

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE MINAS,
METALÚRGICA E DE MATERIAIS**

**OBTENÇÃO DE FIBRAS DA BLENDAS POLIMÉRICAS CELLPRENE®
COM ADITIVOS POR *CENTRIFUGAL SPINNING* E
ELECTROSPINNING PARA APLICAÇÃO COMO *SCAFFOLD***

MSc. NATHÁLIA ODERICH MUNIZ

PORTO ALEGRE

2020

NATHÁLIA ODERICH MUNIZ

**OBTENÇÃO DE FIBRAS DA BLENDAS POLIMÉRICAS CELLPRENE®
COM ADITIVOS POR *CENTRIFUGAL SPINNING* E
ELECTROSPINNING PARA APLICAÇÃO COMO *SCAFFOLD***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do Título de Doutora em Engenharia - Área de Concentração: Ciência e Tecnologia dos Materiais.

Doutoranda: MSc. Nathália Oderich Muniz

Orientador: Prof. Dr. Luís Alberto Loureiro dos Santos

PORTO ALEGRE

2020

NATHÁLIA ODERICH MUNIZ

**OBTENÇÃO DE FIBRAS DA BLENDAS POLIMÉRICAS CELLPRENE®
COM ADITIVOS POR *CENTRIFUGAL SPINNING* E
ELECTROSPINNING PARA APLICAÇÃO COMO *SCAFFOLD***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do Título de Doutora em Engenharia - Área de Concentração: Ciência e Tecnologia dos Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Luís Alberto Loureiro dos Santos

Aprovada em: Porto Alegre, 29 de julho de 2020.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Álvaro Meneguzzi

Dra. Maria Beatriz Nunes de Oliveira Borsa

Dra. Paula Cristina Dartora

Dedico este trabalho ao meu pai, Paulo (in memoriam), à minha mãe, Suzana e ao meu irmão, Frederico. Obrigada pelo amor incondicional que me faz querer seguir em frente.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Luís Alberto Loureiro dos Santos por toda compreensão e confiança depositada no desenvolvimento desse projeto, além de sua disponibilidade, motivação e paciência nas inúmeras vezes em que precisei de auxílio. Muito obrigada pelos anos de orientação, amizade e por manter minha posição de puxa-saca mor.

Aos colegas do Labiomat por todo o carinho, coleguismo, discussões políticas, risadas, conhecimentos compartilhados e amizade construída.

À colega e amiga Fernanda Vechietti pelo seu incentivo incansável durante todos esses anos, por me auxiliar em tudo que estava ao seu alcance e, em especial por sua amizade.

Ao bolsista Guilherme Rech Anesi por todo auxílio na elaboração e caracterização das amostras, pela sua dedicação, compromisso e por tornar possível a finalização desse doutorado.

Ao Prof. Dr. Gustavo Victor Guinea pela orientação durante minha estada no Centro de Tecnologia Biomédica (UPM/Espanha) e aos colegas por tornarem minha experiência muito enriquecedora. Um agradecimento especial à colega e amiga Blanca Bermudéz. Te echo de menos!

À Capes e à UFRGS, pela bolsa de estudos fornecida e pela oportunidade de desenvolver um trabalho em uma instituição de prestígio e qualidade. Ao Erasmus pela bolsa de estudos para realização do doutorado-sanduíche na Espanha.

A todos os amigos e familiares pelo incentivo, apoio e amor.

RESUMO

Um dos principais desafios da Engenharia de Tecidos é produzir matrizes 3D com uma estrutura suficientemente favorável para a viabilidade e propagação das células. Dentre as dificuldades existentes está o desenvolvimento de uma estrutura que permita a manutenção da viabilidade de células por meio de uma porosidade que promova a troca de nutrientes e gases, mas que possua uma resistência mecânica adequada para a região visada. Em prol da diversificação de materiais e técnicas de processamentos utilizados na Engenharia de Tecidos, garantindo assim sua redução de tempos e custos, permitindo sua ampla e irrestrita acessibilidade, faz-se imprescindível a continuidade do estudo de um dos mais recentes biomateriais criados: blenda de poli (ácido láctico-co-glicólico, PLGA) e poliisopreno (PI), registrado como Cellprene[®]. Estudos recentes utilizando a blenda mencionada demonstraram excelentes resultados quando empregada como implante em testes com animais. Sua viabilidade como biomaterial, tanto na sua utilização como *stent* traqueal quanto em aplicações na região cranial e/ou ambiente ósseo, já foi avaliada e comprovada como uma das grandes alternativas existentes atualmente. Desta forma, o objetivo deste estudo foi obter micro e nanofibras de Cellprene[®] por *electrospinning* e *centrifugal spinning* para posterior uso como *scaffold* na Engenharia de Tecidos. A composição da blenda foi modificada para obtenção de melhores resultados, adicionando polietilenoglicol (PEG) como plastificante e hidroxiapatita (HAp) como promovedor de maior bioatividade. Ambos componentes, PEG (15% e 20% em massa) e HAp (10% e 15% em massa) foram adicionados durante o processo de obtenção da blenda. Após a obtenção das fibras, foram realizadas as caracterizações termoquímicas e morfológicas. As fibras com 10% de HAp em sua composição e processadas por *centrifugal spinning* (com 5% em massa de soluto) apresentaram os melhores resultados morfológicos. Essas fibras foram também analisadas quanto a sua bioatividade, viabilidade e adesão celular *in vitro* demonstrando resultados satisfatórios para emprego futuro como *scaffold*.

Palavras-chave: Fibras, hidroxiapatita, PEG, *electrospinning*, *centrifugal spinning*, Cellprene[®].

ABSTRACT

Development of 3D structure that allows the maintenance of cell viability over porosity that promotes the exchange of nutrients and gases, but which has adequate mechanical strength to that referred region is one of the major Tissue Engineering challenges. Considering the diversification of materials and processing techniques used in biomaterials, ensuring a reduction of time and costs, allowing its broad and unrestricted accessibility, it was essential to continue the study of one of the latest biomaterials developed: poly (lactic acid-co-glycolic, PLGA) and poly (isoprene, IR) blend, registered as Cellprene[®]. Novel researches using the mentioned blend demonstrated excellent results when employed as implant in animal tests. Viability as biomaterial, in their use such as tracheal *stent* as for applications in the cranial region and/or bone environment, has been evaluated and proven as a great alternative. Thus, the purpose of this study was to obtain micro- and nano fibers based on Cellprene[®] by electrospinning and centrifugal spinning in order to further use as scaffold in tissue engineering. The blend composition was modified to achieve the best result, adding polyethylene glycol (PEG – 15 wt% and 20 wt%) as plasticizer. Hydroxyapatite (HAp – 10 wt% and 15 wt%) was added to promote bioactivity. Both materials were inserted during the process of obtaining the blend. Thermochemical and morphological characterization were performed. Fibers with 10% HAp in its composition and processed by centrifugal spinning (5 wt%) presented the best morphological results. These fibers were also analyzed for its bioactivity, viability and cell adhesion *in vitro* showing satisfactory results for future use as scaffold.

Keywords: Fibers, hydroxyapatite, PEG, electrospinning, centrifugal spinning, Cellprene[®].

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Principais aplicações dos biopolímeros. Adaptado de KALIYATHAN et al. (2018), p. 73.	17
Figura 3.2. Produção global de bioplásticos. Adaptado de <i>European Bioplastics, novo Institute</i> (2018).	18
Figura 3.3. Extração do látex da <i>Hevea brasiliensis</i> . Em destaque representação da árvore e seus frutos.	21
Figura 3.4. Estrutura química do PI. A letra n representa o número de repetições do isômero <i>cis</i> -1,4-poliisopreno (GUERRA, 2018).....	23
Figura 3.5. Representação da cadeia de PI e de uma partícula de látex. Adaptado de SRIRING et al. (2018), p. 128.	23
Figura 3.6. Aplicações da NR no mundo em 2015. Valores estimados pelo IRSG. Adaptado do Relatório da União Europeia (BLENGINI et al., 2017), p. 71.....	25
Figura 3.7. Estruturas de alguns biopolímeros sintéticos.	28
Figura 3.8. Estrutura química do PLGA e dos monômeros (lático e glicólico). As letras m e n representam o número de repetições de cada monômero.	30
Figura 3.9. Estrutura química do PEG.	32
Figura 3.10. Exemplo de estruturas do PEG. Adaptado da imagem de WANG et al. (2019), p. 1022.	34
Figura 3.11. Ilustração dos principais formatos de <i>scaffolds</i> : matriz sólida 3D porosa, rede de micro e/ou nanofibras, microesfera porosa e hidrogel. Adaptado de PARK et al. (2017), p. 85.	42
Figura 3.12. Ilustração das principais aplicações dos <i>scaffolds</i> : a) angiogênese; b) regeneração de ossos e cartilagens; c) curativo para feridas; d) regeneração de células nervosas. Adaptado de CHUNG & PARK (2007), p. 255.	44
Figura 3.13. Ilustração em detalhe do funcionamento de um <i>stent</i> . Adaptado de PARK et al. (2017), p. 94.....	44
Figura 3.14. Ilustração em detalhe da regeneração óssea e de cartilagem por um <i>scaffold</i> . Adaptado de PARK et al. (2017), p. 92.....	45
Figura 3.15. Ilustração em detalhe da regeneração de pele por um curativo. Adaptado de PARK et al. (2017), p. 91.....	45
Figura 3.16. Ilustração em detalhe do mecanismo de regeneração de cartilagem por injeção de microesferas porosas. Adaptado de CHUNG & PARK (2007), p. 258.	45
Figura 3.17. Ilustração do mecanismo de liberação controlada de fármaco. Adaptado de JACOB et al. (2018), p. 45.	46
Figura 3.18. Métodos de fabricação de <i>scaffolds</i> porosos: a) <i>Solvent casting</i> e lixiviação de partículas; b) Separação de fases termicamente induzida; c) Secagem por congelamento; e d) Impressão 3D. Adaptado de PARK et al. (2017), p. 86.	47
Figura 3.19. Método de fabricação de fibras por ES. Adaptado de PARK et al. (2017), p. 86.....	48
Figura 3.20. Método de fabricação de fibras por CS. Adaptado de ROGALSKI; BASTIAANSEN; PEIJS (2017), p. 100.	49
Figura 4.1. Fluxograma da metodologia empregada neste trabalho.....	51
Figura 4.2. Detalhe dos dois coletores utilizados na produção via ES. O coletor à esquerda organiza as fibras em formato de fitas, e o da direita apresenta-se em formato de tubos.	55
Figura 4.3. Exemplo ilustrativo de um equipamento de CS com um coletor cilíndrico acoplado ao sistema.....	56

Figura 5.1. Espectros de FTIR da blenda Cellprene [®] e das composições contendo 10% e 15% de HAp.	59
Figura 5.2. Espectros de FTIR da blenda Cellprene [®] e das composições contendo 15% e 20% de PEG.	61
Figura 5.3. Espectros de FTIR da blenda Cellprene [®] e das composições: 10% HAp/ 15% PEG, 15% HAp/ 15% PEG, 10% HAp/ 20% PEG e 15% HAp/ 20% PEG.	62
Figura 5.4. Termogramas do 2º ciclo de aquecimento das composições com destaque nos picos das Tg's (a) 10% HAp e 15% HAp; (b) 15% PEG e 20% PEG; (c) 10% HAp/15% PEG e 15% HAp/15% PEG; (d) 10% HAp/20% PEG e 15% HAp/20% PEG.	63
Figura 5.5. Curvas de TGA de (a) composições com HAp e (a') derivadas; (b) composições com PEG e (b') derivadas; (c) composições com 10% HAp/PEG e (c') derivadas; (d) composições com 15% HAp/PEG e (d') derivadas.	65
Figura 5.6. Difrátograma do pó de HAp.	67
Figura 5.7. Análise granulométrica da HAp.	68
Figura 5.8. Imagens realizadas por MEV do pó de HAp. Escalas de 50 e 10 µm.	68
Figura 5.9. Valores de viscosidade média obtidos com concentrações de 3% em massa da blenda Cellprene [®] e suas composições.	69
Figura 5.10. Imagens realizadas durante o ensaio de molhabilidade: (a) Cellprene [®] ; (b) 10% HAp; (c) 15% HAp; (d) 15% PEG; (e) 20% PEG; (f) 10% HAp/15% PEG; (g) 10% HAp/20% PEG; (h) 15% HAp/15% PEG; (i) 15% HAp/20% PEG.	70
Figura 5.11. Imagens da rugosidade superficial (a) Cellprene [®] (b) 10% HAp, (c) 15% HAp.	73
Figura 5.12. Imagens da rugosidade superficial (a) 15% PEG, (b) 20% PEG, (c) 10% HAp/15% PEG.	74
Figura 5.13. Imagens da rugosidade superficial (a) 10% HAp/20% PEG, (b) 15% HAp/15% PEG e (c) 15% HAp/20% PEG.	75
Figura 5.14. Imagens das amostras obtidas por ES e CS nos formatos fitas/fibras e tubos.	77
Figura 5.15. Espectros das composições pós-processamentos (ES e CS): (a) 10% HAp; (b) 15% HAp; (c) 15% PEG e (d) 20% PEG.	78
Figura 5.16. Espectros das composições pós-processamentos (ES e CS): (a) 10% HAp/15% PEG; (b) 15% HAp/15% PEG; (c) 10% HAp/20% PEG e (d) 15% HAp/20% PEG.	79
Figura 5.17. Imagens realizadas por MEV das fibras obtidas via ES e CS, sendo elas: 10% HAp, 15% HAp, 15% PEG e 20% PEG. Escala: 100 µm. No topo de cada micrografia, à direita, imagens realizadas por MO. Escala: 0,5 mm. Em destaque os <i>beads</i> (círculos) e a diferença de diâmetros (setas).	81
Figura 5.18. Imagens realizadas por MEV das fitas obtidas via ES e CS, sendo elas: 10% HAp/15% PEG, 15% HAp/15% PEG, 10% HAp/20% PEG e 15% HAp/20% PEG. Escala: 100 µm. No topo de cada micrografia, à direita, imagens realizadas por MO. Escala: 0,5 mm. Em destaque os <i>beads</i> (círculos) e a diferença de diâmetros (setas).	83
Figura 5.19. Imagens realizadas por MEV das fibras obtidas via ES e CS. Escala: 10 µm.	85
Figura 5.20. Mecanismo da formação da fibra. Adaptado de HOU et al. (2017), p. 309.	86
Figura 5.21. Imagem da amostra 15% HAp/15% PEG produzida via CS com a ocorrência dos “dedos de fibra”	87
Figura 5.22. Valores médios dos diâmetros das fibras obtidas por ES e CS.	87
Figura 5.23. Microscopias das fibras obtidas via CS contendo 10% HAp e processada com 3% e 5% de massa em soluto. Escalas de MO: 1 mm (3%) e 0,5 mm (5%); MEV: 10 µm.	89
Figura 5.24. Esquerda: imagem das fibras 10% HAp obtidas via CS (5% de massa em soluto). Escala: 1 µm. Direita: gráfico dos diâmetros das fibras.	89

Figura 5.25. Micrografias das membranas de 10% HAp imersas em solução SBF por 7, 14 e 21 dias. Escala: 10 μm	91
Figura 5.26. Micrografias das fibras de 10% HAp imersas em solução SBF por 7, 14 e 21 dias. Escala: 10 μm . Em destaque, região selecionada para análise por EDS.....	91
Figura 5.27. Espectro de EDS das estruturas formadas após 21 dias de incubação.....	92
Figura 5.28. Gráfico de densidade celular (células/mL) após 4, 48 e 72 horas de ensaio de viabilidade celular das fibras 10% HAp.	93
Figura 5.29. Micrografias das células MSC cultivadas em contato com fibras 10% HAp e controle durante 4, 48 e 72 horas. Escala: 50 μm	94
Figura 5.30. Gráfico de densidade celular (células/mL) após 1, 2, 4 e 8 horas de ensaio de adesão celular das fibras 10% HAp.	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Biopolímeros naturais: origem e propriedades.....	20
Tabela 4.1. Amostras e suas composições.	52
Tabela 5.1. Bandas de absorção relativas dos principais modos vibracionais do PLGA, PI, PEG e HAp.	60
Tabela 5.2. Valores de ângulo de contato obtidos por ensaio de molhabilidade.....	70
Tabela 5.3. Medidas de rugosidade superficial das membranas.	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C.	Antes de Cristo
ABC	Acetato Butirato Celulose
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> ¹ / Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
BR	Borracha de Polibutadieno
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> / Albumina de Soro Bovino
CR	Borracha de Policloropreno
CS	<i>Centrifugal Spinning</i>
d.C.	Depois de Cristo
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i> / Análise Calorimétrica Diferencial
DRX	Difração de Raio-X
ECM	<i>Extracellular Matrix</i> / Matriz Extracelular
EDS	<i>Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy</i> / Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raio-X
EPDM	Borracha de Etileno-Propileno-Dieno
ES	<i>Electrospinning</i> / Eletrofição
ET	Engenharia de Tecidos
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> / Soro Bovino Fetal
FCIS	Formação de Compósito <i>In-situ</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGIS	Formação de Gel <i>In-situ</i>
FIIS	Formação de Implante <i>In-situ</i>
FTIR	<i>Fourier-Transform Infrared Spectroscopy</i> / Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
HAp	Hidroxiapatita
HSA	<i>Human Serum Albumin</i> / Albumina de Soro Humano
ICDD [®]	<i>International Centre for Diffraction Data</i>
IP	Iodeto de Propídio
IRSG	<i>International Rubber Study Group</i>
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
JCPDS	<i>Joint Committee on Powder Diffraction Standards</i>
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura

¹ As abreviaturas foram descritas de acordo com seu idioma original. Traduções para o português foram realizadas para melhor compreensão.

MO	Microscópio Óptico
MSC	<i>Mesenchymal Stems Cells</i> / Células-Tronco Mesenquimais
m_0	Massa Inicial
m_t	Massa Final
NBR	Borracha Nitrílica
NIPS	<i>Non-Solvent Induced Phase Separation</i> / Separação de Fases Não Induzida por Solvente
NR	<i>Natural Rubber</i> / Borracha Natural
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> / Tampão Fosfato-Salino
PCL	Poli (ϵ -caprolactona)
PDEA	Poli (dietilacrilamida)
PDLA	Poli (ácido D-láctico)
PEEK	Poli (éter-éter-cetona)
PEG	Poli(etilenoglicol
PEO	Polióxido de Etileno
PES	Polietersulfona
PET	Poli (tereftalato de etileno)
PGA	Poli (ácido glicólico)
PHB	Poli (hidroxibutirato)
PThP	Politiofeno Fenileno
PI	Poliisopreno
PLA	Poliácido láctico
PLL	Poli-L-lisina
PLGA	Poli (ácido láctico-co-glicólico)
PLLA	Poli (ácido L-láctico)
PVA	Álcool Polivinílico
PVP	Poli (vinilpirrolidona)
R_a	Rugosidade Superficial
RGD	Arginina-glicina-aspartato
SBC	Copolímero em Bloco de Estireno
SBF	Fluido Corporal Simulado
SBR	Borracha de Estireno-butadieno
T_{cc}	Temperatura de Cristalização à Frio
TCP/ β -TCP/ α -TCP	Fosfato Tricálcico (fase beta/alfa)
T_f	Temperatura de Fusão
T_g	Temperatura de Transição Vítreia
TGA	<i>Thermogravimetric Analysis</i> / Análise Termogravimétrica

TIPS	<i>Thermally Induced Phase Separation/</i> Separação de Fases Termicamente Induzida
TMC	Policarbonato de Trimetileno
TPE	Borracha Termoplástica
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor/</i> Fator de Crescimento Vascular Endotelial

LISTA DE SÍMBOLOS

wt%	Porcentagem em massa
<i>cis</i> -	Isomeria geométrica: os substituintes estão no mesmo lado da dupla ligação
cm ⁻¹	Número de onda
cos	Cosseno
g/mol	grama por mol - Massa Molar
GPa	Giga Pascal
mA	Miliamper
mL	Mililitro
MPa	Mega Pascal
Mn	Massa molar numérica média
Pa	Pascal
rpm	Rotações por minuto
<i>trans</i> -	Isomeria geométrica: os substituintes estão no lado oposto da dupla ligação
α	Letra Grega Alfa
β	Letra Grega Beta
θ	Letra Grega Teta
η	Viscosidade Dinâmica
λ	Comprimento de onda
K	Constante de Scherrer
ν	Estiramento
δ	Dobramento angular simétrico no plano
μL	Micro litro
ω	Letra Grega Ômega

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS.....	IV
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	V
LISTA DE SÍMBOLOS	VIII
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	14
3. REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 Os BIOMATERIAIS	15
3.1.1 AS BIOCERÂMICAS	18
3.1.2 OS BIOPOLÍMEROS NATURAIS	19
3.1.2.1 POLIISOPRENO	21
3.1.3 OS BIOPOLÍMEROS SINTÉTICOS.....	26
3.1.3.1 POLI (ÁCIDO LÁCTICO-CO-GLICÓLICO).....	29
3.1.3.2 POLIETILENOGLICOL	32
3.1.4 AS BLENDS POLIMÉRICAS	34
3.2 FIBRAS POLIMÉRICAS E <i>SCAFFOLDS</i> NA ENGENHARIA DE TECIDOS.....	38
3.2.1 <i>SCAFFOLDS</i> E SUAS PROPRIEDADES	39
3.2.2 MÉTODOS DE FABRICAÇÃO DE <i>SCAFFOLDS</i>	46
4. MATERIAIS E MÉTODOS	50
4.1 ETAPA 1 - PRODUÇÃO, PROCESSAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE CELLPRENE® COM ADITIVOS	52
4.1.1 OBTENÇÃO DAS MEMBRANAS POLIMÉRICAS.....	52
4.1.2 CARACTERIZAÇÕES DAS MEMBRANAS POLIMÉRICAS	52
4.1.2.1 CARACTERIZAÇÕES TERMOQUÍMICAS E TERMOFÍSICAS	52
4.1.2.2 CARACTERIZAÇÃO DA HIDROXIAPATITA.....	53
4.1.2.3 CARACTERIZAÇÕES MORFOLÓGICAS E REOLÓGICAS	54
4.2 ETAPA 2 - OBTENÇÃO DE FIBRAS PELAS TÉCNICAS DE <i>ELECTROSPINNING</i> E <i>CENTRIFUGAL SPINNING</i>	54
4.2.1 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS VIA <i>ELECTROSPINNING</i>	54
4.2.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS VIA <i>CENTRIFUGAL SPINNING</i>	55
4.2.3 MOLDAGEM DE TUBOS POR <i>CENTRIFUGAL SPINNING</i>	55
4.2.4 CARACTERIZAÇÃO DAS FIBRAS POLIMÉRICAS E TUBOS	56
4.2.4.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA	56
4.2.4.2 CARACTERIZAÇÕES MORFOLÓGICAS DAS FIBRAS E TUBOS	56

4.3	ETAPA 3 - AVALIAÇÃO DA MELHOR COMPOSIÇÃO E CARACTERIZAÇÕES	57
4.3.1	ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	57
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	59
5.1	CARACTERIZAÇÃO DAS COMPOSIÇÕES POLIMÉRICAS	59
5.1.1	CARACTERIZAÇÕES TERMOQUÍMICAS E TERMOFÍSICAS.....	59
5.1.2	CARACTERIZAÇÃO DA HIDROXIAPATITA	66
5.1.3	CARACTERIZAÇÕES MORFOLÓGICAS E REOLÓGICAS	68
5.2	CARACTERIZAÇÃO DAS FIBRAS OBTIDAS VIA <i>ELECTROSPINNING</i> E <i>CENTRIFUGAL SPINNING</i>	76
5.2.1	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA	77
5.2.2	CARACTERIZAÇÕES MORFOLÓGICAS	80
5.3	AVALIAÇÃO DA MELHOR COMPOSIÇÃO E CARACTERIZAÇÕES	88
5.3.1	ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	90
6.	CONCLUSÕES.....	96
7.	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	97
	ANEXO	110

1. INTRODUÇÃO

Hospitais e centros de saúde realizam diariamente procedimentos cirúrgicos para substituir ou reconstruir tecidos e órgãos danificados, estes resultantes de acidentes, doenças degenerativas, doenças crônicas, malformações congênitas, câncer, entre outros. No entanto, a disponibilidade de enxertos e transplantes não consegue suprir a demanda atual. Materiais funcionais e versáteis sempre foram cruciais para o desenvolvimento e avanço das civilizações, e isso não seria diferente para a área da saúde. Aliando a necessidade de suprir a demanda supracitada à funcionalidade e versatilidade dos materiais, surge a Engenharia de Tecidos (ET).

A ET pode ser definida como o cultivo e adesão de células humanas *in vitro* em um *scaffold* (ou arcabouço). O *scaffold* por si só representa “o seu coração”, levando em conta que o crescimento de células em um ambiente artificial não seria possível sem uma estrutura bem projetada e apropriada (EIVAZZADEH-KEIHAN et al., 2019).

De maneira geral, estas células se proliferam, migram e se diferenciam em um tecido específico enquanto produzem os componentes de matriz extracelular (no inglês, ECM) necessários para criar tecido. O objetivo da ET é, portanto, desenvolver um novo tecido ou órgão substituto para facilitar o restauro e a manutenção de funções biológicas (KIM; MOONEY, 1998; SACHOLS; CZERNUSZKA, 2003; ZHANG et al., 2010).

Em ordem de produzir estas matrizes (*scaffolds*), materiais com propriedades biocompatíveis vêm sendo estudados incansavelmente a fim de se obter a melhor relação funcionalidade X biocompatibilidade. Estas matrizes têm por essência proporcionar uma estrutura 3D temporária para as células. Dentre as propriedades exigidas para a matriz estão: biodegradabilidade controlada, adequada resistência mecânica e, principalmente, porosidade controlada (responsável pela difusão de nutrientes, proteínas terapêuticas e catabólitos).

Para obter estes *scaffolds*, diversas técnicas podem ser empregadas: lixiviação de partículas salinas em polímeros dissolvidos; secagem por congelamento; moldagem por injeção; separação de fase por indução térmica; impressão 3D; *electrospinning* (ES); *centrifugal spinning* (CS); entre outras. Cada técnica permite adquirir matrizes com uma estrutura interna específica, com suas vantagens e desvantagens, visando a um espaçamento satisfatório para proliferação celular em ambiente tridimensional durante a cultura (PISKIN et al., 2008; SHIN et al., 2005; SMITH et al., 2009).

Conforme mencionado por Manfred Gordon, o último século se viu diante da “revolução das cadeias poliméricas”, permitindo a criação de polímeros com propriedades espetaculares e diferentes estruturas para as mais variadas funções (JOHN et al., 2019). Dentre essas funções, destacam-se os *scaffolds*.

O poli (ácido láctico-co-glicólico, PLGA), parafraseando os autores ROOINTAN et al. (2018), é o “mais audacioso e flexível entre os biomateriais”, além de ser um dos mais populares polímeros biocompatíveis e ter sido amplamente difundido nos anos 60 por seu emprego como linha de sutura (MIDDLETON; TIPTON, 2000). Trata-se de um copolímero de ésteres alifáticos, que tem sido largamente usado como implantes que degradam e são absorvidos pelo organismo (PANDEY; PANDEY; ASWATH, 2008; REZENDE; DUEK, 2002).

Outro polímero altamente biocompatível é a borracha de isopreno ou látex: nomenclatura *cis*-1,4-poliisopreno (BALABANIAN et al., 2006). Além de sua biocompatibilidade, apresenta alta tenacidade e módulo elástico, fatores positivos para aplicação em produtos que serão submetidos à tração e à fadiga.

Com objetivo de melhorar as características do material, mediante o aprimoramento de suas propriedades, blendas poliméricas são empregadas nas mais diversas áreas. Por definição, uma blenda polimérica é a mistura física de dois ou mais polímeros ou copolímeros que não estão ligados por ligações covalentes (STEVENS, 1999).

Recentes pesquisas utilizando a blenda polimérica de PLGA e PI, comercialmente conhecida como Cellprene[®], demonstraram resultados excelentes quando empregada como implante em testes *in vivo* (MARQUES, 2013). Por se tratar de um material recente, desenvolvido em 2011 (MARQUES, 2011), as técnicas empregadas para obtenção de fibras da blenda foram gotejamento e ES. No entanto, as fibras obtidas por ES não foram avaliadas em cultivos celulares em virtude da presença de resíduos de solvente.

Na última década, o ES foi constantemente diversificado para aplicação na ET (LIU, 2014; ZHOU et al., 2014). Destaca-se, também, o CS, uma técnica de produção de fibras por intermédio de altas rotações que tem permitido alcançar valores de espessura de fibras em escala nanométrica. Como exemplo, a pesquisa de LOORDHUSWAMY et al. (2014) afirma que as fibras obtidas por esta técnica são mais apropriadas para uso como *scaffold* por conta de sua estrutura “fofa”, como uma nuvem.

Desta forma, este trabalho se propõe a estudar e avaliar a viabilidade de produzir fibras da blenda Cellprene[®] com adição de polietilenoglicol (PEG) como plastificante e

hidroxiapatita (HAp) como promovedor de maior bioatividade, pelas técnicas ES e CS a fim de compará-las, e, com os melhores resultados, produzir *scaffolds*.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivo principal a obtenção de fibras nanométricas da blenda polimérica Cellprene[®] com adição de PEG e HAp, comparando as técnicas de processamento ES e CS e, a partir disso, caracterizá-las e estudar sua viabilidade como *scaffold* na ET.

Objetivos específicos:

- Obtenção de composições poliméricas da blenda Cellprene[®] com aditivos;
- Obtenção de fibras por ES;
- Obtenção de fibras por CS;
- Comparação entre as técnicas de processamento e obtenção de fibras com melhores resultados variando concentração do soluto;
- Avaliação da bioatividade *in vitro*;
- Comprovação da viabilidade como biomaterial *in vitro*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 OS BIOMATERIAIS

Materiais desenvolvidos com o objetivo de interagir com o meio fisiológico, e por esse quer se dizer fluídos corpóreos/tecidos, definem os chamados Biomateriais (PARK, 1979).

Antes de essa definição ter sido proposta, diversas discussões ocorreram a fim de tentar encontrar uma que pudesse evitar possíveis equívocos e limitações, já que continuamente novos materiais surgiam com distintas aplicações. Em 1982, ocorreu a Conferência de Consenso em Biomateriais para Aplicações Clínicas na qual foi definido que os biomateriais são: “Toda substância (com exceção de drogas) ou combinação de substâncias, de origem sintética ou natural, que durante um período de tempo indeterminado é empregada como um todo ou parte integrante de um sistema para tratamento, ampliação ou substituição de quaisquer tecidos, órgãos ou funções corporais”. Assim sendo, enquadram-se todos os materiais empregados na medicina, odontologia, farmacologia e medicina veterinária, incluindo-se também os materiais em forma de implantes que estão em contato com o tecido do corpo.

No final dos anos 90 foi publicado por Williams (1999) um dicionário de biomateriais, definindo-os como “um material destinado a interagir com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo”. O mesmo autor, em 2009, ainda publicaria um novo artigo demonstrando que sua definição se encontrava obsoleta, visto que, com o avanço da tecnologia, alguns dispositivos não seriam considerados biomateriais por não fazerem interface com o tecido, como, por exemplo, componentes microeletrônicos que fornecem energia para algum órgão e que são hermeticamente fechados.

Assim, ressignifica: “Um biomaterial é uma substância que tenha sido manipulada para levar uma forma que, por si só ou como parte de um sistema complexo, é usado para dirigir, por controle das interações com os componentes de sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou de diagnóstico, em humano ou medicina veterinária” (WILLIAMS, 2009).

Ainda que todo o debate a respeito da definição tenha ocorrido a partir do século XX, não significa que os biomateriais em si tenham surgido neste período. Com base em registros históricos, sabe-se que biomateriais já existiam desde a Pré-História, como no caso dos implantes dentários feitos de conchas marinhas ou de ferro no período de 600 a.C. e as

evidências de suturas realizadas em grandes feridas que datam em torno de 32.000 anos (HACKER; KRIEGHOFF; MIKOS, 2019).

No que tange à definição de um implante, o mesmo se caracteriza por ser um material biocompatível, ou seja, que não promove reações nocivas na região do implante ou no sistema biológico; que não deteriora ao interagir com os tecidos, excluindo-se o caso em que o material é biodegradável; que é biofuncional, mantendo suas funções ativas pelo tempo planejado e, por fim, esterilizável (RAVAGLIOLI; HULBERT; KRAJEWSKI, 1992, apud SANTOS, 2002, p. 6).

Sobre a questão da compatibilidade com o meio biológico (HENCH; WILSON, 1993), os biomateriais são categorizados em:

- BIOTOLERÁVEIS, em que uma camada de tecido fibroso é formada e envolve o material, isolando-o dos tecidos adjacentes. Quanto maior a espessura da camada, menor é a tolerabilidade do material pelo organismo. São praticamente todos os polímeros sintéticos, assim como a grande maioria dos metais.
- BIOINERTES, aqui os materiais são basicamente ignorados pelo organismo, ocorrendo uma formação de tecido fibroso mínimo ou praticamente inexistente. São eles: alumina, zircônia, titânio, ligas de titânio e carbono.
- BIOATIVOS, o material implantado reage ativamente com o tecido ósseo (osteointegração), promovendo ligações químicas por conta de sua alta compatibilidade. Os principais materiais desta classe são os vidros e vitrocerâmicas à base de fosfato de cálcio, HAp e outros compostos de fosfato de cálcio.
- BIOABSORVÍVEIS (BIODEGRADÁVEIS), neste caso os materiais, por conta do contato com os tecidos, são degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo após um determinado período de tempo. Possuem a vantagem de não necessitar uma nova intervenção cirúrgica para a retirada do material de implante. São eles: fosfato tricálcico (TCP), poliácido láctico (PLA), entre outros.

Além das categorias de biocompatibilidade, os biomateriais (como todos os outros materiais já previamente mencionados na lista anterior) podem ser divididos de acordo com suas estruturas químicas, ou seja: polímeros, cerâmicos, metais e compósitos.

Por conta de sua ampla diversidade de propriedades físicas e mecânicas, processabilidade e desempenho, os polímeros/biopolímeros estão cada vez mais visados pelos mais variados setores científicos e industriais. Os polímeros biodegradáveis atraem ainda mais atenção por serem capazes de se desfazer e serem excretados ou reabsorvidos sem necessidade de remoção ou de algum outro procedimento invasivo (ULERY; NAIR; LAURENCIN, 2011).

A Figura 3.1 apresenta as principais aplicações na medicina e odontologia:



Figura 3.1. Principais aplicações dos biopolímeros. Adaptado de KALIYATHAN et al. (2018), p. 73.

Recentemente, a *European Bioplastics, nova-Institute* (2018)² forneceu dados informando que a produção global de polímeros biodegradáveis está em constante crescimento, crescendo de 885 mil toneladas em 2017 para 912 mil toneladas em 2018. O mesmo ocorreu para os polímeros não biodegradáveis, passando de 1.175 toneladas para 1.200 toneladas nos anos de 2017 e 2018. Estatísticas demonstram que a capacidade de produção de bioplásticos crescerá de 2,11 milhões de toneladas em 2018 para aproximadamente 2,62 milhões de toneladas em 2023 (Figura 3.2).

² *European Bioplastics, novo Institute* (2018); Disponível em: <<https://www.european-bioplastics.org/market/>>.

Capacidade de produção global de bioplásticos



Figura 3.2. Produção global de bioplásticos. Adaptado de *European Bioplastics, novo Institute* (2018).

3.1.1 AS BIOCERÂMICAS

Materiais cerâmicos com aplicação médica são amplamente utilizados como substitutos ósseos, revestimento de outros biomateriais, além de aplicações como, por exemplo, preenchimento de cavidades (VOLKMER, 2006). Características como alta dureza, alta resistência à compressão e ao desgaste tornam as biocerâmicas atrativas para estes empregos.

Biocerâmicas à base de fosfato de cálcio são conhecidos por possuírem um comportamento bioativo, promovendo a osteoindução e a osteocondução dos tecidos (TROMMER; SANTOS; BERGMANN, 2007). A HAp é uma das principais biocerâmicas, por conta de sua similaridade com os componentes inorgânicos dos ossos e dos dentes. Com fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, foi um dos primeiros materiais utilizados em procedimentos cirúrgicos (RAVAGLIOLI; KRAJEWSKI, 1992). Sua forma pura apresenta uma fase apatita estequiométrica com uma razão molar de Ca/P de 1,67, sendo o fosfato de cálcio mais estável em temperatura ambiente e com pH variando entre 4 e 12 (LIN; CHANG, 2015).

Diversas pesquisas reportam a adição de HAp em biopolímeros com o objetivo de recriar a estrutura química do osso humano (GOUMA et al., 2012; KIM et al., 2012). Ainda, pode ser adicionada com o intuito de diminuir a taxa de degradação de um material, o que permite uma liberação mais prolongada de fármaco, como exposto no trabalho de ENAYATI et al. (2017). A diminuição da taxa de degradação de um polímero ocorre porque a liberação

de íons básicos da HAp em solução aquosa neutraliza os agentes ácidos oriundos da degradação do polímero. Um exemplo de polímero afetado pela HAp é o PLGA (SCHILLER; EPPLE, 2003).

Em estudo conduzido por KROK-BORKOWICZ et al. (2019), a presença de HAp aumentou a molhabilidade, a adesão e a proliferação celular do PLGA; enquanto no trabalho de KAR, KAUR e THIRUGNANAM (2016), além das melhoras nas propriedades biológicas, promoveu melhora nas propriedades mecânicas quando misturada à quitosana porosa modificada organicamente com montmorilonita.

3.1.2 OS BIOPOLÍMEROS NATURAIS

De maneira sucinta, os polímeros são compostos por estruturas unitárias, monômeros, que se repetem e se ligam formando uma cadeia, podendo ser ramificada ou não. Copolímeros são polímeros que apresentam dois ou mais tipos de monômeros na sua composição. Dentre as inúmeras formas que um polímero pode ser classificado, encontra-se uma referente à sua origem: natural ou sintética.

Estruturas de macromoléculas biológicas que foram produzidas por meio de organismos vivos e que podem ser utilizadas como biomaterial definem o termo biopolímeros naturais. Tais organismos vivos incluem micro-organismos, vegetais e animais (tecidos), além de poderem ser originárias dos meios aéreos, terrestres ou marinhos.

