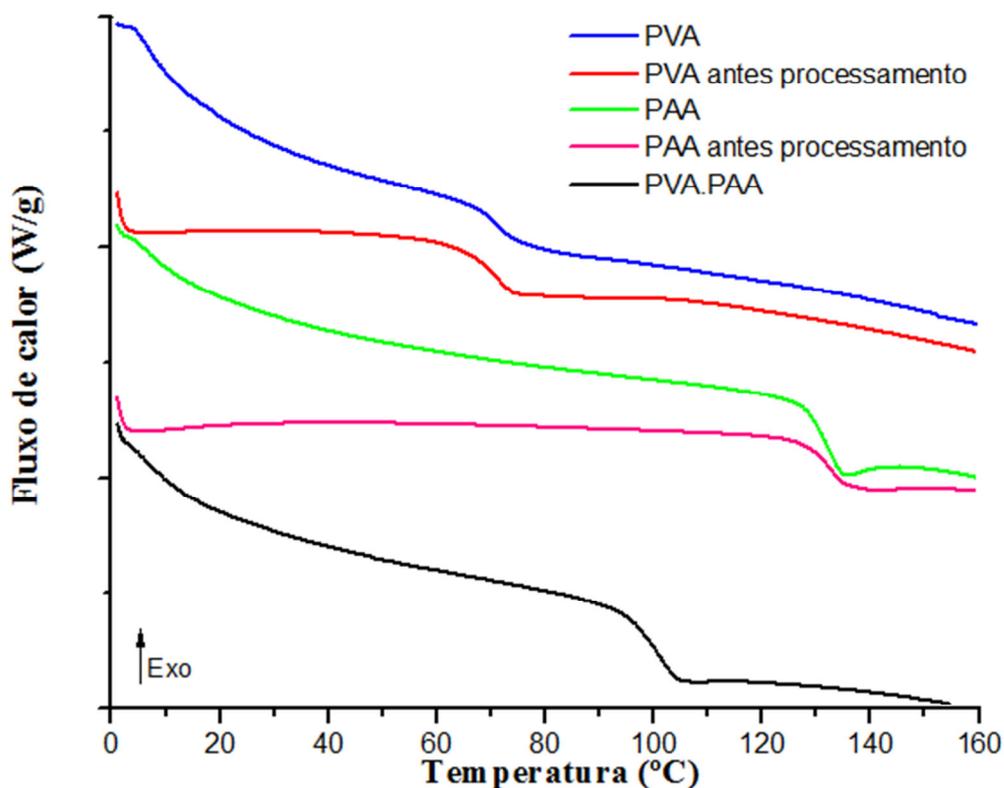


Figura 28. Termogramas de DSC para as nanofibras poliméricas sem reticulação (2º ciclo de aquecimento).

Não houve variações significativas nos valores da T_g entre as matrizes processadas e os polímeros antes do processamento, após observar a Figura 28. O elevado valor de T_g para o PAA se dá por esse polímero possuir uma grande quantidade de ligações duplas e aumento dos grupos polares em sua estrutura. Do contrário, o PVA possui ligações simples em sua estrutura obtendo-se o menor valor de T_g . Essas informações reafirmam o motivo pela qual foram escolhidos esses polímeros, onde o PVA é de natureza flexível e o PAA agrega um caráter mais rígido a matriz.

Contudo, constata-se uma modificação da T_g na curva da matriz PVA.PAA, da Figura 28, além de termos uma mistura totalmente miscível de PVA e PAA. A temperatura de transição vítrea da matriz PVA.PAA possui um valor intermediário entre os dois polímeros puros, pois diminui os grupamentos polares confrontando à estrutura do PAA e tem-se na mistura as ligações duplas, quando comparado ao PVA. E ainda, a interação por fortes ligações de hidrogênio entre o PVA e PAA restringe o movimento molecular, aumentando a rigidez, ao comparar com o PVA puro.

A diferença da posição da linha de base verificada na Figura 28, ao observar o PVA nanofibra e o PVA antes processamento, assim como para as duas curvas de PAA, é em função da quantidade inicial de amostra utilizada para o ensaio⁶⁷.

Conforme a Figura 29 verifica-se que na adição de dois novos componentes se obtém misturas totalmente miscíveis e que tanto a presença do BTCA quando a da HA e o aumento de proporção deles na matriz PVA.PAA não influenciam significativamente no valor da T_g , mantendo-se os valores com pequenas variações.

