



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

GRICIRENE SOUSA CORREIA

FABRICAÇÃO DE NANOFIBRAS DE POLI (ÁLCOOL VINÍLICO) /
HIDROXIAPATITA-ALGINATO POR ELETROFIAÇÃO PARA APLICAÇÃO NA
ENGENHARIA DE TECIDO ÓSSEO

Recife

2022

GRICIRENE SOUSA CORREIA

**FABRICAÇÃO DE NANOFIBRAS DE POLI (ÁLCOOL VINÍLICO) /
HIDROXIAPATITA-ALGINATO POR ELETROFIAÇÃO PARA APLICAÇÃO NA
ENGENHARIA DE TECIDO ÓSSEO**

Tese apresentada no programa de Pós-Graduação
em Ciência dos Materiais da Universidade Federal
de Pernambuco como parte do requisito necessário
para obtenção de título de Doutora.

Área de concentração: Materiais não metálicos.

Orientadora: Beate Seagesser Santos

Recife

2022

Catálogo na fonte
Bibliotecária Nataly Soares Leite Moro, CRB4-1722

- C824f Correia, Gricirene Sousa
 Fabricação de nanofibras de poli (álcool vinílico) / hidroxiapatita-alginato por eletrospinning para aplicação na engenharia de tecido ósseo / Gricirene Sousa Correia. – 2022.
 125 f.: il., fig.
- Orientadora: Beate Seagesser Santos.
 Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN, Ciência de Materiais, Recife, 2022.
 Inclui referências e apêndice.
1. Materiais não metálicos. 2. Hidroxiapatita. 3. Alginato. 4. PVA. 5. Biocompósito I. Santos, Beate Seagesser (orientadora). II. Título.
- 620.19 CDD (23. ed.) UFPE- CCEN 2022 - 78

GRICIRENE SOUSA CORREIA

**FABRICAÇÃO DE NANOFIBRAS DE POLI (ÁLCOOL VINÍLICO) / HIDROXIAPATITA -
ALGINATOPOR ELETROFIAÇÃO PARA APLICAÇÃO NA ENGENHARIA DE TECIDO ÓSSEO**

Aprovada em: 03/03/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. BEATE SAEGESSER SANTOS
(Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr^o. SIDNEY JOSÉ LIMA RIBEIRO
(Examinador Externo)
Instituto de Química da UNESP

Prof^o. Dr^o. RICARDO YARA
(Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. YÊDA MEDEIROS BASTOS DE ALMEIDA
(Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr^o. RICARDO OLIVEIRA DA SILVA
(Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, razão de minha existência.

Em relação a família agradeço imensamente a meu esposo Leonardo Boaes por ter estado do meu lado quando chorei e pela força quando pensei em desistir; aos meus amados filhos (Maria Paula e Leonardo) pelo apoio e carinho; minha irmã Gricinia, esposo Francisco e Dennys pelo suporte a minha família durante minha ausência. Ainda pensando em família agradeço aos meus pais, Ribamar e Glória.

Faço agradecimento especial a minha orientadora Beate Saegesser Santos pela inestimável contribuição, estímulo, ensinamento e paciência desde o início deste trabalho.

Agradeço aos Prof. Severino Júnior e Walter Mendes os quais foram fundamentais em todos os procedimentos laboratoriais e orientações para esta pesquisa.

A Prof^a Juliana Falcão e Antonio Castro Neto pelas palavras de apoio e orientações.

Sou muito grata aos meus colegas de todos os laboratórios (DCFAR, LQES e BSTR) pela contribuição e estímulo, não citarei nenhum nome porque a lista é imensa, deixo aqui um agradecimento do tamanho do mundo.

Ao departamento de Física (UFPE), especialmente pelas análises de microscopia eletrônica de varredura;

Ao CETENE pelas análises experimentais;

A elaboração deste trabalho não teria sido possível sem a compreensão do IFMA pelo meu afastamento. Obrigada por esta oportunidade de crescer profissionalmente.

Agradeço também aos meus amigos e colegas de trabalho Prof. Dr. Ernandes Paiva, Benedito Brauna e *in memoriam* Rivas Mercury pelo imenso apoio, e aos meus amigos ludovicenses pelas orações e força.

RESUMO

Arcabouços de nanofibras produzidos por eletrofiação têm como características principais a elevada relação área superficial / volume e a distribuição de poros micrométricos desordenados podendo ser bons candidatos para regeneração óssea, facilitando a adesão celular e adsorção de moléculas orgânicas (proteínas, aminoácidos e polissacarídeos). Dentre os biomateriais, a hidroxiapatita (HAp) tem destaque por ter composição química similar aos ossos e se liga quimicamente com o tecido ósseo. Este trabalho teve como objetivo sintetizar HAp de tamanho nanométrico que possibilitasse incorporar nas nanofibras de poli (álcool vinílico) (PVA) pela técnica de eletrofiação. Primeiramente foram sintetizadas por via hidrotermal (HAH) e precipitação química (HP), sendo que a HP não foi possível a eletrofiação devido ao tamanho grande dos cristais. Portanto, visando controlar o tamanho dos nanocristais de HAp, induzimos o crescimento *in situ* associado a cadeias poliméricas do alginato e aplicamos como biocompósitos (HAL). Para a eletrofiação foram utilizadas duas concentrações de solução de PVA (10 e 12%) e três concentrações de HAL (0.1, 0.25 e 0.5% (p / p) para a preparação das fibras. A microscopia eletrônica de transmissão (TEM) mostrou HAp semelhante a bastonetes com tamanho no diâmetro e comprimento de (10 ± 2) nm e (34 ± 7) nm, respectivamente. A análise morfológica, propriedades físicas (intumescimento e degradação), mecânicas e biológicas foram avaliadas e comparadas com arcabouços de PVA puros e PVA/HAp. Através da análise da morfologia pode-se afirmar que os melhores parâmetros para formar nanofibras com ausência de imperfeição são aqueles que contém 12% de PVA, porém, nas membranas com maior proporção de HAL (0.5% m/v) apareceram na superfície pequenas quantidades de partículas aglutinadas do biocompósito. Alcançamos valores de diâmetro médio (>110 nm) abaixo do que se observa na literatura, mesmo aumentando a concentração de biocompósito HAL os valores se mantiveram aproximados na maioria das fibras eletrofiadas. A melhor resposta de resistência à tração entre os arcabouços eletrofiados foi a FH2-0.1 no valor de $15,2 \pm 2,5$ MPa, embora as demais membranas também apresentem elevados limites de resistência mecânica. As taxas de intumescimento e degradação foram estimadas semanalmente *in vitro* em solução salina tamponada por um período de 04 semanas. Também foram aplicados testes *in vitro* para avaliar a biocompatibilidade do material estudado. Três linhagens de células foram utilizadas no estudo da viabilidade celular dos arcabouços e pós cerâmicos. Neste ensaio todas as amostras tiveram resultados satisfatórios na quantificação de células viáveis. Quanto ao teste de adesão celular no arcabouço FH2-0.1 mostrou-se que células fibroblasto gengival humano (FGH) adere e prolifera na superfície. Essas e outras propriedades são condições fundamentais para mostrar que esses materiais têm grande potencial para aplicações no tecido ósseo.

Palavras-chaves: hidroxiapatita; alginato; PVA; biocompósito; arcabouços e eletrofiação.

ABSTRACT

Nanofiber scaffolds produced by electrospinning have as main characteristics the high surface area / volume ratio and the distribution of disordered micrometric pores, which can be good candidates for bone regeneration, facilitating cell adhesion and adsorption of organic molecules (proteins, amino acids and polysaccharides). Among the biomaterials, hydroxyapatite (HAp) stands out for having a chemical composition similar to bones and chemically bonding with bone tissue. The aim of this work was to synthesize nanometric-sized HAp that could be incorporated into polyvinyl alcohol (PVA) nanofibers by electrospinning technique. First they were synthesized by hydrothermal (HAH) and chemical precipitation (HP), and the HP was not possible to electrospun due to the large size of the crystals. Therefore, in order to control the size of HAp nanocrystals, we induced in situ growth associated with alginate polymer chains and applied them as biocomposites (HAL). For electrospinning, two concentrations of PVA solution (10 and 12%) and three concentrations of HAL (0.1, 0.25 and 0.5% (p / w) were used for fiber preparation. Transmission electron microscopy (TEM) showed HAp similar to rods with size in diameter and length of (10 ± 2) nm and (34 ± 7) nm, respectively. Morphological, physical (swelling and degradation), mechanical and biological properties were evaluated and compared with pure PVA and PVA/HAp scaffold. Through the morphology analysis it can be stated that the best parameters to form nanofibers without imperfection are those that contain 12% of PVA, however, in membranes with a higher proportion of HAL (0.5% m/v) small surface appears quantities of agglutinated particles of the biocomposite. We reached values of mean diameter (>110 nm) below what is observed in the literature, even increasing the concentration of the HAL biocomposite, the values remained approximate in most of the electrospun fibers. The best tensile strength response among the electrospun archwires was FH2-0.1 at 15.2 ± 2.5 MPa, although the other membranes also present high limits of mechanical strength. Swelling and degradation rates were estimated weekly in vitro in PBS solution for a period of 04 weeks. In vitro tests were also applied to assess the biocompatibility of the material studied. Three cell lines were used in the study of the cell viability of the scaffolds and ceramic powders. In this assay all samples had satisfactory results in the quantification of viable cells. As for the cell adhesion test in the FH2-0.1 scaffold, it showed that human gingival fibroblast cells (FGH) adhere and proliferate on the surface. These and other

properties are fundamental conditions to show that these materials have great potential for applications in bone tissue.

Keywords: hydroxyapatite; alginate; PVA; biocomposite; scaffold and electrospinning.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Esquema da organização hierárquica do osso desde a escala macro e nanométrica.....	22
Figura 2 –	Esquema da relação da engenharia de tecido na área interdisciplinar.....	24
Figura 3 –	Estrutura tridimensional da hidroxiapatita.....	29
Figura 4 –	Estrutura química do alginato (a) bloco M, (b) bloco G e (c) blocos alternados.....	32
Figura 5 –	Mecanismo de reticulação iônica do bloco G com íons de Ca^{2+}	33
Figura 6 –	Estrutura Molecular do PVA.....	35
Figura 7 –	Ilustração de equipamento de fiação (a) jato rotativo e (b) eletrofiação.....	37
Figura 8 –	Imagens do processo da eletrofiação utilizada nesta pesquisa (a) equipamento e (b) ilustração do processo.....	38
Figura 9 –	Fluxograma da metodologia aplicada na Etapa I da amostra HP.....	46
Figura 10 –	Fluxograma da metodologia aplicada na Etapa II da amostra HAH.....	47
Figura 11 –	Fluxograma da metodologia aplicada na Etapa III da amostra HAL.....	48
Figura 12 –	Fluxograma da preparação e caracterizações dos arcabouços fibrosos.....	52
Figura 13 –	Equipamento de eletrofiação (a) Inovenso-Modelo NE-300 Electrospinning Device, (b) constituintes principais: (1) bomba de infusão, (2) seringa, (3) bico injetor, (4) cilindro coletor e (c) fibra eletrofiadas.....	54
Figura 14 –	Equipamento utilizado no ensaio SBF para manter as amostras a 37°C.....	57
Figura 15 –	Imagens das (a) soluções precursoras e (b) pasta de precipitados.....	61

Figura 16 –	Esquema da síntese HAH (a) pelo método hidrotermal (b) precipitado seco a 60°C.....	62
Figura 17 –	Padrão de difração de raio-X das amostras: HAH (a) síntese hidrotermal e (b) calcinada a 900°C; HP (c) síntese por precipitação química via úmida e (d) calcinado a 1050°C; (e) padrão de difração da HAp # JCPDS 9-2216 e (f) padrão de difração do β -TCP.....	64
Figura 18 –	FTIR-KBr (a) da amostra obtida por síntese hidrotermal (HAH), (b) calcinado (HAH 900 °C), FTIR-ATR (c) da amostra sintetizada via úmida (HP) e (d) calcinado (HP 1050 °C).....	67
Figura 19 –	Espectros Raman das amostras sintetizadas por via úmida e hidrotermal, (a) precipitado hidrotermal (HAH) (b) calcinado (HAH 900°C), (c) precipitado por via úmida (HP) e (d) calcinado (HP 1050°C)	68
Figura 20 –	Espectro Raman do β -TCP do trabalho de Arbez e Libouban 2017, com assinalamento das bandas característicos dos fosfatos (ν_{1-4})	69
Figura 21 –	Curvas de TGA das amostras obtidas por síntese hidrotermal (HAH) e precipitação via úmida (HP).....	70
Figura 22 –	Isotermas de adsorção e dessorção dos precipitados (a) via úmida HP e (b) via hidrotermal HAH.....	72
Figura 23 –	Micrografias dos precipitados (a) HP e (b) HAH.....	73
Figura 24 –	Esquema da síntese <i>in situ</i> da hidroxiapatita no gel de alginato (HAL)	74
Figura 25 –	Difratograma do (a) precipitado do biocompósito HAL e (b) calcinado a 1050°C.....	75
Figura 26 –	Espectro de reflectância vibracional do (a) alginato de sódio, (b) precipitado do biocompósito HAL e (c) HAL calcinado a 1050 °C.....	76
Figura 27 –	Espectro Raman das amostras (a) HAL e (b) calcinado a 1050 °C.....	77
Figura 28 –	Curva da análise termogravimétrica (TGA) do biocompósito HAL (vermelho) e alginato, ALG (preto).....	78

Figura 29 –	Isotermas de adsorção e dessorção da HL.....	79
Figura 30 –	Micrografias e análise elementar do biocompósito HAL. Escalas de (a) 1 μm e (b) 500 nm; (c) imagem correspondente a região micrométrica para EDS; (d) análise elementar obtido por EDS.....	81
Figura 31 –	Micrografias e análise elementar por EDS do biocompósito HAL. (a ₁) e (a ₂) representam imagens de campo claro; (b ₁) e (b ₂) imagens correspondentes de campo escuro; (c) imagem correspondente a região nanométrica para EDS; (d) análise elementar obtido por EDS.....	83
Figura 32 –	Micrografia eletrônica de varredura dos pós cerâmicos compactados sinterizados a 1050°C. Amostra HP (a ₁) 10 μm (mag. 45 Kx) e (a ₂) 1 μm (mag. 15 Kx); amostra HAL (b ₁) 10 μm (mag. 45 Kx), e (b ₂) 1 μm (mag. 15 Kx).....	85
Figura 33 –	Esquema do ensaio da bioatividade da pastilha compactada na solução SBF.....	86
Figura 34 –	MEV das pastilhas compactadas e sinterizadas a 1150 °C dos pós sintetizados (a) por precipitação via úmida HP e (b) biocompósito HAL após 7 dias em imersão no SBF.....	86
Figura 35 –	Soluções com (a) 10% de PVA puro e (b) 10%PVA+0.1%HAL.....	87
Figura 36 –	Seringa com solução de 10% PVA com 0.1% de HP.....	87
Figura 37 –	Micrografias e distribuição de diâmetro de membranas de nanofibras (a, d) FP-10, (b, e) FP-12 e (c,f) 10% PVA + 0.1HAH, magnetização 21,8 kX.....	89
Figura 38 –	Micrografias e distribuição de diâmetro de membranas de nanofibras: (a - c) PVA a 10%: (a, d) FH1-0.1, (b, e) FH1-0.25 e (c, f) FH1-0.5; (g - i) 12% PVA: (g, j) FH2-0.1, (h, k) FH2-0.25 e (i, l) FH2-0.5, magnificação 35 Kx.....	91
Figura 39 –	Representação do frasco utilizado no ensaio de bioatividade da fibra na solução SBF.....	92
Figura 40 –	(a e b) MEV e (c e d) EDS dos arcabouços nanofibrosos: PVA a 12%: (a.1) 5 μm (Mag. 28.3 kx) e (a.2) 2 μm (Mag. 40 kx);	