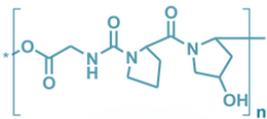
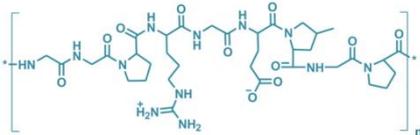
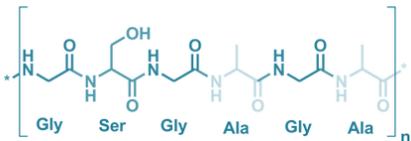
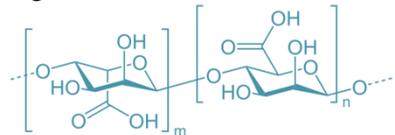
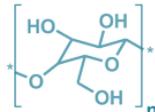
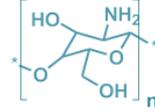
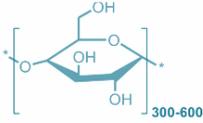
Entre os micro-organismos que fornecem biomoléculas poliméricas, estão os fungos, algas unicelulares, leveduras, bactérias, entre outros. Por meio desses seres vivos é possível obter polissacarídeos (como celulose, dextrana, quitina, ácido hialurônico, etc.) e proteínas (como seda, queratina, etc.). Outros tipos de polissacarídeos (como amido, alginato, carregina, etc.) e de proteínas (como soja, glúten de trigo, etc.) são obtidos dos vegetais (DAVIDENKO et al., 2019).

Fontes provenientes dos animais fornecem polímeros como os glicosaminoglicanos (como a quitina, heparina, ácido hialurônico, etc.), proteoglicanos e proteínas (colágeno, elastina, gelatina, heparina, etc.), assim como o ácido desoxirribonucleico ou mais popularmente conhecido por sua sigla DNA (DAVIDENKO et al., 2019).

Biopolímeros naturais apresentam características muito atrativas quando comparados aos sintéticos, entre elas: disponibilidade universal, hidrofiliabilidade, biodegradabilidade inerente, reatividade química, quirabilidade, além de baixo custo (BOLIN, 1970).

Segue Tabela 3.1, a qual apresenta alguns exemplos de biopolímeros e suas propriedades:

Tabela 3.1. Biopolímeros naturais: origem e propriedades.

POLÍMERO	ORIGEM	PROPRIEDADES
<p>Colágeno</p> 	Comercialmente em: ovinos, suínos, equinos e bovinos	Biodegradável, hidrofiliçidade, boa adesão celular, baixa rigidez, possível transmissão de patógenos
<p>Gelatina</p> 	Desnaturação e hidrólise do colágeno	Biodegradável, hidrofiliçidade, boa adesão celular, baixo custo, propriedades gelificantes, baixas propriedades mecânicas
<p>Seda</p> 	<i>Lepidoptera</i> (larva), alguns aracnídeos	Biodegradável (baixa taxa de degradação), alta resistência à tração, flexibilidade no processamento, termicamente estável
<p>Alginato</p> 	Alga marrom	Biodegradável, relativo baixo custo, fácil gelificação, baixa adsorção de proteína
<p>Celulose</p> 	Vegetais, Tunicados e algas	Biodegradável, altas propriedades mecânicas
<p>Quitosana</p> 	Exoesqueleto de crustáceos e moluscos, cutículas de insetos e fungos	Biodegradável, bactericida, promoção de crescimento celular, baixa resistência à tração
<p>Amido</p> 	Milho, batata, trigo e tapioca	Biodegradável, baixo custo, baixa área superficial

Adaptado de RAMÍREZ RODRÍGUEZ; PATRÍCIO; DELGADO LÓPEZ (2019), p. 202.

3.1.2.1 POLIISOPRENO

Outra classificação que pode ser atribuída aos polímeros é referente à sua propriedade mecânica, sendo classificados como: frágil/rígido, plástico e elastomérico.

De acordo com a *International Organization for Standardization* (ISO), elastômero é uma macromolécula que, ao sofrer uma deformação de baixa a média força, retorna rapidamente à sua forma e dimensão inicial (ISO 1382, 2012).

Um dos elastômeros mais populares é o látex, um líquido branco viscoso proveniente de uma espécie de árvore originária da Floresta Amazônica, a *Árvore-da-Borracha* ou *Hevea brasiliensis* (Figura 3.3). Ainda que originária da América do Sul, esta espécie foi levada a outros continentes, em especial o asiático, que detém 90% da produção mundial atual. Dados fornecidos pela *Association of Natural Rubber Producing Countries*³ demonstraram que a produção em 2018 foi de 13,960 milhões de toneladas. Cabe ressaltar que existem aproximadamente 2.000 espécies de plantas que produzem o látex, mas mais de 99% do látex comercial provém da *H. brasiliensis*.



Figura 3.3. Extração do látex da *Hevea brasiliensis*. Em destaque representação da árvore e seus frutos.

O látex, que originará a borracha natural (no inglês, NR), é uma emulsão coloidal de partículas dispersas do polímero PI (~ 90% da massa total) em meio aquoso, contendo também diversas outras substâncias orgânicas e sais minerais (~ 10% da massa total), como proteínas, carboidratos, lipídios, potássio, cálcio, manganês, sódio, cobre, zinco e ferro (BITTENCOURT et al., 1998; SUSSMAN; BEEZHOLD; KURUP, 2002). A quantidade de

³ *Association of Natural Rubber Producing Countries* (2018); Disponível em: <<http://www.anrpc.org/html/news-secretariat-details.aspx?ID=9&PID=39&NID=2271>>.

substâncias orgânicas e sais minerais está relacionada a muitos fatores, tais como: condições climáticas, solo, estação e clones (TUAMPOEMSAB; NIMPAIBOON; SAKDAPIPANICH, 2015).

Tal emulsão provém da reação da árvore ao sofrer um ferimento, atuando como agente cicatrizante. A *Hevea brasiliensis* possui, abaixo da sua superfície, uma rede em forma de tubos contendo células chamadas laticíferas ou parenquimatosas, na qual seu citoplasma aporta proteínas e enzimas que participam da biossíntese do PI, da coagulação do látex e da defesa da planta. Quando exposto ao ar por um período maior de 12 horas, o látex coagula espontaneamente por ação de bactérias e fungos (levedura), criando a NR (JOHN, 1971).

Por se tratar de um polímero bastante suscetível às ações de coagulação e degradação por conta de processos químicos e bioquímicos, logo ao ser extraído, são adicionados agentes químicos estabilizantes para evitar tais modificações em sua estrutura. Entre os agentes químicos estabilizantes, o mais utilizado é a amônia, que evita a coagulação. Para reduzir a quantidade de substâncias orgânicas, como as proteínas, o látex pode passar por centrifugação, ou sofrer degradação enzimática, irradiação ou adição de acetona durante sua extração. Em geral, ao centrifugar o látex sua água é descartada, passando a ter em volume em média de 60% de borracha sólida (látex sólido). Esta borracha contém em torno de 97% de PI em sua constituição (BRYDSON, 1988, apud MARQUES, 2011, p. 29).

A extração de proteínas e outras substâncias orgânicas se faz necessária por conta das propriedades alergênicas que possuem. O látex contém dois tipos de proteínas em sua composição: as de elevado peso molecular – fortemente ligadas ao PI – e as de baixo peso molecular e solúveis em água, as quais estão dispersas na emulsão. As últimas são chamadas de proteínas extraíveis e são removidas juntamente com a água da emulsão (ao sofrer processos de centrifugação, irradiação, etc.) (MAZNAH et al., 2008). Em situações em que não são completamente removidas, algumas dessas proteínas são as responsáveis por desencadear respostas imunes do tipo I em indivíduos com alergia ao látex (SUSSMAN; BEEZHOLD; KURUP, 2002). De acordo com os números oficiais e com o *WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee*⁴, quinze são os alergênicos provenientes da espécie *Hevea brasiliensis*.

O PI é um polímero composto pela seguinte cadeia: milhares de unidades do isômero *cis*-1,4-poliisopreno, duas unidades de *trans*-poliisopreno e dois grupos terminais de cadeia α e ω (Figura 3.4). O grupo terminal ω é responsável por unir as proteínas mediante ligações de

⁴ *WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee*; Disponível em: <<http://www.allergen.org>>.

hidrogênio, enquanto que o terminal α une os grupos mono e difosfatos (associados aos fosfolipídios) por ligação de hidrogênio ou ligações iônicas (LI et al., 2019). Uma partícula de látex possui as cadeias de PI, nas quais a parte hidrofóbica se une formando uma estrutura globular, enquanto suas extremidades hidrofílicas se encontram na superfície (Figura 3.5) (SRIRING et al., 2018). Possui fórmula $(C_5H_8)_n$, em que $n \approx 5000$, conferindo-lhe um alto peso molecular.

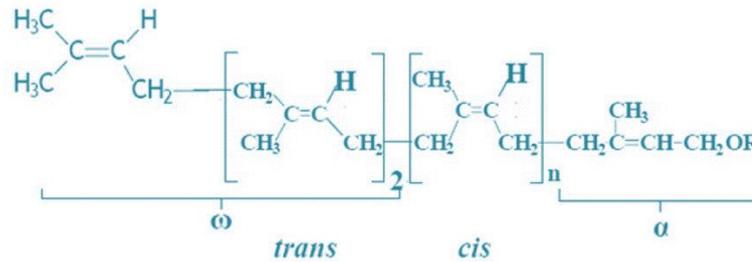


Figura 3.4. Estrutura química do PI. A letra n representa o número de repetições do isômero *cis*-1,4-poliisopreno (GUERRA, 2018).

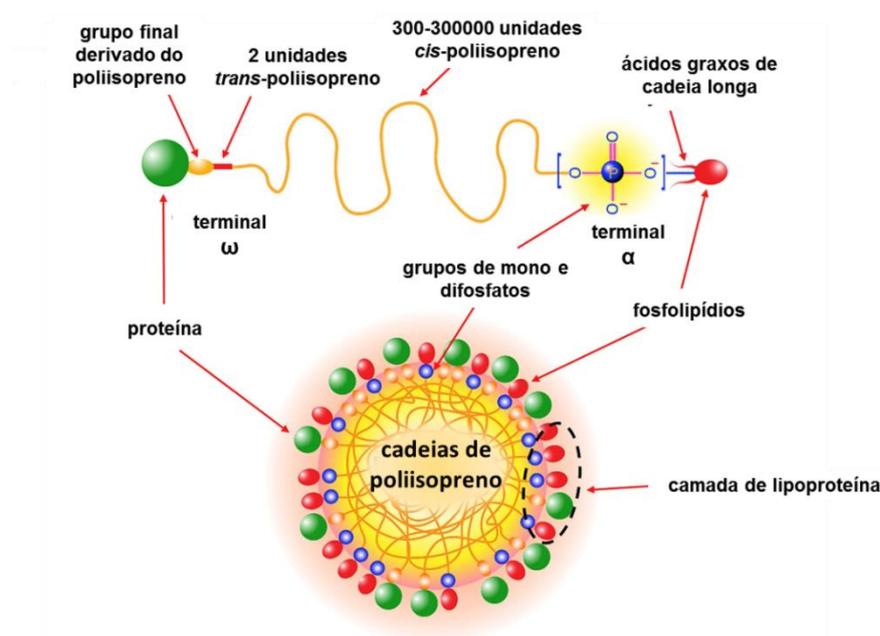


Figura 3.5. Representação da cadeia de PI e de uma partícula de látex. Adaptado de SRIRING et al. (2018), p. 128.

Existem no mercado as chamadas borrachas sintéticas, que podem ser obtidas dos monômeros butadieno, estireno, isopreno, etileno, propileno e benzeno (todos originários do petróleo), formando assim os seguintes produtos comerciais: borracha de estireno-butadieno (SBR), borracha de polibutadieno (BR), borracha de etileno-propileno-dieno (EPDM),

borracha nitrílica (NBR), copolímero em bloco de estireno (SBC's), borracha termoplástica (TPE), borracha de policloropreno (CR), etc.

Mesmo com a grande diversidade de borrachas sintéticas, o PI oriundo da borracha natural ainda é considerado um elastômero de alto valor e comercialmente importante, já que os sintéticos não conseguem alcançar as mesmas propriedades, ao menos não a um baixo custo, como resiliência, elasticidade, maleabilidade a baixas temperaturas, flexibilidade, resistência à corrosão, ao impacto e à abrasão, além da capacidade de dispersar calor (RIPPEL; BRAGANÇA, 2009, apud GUERRA, 2018, p. 24). Um exemplo são os pneus que suportam altas cargas, como no caso de pneus para caminhões, ônibus e aviões, nos quais não é possível utilizar a versão sintética, ou então, usando-a, o custo se tornaria altíssimo (VENKATACHALAM et al., 2013). Ademais, caracteriza-se pela fácil processabilidade, resistência ao ozônio e boas propriedades mecânicas: resistência à tração (20-30 MPa), módulo de Young (1-5 MPa), excelente resistência à abrasão e dureza (40-100 Shore A) (RAHIMI; MASHAK, 2013).

Sobre sua utilização, essa se deu em especial com o descobrimento da vulcanização da NR (por Charles Goodyear em 1839), popularizando e tornando-a imprescindível entre os setores automobilístico, aéreo, têxtil, calçadista, de jardinagem (ex.: mangueiras), equipamentos esportivos, entre tantos outros (ARROYAVE; RESTREPO; VÁSQUEZ, 2014). Anteriormente, em meados do século XVIII, as pessoas utilizavam o látex diretamente na roupa para torná-la à prova d'água; seu primeiro uso como NR foi como apagador de marcas de lápis de chumbo.

Quanto à sua inserção na área da saúde, seu auge foi na década de 1980, quando ocorreu um maior entendimento da sociedade sobre doenças sexualmente transmissíveis, como a Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (no inglês, AIDS) e hepatite e conscientização da importância do uso de luvas em ambientes clínico-hospitalares. As luvas de borracha natural de látex surgem na década de 1920, por conta das excelentes propriedades de resistência ao rasgo e perfuração do material. Sua resistência é tão alta que o filme de NR pode ser estendido entre 600-1000% antes que se rompa. Isso faz com que atue como uma barreira contra gases e líquidos infecciosos (BIN SAMSURI, 2010).

Atualmente, aproximadamente 10% do látex é utilizado para produtos médicos como luvas, preservativos, catéteres, entre outros (VENKATACHALAM et al., 2013). O

*International Rubber Study Group (IRSG)*⁵ forneceu valores estimados da aplicação da NR pelo mundo no ano de 2015 (Figura 3.6):

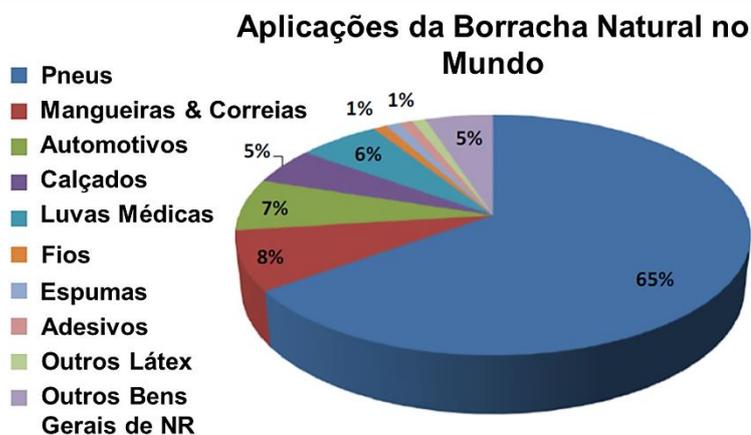


Figura 3.6. Aplicações da NR no mundo em 2015. Valores estimados pelo IRSG. Adaptado do Relatório da União Europeia (BLENGINI et al., 2017), p. 71.

Além de seu uso em luvas, preservativos, bolsas de sangue, etc., o látex vem expandindo suas aplicações dentre os biomateriais e atraindo interesse da comunidade científica graças ao seu comportamento bioativo: angiogênico, ou seja, indutor de neurovascularização. Tal comportamento não é completamente compreendido, mas é atribuído às proteínas na cadeia do PI (DOS SANTOS, 2017). Em algumas pesquisas preliminares, foi apontada a existência de possíveis fatores de crescimento vascular endotelial (no inglês, VEGF) no látex (FRADE et al., 2001 apud ARNEZ, 2008, p. 16).

Outras propriedades (promoção de adesão celular, formação de ECM, além dos excelentes valores de resistência mecânica, entre outras) contribuíram para sua inserção entre os biomateriais e ET. Como abordado no trabalho de ARNEZ (2008), biomembranas da NR foram desenvolvidas e aplicadas nas mais variadas regiões do organismo, inicialmente em animais, desde próteses de substituição na parede abdominal até substituição de esôfago, inclusive até serem incorporadas em seres humanos, para cicatrização de úlceras cutâneas, na reconstrução da conjuntiva ocular, revestimento de neocavidades pós-timpanomastoidectomias, etc. Biomembranas foram reportadas também como promissoras alternativas para cicatrização de tecidos que foram expostos a queimaduras (BOLINAMATOS et al., 2013; KRUPP et al., 2019) e também relacionadas a sistemas de liberação

⁵ *International Rubber Study Group (IRSG)* (2015); Disponível em: <<http://www.rubberstudy.com/statistics.aspx>>.

controlada de fármacos (HERCULANO et al., 2009; PHAECHAMUD; ISSARAYUNGYUEN; PICHAYAKORN, 2016).

Pesquisas ainda mencionam o uso do látex em próteses arteriais e vasculares, ligaduras ortodônticas (DOS SANTOS et al., 2010), e também em associação com outros biomateriais, sejam eles metálicos, cerâmicos ou poliméricos: revestimentos bioativos de blendas de NR com fosfatos de cálcio (DO NASCIMENTO et al., 2019); em blendas com PLGA para espaçadores cranianos reabsorvíveis (FALLER et al., 2015); promovendo osteointegração junto a implantes dentários de titânio (ARNEZ, 2008); curativos dermais de NR com albumina (WATTANAKAROON et al., 2017); regeneração óssea por intermédio de NR revestida com fosfato de cálcio (BORGES et al., 2015); compósitos porosos de NR com celulose bacteriana para futuro uso como curativo (TROVATTI et al., 2015); nanocompósitos de ferrita de níquel-zinco (NiZn) com NR para aplicações biomédicas (FLAIFEL et al., 2012).

Em virtude das propriedades bioativas que possui (formação de ECM, adesão celular e angiogênese), as quais são essenciais para o processo de cicatrização e regeneração tecidual – e também por conta de suas excelentes propriedades mecânicas –, o látex se tornou uma excelente alternativa à ET.

3.1.3 OS BIOPOLÍMEROS SINTÉTICOS

Os biopolímeros sintéticos pertencem à classe de polímeros derivados de fontes não renováveis de petróleo, podendo ser divididos entre biodegradáveis ou não.

No que diz respeito à área de liberação controlada de fármacos, os biopolímeros naturais, como albumina de soro bovino (no inglês, BSA), albumina de soro humano (no inglês, HSA), gelatina, colágeno e hemoglobinas, são bastante empregados, porém possuem a limitação de seu alto custo e a sua forma de purificação ainda ser questionável (JALIL; NIXON, 1990). Os biopolímeros sintéticos surgem como alternativa para estas limitações, pois podem ser adaptados de maneira a ampliar suas propriedades e permitem uma previsibilidade maior na uniformidade de um lote que os naturais (MIDDLETON; TIPTON, 2000). Por conta de suas propriedades (não causar toxicidade, não provocar alergias, não promover a irritabilidade e não provocar o parecimento de carcinomas), destacam-se (Figura 3.7):

- POLIÉSTERES: Atualmente entre os biodegradáveis mais estudados para aplicações biomédicas. Podem ser bioestáveis ou biodegradáveis. Entre os bioestáveis está o poli(tereftalato de etileno, PET), que possui grupos aromáticos e normalmente é

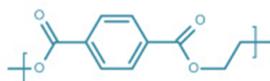
empregado na forma de membrana, filamentos e malhas. Já os biodegradáveis mais comuns são os alifáticos, como o poliácido glicólico (PGA), poli(ácido L-lático, PLLA), poli(ácido D-lático, PDLA), entre outros. Sua degradação ocorre principalmente por hidrólise não enzimática (BANORIYA; PUROHIT; DWIVEDI, 2017; FERNÁNDEZ et al., 2018; MAITZ, 2015; SÖDERGARD; STOLT, 2002; TU et al., 2013; WANG et al., 2011b).

- POLIÉTERES: Polímeros bioestáveis por conta das ligações éter. Os principais biopolímeros desta categoria são: o poli(éter-éter-cetona, PEEK), que, por conta de sua resistência à abrasão e degradação, além de valores de elasticidade próximos ao do osso esponjoso humano, é amplamente utilizado em aplicações ortopédicas (CHEN et al., 2018; KROGMAN et al., 2007; MAITZ, 2015; SURESH; ANOLIK; POWERS, 2018); o PEG, um polímero não degradável, solúvel em água, com alta hidrofiliabilidade e boa biocompatibilidade (HACKER; KRIEGHOFF; MIKOS, 2019); e, também, o polietersulfona (PES), utilizado majoritariamente como membranas, isso devido a características como fácil fabricação, controle do tamanho e distribuição dos poros, estabilidade térmica e quimicamente inerte (HAITAO et al., 2009; JI et al., 2019; KROGMAN et al., 2007).
- POLIAMIDAS: Seu representante mais significativo na área biomédica é o Nylon, que, por conta de sua resistência à tração, é usado abundantemente em suturas. Um dado sobre as poliamidas é que, ainda que ligações de amida estejam em abundância na natureza, sua aplicação está limitada por conta de sua insolubilidade (ou solubilidade dependente do pH) e alta temperatura de fusão. Consequentemente, são inúmeros os trabalhos que funcionalizam poliamidas com outros polímeros (HACKER; KRIEGHOFF; MIKOS, 2019; KROGMAN et al., 2007; MAITZ, 2015; MIDDLETON; TIPTON, 2000; OKAMURA et al., 2002; TIAN et al., 2012).
- POLIANIDRIDOS: Em razão de suas propriedades de degradação via erosão superficial e sua versatilidade, os polianidridos têm atraído muita atenção nos campos médicos e farmacêuticos, em especial no ramo de liberação controlada de fármacos. Selecionando o monômero de acordo com o seu grau de hidrofobicidade,

é possível obter períodos de degradação que vão desde dias até anos (HACKER; KRIEGHOFF; MIKOS, 2019; KATTI et al., 2002; TIAN et al., 2012).

- POLIURETANOS: Constituem uma grande classe de elastômeros sintéticos, possuindo excelentes propriedades mecânicas e de biocompatibilidade. Sua grande popularidade na área biomédica se dá em grande parte por sua versatilidade e capacidade de modificar suas características físico-químicas, sendo empregados como: implantes de longo prazo, catéteres, válvulas coronárias artificiais, isso além da possibilidade de modificar suas propriedades de degradação (DURUCAN; BROWN, 2000; GRAD et al., 2003; HACKER; KRIEGHOFF; MIKOS, 2019; TIAN et al., 2012).
- POLICARBONATOS: Possuem destaque na área de biomateriais por suas propriedades como biodegradabilidade (por hidrólise), baixa toxicidade, excelente resistência mecânica e boa processabilidade. Seu representante mais conhecido é o policarbonato de trimetileno (TMC) e é possível empregá-lo tanto em liberação controlada de fármaco como em aplicações ortopédicas (CARTER et al., 1997; HACKER; KRIEGHOFF; MIKOS, 2019; LEE et al., 2015; TIAN et al., 2012).

POLIÉSTERES

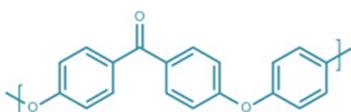


Poli(tereftalato de etileno)
(PET)



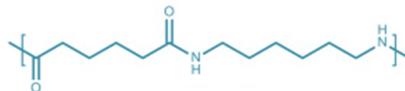
Poliácido Glicólico (PGA) Poli(ácido L-láctico) (PLLA) Poli(ácido D-láctico) (PDLA)

POLIÉTERES



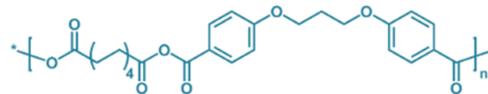
Poli(éter-éter-cetona)
(PEEK)

POLIAMIDAS



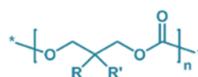
Poliamida
Nylon 6.6

POLIANIDRIDOS



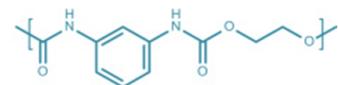
Polianidrido

POLICARBONATOS



Policarbonato de Trimetileno
(TMC)

POLIURETANOS



Poliuretano

Figura 3.7. Estruturas de alguns biopolímeros sintéticos.

3.1.3.1 POLI (ÁCIDO LÁCTICO-CO-GLICÓLICO)

Dentre os biodegradáveis sintéticos, o grupo mais extensivamente estudado é o dos poliésteres alifáticos por conta de sua grande diversidade e versatilidade (VROMAN et al., 2009). Um exemplo disso é o PLA, com previsão de que, até 2023, sua produção cresça em torno de 60% (*European Bioplastics*, 2018).

O PLA pertence ao grupo dos copolímeros ésteres alifáticos, como anteriormente mencionado, assim como o PGA, e derivam dos ácidos láctico e glicólico, respectivamente. Estes dois polímeros surgiram como uma grande promessa entre os materiais por apresentarem excelentes propriedades de biocompatibilidade e degradabilidade (MIDDLETON; TIPTON, 2000), assim como seu amplo espectro de aplicações. A degradação destes polímeros ocorre por meio de uma erosão homogênea via hidrólise das ligações éster dos seus produtos (ácidos láctico e glicólico), sendo totalmente metabolizados e excretados na forma de dióxido de carbono e água.

No entanto, ainda que ambos os polímeros sejam largamente utilizados em diversas aplicações, quando empregados separadamente em aplicações médicas, acabam por apresentar algumas limitações. O PGA, por exemplo, possui uma rápida degradação e é insolúvel na maioria dos solventes, o que compromete pesquisas relacionadas à liberação controlada de fármacos; enquanto o PLA, por sua vez, apresenta um comportamento hidrofóbico e degradação muito lenta, causando uma deterioração das suas propriedades (NIAOUNAKIS, 2015).

Algumas destas limitações, como o tempo de degradação e a estabilidade térmica, podem ser solucionadas ao copolimerizar os ácidos glicólico e láctico, obtendo-se então o PLGA (Figura 3.8) (ULERY; NAIR; LAURENCIN, 2011). Esta copolimerização não somente soluciona como também transforma na principal vantagem o fato de poder definir o tempo de degradação ao modificar a razão de proporção entre os seus monômeros (PLA/PGA) (GRACIA et al., 2018).

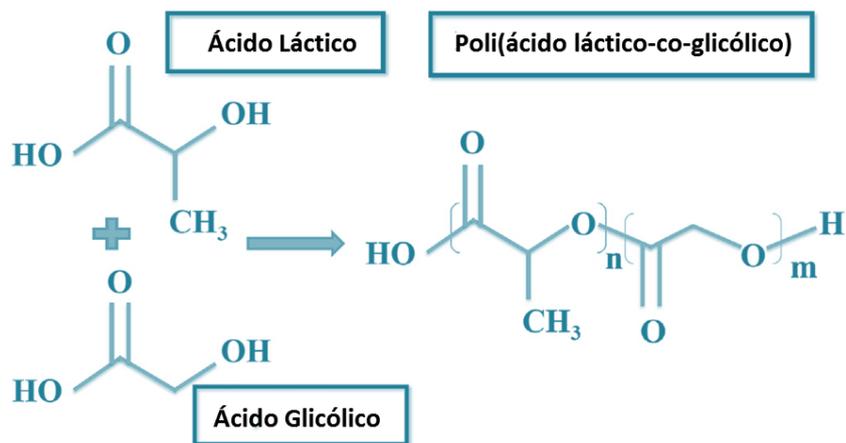


Figura 3.8. Estrutura química do PLGA e dos monômeros (lático e glicólico). As letras m e n representam o número de repetições de cada monômero.

Estudos demonstraram que esta proporção pode promover uma variação de duas semanas a seis meses da meia vida do copolímero quando o PLA está entre 75 a 100% na composição molar (MILLER, 1977). Essa mudança no tempo de degradação ocorre porque o ácido láctico é mais hidrofóbico que o glicólico. Tal hidrofobicidade se dá porque um dos carbonos do monômero (lático) possui um grupo metila (CH₃), enquanto o carbono do ácido glicólico correspondente possui somente um hidrogênio. Tal grupo metila acaba exercendo um impedimento estérico maior, tornando difícil o acesso de moléculas de água (GILDING; REED, 1979).

A razão entre os monômeros geralmente está relacionada à aplicação requerida, como, por exemplo, no caso de liberação controlada de fármacos, utiliza-se o Purasorb PLG[®]85L:15G, que possui 85% de ácido láctico e 15% de ácido glicólico. Outro exemplo é o caso de suturas, em que se pode utilizar o Vycril[®], também conhecido como poliglactina 910, que é composto por 90% de ácido glicólico e 10% de ácido láctico (MIDDLETON; TIPTON, 2000).

Sobre questões de cristalinidade, o PLGA apresenta um comportamento mutável: com uma razão de 25% de monômero lático/75% de monômero glicólico, obtém-se um polímero amorfo; enquanto que, com uma razão de 80% lático/20% glicólico, sua estrutura se torna semicristalina (VROMAN et al., 2009). Sua cristalinidade influencia diretamente nas propriedades mecânicas, na molhabilidade e na taxa de reabsorção do material (MOTTA, 2002). Além disso, a proporção dos monômeros influencia também na sua T_g (temperatura de transição vítrea), diminuindo a temperatura com a diminuição da quantidade de láctide na composição e diminuição da massa molar (JAMSHIDI; HYON; IKADA, 1988).

Esta degradação controlada, aliada às propriedades de resistência mecânica e processabilidade, torna-o um polímero com um alto potencial para aplicação em liberação controlada de fármacos (GRACIA et al., 2018). Ademais, o PLGA é um dos poucos polímeros biodegradáveis aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA).

Estudos recentes aplicaram com sucesso o PLGA em sistemas de liberação de fármaco, como no caso da Vitamina E micro e nano encapsulada para doenças crônicas e oculares (ALKHOLIEF et al., 2019; VARGA et al., 2019). Outro estudo fabricou nanofibras eletrofiadas de PLGA modificada com PEG (para aumentar sua hidrofiliabilidade), contendo o antibiótico amoxicilina (ZHANG et al., 2018a), além de estudos envolvendo sistemas de formação de implante *in-situ* (FIIS) com fármacos adicionados (BODE et al., 2018; ENAYATI et al., 2017), entre outros.

Os FIIS são sistemas em que um fármaco e um polímero biodegradável (KROGMAN et al., 2007) são dissolvidos em um solvente orgânico biocompatível e, em seguida, são injetados de forma subcutânea ou intramuscular formando um implante (já que o contato com os fluidos corpóreos reagem com o polímero, precipitando-o). No que tange a esse sistema de liberação, diversos estudos demonstraram que, ainda que essa técnica possua vantagens como fácil manipulação e preparação, sua maior desvantagem está associada ao tempo de liberação, no qual pode ocorrer uma alta liberação indesejável do fármaco nas primeiras 24 horas, comprometendo não só o tempo restante de liberação, como também a inflamação do tecido com que estava em contato, além de problemas com toxicidade.

Em constante evolução, trabalhos desenvolvidos recentemente na Universidade de Ciências Médicas de Mashhad, no Irã, sugeriram alternativas para os sistemas de formação *in-situ*, como o sistema de formação de compósito *in-situ* (FCIS) e sistema de formação de gel *in-situ* (FGIS), em que drogas opióides (que auxiliam no tratamento de pessoas com dependência química), como Buprenorfina e Naltrexona (KAMALI et al., 2019a, 2019b), foram misturadas a um tribloco de PLGA-PEG-PLGA, permitindo uma degradação mais lenta e um valor inicial de liberação mais baixo.

Outra área na qual o emprego de PLGA tem apresentado resultados bastante satisfatórios é na ET: um grande número de estudos comprovou suas ótimas propriedades de adesão e proliferação celular. Um exemplo é o estudo de KATTI et al. (2004), no qual foram produzidas compressas com o uso de fibras eletrofiadas de PLGA para tratamento de ferimentos. A essas compressas foi adicionado antibiótico e, quando aplicadas sobre o ferimento, foram sendo progressivamente absorvidas pelo corpo humano. Em trabalho

conduzido por ZHAO et al. (2016), os autores apresentaram uma revisão sobre *scaffolds* fabricados por meio de fibras de PLGA produzidas via ES e comprovaram que o polímero promove altas taxas de adesão e proliferação celular, desde seu uso como no caso anterior, de compressas, como em aplicações vasculares e de regeneração óssea, aliado também à liberação controlada de fármacos.

No que diz respeito à regeneração óssea, pesquisas de compósitos de PLGA com outros materiais que proporcionem resistência mecânica e/ou promovam uma maior resposta celular têm demonstrado sua viabilidade. *Scaffolds* porosos do compósito de PLGA/Óxido de Titânio (TiO₂) foram produzidos por impressão 3D, apresentando uma alta proliferação de osteoblastos quando implantados (RASOULIANBOROUJENI et al., 2019). Em outra pesquisa, microesferas porosas de PLGA com nanotubos de TiO₂ preparadas por emulsão foram testados tanto *in vitro* como *in vivo*, apresentando resultados promissores para sua utilização como provável substituto ósseo (ESLAMI et al., 2018). No caso de FAHIMIPOUR et al. (2017), seu grupo de pesquisa criou uma tinta para impressão 3D de compósitos de microesferas de PLGA preenchidas com VEGF e adicionou β-TCP (fosfato tricálcico fase β), gelatina e alginato (os dois últimos adicionados para atuarem como ligantes). Resultados demonstraram que os *scaffolds* criados com esse compósito podem ser considerados futuros regeneradores de defeitos craniofaciais.

Todos os exemplos ora citados não correspondem a 1% de todas as pesquisas que envolvem o PLGA, demonstrando que sua grande versatilidade atrai cada vez mais o interesse dos centros de investigação.

3.1.3.2 POLIETILENOGLICOL

Outro polímero bastante estudado por conta de suas propriedades hidrofílicas é o PEG. Conforme abordado por KUNTHADONG et al. (2015), o PEG pertence ao grupo dos poliéteres solúveis em água, é biodegradável, não tóxico e inerte, além de biocompatível (Figura 3.9).

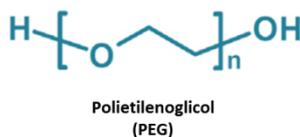


Figura 3.9. Estrutura química do PEG.

Possui comprimentos de cadeia variáveis e peso molecular que vão desde 200 a 10000000 g/mol. São encontrados em estado líquido (baixo peso molecular) e sólidos (alto peso molecular). Valores de 1000 g/mol e maiores existem na forma de sólidos semicristalinos em temperatura ambiente (GULLAPALLI; MAZZITELLI, 2015).

Tratando-se dos pesos moleculares acima de 20000 g/mol, frequentemente o PEG passa a ser chamado de Óxido de Polietileno (PEO) (HACKER; KRIEGHOFF; MIKOS, 2019). Diversas investigações demonstraram que variações no peso molecular promovem variações nas suas propriedades (CHEN et al., 2016; JANSSENS et al., 2008; PIELICHOWSKI; FLEJTUCH, 2002). PEG's com baixo peso molecular, em comparação aos de alto peso molecular, possuem uma maior quantidade de grupos hidroxilas e maior higroscopicidade.

O PEG também é conhecido por atuar como plastificante, ou seja, auxiliar na diminuição da T_g de outros materiais, assim como reduzir a viscosidade e módulo elástico, aumentando sua flexibilidade. Ademais, esta sua versatilidade e hidrofiliçidade permitem que seja incorporado em polímeros biodegradáveis hidrofóbicos, criando, assim, um polímero anfifílico, ou seja, parte hidrofílico, parte hidrofóbico (WANG et al., 2019).

Em aplicações biomédicas é frequentemente utilizado, não somente por conta de suas propriedades, mas também por conta de sua aprovação no FDA. Inúmeras pesquisas relatam sua utilização em liberação controlada de fármacos, *scaffolds*, equipamentos médicos e implantes (GULERIA; KAITH; SINGH, 2012; HACKER; KRIEGHOFF; MIKOS, 2019; RIETSCHER et al., 2016; ZHANG et al., 2018b). Sua atuação como plastificante pode ser vista nos trabalhos de KUNTHADONG et al. (2015) e QUSSI e SUESS (2006), nos quais os pesquisadores diminuíram a T_g dos seus filmes de PLLA/acetato butirato celulose (PLLA/ABC) e de goma-laca, respectivamente, utilizando PEG de diferentes pesos moleculares. Foi demonstrado, em ambos os trabalhos, que os diferentes pesos moleculares do PEG promoveram diferentes resultados: no caso do filme de PLLA/ABC, PEG com baixo peso molecular promoveu maior hidrofiliçidade da superfície, mas também uma instabilidade molecular na matriz; nos filmes de goma-laca, a adição de PEG com altos pesos moleculares levou a resultados imprevisíveis, visto que, quanto maior o peso molecular, maior o volume molecular e menor o número de grupos hidroxila, levando a uma diminuição na difusão e interação com as cadeias de goma-laca, reduzindo assim a atuação termodinâmica do plastificante. Nas duas investigações, os autores são categóricos: tanto as concentrações como os pesos moleculares devem ser bem definidos para cada tipo de material e aplicação.

Outro exemplo de sua aplicabilidade é como revestimento de materiais metálicos, como na pesquisa de ORIŇAKOVÁ et al. (2019), na qual espumas fabricadas com ferro foram revestidas com PEG de peso molecular 4000 g/mol, obtendo assim um material com maior biocompatibilidade para futuras aplicações como substituto ósseo.

Ainda sobre substitutos ósseos, *scaffolds* produzidos de nanopartículas de HAp e de biovidro com adição de PEG apresentaram ótimos resultados quando da sua aplicabilidade em ambientes ósseos. A inclusão do PEG nas biocerâmicas aumentou suas propriedades mecânicas, além de melhorar a adsorção, porosidade, resposta *in-vitro*, biodegradação e morfologia (KUMAR; DEHIYA; SINDHU, 2019).

Grande parte da versatilidade do PEG, nas inúmeras aplicações ao qual é submetido, é devida às diversas formas em que este pode ser encontrado. Sua estrutura molecular pode ser linear, 3-braços, 4-braços, formato-Y, tipo-pente e tipo-dendrita (Figura 3.10). Além disso, pode ser sintetizado, formando blocos de copolímeros (duplo, triplo, etc.), enxerto de copolímeros, entre outros (WANG et al., 2019).