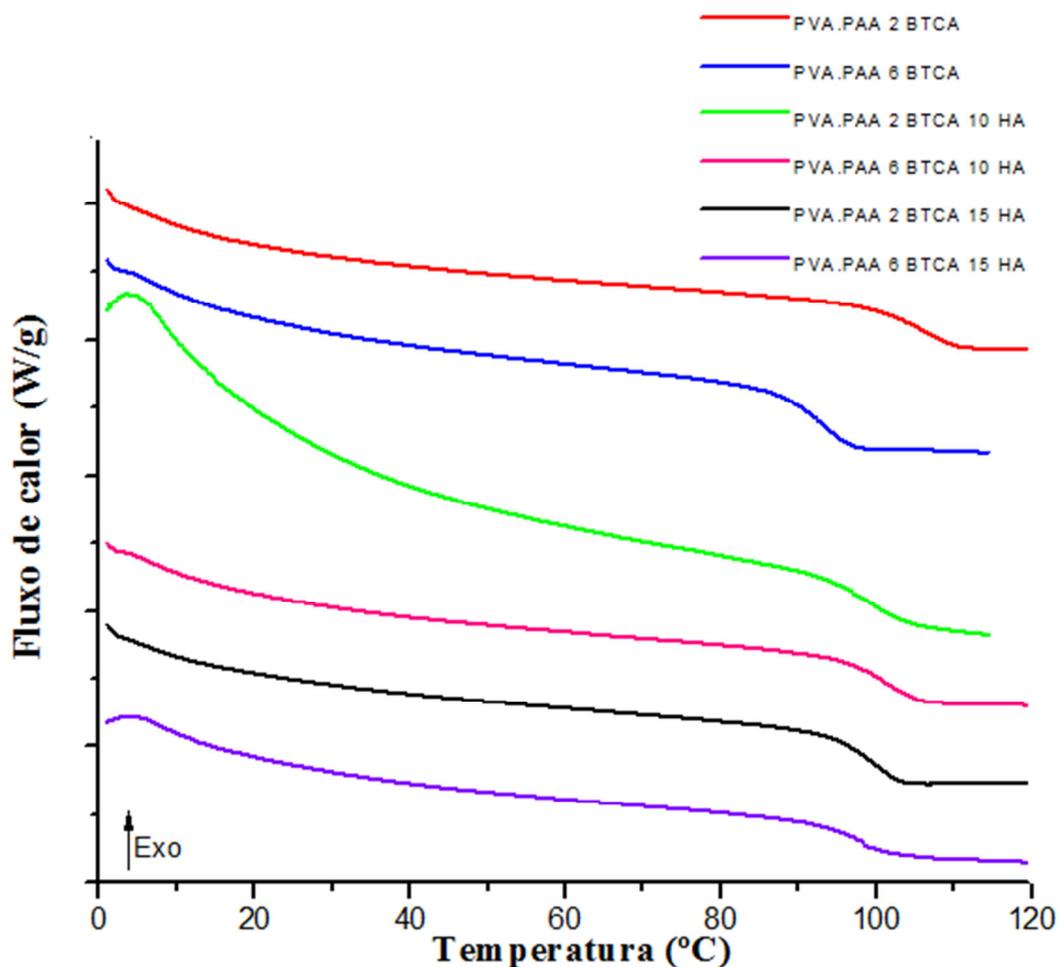


Figura 29. Termogramas de DSC para as nanofibras reticuladas (2º ciclo de aquecimento)

Percebe-se que a adição do BTCA à matriz PVA.PAA não interfere na T_g por ter maior importância as interações intermoleculares do PVA e PAA do que a reação de esterificação com o BTCA. Assim como o que foi levantado na revisão bibliográfica, a HA se deposita na matriz, o que também não influencia no valor de T_g por não participar das ligações na estrutura da matriz PVA.PAA. Em resumo a análise térmica permitiu verificar que a

temperatura de transição vítrea não sofreu variações comparando a matriz PVA.PAA com as composições de BTCA e HA, porém em relação aos polímeros puros o valor foi intermediário.

Tabela 6. Temperatura de transição vítrea para as nanofibras de PVA.PAA e os polímeros puros, antes e após o processamento.

MATRIZ	T_g (°C)
PVA antes processamento	70,5
PVA nanofibras	70,7
PAA antes processamento	131,0
PAA nanofibras	130,8
PVA.PAA	99,5
PVA.PAA 2 BTCA	105,2
PVA.PAA 6 BTCA	92,4
PVA.PAA 2 BTCA 10 HA	99,4
PVA.PAA 6 BTCA 10 HA	100,4
PVA.PAA 2 BTCA 15 HA	98,6
PVA.PAA 6 BTCA 15 HA	97,4

5.6 ENSAIO MECÂNICO DE TRAÇÃO

As propriedades mecânicas das matrizes de suporte de nanofibras foram avaliadas pelo teste de tração. Através dos resultados do ensaio ilustrado na Figura 30 e resumidos pela Tabela 7, observa-se que há uma tendência de aumento do valor de tensão na ruptura nas matrizes com o BTCA e HA, quando comparadas às matrizes puras de PVA e PAA. Para a elongação os valores aumentaram quando comparados ao PAA, mas variaram quando comparadas ao PVA. Os resultados de Módulo de Young teve em sua maioria menores valores na matrizes estudadas quando comparados ao PVA e PAA puros.