	10% PVA + 0.1HAH (b.1) 5 μ m (Mag. 30.1 kx) e (b.2) 2 μ m (Mag. 60 kx)	93
Figura 41 –	(a e b) Micrografias e (c e d) EDS dos arcabouços nanofibrosos: FH1-0.1: (a.1) 5 μ m (Mag. 25.7 kx) e (a.2) 2 μ m (Mag. 56.2 kx); FH2-0.1 (b.1) 5 μ m (Mag. 30 kx) e (b.2) 2 μ m (Mag. 60 kx); (e) Mapeamento elementar por imagem.....	95
Figura 42 –	Curvas de tensão-deformação dos arcabouços eletrofiados (a) 10% PVA + 0.1HAH, FP-10, FH1-0,1, FH1-0,25 e FH1-0,5; e (b) FP-12, FH2-0.1, FH2-0,25 e FH2-0,5.....	97
Figura 43 –	Comportamento de intumescimento dos arcabouços de PVA puro, PVA/HAH e PVA / HAL em solução de PBS a 37 °C por 1, 2, 3 e 4 semanas.....	100
Figura 44 –	Comportamento de degradação in vitro de arcabouço de PVA puro, PVA/HAH e PVA / HAL em solução de PBS a 37 °C por 1, 2, 3 e 4 semanas.....	103
Figura 45 –	Micrografias de células de FGH colhidas e aderidas a estruturas fibrosas feitas de (a) FH1-0.1 e (b) FH2-0.1, respectivamente. Mag. 2 Kx.....	104
Figura 46 –	Viabilidade celular em comparação com o teste controle da célula FGH dos pós (a) HAH e HAL e (b) arcabouços fibrosos	106
Figura 47 –	Viabilidade celular do biocompósito HAL e arcabouço FH2-0.1 da linhagem celular (a) J774 A1 e (b) MDA.....	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1–	Principais compostos da família do fosfato de cálcio.....	28
Tabela 2 –	Apresenta alguns relatos no uso dos biocompósitos contendo hidroxiapatita descrito na literatura.....	31
Tabela 3 –	Código das amostras e concentração (%m/m) dos seus constituintes.....	53
Tabela 4 –	Parâmetros utilizados para produção das nanofibras por eletrofiação.....	54
Tabela 5 –	Comparação da composição iônica do SBF com a do plasma sanguíneo.....	56
Tabela 6 –	Reagentes utilizados na preparação da solução SBF.....	56
Tabela 7 –	Parâmetros de rede, volume da célula unitária e parâmetros estatísticos de qualidade do refinamento de Rietveld para os cristais de β -TCP e HAp dos pós HP sintetizados a 1050 °C..	65
Tabela 8 –	Assinalamento vibracionais do IV e Raman para a fase HAp e β -TCP.....	66
Tabela 9 –	Dados de áreas superficiais de materiais mesoporos encontrados na literatura.....	79
Tabela 10 –	Tensão de ruptura (σ), módulos de elasticidade (E) e alongamento na ruptura dos arcabouços eletrofiados.....	98
Tabela 11 –	Taxa de intumescimento de diferentes produtos encontrados na literatura.....	101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALG	Alginato
CaP	Fosfato de cálcio
CO ₂	Dióxido de carbono
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> - Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> - Soro Fetal Bovino
FGH	Fibroblasto Gengival Humano
HAH	Precipitado por via hidrotermal da HAp
HAL	Biocompósito de HAp/Alginato
HAp	Hidroxiapatita
HP	Precipitado por via úmida da HAp
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> - União Internacional de Química Pura e Aplicada
MEC	Matriz extracelular
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MPa	Mega Pascal
MTT	Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio
nHAp	Nanohidroxiapatita
PBS	Solução Salina Tamponada
PEG	Polietilenoglicol
PLGA	Poli (ácido D, L-láctico-co-glicólico)
PVA	Poli(álcool vinílico)
SBF	<i>Simulated Body Fluid</i> – Fluido Corporal Simulado
β-TCP	<i>Tricalcium phosphate</i> - Fosfato tricálcico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	OBJETIVOS.....	20
2.1	Objetivo geral.....	20
2.1	Objetivo específicos.....	20
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
3.1	Tecido ósseo.....	21
3.2	Engenharia de tecido ósseo.....	23
3.3	Biomateriais.....	25
3.3.1	Hidroxiapatita (HAp).....	27
3.3.2	Biocompósito com hidroxiapatita.....	30
3.3.3	Alginate.....	32
3.3.4	Poli (Álcool Vinílico)	34
3.4	Processamento de Fibras.....	36
3.4.1	Técnica da eletrofiação.....	38
3.4.2	Arcabouços eletrofiados com matriz de PVA aplicados na engenharia de tecido ósseo.....	41
4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	45
4.1	Preparação dos pós cerâmicos a base de fosfato de cálcio.....	45
4.2	Preparação e caracterização das pastilhas compactadas.....	48
4.2.1	Preparação dos compactados.....	48
4.2.2	Caracterização dos pós cerâmicos e pastilhas compactadas.....	49
4.2.2.1	<i>Difração de raio-X.....</i>	<i>49</i>
4.2.2.2	<i>Espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....</i>	<i>50</i>
4.2.2.3	<i>Espectroscopia Raman.....</i>	<i>50</i>
4.2.2.4	<i>Análise termogravimétrica (TGA).....</i>	<i>50</i>
4.2.2.5	<i>Isoterma de adsorção e dessorção.....</i>	<i>51</i>
4.2.2.6	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET)..</i>	<i>51</i>
4.3	Preparação e caracterização dos arcabouços fibrosos.....	52
4.3.1	Preparação das soluções para eletrofiação.....	52
4.3.2	Parâmetros para eletrofiação das soluções.....	53

4.3.3	Análise morfológica dos arcabouços fibrosos.....	55
4.3.4	Propriedade mecânica.....	55
4.3.5	Ensaio de Bioatividade em Simulated Body Fluid (SBF).....	55
4.3.6	Ensaio de intumescimento e degradação dos arcabouços por imersão no PBS.....	57
4.3.7	Cultura de células <i>in vitro</i>	58
4.3.8	Análise da morfologia celular.....	59
4.3.9	Viabilidade celular nas nanofibras e biocompósito HAL.....	59
4.3.9.1	<i>Viabilidade celular com linhagem de células FGH</i>	60
4.3.9.2	<i>Viabilidade celular com linhagem de células J774 e MDA</i>	60
5	RESULTADO E DISCUSSÃO	61
5.1	Caracterização dos fosfatos de cálcio sintetizados por via úmida (HP) e hidrotermal (HAH)	61
5.1.1	Difração de raio-X.....	62
5.1.2	Espectroscopia vibracional (FTIR / Raman)	65
5.1.3	Análise termogravimétrica (TGA)	69
5.1.4	Curvas de adsorção e dessorção de N ₂	70
5.1.5	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	73
5.2	Caracterização do biocompósito hidroxiapatita / alginato (HAL)	73
5.2.1	Difração de raio-X.....	74
5.2.2	Caracterização vibracional (FTIR-ATR / Raman)	75
5.2.3	Análise termogravimétrica (TGA).....	77
5.2.4	Isotermas de adsorção e dessorção e área superficial específica..	78
5.2.5	MEV e análise elementar por EDS.....	80
5.2.6	MET e análise elementar por EDS do HAL.....	82
5.3	Caracterização das pastilhas compactadas HP e HAL	84
5.3.1	Microscopia eletrônica de varredura.....	84
5.3.2	Bioatividade.....	85
5.4	Caracterização dos arcabouços eletrofiados	87
5.4.1	Microscopia eletrônica de varredura das fibras eletrofiadas.....	88
5.4.1.1	<i>Arcabouços de PVA puros e PVA / HAH</i>	88
5.4.1.2	<i>Arcabouço do PVA com biocompósito HAL (PVA/HAL)</i>	89

5.4.1.3	<i>Bioatividade da nanofibra PVA puro, PVA/HAH e PVA/HAL.....</i>	92
5.4.2	Propriedade mecânica dos arcabouços.....	96
5.4.3	Ensaio de Intumescimento.....	98
5.4.4	Ensaio de degradação.....	101
5.4.5	Ensaio de adesão celular.....	103
5.4.6	Ensaio de viabilidade celular.....	104
5.4.6.1	<i>Viabilidade celular com linhagem celular FGH.....</i>	105
5.4.6.2	<i>Viabilidade com linhagem celular J774A1 e MDA.....</i>	107
6	CONCLUSÃO.....	109
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	111
	REFERÊNCIAS.....	112
	APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO.....	125

1 INTRODUÇÃO

Os enxertos ósseos têm sido utilizados para preencher inúmeros defeitos ósseos, resultantes de lesões traumáticas, defeitos genéticos, doenças degenerativas e cânceres, que exigem uma necessidade clínica de terapias melhoradas para auxiliar no reparo e regeneração do tecido danificado, tornando-se grandes desafios para cirurgia ortopédica (FROHBERGH *et al.*, 2015; RICE *et al.*, 2013). A prevalência mundial de tais defeitos leva a bilhões de dólares em custos para a área da saúde e uma diminuição da qualidade de vida para os pacientes (FROHBERGH *et al.*, 2015).

Embora os enxertos ósseos, tais como: autógenos e xenógenos tenham mais disponibilidade para aplicações biomédicas, estes necessitam de um segundo procedimento cirúrgico (autógenos) e os xenógenos podem transmitir doenças por serem de espécie diferente. Esta realidade faz com que haja um aumento na demanda por biomateriais que possam potencialmente substituir, reparar ou regenerar ossos lesionados ou doentes (PARHI; RAMANAN; RAY, 2006). Com avanços dos biomateriais e maior compreensão da biologia que envolve uma série complexa de fatores de crescimento e redes de sinalização celular, novos biomateriais foram desenvolvidos para preparar o caminho da próxima geração da medicina regenerativa tecidual (RICE *et al.*, 2013).

Na maioria dos casos, um biomaterial é qualquer material biocompatível, natural ou produzido pelo homem, que é usado para substituir ou auxiliar parte de um órgão ou tecido, enquanto em contato íntimo com o tecido vivo (CHEN, Q.; THOUAS, 2014).

Dentre os biomateriais os fosfatos de cálcio têm sido estudados como materiais de reparo ósseo nos últimos 80 anos (DOROZHKIN, 2012). O tecido ósseo humano natural é uma parte importante do esqueleto humano sendo composto por hidroxiapatita (inorgânico) e colágeno (orgânico) (GÖNCÜ *et al.*, 2017). A similaridade da hidroxiapatita (HAp, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) com o componente inorgânico da matriz óssea contribui para o desenvolvimento de diferentes métodos de sínteses da HAp, que podem ter aplicações biomédicas como no reparo de tecidos duros ou sistemas de liberação de fármacos. A hidroxiapatita pode ser utilizada como substituto ósseo parcial, preenchimento de ossos e dentes ou revestimento em ortopedia e implantes dentários (SZCZEŚ; HOŁYSZ; CHIBOWSKI, 2017).

Por outro lado, considerando que o osso natural é formado por uma matriz orgânica, o colágeno tipo I, que fornece ao osso flexibilidade e resiliência, e uma fase inorgânica, hidroxiapatita, que é responsável pela rigidez e resistência do osso, portanto, trata-se de um biocompósito natural (LI, Z. *et al.*, 2015). A vantagem dos orgânicos/polímeros nos biocompósitos sobre outros materiais, são adquirir propriedades mecânicas (flexibilidade) e taxa de biodegradação que podem ser adaptadas até certo ponto para aplicações específicas, por exemplo o tecido ósseo (PARHI; RAMANAN; RAY, 2006). Dentre estes biomateriais sintéticos, tem-se o alginato, que vai além destas características, onde estes são processados principalmente pelos métodos de hidrogel e aplicado como transportadores de drogas e arcabouços (*scaffolds*) na engenharia de tecido ósseo (LEE, K. Y.; MOONEY, 2012).

Na engenharia de tecido ósseo é fundamental desenvolver arcabouços com porosidade altamente interconectada para guiar o crescimento interno da célula para regeneração do tecido (HUBBELL, 2003). Tais arquiteturas porosas hierárquicas definem as características mecânicas e biológicas dos arcabouços. Por exemplo, os espaços vazios (poros) servirão de ambiente para regenerar células com intuito de formar novos tecidos (incluindo novos vasos sanguíneos) e também como vias para o transporte de massa por difusão (SUN, FANGFANG; ZHOU; LEE, 2011).

Dentre as técnicas usuais utilizadas para a obtenção de arcabouços sintéticos voltados para engenharia de tecido ósseo, a técnica de eletrofiação é tida como uma das mais favoráveis, pois produzem nanofibras de alta relação entre área superficial e volume, permitindo uma maior superfície para fixação de células, em comparação com outras estruturas tridimensionais (3D) (KUMBAR *et al.*, 2008).

Vários polímeros naturais e sintéticos têm sido aplicados no processo de eletrofiação. O Poli (álcool vinílico) (PVA) é um polímero hidrofílico semicristalino com boa estabilidade química e térmica. Além de ser também altamente biocompatível e não tóxico, pode ser processado facilmente, e possuir alta permeabilidade à água (ISLAM, MD. SHAHIDUL; KARIM, 2010).

A seleção de biomateriais adequados a serem usados na engenharia de tecidos ósseo se baseia em considerações biológicas sólida. Testes *in vitro* foram aplicados nas membranas em estudo para avaliação da taxa de intumescimento, degradação, citotoxicidade e adesão celular. Dessa maneira, eles poderão adquirir o nível de segurança adequada para futuros testes *in vivo*.

Mediante a relevância de se utilizar estes biomateriais (HAp/alginato/PVA) no processo de restauração óssea, como visto nas literaturas, estes se tornam atrativos para aplicações na engenharia de tecido ósseo. Entretanto estudos destes biomateriais utilizados como biocompósito aplicados em arcabouços eletrofiados na engenharia de tecido ósseo são trabalhosos, devido à dificuldade de obter fibras de tamanho de escala nanométrica e distribuição homogênea, principalmente quando se têm materiais incorporados dentro destas fibras (biocompósito). Outro problema é a presença do alginato, onde os poliânions da estrutura molecular do alginato criam uma força repulsiva e interrompem a fiação contínua da fibra (SAFI *et al.*, 2007). Este fenômeno, embora solucionado pela mistura de soluções de gel de alginato com outros polímeros, este processo pode gerar inúmeros defeitos.

Neste contexto, este trabalho tem como objetivo produzir pós de HAp incorporados em gel de alginato visando obter biocompósito em escala nanométrica para serem eletrofiados numa matriz de PVA para potencial uso como material na engenharia de tecido ósseo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo principal deste trabalho foi obter arcabouços de nanofibras por eletrofiação de poli (álcool vinílico) e biocompósito de hidroxiapatita / alginato (HAL) visando aplicar na engenharia de tecido ósseo.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar pós de fosfato de cálcio (CaP), por diferentes metodologias com intuito de precipitar fase da hidroxiapatita pela sua importância biológica no tecido ósseo.
- Sintetizar biocompósito de HAp *in situ* no gel de alginato na forma de pós;
- Caracterizar os pós sintetizados (DRX, FTIR, Raman, TGA, BET, MEV, MET);
- Otimizar as concentrações de PVA com os pós estudados para a produção de arcabouços eletrofiados;
- Ajustar os parâmetros do processo de eletrofiação;
- Avaliar a morfologia das fibras eletrofiadas e sua distribuição de tamanho;
- Verificar a resistência mecânica, taxa de intumescimento e degradação dos arcabouços;
- Estudar a bioatividade após 7 dias de imersão no *Simulated Body Fluid* – SBF;
- Verificar através de ensaio *in vitro* a viabilidade celular e adesão celular para possível ensaios *in vivo*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

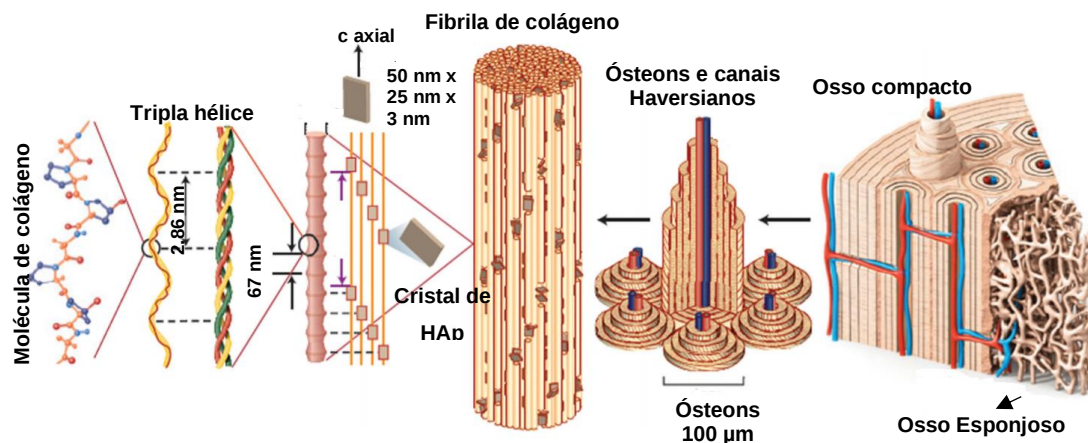
3.1 Tecido ósseo

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo de suporte significativo e dinâmico que continua a ser remodelado e reconstruído ao longo da vida de um indivíduo. Além de sua função estrutural, é responsável pelo suporte, proteção, locomoção e carga. Assim como também assume responsabilidade pela formação de células sanguíneas (hematopoese), homeostase mineral e outras funções (YI *et al.*, 2016).

A anatomia do tecido ósseo pode ser dividida em dois tipos de tecido: cortical ou compacto e trabecular ou esponjoso. O cortical é denso e está presente no eixo de ossos longos, que possui uma estrutura em forma de lamelas concêntricas onde a matriz de colágeno se organiza, com uma porosidade variando entre 5 a 10%. Já o trabecular apresenta uma menor densidade por possuir uma matriz mais porosa variando de 50 a 90%. Este se organiza em trabéculas preenchidas por medula óssea vermelha, na qual há produção ativa de células sanguíneas a partir de células mesenquimais (CARNEIRO; JUNQUEIRA, 2012; JUDAS *et al.*, 2012; KUMAR SAINI; PRASAD BAGRI; BAJPAI, 2019).

De um modo geral o tecido ósseo apresenta um arranjo estrutural em diferentes escalas que está dividido em três níveis: nanoestrutura (não colagenosas, proteínas orgânicas, minerais cristalinos); microestrutura de ósteons, lamelas, sistemas Haversianos e Volkmann; macroestrutura como o osso esponjoso (trabecular) e cortical (Figura 1) (GALIA *et al.*, 2009; LIU, H.; WEBSTER, 2007).

Figura 1 – Esquema da organização hierárquica do osso desde a escala macro e nanométrica



Fonte: (WEGST *et al.*, 2015).

A matriz extracelular do tecido ósseo também é composta por células que são responsáveis pela síntese da matriz, tais como: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos.

Os osteoblastos são responsáveis não só pela formação da matriz óssea, mas também pela sua mineralização. Estas células sintetizam a parte orgânica (colágeno tipo I, proteoglicanos e glicoproteínas) da matriz óssea, e também osteonectina que facilita a deposição de cálcio e osteocalcina estimula a atividade dos osteoblastos (CARNEIRO; JUNQUEIRA, 2012).

Quando os osteoblastos se envolvem completamente na matriz óssea calcificada, fica aprisionado em cavidades denominadas de lacunas, diferenciando-se deste modo em osteócitos (RODAN, 1992).

Já os osteoclastos desempenham um papel fundamental no processo de remodelação e renovação do tecido ósseo. São essas células que realizam a reabsorção do tecido ósseo mineralizado, permitindo a liberação de cálcio. (RODAN, 1992).

3.2 Engenharia de tecido ósseo

Um dos setores que vem crescendo nas pesquisas na área biomédica é a engenharia de tecido, que regenera tecidos naturais, bem como o uso de células na criação de substitutos biológicos para tecidos e órgãos defeituosos (TABATA, 2000).