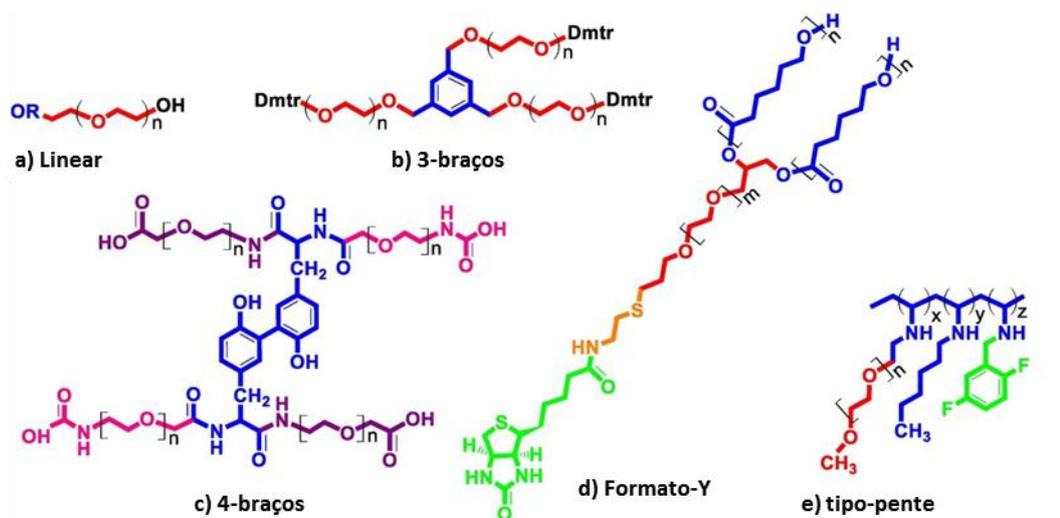


Figura 3.10. Exemplo de estruturas do PEG. Adaptado da imagem de WANG et al. (2019), p. 1022.

3.1.4 AS BLENDS POLIMÉRICAS

Uma das maneiras de se obterem polímeros com melhores propriedades é com a produção de blends, as quais nada mais são que a união de dois ou mais polímeros com o objetivo de combinar as melhores propriedades de cada um dos seus componentes, obtendo assim um novo material, que poderá ser utilizado em aplicações nas quais seus componentes individualmente não poderiam. Para tal, é necessário que um dos polímeros represente mais de 2% em massa do produto final (GUERRA, 2018).

Uma estratégia para se chegar a tal objetivo é unir um polímero amorfo a um polímero cristalino. Polímeros cristalinos possuem estabilidade química e facilidade de processamento, porém possuem baixa resistência ao impacto e estabilidade dimensional limitada. Essa resistência ao impacto e estabilidade dimensional podem ser corrigidas por um polímero amorfo (EBEWELE, 2000).

As blendas poliméricas são categorizadas de acordo com a interação entre os polímeros, podendo ser: miscíveis, imiscíveis ou parcialmente miscíveis.

Blendas miscíveis são aquelas nas quais a interação entre os polímeros é total, sua mistura molecular é tamanha que, em uma análise macroscópica, o polímero final apresenta fase única, sendo assim comparável às propriedades de copolímeros e homopolímeros, possuindo uma única T_g . De forma oposta, as blendas imiscíveis possuem mais de uma T_g (cada T_g correspondente a cada polímero da blenda), demonstrando a separação clara entre os seus polímeros formadores, com estruturas moleculares de duas ou mais fases. No caso da blenda parcialmente miscível, também possui diferentes T_g em sua composição, e as T_g , por sua vez, apresentam um leve deslocamento em direção a uma temperatura média, causada justamente pela interação entre seus constituintes (ABBASIAN et al., 2019).

As propriedades físicas da blenda normalmente são controladas pela natureza do polímero, composição da blenda e adesão interfacial (OBASI; OGBOBE; IGWE, 2009).

Além disso, alguns autores chamam de materiais poliméricos bioartificiais ou biosintéticos as blendas que possuem em sua composição polímeros de origem natural e sintética (ABBASIAN et al., 2019). Tais materiais têm despertado grande interesse por produzirem *scaffolds* que podem exibir tanto as propriedades físico-químicas e processabilidade dos polímeros sintéticos como as interações biológicas e biocompatibilidades dos polímeros naturais (SASMAZEL, 2011).

Por conta das vantagens previamente mencionadas, numerosos estudos vêm sendo produzidos com blendas poliméricas para serem utilizadas seja como próteses, órteses, *scaffolds*, liberação de fármacos, entre outros (ULERY; NAIR; LAURENCIN, 2011). Um exemplo é o trabalho produzido por CHAN et al. (2018), em que obtiveram fibras eletrofiadas porosas da blenda do polímero politiofeno fenileno (PThP) com o polímero bioabsorvível PLGA. As matrizes que as fibras porosas formaram exibiram citocompatibilidade com fibroblastos dérmicos e melanócitos epidérmicos, ambas células de origem humana que promovem a formação de tecido da pele.

Em outro estudo, o pesquisador SASMAZEL (2011) produziu *scaffolds* de uma blenda híbrida, composta por um polímero natural biodegradável, a quitosana, um polímero sintético biodegradável, o poli(ϵ -caprolactona, PCL) e um cerâmico, a HAp. A quitosana possui excelentes propriedades biocompatíveis, mas deixa a desejar quanto às questões de propriedades mecânicas e degradação. Por outro lado, o PCL é facilmente processável (por conta de sua baixa temperatura de fusão: $\sim 60^{\circ}\text{C}$), enquanto suas propriedades mecânicas e de degradação podem ser controladas, mas possui como desvantagem atividade biológica limitada e hidrofobicidade. A HAp é uma cerâmica biocompatível e que acelera o crescimento de células osteoblásticas. Dessa forma, o autor conseguiu fabricar estruturas 3D com valores de módulo de elasticidade e de resistência à tração muito maiores que ambos os polímeros individualmente, com excelentes propriedades de biocompatibilidade e diferenciação celular.

Scaffolds para curativos de pele também foram desenvolvidos com blends, como no caso da pesquisa de KIM et al. (2008), que criaram uma matriz de gel de alginato de sódio com álcool polivinílico (PVA) contendo nitrofurazona (medicamento anti-infeccioso), promovendo um aumento na taxa de cicatrização da ferida; pesquisa adjacente foi a promovida por CHANDIKA et al. (2015), na qual um *scaffold* em forma de esponja foi obtido do colágeno de peixe com alginato de sódio e funcionalizado com quito-oligosacarídeos. Como resultado, a esponja apresentou estrutura rígida e biocompatível, com menor taxa de biodegradabilidade e maior adesão e proliferação celular.

No recente artigo de revisão de YEGAPPAN et al. (2018), os autores discutem sobre o polissacarídeo carragenina, oriundo de algas marinhas vermelhas, o qual vem sendo aplicado como agente anticâncer e agente antihiperlipídico, assim como inibidor de herpes e vírus papiloma. Nessa revisão, apresentam inúmeras pesquisas nas quais este polissacarídeo foi misturado a outros polímeros, sejam estes sintéticos ou naturais: seda de fibroína, PVA, quitosana, gelatina, PCL, ágar, poli(dietilacrilamida, PDEA), poli(oxialquilenamina), poli(hidroxibutirato, PHB), ácido hialurônico, poli(vinilpirrolidona, PVP), alginato, etc., produzidos pelas mais diversas técnicas e obtidos das mais variadas maneiras (biotinta, fibras, membranas, hidrogéis, nanocápsulas, filmes, nanogéis, etc). Comprovando, por fim, sua funcionalidade nas áreas de ET, liberação controlada de fármacos e medicina regenerativa.

Ainda que o poliéster PLGA possua propriedades satisfatórias para seu emprego como biomaterial, como boa biocompatibilidade e biodegradabilidade, sua superfície é hidrofóbica por conta da falta de grupo funcional, limitando sua interação com as superfícies das células.

Tal questão pode ser resolvida ao criar uma blenda deste polímero com outros polímeros naturais, como colágeno e gelatina (SADEGHI-AVALSHAHR et al., 2017).

Analogamente, uma blenda polimérica, que foi patenteada (2013) pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Biomateriais e Cerâmicas Avançadas (Labiomat), vem chamando a atenção por suas propriedades biomédicas: trata-se da blenda composta pelo polímero natural PI e pelo polímero sintético PLGA, registrada como Cellprene[®].

Desenvolvida em 2011, a blenda Cellprene[®] é uma mistura de 40 / 60% em massa de PI/PLGA, respectivamente; sendo o PLGA composto de 84% do monômero láctide e 16% do monômero glicolide. Produzida por meio da dissolução dos componentes em solvente orgânico, e posterior volatilização deste solvente, a blenda já foi fabricada em forma de *stent* espiral e espaçadores craniais por processo de injeção e microfibras por ES e gotejamento. A blenda, diferentemente do PLGA, possui comportamento dúctil e uma expressiva transformação plástica.

Os *stents* espirais foram implantados em coelhos durante um procedimento de traqueotomia, apresentando resultados satisfatórios, sem processo infeccioso ou obstrução respiratória, validando seu uso como *scaffold* traqueal. Em outro momento, foi comprovada também sua viabilidade em ambiente ósseo, quando implantado no crânio de ratos a fim de tratar a craniossinostose (doença que inibe o crescimento cranial lateral, promovendo deformação na face). Dentre os tratamentos existentes para esta doença, o mais usual é a utilização de molas metálicas que auxiliam na expansão intracranial. Ao utilizar os espaçadores de Cellprene[®], estes foram absorvidos e totalmente integrados ao tecido, além da não necessidade de uma futura intervenção cirúrgica de remoção do material; vantagens quando comparadas às molas, que, por sua constituição metálica, são bioinertes (formação de fibrose) e que impreterivelmente necessitarão de uma segunda intervenção cirúrgica (KIM et al., 2014; MARQUES, 2015).

Sobre os *scaffolds* de microfibras desenvolvidas via ES, os mesmos foram ensaiados *in vitro* com células musculares esqueléticas e células dérmicas humanas (fibroblastos). Foi reportado que o *scaffold* incentivou o aumento da atividade metabólica e de proliferação das células musculares e um crescimento celular entre os fibroblastos. Tais resultados demonstraram a aplicabilidade da blenda também em tecidos moles (MARQUES et al., 2017).

Não obstante, outra pesquisa adicionou HAp e α -TCP (fosfato de cálcio fase α) ao Cellprene[®], fabricando fibras por ES. Ambos os cerâmicos não comprometeram as propriedades térmicas da blenda original e, no caso da fibra com fosfato de cálcio, o módulo

de elasticidade apresentou um valor um pouco menor do que o com HAp. Ainda que sua viabilidade *in vitro* e *in vivo* não tenha sido testada, tudo leva a crer que a inserção dos cerâmicos só contribui para a regeneração de tecidos ósseos (VECHIETTI et al., 2015).

Mais recentemente, uma nova blenda de Cellprene[®] foi criada, substituindo o PI por PI epoxidado, mantendo as proporções originais. Com objetivo de aumentar a miscibilidade entre os materiais, a nova blenda exibiu uma miscibilidade parcial e uma maior hidrofobicidade em sua superfície (GUERRA, 2018).

Por fim, a blenda Cellprene[®], sendo o PI epoxidado ou não, revelou-se um biomaterial de grande versatilidade, podendo ser adotado tanto em ambientes ósseos quanto em ambientes de tecidos moles. O fato de ser um polímero imiscível/parcialmente miscível não compromete seu emprego na ET, já que *in vivo* o PLGA é absorvido pelo organismo e o PI, ainda que absorvido mais lentamente, propicia a neurovascularização.

3.2 FIBRAS POLIMÉRICAS E SCAFFOLDS NA ENGENHARIA DE TECIDOS

A ET é uma das vertentes da medicina regenerativa que alia os saberes de cientistas e engenheiros em prol da regeneração/reconstrução de tecidos humanos (ossos, tendões, cartilagens, vasos sanguíneos, nervos, etc.). São três as suas entidades fundamentais: células, biomoléculas e biomateriais. O objetivo da ET é reparar, substituir, manter e melhorar as propriedades de um tecido ou órgão por meio de células vivas, criando um substituto tecidual funcional mediante o cultivo destas células em um biomaterial – que gradualmente será degradado enquanto as células se desenvolvem, dando lugar a um completo tecido natural.

É sabido que a ET já era aplicada e estudada desde os primórdios. Por exemplo, em 2000 a.C., quando utilizavam ouro para reconstrução de defeitos ósseos do crânio (ASTI; GIOGLIO, 2014). No entanto, o termo em si, como conhecido atualmente, surgiu em 1988 durante um Seminário da *Science Foundation*, no qual foi definido como: “A aplicação de princípios e métodos de engenharia e ciências da vida para a compreensão fundamental das relações estrutura-função em tecidos mamíferos normais e patológicos e o desenvolvimento de substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar a função do tecido” (O’BRIEN, 2011, p. 88).

Por meio de uma estrutura 3D de um biomaterial, as células ali aderidas estabelecem uma ECM, provendo os componentes necessários para a reconstrução do tecido desejado.

3.2.1 SCAFFOLDS E SUAS PROPRIEDADES

Scaffolds, em português, arcabouços, são estruturas tridimensionais as quais servirão de suporte mecânico para as células ali incorporadas. Também podem ser chamados de matrizes sintéticas extracelulares, já que neste ambiente as células se proliferam, migram e se diferenciam, formando tecidos sobre um alicerce em 3D (COLLINS; BIRKINSHAW, 2013).

Fabricados de biomateriais, podem ser absorvíveis; naturais ou sintéticos, isso de acordo com a aplicação requerida. Podem ser estruturas abertas ou fechadas, ou seja, as abertas são aquelas que os *scaffolds* são implementados no organismo e ali se mantêm totalmente integrados ao tecido receptor; as fechadas compreendem os sistemas em que as células estão isoladas do organismo por uma membrana, a qual permite trocas gasosas e de nutrientes ao mesmo tempo em que age como uma barreira contra outras entidades maiores (células imunes e anticorpos) (SEGURA, 2004).

Existem três categorias que definem esses arcabouços, são elas (COLLINS; BIRKINSHAW, 2013):

- CONDUTIVA: *scaffolds* bioabsorvíveis são implantados diretamente no local da lesão, fornecendo suporte mecânico e o espaço necessário para o crescimento do tecido.
- INDUTIVA: o *scaffold* atua da mesma maneira que o condutivo, mas, neste caso, sinais bioativos (ex.: fatores de crescimento) são inseridos para auxiliar as células durante o processo de formação do tecido.
- SEMEAÇÃO DE CÉLULAS: nesta categoria atua como a indutiva, porém o cultivo de células é *ex vivo*, ou seja, o crescimento do tecido se dá em um biorreator.

Dentre essas categorias, a semeadura de células contém algumas limitações que incluem a fonte de células a ser usada e a elaboração de biorreatores que forneçam os sinais químicos e mecânicos adequados para a regeneração dos tecidos. As células são obtidas por biópsias, doadores compatíveis ou fontes de células-tronco (adulta ou fetal).

No caso das condutivas e indutivas, a ideia é que as células que regenerarão o tecido provenham justamente do entorno do local doente ou lesionado, e que serão induzidas a se infiltrarem no *scaffold*.

De qualquer forma, é importante ressaltar que, independentemente da categoria na qual o arcabouço está inserido, faz-se mister que contenha determinadas propriedades mecânicas para o sucesso da técnica. Idealmente, essas propriedades (resistência à compressão, à fadiga, bem como módulo de elasticidade) devem ser similares as do tecido no qual será implantado, seja uma região de tecido ósseo, epitelial, etc., que possua uma estrutura suficientemente resistente para seu manuseio durante a implantação e para as atividades diárias do paciente (ASTI; GIOGLIO, 2014). Por exemplo, um arcabouço para a região de osso cortical deve possuir valores de resistência à compressão (no eixo longitudinal) e à tração entre 100-230 MPa e 50-151 MPa, respectivamente, e módulo de elasticidade por volta de 7 a 30 GPa (HUTMACHER et al., 2007).

Ao se fabricar um *scaffold*, alguns requisitos ademais das propriedades mecânicas devem ser levados em consideração: ser biocompatível, sem gerar toxicidade ou inflamação *in vivo* (o mesmo para os produtos gerados pela sua degradação, se houver); possuir superfície que permita a adesão, o crescimento e a conservação celular; ser manufaturável e replicável; possuir uma porosidade considerável que garanta uma penetração celular e difusão de nutrientes para estas células e para a ECM formada, e que os poros sejam interconectados para permitir uma formação tecidual homogênea, além de permitir que resíduos e produtos de degradação do arcabouço possam ser expelidos do corpo sem interferências (O'BRIEN, 2011). A bioatividade do *scaffold* pode ser aumentada por meio da inserção de materiais que possuam a capacidade de interagir ou se ligar com os tecidos vivos (TURNBULL et al., 2018).

Diversos estudos observaram que a densidade e o tamanho dos poros influenciam de forma significativa na adesão e no crescimento celular (GUPTA et al., 2018; KROK-BORKOWICZ et al., 2019; ZELTINGER et al., 2001). Quanto menor o tamanho do poro, maior a área superficial do *scaffold* e, conseqüentemente, maior a probabilidade de a célula interagir e aderir a este último. No entanto, poros demasiadamente pequenos podem impedir a migração das células.

A interação primária entre *scaffolds* e células ocorre via grupos químicos, chamados ligantes, na superfície do material. Quando o *scaffold* é produzido de um material natural, como o colágeno, este naturalmente possui a sequência tripeptídica de ligação arginina-glicina-aspartato (RGD). Quando produzido de material sintético, pode necessitar a incorporação destes ligantes por intermédio, por exemplo, da adsorção proteica. A densidade destes ligantes é influenciada pela área superficial específica dos poros e, para que esta área

seja alta, os poros devem ser pequenos o suficiente, conduzindo a uma mínima densidade de ligantes que levem a aderir um número crítico de células eficientemente. Com uma área superficial alta ocorre um aumento da solubilidade iônica na microrregião, promovendo pontos de adesão para as células (COLLINS; BIRKINSHAW, 2013; VENUGOPAL et al., 2011).

Conforme reportado por TURNBULL et al. (2018), arcabouços com tamanho de poro em torno de 300 μm promoveram formação óssea (osteogênese), devido à alta permeabilidade e potencial de vascularização. Uma melhor angiogênese *in vivo* ocorreu por conta de um aumento da macroporosidade do *scaffold*, enquanto o grau de microporosidade (diâmetro de poros menores que 10 μm) resultou em efeitos osteogênicos, isso por melhorar a interação célula-*scaffold*. Portanto, no caso de *scaffolds* para aplicações ósseas, os mesmos devem apresentar uma mistura de macroporos para o crescimento interno das células *in vivo*, e de microporos para estimular a interação célula-*scaffold* (ligantes). Para a formação de cartilagem (condrogênese), tamanhos de poro menores (próximos a 100 μm) que os para aplicação óssea foram mais favoráveis, pois a cartilagem articular normalmente é nutrida pelo fluido articular e o osso pelos nutrientes da circulação sanguínea.

Os valores médios de poros mais favoráveis dependem da natureza do material e das células aplicadas. Células musculares lisas vasculares aderiram em poros com média entre 63 a 150 μm , enquanto nos fibroblastos a média foi mais ampla, de 38 a 150 μm em *scaffolds* de PLLA (ZELTINGER et al., 2001). Na pesquisa de KROK-BORKOWICZ et al. (2019), foram comparados *scaffolds* de PLGA com e sem HAp e diferentes tamanhos de poros e sua influência na proliferação de osteoblastos. Demonstrou-se que a HAp aumentou a molhabilidade do PLGA e, com isso, apresentou melhores resultados: com porosidade entre 250-320 μm , os *scaffolds* com HAp tiveram uma proliferação de células significativamente maior que as só com PLGA; com porosidade entre 400-600 μm , o crescimento celular foi maior com a presença de HAp; a marcação osteopontin foi mais abundante em porosidade 400-600 μm com HAp.

Outro exemplo que comprova que o material do *scaffold* influencia no comportamento das células é o de YUAN et al. (2018), em que microesferas de PLGA foram revestidas com poli-L-lisina (PLL), resultando em uma maior atração por parte das células ósseas a esses *scaffolds* quando comparados aos sem revestimento. Tal atração ocorreu porque as células tendem a se espalhar mais uniformemente no substrato graças à forte interação entre as cargas positivas do PLL e as cargas negativas das membranas celulares.

Scaffolds podem apresentar diversas estruturas e formatos (Figura 3.11), como microesferas porosas, sólidos porosos, esponjas, redes de micro e/ou nanofibras, espumas, hidrogéis e etc. (CHAUDHARI et al., 2016).

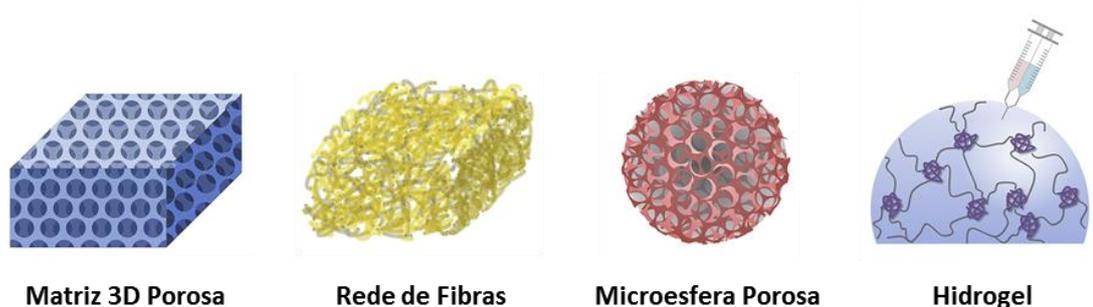


Figura 3.11. Ilustração dos principais formatos de *scaffolds*: matriz sólida 3D porosa, rede de micro e/ou nanofibras, microesfera porosa e hidrogel. Adaptado de PARK et al. (2017), p. 85.

Sólidos porosos apresentam como vantagem um ótimo ambiente para a ECM e transporte de nutrientes para as células devido a sua alta porosidade. Além disso, permitem definir o tamanho de poro, o que evita que as células se aglomerem de tal forma que gerem um centro de necrose. Espumas e esponjas são mecanicamente mais estáveis que estruturas de redes. Estes sólidos são comumente utilizados em crescimento de tecidos, órgãos e tecidos duros como ossos (CHAUDHARI et al., 2016).

Microesferas porosas possuem a vantagem de serem facilmente processáveis e permitirem o controle do tempo de liberação de fármacos. Suas propriedades de adesão e migração são ótimas. No entanto, microesferas que passam por processo de sinterização podem diminuir a viabilidade das células (CHAUDHARI et al., 2016).

Hidrogéis são amplamente utilizados para a regeneração de tecidos, angiogênese, curativos de feridas e apresentam como vantagens sua alta biocompatibilidade e excelente controle de biodegradação. Porém, estes *scaffolds* apresentam baixa resistência mecânica (CHAUDHARI et al., 2016).

Redes de micro e/ou nanofibras possuem os melhores nichos para a adesão, proliferação e diferenciação de células, já que suas estruturas são formadas por uma alta micro/nanoporosidade. Algumas vezes necessitam que suas superfícies sejam funcionalizadas para promover uma melhor adsorção proteica. Podem ser utilizadas tanto em tecidos moles como duros e, mais recentemente, atuam como veículos para liberação controlada de fármacos, proteínas e DNA (VASITA; KATTI, 2006).

Existem também os casos em que essas estruturas são mescladas, como na pesquisa realizada por LIU, JIN e MA (2011), que fabricaram microesferas ocas utilizando nanofibras de PLLA (estrutura forma de estrela) para atuar como um veículo injetável de células. Essas microesferas integraram uma arquitetura de ECM com uma forma injetável altamente porosa e resultaram em uma eficiente regeneração de tecido cartilaginoso quando comparados a microesferas normais.

Essa ampla gama de estruturas permite que os arcabouços sejam utilizados nas mais variadas situações: curativos para feridas, membranas para lesões internas, membranas para hemodiálise, catéteres vasculares e urinários, malhas para suporte de órgãos e tecidos (evitando prolapso e hérnia), regeneração óssea, regeneração de tendões, de ligamentos, de células nervosas, *stents* vasculares e traqueais, válvulas coronárias, promoção de angiogênese, são algumas das aplicações em que os *scaffolds* estão inseridos (Figuras 3.12 a 3.16). Sem mencionar os que ainda possuem a função de liberar de forma controlada e gradual fármacos ali adicionados (Figura 3.17) (MAITZ, 2015).

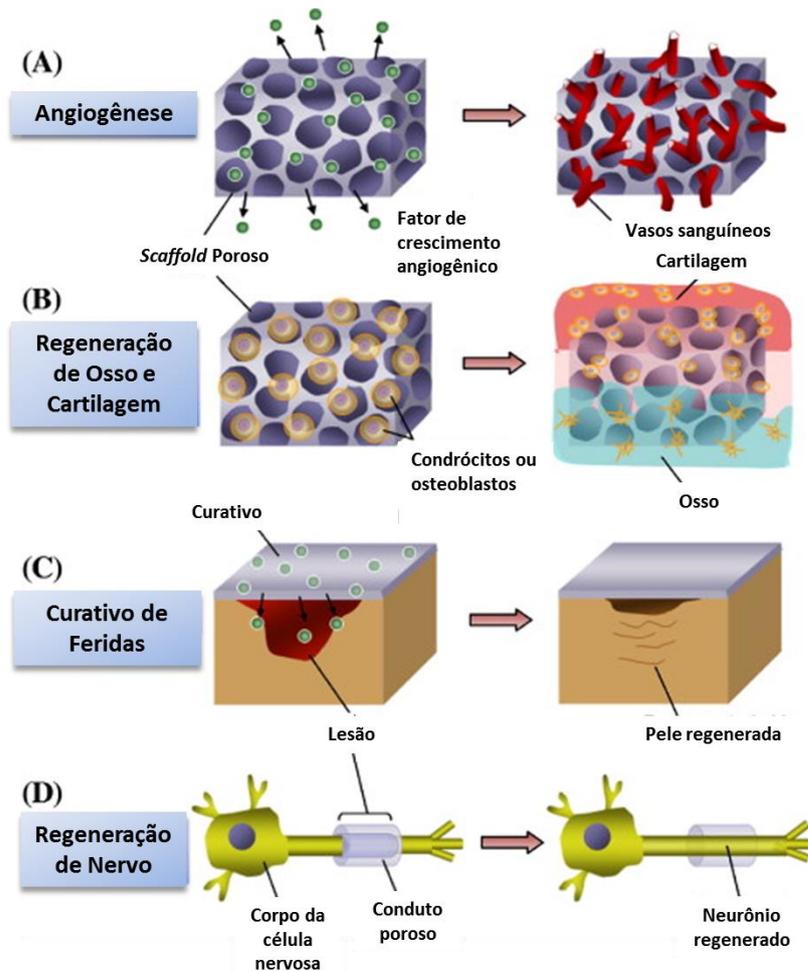


Figura 3.12. Ilustração das principais aplicações dos *scaffolds*: a) angiogênese; b) regeneração de ossos e cartilagens; c) curativo para feridas; d) regeneração de células nervosas. Adaptado de CHUNG & PARK (2007), p. 255.

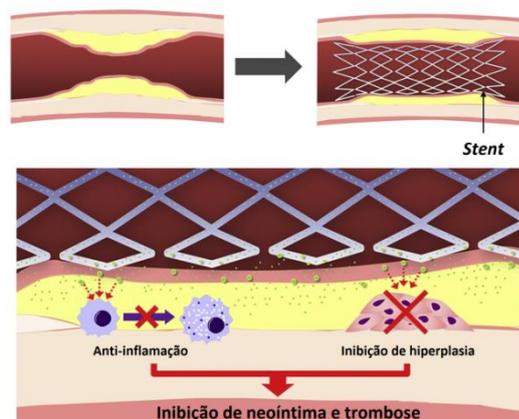


Figura 3.13. Ilustração em detalhe do funcionamento de um *stent*. Adaptado de PARK et al. (2017), p. 94.

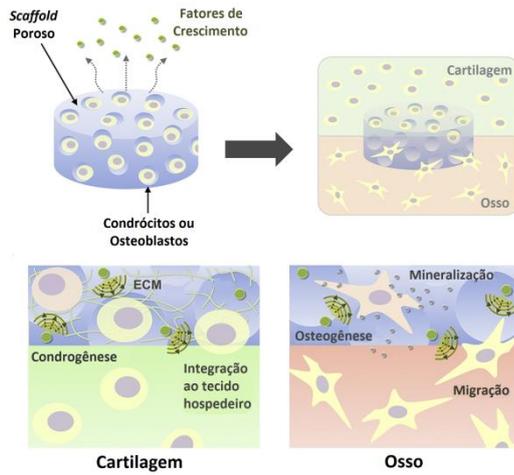


Figura 3.14. Ilustração em detalhe da regeneração óssea e de cartilagem por um *scaffold*. Adaptado de PARK et al. (2017), p. 92.

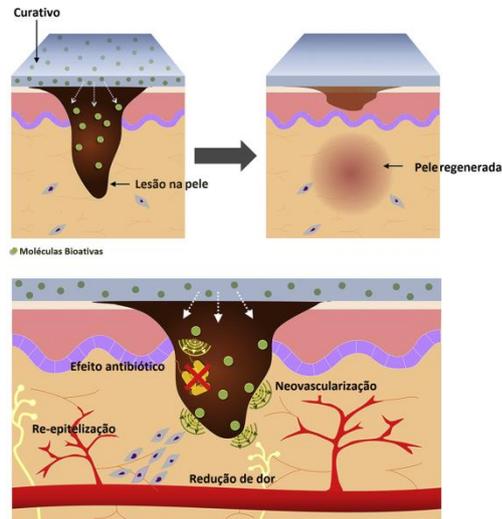


Figura 3.15. Ilustração em detalhe da regeneração de pele por um curativo. Adaptado de PARK et al. (2017), p. 91.

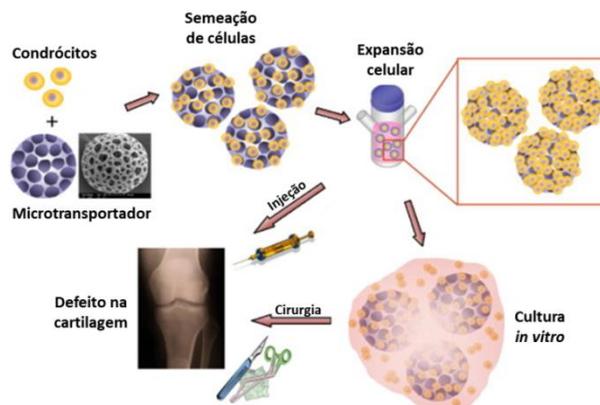


Figura 3.16. Ilustração em detalhe do mecanismo de regeneração de cartilagem por injeção de microesferas porosas. Adaptado de CHUNG & PARK (2007), p. 258.

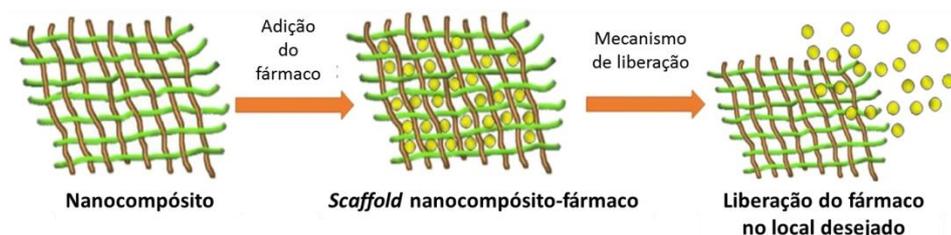


Figura 3.17. Ilustração do mecanismo de liberação controlada de fármaco. Adaptado de JACOB et al. (2018), p. 45.

3.2.2 MÉTODOS DE FABRICAÇÃO DE SCAFFOLDS

Nas últimas décadas, o interesse por tecnologias que promovam o bem-estar está em constante crescimento, juntamente com o avanço do desenvolvimento de técnicas para processamento de *scaffolds*. A Figura 3.18 exemplifica alguns destes métodos de obtenção de *scaffolds* porosos.

Scaffolds podem ser produzidos por lixiviação de partículas e *solvent casting*, que são técnicas em que um agente porogênico (sal, açúcar, amido de milho, etc.) é disperso em um material líquido (polímero) ou em pó. O polímero solubilizado é solidificado por evaporação do solvente, reticulação ou outras reações e o pó é compactado mediante pressão e temperatura. Ao obter a estrutura sólida, as partículas do agente porogênico são dissolvidas com solvente específico, gerando a estrutura porosa.

Separação de fases é outra técnica de fabricação, podendo ser do tipo induzida quimicamente, não induzida por solvente (do inglês, NIPS) e termicamente induzida (do inglês, TIPS). No processo desta última, a temperatura da solução do polímero é reduzida para induzir a separação das fases. Após, ocorre a remoção do solvente, por extração, sublimação ou evaporação e a fase mais abundante do polímero permanece agora com poros formados onde o solvente estava.

Secagem por congelamento (*Freeze Drying*) é uma técnica parecida com a separação de fases, em que um polímero diluído é congelado, fazendo com que o solvente crie cristais de gelo. Após, aplica-se uma pressão menor que a pressão de vapor de equilíbrio deste solvente, fazendo com que este último sublime, gerando um polímero sólido com microestrutura porosa interligada.

Estas técnicas, por mais que produzam materiais porosos, não são suficientemente flexíveis para estruturas 3D mais complexas (WANG et al., 2011a).

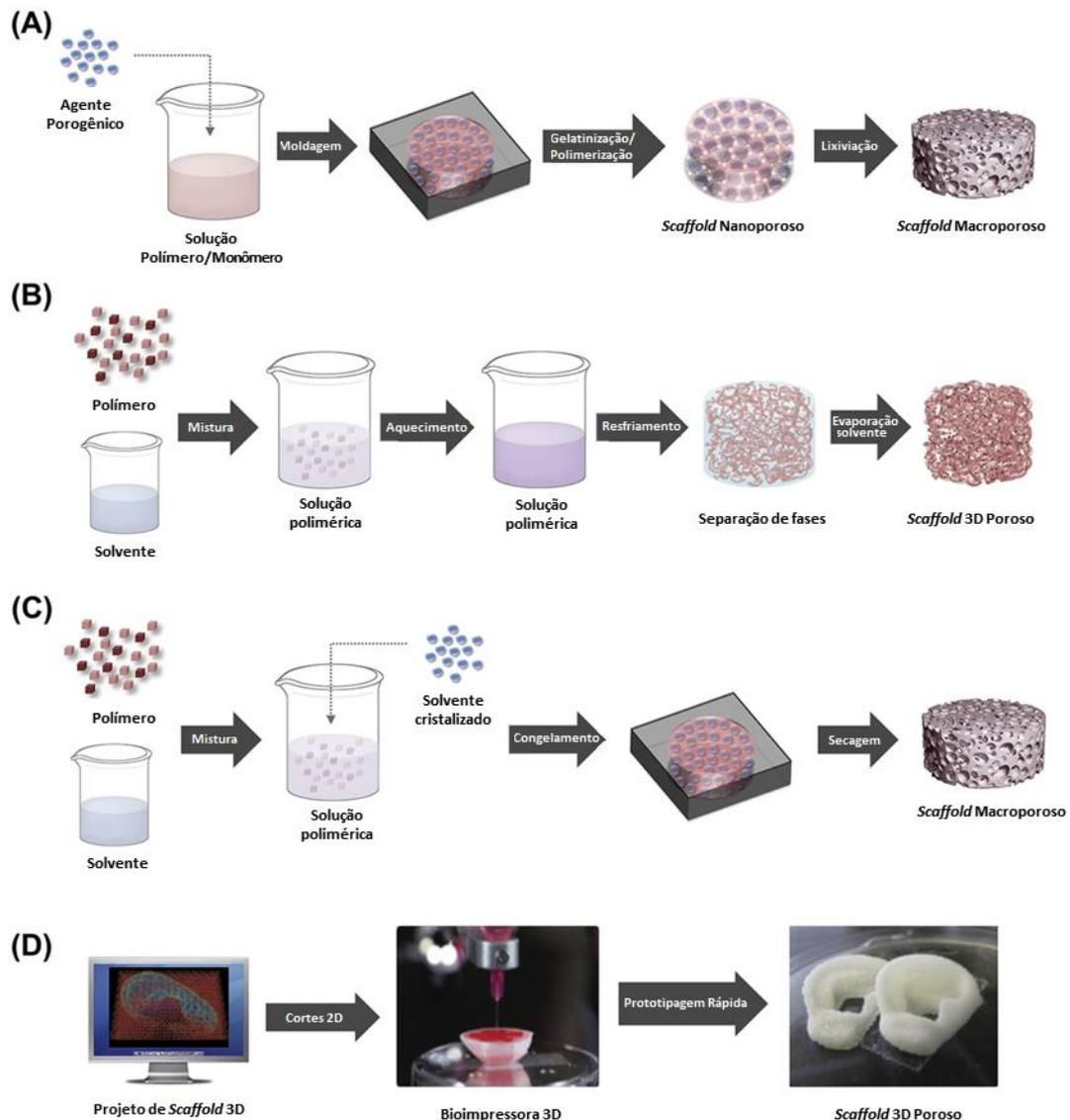


Figura 3.18. Métodos de fabricação de *scaffolds* porosos: a) *Solvent casting* e lixiviação de partículas; b) Separação de fases termicamente induzida; c) Secagem por congelamento; e d) Impressão 3D. Adaptado de PARK et al. (2017), p. 86.

Impressão 3D é uma técnica mais recente, na qual se utilizam ferramentas computacionais para gerar uma arquitetura em 3D, a qual é enviada a uma impressora integrada. Essa impressora fabrica o *scaffold* por meio de um processo aditivo, no qual camadas são sobrepostas formando o sólido. Sua grande limitação é o alto custo e a viabilidade do material a ser empregado como tinta de impressão.

Além desses processos de manufatura, existem os voltados diretamente para a fabricação de micro e nanofibras poliméricas, como ES, CS, *melt spinning*, *wet spinning*, gotejamento, entre outros.

3.2.2.1 FIBRAS POLIMÉRICAS POR *ELECTROSPINNING*

ES ou eletrofiação é uma técnica bastante popular de fabricação de fibras poliméricas. Desenvolvida em 1902, mas empregada efetivamente a partir de 1995, sua popularidade é tamanha que de 2017 até junho de 2019 já foram produzidos mais de 7.500 trabalhos de investigação⁶ (SARKAR et al., 2010).