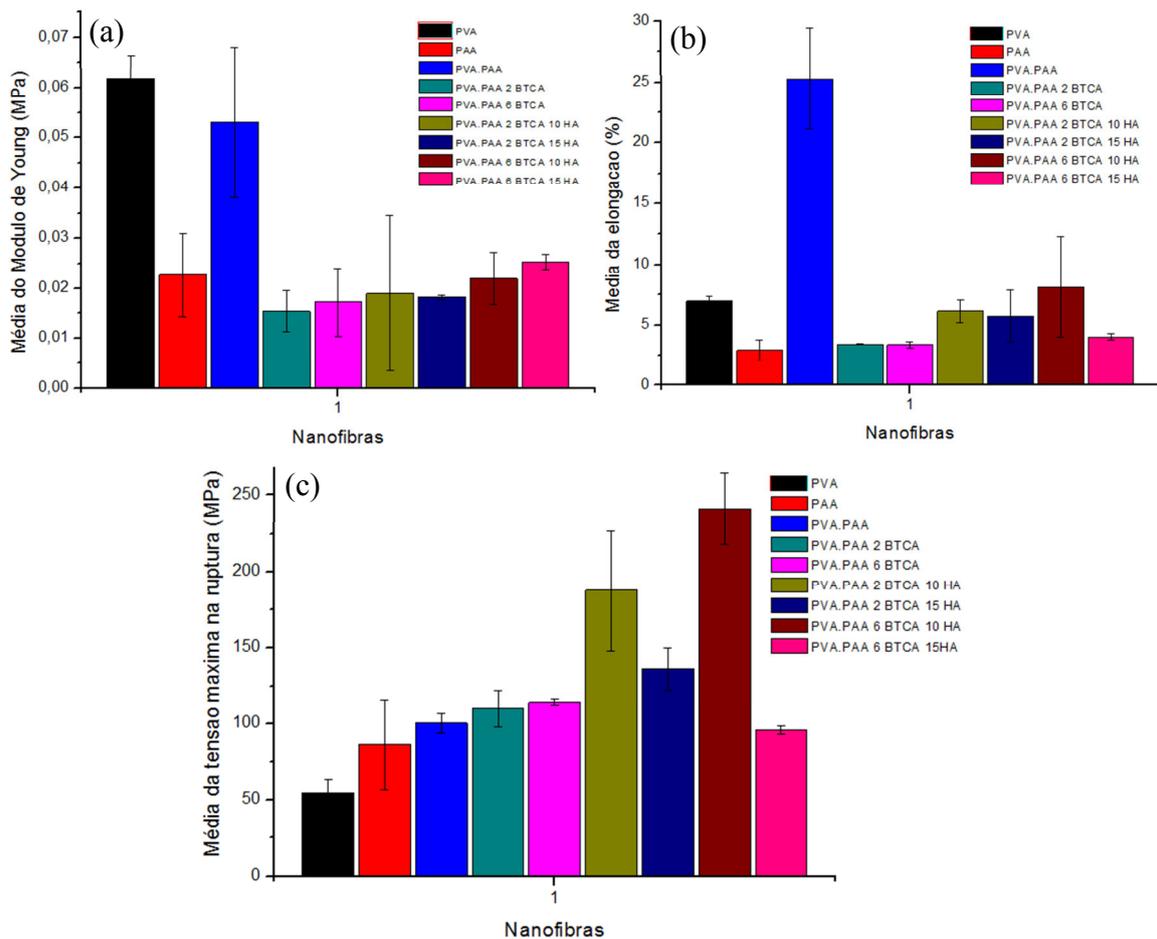


Figura 30. Propriedades mecânicas sob tração (a) Módulo de Young, (b) Elongação e (c) Tensão máxima na ruptura.

A adição do BTCA na matriz PVA.PAA, de um modo geral, provocou um aumento nos valores de tensão na ruptura e diminuição dos resultados de Elongação e do Módulo de Young. Já o acréscimo do teor do agente reticulante na matriz PVA.PAA de 2 % para 6 %, causou um aumento da tensão na ruptura para as amostras sem o BTCA e com 10 % de HA. O valor de tensão teve queda para a matriz com 15 % de HA. Esse aumento do BTCA na matriz provocou também uma diminuição na Elongação e aumento do Módulo de Young, com exceção na matriz com 10 % de HA que não variou.

Ao observar os resultados do incremento da HA na matriz PVA.PAA, verifica-se que há aumento da tensão máxima de ruptura quando comparada à matriz sem a HA, mas diminui para a matriz com 15 % de HA, quando comparada à matriz com 10 %. Já o Módulo de Young aumenta com aumento da HA na matriz. De fato ocorre o aumento da resistência à tração e do valor de Módulo de Young, isto é atribuído a um aumento de rigidez. Tanto a presença do BTCA que tem a função de reticular e empacotar as cadeias, quanto a adição da HA que é um componente rígido inorgânico, provoca esse comportamento. Porém, ao

aumentar a quantidade de HA de 10 % para 15 % em peso do PVA/PAA, a diminuição de resistência é atribuída à aglomeração das nanopartículas de HA em concentração mais elevada. Esse comportamento já foi relatado anteriormente em uma matriz de PVA e colágeno e incremento de 5 % para 10 % de HA⁸.

Tabela 7. Resultados das propriedades mecânicas sob tração obtidas para as matrizes.

MATRIZ	Tensão na ruptura (MPa)	Elongação (%)	Módulo de Young (MPa)
PVA	54,9±9	6,98±0,37	0,0619±0,0044
PAA	86,6±30	2,91±0,85	0,0227±0,0084
PVA.PAA	100,4±7	25,28±4,16	0,0531±0,0149
PVA.PAA 2 BTCA	110,2±12	3,42±0,05	0,0154±0,0041
PVA.PAA 6 BTCA	114,6±3	3,36±0,26	0,0173±0,0068
PVA.PAA 2 BTCA 10 HA	187,4±39	6,15±0,96	0,0190±0,0156
PVA.PAA 6 BTCA 10 HA	241,1±14	5,75±2,13	0,0182±0,0004
PVA.PAA 2 BTCA 15 HA	136,3±23	8,12±4,16	0,0219±0,0052
PVA.PAA 6 BTCA 15 HA	96,1±3	4,01±0,26	0,0254±0,0015

As propriedades mecânicas de um osso humano têm como características: resistência máxima a tração de 150 MPa⁷⁷, alongação de 3,89 %⁷⁸ e módulo de elasticidade em 0,0174 MPa⁷⁷, podendo variar conforme o local analisado.