A perda ou disfunção do tecido esquelético causadas por trauma, lesão, doença ou avanços na idade pode resultar em morbidade significativa, bem como em uma variedade de questões socioeconômicas (BLACK *et al.*, 2015). A engenharia de tecidos e a medicina regenerativa surgiram nos últimos anos com novas abordagens para a formação de um novo tecido esquelético, na tentativa de abordar a necessidade não satisfeita de crescimento ósseo e reparação óssea (BLACK *et al.*, 2015).

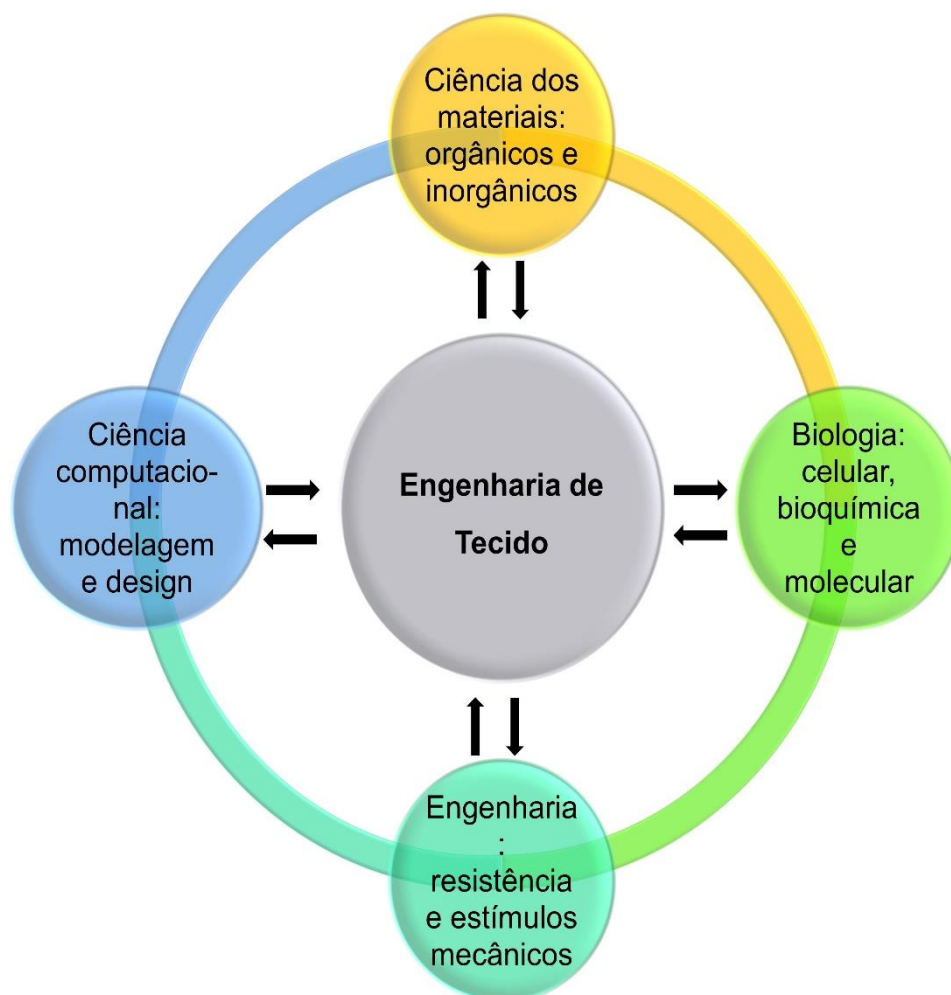
Para Berthiaume, *et al.* (2011), muitas vezes, o ambiente imita alguns aspectos críticos da configuração *in vivo* através do controle adequado dos materiais e do ambiente mecânico, bem como do meio químico (BERTHIAUME; MAGUIRE; YARMUSH, 2011) . Geralmente, arcabouços para adesão celular devem servir pelo menos a um dos seguintes propósitos:

- ✓ Facilitar ligação celular e migração;
- ✓ Retenção e apresentação de fatores bioquímicos;
- ✓ Ambiente poroso para adesão celular e difusão de nutrientes adequados;
- ✓ Rigidez mecânica e flexibilidade.

Então, com todos esses esclarecimentos a engenharia de tecidos é um ramo interdisciplinar da ciência que combina o sistema biólogo, químico e ciência dos materiais para trabalharem juntos. Portanto, o ramo interdisciplinar consiste na proliferação de células-tronco no arcabouço no meio de fluido corporal simulado - SBF (*Simulated Body Fluid*) para confirmar a biocompatibilidade do arcabouço no corpo humano (AMBEKAR; KANDASUBRAMANIAN, 2019).

Pode-se afirmar então que, a engenharia do tecido é de natureza interdisciplinar que inclui conceitos e tecnologia em diversas áreas como mostrado na Figura 2.

Figura 2 – Esquema da relação da engenharia de tecido na área interdisciplinar



Fonte: A autora (2020).

O sucesso da engenharia de tecido depende também da biocompatibilidade e resistência mecânica dos biomateriais. Portanto ao produzir um arcabouço a seleção do material é crucialmente importante (ISLAM, MD SHARIFUL; TODO, 2016). Segundo Holmes (2002), os candidatos a arcabouços de biomateriais devem satisfazer, de forma ideal, vários critérios rigorosos: (1) unidades básicas que podem ser projetadas e modificadas; (2) uma taxa controlada de biodegradação dos materiais; (3) ausência de citotoxicidade; (4) propriedades que especificamente promovem ou inibem interações célula-material; (5) respostas imunes e inflamação mínimas; (6) produção de material fácil e escalável, purificação e processamento, e (7) compatibilidade química com soluções aquosas e condições fisiológicas.

A biologia dos enxertos ósseos e seus substitutos é apreciada a partir de uma compreensão dos processos de formação óssea da osteoindução, novo osso obtido através do recrutamento ativo de células-tronco mesenquimais do hospedeiro do tecido circundante, que se diferenciam em osteoblastos formadores de osso; e osteocondução é a facilidade da entrada dos vasos sanguíneos e a formação do novo osso em uma estrutura treliçada passiva definida (BHATT; ROZENTAL, 2012).

3.3 Biomateriais

Biomaterial, por definição clássica, é um material utilizado num dispositivo médico, destinado a interagir com os sistemas biológicos.

Por outro lado, em posição de refinar o paradigma dos biomateriais e redefinir o conceito, levando em consideração o surgimento de novas tecnologias, define-se como:

"Uma substância que foi projetada para assumir uma forma que, sozinha ou como parte de um sistema complexo, é usada para direcionar, pelo controle de interações com componentes de sistemas vivos, a de qualquer procedimento terapêutico ou diagnóstico, em medicina humana ou veterinária" (WILLIAMS, 2009).

Segundo Bhat e Kumar (2013) tem uma definição mais completa, do ponto de vista da saúde, os biomateriais, podem ser definidos como:

"Materiais que possuem algumas propriedades novas que os tornam apropriados para entrar em contato imediato com o tecido vivo, sem provocar quaisquer reações adversas de rejeição imunológica" (BHAT; KUMAR, 2013).

Os biomateriais são geralmente classificados em função de sua origem, reação biológica, natureza química e aplicação referente ao mecanismo de ação.

- Quanto à relação com a origem podem ser:
 - *Autógenos* – quando se realiza a retirada de um tecido para implante no próprio indivíduo, exemplos: osso esponjoso e, em menor grau, o osso cortical são materiais de enxerto de referência. A disponibilidade de enxertos autógenos é, no entanto, limitada e a retirada está frequentemente associada à mobilidade do local doador (BHATT; ROZENTAL, 2012).
 - *Alógenos* – quando o implante é dado por um órgão ou tecido de indivíduos diferentes, porém pertencendo a mesma espécie. Exemplos: fonte de cadáveres.
 - *Xenógenos* – quando o implante é originário de uma espécie diferente (caso da utilização de pericárdio bovino em próteses cardíacas).
 - *Aloplásticos* – são considerados materiais sintéticos, exemplos: ligas de titânio (metais), alginatos (polímeros), hidroxiapatita (cerâmicas), e mais recentemente, hidroxiapatita/prata (compósitos). A vantagem do uso destes materiais é que evitam a morbidade de doadores, e tipicamente simplifica o procedimento operativo em termos de tempo e complexidade da técnica (EPPLEY, 1999).
- Quanto a relação à reação biológica, especialmente confinados às suas respostas ao material da interface, os biomateriais podem ser classificados (DUBOK, 2001; REZWAN *et al.*, 2006):
 - Bioinerte – Estes materiais interagem muito pouco com o tecido circundante. Ex: Óxidos de titânio, tântalo, alumínio e zircônia;
 - Bioativos – A superfície destes materiais favorece ligação bioquímica com o organismo vivo. Ex: hidroxiapatita porosa, sais de fosfato de cálcio (polifosfato de cálcio), biovidros, poliuretano etc.;
 - Biodegradável – Estes materiais possuem uma taxa de degradação controlável, onde sua substituição pelo tecido ocorre sem toxicidade e rejeição para o organismo *in vivo*. Ex: polímeros naturais (alginato, quitosana etc.) e sintéticos (PVA, PLLA, PLGA etc.), Fosfato tricálcico, hidroxiapatita etc.;
 - Biomiméticos – Estes materiais possuem similaridade na composição química, propriedades biomecânica e bioquímica com tecido onde vai

ser implantado. Ex: polissacarídeos, tais como, ácido hialurônico, alginato, quitosana etc.

➤ Quanto à aplicação

- Osteoindutores – possui capacidade de atrair células que propiciam o crescimento do tecido ósseo.
- Osteocondutores – estes materiais permite a justaposição de um novo tecido ósseo, a partir de outro pré-existente (por ex. arcabouços).
- Osteogênicos – se refere a materiais orgânicos capazes de formar osso diretamente de osteoblastos.

➤ Além das classificações fundamentais de comportamento, um biomaterial pode ser classificado pela sua natureza química natural e sintética. Entre os naturais exemplifica-se o colágeno puro e ossos retirados de outra fonte animal (bovino). Já os sintéticos são descritos os metálicos (p.ex. ligas de titânio), cerâmicos (p. ex. hidroxiapatita), polímeros (p.ex. alginato, ácido poli (ácido lático), polietileno glicol, PVA, etc.), biocompósitos (p. ex. hidroxiapatita/quitosana).

Dentre essas possibilidades, os materiais sintéticos são particularmente os mais atrativos devido à ausência de risco de transmissão de doenças e facilidade de reproduzir a sua composição química e arquitetura porosa (BOHNER; SANTONI; DÖBELIN, 2020) .

3.3.1 Hidroxiapatita (HAp)

Fosfato de cálcio (CaP) é o nome comum de uma família de minerais contendo cátions de cálcio (Ca^{2+}), juntamente com ortofosfato (PO_4^{3-}), metafosfato (PO_3^-) ou pirofosfato ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$), e às vezes hidrogênio (H^+) ou íons hidróxido (OH^-). É o principal constituinte inorgânico do osso (~ 60% do osso) e o principal constituinte do esmalte dentário (cerca de 90%). Existe uma família de cerâmica de polifosfato de cálcio que são caracterizados de acordo com a relação entre os íons de cálcio (Ca) e fósforo (P) na estrutura. Para composto quimicamente puros, Ca/P pode variar entre 0,5 - 2,0. Além da variação da razão Ca/P, estes também possuem uma faixa de estabilidade de pH, cristalografia e solubilidade diferentes (DOROZHKIN, 2012; ELIAZ; METOKI, 2017).

A Tabela 1 mostra os principais compostos preparados a partir do fosfato de cálcio, onde são descritos a razão Ca/P, sua fórmula química e o nome, bem como a nomenclatura do mineral correspondente.

Tabela 1 – Principais compostos da família do fosfato de cálcio

Ca/P	Fórmula química	Nome químico	Mineral
0,5	$[\text{Ca}(\text{PO}_3)_2]_n$	Polifosfato de cálcio	-
1,0	CaHPO_4	Fosfato dicálcio	Monetita
1,0	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Fosfato dicálcio dihidratado	Brushita
1,33	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Fosfato de octacálcio	-
1,43	$\text{Ca}_{10}(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_6$	-	Whitelockita
1,5	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Fosfato tricálcico	-
1,67	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	-	Hidroxiapatita
2,0	$\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$	Fosfato de tetracálcio	-

Fonte: Adaptado de (DOROZHKIN, 2012).

Os principais membros da família dos fosfatos de cálcio (CaP) (Tabela 1) são de interesse para aplicações biomédicas, por isso vários processos de síntese dos CaP são descritos na literatura. A maioria dos CaP é, moderadamente, solúvel em água e insolúvel em soluções alcalinas, mas todos eles são facilmente solúveis em ácidos (DOROZHKIN, 2012).

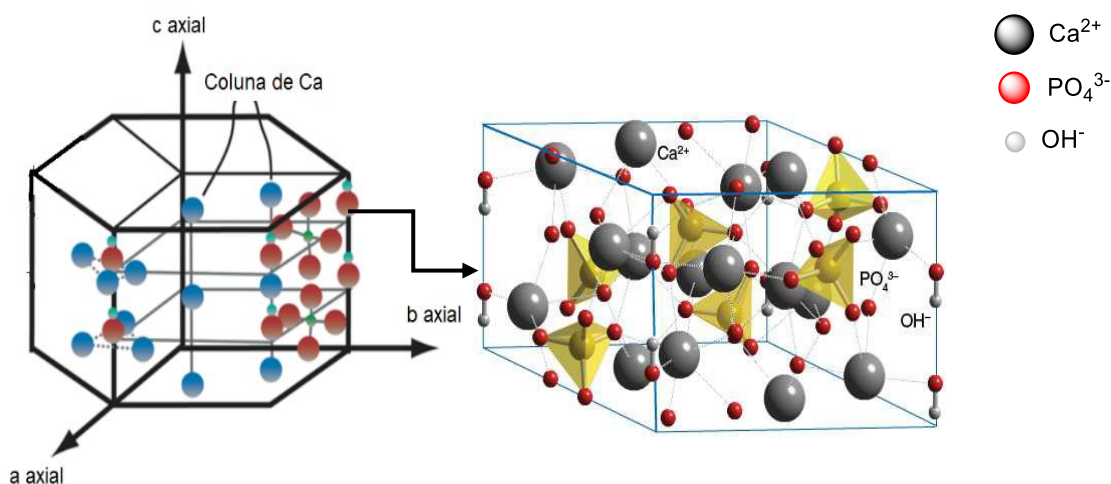
Assim, para sintetizar CaP é preciso controlar pH, temperatura, relação inicial de Ca/P e concentrações de íons. Estes fatores podem influenciar a morfologia dos cristais, conseqüentemente, o processo de biomineralização do tecido ósseo (CHEN, S. *et al.*, 2019).

Sabe-se que entre os CaP, a hidroxiapatita (HAp) é de grande interesse da área biomédica devido à similaridade com o tecido ósseo, portanto é comum usar alguns CaP como precursores para transformá-los em HAp, por ex. cristais de monetita (CHEN, S. *et al.*, 2019), ou exibir comportamento bioativo à temperatura ambiente, permitindo a formação de hidroxiapatita na superfície, é o caso do fosfato - tricálcico *Tricalcium phosphate* (β -TCP) (ARBEZ; LIBOUBAN, 2017). Embora intimamente associado com o processamento de hidroxiapatitas, o β -TCP exibe taxas de

dissolução mais rápidas do que as hidroxiapatitas em fluidos biológicos (JILLAVENKATESA; CONDRATE, 1998).

Portanto, dentre os fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita, razão 1,67 de Ca/P, é o maior constituinte do osso, juntamente com o colágeno. Trata-se de uma cerâmica constituída a partir de uma rede tridimensional (Figura 3).

Figura 3 – Estrutura tridimensional da hidroxiapatita



Fonte: <http://www.chemtube3d.com/solidstate/hydroxyapatite.html87529833>

A semelhança da hidroxiapatita sintética com o componente inorgânico da matriz óssea contribui para o desenvolvimento de métodos de síntese da HAp, que podem ter aplicações biomédicas, para reparar tecidos duros, ou como sistemas de administração de fármacos. A HAp é usada como substituto ósseo que pode ser completo ou parcial, preenchimento de ossos, revestimento em ortopedia e implantes dentários (SZCZES; HOŁYSZ; CHIBOWSKI, 2017). Diferentemente dos metais ou cerâmicas bioinertes (biovidros), onde ocorre sua encapsulação pelo tecido vivo, a hidroxiapatita não é apenas biocompatível, mas também, bioativa. Liga-se diretamente ao osso favorecendo sua fixação (ASHOK; MEENAKSHI SUNDARAM; NARAYANA KALKURA, 2003).

Além do uso na engenharia de tecido, os pós de HAp obtidos na forma de estruturas nanométricas (nHAp), são utilizados também como revestimentos cerâmicos de metais devido a sua excelente biocompatibilidade, decorrente de sua similaridade química e estrutural com a constituição inorgânica de ossos humanos

(KÖSEOGLU *et al.*, 2009). O aumento na área de superfície da nHAp leva a uma maior proporção de átomos ou moléculas expostas, comparado aos componentes do interior da HAp levando a uma bioatividade mais eficiente (RAJKUMAR; MEENAKSHISUNDARAM; RAJENDRAN, 2011). No entanto, estrutura com n-HAp é mecanicamente frágil, limitando assim, suas aplicações como enxertos ósseo que recebem cargas (LIAO *et al.*, 2018). Não somente a HAp, mas todos os fosfatos de cálcio, embora capazes de incitar uma resposta biológica favorável do tecido ósseo (“bioativo”), (ROEDER *et al.*, 2008).

Uma vasta gama de materiais tem sido utilizada para melhorar as propriedades mecânicas da hidroxiapatita. Dentre estes, tem os polissacarídeos derivados naturais como quitina, quitosana, alginato, carragenina e sulfato de condroitina são materiais versáteis amplamente utilizados para aplicações de engenharia de tecidos ósseos (VENKATESAN *et al.*, 2015).