Esta popularidade se deve em grande parte por se tratar de uma técnica bastante flexível quanto à produção de fibras em diferentes tamanhos (podendo chegar a escalas nanométricas) e diferentes estruturas, como fibras ocas, fibras coaxiais, entre outros. Consiste na formação das fibras por intermédio de forças eletrostáticas; o polímero solubilizado é atraído até a superfície por conta de uma diferença de potencial de um campo elétrico de alta tensão. A atração ocorre quando a carga elétrica supera a tensão superficial deste polímero (Figura 3.19). Pode ser utilizada uma única agulha ou múltiplas para produzir uma maior quantidade e/ou mesclar diferentes polímeros (ROGALSKI; BASTIAANSEN; PEIJS, 2017). Sua grande limitação está condicionada ao fator da baixa taxa de produção, na dependência de um polímero/solvente condutor e da necessidade de alta voltagem.

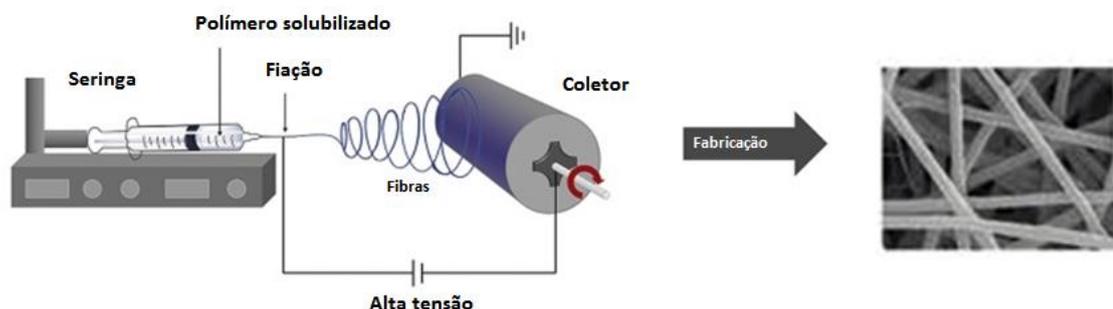


Figura 3.19. Método de fabricação de fibras por ES. Adaptado de PARK et al. (2017), p. 86.

3.2.2.2 FIBRAS POLIMÉRICAS POR *CENTRIFUGAL SPINNING*

Enquanto a técnica ES é amplamente utilizada e conhecida há décadas, a CS (ou também nomeada como *Rotary Jet Spinning*, *Rotor Spinning* e *Forcespinning*TM) surgiu no final da década passada. Foi patenteada em 2010 como *Forcespinning*TM pela Universidade do Texas, mas suas outras denominações seguiram em uso.

Surge justamente como alternativa às limitações do ES, não necessitando de altas tensões e com uma taxa de produção alta. Estudos demonstraram que um equipamento de CS de laboratório pode produzir 50 vezes mais a quantidade de fibras que por ES: 60 g/h por CS

⁶ Dados fornecidos pelo banco de dados da Web of ScienceTM; Disponível em: <<https://www.webofknowledge.com>>.

em contrapartida com 0,11 g/h por ES – comparando um único orifício para CS e uma única agulha para ES (ROGALSKI; BASTIAANSEN; PEIJS, 2017).

Baseia-se no princípio da máquina de produzir algodão doce: um reservatório para adição de um polímero (pode estar solubilizado ou sólido – em alguns casos os equipamentos possuem motores de aquecimento onde o polímero é fundido) e de um orifício, pelo qual o polímero é ejetado, formando a fibra. O reservatório é rotado a uma velocidade angular suficiente para expulsar o polímero que será coletado por hastes verticais. Algumas variações no método de coleta podem ser utilizadas, como adicionar hastes rotatórias, por exemplo. Uma ilustração do equipamento pode ser vista na Figura 3.20.

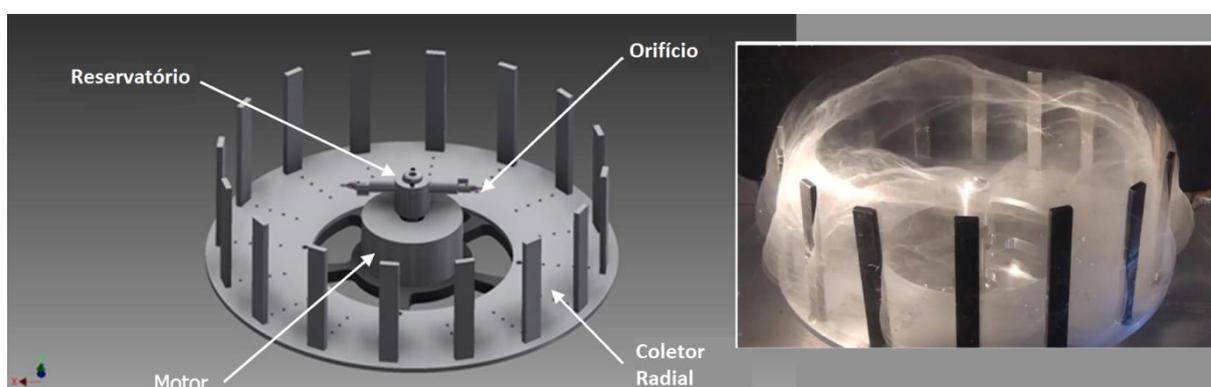


Figura 3.20. Método de fabricação de fibras por CS. Adaptado de ROGALSKI; BASTIAANSEN; PEIJS (2017), p. 100.

Atualmente, diversas pesquisas vêm sendo realizadas com o intuito de entender o processo por esta técnica, demonstrando resultados satisfatórios para o processamento de fibras em escala micro e nanométricas. Autores afirmam que os materiais produzidos por CS são melhores opções para a ET devido a sua estrutura “*fluffy*”, como uma nuvem de fibras (LOORDHUSWAMY et al., 2014).

Parâmetros como velocidade de rotação, concentração, taxa de evaporação (para soluções), temperatura (para aquecimento) e distância do coletor influenciam diretamente na morfologia e no diâmetro da fibra (DABIRIAN et al., 2011).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Elucidando da melhor forma possível o entendimento deste trabalho, a metodologia foi dividida em três etapas. A primeira diz respeito à produção de membranas com diferentes composições da blenda Cellprene[®] com a adição de PEG e HAp. O PEG foi adicionado à blenda com o intuito de atuar como plastificante e melhorar as propriedades de processamento do material, enquanto a HAp foi adicionada a fim de aprimorar a biocompatibilidade da fibra. A HAp foi produzida pelo Labiomat e obtida pela técnica de precipitação por via úmida, usando ácido fosfórico e hidróxido de cálcio como precursores (RAMESH et al., 2007).

Já a segunda etapa é destinada ao processamento via ES e CS dessas membranas. Durante ambas as etapas foram realizadas as caracterizações necessárias. E, por fim, a terceira e última etapa visou à avaliação do melhor resultado e refinamento da sua estrutura, para posterior utilização como *scaffold*.

As etapas referentes ao processamento via ES e ensaios *in vitro* foram realizados no *Laboratório de Biomateriales, Materiales Biológicos y Ingeniería Regenerativa del Centro de Tecnología Biomédica (CTB)* pertencente à *Universidad Politécnica de Madrid*. Todas as outras foram realizadas nos laboratórios pertencentes à Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

A seguir, fluxograma (Figura 4.1) e detalhamento de cada etapa.

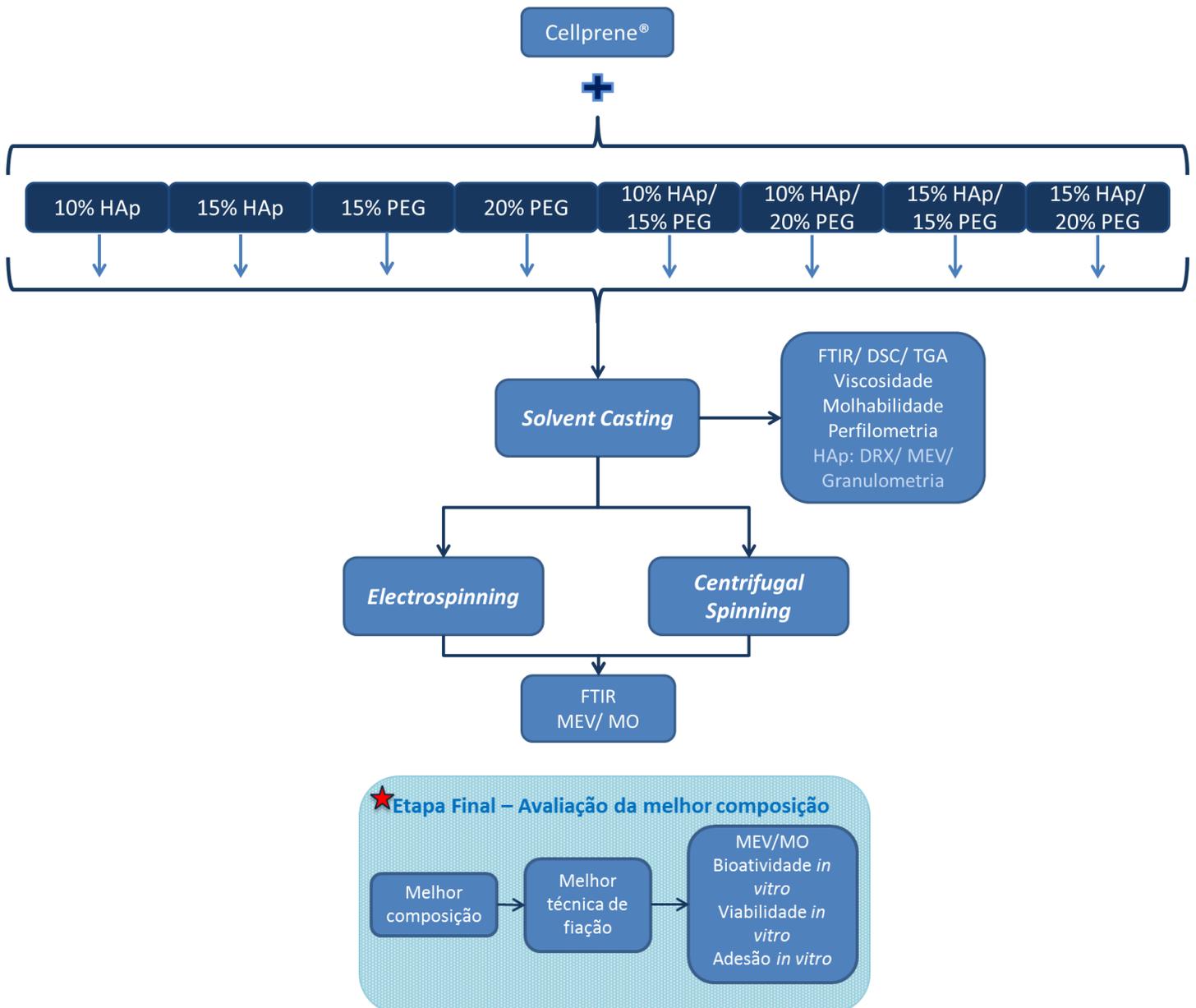


Figura 4.1. Fluxograma da metodologia empregada neste trabalho.

4.1 ETAPA 1 - PRODUÇÃO, PROCESSAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE CELLPRENE[®] COM ADITIVOS

4.1.1 OBTENÇÃO DAS MEMBRANAS POLIMÉRICAS

Baseando-se na metodologia descrita no trabalho de Marques (2011) – Anexo I –, a adição dos componentes PEG (PEG, Mn = 8000 g/mol – Fischer Scientific) e HAp na blenda Cellprene[®] se deu durante a dissolução em clorofórmio (Clorofórmio P. A. – ACS, Dinâmica Química Cont. LTDA) do PI (Mn = 317604 g/mol – Mafer) e PLGA (Mn = 170471 g/mol – Purasorb[®] PLG 8531, Corbion Purac). Todas as etapas seguiram a mesma metodologia, tomando o cuidado de se manterem as proporções de PI e PLGA fiéis às originais.

Assim, foram produzidas diferentes membranas com diferentes composições (conforme Tabela 4.1) pelo método *solvent casting* e, sequencialmente, as amostras foram secadas em estufa a 40 °C e armazenadas a 4 °C.

Tabela 4.1. Amostras e suas composições.

AMOSTRA	COMPOSIÇÃO (%)
15% PEG	15% PEG/ 34% PI/ 51% PLGA
20% PEG	20% PEG/ 32% PI/ 48% PLGA
10% HAp	10% HAp/ 36% PI/ 54% PLGA
15% HAp	15% HAp/ 34% PI/ 51% PLGA
10% HAp / 15% PEG	10% HAp/ 15% PEG/ 30% PI/ 45% PLGA
10% HAp/ 20% PEG	10% HAp/ 20% PEG/ 28% PI/ 42% PLGA
15% HAp/ 15% PEG	15% HAp/ 15% PEG/ 28% PI/ 42% PLGA
15% HAp/ 20% PEG	15% HAp/ 20% PEG/ 26% PI/ 39% PLGA

4.1.2 CARACTERIZAÇÕES DAS MEMBRANAS POLIMÉRICAS

4.1.2.1 CARACTERIZAÇÕES TERMOQUÍMICAS E TERMOFÍSICAS

As membranas obtidas por *solvent casting* foram caracterizadas quanto à sua composição química – Espectroscopia de Radiação Infravermelha por Transformada de Fourier (no inglês, FTIR) – e seu comportamento térmico – Calorimetria Diferencial de Varredura (no inglês, DSC) e Análise Termogravimétrica (no inglês, TGA).

Para caracterização por FTIR, os espectros das composições poliméricas na região de 4000–500 cm⁻¹ foram obtidos utilizando espectrômetro Perkin Elmer modelo Spectrum 1000

à temperatura ambiente (25 °C). Como base de parâmetros para procedimento, o ensaio obedeceu às regras descritas na norma ASTM D2702-05.

Para caracterização por DSC, os termogramas foram obtidos em um calorímetro diferencial de varredura TA Instruments Q20, em um intervalo de -80 °C a 270 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min, e análise sobre o segundo ciclo para eliminação de histórico térmico das composições decorrente do processamento. Como base de parâmetros para procedimento, o ensaio obedeceu às regras descritas na norma ASTM D3418-15.

TGA foi aplicada usando equipamento Seiko TG/DTA 220 Thermal System, com uma taxa de aquecimento de 10 °C/min, entre 40-380 °C. A análise foi aplicada às amostras após volatilização. Como base de parâmetros para procedimento, os ensaios obedeceram às regras descritas na norma ASTM D3850-19.

4.1.2.2 CARACTERIZAÇÃO DA HIDROXIAPATITA

A HAp foi caracterizada quanto às suas fases, tamanho de cristalito e distribuição granulométrica.

A distribuição granulométrica foi obtida utilizando granulômetro modelo CILAS 1180 pela técnica de Difração a Laser e com a amostra dispersa em álcool etílico. Esta técnica permite obter o tamanho médio e a distribuição do tamanho das partículas. Foi realizada também análise por microscópio eletrônico de varredura (MEV, modelo JSM – 6060, marca JEOL). Para o MEV, a HAp foi dispersa em água e revestida com uma fina camada de ouro, utilizando tensão de 15 kV.

Para avaliação da composição das fases e tamanho de cristalito foi utilizada a técnica de Difração de Raio-X (DRX). O ensaio foi executado em um equipamento Philips modelo X'Pert MPD com tubo de cobre (radiação $K\alpha = 1,5418 \text{ \AA}$) e a análise dos difratogramas foi realizada com a ferramenta X'pert Highscore, sobre a base de dados da *International Centre for Diffraction Data* (ICDD[®]). As varreduras para análise das fases foram executadas com velocidade de 0,05 °/s e intervalo de 10 a 80 °. A tensão e a corrente utilizadas no tubo foram de 40 kV e 40 mA, respectivamente. Quanto ao tamanho de cristalito, este foi calculado pela Lei de Scherrer (Equação 4.1):

$$T = \frac{K \cdot \lambda}{\beta \cos \theta} \quad \text{Equação 4.1}$$

Em que: K = constante de Scherrer (parametrizada como sendo 1.0); λ = comprimento de onda; β = largura do pico; θ = ângulo de Bragg.

4.1.2.3 CARACTERIZAÇÕES MORFOLÓGICAS E REOLÓGICAS

Além das caracterizações referentes às questões termoquímicas e termofísicas foram avaliadas outras propriedades das membranas obtidas por *solvent casting*: viscosidade, resposta do material quanto à sua molhabilidade e rugosidade.

Para as viscosidades, avaliaram-se as membranas dissolvidas em concentrações de 3% em massa de soluto em um reômetro TA Ares-G2 do tipo cone-placa; 0,041 mm de espaçamento; taxa de cisalhamento variando de 0 a 300 s⁻¹ a 25 °C. Para solubilização foi utilizado clorofórmio.

No ensaio de molhabilidade foram realizadas três medições em cada membrana e repetidas em triplicata. Para tal ensaio, a molhabilidade superficial foi obtida com a medição do ângulo de contato formado por uma gota de 1 µL de água deionizada sobre a superfície da amostra seca. Um microscópio digital (Digital Microscope Suite 2.0, marca Kruss) foi utilizado para capturar imagens do ensaio, enquanto o *software* DSA4 foi utilizado para medir o ângulo. Como base de parâmetros para procedimento, os ensaios obedeceram às regras descritas na norma ASTM D7334-08.

Para a análise da superfície, a rugosidade (R_a) das membranas foi medida no perfilômetro óptico da marca Bruker (modelo ContourGT). Foram avaliadas três medições em cada membrana e repetidas em triplicata.

4.2 ETAPA 2 - OBTENÇÃO DE FIBRAS PELAS TÉCNICAS DE *ELECTROSPINNING* E *CENTRIFUGAL SPINNING*

4.2.1 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS VIA *ELECTROSPINNING*

Todas as membranas de diferentes composições obtidas via *solvent casting* foram solubilizadas em clorofórmio e processadas via ES utilizando-se os seguintes parâmetros:

- Velocidade de rotação do coletor: 600 rpm (Digital Speed Controller, SPG Co. LTD);
- Tensão aplicada: 19 kV (NanoNC, +30 kV/2mA);
- Taxa de fluxo: 850 µL/h (Fischer Scientific);
- Distância entre a ponta da agulha e do coletor: 8 cm;
- Seringa BD 1 ml Syringe Luer-Lok™ TSP;
- Agulha Hipodérmica Labor Import 0,70 X 0,30 – 22G 1 ¼.

Foram utilizadas soluções com 3% em massa de material, valor esse baseado nos trabalhos anteriores com a blenda Cellprene® (MARQUES, 2015).

Dois tipos de coletores foram usados: um disco para a produção de fitas finas e um cilindro para produção de tubos (Figura 4.2). As amostras foram todas armazenadas em estufa por 48 horas a 40 °C, com objetivo de retirar qualquer resquício de solvente.

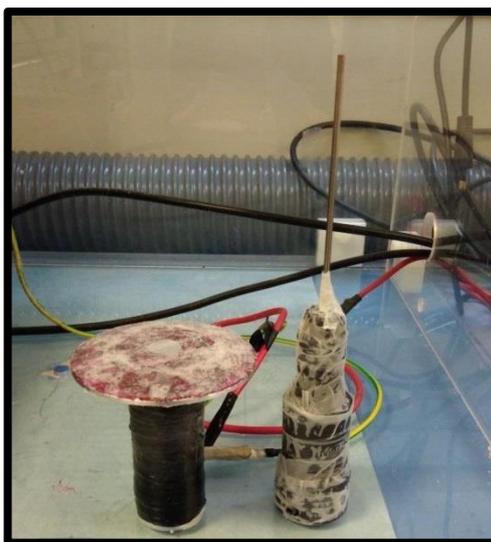


Figura 4.2. Detalhe dos dois coletores utilizados na produção via ES. O coletor à esquerda organiza as fibras em formato de fitas, e o da direita apresenta-se em formato de tubos.

4.2.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS VIA *CENTRIFUGAL SPINNING*

Foram fabricadas fibras das membranas de diferentes composições solubilizadas em clorofórmio pelo método CS e, para tal, utilizaram-se os seguintes parâmetros:

- Velocidade de rotação: 25000 rpm;
- Número de orifício de saída do material: 1;
- Diâmetro do orifício (ou abertura): 0,6 mm.

Em seguida, as fibras foram recolhidas e armazenadas em estufa por 48 horas a 40 °C, a fim de se retirarem possíveis resquícios de solvente.

4.2.3 MOLDAGEM DE TUBOS POR *CENTRIFUGAL SPINNING*

Moldagem de tubos para uso como *scaffolds* ocorreu por meio do enovelamento das fibras em um coletor cilíndrico, o qual foi acoplado a um agitador mecânico (Stirrer DLH, Velp Scientífica) e rotacionado a uma velocidade de aproximadamente 100 rpm, estando esse próximo ao equipamento de CS. Desta forma, o material solubilizado em clorofórmio foi

sendo gotejado para dentro de um recipiente e fibras foram progressivamente sendo ejetadas através de uma abertura (na parede deste recipiente) e, então, recolhidas pelo coletor. Uma ilustração do sistema pode ser vista na figura 4.3 a seguir:

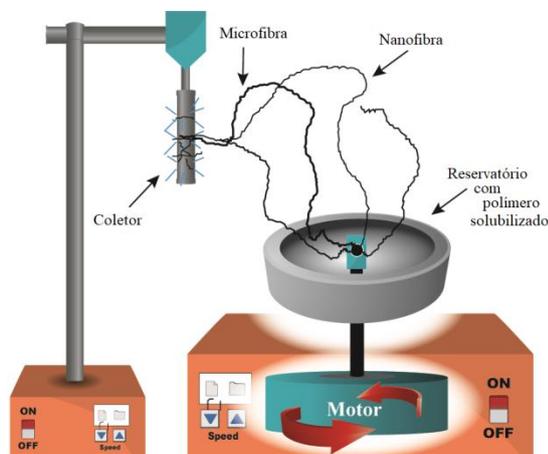


Figura 4.3. Exemplo ilustrativo de um equipamento de CS com um coletor cilíndrico acoplado ao sistema.

As amostras também foram armazenadas em estufa a 40 °C por 48 horas para eliminar possíveis resquícios de solvente e finalmente retiradas do molde, formando, assim, pequenos tubos com estrutura uniforme e resistência mecânica suficiente para o manuseio e avaliação de crescimento celular.

4.2.4 CARACTERIZAÇÃO DAS FIBRAS POLIMÉRICAS E TUBOS

Com objetivo de comparar as composições pós-processamento, caracterizações foram realizadas. Dessa maneira, foram retirados fragmentos das fibras obtidas por ambas as técnicas para avaliação.

4.2.4.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

As fibras obtidas das membranas foram avaliadas por FTIR com o objetivo de verificar a manutenção dos grupamentos químicos originais pós-processamento. Os parâmetros foram os mesmos do item 4.1.2.1.

4.2.4.2 CARACTERIZAÇÕES MORFOLÓGICAS DAS FIBRAS E TUBOS

As amostras foram avaliadas morfológicamente por microscópio óptico digital (MO, MD AM4113/ AD4113 Dino-Lite, Anno Electronics Corporation) e MEV. Estas foram

previamente revestidas com uma camada de ouro e foi utilizada tensão de 15 kV para sua análise por MEV. Para medição das espessuras, foi utilizado *software* ImageJ.

4.3 ETAPA 3 - AVALIAÇÃO DA MELHOR COMPOSIÇÃO E CARACTERIZAÇÕES

Tal etapa final foi destinada à seleção do melhor resultado obtido e ao seu melhoramento mediante a variação da concentração do soluto para a fabricação da fibra: 5% e 7% em massa. Após, análises morfológicas por meio de MEV e MO foram realizadas, bem como medição das espessuras utilizando *software* ImageJ.

4.3.1 ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.3.1.1 ENSAIO DE BIOATIVIDADE *IN VITRO*

Reproduzindo o método proposto por KOKUBO e TAKADAMA (2006), a bioatividade *in vitro* foi avaliada por meio da imersão das membranas e das fibras em Fluido Corporal Simulado (no inglês, SBF). Este fluido é uma solução com composição e concentração semelhante às partes inorgânicas do plasma humano. O SBF foi produzido nas dependências do Labiomat seguindo o protocolo descrito por KOKUBO e TAKADAMA (2006).

As membranas foram cortadas em pedaços retangulares de 10 X 10 mm e, em seguida, incubadas em 2 ml de SBF a 37 °C. Já as fibras foram pesadas e também incubadas. O fluido foi trocado a cada dois dias. Após 7, 14 e 21 dias, membranas e fibras foram removidas e secas ao ar à temperatura ambiente para posterior caracterização. O ensaio foi realizado em triplicata. A formação de estruturas obtidas nos diferentes tempos de imersão foi avaliada qualitativamente usando MEV e análise dos elementos químicos presentes pelo detector de espectroscopia de energia dispersiva (no inglês, EDS). Para o MEV, as amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro e foi utilizada tensão de 15 kV.

4.3.1.2 ENSAIO DE VIABILIDADE E ADESÃO *IN VITRO*

A fim de avaliar a viabilidade celular do material e adesão celular, as fibras foram expostas a ensaios *in vitro*. Células-tronco mesenquimais (no inglês, MSC) provenientes da medula óssea de ratos foram isoladas e cultivadas após aprovação do Comitê de Ética da *Universidad Politécnica de Madrid* (conforme Regulamentação Espanhola para experimentos em animais – Leis nº 53/2013 e nº 178/2004).

As células foram mantidas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium – GE Healthcare Life Sciences), suplementado com 10% de soro fetal bovino (no inglês, FBS), 1% penicilina/estreptomicina e 2 mM L-Glutamina e reservadas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂.

Para ensaio de viabilidade celular, foram preparadas suspensões celulares por tripsinização (0,05% tripsina – EDTA (1X), Gibco® Life Technologies) a uma densidade de 2,5 X 10⁴ células/mL, semeadas em placas de cultura de poliestireno de 24 poços (BioLite, Thermo Scientific). Fibras da amostra foram dispostas nas placas de cultura e analisadas em um período de 4, 48 e 72 horas.

A viabilidade foi avaliada mediante a adição de Calceína-AM (Gibco® Life Technologies) e Iodeto de Propídio (IP, Sigma Aldrich) aos poços por 20-30 min a 37 °C. Calceína e IP foram usadas a 5 µM e 1,5 µM, respectivamente. Com a adição destes compostos foi feita a contagem do número de células nos poços com e sem fibras (controle negativo) pelo *software* ImageJ. Microscópio de fluorescência (Leica DMI3000, Alemanha) acoplado com câmera (Leica DFC340FX) foi utilizado na análise.

O estudo de adesão das células foi realizado com a semeadura de 2,5 X 10⁴ células/mL em placas de cultura de 24 poços. Fibras da amostra foram dispostas nas placas de cultura e analisadas em um período de 1, 2, 4 e 8 horas. Após cada período, as fibras foram retiradas dos poços e cada poço foi lavado 3 vezes com solução tampão fosfato-salino (no inglês, PBS) (Gibco® Life Technologies). Em seguida, as fibras foram recolocadas nestes poços e foram adicionadas a tripsina e meio de cultura (DMEM). Por fim, as células foram contadas em microscópio óptico (Leica Dmil Led, Alemanha). Ambos os experimentos foram realizados em triplicata.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS COMPOSIÇÕES POLIMÉRICAS

5.1.1 CARACTERIZAÇÕES TERMOQUÍMICAS E TERMOFÍSICAS

Conforme previamente mencionado, as amostras foram avaliadas quanto ao seu comportamento termoquímico. As composições com PEG e HAp foram comparadas com a blenda original de PLGA/PI.

Nas figuras 5.1, 5.2 e 5.3 estão expostos os espectros de FTIR da blenda Cellprene® e das composições de PLGA/PI adicionadas de HAp e PEG. Na tabela 5.1 são apresentados os grupos funcionais e suas frequências para cada um dos componentes.

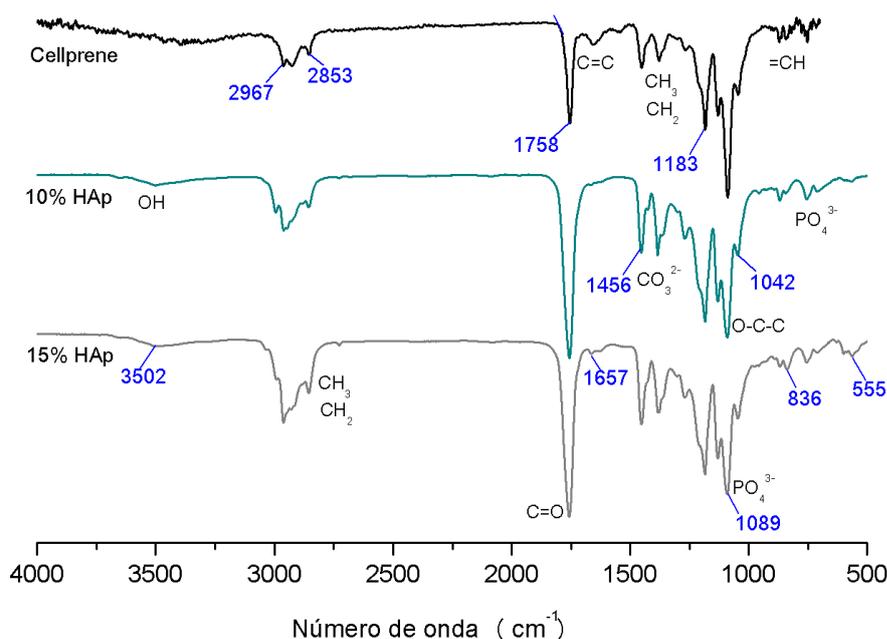


Figura 5.1. Espectros de FTIR da blenda Cellprene® e das composições contendo 10% e 15% de HAp.

Para os grupos funcionais referentes ao PLGA/PI, nota-se a presença dos estiramentos simétricos e assimétricos dos grupos CH_2 e CH_3 por volta de 2970 a 2850 cm^{-1} (Figura 5.1). Os grupamentos $\text{C}=\text{O}$ e $\text{O}-\text{C}-\text{C}$ pertencentes ao PLGA aparecem nas bandas ~ 1760 e ~ 1090 cm^{-1} , respectivamente. Ainda referente ao PLGA, encontra-se o estiramento $\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}$ de ésteres saturados por volta de ~ 1186 cm^{-1} . Os grupamentos do PI, $\text{C}=\text{C}$ (~ 1661 cm^{-1}) e $=\text{CH}$ (~ 843 cm^{-1}) se encontram nas bandas indicadas na literatura (MARQUES, 2015).

Conforme esperado, as composições que continham a blenda PLGA/PI com adição de HAp mantiveram as bandas características dos grupos funcionais dos seus componentes originais. Na região entre 3700 a 3500 cm^{-1} (Figura 5.1), pode-se notar uma leve intensidade da banda vibracional da hidroxila, grupo pertencente à HAp. É possível ainda que exista uma adsorção da molécula H_2O sendo mascarada por esta hidroxila (GAN; PILLIAR, 2004). Os outros grupos funcionais da HAp, carbonilas e fosfatos, apresentam as bandas conforme reportado na literatura (CENGIZ et al., 2008), entre 1460-1450 cm^{-1} para a carbonila e $\sim 1042 \text{ cm}^{-1}$ para o fosfato.

Tabela 5.1. Bandas de absorção relativas dos principais modos vibracionais do PLGA, PI, PEG e HAp.

COMPONENTE	GRUPO FUNCIONAL	FREQUÊNCIA (cm^{-1})
PLGA	C=O	1760
	$\nu\text{O-C-C}$ no C-O	1085 e 1090
	$\nu\text{C-C(=O)-O}$ no C-O	1185
	C-H	1450-850
PI	$\nu\text{C-H}$ no CH_2 e CH_3	2980-2850
	$\nu\text{C=C}$	1680-1600
	$\delta\text{C-H}$ no CH_2 e CH_3	1450-1375
	$\delta\text{C=C-H}$	837
PEG	νOH	3600
	$\nu\text{C-H}$ no CH_2	2880, 1359, 1342, 1279, 1240, 966, 960, 841
	$\nu\text{C-O}$	1080, 1059
HAP	OH	3572
	CO_3^{2-}	1547, 1457, 1415
	PO_4^{3-}	1087, 1032, 961, 602, 566, 471

Legenda: ν = estiramento; δ = dobramento angular simétrico no plano

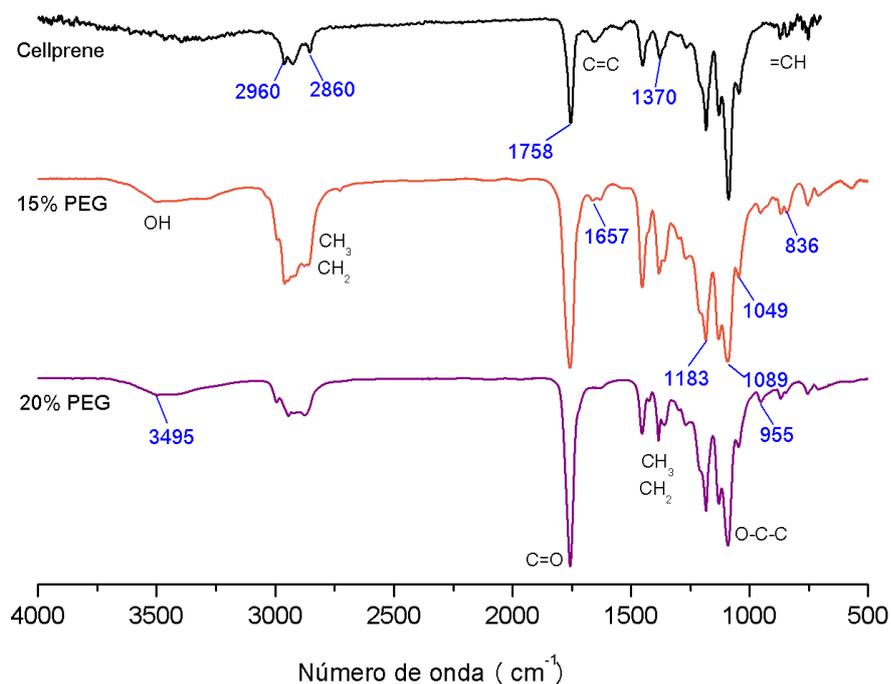


Figura 5.2. Espectros de FTIR da blenda Cellprene[®] e das composições contendo 15% e 20% de PEG.

As bandas aparentes entre as faixas 1500-800 cm^{-1} são conhecidas como a impressão digital dos materiais. Nesta faixa, são obtidas as informações a respeito das macromoléculas do PEG. As bandas referentes ao PEG estão representadas pelos estiramentos (CH_2), pelo grupo C-O em ~ 1080 e ~ 1059 cm^{-1} , além da hidroxila por volta de 3600 cm^{-1} (ILIE et al., 2010). É possível perceber que a adição de PEG na blenda (Figura 5.2) intensificou o grupo C-O. Verifica-se que os grupos funcionais permaneceram os mesmos da blenda original.

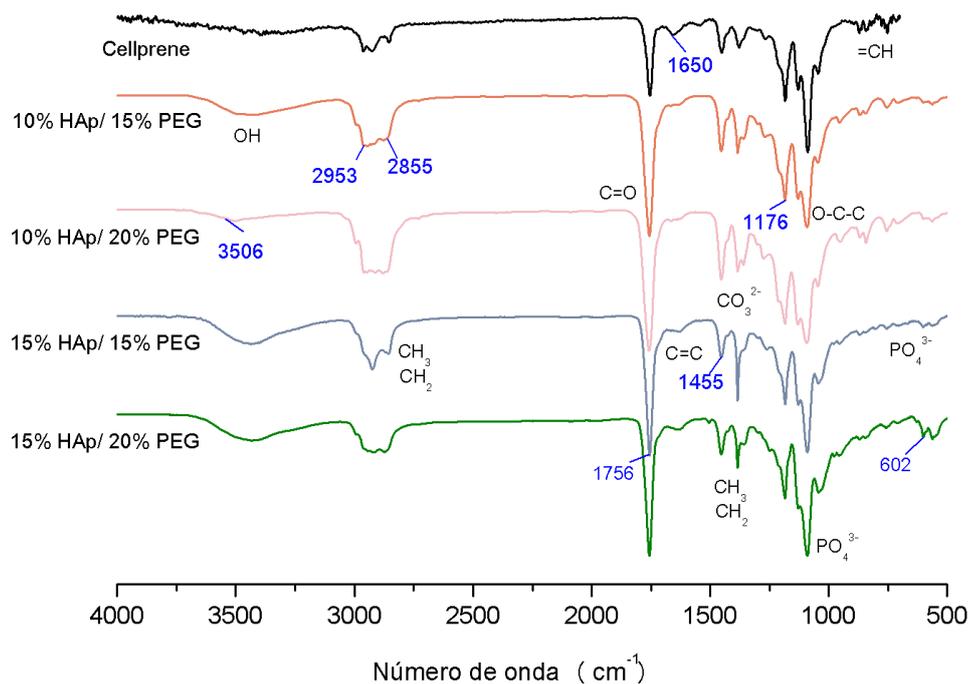


Figura 5.3. Espectros de FTIR da blenda Cellprene[®] e das composições: 10% HAp/ 15% PEG, 15% HAp/ 15% PEG, 10% HAp/ 20% PEG e 15% HAp/ 20% PEG.

A fim de avaliar as transições térmicas das diferentes composições obtidas utilizando o Cellprene[®], análises por DSC foram realizadas. Como já mencionado, foram analisados somente os segundos ciclos, permitindo assim eliminar a história térmica do material decorrente do processamento.