Os resultados obtidos mostram que as matrizes PVA.PAA 2 e 6 BTCA 10 HA possuem boas propriedades mecânicas, para aplicação desejada.

5.7 VIABILIDADE CELULAR (MTS)

O teste de MTS, Figura 31, foi realizado para verificar a viabilidade celular nas matrizes eletrofiadas das amostras de PVA.PAA 6 BTCA, PVA.PAA 6 BTCA 10 HA e 3 PVA.PAA 6 BTCA 15 HA utilizando o PS como controle.

A quantidade de formazano produzido é proporcional ao número de células vivas em cultura uma vez que a redução química de formazina num produto colorido é dependente do número de células viáveis⁷⁹.

Dentre as amostras testadas, aquelas contendo a hidroxiapatita tiveram um aumento estatisticamente significativo em relação às demais e ao controle (PS) durante 24 horas ($p < 0,05$). Após 72 e 120 horas não houve aumentos significativos das amostras em relação ao controle. O ensaio MTS demonstra que as células expostas a estes suportes mantêm a capacidade de proliferar durante até 72 horas.

A fosfatase alcalina é uma enzima ligada à membrana e a sua atividade é utilizada como um marcador de diferenciação osteoblástica, uma vez que é produzida apenas por células que apresentam ECM mineralizado⁸⁰.

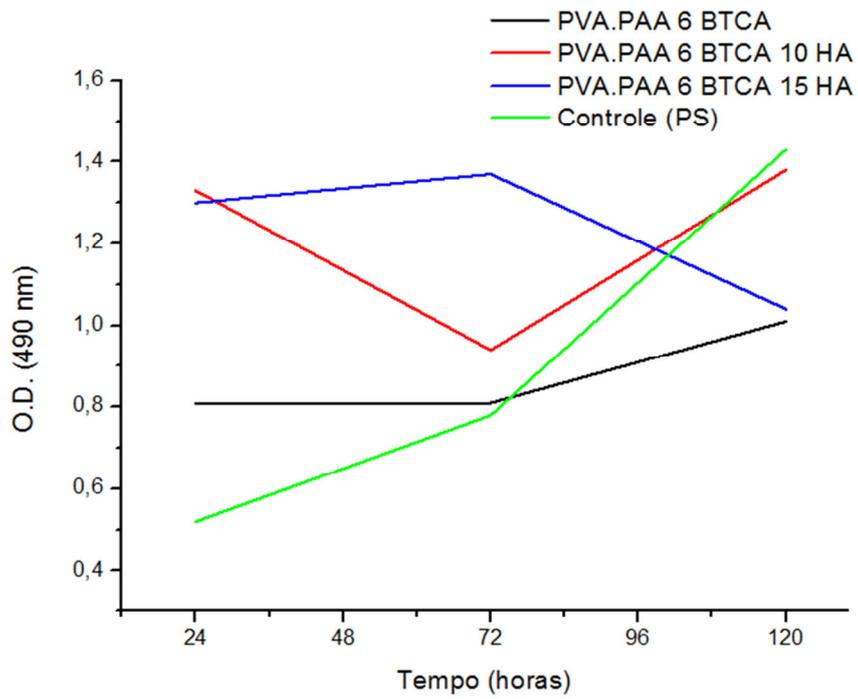


Figura 31. Ensaio de MTS nas matrizes e o PS como controle utilizando células-tronco de polpa de dente. Teste Anova: diferença significativa * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$).

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho matrizes de nanofibras formadas a partir de PVA/PAA com a incorporação da HA foram preparadas com sucesso pelo método de eletrofiação. Através de análises preliminares verificou-se que a matriz que era composta de PVA e PAA com o mínimo de 2 % BTCA não se desfazia em água. Essa mudança de comportamento foi comprovada pelas medidas de WCA, em que a matriz sem o agente reticulante resultou em um ângulo de contato de 58,5° enquanto que as matrizes com a presença do BTCA obtiveram ângulo de contato acima de 90°, caracterizando as matrizes com superfície hidrofóbicas. Além disso, a partir dos espectros do FTIR-ATR não é possível comprovar uma possível reação de esterificação entre PVA e BTCA e PVA/BTCA e o PAA, pela ausência de banda de éster nos espectros analisados. Porém, é possível verificar que essas interações podem ser por ligações de hidrogênio. A técnica de FTIR-ATR foi útil para comprovar os principais grupamentos na matriz de PVA/PAA.

Pelo MEV estudou-se a morfologia das matrizes em que foi possível comprovar a presença de nanofibras com as médias variando entre 273 nm a 437 nm. Ainda com o MEV verificou-se a presença de fibras mesmo após a matriz permanecer imersa em água por 48 h. A HA na matriz foi detectada pela técnica MEV-FEG com EDS em que no gráfico aparecem picos referentes a cálcio e fósforo que são componentes da HA, além de verificar como a HA se deposita na matriz.