3.3.2 Biocompósito com hidroxiapatita

Material compósito é definido como um material multifásico que pode ser sintetizado ou ocorre naturalmente. Além disso, as fases constituintes devem ser quimicamente diferentes e estarem separadas por uma interface distinta (CALLISTER; RETHWISCH, 2016). Os biocompósitos, por sua vez, possuem a mesma definição que material compósito, porém, apresentam em sua composição um biomaterial. Um exemplo de biocompósitos aplicados na engenharia de tecido resultam da combinação de polímeros biocompatíveis com a hidroxiapatita (HAp) para fabricar arcabouços que atendem a todos os requisitos desejados (SUN, FANGFANG; ZHOU; LEE, 2011). A adição de polímeros biodegradáveis, como poli (ácido glicólico), poli (ácido láctico) e poli (ácido D, L-láctico-co-glicólico) (PLGA) à cerâmica de fosfato de cálcio permitiria uma melhor manipulação e controle sobre ambos macro e microestrutura na modelagem de biocompósitos para adaptação a defeitos ósseos.

Em diferentes momentos, inúmeros polímeros biocompatíveis foram testados como matrizes do arcabouço: poli (ácido D, L-lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA) (KIM, S. *et al.*, 2006), colágeno, (ARAHIRA; TODO, 2014; RYAN *et al.*, 2015), quitosana (ZHAO; LIANG, 2017), (PEG) (DEB; DEOGHARE; BARUA, 2018), poli (álcool vinílico) (PVA) (ANJANEYULU *et al.*, 2017; POURSAMAR; AZAMI; MOZAFARI, 2011), poli

(vinil pirrolidona) (PVP) (LI, X. *et al.*, 2013), entre outros. A Tabela 2 mostra diferentes arcabouços de matrizes poliméricas contendo hidroxiapatita.

Tabela 2 – Apresenta alguns relatos no uso dos biocompósitos contendo hidroxiapatita descrito na literatura

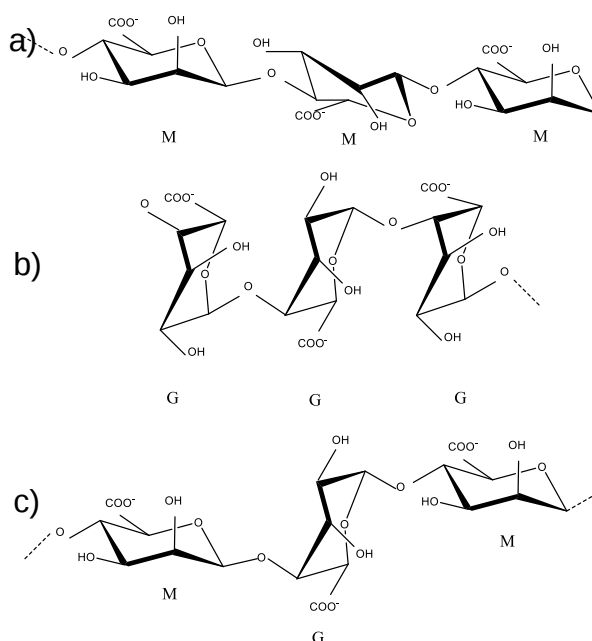
Biocompósito	Técnica de processamento	Produto	Ref.
HAp/ALG	Hidrogel + liofilização	Arcabouço para liberação de clorexidina	(SUKHODUB <i>et al.</i> , 2018).
HAp/ALG	Hidrogel + liofilização	Arcabouço para liberação de ácido ascórbico	(ILIE <i>et al.</i> , 2016).
HAp/Poli(ácido láctico e glicólico)	Prensagem + CO ₂ (g) + lixiviação	Pastilhas sólidas	(KIM, S. <i>et al.</i> , 2006).
HAp/PVA/Celulose	Hidrogel + liofilização	Arcabouço	(KUMAR <i>et al.</i> , 2014).
HAp/ALG/Quitosana	Hidrogel + secagem 80°C	Pó seco	(LIAO <i>et al.</i> , 2018).
HAp/ALG/PVA	Eletrofiação	Fibras	(ANJANEYUL U <i>et al.</i> , 2017).
HAp/Ag/Gelatina/ALG/PVA	Hidrogel + liofilização + criogel	Arcabouço	(KUMAR SAINI; PRASAD BAGRI; BAJPAI, 2019).
HAp/Colágeno	Eletrofiação	Fibras	(ZHAO; LIANG, 2017).
HAp-βTCP/PVA/PVP	Eletrofiação	Fibras	(UMA MAHESHWAR I <i>et al.</i> , 2017).

Fonte: A autora (2020).

3.3.3 Alginato

O alginato é um copolímero polianiônico linear extraído de algas marinhas e bactérias, composto de sequência de dois monômeros ácidos β -D-manurônicos (M) e α -L-gulurônicos (G) unidos por ligações glicosídicas 1,4 em proporções variáveis os quais podem formar blocos de homopolímero (M e/ou G) e heteropolímero (MG) ao longo da cadeia (Figura 4) (TURCO *et al.*, 2009; YANG, J.; XIE; HE, 2011). É considerado biocompatível, não tóxico; não-imunogênico e biodegradável. Além de sua biocompatibilidade, abundância de fontes e preços baixos, tem sido amplamente utilizado na indústria alimentícia como espessante, agente emulsificante e material de engenharia de tecidos (VENKATESAN *et al.*, 2015).

Figura 4 – Estrutura química do alginato (a) bloco M, (b) bloco G e (c) blocos alternados



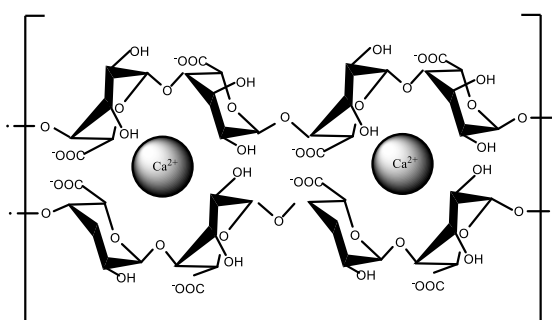
Fonte: A autora (2020).

O alginato é conhecido por formar um hidrogel na presença de cátions divalentes, como o cálcio (Ca^{2+}), que atuam como reticulante entre os grupos funcionais de cadeias de alginato (YANG, J.; XIE; HE, 2011). Porém, existe uma diferença de afinidade de íons metálicos (Ca, Ba, Sr) entre os homopolímeros G, M ou alternados. As cadeias ricas em G têm maior afinidade por causa da estrutura

secundária dos alginatos, onde a ligação diaxial na cadeia homopolimérica de guluronatos (G) determina uma estrutura de fibra curva formando cavidades, o que facilita a acomodação de cátions metálicos dentro dessas cavidades negativas (AGULHON *et al.*, 2012).

A conformação do ácido gulurônico (G) permite um alto grau de coordenação dos grupos COO^- e OH^- com Ca^{2+} formando um gel de alta viscosidade (LIANG *et al.*, 2012). Essa estrutura é conhecida como modelo de reticulação em “caixa de ovos” (do inglês, egg box) (Figura 5) (GRANT *et al.*, 1973).

Figura 5 – Mecanismo de reticulação iônica do bloco G com íons de Ca^{2+}



Fonte: A autora (2020).

A gelificação do alginato se dá por ligação cruzada de uma solução de alginato com íons de cálcio. Estes géis liofilizados foram utilizados como curativos para feridas mantendo o ambiente fisiologicamente úmido por absorção e dessorção de água dos géis (VENKATESAN *et al.*, 2015). Esta interação faz com que se minimize a infecção bacteriana facilitando a cicatrização de feridas (LEE, K. Y.; MOONEY, 2012).

Dentre o grupo biocerâmica, os biocompósitos orgânico-inorgânicos são os mais preferidos a serem usados devido a sua característica que pode atender às propriedades mecânicas requeridas no campo biomédico (KANASAN *et al.*, 2017; KUSAKABE; HIROTA; MIZUTANI, 2017).

Por sua vez, os biocompósitos têm encontrado várias aplicações na área da indústria de alimentos, veículo de liberação de drogas, engenharia de tecidos, entre outras aplicações. Na indústria alimentícia, o desafio atual é o uso do ácido ascórbico devido a sua alta sensibilidade e baixa estabilidade a condições ambientais inadequadas (por exemplo, temperatura, oxigênio, luz e umidade) (AZEVEDO *et al.*, 2014). Então, uma forma de protegê-lo consiste em imobilizar o ácido ascórbico em

óxido de zinco e encapsulá-lo em esfera de alginato (DESAI; LIU; PARK, 2005). Enquanto na engenharia de tecido foram incorporados pós de HAp no gel de alginato juntamente com clorexidina (CHX) para atuar como um sistema lento de liberação e distribuição do fármaco nos quais foram liofilizados para gerar arcabouços (SUKHODUB *et al.*, 2018). Também foram preparados e caracterizados nanocompósito de hidroxiapatita e alginato como sistema de liberação de fármaco (ácido ascórbico) (ILIE *et al.*, 2016).

Também houve a tentativa de eletrofiar arcabouços de alginato puro, porém a baixa concentração de solução foi insuficiente para fornecer matérias-primas necessárias para a malha fibrosa, pois os números de cadeias poliméricas são insuficientes e existe também repulsão intermolecular entre os grupos aniônicos (SHEN; HSIEH, 2014; SUN, FANCHEN *et al.*, 2019). Outros fatores que envolvem a eletrofição do alginato são a condutividade, tensão superficial, estrutura molecular e sua condição de polieletrólítico (MOKHENA *et al.*, 2020).

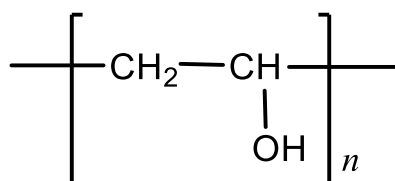
Mesmo assim, o uso do alginato vem crescendo cada vez mais na área biomédica devido à alta biocompatibilidade, baixa imunogenicidade, baixo custo, excelente capacidade de gelificação, e semelhança estrutural com um dos principais componentes da matriz extracelular (ECM), proteoglicanos (glicosaminoglicano (GAG)) e colágenos (FANG *et al.*, 2011; MOKHENA *et al.*, 2020; SHIVAKUMARA; DEMAPPA, 2019).

Devido às diversas qualidades do alginato, tem-se o desejo de expandir e aplicá-lo como arcabouços nanofibrosos eletrofiados.

3.3.4 Poli (Álcool Vinílico)

O poli(álcool vinílico) (PVA) possui estrutura molecular (Figura 6) e é um polímero sintético hidrofílico contendo grupos hidroxila pendentes e sua solução aquosa pode formar filmes transparentes (MALLAKPOUR; BEHRANVAND, 2017).

Figura 6 – Estrutura Molecular do PVA



Fonte: A autora (2020).

O poli(álcool vinílico) (PVA) são polímeros sintéticos usados desde o início da década de 1930, em uma ampla gama de aplicações nas industriais têxteis, alimentícias, dispositivos médicos etc. (BAKER *et al.*, 2012; DEMERLIS; SCHONEKER, 2003). Quanto aos dispositivos biomédicos, estes são aplicados como adesivos transdérmicos, géis que secam rapidamente quando aderido na pele e formulações de comprimidos de libertação de drogas imediata e sustentada (DEMERLIS; SCHONEKER, 2003).

O PVA também possui propriedades interessantes como adequada não-toxicidade, hidrofiliçidade, propriedades mecânicas, biocompatibilidade, alta degradação em água e características bioadesivas e sua rede tridimensional permite a troca difusional de nutrientes e produtos residuais com o ambiente circundante (RAFIENIA; SABERI; POORAZIZI, 2017; SHIVAKUMARA; DEMAPPA, 2019).

No entanto, o PVA é considerado frágil, por isso, para melhorar esta propriedade, mistura-se com outros polímeros ou cerâmicos. Assim, uma nova classe de materiais denominados de híbridos agregaria combinações de propriedades dos materiais orgânicos com inorgânicos, nos quais são misturados em escalas nanométricas ou até mesmo nível molecular (ABD EL-AZIZ; EL-MAGHRABY; TAHA, 2017; PODKOŚCIELNA; SOBIESIAK, 2016).

Já se sabe que o PVA continua sendo um dos grupos de polímeros amplamente utilizados em biomateriais aplicados na área biomédica devido a sua estrutura de copolímero em bloco segmentado e sua biodegradabilidade (PRASANNA; VENKATASUBBU, 2018).

Devido à facilidade de processamento incluindo a preparação da solução os polímeros também são usados em aplicações como arcabouços de tecido e cartilagem artificial (RAJKUMAR; MEENAKSHISUNDARAM; RAJENDRAN, 2011).

Além disso, a flexibilidade e a disponibilidade de forma dos materiais poliméricos conferem grande potencial na área de regeneração óssea (JANG; CASTANO; KIM, 2009).

Para aplicações biomédicas, preferencialmente imitar a matriz extracelular do tecido ósseo, mistura de PVA com outros polímeros orgânicos (alginato, quitosana etc.) e nanopartículas são descritos na literatura (XUE *et al.*, 2018). Filmes de nanopartícula de hidroxiapatita (HAp) com poli(álcool vinílico) (PVA) e alginato de sódio foram estudados para liberação controlada de antibióticos, amoxicilina, para infecção no tecido ósseo (PRASANNA; VENKATASUBBU, 2018) e tratamento de defeitos periodontais infra-ósseos (PRAKASH *et al.*, 2019). Também, para regeneração periodontal foram estudadas fibras eletrofiadas de PVA / HAp / Nanotubo de carbono (PVA / HAp / CNT) (KHAN *et al.*, 2017).

As nanofibras eletrofiadas também estão presente na área ambiental, nos quais foram estudadas como filtros para retiradas de contaminantes (Zn^{2+}) de solução aquosa (ABD EL-AZIZ; EL-MAGHRABY; TAHA, 2017).

3.4 Processamento de Fibras

Os materiais usados em enxerto ósseo, arcabouços, devem ser projetados para suportar a migração, fixação e proliferação de células (JANUARIYASA; ANA; YUSUF, 2020). Então, para obter estes processos biológicos é essencial uma porosidade alta e interconectada em escala micrométrica para o uso de fatores de crescimento e migração celular (SATTARY *et al.*, 2018; VASITA; KATTI, 2006). Assim, muitas técnicas de fabricação de estrutura porosa (arcabouços) e biodegradável tem avançado para aplicação na regeneração de órgãos e tecidos (AMBEKAR; KANDASUBRAMANIAN, 2019).

Os polímeros são os primeiros materiais utilizados na fabricação de arcabouços em aplicações na engenharia de tecidos, mas outros materiais poliméricos biodegradáveis já foram usados neste campo (ARMENTANO *et al.*, 2010). Isto deve-se a sua grande flexibilidade de design porque a composição e estrutura podem ser adaptadas às necessidades específicas, por isso, se tornam candidatos atraentes (LIU, X.; MA, P. 2004). A fibra PVA tem sido destacada, pela sua biocompatibilidade, alta resistência à tração, compressão, módulo de elasticidade e resistência à abrasão devido ao seu arranjo de treliça (LEE, J. S. *et al.*, 2004). Já se sabe que entre os

materiais, o processamento de arcabouços poliméricos são os mais fáceis de obter tais características, porém em algumas aplicações são consideradas frágeis e hidratáveis a temperatura corpórea (37°C) (KORDE; KANDASUBRAMANIAN, 2018).

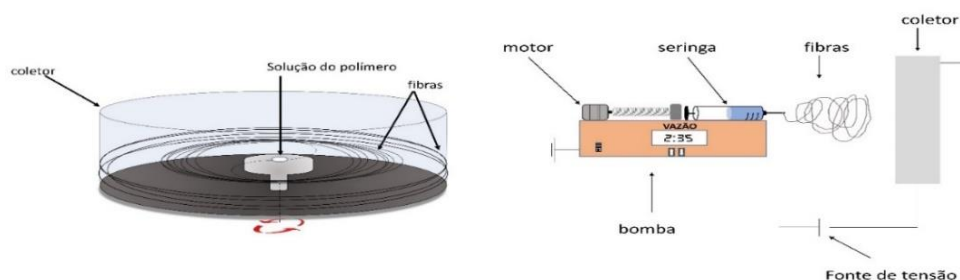
Assim, uma das linhas de pesquisa mais importante na área da engenharia de tecido ósseo é desenvolver suportes conhecidos por arcabouços nanofibrosos e nanoparticulados, pois se assemelham às características nanométricas da matriz extracelular nativa (MEC), que por sua vez direciona numerosos aspectos da organização e sobrevivência celular.

Outro fator importante das nanofibras para a engenharia de tecido é a grande razão entre a área superficial e o volume, que permite a migração e proliferação celular (SUKIGARA *et al.*, 2003). Alguns biomateriais poliméricos biocompatíveis e biodegradáveis são usados na fabricação de arcabouço, estes materiais incluem colágeno, poli(lactido-co-glicolido), poli (ácido láctico), poli (ácido glicólico) etc. (SUKIGARA *et al.*, 2003).

Atualmente na área da bioengenharia arcabouços de nanofibras poliméricas, com seus diferentes métodos de produção e montagem estão cada vez mais atuante nas pesquisas, principalmente na reconstrução e/ou substituição do tecido ósseo.

Portanto, antes de decidir sobre o tipo de processo de fabricação das nanofibras (jato rotativo, extrusão, separação de fase, eletrofiação etc.) é importante mencionar que existe uma grande demanda de variáveis que ocorrem durante o processamento do arcabouço fibroso (ROGALSKI; BASTIAANSEN; PEIJS, 2018). A ilustração da Figura 7 mostra dois processos de fabricação da nanofibras jato rotativo (a) e eletrofiação (b).