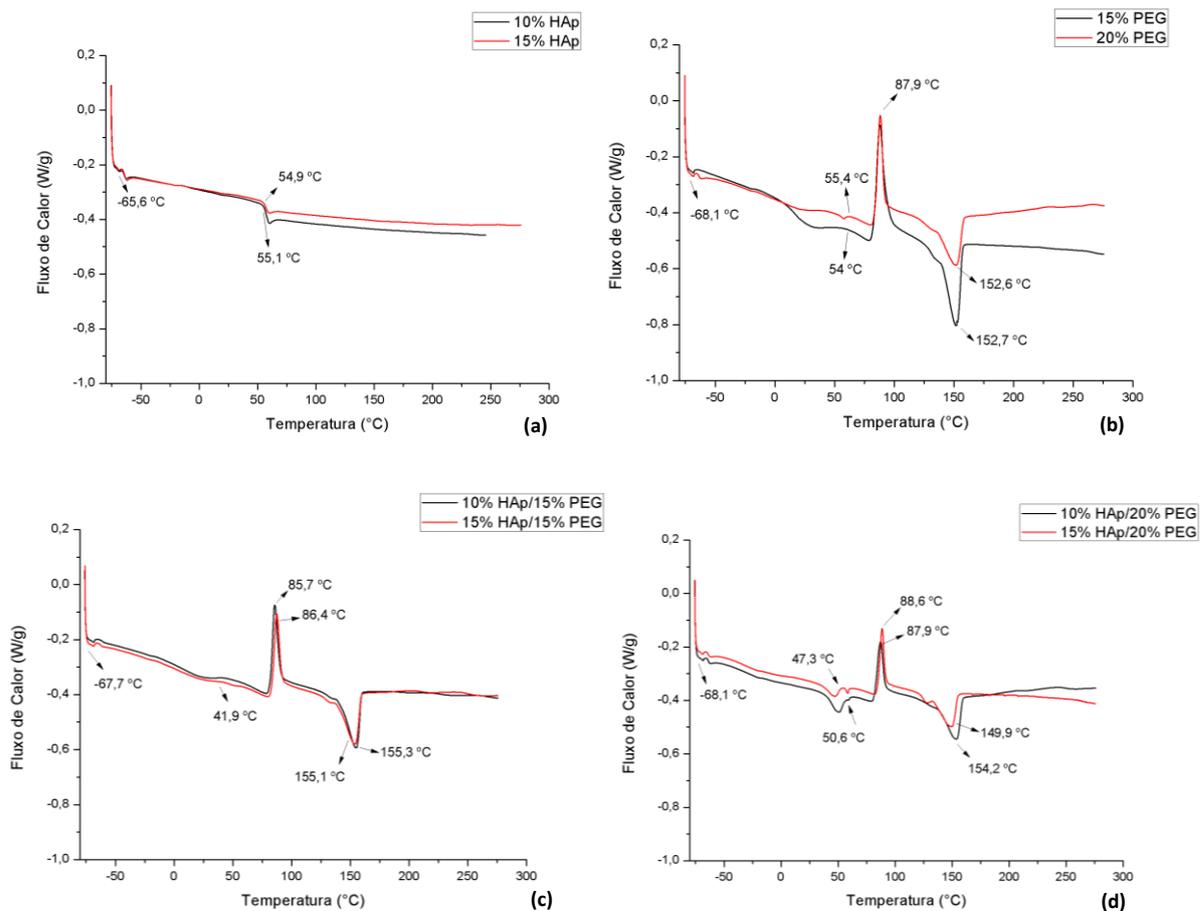


Figura 5.4. Termogramas do 2º ciclo de aquecimento das composições com destaque nos picos das T_g's (a) 10% HAp e 15% HAp; (b) 15% PEG e 20% PEG; (c) 10% HAp/15% PEG e 15% HAp/15% PEG; (d) 10% HAp/20% PEG e 15% HAp/20% PEG.

É possível perceber que os termogramas referentes às amostras contendo somente HAp – Figura 5.4(a) – apresentaram a mudança de linha de base correspondente à região da T_g, sendo na amostra com 10%, em aproximadamente -65,6 °C e em 55,1 °C. Para a amostra com 15%, em -65,6 °C e 54,9 °C, respectivamente. Ambas as mudanças da linha de base coincidem com os valores encontrados na tese de Douglas Marques (MARQUES, 2015), os quais correspondem respectivamente à T_g do PI (-66 °C) e T_g do PLGA (59 °C).

No caso das amostras com PEG (Figura 5.4(b)), um pico exotérmico pode ser visto na temperatura de 87,9 °C, sendo correspondente à temperatura de cristalização à frio (T_{cc}). De acordo com a literatura, o PEG 8000 apresenta uma temperatura de fusão (T_f) próxima a 60 °C, T_{cc} em torno de 44 °C e possui estrutura cristalina. Já o PLGA apresenta T_f = 149,45 °C, T_{cc} = 111,20 °C e estrutura semicristalina (DWI et al., 2018).

Conforme reportado por MARQUES (2011), quanto maior a concentração de PI, menor a cristalinidade da blenda. No seu estudo, ele demonstrou que, quando a relação

PLGA/PI é de 75/25, o pico exotérmico da cristalização pode ser visto no termograma (107,16 °C), mas que, ao passar para 60/40, esse desaparece. Considerando que os valores de proporção de PLGA/PI não foram modificados, pode-se concluir que a aparição do pico exotérmico é devido à presença do PEG, já que, por ser um plastificante, confere flexibilidade à mistura. Desta forma, os picos tanto de cristalização à frio quanto de fusão (152,6 °C e 152,7 °C) apresentados pelas amostras devem pertencer ao PLGA. A adição de PEG proporcionou uma maior flexibilidade à mistura, permitindo que a cadeia do PLGA se movimentasse para formar os cristalitos. Da mesma forma, nas composições com HAp, os valores de T_g estiveram próximos aos esperados.

Sobre os termogramas (c) e (d) da figura 5.4, estes exibem comportamentos bastante similares ao caso da composição com PEG, com uma pequena variação não significativa na temperatura de fusão.

Ainda que aditivos tenham sido adicionados ao Cellprene[®], é possível afirmar que os termogramas do PLGA/PI e composições permaneceram imiscíveis, isso devido às T_g bem demarcadas.

Outro ensaio realizado foi o TGA, que permite que sejam obtidas as informações relacionadas à estabilidade térmica do material. Nesse ensaio foi avaliada a perda de massa do material, ou seja, sua degradação em função da temperatura. Abaixo, os gráficos com os termogramas e das suas correspondentes derivadas (Figura 5.5):

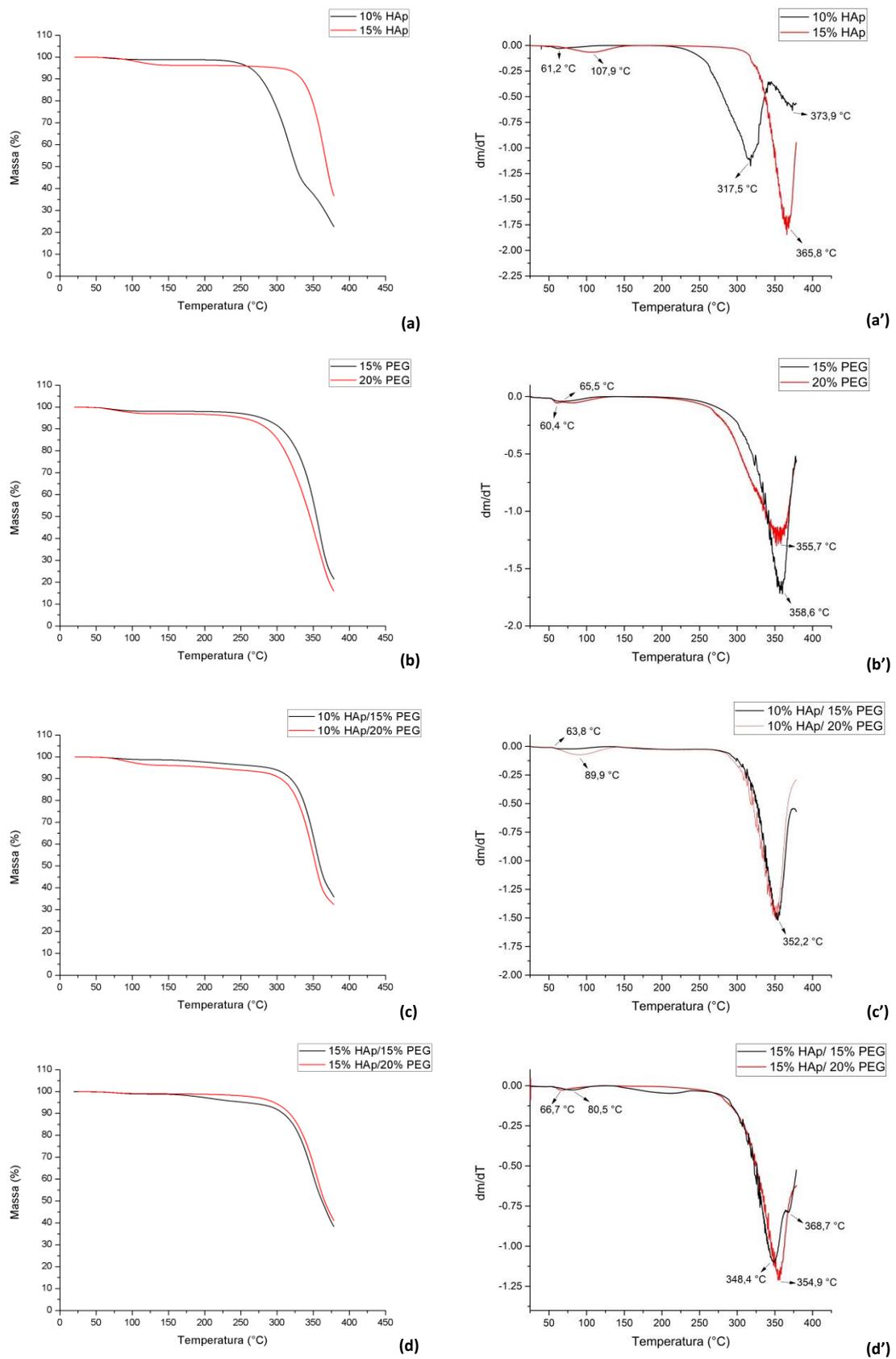


Figura 5.5. Curvas de TGA de (a) composições com HAp e (a') derivadas; (b) composições com PEG e (b') derivadas; (c) composições com 10% HAp/PEG e (c') derivadas; (d) composições com 15% HAp/PEG e (d') derivadas.

MARQUES (2015), ao desenvolver sua investigação sobre a blenda PLGA/PI, revelou que o material possui sua perda de massa completa nas inflexões de 348,3 °C e 356 °C e que esses dois picos de degradação corresponderiam ao fato de a blenda ser imiscível, mantendo as temperaturas de degradação originais de cada componente.

Pelos termogramas das composições foi possível observar que, de uma maneira geral, as inflexões de degradação se mantiveram próximas da blenda pura, apresentando sua perda completa na faixa de 348,4 °C a 368,7 °C. O PEG apresenta perda total de massa por volta de 420 °C. Outras inflexões podem ser vistas por volta de 60 °C a 100 °C, podendo estar relacionadas com perda de água e evaporação do solvente.

5.1.2 CARACTERIZAÇÃO DA HIDROXIAPATITA

Uma das maneiras de se confirmar se a composição de um determinado material é o que se acredita ser é por intermédio da técnica de DRX, pois ela permite que se obtenham as fases cristalinas de um material, a quantidade em que aparecem, além do tamanho do cristalito (CULLITY, 1978).

De acordo com a literatura, as informações adquiridas no difratograma abaixo (Figura 5.6) confirmam que o pó analisado é HAp e que houve também a formação da fase cristalina β -TCP (CHANG; KO; DOUGLAS, 2003; SHAHABI et al., 2014; VAN WAZER, 1958; VOLKMER, 2006). O pico com maior intensidade é observado em 31,7 ° de 2θ , correspondente ao principal pico da estrutura hexagonal da HAp (211) (RINCÓN-LÓPEZ et al., 2018). Os picos mais intensos observados estão entre 20 e 60 ° de 2θ .

O difratograma revelou os picos que correspondem a fase β -TCP com estrutura romboédrica e plano principal de difração em 31 ° de 2θ (021). O surgimento desta fase está relacionado ao processo de obtenção da HAp (precipitação química). Para a síntese de HAp, deve haver um controle rigoroso dos parâmetros do processo (pH, temperatura, tempo de reação, etc.), de tal modo que qualquer mínima alteração pode levar a modificações da composição do produto final, revelando fases de outros fosfatos (SILVA et al., 2019). No entanto, para esse trabalho, por se tratar de um material bioativo, sua presença não interfere nos resultados. Esses picos correspondem aos reportados nas fichas-padrão de difração de número 09-0432 (HAp) e 09-0169 (β -TCP) do *Joint Committee on Powder Diffraction Standards* (JCPDS).

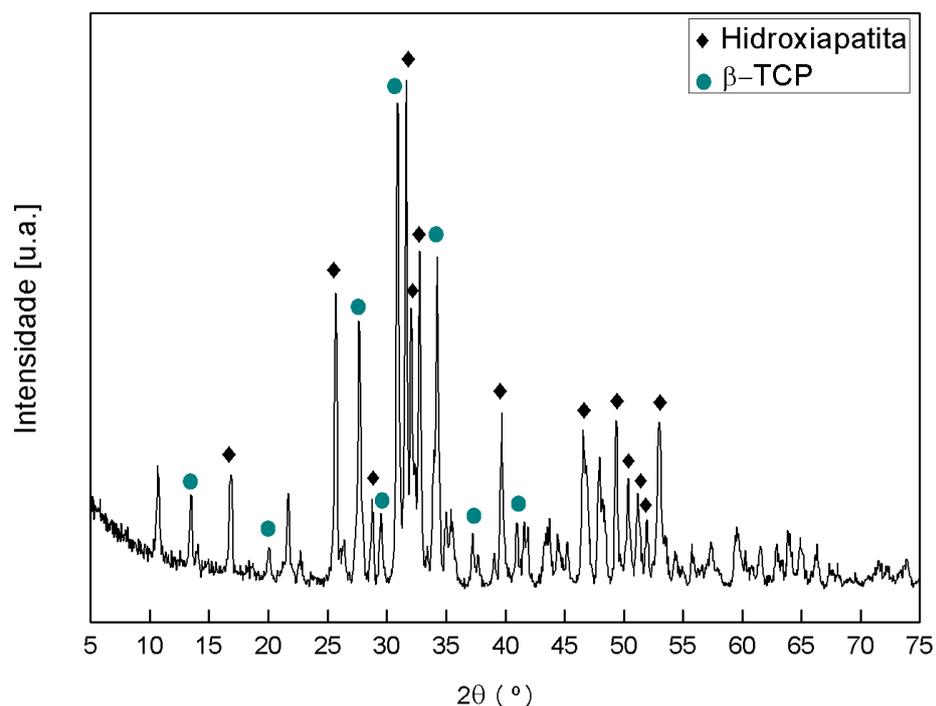


Figura 5.6. Difratoograma do pó de HAp.

O tamanho de cristalito foi calculado pela Lei de Scherrer e comprovou ser nanocristalino, com um tamanho médio de grão em torno de 165 nm.

Pela análise granulométrica (Figura 5.7), o diâmetro médio da amostra foi de 24,31 μm ; com 50% de concentração apresentou valor de 21,57 μm e com 90% diâmetro de 45,72 μm . Já com 10% de concentração, mostrou valores de 6,82 μm . Tais valores em escala micro estão relacionados ao processo de aglomeração. Esses diferentes valores com 90 e 50% sugerem que uma aglomeração ocorreu, podendo ser consequência do método no qual o pó de HAp foi produzido, que normalmente produz grandes aglomerações com escala próxima a centenas de micrômetros; ou também devido ao tratamento isotérmico, como o tratamento hidrotérmico ou calcinação a temperaturas entre 120 a 1100 $^{\circ}\text{C}$ por mais de 24 horas.

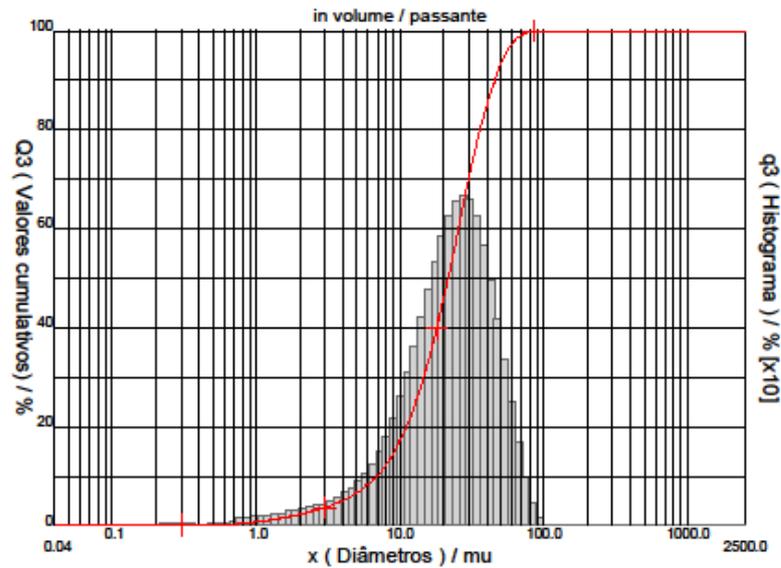


Figura 5.7. Análise granulométrica da HAp.

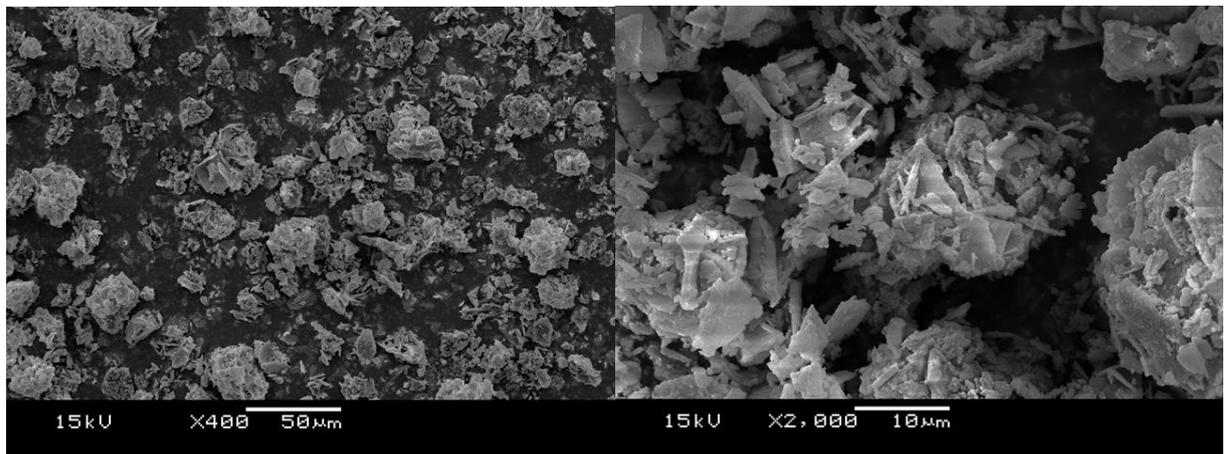


Figura 5.8. Imagens realizadas por MEV do pó de HAp. Escalas de 50 e 10 μm .

Com objetivo de validar a teoria da aglomeração, micrografias do pó de HAp (Figura 5.8) foram realizadas. Tais imagens confirmam que os grãos se encontram aglomerados e que apresentam uma estrutura laminar.

5.1.3 CARACTERIZAÇÕES MORFOLÓGICAS E REOLÓGICAS

Com o objetivo de tentar compreender o comportamento reológico das membranas baseadas na blenda Cellprene[®], foram medidas as viscosidades da blenda original e das composições com 3% em concentração de soluto.

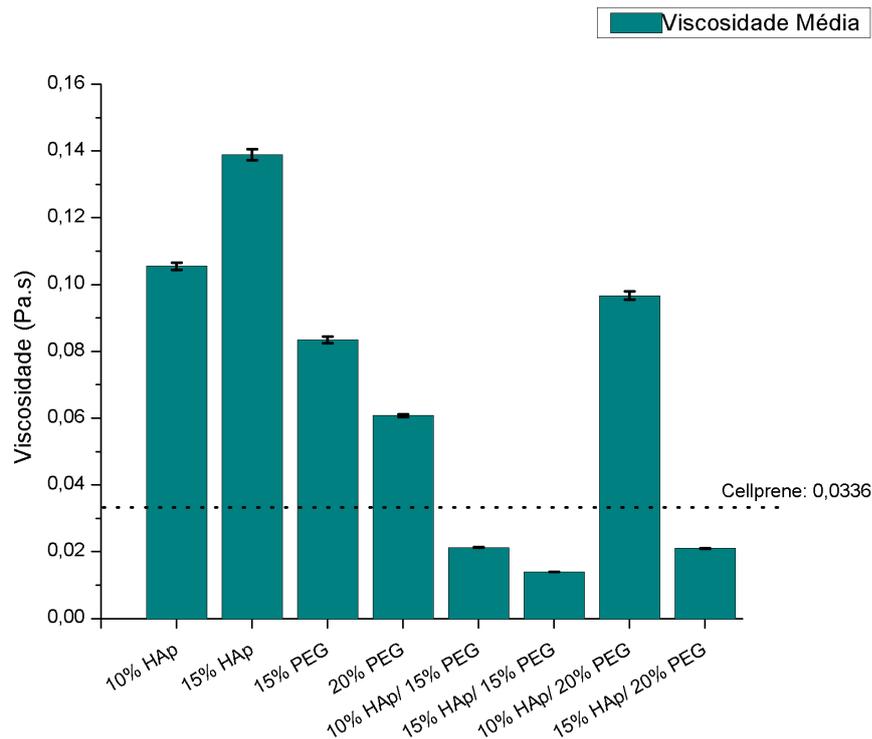


Figura 5.9. Valores de viscosidade média obtidos com concentrações de 3% em massa da blenda Cellprene® e suas composições.

Conforme figura 5.9, pode-se averiguar que a adição de aditivos modificou significativamente a viscosidade da blenda PLGA/PI. As amostras com HAp obtiveram valores mais altos de viscosidade devido ao fato de os grãos desse material estarem dispersos na solução, criando uma barreira e exigindo um aumento da força de cisalhamento do material. No caso das amostras somente com PEG, as viscosidades também ficaram acima dos valores da blenda original e, ainda que uma das funções do PEG seja atuar como plastificante, nesse caso a longa cadeia de moléculas do PEG pode ter interagido com as moléculas da blenda, em especial a do PI, aumentando as interações químicas entre esses. Outro motivo para o aumento da viscosidade em relação a blenda original pode estar relacionado à rápida evaporação do solvente durante o ensaio.

Com respeito às composições de x% HAp/PEG, poder-se-ia dizer que a presença da HAp impediu esta forte ligação entre o PEG e o PI, permitindo que o PEG atuasse como plastificante e diminuísse os valores da viscosidade.

O ensaio de molhabilidade é de extrema importância por definir uma das propriedades mais cruciais dos biomateriais: seu comportamento quando exposto a líquidos, ou seja, se é hidrofílico ou hidrofóbico. Um *scaffold* necessita ser hidrofílico justamente por estar em contato com os meios de cultura celular.

Durante o ensaio, uma gota de água deionizada é pingada sobre o material e o ângulo que tal gota faz com a superfície informa a molhabilidade do material. Assim, valores acima de 90 ° são considerados hidrofóbicos e, abaixo, hidrofílicos.

Tabela 5.2. Valores de ângulo de contato obtidos por ensaio de molhabilidade.

AMOSTRA	ÂNGULO DE CONTATO (°)
CELLPRENE®	69,07 ± 2,06
10% HAP	96,54 ± 0,39
15% HAP	96,66 ± 2,44
15% PEG	57,70 ± 1,13
20% PEG	46,51 ± 4,19
10% HAP/15% PEG	57,22 ± 1,04
10% HAP/20% PEG	87,36 ± 0,39
15% HAP/15% PEG	55,30 ± 0,94
15% HAP/20% PEG	81,10 ± 0,34

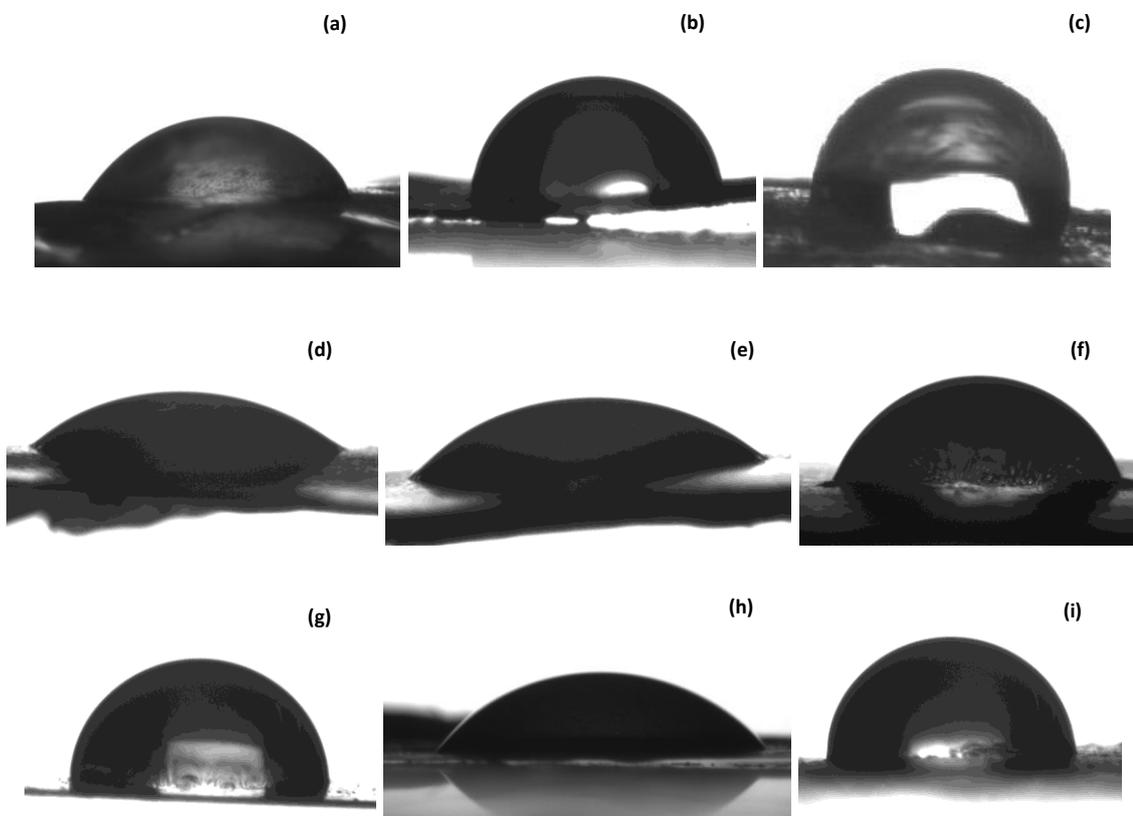


Figura 5.10. Imagens realizadas durante o ensaio de molhabilidade: (a) Cellprene®; (b) 10% HAp; (c) 15% HAp; (d) 15% PEG; (e) 20% PEG; (f) 10% HAp/15% PEG; (g) 10% HAp/20% PEG; (h) 15% HAp/15% PEG; (i) 15% HAp/20% PEG.

Com base nos resultados obtidos (Tabela 5.2 e Figura 5.10), é possível afirmar que a maioria das membranas manteve o comportamento hidrofílico ($< 90^\circ$) característico do PLGA/PI, à exceção das amostras 10% HAp e 15% HAp. Um dos fatores que aumentou a molhabilidade de algumas amostras pode estar relacionado à presença do PEG.

O PEG aumenta a hidrofiliabilidade devido à sua solubilidade em água e aos grupos polares OH em sua estrutura, que interagem com as moléculas de água, criando uma ligação de hidrogênio, a qual permite uma maior molhabilidade na superfície (BHATTARAI et al., 2006; BUTTARO; DRUFVA; FREY, 2014).

Em estudo conduzido por TRAKOOLWANNACHAI, KHEOLAMAI e UMMARTYOTIN (2019), os pesquisadores demonstraram que a adição de HAp na quitosana aumentou a hidrofobicidade da amostra. Esse fenômeno pode ser explicado pela ligação que ocorre entre a carbonila (HAp) e a amina (quitosana), que atua como uma barreira temporária a absorção de água, impedindo a interação entre as macromoléculas do polímero e as moléculas da água (KAR; KAUR; THIRUGNANAM, 2016). No caso das membranas que possuíam somente HAp adicionada à blenda Cellprene[®], a hidrofobicidade pode estar relacionada à interação entre a carbonila da HAp e o grupo -CH do Cellprene[®].

Além desse fenômeno, muitos autores comprovaram que não só a natureza química da superfície do material é responsável pela sua molhabilidade, mas também a sua rugosidade e porosidade (QUÉRÉ, 2008; REN et al., 2013). Tanto a rugosidade quanto a porosidade podem aumentar a hidrofobicidade do material. De acordo com o estudo da molhabilidade chamado “Cassie”, a gota fica suspensa no topo das estruturas da superfície rugosa devido à presença de ar entre elas (CASSIE; BAXTER, 1944); em outro estudo conduzido por WENZEL (1936), a gota fica cravada na estrutura rugosa. Em casos em que a queda da gota é pequena, a assimetria resultante dos ângulos de contato cria uma diferença de pressão entre a frente e a traseira da gota, gerando uma força suficientemente capaz de resistir à pressão da gravidade (QUÉRÉ, 2008).

No trabalho de RAJZER (2014), a adição de nanoHAp em microfibras porosas de poli (ϵ -caprolactona) promoveu um aumento do ângulo de contato. As fibras poliméricas possuíam um ângulo em torno de 100° , mas, com a adição de HAp, passou a ser próximo de 135° . Este aumento ocorreu devido à presença de cristalitos na superfície da fibra, resultando em uma maior rugosidade superficial.

Para avaliar a influência da rugosidade na molhabilidade, análises de perfilometria foram conduzidas a fim de medir a rugosidade superficial (R_a) das membranas (Figuras 5.11 a 5.13 e Tabela 5.3).

Tabela 5.3. Medidas de rugosidade superficial das membranas.

AMOSTRA	R_a (μm)
CELLPRENE[®]	$1,73 \pm 0,59$
10% HAP	$14,36 \pm 1,40$
15% HAP	$17,76 \pm 1,26$
15% PEG	$8,54 \pm 1,08$
20% PEG	$4,36 \pm 2,45$
10% HAP/15% PEG	$10,47 \pm 2,04$
10% HAP/20% PEG	$6,23 \pm 3,12$
15% HAP/15% PEG	$4,26 \pm 0,54$
15% HAP/20% PEG	$5,94 \pm 3,77$

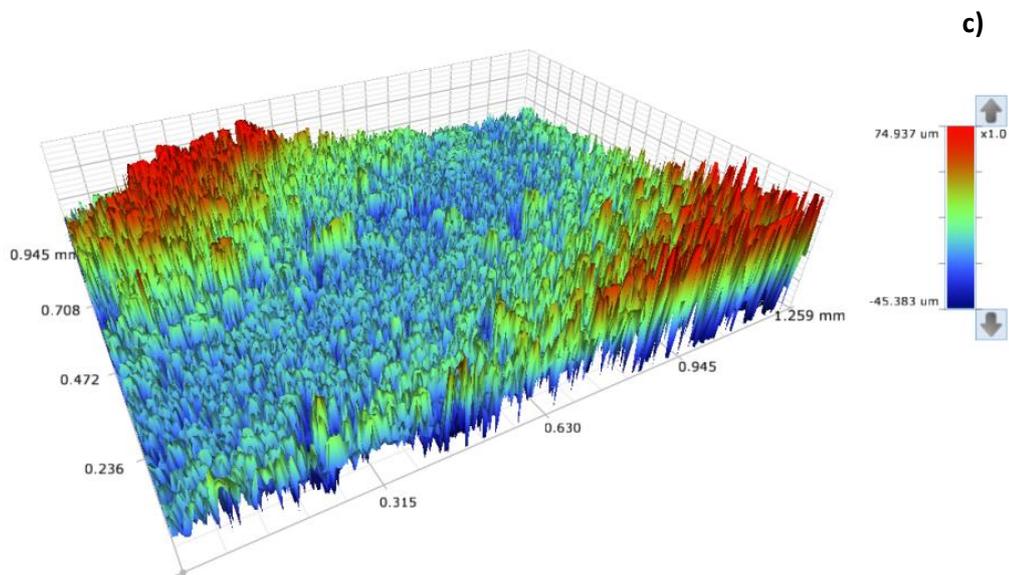
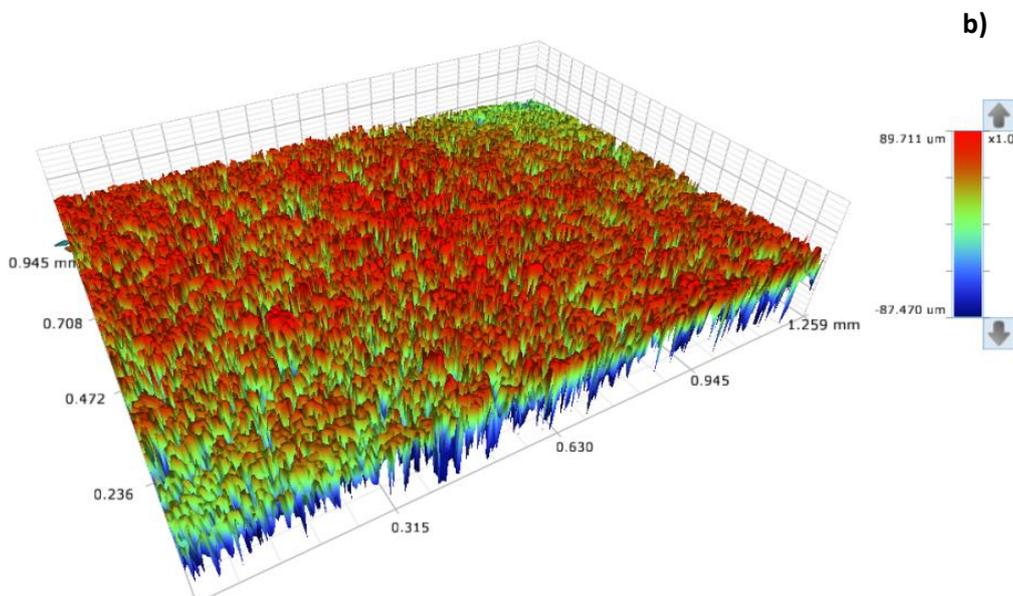
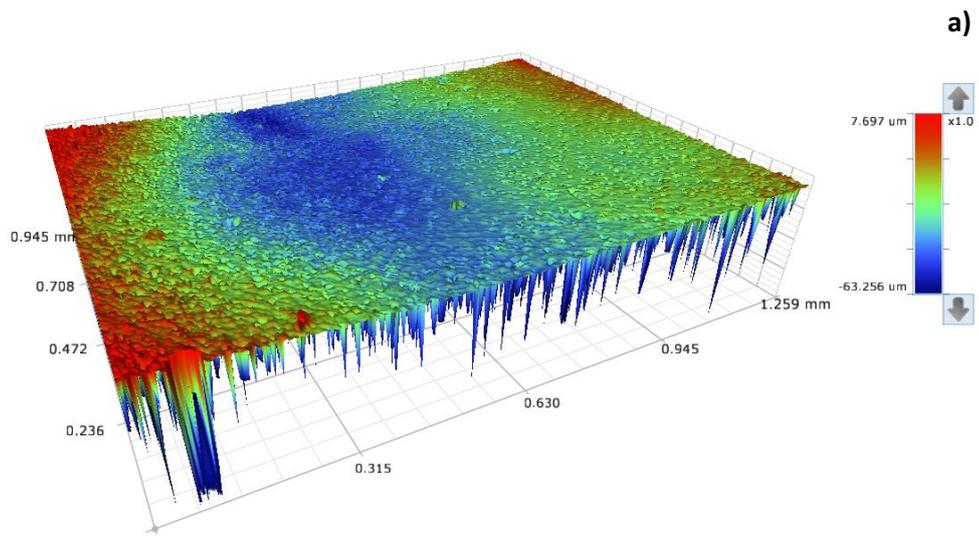


Figura 5.11. Imagens da rugosidade superficial (a) Cellprene[®] (b) 10% HAp, (c) 15% HAp.

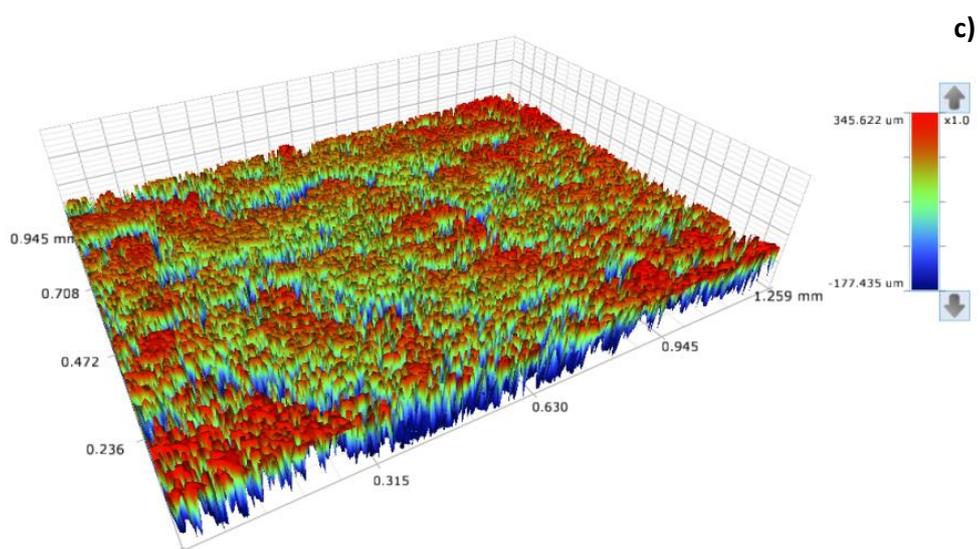
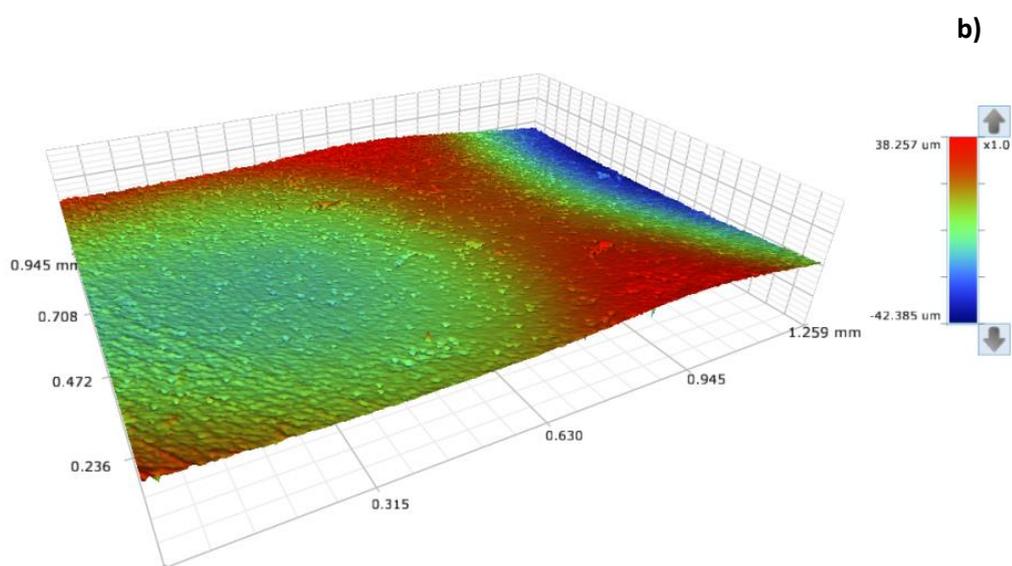
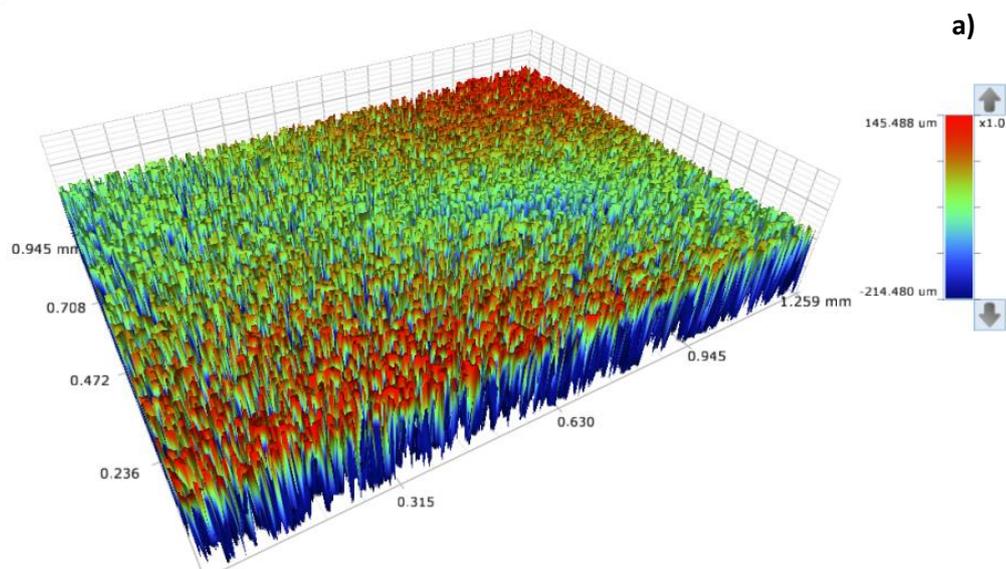


Figura 5.12. Imagens da rugosidade superficial (a) 15% PEG, (b) 20% PEG, (c) 10% HAp/15% PEG.