As análises térmicas indicaram que a mistura PVA/PAA/HA com BTCA era totalmente miscível e que as características foram intermediárias para os polímeros puros, porém com boa estabilidade térmica para aplicação desejada.

Com o ensaio mecânico concluiu-se que os resultados foram semelhantes com as características do osso humano, para as matrizes PVA.PAA 2 BTCA 10 HA e PVA.PAA 6 BTCA 10 HA. O incremento de HA na matriz de 10 % para 15 % influencia as propriedades mecânicas, devido à aglomeração da HA como já estudado anteriormente.

Por fim, o ensaio de viabilidade celular ajudou a verificar que as células cultivadas na presença da matriz PVA.PAA 6 BTCA 15 HA mantiveram atividade por pelo menos 72 h. Sendo assim a matriz PVA/PAA/HA reticulada com BTCA é uma opção para testar como um suporte, visando aplicação em sistema osteocondutor.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Buscando complementar os estudos sobre a matriz desenvolvida neste trabalho e visando sua aplicação como um biomaterial para sistemas osteocondutores, sugerem-se alguns temas a serem investigados a partir da deste projeto.

- Analisar o grau de reticulação e a concentração de hidroxiapatita nas nanofibras;
- Análise da porosidade da matriz, já que essa é uma condição para uma melhor adesão das células;
- Realizar outros ensaios biológicos através de ensaios de adesão e proliferação celular de células tronco;
- Avaliar outros polímeros capazes de sofrer reação de reticulação com BTCA;

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Keane, T. J.; Badylak, S. F., Biomaterials for tissue engineering applications. *Seminars in Pediatric Surgery* **2014**, *23* (3), 112-118.
2. Chen, Q.; Liang, S.; Thouas, G. A., Elastomeric biomaterials for tissue engineering. *Progress in Polymer Science* **2013**, *38* (3–4), 584-671.
3. Guilak, F.; Butler, D. L.; Goldstein, S. A.; Baaijens, F. P. T., Biomechanics and mechanobiology in functional tissue engineering. *Journal of Biomechanics* **2014**, *47* (9), 1933-1940.
4. Maas, M.; Hess, U.; Rezwani, K., The contribution of rheology for designing hydroxyapatite biomaterials. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2014**, *19* (6), 585-593.
5. Paşcu, E. I.; Stokes, J.; McGuinness, G. B., Electrospun composites of PHBV, silk fibroin and nano-hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C* **2013**, *33* (8), 4905-4916.
6. Song, W.; Markel, D. C.; Wang, S.; Shi, T.; Mao, G.; Ren, W., Electrospun polyvinyl alcohol–collagen–hydroxyapatite nanofibers: a biomimetic extracellular matrix for osteoblastic cells. *Nanotechnology* **2012**, *23* (11), 115101.
7. Bhattarai, N.; Edmondson, D.; Veisoh, O.; Matsen, F. A.; Zhang, M., Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility. *Biomaterials* **2005**, *26* (31), 6176-6184.
8. Asran, A. S.; Henning, S.; Michler, G. H., Polyvinyl alcohol–collagen–hydroxyapatite biocomposite nanofibrous scaffold: Mimicking the key features of natural bone at the nanoscale level. *Polymer* **2010**, *51* (4), 868-876.
9. Çay, A.; Mohsen, M., Properties of electrospun poly(vinyl alcohol) hydrogel nanofibers crosslinked with 1,2,3,4-butanetetracarboxylic acid. *Journal of Applied Polymer Science* **2013**, *129* (6), 3140-3149.
10. Rošic, R.; Pelipenko, J.; Kristl, J.; Kocbek, P.; Bešter-Rogač, M.; Baumgartner, S., Physical characteristics of poly (vinyl alcohol) solutions in relation to electrospun nanofiber formation. *European Polymer Journal* **2013**, *49* (2), 290-298.
11. Paipitak, K.; Pornpra, T.; Mongkontalang, P.; Techitdheer, W.; Pecharapa, W., Characterization of PVA-Chitosan Nanofibers Prepared by Electrospinning. *Procedia Engineering* **2011**, *8* (0), 101-105.
12. Beppu, M. M.; Santana, C. C., PAA influence on chitosan membrane calcification. *Materials Science and Engineering: C* **2003**, *23* (5), 651-658.
13. Baştürk, E.; Demir, S.; Danış, Ö.; Kahraman, M. V., Covalent immobilization of α -amylase onto thermally crosslinked electrospun PVA/PAA nanofibrous hybrid membranes. *Journal of Applied Polymer Science* **2013**, *127* (1), 349-355.
14. Shin, S.-H.; Purevdorj, O.; Castano, O.; Planell, J. A.; Kim, H.-W., A short review: Recent advances in electrospinning for bone tissue regeneration. *Journal of Tissue Engineering* **2012**, *3* (1).
15. Rasia, G. M. Síntese e funcionalização de hidrogéis de poli (álcool vinílico). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.
16. Yang, D.; Jin, Y.; Zhou, Y.; Ma, G.; Chen, X.; Lu, F.; Nie, J., In Situ Mineralization of Hydroxyapatite on Electrospun Chitosan-Based Nanofibrous Scaffolds. *Macromolecular Bioscience* **2008**, *8* (3), 239-246.
17. Frohbergh, M. E.; Katsman, A.; Botta, G. P.; Lazarovici, P.; Schauer, C. L.; Wegst, U. G. K.; Lelkes, P. I., Electrospun hydroxyapatite-containing chitosan nanofibers crosslinked with genipin for bone tissue engineering. *Biomaterials* **2012**, *33* (36), 9167-9178.