Figura 7 – Ilustração de equipamento de fiação (a) jato rotativo e (b) eletrofiação



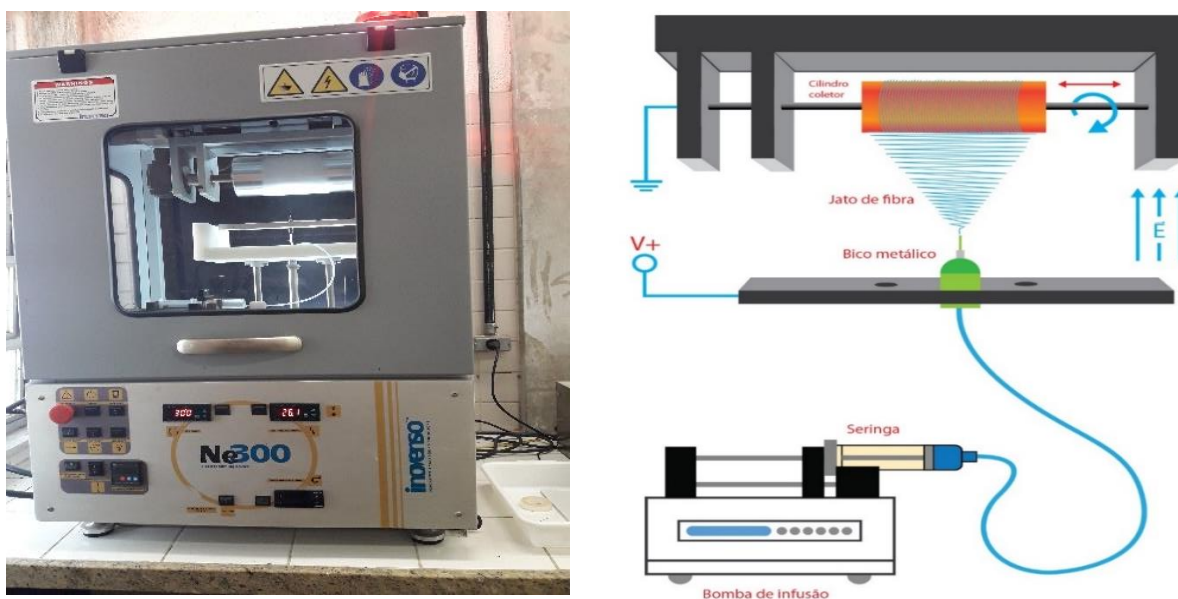
Fonte: A autora (2020).

Qualquer processo de fabricação das nanofibras, exige controle de variáveis, tais como: viscosidade, peso molecular, composição química, umidade, temperatura etc., caso contrário, poderá afetar a qualidade das nanofibras. Pensando nisso, para evitar a umidade, esta pesquisa optou por escolher um equipamento que durante o processamento da fibra permanecesse isolado do meio.

3.4.1 Técnica da eletrofiação

Esta pesquisa, optou por escolher o processo de eletrofiação ou *electrospinning* que consiste em formar filamentos a partir de soluções poliméricas. A técnica de eletrofiação consiste basicamente em: (1) bomba de infusão, (2) seringa, (3) uma fonte de alta voltagem (4) um coletor cilindro ou um alvo (HUANG *et al.*, 2003). A Figura 8 mostra o equipamento industrial Inovenso-Modelo NE-300 Electrospinning Device do Laboratório do LQES (DQF da UFPE) utilizado nesta pesquisa (a) e a ilustração (b).

Figura 8 – Imagens do processo da eletrofiação utilizada nesta pesquisa (a) equipamento e (b) ilustração do processo



Fonte: A autora (2020).

Pelo princípio da eletrofiação, os filamentos de polímero são formados a partir de uma fonte de potencial elétrico aplicado à solução do polímero na superfície da gota líquida na ponta da agulha (bico metálico) coberta por cargas elétricas. A superfície do líquido é distorcida em uma forma cônica conhecida como o cone de Taylor. Uma vez que a tensão excede um valor crítico, a força eletrostática supera a tensão superficial da solução e um jato líquido estável é ejetado da ponta do cone. O solvente evapora à medida que o jato viaja pelo ar, deixando para trás fibras poliméricas ultrafinas coletadas em um alvo eletricamente aterrado. Finalmente, as fibras resultantes são coletadas no cilindro coberto com folhas de alumínio que formam uma membrana fibrosa (HUANG *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2014; LIAO *et al.*, 2018).

Os parâmetros apropriados das variáveis envolvidas no processo da eletrofiação (tensão, distância agulha-coletor, viscosidade da solução, tipo de solvente, etc.), permite o controle da espessura, homogeneidade e orientação das fibras (LI, H. *et al.*, 2014). Porém, muitas propriedades do processo estão intercaladas, como a distância entre agulha e o coletor afeta o campo elétrico, e mesmo tais propriedades são variáveis de acordo com as propriedades da solução (concentração, solvente, viscosidade etc.).

Portanto, em função destes pontos, é importante controlar alguns fatores e variáveis que permitam determinar um conjunto de parâmetros adequados para o processo de formação das nanofibras por eletrofiação. Entre estes:

Tensão Aplicada

Pesquisadores sugeriram que, quando voltagens mais altas são aplicadas, há mais ejeção do polímero e isso resulta no aumento do diâmetro da fibra (ZHANG, C. *et al.*, 2005). Também pode resultar na formação de grânulos/gotas (*beads*) ou nanofibras com grânulos, e nanofibras frisadas nos quais são atribuídos à diminuição do tamanho do cone de Taylor e ao aumento da velocidade do jato para a mesma taxa de fluxo (HAIDER; HAIDER; KANG, 2018).

Concentração do Polímero

No processo de eletrofiação, para a formação de fibras, é necessária uma concentração mínima do polímero na solução. Em concentrações baixas, formam-se grânulos em vez de fibras e, em altas concentrações, a formação de fibras contínuas

não é desejável devido à incapacidade de manter o fluxo da solução na ponta da agulha, resultando na formação de fibras maiores (SUKIGARA *et al.*, 2003). Outra pesquisa com solução de PVA apontou que altas concentrações da solução polimérica não formavam fibras, mas grandes gotas caindo sobre o alvo de coleta independentemente da tensão de eletrofiação. Em concentração bem baixa eram insuficientes para estabilizar o jato e a contração dos diâmetros do jato impulsionado pela tensão superficial fazia com que a solução formasse grânulos ou fibras com grânulos (ZHANG, C. *et al.*, 2005).

Massa molecular do polímero

Este é outro parâmetro importante da solução que afeta a morfologia da fibra eletrofiada. Em geral, soluções de polímeros de massa molecular alta tem tendência a proporcionar uma melhor viscosidade, podendo gerar fibras mais uniformes e maiores no diâmetro. Enquanto, solução de polímeros de massa molecular baixa tende a formar grânulos (BHARDWAJ; KUNDU, 2010).

Viscosidade

A viscosidade da solução desempenha um papel importante na determinação do tamanho e morfologia da fibra durante a fiação de fibras poliméricas. Portanto viscosidade muito baixa não forma fibra contínua e alta há dificuldade na ejeção de jatos de solução de polímero, assim, há uma exigência de viscosidade ideal para eletrofiação (SUKIGARA *et al.*, 2003). Outra pesquisa afirma que grânulos e fibras com grânulos são menos propensos a serem formados para as soluções mais viscosas (FONG; CHUN; RENEKER, 1999). Na verdade, viscosidade, concentração de polímero e massa molecular estão correlacionados entre si, e todos estes parâmetros irão depender do tipo de polímero.

Taxa de Fluxo

A taxa de fluxo do polímero da seringa é um parâmetro importante do processo, uma vez que influencia a velocidade do jato e a taxa de transferência do material. Uma taxa de alimentação menor é mais desejável, pois o solvente terá tempo suficiente para a evaporação (YUAN *et al.*, 2004). Uma pesquisa com solução de poli(óxido de etileno), PEO, mostrou que o diâmetro médio da fibra aumenta linearmente com o aumento taxa de alimentação da solução de polímero (HENRIQUES *et al.*, 2009).

Distância do coletor

A distância do alvo ao coletor é outro parâmetro que influencia a qualidade das fibras. Pesquisa com polímero poli(óxido de etileno), PEO, afirma que em distâncias curtas, abaixo de 15 cm, as fibras se fundem em suas interseções devido à evaporação incompleta do solvente antes que o jato atinja o coletor (HENRIQUES *et al.*, 2009).

Porém, outra pesquisa com poli(álcool vinílico), PVA, a distância do alvo ao coletor entre 8-15 cm não teve efeito significativo na morfologia da fibra eletrofiadas. Assumiu-se que os jatos de solução foram alongados e solidificados rapidamente depois que fluíram para fora da ponta da agulha devido à alta condutividade do PVA (ZHANG, C. *et al.*, 2005).

Além destes parâmetros descritos acima sugere levar em consideração outros parâmetros que podem afetar o processo: propriedades da solução (viscosidade, concentração do polímero etc.), massa molecular do polímero, condutividade e tensão superficial; e variáveis controladas, incluindo pressão hidrostática no capilar, potencial elétrico na ponta e distância entre a ponta e coletor; e parâmetros ambientais, incluindo temperatura, umidade e velocidade do ar na câmara de eletrofiação (DOSHI; RENEKER, 1995).

3.4.2 Arcabouços eletrofiados com matriz de PVA aplicados na engenharia de tecido ósseo

Uma grande variedade de polímero tem sido investigada para produzir arcabouços eletrofiados com alta porosidade e área superficial. No entanto, apenas polímeros viscoelástico passíveis de sofrerem grandes deformações podem ser transformados em nanofibras por meio do estiramento (HUANG *et al.*, 2003). Também, várias composições poliméricas foram utilizadas como matrizes de suporte de células ósseas com a intenção de conseguir melhor adesão celular, crescimento e formação de minerais adequados para a regeneração do osso (PRABHAKARAN; VENUGOPAL; RAMAKRISHNA, 2009).

Apesar de muitos polímeros terem sido dissolvidos com solventes adequados para serem eletrofiados, há uma grande dificuldade de eletrofiar biopolímeros naturais, uma vez que, não é fácil encontrar solventes orgânicos, por isso, que a

maioria deles são eletrofiados com mistura de outros polímeros sintéticos biocompatível (LU *et al.*, 2006).

Também, muitos possuem solubilidade limitada (quitosana, celulose etc.), não são solúveis em água e são difíceis de se dissolver na maioria dos solventes orgânicos (SHEN; HSIEH, 2014). Mesmo assim, é preciso investigar o uso de polímeros naturais em arcabouços eletrofiados, pois possuem propriedades interessantes para a área biomédicas, tais como: bioativas, anestésicos, antibactericida, antiviral, antiinflamatório etc. Por isso, muitas pesquisas utilizam diferentes solventes, às vezes tóxicos, no preparo da solução para eletrofiação. Isto pode dificultar o controle de alguns parâmetros durante o processo de eletrofiação, ou até prejudicar o meio ambiente e o ser humano.

Então, muitas pesquisas procuram solucionar este problema misturando diferentes polímeros sintéticos com naturais, porém, é preciso encontrar solventes comuns e não tóxico.

Arcabouço de nanofibras de PVA / quitosana (CS) / ácido ascórbico (ASC) mostraram-se fundidas em algumas concentrações, talvez pela utilização de diferentes solventes água (PVA), ácido acético (CS) e etanol, propileno glicol e água destilada (ASC) (NAJAFI-TAHER *et al.*, 2015).

Também foi estudado arcabouço de matriz de PVA / quitosana (CS) misturados mecanicamente em diferentes proporções de hidroxiapatita carbonatada (CHAp) com intensão de mimetizar a matriz extracelular do tecido ósseo. Neste processo foram utilizados somente dois tipos de solventes diferentes, água (PVA) e ácido acético (CS), mesmo assim, obtiveram aglomeração de partículas em algumas concentrações de CHAp. (JANUARIYASA; ANA; YUSUF, 2020).

Já para melhorar resistência mecânica, fibras de PVA / própolis foram reticuladas com glutaraldeído (GTA), acetona e ácido clorídrico (HCl). Este processo reduziu a porosidade e a razão da área de superfície e volume, consequentemente, estas características diminuem a ligação das células, que é crucial para aplicações biomédicas (BILGINER; ARSLAN YILDIZ, 2020).

Arcabouços de nanofibras eletrofiadas de poli(álcool vinílico) com diferentes concentrações de HAp dopada com Ag foram estudadas para aumentar a atividade antibacteriana (ANJANEYULU *et al.*, 2017). Em outro trabalho para melhorar a biodegradação foram acrescentados biocompósito de HAp e fosfato tricálcico (β -TCP)

incorporadas na matriz de poli(álcool vinílico) / poli(vinil pirrolidona) – PVA / PVP (UMA MAHESHWARI *et al.*, 2017).

Uma grande variedade de polímero tem sido investigada para produzir arcabouços eletrofiados com alta porosidade e área superficial. No entanto, apenas polímeros viscoelástico passíveis de sofrerem grandes deformações podem ser transformados em nanofibras por meio do estiramento (HUANG *et al.*, 2003). Também, várias composições poliméricas foram utilizadas como matrizes de suporte de células ósseas com a intenção de conseguir melhor adesão celular, crescimento e formação de minerais adequados para a regeneração do osso (PRABHAKARAN; VENUGOPAL; RAMAKRISHNA, 2009).

Apesar de muitos polímeros terem sido dissolvidos com solventes adequados para serem eletrofiados, há uma grande dificuldade de eletrofiar biopolímeros naturais, uma vez que, não é fácil encontrar solventes orgânicos, por isso, que a maioria deles são eletrofiados com mistura de outros polímeros sintéticos biocompatível (LU *et al.*, 2006).

Também, muitos possuem solubilidade limitada (quitosana, celulose etc.), não são solúveis em água e são difíceis de se dissolver na maioria dos solventes orgânicos (SHEN; HSIEH, 2014). Mesmo assim, é preciso investigar o uso de polímeros naturais em arcabouços eletrofiados, pois possuem propriedades interessantes para a área biomédicas, tais como: bioativas, anestésicos, antibactericida, antiviral, antiinflamatório etc. Por isso, muitas pesquisas utilizam diferentes solventes, às vezes tóxicos, no preparo da solução para eletrofiação. Isto pode dificultar o controle de alguns parâmetros durante o processo de eletrofiação, ou até prejudicar o meio ambiente e o ser humano.

Então, muitas pesquisas procuram solucionar este problema misturando diferentes polímeros sintéticos com naturais, porém, é preciso encontrar solventes comuns e não tóxico.

Arcabouço de nanofibras de PVA / quitosana (CS) / ácido ascórbico (ASC) mostraram-se fundidas em algumas concentrações, talvez pela utilização de diferentes solventes água (PVA), ácido acético (CS) e etanol, propileno glicol e água destilada (ASC) (NAJAFI-TAHER *et al.*, 2015).

Também foi estudado arcabouço de matriz de PVA / quitosana (CS) misturados mecanicamente em diferentes proporções de hidroxiapatita carbonatada (CHAp) com intensão de mimetizar a matriz extracelular do tecido ósseo. Neste processo foram

utilizados somente dois tipos de solventes diferentes, água (PVA) e ácido acético (CS), mesmo assim, obtiveram aglomeração de partículas em algumas concentrações de CHAp. (JANUARIYASA; ANA; YUSUF, 2020).

Já para melhorar resistência mecânica, fibras de PVA / própolis foram reticuladas com glutaraldeído (GTA), acetona e ácido clorídrico (HCl). Este processo reduziu a porosidade e a razão da área de superfície e volume, consequentemente, estas características diminuem a ligação das células, que é crucial para aplicações biomédicas (BILGINER; ARSLAN YILDIZ, 2020).

Arcabouços de nanofibras eletrofiadas de poli(álcool vinílico) com diferentes concentrações de HAp dopada com Ag foram estudadas para aumentar a atividade antibacteriana (ANJANEYULU *et al.*, 2017). Em outro trabalho para melhorar a biodegradação foram acrescentados biocompósito de HAp e fosfato tricálcico (β -TCP) incorporadas na matriz de poli(álcool vinílico) / poli(vinil pirrolidona) – PVA / PVP (UMA MAHESHWARI *et al.*, 2017).

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

- Obtenção dos pós cerâmicos.

Nesta parte, iremos dividir em Etapas o procedimento utilizado para obtenção dos pós de cerâmicos a base de fosfato de cálcio:

- **Etapa I**, será descrito a síntese dos pós precipitado por via úmida (HP);
 - **Etapa II**, será descrito a síntese dos pós da hidroxiapatita precipitada por via hidrotermal (HAH);
 - **Etapa III**, será descrito a metodologia do biocompósito da Hidroxiapatita/Alginato (HAL).
- Preparação das pastilhas compactadas dos pós HP e HAL.
 - Preparação dos arcabouços eletrofiados;
 - E posteriormente serão abordados os fundamentos teóricos das técnicas experimentais usadas para caracterização química, física e biológicas das amostras.