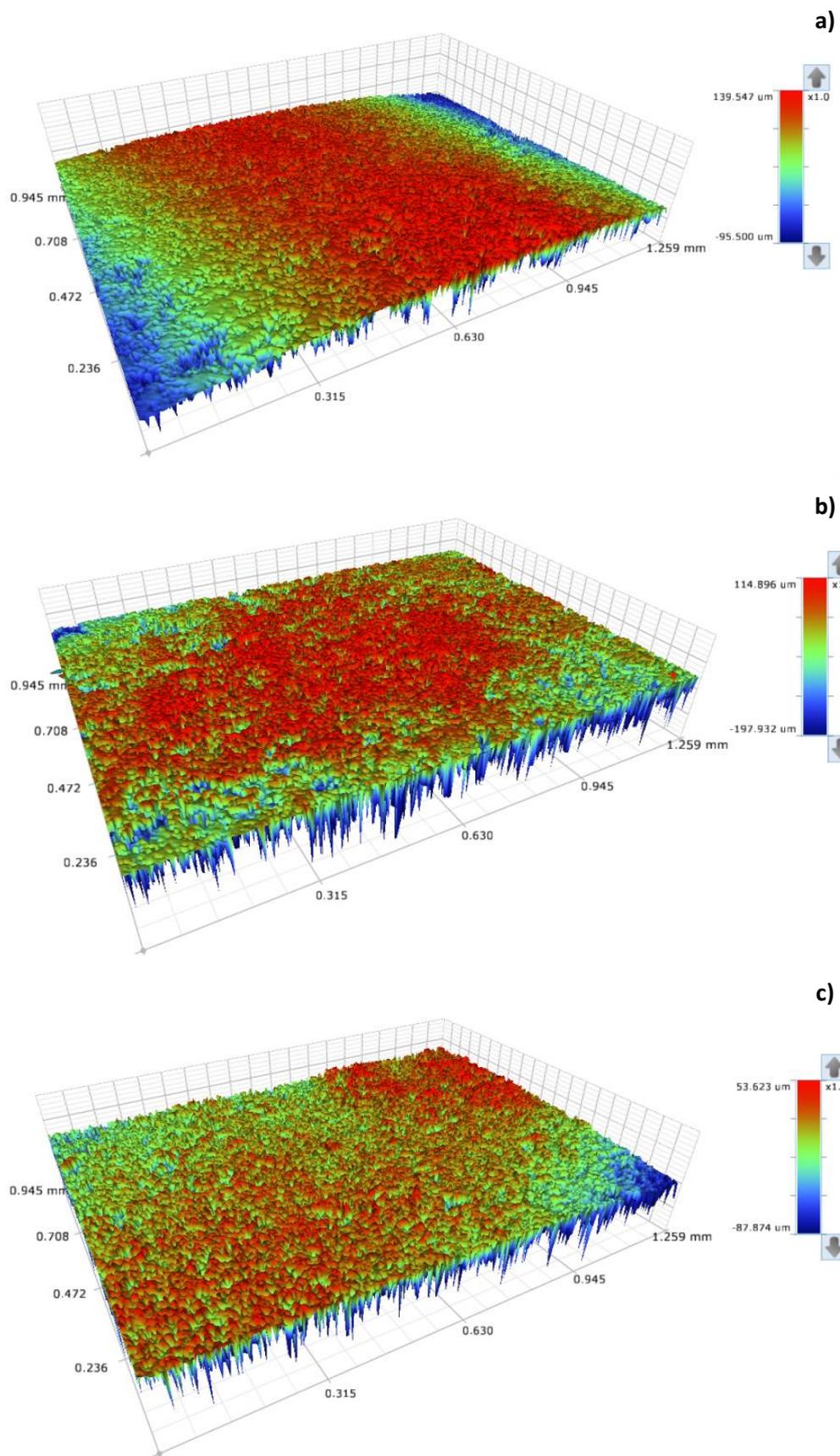


Figura 5.13. Imagens da rugosidade superficial (a) 10% HAp/20% PEG, (b) 15% HAp/15% PEG e (c) 15% HAp/20% PEG.

As medidas de rugosidade superficial corroboraram os resultados de molhabilidade: tanto a membrana 10% HAp quanto a 15% HAp ($R_a = 14,36 \pm 1,4 \mu\text{m}$; $R_a = 17,76 \pm 1,26 \mu\text{m}$; respectivamente) apresentaram os maiores valores de rugosidade, o que explicaria o maior ângulo de contato e, por conseguinte, a mudança na molhabilidade do material.

Para aplicações biomédicas, como substituição óssea, diversos estudos têm mostrado que a topografia superficial do biomaterial influencia no comportamento osteoblástico. Tais estudos afirmam que um maior valor de rugosidade superficial favorece a atividade osteoblástica, permitindo ancoramento ósseo e estabilidade biomecânica (APARICIO; PADRÓS; GIL, 2011; COSTA-RODRIGUES et al., 2012; JUNKER et al., 2009; LE GUÉHENNEC et al., 2007; LU et al., 2010).

5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS FIBRAS OBTIDAS VIA *ELECTROSPINNING* E *CENTRIFUGAL SPINNING*

Ao longo do processo de obtenção das fibras foi possível averiguar que a técnica de CS produziu quantidade de fibras maior quando comparada à técnica de ES.

Outra consideração é sobre a morfologia final das amostras. Diferentemente das fibras obtidas via ES, as quais permitiam obter amostras em formato de fitas, as fibras obtidas via CS apresentaram uma estrutura de malha, comparável a um algodão.

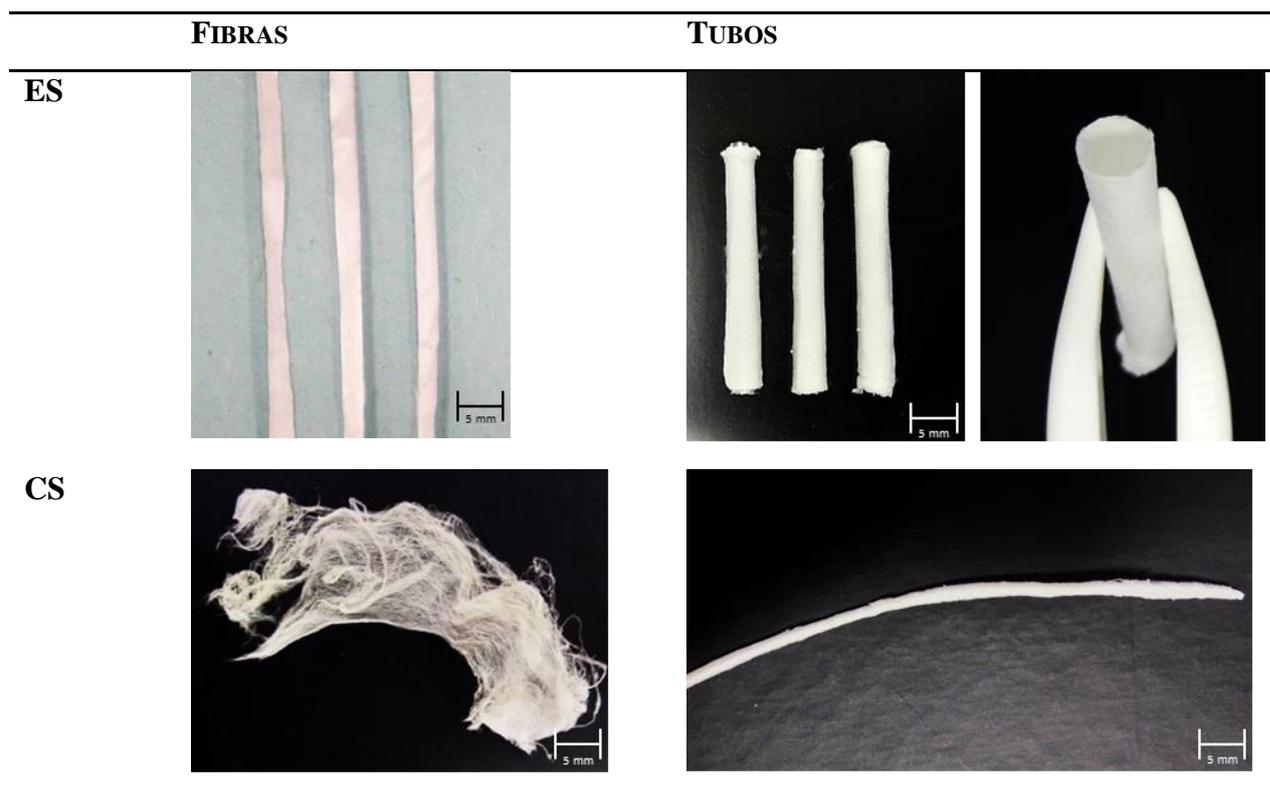


Figura 5.14. Imagens das amostras obtidas por ES e CS nos formatos fitas/fibras e tubos.

Através das imagens apresentadas na Figura 5.14, ficou evidenciada a possibilidade de produzir fibras nas diferentes morfologias em ambos os métodos de processamento.

O processamento via CS foi realizado com uma velocidade de rotação de 25000 rpm. Essa altíssima velocidade foi definida com base na literatura, que sugere que baixas velocidades de rotação podem promover fibras mal-formadas, com uma maior variabilidade de diâmetro, enquanto altas rotações permitem que o jato de polímero se forme e alongue rapidamente, favorecendo a evaporação do solvente e resultando em fibras mais finas (BADROSSAMAY et al., 2010).

5.2.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

Avaliando os espectros obtidos por FTIR que apresentam os grupamentos químicos das fibras (Figuras 5.15 e 5.16), foi constatado que, após serem processadas pelas duas técnicas, ES e CS, as amostras permaneceram com seus aspectos similares e grupos funcionais originais, sem o surgimento de novos picos ou reação entre os componentes.

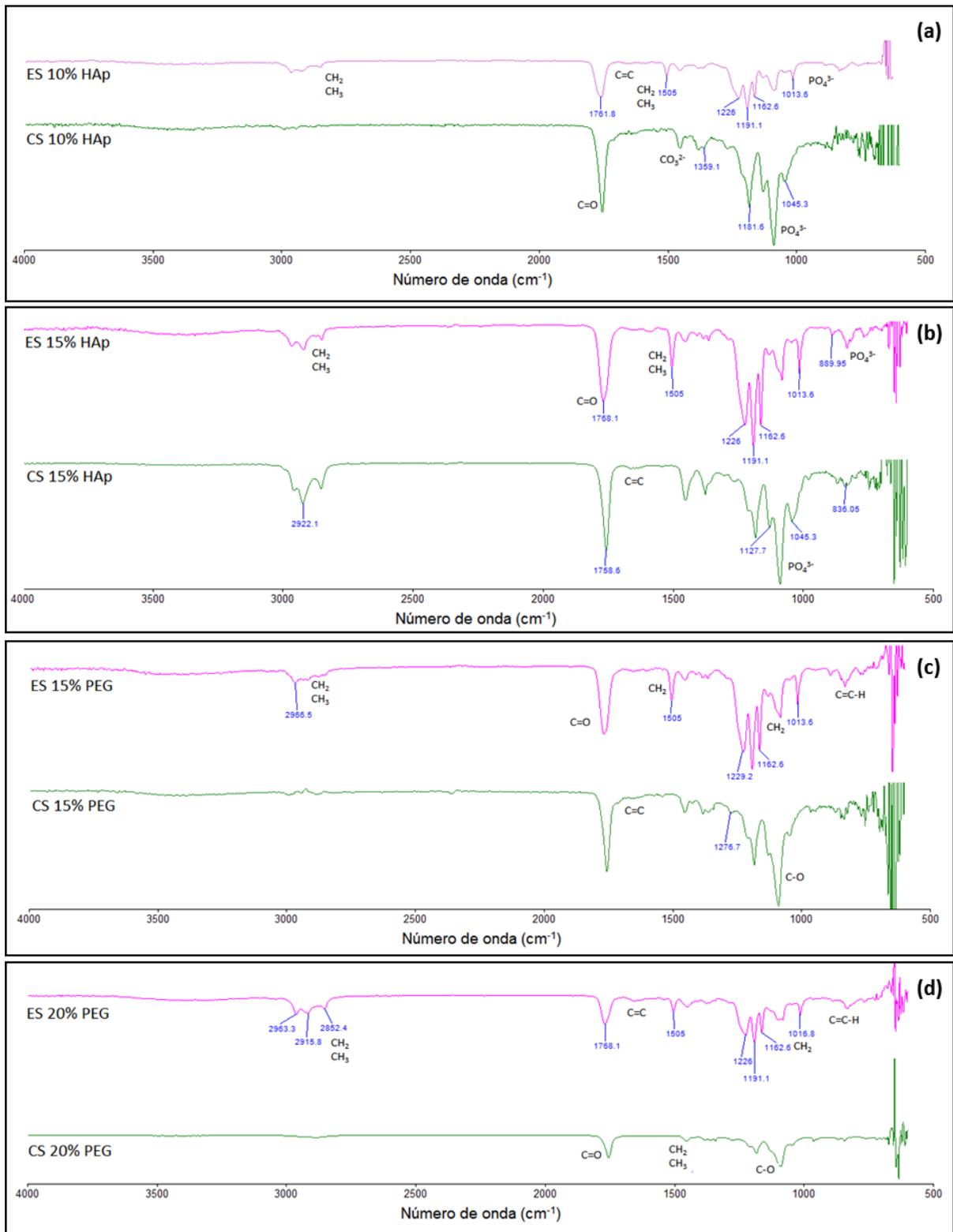


Figura 5.15. Espectros das composições pós-processamentos (ES e CS): (a) 10% HAp; (b) 15% HAp; (c) 15% PEG e (d) 20% PEG.

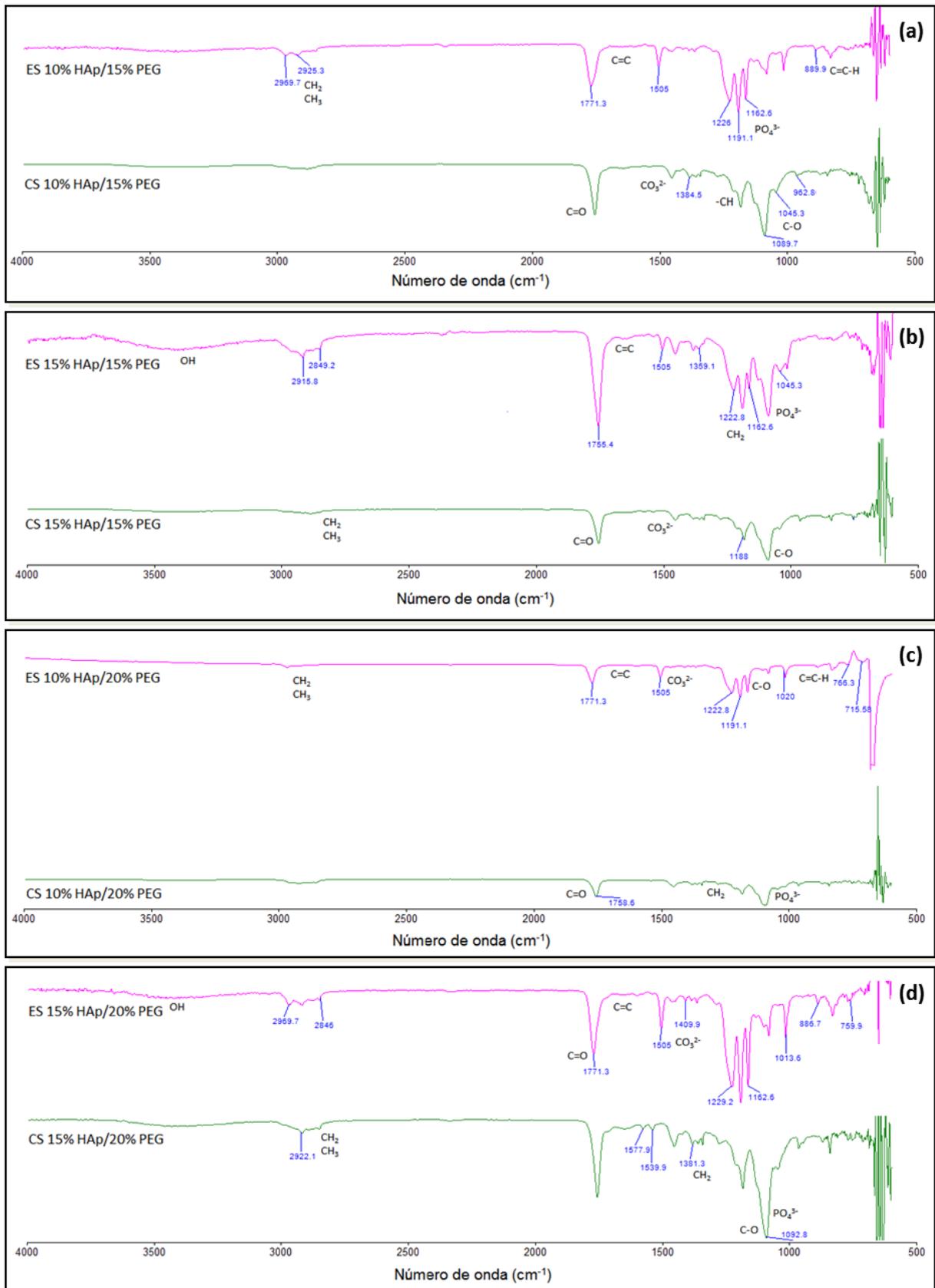


Figura 5.16. Espectros das composições pós-processamentos (ES e CS): (a) 10% HAp/15% PEG; (b) 15% HAp/15% PEG; (c) 10% HAp/20% PEG e (d) 15% HAp/20% PEG.

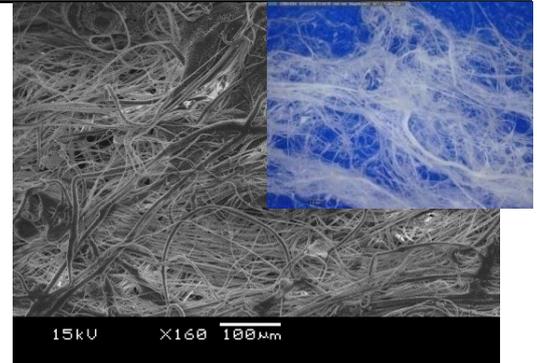
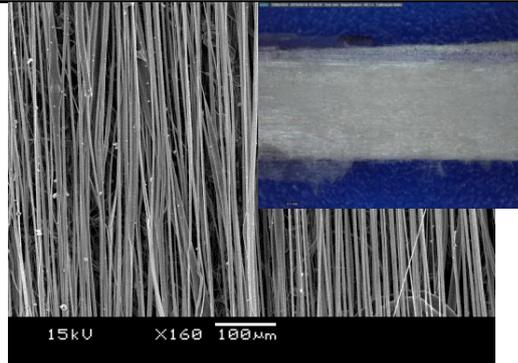
5.2.2 CARACTERIZAÇÕES MORFOLÓGICAS

As análises morfológicas das fibras foram realizadas em dois equipamentos: MO e MEV. A faixa de aumento do MO está entre 50x e 300x, enquanto aumentos no MEV podem chegar a 30000x.

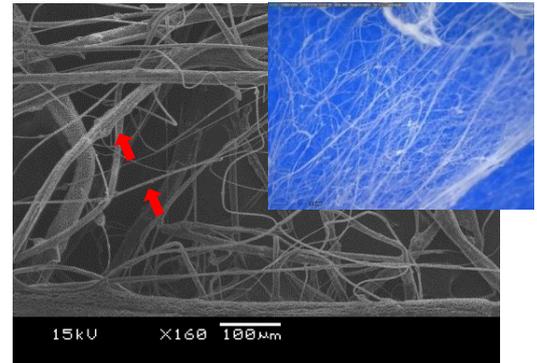
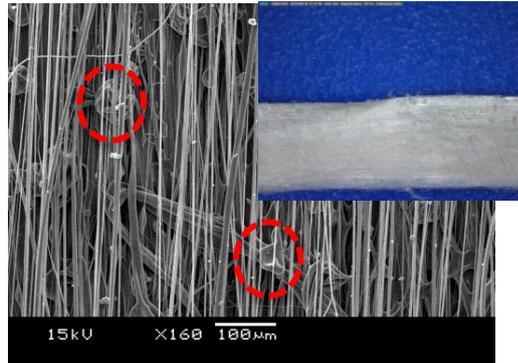
São apresentadas na Figura 5.17 as fibras que contêm HAp e PEG separadamente e, já pelas imagens do microscópio óptico, foi possível identificar a formação dos *beads* em grande quantidade na amostra contendo 20% PEG por CS (destacado em vermelho). No restante das amostras essa formação se deu de forma mais branda. Nota-se também que a amostra com 15% HAp possui fibras com diâmetros mais heterogêneos em ambos os processamentos quando comparada às outras.

No que tange à análise por MEV, as amostras por ES não apresentaram diferenças significativas entre elas em termos de espessura, mas a amostra com 15% HAp apresentou uma grande quantidade de *beads* (destacados em vermelho). Já nas amostras por CS, da mesma forma que na análise por MO, é possível perceber uma grande variedade de diâmetros na espessura das fibras com 15% HAp (destacadas pelas setas) e também se percebem os *beads* da amostra com 20% PEG (CS).

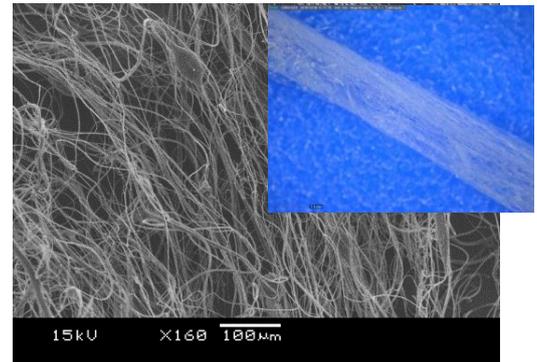
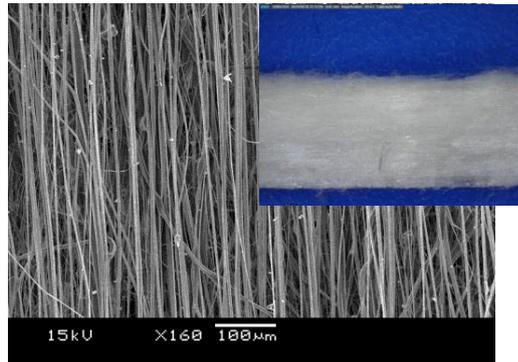
10% HAP



15% HAP



15% PEG



20% PEG

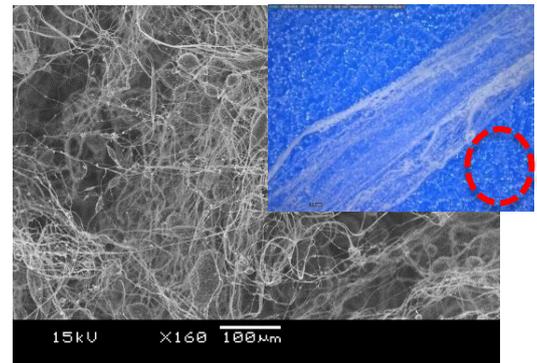
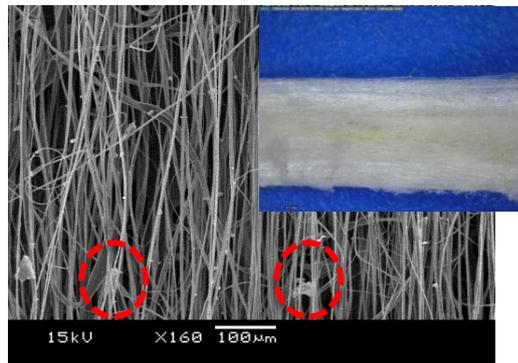


Figura 5.17. Imagens realizadas por MEV das fibras obtidas via ES e CS, sendo elas: 10% HAP, 15% HAP, 15% PEG e 20% PEG. Escala: 100 μm. No topo de cada micrografia, à direita, imagens realizadas por MO. Escala: 0,5 mm. Em destaque os *beads* (círculos) e a diferença de diâmetros (setas).

A literatura reporta que estas formações indesejadas de gotas, nomeadas *beads* ou grânulos, estão diretamente vinculadas às instabilidades superficiais causadas pelo processo de fiação – distância do coletor, velocidade de rotação para CS, tensão aplicada para ES – e por fatores reológicos, como viscosidade e tensão superficial (GAN; PILLIAR, 2004; ILIE et al., 2010). No caso do CS, ocorre uma competição entre a força centrífuga e a força de Laplace, induzida pela curvatura da superfície, desencadeando a chamada instabilidade de Rayleigh-Taylor (LI; CHEN; YANG, 2016). Se, durante o processamento das fibras houver tempo suficiente, algumas gotículas podem adquirir uma forma arredondada por conta do entrelaçamento da cadeia.

Em trabalhos prévios com a blenda PLGA/PI, o valor ideal de concentração do soluto para manufatura via ES foi definido como 3% em massa, quando tais fibras apresentaram os melhores resultados, com baixíssima presença de *beads* em sua estrutura (GUERRA, 2018; MARQUES et al., 2017; MARQUES, 2015). Portanto, tal parâmetro foi repetido nas composições quando produzidas tanto via ES como via CS.

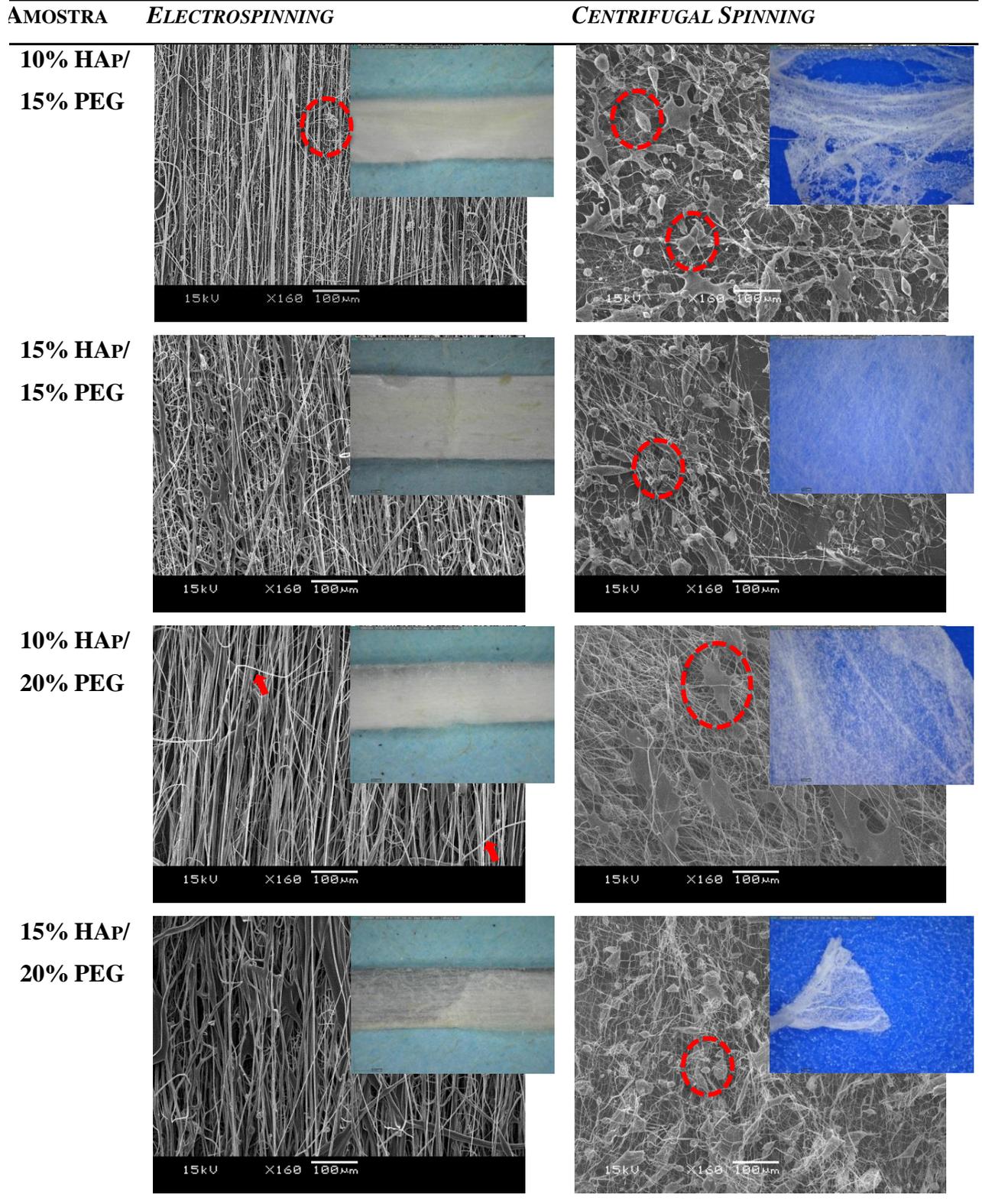


Figura 5.18. Imagens realizadas por MEV das fitas obtidas via ES e CS, sendo elas: 10% HAp/15% PEG, 15% HAp/15% PEG, 10% HAp/20% PEG e 15% HAp/20% PEG. Escala: 100 μm . No topo de cada micrografia, à direita, imagens realizadas por MO. Escala: 0,5 mm. Em destaque os *beads* (círculos) e a diferença de diâmetros (setas).

Ao traçar um paralelo com as viscosidades obtidas anteriormente (Figura 5.9), no caso do ES, ambas as amostras (somente com HAp e somente com PEG) apresentaram viscosidades com valores maiores que a do Cellprene[®] e as fibras de modo geral apresentaram estruturas com pouco ou sem *beads*. A exceção foi a amostra 15% HAp, que, justamente, apresentou o maior valor de viscosidade e uma grande quantidade de grânulos. Quanto às amostras com ambos os aditivos (HAp e PEG), quase todas apresentaram viscosidades inferiores às da blenda PLGA/PI, além de ser visível a presença massiva de *beads* em suas estruturas (Figura 5.18). A exceção foi a amostra com 10% HAp/20% PEG, cuja viscosidade foi maior (~ 0,10 Pa.s) e com uma fibra mais homogênea. Assim, é possível inferir que, em se tratando da técnica de ES com uma concentração do soluto de 3% em massa, os valores de viscosidade devem estar entre $0,03 < \eta < 0,11$ Pa.s para a formação de fibras finas, homogêneas e sem a presença de *beads*. No caso das amostras produzidas via CS, a viscosidade deve estar acima de 0,10 Pa.s.

Esse fenômeno da viscosidade ideal pode ser explicado pela concentração de entrelaçamentos. Quando a solução está muito diluída, basicamente não existem entrelaçamentos nas cadeias do polímero, o que dificulta a formação de fibras devido à sobreposição das cadeias. Ao aumentar a concentração da solução para próximo do ideal, as fibras são formadas, mas o entrelaçamento ainda é baixo, o que pode levar à formação dos *beads*. Quando a concentração chega ao seu valor ideal, o entrelaçamento das cadeias é suficiente para formar fibras contínuas e sem esses grânulos (LU et al., 2013).

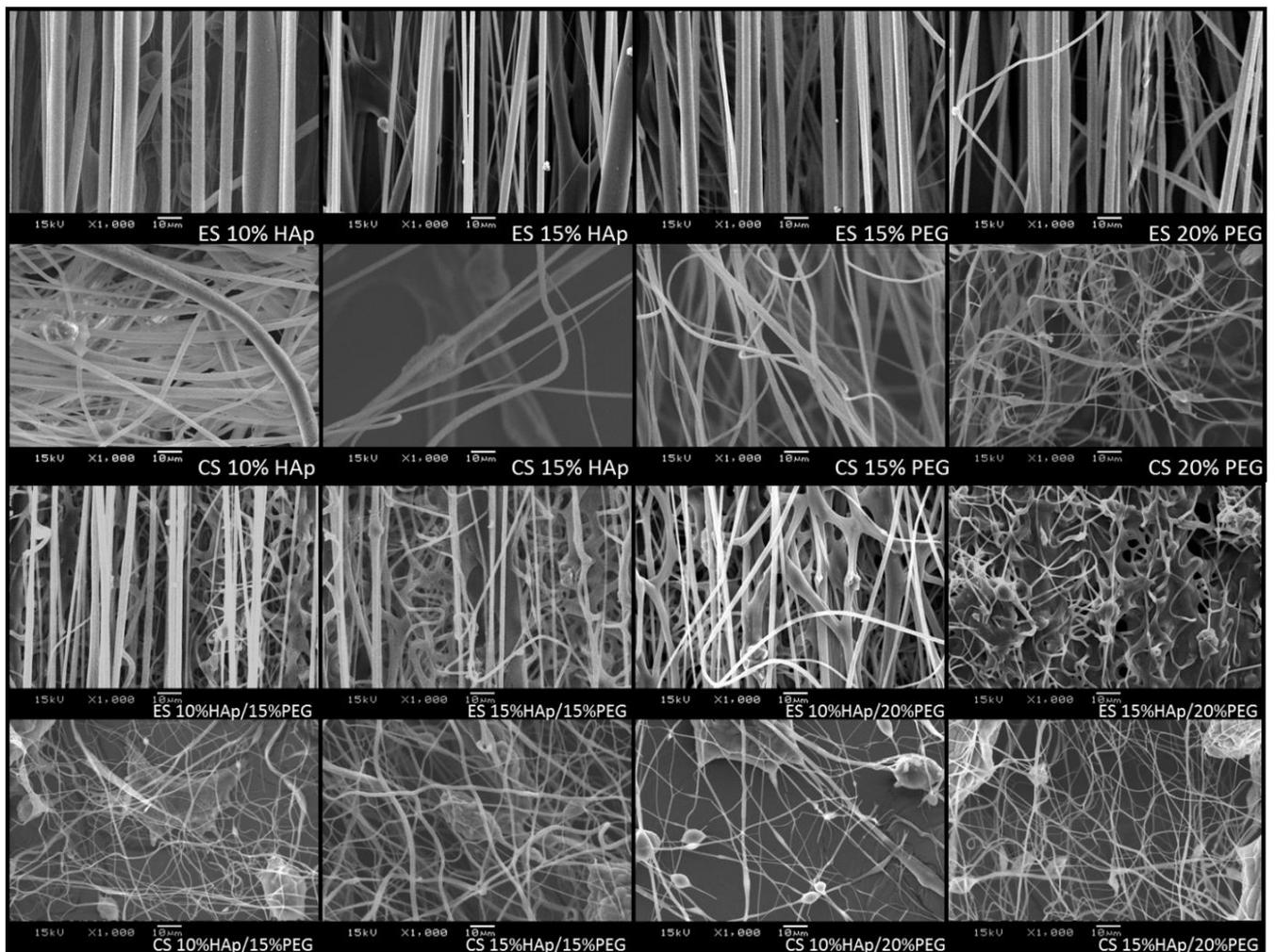


Figura 5.19. Imagens realizadas por MEV das fibras obtidas via ES e CS. Escala: 10 µm.

Comparativamente, as amostras que contêm PEG apresentaram fibras mais finas quando processadas por CS do que por ES (Figura 5.18). O mesmo se dá no caso das fibras com 10% HAp.

Analisando-se as micrografias com maior aumento (Figura 5.19), algumas das amostras obtidas por CS exibiram porosidade ao longo da sua estrutura, enquanto suas análogas por ES não. Tal fenômeno pode ser explicado pela evaporação do solvente em cada método.

HOU et al. (2017) em seu trabalho explicam as formas como a porosidade é formada ao longo das fibras de acordo com a técnica de fiação. São duas as hipóteses: durante o processamento, o jato de polímero se constitui basicamente das cadeias dos polímeros e das moléculas do solvente, além das moléculas de água por conta da umidade. Por conta da volatilidade do solvente se espera que o solvente evapore rapidamente durante o processo, deixando as moléculas de água para trás. Outra hipótese estaria relacionada à separação de

fases, que ao longo da fibra formariam regiões ricas em água e outras ricas em soluto. Gradualmente esta água evaporaria juntamente com o solvente, formando poros.