18. Rogina, A., Electrospinning process: Versatile preparation method for biodegradable and natural polymers and biocomposite systems applied in tissue engineering and drug delivery. *Applied Surface Science* **2014**, *296* (0), 221-230.
19. Holzwarth, J. M.; Ma, P. X., Biomimetic nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **2011**, *32* (36), 9622-9629.
20. Venugopal, J.; Low, S.; Choon, A. T.; Sampath Kumar, T. S.; Ramakrishna, S., Mineralization of osteoblasts with electrospun collagen/hydroxyapatite nanofibers. *Journal Of Materials Science. Materials In Medicine* **2008**, *19* (5), 2039-2046.
21. Mitra, J.; Tripathi, G.; Sharma, A.; Basu, B., Scaffolds for bone tissue engineering: role of surface patterning on osteoblast response. *RSC Advances* **2013**, *3* (28), 11073-11094.
22. Zhang, Y.; Reddy, V. J.; Wong, S. Y.; Li, X.; Su, B.; Ramakrishna, S.; Lim, C. T., Enhanced Biomineralization in Osteoblasts on a Novel Electrospun Biocomposite Nanofibrous Substrate of Hydroxyapatite/Collagen/Chitosan. *Tissue Engineering Part A* **2010**, *16* (6), 1949-1960.
23. Zhang, Z.; Hu, J.; Ma, P. X., Nanofiber-based delivery of bioactive agents and stem cells to bone sites. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2012**, *64* (12), 1129-1141.
24. Eap, S.; Ferrand, A.; Palomares, C. M.; Hébraud, A.; Stoltz, J.-F.; Mainard, D.; Schlatter, G.; Benkirane-Jessel, N., Electrospun nanofibrous 3D scaffold for bone tissue engineering. *Bio-Medical Materials And Engineering* **2012**, *22* (1-3), 137-141.
25. Ganey, T.; Hutton, W.; Meisel, H. J., Osteoconductive carriers for integrated bone repair. *SAS Journal* **2009**, *3* (3), 108-112.
26. Perán, M.; García, M.; Lopez-Ruiz, E.; Jiménez, G.; Marchal, J., How Can Nanotechnology Help to Repair the Body? Advances in Cardiac, Skin, Bone, Cartilage and Nerve Tissue Regeneration. *Materials* **2013**, *6* (4), 1333-1359.
27. Williams, D. F., *Definitions in biomaterials*. 1987.
28. *Biomedical Nanotechnology*. CRC Press. **2005**.
29. Albrektsson, T.; Johansson, C., Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J* **2001**, *10* (2), S96-S101.
30. Uma Maheshwari, S.; Samuel, V. K.; Nagiah, N., Fabrication and evaluation of (PVA/HAp/PCL) bilayer composites as potential scaffolds for bone tissue regeneration application. *Ceramics International* **2014**, *40* (6), 8469-8477.
31. Kai, D.; Liow, S. S.; Loh, X. J., Biodegradable polymers for electrospinning: Towards biomedical applications. *Materials Science and Engineering: C* **2014**, *45* (0), 659-670.
32. Sombatmankhong, K.; Suwanton, O.; Waleetorncheepsawat, S.; Supaphol, P., Electrospun fiber mats of poly(3-hydroxybutyrate), poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), and their blends. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* **2006**, *44* (19), 2923-2933.
33. Terada, D.; Kobayashi, H.; Zhang, K.; Tiwari, A.; Yoshikawa, C.; Hanagata, N., Transient charge-masking effect of applied voltage on electrospinning of pure chitosan nanofibers from aqueous solutions. *Science and Technology of Advanced Materials* **2012**, *13* (1), 015003.
34. Zhang, Y.; Venugopal, J. R.; El-Turki, A.; Ramakrishna, S.; Su, B.; Lim, C. T., Electrospun biomimetic nanocomposite nanofibers of hydroxyapatite/chitosan for bone tissue engineering. *Biomaterials* **2008**, *29* (32), 4314-4322.
35. Zhou, Y.; Yang, H.; Liu, X.; Mao, J.; Gu, S.; Xu, W., Electrospinning of carboxyethyl chitosan/poly(vinyl alcohol)/silk fibroin nanoparticles for wound dressings. *International Journal of Biological Macromolecules* **2013**, *53* (0), 88-92.
36. Tsai, R.-Y.; Hung, S.-C.; Lai, J.-Y.; Wang, D.-M.; Hsieh, H.-J., Electrospun chitosan-gelatin-polyvinyl alcohol hybrid nanofibrous mats: Production and characterization. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* **2014**, *45* (4), 1975-1981.