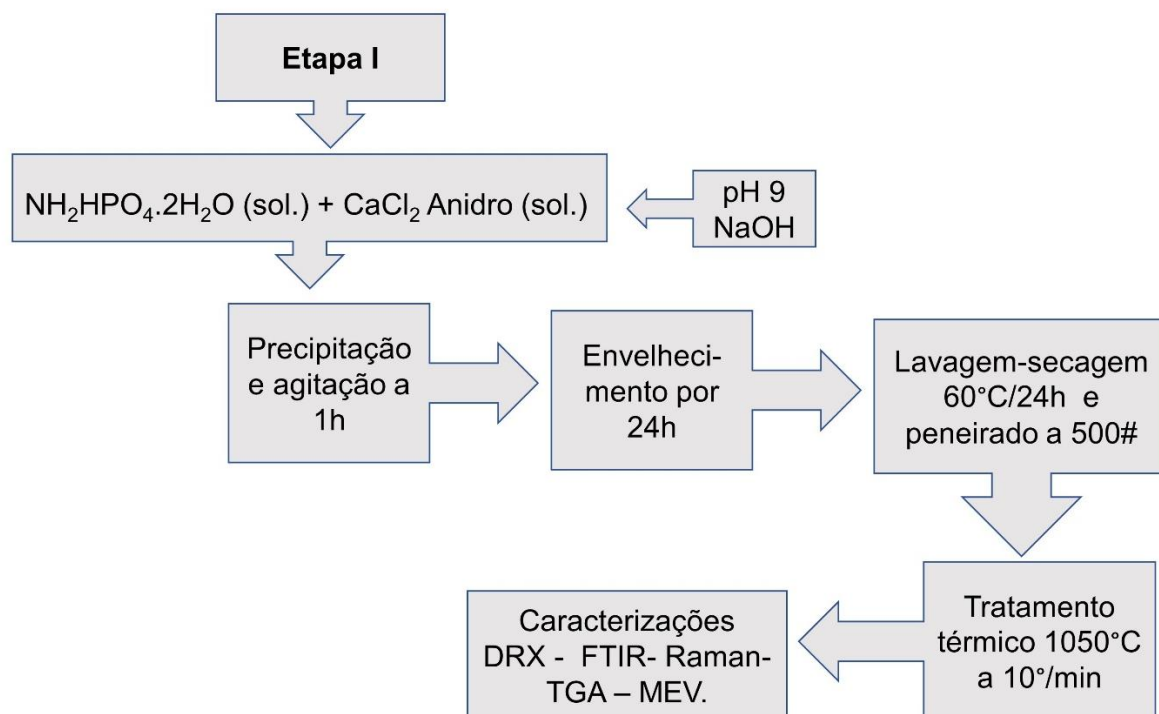
4.1 Preparação dos pós cerâmicos a base de fosfato de cálcio

Etapa I – Síntese dos pós por precipitação via úmida da hidroxiapatita (HP)

Por ser uma técnica de curto tempo, facilidade de preparo, produção de pós em grandes quantidades, baixo custo e reativo foram sintetizados pós de hidroxiapatita pelo método de precipitação em solução aquosa (HP). O precipitado foi obtido a partir da adição de 0,02 mol $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Vetec, PA), gotejando lentamente, sob a solução aquosa contendo 0,04 mol de CaCl_2 anidro (Sigma Aldrich, 99%) em agitação, sendo em seguida adicionada solução de NaOH (2 mol.L⁻¹, Vetec, PA) até o pH 9. O sistema foi mantido sob agitação constante por 1h e descansado por 24h para uma cristalização completa. Em seguida, os precipitados foram centrifugados (1792 G) e lavados várias vezes com água destilada e na última lavagem utilizou-se álcool etílico 99,5% (Vetec, PA) para remover o excesso de íons residuais. Em seguida, o precipitado foi seco a 60°C por 24h, triturado em almofariz e peneirado a 500 mesh (abertura $\leq 25 \mu\text{m}$) com intuito de desaglomerar e reduzir o tamanho de grãos, e depois para uma melhor cristalização foi calcinado a 1050°C por 2h.

O Fluxograma da Figura 9 apresenta um resumo da metodologia proposta para obtenção de pós de hidroxiapatita por precipitação por via úmida.

Figura 9 – Fluxograma da metodologia aplicada na Etapa I da amostra HP



Fonte: A autora (2020).

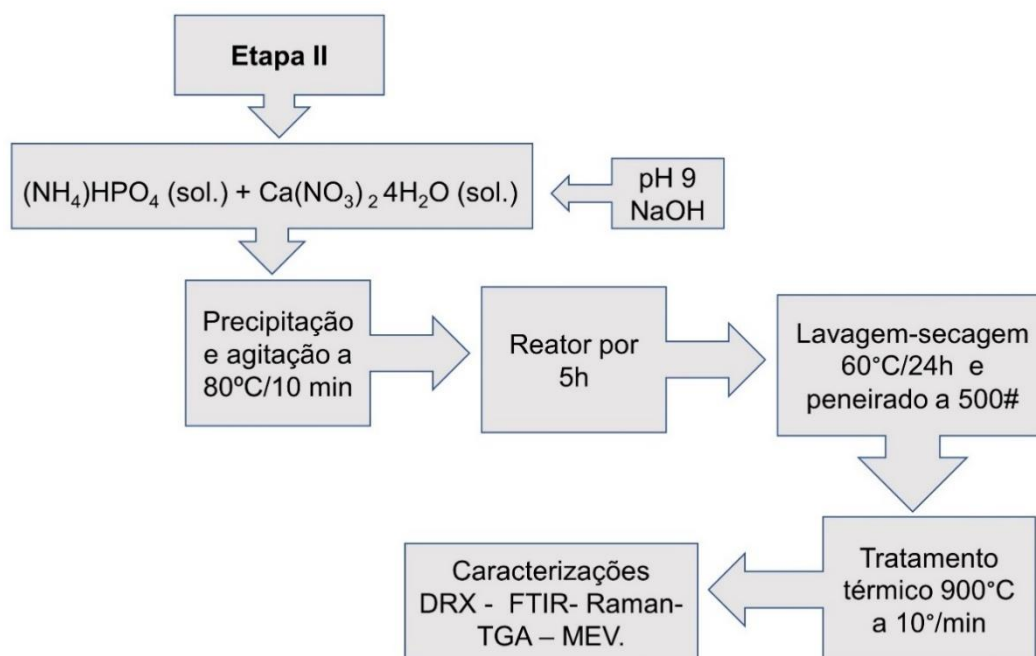
Etapa II – Preparação dos pós por via hidrotermal da hidroxiapatita (HAH)

Para esta síntese foram levados para reagir 0,025 mol de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,6 mol.L⁻¹, Vetec, PA) e 0,005 mol de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (0,3 mol.L⁻¹, Spectrum, PA) através do gotejamento lento do precursor do fostato sobre a solução de água contendo íons Ca^{2+} , sob agitação constante a 80°C, com volume reacional total = 50 mL. Após o gotejamento total, o pH da síntese (inicialmente entre 5,5 - 6,5) foi elevado para 9 utilizando-se solução de NaOH (2 mol.L⁻¹, Vetec, PA). O sistema foi deixado sob agitação por 10 min. Em seguida, uma alíquota do sistema reacional (~10 mL) foi colocada em um reator para aquecimento a 200°C (5°/min) durante 5h, sendo, posteriormente, resfriado lentamente, dentro do forno até chegar à temperatura ambiente. O precipitado obtido foi centrifugado (1792 G) e lavado várias vezes com água destilada e na última lavagem utilizou-se álcool etílico 99,5% (Vetec, PA) e, depois, seco a 60°C por 24h. Em seguida o material foi triturado manualmente e

peneirado a 500 mesh (abertura $\leq 25 \mu\text{m}$). As amostras foram tratadas termicamente a 900°C (taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$) por um tempo de patamar de 2h.

O Fluxograma da Figura 10 apresenta um resumo da metodologia proposta para obtenção de pós por via hidrotermal (HAH).

Figura 10 – Fluxograma da metodologia aplicada na Etapa II da amostra HAH



Fonte: A autora (2020).

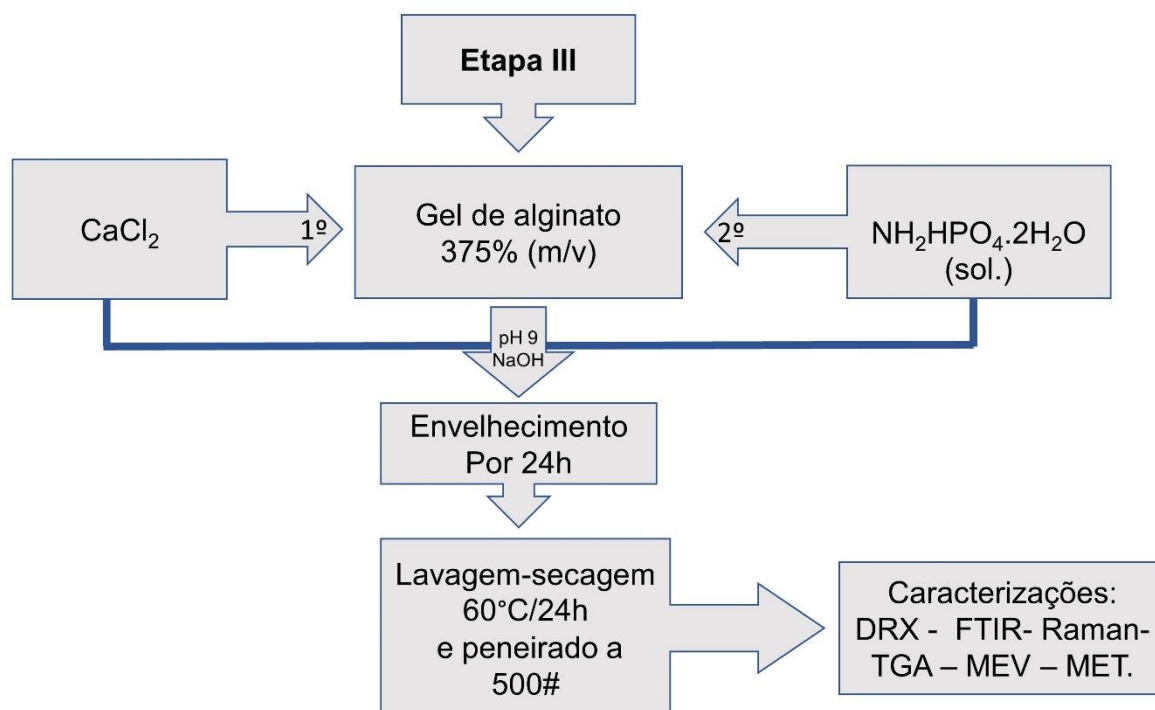
Etapa III – Preparação da amostra dos pós do biocompósito da hidroxiapatita/alginato (HAL).

A técnica escolhida para preparação da síntese do biocompósito da hidroxiapatita/ alginato (HAL) utilizou gel de alginato para sintetizar *in situ* a hidroxiapatita (HAp) para controlar o crescimento dos cristais.

Nesta técnica, uma solução homogênea de 40 mL contendo 0,15 g (0,375% m/v) de alginato de sódio (ALG) foi mantida sob agitação constante a temperatura ambiente e 0,002 mol de solução de CaCl_2 anidro foi adicionada por gotejamento lento. O sistema foi agitado continuamente por 24h; logo após, foi adicionada solução contendo 0,001 mol de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e ajustado o pH para 9 com adição de NaOH, ($2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$). Este sistema foi continuamente agitado por 5h a temperatura ambiente e deixando envelhecer em frasco fechado por 24h. Em seguida, os precipitados foram

centrifugados e lavados várias vezes com água destilada para remover o excesso de íons residuais, sendo secos a 60°C por 24h para a remoção de toda água do material. O precipitado foi, então, triturado em almofariz e peneirado a 500 mesh (< 25 µm). O Fluxograma da Figura 11 mostra o procedimento da síntese do biocompósito HAL.

Figura 11 – Fluxograma da metodologia aplicada na Etapa III da amostra HAL



Fonte: A autora (2020).

4.2 Preparação e caracterização das pastilhas compactadas

4.2.1 Preparação dos compactados

Pastilhas cilíndricas dos precipitados por via úmida da hidroxiapatita (HP) e biocompósito hidroxiapatita / alginato (HAL) foram compactadas para avaliar a porosidade e análise superficial para possíveis aplicações biomédicas em tecido ósseo que exigem elevada resistência. Nesta etapa, os pós secos (HP e HAL) foram compactados uniaxialmente (100 MPa) ~1 g de pó numa matriz de aço de 12 mm de diâmetro com auxílio de uma prensa hidráulica com capacidade de 30 ton. Os compactos foram sinterizados a 1050°C com uma taxa de aquecimento a 10°C/min

por 2h de patamar. O resfriamento ocorreu dentro do forno e em seguida foram caracterizados. Tanto os precipitados de HP e biocompósito HAL foram calcinados com os mesmos parâmetros de sinterização das pastilhas, para analisar possíveis alterações da fase cristalina e outras características. Estas duas amostras foram escolhidas por formar consideráveis quantidade de precipitados para compactação.

4.2.2 Caracterização dos pós cerâmicos e pastilhas compactadas

4.2.2.1 Difração de raio-X

As análises cristalográficas dos pós obtidos foram realizadas pelo método da Difração de Raios X, num difratômetro de Raios X, modelo XRD-7000, fabricante *Shimadzu*, utilizando-se radiação $\text{CuK}\alpha$ ($1,548\text{\AA}$), com uma tensão de 40 kV e corrente de 30 mA, utilizando-se amostras pulverizadas. Esta análise permitiu identificar as fases cristalográficas presentes no material por interpolação da base de dados utilizando-se o programa High Score Plus 3.0c. para os tamanhos médios dos cristalitos foi utilizada a Equação de Scherrer (Eq. 1):

$$tc = \frac{k \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos \theta} \quad (\text{Eq.1})$$

Sendo:

tc – tamanho médio dos cristais

k – constante de Scherrer

λ – comprimento de onda

β – largura meia altura

4.2.2.2 *Espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)*

Para as análises de espectroscopia na região de infravermelho, foi utilizado Espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR): reflectância total atenuada (ATR) e com pastilhas de KBr. Marca Perkin Elmer, Modelo Frontier ATR universal, varredura 4000 - 600 cm^{-1} e espectrofotômetro do sistema Bruker Tensor 27 com MCT e detector DTGS, com varredura na região de 4000 - 400 cm^{-1} .

4.2.2.3 *Espectroscopia Raman*

As análises da espectroscopia Raman é uma técnica fotônica que permite identificar materiais orgânicos e inorgânicos através da análise de rotações e/ou vibrações das moléculas em uma estrutura morfológica. Foram analisadas amostras em forma de pó em um equipamento Sistema Confocal Witec, com laser operando com cristal de granada de ítrio e alumínio dopado com neodímio, *yttrium aluminium garnet*, (Nd:YAG) ($\lambda = 532 \text{ nm}$) com potência variável, dependendo da intensidade do sinal da amostra.

4.2.2.4 *Análise termogravimétrica (TGA)*

O estudo calorimétrico por TGA foi utilizado para determinação da estabilidade térmica das cerâmicas. As análises foram efetuadas em uma termobalança modelo 60H da Shimadzu em atmosfera de ar sintético. As amostras foram aquecidas na faixa de 30 – 900°C com uma taxa de 10°C/min utilizando um gás nitrogênio (N_2) com arraste a um fluxo de 20 mL/minuto.

4.2.2.5 *Isoterma de adsorção e dessorção*

As isotermas de adsorção-dessorção de nitrogênio (N₂) foram coletadas em um equipamento Analisador de Área Superficial e de Poros Micromeritics ASAP 2440. Sendo que as medidas da área superficial específica dos pós das amostras foram calculadas de acordo com a teoria de Brunauer-Emmett-Teller (BET) (BRUNAUER; EMMETT; TELLER, 1938). As análises da isoterma de adsorção e dessorção foram obtidos pelo método Barret-Joyner-Halenda (BJH) (BARRETT; JOYNER; HALENDA, 1951).

4.2.2.6 *Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET)*

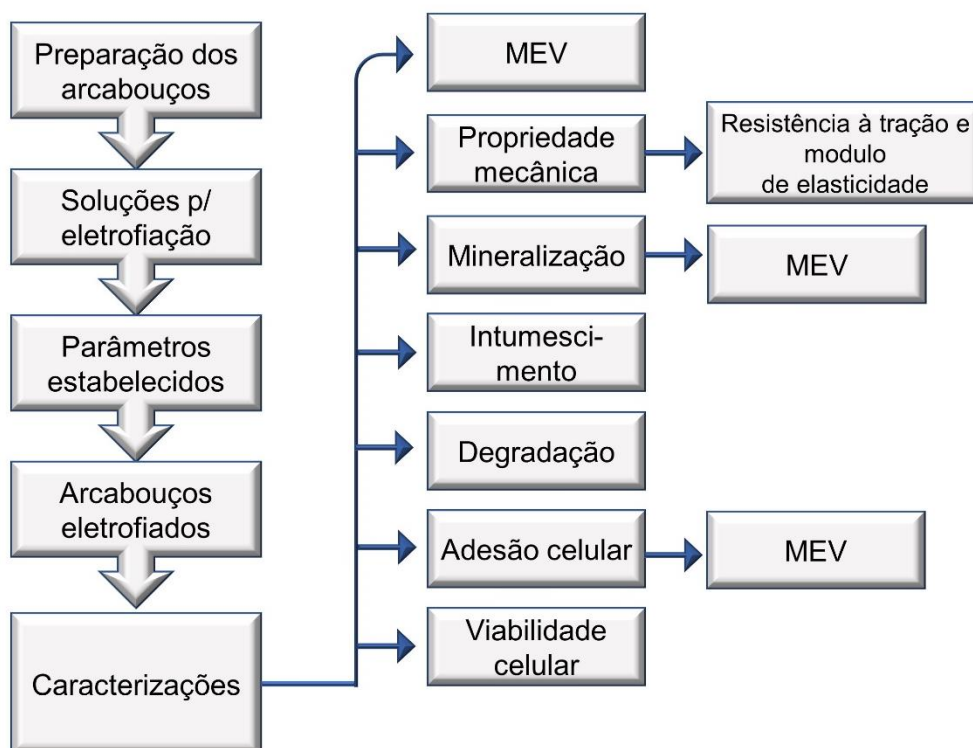
As informações morfológicas e topográficas sobre as superfícies do pós de fosfato de cálcio e dos compactados analisados foram observadas em um microscópio eletrônico de varredura, modelo QUANTA 200F, filamento FEG, fabricante: FEI, com voltagem de aceleração de 20kV. As amostras foram colocadas sobre porta amostras contendo fita de carbono condutora e cobertas com camada nanométrica de filme de ouro, usando um metalizador modular de alto vácuo. O equipamento conta com Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS).

As imagens de MET são formadas por elétrons que atravessam a amostra carregando todas as informações da área analisada. A técnica foi aplicada somente no biocompósito hidroxiapatita / alginato (HAL), onde uma pequena quantidade de pó foi dispersa no etanol e sonicada por 10 min e depositada em uma grade de cobre para investigar a interação *in situ* da hidroxiapatita no alginato. Nesta técnica as amostras foram analisadas em contrastes claros e escuros. O equipamento utilizado na microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi FEI TECNAI G² F20 HRTEM operado em 200 keV do Laboratório de Caracterização Estrutural da UFSCar do departamento de engenharia dos materiais de São Carlos.

4.3 Preparação e caracterização dos arcabouços fibrosos

A Figura 12 mostra o fluxograma dos experimentos realizados com os arcabouços fibrosos.

Figura 12 – Fluxograma da preparação e caracterizações dos arcabouços fibrosos



Fonte: A autora (2021).