O fenômeno da formação da porosidade de acordo com a técnica da fiação é explicado na figura 5.20:

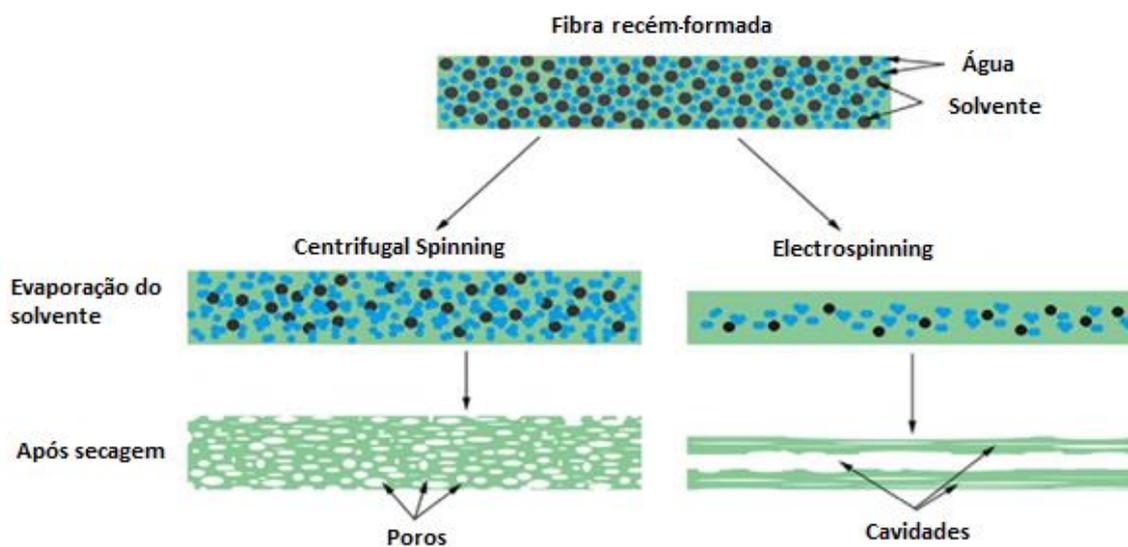


Figura 5.20. Mecanismo da formação da fibra. Adaptado de HOU et al. (2017), p. 309.

Porém, os mecanismos mencionados não se enquadrariam para o caso da técnica de ES. Devido à instabilidade do jateamento durante o processo, levaria a uma rápida evaporação do solvente, em escala de tempo até mesmo de milissegundos, promovendo um crescimento do grão polimérico, reduzindo assim o poro pela rápida separação de fases e aglomerando o solvente restante no centro, criando, ao final da evaporação, cavidades na fibra.

Tais hipóteses podem ser a explicação do porquê de as amostras processadas via CS apresentarem poros visíveis enquanto as via ES não.

Ainda sobre as micrografias com maior aumento (5.19), nas amostras produzidas por CS (10% HAp/15% PEG, 15% HAp/15% PEG, 10% HAp/20% PEG e 15% HAp/20% PEG), é perceptível a ocorrência dos chamados “dedos de fibra”. De acordo com WEITZ et al. (2008), trata-se de fibras que surgem de uma gota/*bead* e são causadas pela ação de forças externas, como forças gravitacionais, capilares, centrífugas e de Marangoni (gradientes na tensão de superfície). Enquanto por ES uma fibra surge de cada *bead*, na técnica de CS mais de uma fibra pode surgir de um *bead*. Um exemplo de dedos de fibra pode ser visto a seguir na Figura 5.21.

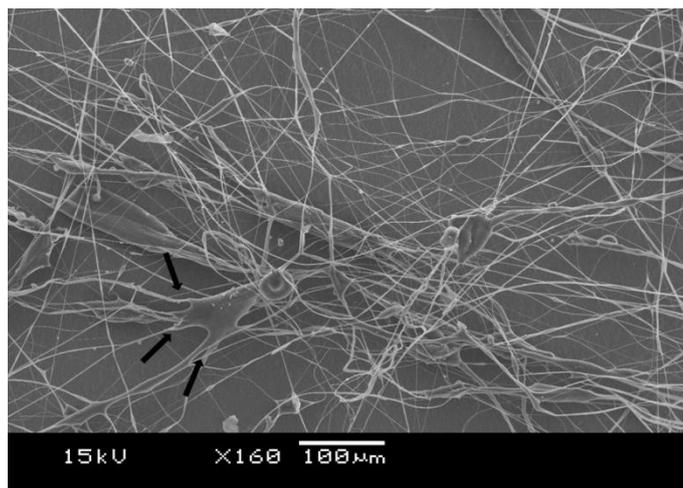


Figura 5.21. Imagem da amostra 15% HAp/15% PEG produzida via CS com a ocorrência dos “dedos de fibra”.

Finalizadas as análises morfológicas das amostras, foram realizadas as medidas dos diâmetros médios das fibras (Figura 5.22).

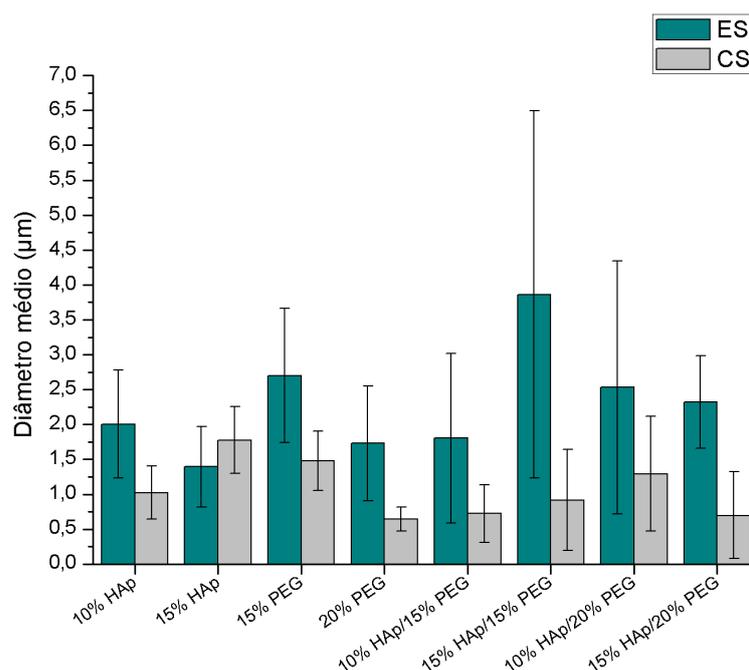


Figura 5.22. Valores médios dos diâmetros das fibras obtidas por ES e CS.

Ambas as técnicas produziram fibras com diâmetros na faixa de micro e nanômetros. As fibras obtidas via CS, quando comparadas às obtidas via ES, apresentaram para todas as composições os menores diâmetros, variando de 0,15 a 2,86 µm, enquanto os diâmetros das fibras produzidas via ES variaram de 0,30 a 8,81 µm. No processo por CS, o diâmetro da fibra é reduzido, tornando-a mais homogênea devido ao aumento da velocidade de rotação e à expansão da trajetória do jato (ZHANG; SUN, 2017).

Se fossem considerados somente os valores das espessuras das fibras, as amostras com 20% PEG e as com 10% HAp/15% PEG e 15% HAp/20% PEG obtidas por CS seriam definidas como as melhores. No entanto, estes valores sozinhos não representam a realidade, já que, pelas análises de microscopia, ficou constatado que as amostras com 20% PEG e com x% HAp/PEG possuem muitos *beads*, o que comprometeria a estrutura do *scaffold*. Assim sendo, o melhor resultado foi atribuído à amostra com 10% HAp, que apresentou diâmetros na faixa de 0,29-1,63 μm por CS e 0,51-3,12 μm por ES.

Em um ambiente biológico é importante salientar que um *scaffold* produzido por intermédio de fibras necessita de poros interconectados para uma perfeita proliferação celular. Analogamente, foi demonstrado que estruturas com fibras alinhadas possuem uma proliferação muito aquém quando comparadas a uma estrutura com fibras orientadas randomicamente. Para fibras randômicas, a circularidade dos poros e seus tamanhos são maiores que das alinhadas, promovendo uma forma mais fácil de a célula se integrar dentro do *scaffold*. No caso das fibras alinhadas, a circularidade dos poros é direcional, enquanto para as fibras randômicas essa é bastante irregular, auxiliando no crescimento celular (STACHEWICZ et al., 2019). Além disso, a combinação de micro e nanofibras em *scaffolds* não só melhora a resistência à compressão, como também promove a proliferação e diferenciação celular (CUI et al., 2015).

Outra consideração a ser feita e reiterando o que já havia sido mencionado pela literatura, é o fato de que o método via CS demonstrou ser muitíssimo mais vantajoso que o ES, não só pela simplicidade da técnica, mas também por ser mais eficiente em termos de produção (quantidade de fibras/tempo).

5.3 AVALIAÇÃO DA MELHOR COMPOSIÇÃO E CARACTERIZAÇÕES

Após avaliação dos resultados, foi definido que a amostra 10% HAp apresentou a melhor estrutura, com fibras finas e homogêneas.

Como previamente mencionado, é sabido que a morfologia da fibra depende da concentração do soluto. Desta forma, foi avaliado o quanto a concentração em solução realmente afeta as propriedades das fibras. A amostra 10% HAp foi processada via CS com as seguintes concentrações de soluto: 3, 5 e 7% em massa.

As imagens das amostras realizadas por MO e MEV são apresentadas na Figura 5.23:

10% HAP

3% EM MASSA

5% EM MASSA

MICROSCÓPIO
ÓPTICO



MICROSCÓPIO
ELETRÔNICO
DE
VARREDURA

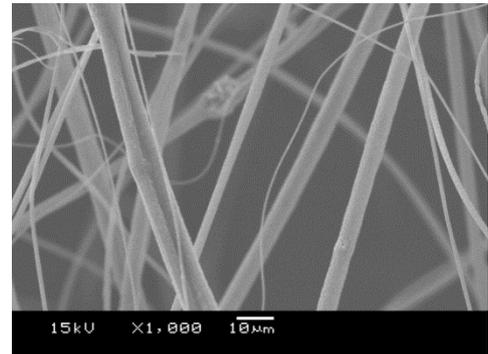
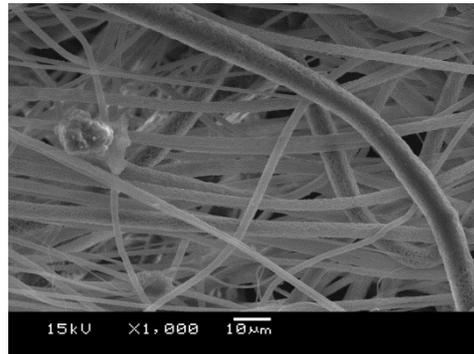


Figura 5.23. Microscopias das fibras obtidas via CS contendo 10% HAP e processada com 3% e 5% de massa em soluto. Escalas de MO: 1 mm (3%) e 0,5 mm (5%); MEV: 10 μm.

Fibras que seriam obtidas da solução de 7% não puderam ser produzidas, já que a solução estava demasiadamente viscosa para seu processamento.

Sobre as micrografias (Figura 5.23), as amostras com maior concentração (5%) apresentaram os melhores resultados, com fibras mais finas, homogêneas e sem *beads*. Isto pode ser devido ao fato de a viscosidade estar na região do seu ponto crítico, o que promoveu uma formação de fibra mais lisa, com menor variação de diâmetro.

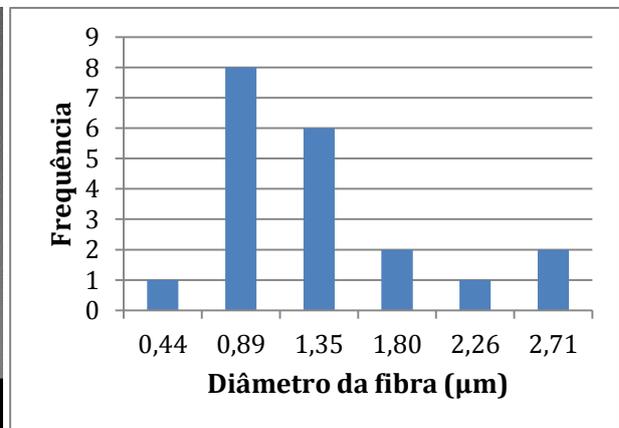
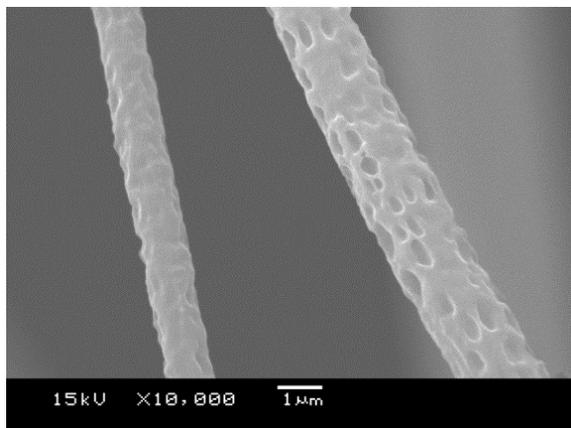


Figura 5.24. Esquerda: imagem das fibras 10% HAP obtidas via CS (5% de massa em soluto). Escala: 1 μm. Direita: gráfico dos diâmetros das fibras.

As fibras 10% HAp solubilizadas em 5% em massa e processadas via CS apresentaram porosidade ao longo da sua estrutura (Figura 5.24). Tal porosidade surge durante o processamento da fibra, como já anteriormente explicado. Pelo gráfico dos diâmetros das amostras é possível notar que as fibras variaram de 0,44-2,71 μm , apresentando diâmetro médio de $1,13 \pm 0,67 \mu\text{m}$.

5.3.1 ENSAIOS BIOLÓGICOS

5.3.1.1 ENSAIO DE BIOATIVIDADE *IN VITRO*

A bioatividade ou não de um material pode ser determinada mediante a imersão deste em um meio que simula o fluido corporal. De acordo com KOKUBO e TAKADAMA (2006), a formação da camada de apatita após alguns dias de incubação comprova o comportamento bioativo do material. O surgimento de íons de cálcio e fósforo sobre sua superfície confirma a resposta bioativa e é um dos fatores determinantes para sua aplicação *in vivo* (DANOUX et al., 2014).

As micrografias das membranas e fibras produzidas via CS de 10% HAp mergulhadas em solução SBF por 21 dias (Figuras 5.25 e 5.26) apresentam o surgimento de agregados, com grãos em diferentes formatos sobre a superfície das amostras. O aspecto destes agregados corresponde à morfologia característica dos cristais de Ca-P encontrados na literatura (GUERRA, 2018; RAJZER, 2014; SANTOS et al., 2004).

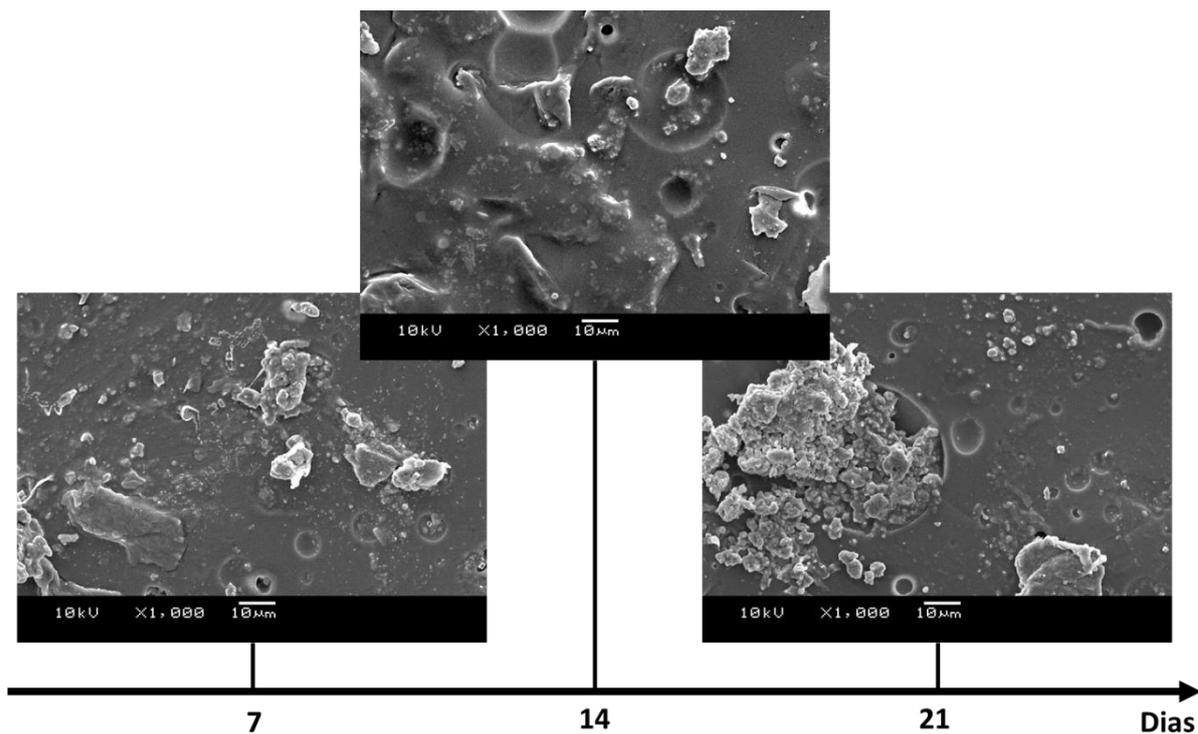


Figura 5.25. Micrografias das membranas de 10% HAp imersas em solução SBF por 7, 14 e 21 dias. Escala: 10 µm.

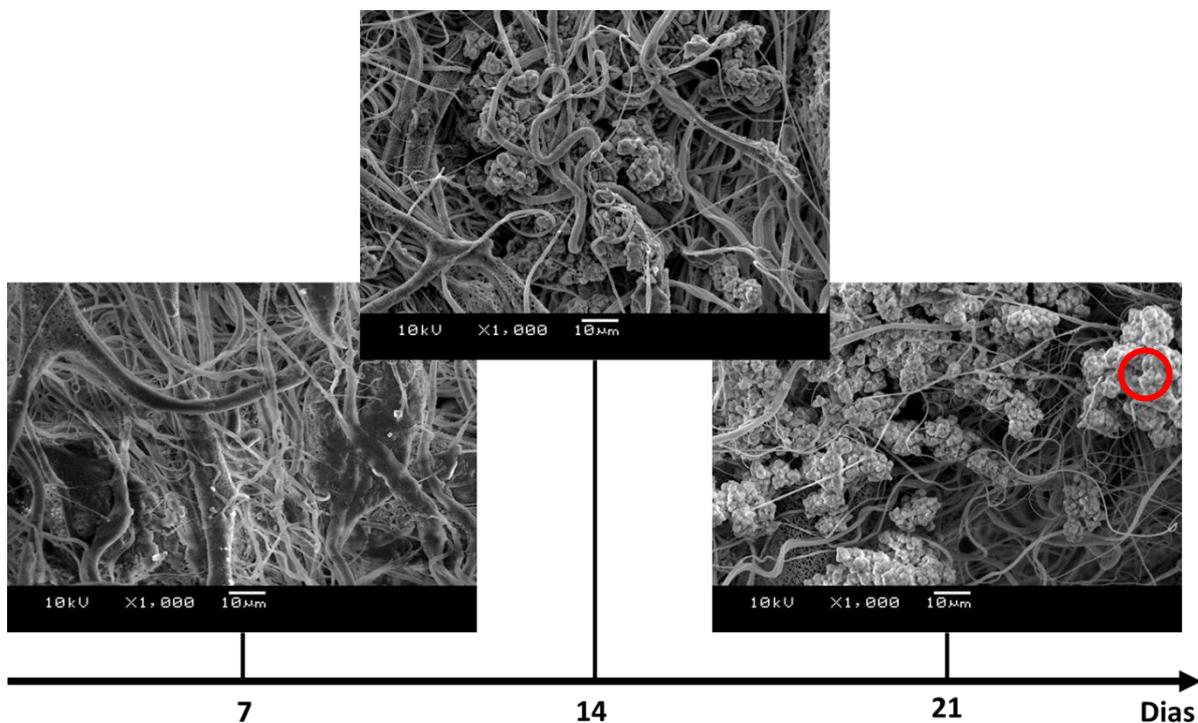


Figura 5.26. Micrografias das fibras de 10% HAp imersas em solução SBF por 7, 14 e 21 dias. Escala: 10 µm. Em destaque, região selecionada para análise por EDS.

O surgimento dos agregados em ambas as amostras foi percebido a partir do 7º dia, com um progressivo aumento ao longo dos dias. A formação destes agregados é consequência

das trocas iônicas e corresponde à apatita óssea (KIM et al., 2005). Grupos funcionais com carga negativa induzem fortemente a produção de fosfato de cálcio amorfo. A HAp, desta forma, atua como ponto de nucleação e, quanto maior sua quantidade, maior a quantidade de carga negativa e, conseqüentemente, uma maior quantidade de apatita será formada (KAR; KAUR; THIRUGNANAM, 2016; OLAD; AZHAR, 2014).

O espectro gerado com as composições químicas por EDS é apresentado na Figura 5.27. A análise foi realizada sobre a estrutura formada na superfície da membrana 10% HAp (destaque na Figura 5.26) após 21 dias de imersão em SBF. A precipitação do fosfato de cálcio pode ser atribuída à presença dos elementos Ca, C, O e P, os quais estão presentes na membrana (LIVERANI et al., 2018; SHAHBAZARAB et al., 2018).

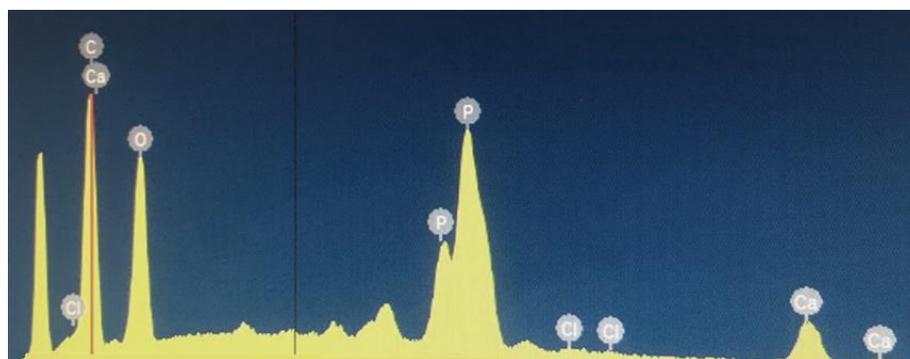


Figura 5.27. Espectro de EDS das estruturas formadas após 21 dias de incubação.

5.3.1.2 ENSAIO DE VIABILIDADE E DE ADESÃO *IN VITRO*

Scaffolds que serão empregados na área de ET devem ser compatíveis com as células para que essas possam crescer e proliferar, e não se tornem citotóxicas. A viabilidade celular das amostras 10% HAp produzidas via CS (concentração de 5% em massa de soluto) foi examinada mediante cultura celular durante um período de 4, 24 e 72 horas. Após esses períodos, as células foram contadas, e foi comparado o comportamento celular dessas amostras em contato com as fibras e em contato direto com os poços de cultura. É apresentado na Figura 5.28 o gráfico da densidade celular por tempo.

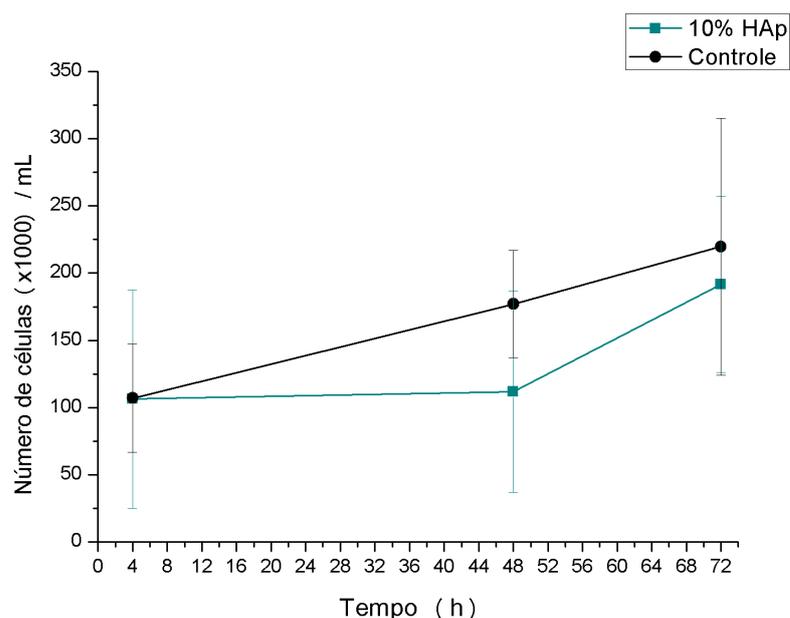


Figura 5.28. Gráfico de densidade celular (células/mL) após 4, 48 e 72 horas de ensaio de viabilidade celular das fibras 10% HAp.

Analisando-se o gráfico acima, é possível afirmar que as fibras não apresentaram efeitos nocivos às células. Os dados demonstraram que, tanto nos poços com e sem a presença das fibras, ocorreu a proliferação celular, com um aumento gradativo de população. Isso sugere que a estrutura tridimensional das fibras permitiu espaço suficiente para o crescimento celular (JEONG et al., 2008).

As células em contato com as fibras proliferaram efetivamente a partir do 3º dia, diferentemente das em contato com o controle, que obteve um crescimento gradual. Tal diferença pode ser explicada pela complexidade da estrutura 3D, que, quando comparada a uma superfície 2D, apresenta uma baixa área superficial inicial, levando a uma baixa adesão inicial das células. Porém, a longo prazo, as estruturas 3D são recomendadas, pois permitem acomodar uma maior quantidade de células (SALAMON et al., 2014).

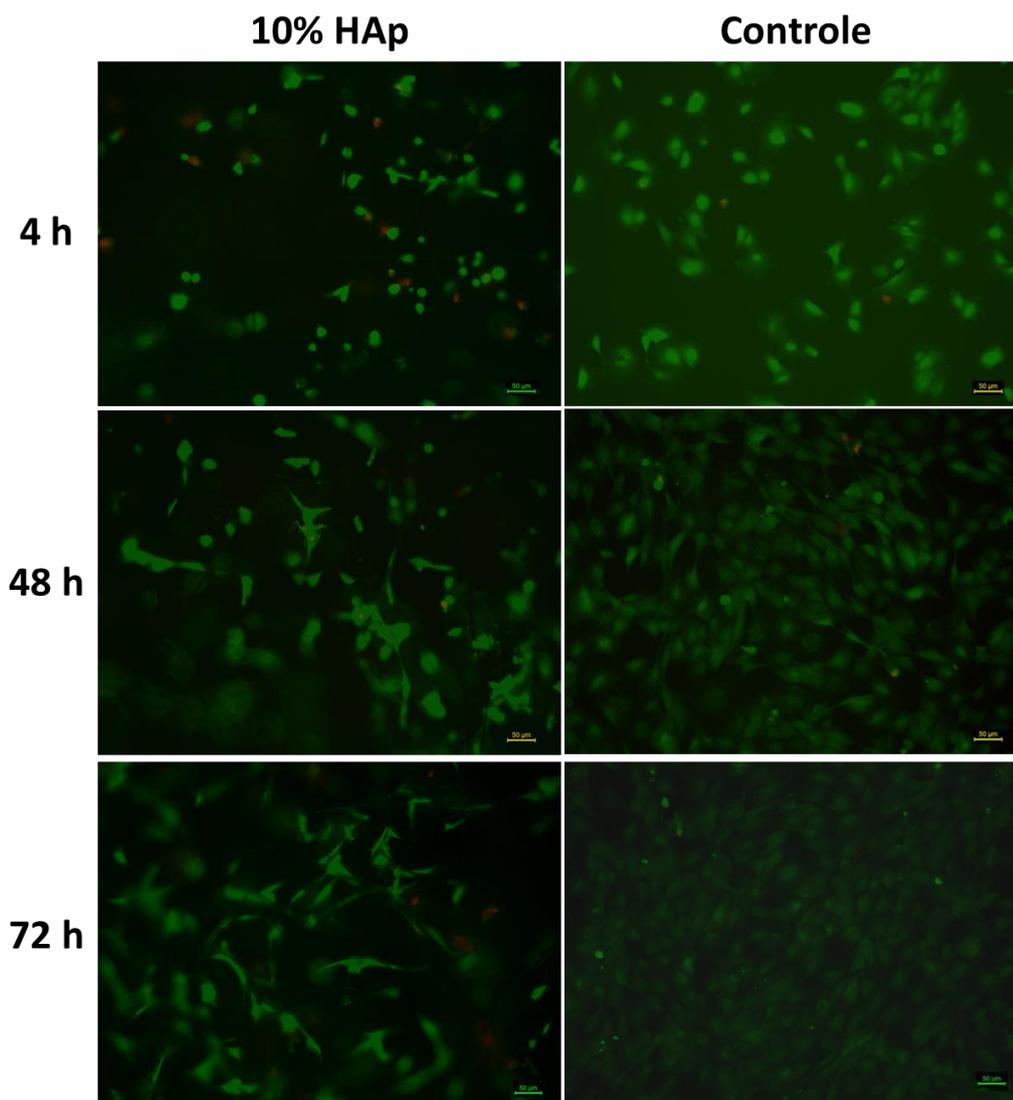


Figura 5.29. Micrografias das células MSC cultivadas em contato com fibras 10% HAp e controle durante 4, 48 e 72 horas. Escala: 50 μm .

Nas micrografias (Figura 5.29) realizadas por microscopia de fluorescência, estão destacadas as células vivas (corante verde) e as mortas (corante vermelho). Enquanto as células na região de controle mantiveram uma morfologia arredondada, as que estiveram em contato com as fibras apresentaram um formato alongado após 48 horas, sugerindo uma aderência à fibra.

Outro fator (além da incorporação da HAp) que pode ter contribuído na proliferação celular sobre as fibras foi a rugosidade superficial, que, conforme relatado por JASIM et al. (2018), auxilia no crescimento e em uma melhor adesão da população de células.

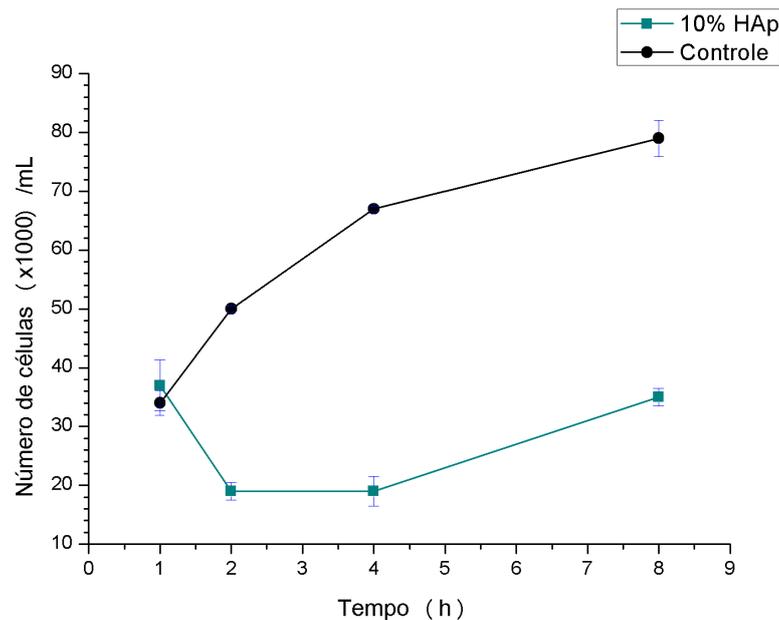


Figura 5.30. Gráfico de densidade celular (células/mL) após 1, 2, 4 e 8 horas de ensaio de adesão celular das fibras 10% HAp.

Os resultados de adesão celular (Figura 5.30) demonstraram que as células em contato com as fibras não aderiram totalmente em sua estrutura, corroborando os resultados de viabilidade celular em que as células necessitariam de, no mínimo, 72 horas para aderir efetivamente na superfície do material. Percebe-se que, a partir de 4 horas, as células iniciaram o processo de adesão e que mais horas seriam necessárias para uma completa adesão. Um novo ensaio *in vitro* mantendo a amostra submersa para sua total molhabilidade, em meio de cultura algumas horas antes da inserção de células, provavelmente permitiria maior proliferação celular.

Ensaio adicionais *in vitro* e *in vivo* devem ser realizados para comprovação definitiva da amostra como biomaterial. No entanto, os resultados previamente comentados demonstram que o material possui grande potencial para futura aplicação como *scaffold*.

6. CONCLUSÕES

Fibras da blenda polimérica Cellprene[®] com aditivos foram obtidas de forma satisfatória tanto por ES quanto por CS. As duas técnicas produziram fibras em escala micro e nanométrica e os resultados experimentais demonstraram que a qualidade da fibra depende diretamente da viscosidade. Também ficou confirmado que CS produz uma maior taxa de fibras quando comparada a ES, além de fabricar fibras com menores diâmetros.

A produção de fibras com concentração de 3% em massa de soluto permitiu identificar os melhores valores de viscosidade para a produção de fibras finas, homogêneas e sem *beads*:

- ES: $0,03 < \eta < 0,11$ Pa.s;
- CS: $\eta > 0,10$ Pa.s.

Todas as composições apresentaram comportamento hidrofílico, com exceção da amostra 10% HAp (CA = 96,54 °) e 15% HAp (CA = 96,66 °). A hidrofobicidade dessas amostras foi causada pela sua alta rugosidade superficial (10% HAp - $R_a = 14,36 \pm 1,40$ μm ; 15% HAp - $R_a = 17,76 \pm 1,26$ μm). A rugosidade auxilia na adesão e proliferação celular.

As fibras de composição 10% HAp produzidas via CS obtiveram melhor resultado quanto à sua estrutura morfológica e foram selecionadas para serem aperfeiçoadas. Resultados demonstraram que amostras produzidas com 5% em massa de soluto permitiram fibras mais finas, com estrutura homogênea e sem a presença de *beads*.

Análises de bioatividade, viabilidade e adesão celular *in vitro* sugerem que as fibras 10% HAp podem ser aplicadas como biomaterial. Futuros ensaios de viabilidade com outras células *in vivo* devem ser realizados para comprovação definitiva de seu uso como *scaffold*.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. ASTM D7334-08: *Standard Practice for Surface Wettability of Coatings, Substrates and Pigments by Advancing Contact Angle Measurement*. 3p. 2013. doi: <https://doi.org/10.1520/D7334-08R13>

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. ASTM D2702-05: *Standard Practice for Rubber Chemicals—Determination of Infrared Absorption Characteristics*. West Conshohocken, PA; ASTM International. 4p. 2016. doi: <https://doi.org/10.1520/D2702-05R16>

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. ASTM D3850-19: *Standard Test Method for Rapid Thermal Degradation of Solid Electrical Insulating Materials By Thermogravimetric Method (TGA)*. 5p. 2019. doi: <https://doi.org/10.1520/D3850-19>

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. ASTM D3418-15: *Standard Test Method for Transition Temperatures and Enthalpies of Fusion and Crystallization of Polymers by Differential Scanning Calorimetry*. 7p. 2015. doi: <https://doi.org/10.1520/D3418-15>

ABBASIAN, Mojtaba et al. Scaffolding polymeric biomaterials: Are naturally occurring biological macromolecules more appropriate for tissue engineering? **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 134, p. 673–694, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.197>>

ALKHOLIEF, Musaed et al. Employing a PLGA-TPGS based nanoparticle to improve the ocular delivery of Acyclovir. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 293–302, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319016418305796>>. Acesso em: 3 abr. 2019.

APARICIO, Conrado; PADRÓS, Alejandro; GIL, Francisco-Javier. In vivo evaluation of micro-rough and bioactive titanium dental implants using histometry and pull-out tests. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, [s. l.], v. 4, n. 8, p. 1672–1682, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbbm.2011.05.005>>

ARNEZ, Maya Fernanda Manfrin. **Osseointegração de implantes em defeitos circunferenciais utilizando proteínas angiogênicas purificadas do látex, osso autógeno e regeneração óssea guiada. Estudo comparativo em mandíbulas de cães**. 2008. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2008.

ARROYAVE, Gabriel Jaime Peláez; RESTREPO, Sandra Milena Velásquez; VÁSQUEZ, Diego Hernán Giraldo. Aditivos para el procesamiento del caucho natural y su aplicación en pequeñas. **Informador Técnico**, [s. l.], v. 78, n. 2, p. 166–174, 2014.

ASTI, Annalia; GIOGLIO, Luciana. Natural and synthetic biodegradable polymers: Different scaffolds for cell expansion and tissue formation. **International Journal of Artificial Organs**, [s. l.], v. 37, n. 3, p. 187–205, 2014.

BADROSSAMAY, Mohammad Reza et al. Nanofiber assembly by rotary jet-spinning. **Nano Letters**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 2257–2261, 2010.

BALABANIAN, C. A. C. A. et al. Biocompatibility of Natural Latex Implanted Into Dental Alveolus of Rats. **Journal of Oral Science**, [s. l.], p. 201–206, 2006.

BANORIYA, Deepen; PUROHIT, Rajesh; DWIVEDI, R. K. Advanced Application of Polymer based

Biomaterials. **Materials Today: Proceedings**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 3534–3541, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.matpr.2017.02.244>>

BHATTARAI, Shanta Raj et al. Hydrophilic nanofibrous structure of polylactide; fabrication and cell affinity. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, [s. l.], v. 78, n. 2, p. 247–257, 2006.

BIN SAMSURI, A. Degradation of Natural Rubber and Synthetic Elastomers. In: **Shreir's Corrosion**. Shah Alam: Elsevier B.V., 2010. p. 2407–2438.

BITTENCOURT, A. M. B. F. et al. Aggregation stability of natural rubber latex with low dry rubber content (DRC) in acidic medium. **Polymer Bulletin**, [s. l.], v. 40, p. 111–116, 1998.

BLENGINI, G. A. et al. **Assessment of the Methodology for Establishing the EU List of Critical Raw Materials**. Luxemburgo. Disponível em: <<https://ec.europa.eu/jrc>>.

BODE, C. et al. In-situ forming PLGA implants for intraocular dexamethasone delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 548, n. 1, p. 337–348, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517318304812>>. Acesso em: 3 abr. 2019.

BOLINA-MATOS, Regina De Sousa et al. Efeitos da biomembrana de látex natural (*Hevea brasiliensis*) em pele de ratos Wistar submetidos à lesão térmica corporal por escaldamento. **Revista Brasileira de Queimaduras**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 270–277, 2013.

BORGES, Felipe Azevedo et al. Natural rubber latex coated with calcium phosphate for biomedical application. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, [s. l.], v. 26, n. 17, p. 1256–1268, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/09205063.2015.1086945>>

BUTTARO, Larissa M.; DRUFVA, Erin; FREY, Margaret W. Phase separation to create hydrophilic yet non-water soluble PLA/PLA-b-PEG fibers via electrospinning. **Journal of Applied Polymer Science**, [s. l.], v. 131, n. 19, p. 1–7, 2014.