37. Yang, X.; Chen, X.; Wang, H., Acceleration of Osteogenic Differentiation of Preosteoblastic Cells by Chitosan Containing Nanofibrous Scaffolds. *Biomacromolecules* **2009**, *10* (10), 2772-2778.
38. Ebewele, R. O., *Polymer Science and Technology*. 1996.
39. Lee, E.-S.; Lei, D.; Devarayan, K.; Kim, B.-S., High strength poly(vinyl alcohol)/poly(acrylic acid) cross-linked nanofibrous hybrid composites incorporating nanohybrid POSS. *Composites Science and Technology* **2015**, *110* (0), 111-117.
40. Ciência dos Materiais Multimídia. Disponível em: www.cienciadosmateriais.org.
41. Zulkifli, F. H.; Shahitha, F.; Yusuff, M. M.; Hamidon, N. N.; Chahal, S., Cross-Linking Effect on Electrospun Hydroxyethyl Cellulose/Poly(Vinyl Alcohol) Nanofibrous Scaffolds. *Procedia Engineering* **2013**, *53* (0), 689-695.
42. Gulrez, S. K. H.; Al-Assaf, S.; Phillips, G. O., *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications*. 2011; p 117-151.
43. Xu, Z. J.; Tian, Y. L.; Liu, H. L.; Du, Z. Q., Cotton fabric finishing with TiO₂/SiO₂ composite hydrosol based on ionic cross-linking method. *Applied Surface Science* **2015**, *324* (0), 68-75.
44. Li, W.; Xu, X.; Chen, S.; Zhou, X.; Li, L.; Chen, D.; Wang, X., Esterification crosslinking structures of rayon fibers with 1,2,3,4-butanetetracarboxylic acid and their water-responsive properties. *Carbohydrate Polymers* **2008**, *71* (4), 574-582.
45. Wang, X.; Zhou, X.; Wu, L.; Zhang, J.; Li, X., Influence of esterification crosslinking structures of rayon fibers with 1,2,3,4-butanetetracarboxylic acid on tensile properties. *Journal of Applied Polymer Science* **2011**, *121* (6), 3553-3559.
46. Kaczmarek, H.; Metzler, M.; Ścigalski, F., Photochemical stability of poly(acrylic acid)/silver nanocomposite. *Materials Letters* **2014**, *135* (0), 110-114.
47. Minami, H.; Kimura, A.; Kinoshita, K.; Okubo, M., Preparation of Poly(acrylic acid) Particles by Dispersion Polymerization In an Ionic Liquid. *Langmuir* **2010**, *26* (9), 6303-6307.
48. Mehrdad, A.; Samadiani, N.; Poormoosa, L., Effect of temperature and hydrochloric acid on the intrinsic viscosity of poly(acrylic acid) in aqueous solutions. *Journal of Molecular Liquids* **2013**, *187* (0), 177-182.
49. Grabowska, B.; Sitarz, M.; Olejnik, E.; Kaczmarek, K., FT-IR and FT-Raman studies of cross-linking processes with Ca²⁺ ions, glutaraldehyde and microwave radiation for polymer composition of poly(acrylic acid)/sodium salt of carboxymethyl starch – Part I. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2015**, *135* (0), 529-535.
50. Gratzl, G.; Paulik, C.; Hild, S.; Guggenbichler, J. P.; Lackner, M., Antimicrobial activity of poly(acrylic acid) block copolymers. *Materials Science and Engineering: C* **2014**, *38* (0), 94-100.
51. Zhang, S.; Gonsalves, K. E., Chitosan-calcium carbonate composites by a biomimetic process. *Materials Science and Engineering: C* **1995**, *3* (2), 117-124.
52. Chen, Q.; Kurosu, H.; Ma, L.; Matsuo, M., Elongation-induced phase separation of poly(vinyl alcohol)/poly(acrylic-acid) blends as studied by ¹³C CP/MAS NMR and wide-angle X-ray diffraction. *Polymer* **2002**, *43* (4), 1203-1206.
53. Wu, G. M.; Lin, S. J.; Yang, C. C., Preparation and characterization of PVA/PAA membranes for solid polymer electrolytes. *Journal of Membrane Science* **2006**, *275* (1-2), 127-133.
54. McKeon-Fischer, K. D.; Flagg, D. H.; Freeman, J. W., Poly(acrylic acid)/poly(vinyl alcohol) compositions coaxially electrospun with poly(ϵ -caprolactone) and multi-walled carbon nanotubes to create nanoactuating scaffolds. *Polymer* **2011**, *52* (21), 4736-4743.