4.3.1 Preparação das soluções para eletrofiação

As amostras foram preparadas com solução de poli (álcool vinílico), (PVA, 89000 – 98000 g.mol⁻¹, Sigma Aldrich) e mistura com pós cerâmicos. Na Tabela 3 estão presente o código de fibras eletrofiadas; (1) somente com PVA nas concentrações de 10% (FP-10) e 12% (FP-12); (2) Devido aos bons resultados de caracterização da hidroxiapatita sintetizada por via hidrotermal (HAH) resolvemos eletrofiar fibras de 10% de PVA com 0,1% de HAH calcinada a 900°C codificada de 10%PVA+0.1HAH; (3) diferentes concentrações de biocompósitos de hidroxiapatita/alginato (HAL) (0.1, 0.25 e 0.5%) fiadas com 10 e 12% de PVA.

Tabela 3 – Código das amostras e concentração (%m/m) dos seus constituintes

Amostras	PVA (%)	HAL (%)	HAH (%)
FP-10	10		
FP-12	12	-	-
10%PVA+0.1HAH	10	-	0.1
FH1-0.1		0.1	
FH1-0.25	10	0.25	-
FH1-0.5		0.5	
FH2-0.1		0.1	
FH2-0.25	12	0.25	-
FH2-0.5		0.5	

FP=Fibra de PVA puros; FH1=Fibra 10% PVA+HAL e FH2=Fibra 12% PVA+HAL.

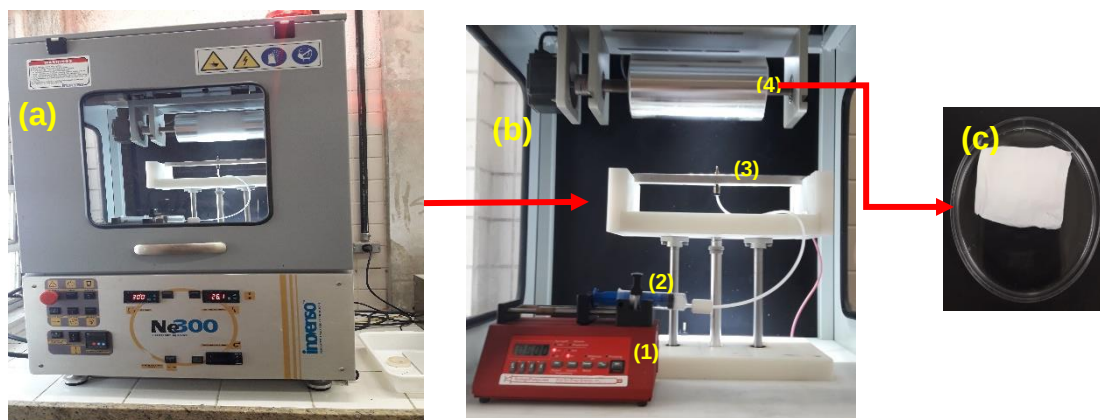
Fonte: A autora (2020).

As soluções de PVA foram preparadas por solubilização do polímero a 90°C por aproximadamente 3h com agitação, até obter uma solução totalmente transparente. Para eliminar bolhas residuais e estabilizar a viscosidade a solução foi deixada descansar ao ar livre por 24h. Em seguida, foram adicionados nas suas respectivas soluções de 10 e 12% dos pós cerâmicos (HP, HAH e HAL). A mistura e dispersão dos pós de fosfato de cálcio na solução de PVA foi realizada com auxílio de um agitador magnético por aproximadamente 5h, e em seguida colocada em um banho de ultrassom por 1h até obter uma dispersão uniforme.

4.3.2 Parâmetros para eletrofiação das soluções

O preparo das amostras da malha de nanofibra por eletrofiação foram realizadas com auxílio do equipamento Inovenso-Modelo NE-300 Electrospinning Device do Laboratório LQES do departamento DQF da UFPE (Figura 13). Nesta etapa misturas de PVA / pós biocerâmicos foram adicionados em seringa de polipropileno (20 mL) acoplada a uma bomba de infusão que regula a velocidade da solução polimérica. As fibras foram depositadas por aproximadamente 6h, no alvo, que era um cilindro coberto com folhas de alumínio.

Figura 13 – Equipamento de eletrofiação (a) Inovenso-Modelo NE-300 Electrospinning Device, (b) constituintes principais: (1) bomba de infusão, (2) seringa, (3) bico injetor, (4) cilindro coletor e (c) fibra eletrofiadas



Fonte: A autora (2020).

Os parâmetros utilizados para produção das amostras da malha nanofibrosa estão apresentadas na Tabela 4. Devido às diferentes misturas preparadas, as quais apresentaram diferentes propriedades físico-químicas (*i.e.* viscosidade, tamanho de partículas etc.) diversas tentativas foram feitas até padronizar estes parâmetros.

Tabela 4 – Parâmetros utilizados para produção das nanofibras por eletrofiação

Amostra	Taxa de fluxo (mL/h)	Tensão aplicada (kV)	Distância do bico ao coletor (cm)
FP-10	0,6	23	10
FP-12	0,8	26	8
10%PVA+0.1HAH	1,0	25	10
FH1-0.1	0,8	25	15
FH1-0.25	0,8	23	15
FH1-0.5	0,8	27	15
FH2-0.1	0,8	24	15
FH2-0.25	0,8	25	10
FH2-0.5	0,8	29	15

FP = Fibra polimérica contendo PVA; FH1 e FH2 = Fibra polimérica composta PVA+HAL.

Fonte: A autora (2020).

4.3.3 Análise morfológica dos arcabouços fibrosos

A análise morfológica das fibras foi realizada em microscópio eletrônico de varredura FEI, modelo QUANTA 200F, com filamento de FEG operado a 20kV. A membrana fibrosa revestida com uma fina camada de ouro usando um aplicador de pulverização catódica antes de serem examinadas por um microscópio eletrônico de varredura (MEV). Os tamanhos médios das fibras foram determinados pelo programa ImageJ utilizando-se mais de 100 medidas por imagem.

4.3.4 Propriedade mecânica

O ensaio mecânico, especificamente a resistência à tração, das fibras de PVA puros e PVA com biocompósitos foi determinado usando uma máquina Emic DL 3000 N à temperatura ambiente. A velocidade de tração foi de 25 mm / min e o tamanho da amostra para avaliação mecânica de tração foi 10 x 0,05 (mm²) (largura x espessura). Os dados da força e deformação foram dados pelo Programa Tesc versão 3.04 durante a realização do ensaio, onde foram convertidos para determinar a curva tensão versus deformação. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão (n = 3).

4.3.5 Ensaio de Bioatividade em Simulated Body Fluid (SBF)

Os arcabouços estudados foram submetidos à imersão em Fluido Corpóreo Simulado (*Simulated Body Fluid* – SBF) durante sete dias para verificar por MEV a ocorrência ou não da precipitação de *apatita* na superfície dos mesmos. O SBF foi preparado de acordo com a metodologia apresentada por Kokubo e colaboradores e a sua composição iônica está descrita na Tabela 5 (KOKUBO; TAKADAMA, 2006).

Tabela 5 – Comparação da composição iônica do SBF com a do plasma sanguíneo

Composição (mMol/L)	Na ⁺	K ⁺	Ca ⁺	Mg ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ²⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₃ ²⁻	pH
SBF	142	5	2,5	2,5	147,8	4,2	1,0	0,5	7,4
Plasma sanguíneo	142	5	2,5	2,5	103	27	1,0	0,5	7,2-7,4

Fonte: (KOKUBO; TAKADAMA, 2006).

I. Preparo da solução do SBF

Foram agitados os reagentes com 700 mL de água deionizada em agitação magnético com aquecimento, mantendo a mistura a $(36,5 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Os reagentes foram adicionados e dissolvidos na ordem descrita na Tabela 6.

Tabela 6 – Reagentes utilizados na preparação da solução SBF

Ordem	Reagentes	Quantidades (g)
1	NaCl	8,035
2	NaHCO ₃	0,355
3	KCl	0,225
4	K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O	0,231
5	MgCl ₂ .6H ₂ O	0,311
6	1M HCl	39 mL
7	CaCl ₂	0,292
8	Na ₂ SO ₄	0,072
9	TRIS	6,118
10	1M HCl	0-5 mL

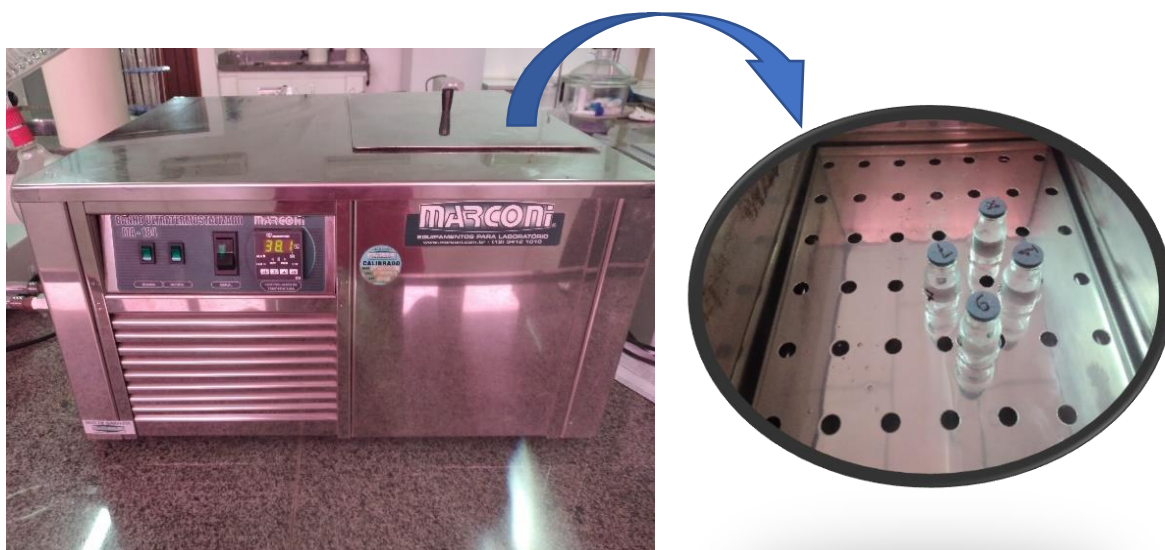
Fonte: (KOKUBO; TAKADAMA, 2006)

Em seguida a solução SBF foi mantida a temperatura $(36,5 \pm 1) ^\circ\text{C}$ e ajustado o pH 7,4 com uma solução de 2 M de HCl. Posteriormente foi transferida para um balão volumétrico de 1L e completados com água deionizada, e reservada na geladeira.

II. Ensaio de mineralização dos arcabouços

Os arcabouços de nanofibras e das pastilhas compactadas foram cortados no tamanho aproximadamente de $(1 \times 1) \text{ cm}^2$ e colocadas por imersão em vidros com 10 mL de solução do SBF durante sete dias com troca a cada 24h a $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ para repor os íons de cálcio e fósforo em um Equipamento Banho Ultratermostatizado MA 184 Marconi da UFMA, Figura 14, onde posteriormente seca por 24h no dessecador para serem analisadas por MEV.

Figura 14 – Equipamento utilizado no ensaio SBF para manter as amostras a 37°C



Fonte: A autora (2020).

4.3.6 Ensaio de intumescimento e degradação dos arcabouços por imersão no PBS

A taxa de intumescimento e degradação (perda de massa) foi realizada em solução salina tamponada com fosfato (PBS) preparada com 8,06 g/L de NaCl, 0,22 g/L de KCl, 1,15 g/L de Na_2HPO_4 e 0,20 g/L de K_2HPO_4 ajustado o pH 7,4 com Na(OH) e mantido sob refrigeração ($4\text{-}10^\circ\text{C}$). Após o preparo da solução PBS, foram cortadas amostras dos arcabouços nanofibrosos de tamanho $(2 \times 2) \text{ cm}^2$, secas na estufa a 40°C por 3 h e em seguida pesadas (M_i). Após esse processo as amostras resultantes foram colocadas em frascos de vidros vedados contendo 10 ml de solução PBS, pH 7,4, incubada em um Banho Ultratermostatizado, por períodos específicos (até 4 semanas) a $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Durante todo tempo de ensaio, a solução tampão PBS não foi substituída. No final de cada período (semana), para o ensaio de intumescimento

(inchaço), o arcabouço foi removido e passado em papel absorventes para retirar o excesso de solução PBS e, posteriormente pesadas para obter a massa úmida (M_u). Então, taxa de intumescimento de massa dos arcabouços foi calculada pela Equação (2). Já para dados da degradação, estes foram deixados no dessecador por 48 horas para secagem e em seguida pesado para obter a massa seca após a degradação (M_d). Através da Equação 3 foi calculada a degradação. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$).

$$\text{Intumescimento (\%)} = \frac{(M_u - M_d)}{M_d} \times 100 \quad \text{Eq. 2}$$

$$\text{Degradação (\%)} = \frac{(M_i - M_d)}{M_i} \times 100 \quad \text{Eq. 3}$$

Onde:

M_i – massa inicial antes do ensaio;

M_u – massa encharcada por PBS;

M_d – massa seca degradada após períodos específicos.

4.3.7 Cultura de células *in vitro*

Para o ensaio biológico foram utilizados três linhagem de células. Para os ensaios de adesão e viabilidade celular, realizado no Laboratório de Nanorradiofarmácia e Síntese de Novos Radiofármacos (UERJ), foi utilizada linhagem de células celular de fibroblasto gengival humano (FGH) obtida do Cell Bank of Rio de Janeiro, Brasil (0190). O meio de cultura da FGH, foram rotineiramente mantidas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) / F12 suplementado com 10% de FBS (Soro Fetal Bovino), NaHCO_3 (3,7 g/L), HEPES (5,2 g/L), penicilina (0,5 U/mL) e estreptomicina (0,5 mg/mL), respectivamente. As células foram incubadas a 37 °C em uma atmosfera umidificada de 5% de CO_2 . As células foram cultivadas até a confluência em frascos de cultura de 75 cm^2 e foram destacadas por breve tratamento com tripsina (0,1%) / *ethylenediamine tetraacetic acid* - EDTA (0,01%).

Também foi realizado mais duas linhagens de células para avaliar a viabilidade celular. Neste ensaio, realizado no Laboratório de Biotecnologia e Farmacêutica

(UFPE), foram utilizadas células J774.A1 (macrófagos) e MDA-MB-231 (adenocarcinoma humano da glândula mamária). O meio de cultura das células J774.A1 foram cultivadas em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino (10%) e penicilina-estreptomicina (1%) a 37 °C e 5% de CO₂. Enquanto que, a cultura MDA-MB-231 foi mantida em meio de cultura L-15 de Leibovitz e F-12 (proporção de 50% de cada meio) com L-glutamina 2 mM, sem bicarbonato de sódio e 10% de FBS com ausência de CO₂. As células foram contabilizadas em câmara de Newbauer para o teste de viabilidade celular.

4.3.8 Análise da morfologia celular

Para a análise da morfologia celular iniciou-se com as nanofibras esterilizadas, nos quais foram lavados três vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e transferidos para placas de cultura de 24 poços individuais. A célula fibroblasto gengival humano (FGH) com confluência de $1,5 \times 10^4$ foram semeados nas membranas por 24h a 37 °C em atmosfera umidificada a 5% de CO₂. Após 48h de cultura, as construções celulares foram colhidas, lavadas duas vezes com PBS para remover células não aderentes e subsequentemente fixadas com glutaraldeído a 3,0% a 4 °C por 4h. Em seguida, as amostras foram desidratadas com uma série de soluções graduadas de etanol. As amostras foram secas (ao ar) e assentadas em tiras de carbono e analisadas na potência de 5 KeV, a fim de manter a integridade das estruturas, uma vez que não foi realizada metalização. As imagens MEV foram processadas em um microscópio Hitachi 3000 TM.

4.3.9 Viabilidade celular nas nanofibras e biocompósito HAL

A viabilidade celular foi realizada por três tipos de células, fibroblasto gengival humano (FGH), J774.A1 (macrófagos) e MDA-MB-231 (adenocarcinoma humano da glândula mamária) como mencionado nas Seções 4.3.8 e 4.3.9. Esta análise foi avaliada pela técnica MTT, através da atividade mitocondrial das células viáveis pelo método de redução do brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-yl)2,5-difeniltetrazólio (MTT) em Formazan. Cada concentração foi testada em três (J774 A1 e MDS) e quatro (FGH) poços e os dados foram apresentados como Média $\pm$ Desvio padrão.

4.3.9.1 Viabilidade celular com linhagem de células FGH

Para as células fibroblastos (FGH), foram analisadas amostras pulverizadas dos biocompósito HAL e HAH testados nas concentrações 25, 50 e 100 µg/mL. Além destas também foram estudados os arcabouços fibrosos FH1 (10% PVA) e FH2 (12% PVA) incorporados com 0.1 e 0.5% de HAL, e arcabouço 10% PVA + 0.1HAH. As células foram inoculadas em placas de 96 poços por 24 h: FGH a 5×10^3 células/poço. Em seguida, as amostras foram adicionadas e submetidas a incubação por 24 h. Após o período de tratamento, as células foram incubadas com 1mg/ml MTT (3-(4,5dimetiltiazol-2-yl)-2,5difênil tetrazólio brometo) por 2 horas em atmosfera úmida a 37°C com 5% CO₂. Após a incubação, o sobrenadante foi removido e os poços incubados com 100µl de isopropanol absoluto para a lise das células e a solubilização dos cristais de MTT. As amostras em pó (HAH e HAL) foram analisadas em três concentrações, 25, 50, 100 µg/mL. A absorbância dos extratos das amostras testadas foi lida a 595nm no espectrofotômetro (Multiskan Spectrum/Thermo Scientific). A quantificação das células viáveis foi feita com base em uma curva padrão obtida com as células FGH, denominada de controle, e que receberam o mesmo tratamento com MTT como descrito acima.