CARTER, Kenneth R. et al. Synthesis of Amine-Terminated Aliphatic Polycarbonates via Al (Et) 2 (OR) -Initiated Polymerizations. **Macromolecules**, [s. l.], v. 30, n. 20, p. 6074–6076, 1997.

CASSIE, A. B. D.; BAXTER, S. Wettability of porous surfaces. **Transactions of the Faraday Society**, [s. l.], v. 40, p. 546–551, 1944.

CENGIZ, Burcu et al. Synthesis and characterization of hydroxyapatite nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s. l.], v. 322, n. 1–3, p. 29–33, 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927775708001167>>. Acesso em: 16 abr. 2019.

CHAN, Eddie Wai Chi et al. Electrospun Polythiophene Phenylenes for Tissue Engineering. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 19, p. 1456–1468, 2018.

CHANDIKA, Pathum et al. Fish collagen/alginate/chitoooligosaccharides integrated scaffold for skin tissue regeneration application. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 81, p. 504–513, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.08.038>>

CHANG, Myung Chul; KO, Ching-chang; DOUGLAS, William H. Preparation of hydroxyapatite-gelatin nanocomposite. **Biomaterials**, [s. l.], v. 24, p. 2853–2862, 2003.

CHAUDHARI, Atul A. et al. Future Prospects for Scaffolding Methods and Biomaterials in Skin Tissue Engineering: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 17, 2016.

CHEN, Ya-shum et al. Characterizing the differentiation of osteoprogenitor cells on surface modified polyether-ether-ketone. **Surface & Coatings Technology**, [s. l.], v. 350, p. 904–912, 2018.

CHEN, Yujing et al. Influence of polyethylene glycol (PEG) chain length on the thermal behavior of spin-coated thin films of biodegradable poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)/PEG blends. **Journal of Molecular Structure**, [s. l.], v. 1124, p. 159–163, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.02.059>>

CHUNG, Hyun Jung; PARK, Tae Gwan. Surface engineered and drug releasing pre-fabricated scaffolds for tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 59, p. 249–262, 2007.

COLLINS, Maurice N.; BIRKINSHAW, Colin. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering — A review. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 92, n. 2, p. 1262–1279, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.028>>

COSTA-RODRIGUES, João et al. Hydroxyapatite surface roughness: Complex modulation of the osteoclastogenesis of human precursor cells. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 1137–1145, 2012.

CUI, Liguó et al. A Novel Nano/Micro-Fibrous Scaffold by Melt-Spinning Method for Bone Tissue Engineering. **Journal of Bionic Engineering**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 117–128, 2015. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1672-6529\(14\)60106-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1672-6529(14)60106-2)>

CULLITY, B. D. **Elements of X Ray Diffraction**. 2nd. ed. New Yor: Addison-Wesley, 1978.

DABIRIAN, F. et al. A comparative study of jet formation and nanofiber alignment in electrospinning and electrocentrifugal spinning systems. **Journal of Electrostatics**, [s. l.], v. 69, n. 6, p. 540–546, 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304388611001380>>. Acesso em: 9 nov. 2018.

DANOUX, Charlène B. et al. In vitro and in vivo bioactivity assessment of a polylactic acid/hydroxyapatite composite for bone regeneration. **Biomatter**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 1–12, 2014.

DAVIDENKO, Natalia et al. **Natural Biopolymers for Biomedical Applications**. Cambridge: Elsevier Inc., 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.11026-8>>

DO NASCIMENTO, Rodney Marcelo et al. Towards the production of natural rubber-calcium phosphate hybrid for applications as bioactive coatings. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 94, n. September 2018, p. 417–425, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.09.048>>

DOS SANTOS, L. A. L. Natural Polymeric Biomaterials: Processing and Properties. In: **Reference Module in Materials Science and Materials Engineering**. [s.l: s.n.]. p. 1–6.

DOS SANTOS, Rogério Lacerda et al. Cytotoxicity of latex and non-latex Orthodontic elastomeric ligatures on L929 mouse fibroblasts. **Brazilian Dental Journal**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 205–210, 2010.

DURUCAN, Caner; BROWN, Paul W. Calcium-deficient hydroxyapatite-PLGA composites: Mechanical and microstructural investigation. **Journal of Biomedical Materials Research**, [s. l.], v. 51, n. 4, p. 726–734, 2000.

DWI, Setyawan et al. PEG 8000 increases solubility and dissolution rate of quercetin in solid dispersion system. **Marmara Pharmaceutical Journal**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 259–266, 2018.

EBEWELE, Robert O. **Polymer Science and Technology**. [s.l.]: CRC Press LLC, 2000.

EIVAZZADEH-KEIHAN, Reza et al. Carbon based nanomaterials for tissue engineering of bone: building new bone on small black scaffolds: A review. **Journal of Advanced Research**, [s. l.], 2019. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090123219300773>>

ENAYATI, Marjan et al. In situ forming PLGA implant for 90 days controlled release of leuprolide

acetate for treatment of prostate cancer. **Polymers for Advanced Technologies**, [s. l.], v. 28, n. 7, p. 867–875, 2017.

ESLAMI, Hossein et al. Poly(lactic-co-glycolic acid)(PLGA)/TiO₂ nanotube bioactive composite as a novel scaffold for bone tissue engineering: In vitro and in vivo studies. **Biologicals**, [s. l.], v. 53, n. March, p. 51–62, 2018.

FAHIMIPOUR, F. et al. 3D printed TCP-based scaffold incorporating VEGF-loaded PLGA microspheres for craniofacial tissue engineering. **Dental Materials**, [s. l.], v. 33, n. 11, p. 1205–1216, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.dental.2017.06.016>>

FALLER, Gustavo et al. Development and testing of an absorbable spring for cranial expansion in rabbits. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, [s. l.], v. 43, n. 7, p. 1269–1276, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcms.2015.06.006>>

FERNÁNDEZ, Jorge et al. Release mechanisms of urinary tract antibiotics when mixed with bioabsorbable polyesters. **Materials Science & Engineering C**, [s. l.], v. 93, n. March, p. 529–538, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.08.008>>

FLAIFEL, Moayad Husein et al. NiZn ferrite filled thermoplastic natural rubber nanocomposites: Effect of low temperature on their magnetic behaviour. **Cryogenics**, [s. l.], v. 52, n. 10, p. 523–529, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cryogenics.2012.06.009>>

GAN, Lu; PILLIAR, Robert. Calcium phosphate sol–gel-derived thin films on porous-surfaced implants for enhanced osteoconductivity. Part I: Synthesis and characterization. **Biomaterials**, [s. l.], v. 25, n. 22, p. 5303–5312, 2004. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961203011992>>. Acesso em: 16 abr. 2019.

GILDING, D. K.; REED, A. M. Biodegradable polymers for use in surgery polyglycolic/poly(actic acid) homo- and copolymers: 1. **Polymer**, [s. l.], v. 20, p. 1459–1464, 1979.

GOUMA, P. et al. Nano-hydroxyapatite-cellulose acetate composites for growing of bone cells. **Materials Science & Engineering C**, [s. l.], v. 32, p. 607–612, 2012.

GRACIA, E. et al. Improvement of PLGA loading and release of curcumin by supercritical technology. **Journal of Supercritical Fluids**, [s. l.], v. 141, n. March, p. 60–67, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.03.019>>

GRAD, Sibylle et al. The use of biodegradable polyurethane scaffolds for cartilage tissue engineering: potential and limitations. **Biomaterials**, [s. l.], v. 24, p. 5163–5171, 2003.

GUERRA, Nayrim Brizuela. **Obtenção e Avaliação da Blenda Poliisopreno Epoxidado - Poli(Ácido Lático-co-Glicólico) para Engenharia de Tecidos**. 2018. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, [s. l.], 2018.

GULERIA, Rajender; KAITH, N. S.; SINGH, Ranjit. Peg based solid dispersions of gliclazide: A comparative study. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 4, n. SUPPL.1, p. 507–512, 2012.

GULLAPALLI, Rampurna P.; MAZZITELLI, Carolyn L. Polyethylene glycols in oral and parenteral formulations — A critical review. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 496, p. 219–239, 2015.

GUPTE, Melanie J. et al. Pore size directs bone marrow stromal cell fate and tissue regeneration in nanofibrous macroporous scaffolds by mediating vascularization. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 82, p. 1–11, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.10.016>>

HACKER, Michael C.; KRIEGHOFF, Jan; MIKOS, Antonios G. Synthetic Polymers. In: **Principles**

of **Regenerative Medicine**. [s.l.]: Elsevier Inc., 2019. p. 559–590.

HAITAO, Wang et al. Improvement of Hydrophilicity and Blood Compatibility on Polyethersulfone Membrane by Blending Sulfonated Polyethersulfone. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 324–329, 2009. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1004-9541\(08\)60211-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1004-9541(08)60211-6)>

HENCH, L.; WILSON, J. **Advanced Series in Ceramics - Vol. 1: An Introduction to Bioceramics**. [s.l.]: World Scientific, 1993.

HERCULANO, Rondinelli Donizetti et al. Natural Rubber Latex Used as Drug Delivery System in Guided Bone Regeneration (GBR). **Materials Research**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 253–256, 2009.

HOU, Teng et al. Highly porous fibers prepared by centrifugal spinning. **Materials and Design**, [s. l.], v. 114, p. 303–311, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264127516314071>>. Acesso em: 1 out. 2018.

HUTMACHER, Dietmar Werner et al. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. **J Tissue Eng Regen Med**, [s. l.], v. 1, p. 245–260, 2007.

ILIE, Cornelia et al. The Influence of Nonionic Surfactants on the Carbopol-Peg Interpolymer Complexes. **Revue Roumaine De Chimie**, [s. l.], v. 55, n. 7, p. 409–417, 2010.

JACOB, Joby et al. Biopolymer based nanomaterials in drug delivery systems: A review. **Materials Today Chemistry**, [s. l.], v. 9, p. 43–55, 2018.

JALIL, R.; NIXON, J. R. Biodegradable poly(lactic acid) and poly(lactide-co-glycolide) microcapsules: Problems associated with preparative techniques and release properties. **Journal of Microencapsulation**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 297–325, 1990.

JAMSHIDI, K.; HYON, SH; IKADA, Y. Thermal characterization of polylactides. **Polymer**, [s. l.], v. 29, p. 2229–2234, 1988.

JANSSENS, Sandrien et al. Influence of polyethylene glycol chain length on compatibility and release characteristics of ternary solid dispersions of itraconazole in polyethylene glycol/hydroxypropylmethylcellulose 2910 E5 blends. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 203–210, 2008.

JASIM, Dhifaf A. et al. Graphene-based papers as substrates for cell growth: Characterisation and impact on mammalian cells. **FlatChem**, [s. l.], v. 12, p. 17–25, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.flatc.2018.11.006>>

JEONG, Sung In et al. Nanofibrous Poly(lactic acid)/Hydroxyapatite composite scaffolds for guided tissue regeneration. **Macromolecular Bioscience**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 328–338, 2008.

Jl, Hai-feng et al. Multifunctionalized polyethersulfone membranes with networked submicrogels to improve antifouling property, antibacterial adhesion and blood compatibility. **Materials Science & Engineering C**, [s. l.], v. 96, p. 402–411, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.11.047>>

JOHN, George et al. Natural Monomers: A Mine for Functional and Sustainable Materials - Occurrence, Chemical Modification and Polymerization. **Progress in Polymer Science**, [s. l.], 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670018300273>>. Acesso em: 26 fev. 2019.

JOHN, K. Coagulation of Hevea Latex with Surfactant and Salt : I. Development of the Process and its Effect on Raw Rubber Properties. **Journal Natural Rubber Research**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 147–156, 1971.

JUNKER, Rüdiger et al. Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: a systematic review. **Clinical Oral Implants Research**, [s. l.], v. 20, p. 185–206, 2009.

KALIYATHAN, Abitha Vayyaprontavida et al. Natural rubber and silicone rubber-based biomaterials. In: **Fundamental Biomaterials: Polymers**. [s.l.]: Elsevier Ltd., 2018. p. 71–84.

KAMALI, Hossein et al. In-vitro, ex-vivo, and in-vivo evaluation of buprenorphine HCl release from an in situ forming gel of PLGA-PEG-PLGA using N-methyl-2-pyrrolidone as solvent. **Materials Science and Engineering: C**, [s. l.], v. 96, p. 561–575, 2019. a. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493118315261>>. Acesso em: 3 abr. 2019.

KAMALI, Hossein et al. Comparison of in-situ forming composite using PLGA-PEG-PLGA with in-situ forming implant using PLGA: In-vitro, ex-vivo, and in-vivo evaluation of naltrexone release. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 50, p. 188–200, 2019. b. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1773224718308888>>. Acesso em: 3 abr. 2019.

KAR, Sumanta; KAUR, Tejinder; THIRUGNANAM, A. Microwave-assisted synthesis of porous chitosan –modified montmorillonite–hydroxyapatite composite scaffolds. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 82, p. 628–636, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.060>>

KATTI, Dharendra S. et al. Toxicity, biodegradation and elimination of polyanhydrides. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 54, p. 933–961, 2002.

KATTI, Dharendra S. et al. Bioresorbable nanofiber-based systems for wound healing and drug delivery: Optimization of fabrication parameters. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, [s. l.], v. 70, n. 2, p. 286–296, 2004.

KIM, B. S.; MOONEY, D. J. Development of Biocompatible Synthetic Extracellular Matrices for Tissue Engineering. **TIBTECH**, [s. l.], v. 16, p. 224–230, 1998.

KIM, Hyun-min et al. Process and kinetics of bonelike apatite formation on sintered hydroxyapatite in a simulated body fluid. **Biomaterials**, [s. l.], v. 26, n. 21, p. 4366–4373, 2005.

KIM, Jong Oh et al. Development of polyvinyl alcohol–sodium alginate gel-matrix-based wound dressing system containing nitrofurazone. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 359, p. 79–86, 2008.

KIM, Jung Ho et al. Experimental comparative study of the histotoxicity of poly(lactic-co-glycolic acid) copolymer and poly(lactic-co-glycolic acid)-poly(isoprene) blend. **Polímeros**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 529–535, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-14282014000500002&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 11 mar. 2019.

KIM, Sung Min et al. Gelatin-layered and multi-sized porous β -tricalcium phosphate for tissue engineering scaffold. **Nanoscale Research Letters**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–16, 2012. Disponível em: <<http://www.nanoscalereslett.com/content/7/1/78>>

KOKUBO, Tadashi; TAKADAMA, Hiroaki. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? **Biomaterials**, [s. l.], v. 27, n. 15, p. 2907–2915, 2006.

KROGMAN, Nicholas R. et al. Miscibility of Bioerodible Polyphosphazene / Poly (lactide-co-glycolide) Blends. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 1306–1312, 2007.

KROK-BORKOWICZ, Małgorzata et al. Influence of pore size and hydroxyapatite deposition in poly(L-lactide-co-glycolide) scaffolds on osteoblast-like cells cultured in static and dynamic conditions. **Materials Letters**, [s. l.], v. 241, p. 1–5, 2019.

KRUPP, Tamires et al. NATURAL RUBBER - PROPOLIS MEMBRANE IMPROVES WOUND HEALING IN SECOND-DEGREE BURNING MODEL. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 131, p. 980–988, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.147>>

KUMAR, Pawan; DEHIYA, Brijnandan S.; SINDHU, Anil. Synthesis and characterization of nHA-PEG and nBG-PEG scaffolds for hard tissue engineering applications. **Ceramics International**, [s. l.], v. 45, p. 8370–8379, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.01.145>>

KUNTHADONG, Pimpanitpa et al. Biodegradable Plasticized Blends of Poly(L-lactide) and Cellulose Acetate Butyrate: From Blend Preparation to Biodegradability in Real Composting Conditions. **Journal of Polymers and the Environment**, [s. l.], v. 23, p. 107–113, 2015.

LE GUÉHENNEC, L. et al. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. **Dental Materials**, [s. l.], v. 23, n. 7, p. 844–854, 2007.

LEE, Ashlynn L. Z. et al. Injectable Biodegradable Hydrogels from Vitamin D - Functionalized Polycarbonates for the Delivery of Avastin with Enhanced Therapeutic Efficiency against Metastatic Colorectal Cancer. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 16, p. 465–475, 2015.

LI, Shiqi et al. Branching function of terminal phosphate groups of polyisoprene chain. **Polymer**, [s. l.], v. 174, n. February, p. 18–24, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.polymer.2019.04.046>>

LI, Xianglong; CHEN, Huanhuan; YANG, Bin. Centrifugally spun starch-based fibers from amylopectin rich starches. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 137, p. 459–465, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.079>>

LIN, K.; CHANG, J. **Structure and properties of hydroxyapatite for biomedical applications**. [s.l.]: Elsevier Ltd., 2015. v. 4214 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-78242-033-0.00001-8>>

LIU, N. H. et al. Electrospinning of poly(epsilon-caprolactone-co-lactide)/Pluronic blended scaffolds for skin tissue engineering. **Journal of Materials Science**, [s. l.], v. 49, p. 7253–7262, 2014.

LIU, Xiaohua; JIN, Xiaobing; MA, Peter X. Nanofibrous hollow microspheres self-assembled from star-shaped polymers as injectable cell carriers for knee repair. **Nature Materials**, [s. l.], v. 10, p. 398–406, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nmat2999>>

LIVERANI, Liliana et al. Incorporation of bioactive glass nanoparticles in electrospun PCL / chitosan fibers by using benign solvents. **Bioactive Materials**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 55–63, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.05.003>>

LOORDHUSWAMY, Amalorpava Mary et al. Fabrication of highly aligned fibrous scaffolds for tissue regeneration by centrifugal spinning technology. **Materials Science and Engineering: C**, [s. l.], v. 42, p. 799–807, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2014.06.011>>. Acesso em: 9 nov. 2018.

LU, Helen H. et al. Tissue Engineering Strategies for the Regeneration of Orthopedic Interfaces. **Annals of Biomedical Engineering**, [s. l.], v. 38, n. 6, p. 2142–2154, 2010.

LU, Yao et al. Parameter study and characterization for polyacrylonitrile nanofibers fabricated via centrifugal spinning process. **European Polymer Journal**, [s. l.], v. 49, n. 12, p. 3834–3845, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014305713004771>>. Acesso em: 9 nov. 2018.

MAITZ, M. F. Applications of synthetic polymers in clinical medicine. **Biosurface and Biotribology**,

[s. l.], v. 1, n. 3, p. 161–176, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bsbt.2015.08.002>>

MARQUES, Douglas R. et al. In vitro evaluation of poly (lactic-co-glycolic acid)/polyisoprene fibers for soft tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, [s. l.], v. 105, n. 8, p. 2581–2591, 2017.

MARQUES, Douglas Ramos. **Obtenção e caracterização de blendas poliméricas de poli (ácido láctico-co-glicólico) e poli (isopreno) para aplicação como biomaterial**. 2011. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, [s. l.], 2011.

MARQUES, Douglas Ramos. **Fibras De Poli (Ácido Láctico-Co-Glicólico)/Poliisopreno Para Aplicação Em Engenharia De Tecidos**. 2015. UFRGS, [s. l.], 2015.

MAZNAH, K. S. et al. Effect of acid treatment on extractable protein content, crosslink density and tensile properties of natural rubber latex films. **Polymer Testing**, [s. l.], v. 27, n. 7, p. 823–826, 2008.

MIDDLETON, John C.; TIPTON, Arthur J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. **Biomaterials**, [s. l.], v. 21, n. 23, p. 2335–2346, 2000.

MILLER, R. A. et al. Degradation rates of oral resorbable implants (polylactates and polyglycolates): Rate modification with changes in PLA/PGA copolymer ratios. **Journal of Biomedical Materials Research**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 711–719, 1977.

MOTTA, Adriana Cristina. **Síntese e Caracterização do Poli(L-ácido láctico)- PLLA e Poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico)- PLGA e Estuda da degradação “in vitro”**. 2002. Universidade Estadual de Campinas, [s. l.], 2002.

NIAOUNAKIS, Michael. Definitions of Terms and Types of Biopolymers. **Biopolymers: Applications and Trends**, [s. l.], p. 1–90, 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323353991000016>>. Acesso em: 21 fev. 2019.

O'BRIEN, Fergal J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. **Materials Today**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 88–95, 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S136970211170058X>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

OBASI, Henry C.; OGBOBE, Okoro; IGWE, Isaac O. Diffusion Characteristics of Toluene into Natural Rubber/Linear Low Density Polyethylene Blends. **International Journal of Polymer Science**, [s. l.], p. 1–6, 2009.

OKAMURA, A. et al. Synthesis and properties of novel biodegradable polyamides containing α -amino acids. **Polymer**, [s. l.], v. 43, p. 1–6, 2002.

OLAD, Ali; AZHAR, Fahimeh Farshi. The synergetic effect of bioactive ceramic and nanoclay on the properties of chitosan – gelatin / nanohydroxyapatite – montmorillonite scaffold for bone tissue engineering. **Ceramics International**, [s. l.], v. 40, n. 7, p. 10061–10072, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ceramint.2014.04.010>>

ORINÁKOVÁ, Renáta et al. Evaluation of in vitro biocompatibility of open cell iron structures with PEG coating. **Applied Surface Science**, [s. l.], v. 475, p. 515–518, 2019.

PANDEY, A.; PANDEY, G. C.; ASWATH, P. B. Synthesis Of Polylactic Acid–Polyglycolic Acid Blends Using Microwave Radiation. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, [s. l.], v. 1, n. 3, p. 227–233, 2008.

PARK, J. **Biomaterials: An Introduction**. [s.l.]: Springer US, 1979.

PARK, Sung-Bin et al. Biopolymer-based functional composites for medical applications. **Progress in**

Polymer Science, [s. l.], v. 68, p. 77–105, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2016.12.003>>

PHAECHAMUD, Thawatchai; ISSARAYUNGYUEN, Pongsathorn; PICHAYAKORN, Wiwat. Gentamicin sulfate-loaded porous natural rubber films for wound dressing. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 85, p. 634–644, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.040>>

PIELICHOWSKI, Krzysztof; FLEJTUCH, Kinga. Differential Scanning Calorimetry Studies on Poly(ethylene Glycol) with Different Molecular Weights for Thermal Energy Storage Materials †. **Polymers for Advanced Technologies**, [s. l.], v. 13, p. 690–696, 2002.

PISKIN, Erhan et al. In vivo Performance of Simvastatin-Loaded Electrospun Spiral-Wound Polycaprolactone Scaffolds in Reconstruction of Cranial Bone Defects in the Rat Model. **Journal of Biomedical Materials Research: Part A**, [s. l.], v. 90A, n. 4, p. 1137–1151, 2008.

QUÉRÉ, David. Wetting and Roughness. **Annual Review of Materials Research**, [s. l.], v. 38, p. 71–99, 2008.

QUSSI, Basel; SUESS, Wolfgang G. The Influence of Different Plasticizers and Polymers on the Mechanical and Thermal Properties, Porosity and Drug Permeability of Free Shellac Films. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, [s. l.], v. 32, p. 403–412, 2006.

RAHIMI, A.; MASHAK, A. Review on rubbers in medicine: natural, silicone and polyurethane rubbers. **Plastics, Rubber and Composites**, [s. l.], v. 42, n. 6, p. 223–230, 2013.

RAJZER, Izabella. Fabrication of bioactive polycaprolactone / hydroxyapatite scaffolds with final bilayer nano- / micro-fibrous structures for tissue engineering application. **Journal of Materials Science**, [s. l.], v. 49, n. 16, p. 5799–5807, 2014.

RAMESH, S. et al. Rapid densification of nanocrystalline hydroxyapatite for biomedical applications. **Ceramics International**, [s. l.], v. 33, n. 7, p. 1363–1367, 2007.

RAMÍREZ RODRÍGUEZ, GB; PATRÍCIO, TMF; DELGADO LÓPEZ, JM. **Natural polymers for bone repair**. Second Edi ed. [s.l.]: Elsevier Ltd, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102451-5.00008-1>>

RASOULIANBOROUJENI, M. et al. Development of 3D-printed PLGA/TiO₂ nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering applications. **Materials Science and Engineering: C**, [s. l.], v. 96, p. 105–113, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493117348968>>. Acesso em: 3 abr. 2019.

RAVAGLIOLI, A.; KRAJEWSKI, A. **Bioceramics - Materials, Properties, Applications**. New York: Chapman & Hall, 1992.

REN, Liyun et al. Large-scale and highly efficient synthesis of micro- and nano-fibers with controlled fiber morphology by centrifugal jet spinning for tissue regeneration. **Nanoscale**, [s. l.], v. 5, n. 6, p. 2337–2345, 2013.

REZENDE, C. A.; DUEK, E. A. R. Blendas de Poli (Ácido Lático-co-Ácido Glicólico)/Poli (Ácido Lático): Degradação in vitro. **Polímeros Ciência e Tecnologia**, [s. l.], p. 36–44, 2002.

RIETSCHER, René et al. Impact of PEG and PEG-b-PAGE modified PLGA on nanoparticle formation, protein loading and release. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 500, n. 1–2, p. 187–195, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.01.021>>

RINCÓN-LÓPEZ, July Andrea et al. Synthesis, Characterization and In Vitro Study of Synthetic and Bovine-Derived Hydroxyapatite Ceramics: A Comparison. **Materials**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 333, 2018.

ROGALSKI, James J.; BASTIAANSEN, Cees W. M.; PEIJS, Ton. Rotary jet spinning review – a potential high yield future for polymer nanofibers. **Nanocomposites**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 97–121, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/20550324.2017.1393919>>

ROOINTAN, Amir et al. Poly(lactic-co-glycolic acid): The most ardent and flexible candidate in biomedicine! **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, [s. l.], v. 67, n. 17, p. 1028–1049, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00914037.2017.1405350>>

SACHOLS, E.; CZERNUSZKA, J. T. Making Tissue Engineering Scaffolds Work: Review on the Application of Solid Freeform Fabrication Technology to the Production of Tissue Engineering Scaffolds. **European Cells and Materials**, [s. l.], v. 5, p. 29–40, 2003.

SADEGHI-AVALSHAHR, Ali Reza et al. Synthesis and characterization of PLGA/collagen composite scaffolds as skin substitute produced by electrospinning through two different approaches. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, [s. l.], v. 28, n. 14, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10856-016-5789-z>>

SALAMON, D. et al. Facile method of building hydroxyapatite 3D scaffolds assembled from porous hollow fibers enabling nutrient delivery. **Ceramics International**, [s. l.], v. 40, n. 9 PART B, p. 14793–14799, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ceramint.2014.06.071>>

SANTOS, Luis Alberto Dos. **Desenvolvimento de cimento de fosfato de calcio reforçado por fibras para uso na area medico-odontologica**. 2002. Universidade Estadual de Campinas, [s. l.], 2002. Disponível em: <All Papers/Other/Tesela.pdf - Tesela.pdf>

SANTOS, Maria Helena et al. Synthesis Control and Characterization of Hydroxyapatite Prepared by Wet Precipitation Process. **Materials Research**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 625–630, 2004.

SARKAR, Kamal et al. Electrospinning to ForcespinningTM. **Materials Today**, [s. l.], v. 13, n. 11, p. 12–14, 2010.

SASMAZEL, Hilal Turkoglu. Novel hybrid scaffolds for the cultivation of osteoblast cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 49, p. 838–846, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.07.022>>

SCHILLER, Carsten; EPPLE, Matthias. Carbonated calcium phosphates are suitable pH-stabilising fillers for biodegradable polyesters. **Biomaterials**, [s. l.], v. 24, n. 12, p. 2037–2043, 2003.

SEGURA, Tatiana. **Engineering Substrate-Mediated Gene Delivery: A Novel DNA Delivery Strategy**. 2004. Northwestern University, [s. l.], 2004.

SHAHABI, Sima et al. Effect of Gamma Irradiation on Structural and Biological Properties of a Effect of Gamma Irradiation on Structural and Biological Properties of a PLGA-PEG-Hydroxyapatite Composite. **The Scientific World Journal**, [s. l.], n. September, p. 1–9, 2014.

SHAHBAZARAB, Zeinab et al. Fabrication and characterization of nanobiocomposite scaffold of zein/chitosan/nanohydroxyapatite prepared by freeze-drying method for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 108, p. 1017–1027, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.017>>

SHIN, Kyu Chul et al. A Facile Preparation of Highly Interconnected Macroporous PLGA Scaffolds By Liquid–Liquid Phase Separation II. **Polymer**, [s. l.], v. 46, p. 3801–3808, 2005.

SILVA, Suely Alves et al. Citotoxicidade in vitro de nanopartículas de fosfato tricálcico-β sintetizado via reação em estado sólido. **Matéria (Rio de Janeiro)**, [s. l.], v. 24, n. 1, 2019.

SMITH, I. O. et al. Nanostructured Polymer Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. **Wires: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, [s. l.], v. 1, p. 226–236, 2009.

SÖDERGARD, Anders; STOLT, Mikael. Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. **Progress in Polymer Science**, [s. l.], v. 27, p. 1123–1163, 2002.

SRIRING, Manus et al. Viscoelastic and mechanical properties of large- and small-particle natural rubber before and after vulcanization. **Polymer Testing**, [s. l.], v. 70, n. May, p. 127–134, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142941818307827>>. Acesso em: 26 fev. 2019.

STACHEWICZ, Urszula et al. Pore shape and size dependence on cell growth into electrospun fiber scaffolds for tissue engineering: 2D and 3D analyses using SEM and FIB-SEM tomography. **Materials Science & Engineering C**, [s. l.], v. 95, p. 397–408, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.08.076>>

STEVENS, M. P. **Polymer Chemistry: An Introduction**. New York: Oxford University Press, 1999.

SURESH, Visakha; ANOLIK, Rachel; POWERS, David. The Utility of Polyether-Ether-Ketone Implants Adjacent to Sinus Cavities After Craniofacial Trauma. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, [s. l.], v. 76, n. 11, p. 2361–2369, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.joms.2018.05.002>>

SUSSMAN, Gordon L.; BEEZHOLD, Donald H.; KURUP, Viswanath P. Allergens and natural rubber proteins. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, [s. l.], v. 110, p. 33–39, 2002.

TIAN, Huayu et al. Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application. **Progress in Polymer Science**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 237–280, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.004>>

TRAKOOLWANNACHAI, V.; KHEOLAMAI, P.; UMMARTYOTIN, S. Development of hydroxyapatite from eggshell waste and a chitosan-based composite: In vitro behavior of human osteoblast-like cell (Saos- 2) cultures. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 134, p. 557–564, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.004>>

TROMMER, R. M.; SANTOS, L. A. Dos; BERGMANN, C. P. Técnica alternativa para obter recobrimentos de hidroxiapatita. **Cerâmica**, [s. l.], v. 53, n. 326, p. 153–158, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0366-69132007000200007&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 12 mar. 2019.

TROVATTI, E. et al. Development And Characterization Of Natural Rubber And Bacterial Cellulose-Sponge Composites. **World Journal of pharmacy and pharmaceuticals**, [s. l.], v. 4, n. 7, p. 220–235, 2015.

TSUNEIZUMI, Y. et al. Chemical Recycling of Poly (Lactic Acid) - Based Polymer Blends Using Environmentally Benign Catalysts. **Polymer Degradation and Stability**, [s. l.], v. 95, n. 8, p. 1387–1393, 2010.

TU, Qin et al. Click synthesis of neutral, cationic, and zwitterionic poly (propargyl glycolide) - co - poly (ε -caprolactone) -based aliphatic polyesters as antifouling biomaterials. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 108, p. 34–43, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.02.006>>

TUAMPOEMSAB, Surakit; NIMPAIBOON, Adun; SAKDAPIPANICH, Jitladda T. Quantitative analysis of isoprene units in natural rubber and synthetic polyisoprene using ¹H-NMR spectroscopy with an internal standard. **Polymer Testing**, [s. l.], v. 43, p. 21–26, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.polymeresting.2015.02.003>>

TURNBULL, Gareth et al. 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. **Bioactive Materials**, [s. l.], v. 3, p. 278–314, 2018.

ULERY, Bret D.; NAIR, Lakshmi S.; LAURENCIN, Cato T. Biomedical applications of biodegradable polymers. **Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics**, [s. l.], v. 49, n. 12, p. 832–864, 2011.

VAN WAZER, John R. **Phosphorus and its compounds**. New York: Interscience, 1958.

VARGA, Norbert et al. The effect of synthesis conditions and tunable hydrophilicity on the drug encapsulation capability of PLA and PLGA nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 176, p. 212–218, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776519300128>>. Acesso em: 3 abr. 2019.

VASITA, Rajesh; KATTI, Dhirendra S. Nanofibers and their applications in tissue engineering. **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 15–30, 2006.

VECHIETTI, F. A. et al. Fibers obtaining and characterization using poly (Lactic-Co-Glycolic acid) and Poly (Isoprene) containing hydroxyapatite and α tcp calcium phosphate by electrospinning method. **Key Engineering Materials**, [s. l.], v. 631, p. 173–179, 2015.

VENKATACHALAM, Perumal et al. Natural rubber producing plants: An overview. **African Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 12, n. 12, p. 1297–1310, 2013. Disponível em: <<http://www.academicjournals.org/AJB>>

VENUGOPAL, Jayarama Reddy et al. Osteoblast mineralization with composite nanofibrous substrate for bone tissue regeneration. **Cell Biology International**, [s. l.], v. 35, p. 73–80, 2011.

VOLKMER, Tiago Moreno. **Obtenção e caracterização de hidroxiapatita porosa pelo método gel casting de espumas para uso como implantes**. 2006. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, [s. l.], 2006.

VROMAN, Isabelle et al. Biodegradable Polymers. **Materials**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 307–344, 2009. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1996-1944/2/2/307>>. Acesso em: 24 fev. 2019.

WANG, Jiang-Ze et al. A review of emerging bone tissue engineering via PEG conjugated biodegradable amphiphilic copolymers. **Materials Science & Engineering C**, [s. l.], v. 97, p. 1021–1035, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.01.057>>

WANG, Li et al. Fabrication of polymer fiber scaffolds by centrifugal spinning for cell culture studies. **Microelectronic Engineering**, [s. l.], v. 88, n. 8, p. 1718–1721, 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167931710005423>>. Acesso em: 9 nov. 2018.

WANG, Yan-yan et al. Introducing RGD Peptides on PHBV Films through PEG-Containing Cross-Linkers to Improve the Biocompatibility. [s. l.], v. 12, p. 551–559, 2011. b.

WATTANAKAROON, Wanida et al. Albumin-natural rubber latex composite as a dermal wound dressing. **Materials Today: Proceedings**, [s. l.], v. 4, n. 5, p. 6633–6640, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214785317309732>>. Acesso em: 26 fev. 2019.

WEITZ, R. T. et al. Polymer nanofibers via nozzle-free centrifugal spinning. **Nano Letters**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 1187–1191, 2008.

WENZEL, R. N. Resistance of Solid Surfaces to Wetting by Water. **Industrial and Engineering Chemistry**, [s. l.], v. 28, n. 8, p. 988–994, 1936.

WILLIAMS, David F. **The Willians Dictionary of Biomaterials**. Liverpool: Liverpool University Press, 1999.

WILLIAMS, David F. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, [s. l.], v. 30, p. 5897–5909, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.027>>

YEGAPPAN, Ramanathan et al. Carrageenan based hydrogels for drug delivery, tissue engineering and wound healing. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 198, p. 385–400, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.06.086>>

YUAN, Yin et al. Modification of porous PLGA microspheres by poly-L-lysine for use as tissue engineering scaffolds. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 161, p. 162–168, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.10.044>>

ZELTINGER, Joan et al. Effect of Pore Size and Void Fraction on Cellular Adhesion, Proliferation, and Matrix Deposition. **Tissue Engineering**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 557–572, 2001.

ZHANG, Leqiang et al. Electrospun PEGylated PLGA nanofibers for drug encapsulation and release. **Materials Science and Engineering: C**, [s. l.], v. 91, p. 255–262, 2018. a. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493117325250>>. Acesso em: 3 abr. 2019.

ZHANG, Liang et al. Effect of plasticizers on microstructure, compatibility and mechanical property of hydroxypropyl methylcellulose/hydroxypropyl starch blends. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 119, p. 141–148, 2018. b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.064>>

ZHANG, Y. et al. Chronic Label-Free Volumetric Photoacoustic Microscopy of Melanoma Cells In Three-Dimensional Porous Scaffolds. **Biomaterials**, [s. l.], v. 31, p. 8651–8658, 2010.

ZHANG, Zhiming; SUN, Jun. Research on the development of the centrifugal spinning. **MATEC Web of Conferences**, [s. l.], v. 95, p. 07003, 2017.

ZHAO, Wen et al. Fabrication of functional PLGA-based electrospun scaffolds and their applications in biomedical engineering. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 59, p. 1181–1194, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.11.026>>

ZHOU, L. et al. Study of a novel porous gel polymer electrolyte based on thermoplastic polyurethane/poly(vinylidene fluoride-cohexafluoropropylene) by electrospinning technique. **Journal of Power Sources**, [s. l.], v. 263, p. 118–124, 2014.

1. OBTENÇÃO DA BLENDA CELLPRENE®

A blenda Cellprene® foi obtida de acordo com os procedimentos descritos por Marques (2011). Segue descrição detalhada:

- O Poli(ácido láctico-co-glicólico, PLGA) foi obtido junto à Purac Biomaterials (The Netherlands) e utilizado como obtido, sem purificações ou processamentos prévios. O pH do material recebido era de 7,2, não apresentando necessidade de tratamento de neutralização. O poliisopreno (PI) foi obtido junto à Mafer LTDA (Brasil) na conformação de látex natural centrifugado 60%. Uma vez que o pH do material recebido transita entre 10,0-11,2, o material foi neutralizado com solução de ácido clorídrico 2M a um intervalo de pH 7,2-7,8. Para sua utilização, o material recebido foi submetido a secagem completa em estufa a 40°C por 24h. O polímero foi purificado pelo método de reprecipitação, usando clorofórmio como solvente, com solução precipitada em metanol (TSUNEIZUMI et al., 2010). Após precipitação, o material foi submetido a nova secagem completa em estufa a 40°C por 24h. O clorofórmio (99,8%) (nomenclatura IUPAC: triclorometano) e o metanol (99,8%) foram obtidos junto à Synth (Brazil) e foram utilizados como obtidos, sem purificações ou processamentos prévios.

- As blendas de PLGA/PI foram preparadas pelo seguinte procedimento. PLGA e PI foram pesados em separado, no estado sólido. Os materiais, na proporção em massa de 60% de PLGA e 40% de PI (proporção em volume: 51% PLGA/49% PI), foram dissolvidos em clorofórmio por processo de agitação magnética. Após homogeneização da solução polímeros/clorofórmio, o material foi submetido à secagem por 24 horas em estufa a 40°C para volatilização do solvente. A blenda foi armazenada a 4°C para procedimentos posteriores.