55. Lu, Y.; Wang, D.; Li, T.; Zhao, X.; Cao, Y.; Yang, H.; Duan, Y. Y., Poly(vinyl alcohol)/poly(acrylic acid) hydrogel coatings for improving electrode–neural tissue interface. *Biomaterials* **2009**, *30* (25), 4143-4151.
56. Bronzino, J. D., *The Biomedical Engineering Handbook*. **2000**.
57. Pramanik, N.; Mishra, D.; Banerjee, I.; Maiti, T. K.; Bhargava, P.; Pramanik, P., Chemical Synthesis, Characterization, and Biocompatibility Study of Hydroxyapatite/Chitosan Phosphate Nanocomposite for Bone Tissue Engineering Applications. *International Journal of Biomaterials* **2009**, *2009*, 8.
58. Aoki, H., *Science and Medical Applications of Hydroxyapatite*. **1991**.
59. Li, J. J.; Kaplan, D. L.; Zreiqat, H., Scaffold-based regeneration of skeletal tissues to meet clinical challenges. *Journal of Materials Chemistry B* **2014**, *2* (42), 7272-7306.
60. Kang, R.; Luo, Y.; Zou, L.; Xie, L.; Lysdahl, H.; Jiang, X.; Chen, C.; Bolund, L.; Chen, M.; Besenbacher, F.; Bunger, C., Osteogenesis of human induced pluripotent stem cells derived mesenchymal stem cells on hydroxyapatite contained nanofibers. *RSC Advances* **2014**, *4* (11), 5734-5739.
61. Sun, F.; Zhou, H.; Lee, J., Various preparation methods of highly porous hydroxyapatite/polymer nanoscale biocomposites for bone regeneration. *Acta Biomaterialia* **2011**, *7* (11), 3813-3828.
62. Chen, C.; Deng, Y.; Yan, E.; Hu, Y.; Jiang, X., Preparation of porous chitosan-poly(acrylic acid)-calcium phosphate hybrid nanoparticles via mineralization. *Chin. Sci. Bull.* **2009**, *54* (18), 3127-3136.
63. Chen, H.; Liu, Y.; Jiang, Z.; Chen, W.; Yu, Y.; Hu, Q., Cell–scaffold interaction within engineered tissue. *Experimental Cell Research* **2014**, *323* (2), 346-351.
64. Ha, Y.-M.; Amna, T.; Kim, M.-H.; Kim, H.-C.; Hassan, M. S.; Khil, M.-S., Novel silicified PVAc/POSS composite nanofibrous mat via facile electrospinning technique: Potential scaffold for hard tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2013**, *102* (0), 795-802.
65. Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S.; Vyvyan, J. R., *Introdução à Espectroscopia*. 2010.
66. *Handbook of analytical methods for materials, Materials Evaluation and Engineering. Plymouth* **2001**.
67. Canevarolo, S. V. J., *Técnicas de caracterização de Polímeros; Artiliber: São Paulo*,. 2007.
68. Goonoo, N.; Bhaw-Luximon, A.; Jhurry, D., In vitro and in vivo cytocompatibility of electrospun nanofiber scaffolds for tissue engineering applications. *RSC Advances* **2014**, *4* (60), 31618-31642.
69. Cauch-Rodriguez, J. V.; Deb, S.; Smith, R., Effect of cross-linking agents on the dynamic mechanical properties of hydrogel blends of poly(acrylic acid)-poly(vinyl alcohol-vinyl acetate). *Biomaterials* **1996**, *17* (23), 2259-2264.
70. Zeng, J.; Haoqing, H.; Schaper, A.; Wendorff Joachim, H.; Greiner, A., Poly-L-lactide nanofibers by electrospinning – Influence of solution viscosity and electrical conductivity on fiber diameter and fiber morphology. In *e-Polymers*, 2003; Vol. 3, p 102.
71. Fong, H.; Reneker, D. H., Elastomeric nanofibers of styrene–butadiene–styrene triblock copolymer. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* **1999**, *37* (24), 3488-3493.
72. Zhang, M.; Liu, Y.; Jia, Y.; Han, H.; Sun, D., Preparation and Evaluation of Electrospun Zein/HA Fibers Based on Two Methods of Adding HA Nanoparticles. *Journal of Bionic Engineering* **2014**, *11* (1), 115-124.

73. Garcia-Torres, J.; Sylla, D.; Molina, L.; Crespo, E.; Mota, J.; Bautista, L., Surface modification of cellulosic substrates via atmospheric pressure plasma polymerization of acrylic acid: Structure and properties. *Applied Surface Science* **2014**, *305* (0), 292-300.
74. Huang, Z.-M.; Zhang, Y. Z.; Kotaki, M.; Ramakrishna, S., A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology* **2003**, *63* (15), 2223-2253.
75. Kim, C. H.; Khil, M. S.; Kim, H. Y.; Lee, H. U.; Jahng, K. Y., An improved hydrophilicity via electrospinning for enhanced cell attachment and proliferation. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **2006**, *78B* (2), 283-290.
76. Callister, W. D. J., *Ciência e Engenharia de Materiais*; LTC S.A.: Rio de Janeiro. **2002**.
77. Jacobs, C. R., *Bone mechanics handbook* (second edition): Stephen C. Cowin (Ed.); CRC Press, Boca Raton, FL, 2001, hardback ISBN 0-8493-9117-2. *Journal of Biomechanics* **2002**, *35* (5), 723-724.
78. Vashishth, D.; Behiri, J. C.; Bonfield, W., Crack growth resistance in cortical bone: Concept of microcrack toughening. *Journal of Biomechanics* **1997**, *30* (8), 763-769.
79. Gouma, P.; Xue, R.; Goldbeck, C. P.; Perrotta, P.; Balázsi, C., Nano-hydroxyapatite—Cellulose acetate composites for growing of bone cells. *Materials Science and Engineering: C* **2012**, *32* (3), 607-612.
80. Gupta, D.; Venugopal, J.; Mitra, S.; Giri Dev, V. R.; Ramakrishna, S., Nanostructured biocomposite substrates by electrospinning and electrospraying for the mineralization of osteoblasts. *Biomaterials* **2009**, *30* (11), 2085-2094.