4.3.9.2 Viabilidade celular com linhagem de células J774 e MDA

Células J774 (1×10^5 células/mL) e MDA (1×10^4 células/mL) foram inoculadas em placas de 96 poços. Após 24h de incubação, as amostras foram adicionadas durante 24 horas, nas concentrações indicadas de 12.5, 25, 50, 100 e 200 µg/mL. Ambas foram solubilizadas em solução salina (PBS). Após o período de tratamento, 20 µL de solução de MTT (4mg/mL) foi adicionado em cada poço, e as placas foram incubadas durante 2h30'. Após a incubação, o sobrenadante foi removido e adicionados 100 µL de DMSO (Dimetilsulfóxido). A leitura da absorbância foi realizada em Leitor de Microplaca (BioteK Elx808) 630 nm. A citotoxicidade foi expressa em viabilidade celular, dada pela Equação 4:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{A_{bs} \text{ da população celular tratada} \times 100}{A_{bs} \text{ da população celular não tratada (controle)}} \quad (\text{Eq.4})$$

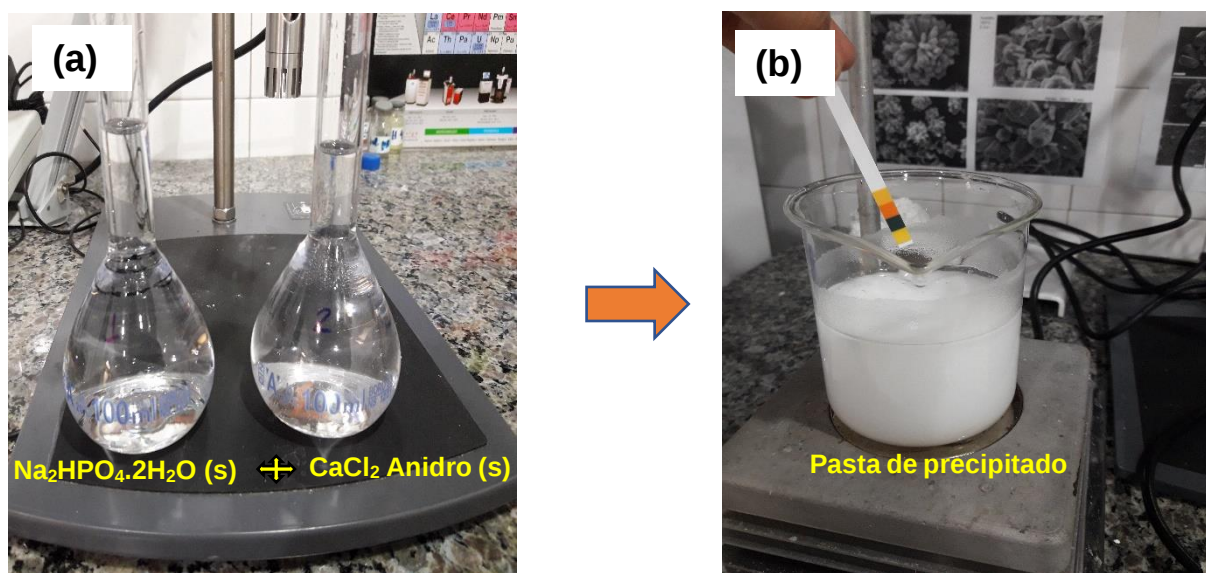
5 RESULTADO E DISCUSSÃO

Como descrito anteriormente, com a intenção de sintetizar somente uma única fase de fosfato de cálcio, no caso, hidroxiapatita (HAp) e tornar o tamanho dos cristais nanométricos foram escolhidas três rotas de síntese.

5.1 Caracterização dos fosfatos de cálcio sintetizados por via úmida (HP) e hidrotermal (HAH)

O processo de formação dos pós fosfato de cálcio é resultante da mistura dos reagentes e controle do pH, no qual obteve-se uma pasta de coloração branca para a síntese HP (Figura 15).

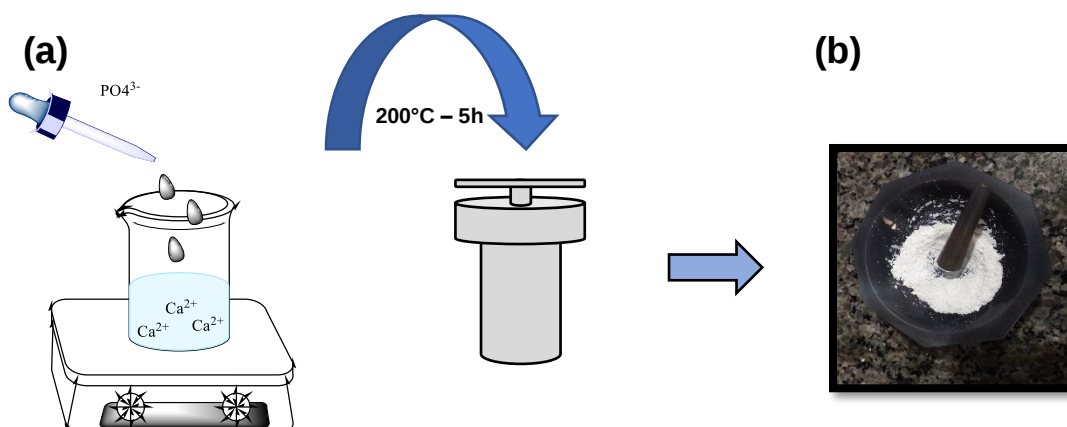
Figura 15 – Imagens das (a) soluções precursoras e (b) pasta de precipitados



Fonte: A autora (2020).

Já para o processo de síntese da hidroxiapatita por via hidrotermal (HAH), precisou de reator e mais tempo de síntese, esquematizado na Figura 16.

Figura 16 – Esquema da síntese HAH (a) pelo método hidrotermal (b) precipitado seco a 60°C



Fonte: A autora (2020).

Foi possível observar na rota por via hidrotermal uma maior aglomeração das partículas provavelmente ao menor tamanho de partículas dos precipitados.

5.1.1 Difração de raio-X

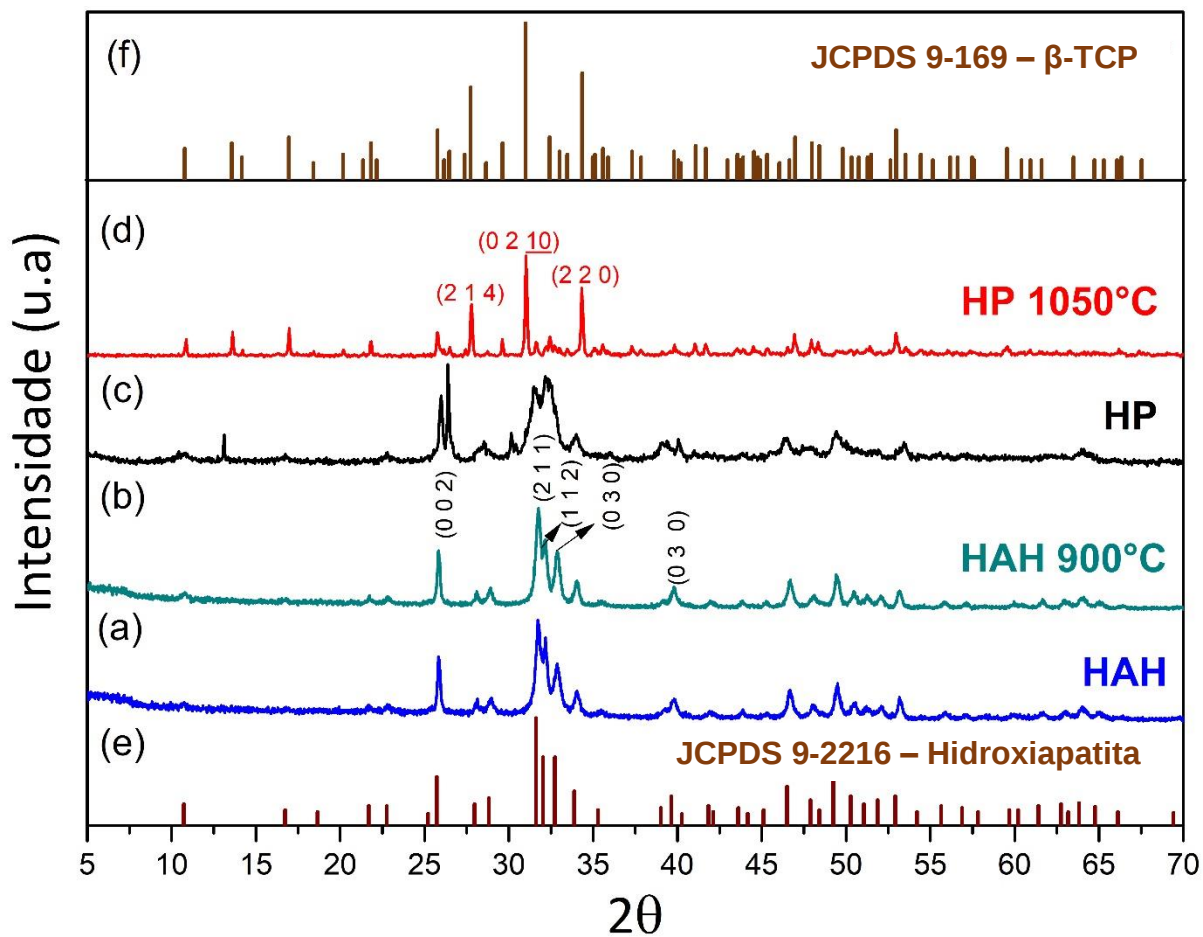
A intenção desde trabalho é sintetizar pós de hidroxiapatita, por isso achamos melhor não realizar a calcinação em maiores temperatura ($<1000^\circ\text{C}$) a amostra HAH para não transformar em outra fase de fosfato de cálcio. Então, a Figura 17 mostra os difratogramas dos pós biocerâmicos trabalhados nesta pesquisa, tanto os pós sintetizados por via hidrotermal (HAH), quanto os obtidos por precipitação via úmida (HP), antes e após o tratamento térmico. Foi adicionado, para efeito de comparação, o padrão referente à fase hidroxiapatita (ficha JCPDS 9-2216 da *Joint Committee on Powder Diffraction Standards-International Center for Diffraction*).

Ao comparar com os picos do difratograma do padrão hidroxiapatita com as amostras, observa-se que hidrotérmico (HAH), tanto recém preparado, quanto o pó calcinado a 900°C , apresentam apenas uma única fase cristalina que corresponde integralmente à fase hidroxiapatita. Observa-se que, tanto antes quanto após o tratamento térmico, os difratogramas apresentaram uma alta cristalinidade, e que a calcinação não resultou em alteração de fase, mas produziu um pequeno aumento da intensidade dos picos.

Já a análise do padrão de difração da amostra HP mostrou que o material recém preparado apresentou picos menos definidos. A análise comparativa com padrões da literatura para fosfatos de cálcio, demonstrou que os picos não coincidem com a fase hidroxiapatita. Esta amostra apresentou mistura bifásica de uma fase monetita (CaHPO_4) ($2\theta = 31,48; 32,16$ e $26,48^\circ$) e apatita não-estequiométrica ($\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$). Após o tratamento térmico a 1050°C , foi observada uma maior definição do padrão de difração e rearranjo na estrutural cristalina para as fases β -TCP ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) e hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Para o β -TCP identificando-se as reflexões dos planos $(0\ 2\ \underline{10})$ ($2\theta = 31,0^\circ$), $(2\ 2\ 0)$ ($2\theta = 34,3^\circ$) e $(2\ 1\ 4)$ ($2\theta = 27,75^\circ$) (JCPDS # 09-0169) (FUH *et al.*, 2017; TAS *et al.*, 1997). Este resultado também foi confirmado pelo refinamento Rietveld, como mostra os resultados dos parâmetros de rede, volume da célula unitária apresentados na Tabela 7. Isto pode ter ocorrido devido à falta de controle de parâmetros, tais como: reação do pH, estequiometria, temperatura e até mesmo o nível de pureza dos reagentes (DESCAMPS; HORNEZ; LERICHE, 2007; DESTAINVILLE *et al.*, 2003).

Na verdade, a influência da estequiometria dos fosfatos de cálcio nas características dos pós, sinterização e propriedades dos materiais ainda são mal compreendidas.

Figura 17 – Padrão de difração de raio-X das amostras: HAH (a) síntese hidrotermal e (b) calcinada a 900°C; HP (c) síntese por precipitação química via úmida e (d) calcinado a 1050°C; (e) padrão de difração da HAp # JCPDS 9-2216 e (f) padrão de difração do β -TCP



Fonte: A autora (2020).

Tabela 7 – Parâmetros de rede, volume da célula unitária e parâmetros estatísticos de qualidade do refinamento de Rietveld para os cristais de β -TCP e HAp dos pós HP sintetizados a 1050 °C

Fases	Parâmetros de rede		Volume (Å) ³	Parâmetros estatísticos		
	a = b (Å)	c (Å)		χ^2	R _{wp} (%)	R _p (%)
Ca ₃ (PO ₄) ₂	10,4625	37,4603	3551,2	1,14	16,20	12,35
Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	9,4950	6,8746	536,74			
(ICSD 17082) ^a	10,4127	37,2993	3502,34	-	-	-
(ICSD 26204) ^b	9,424	6,879	529,09	-	-	-

Fonte: ^a LIU, S. *et al.*, 2020; ^b SUDARSANAN; YOUNG, 1969.

5.1.2 Espectroscopia vibracional (FTIR / Raman)

A Tabela 8 apresenta o conjunto de frequências vibracionais reportadas na literatura tanto para espectroscopia de absorção vibracional quanto para espectroscopia de espalhamento Raman das fases hidroxiapatita e β -TCP.

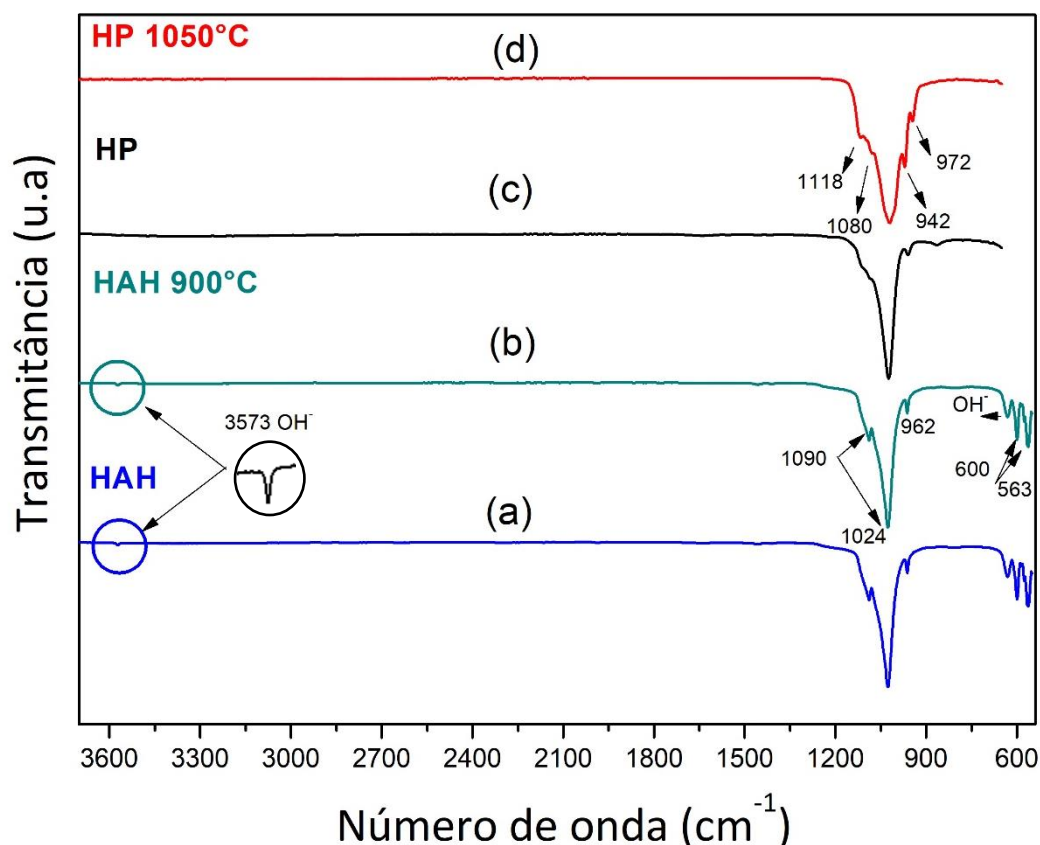
Tabela 8 – Assinalamento vibracionais do IV e Raman para a fase HAp e β -TCP.

Modo vibracional	Hidroxiapatita		β -TCP	
	IV (cm ⁻¹)	Raman (cm ⁻¹)	IV (cm ⁻¹) ^c	Raman (cm ⁻¹)
	a	b		d
ν_3 (PO ₄ ³⁻)	1090	1075	1080	1089
ν_3 (PO ₄ ³⁻)	1062	1053	1020	1047
ν_3 (PO ₄ ³⁻)	1030	1028	1115	1016
ν_1 (PO ₄ ³⁻)	962	962	972	971
ν_1 (PO ₄ ³⁻)	470	948	945	949
ν_4 (PO ₄ ³⁻)	601	608	603	612
ν_4 (PO ₄ ³⁻)	571	593	590	549
ν_4 (PO ₄ ³⁻)	565	580	-	-
ν_2 (PO ₄ ³⁻)	-	447	-	442
ν_2 (PO ₄ ³⁻)	-	432	-	407
ν_s (OH)	3573	3573*	-	-
ν_L (OH)	631	655*	-	-

Fonte: ^(a) BLAKESLEE; CONDRATE, 1971; ^(b) SILVA; SOMBRA, 2004; ^(c) MOREIRA; SADER; SOARES, 2014; ^(d) ARBEZ; LIBOUBAN, 2017).

A Figura 18 mostra os espectros vibracionais obtidos por FTIR dos pós HAH e HP. Após análise comparativa dos dados da Tabela 7 com os perfis espectrais das amostras, foi observado que todas apresentaram os sinais característicos de grupos fosfatos. As amostras HP e HP 1050 °C não apresentam as frequências vibracionais ν_{OH} , características da fase hidroxiapatita, enquanto que estes sinais foram identificados nas amostras HAH e HAH 900 °C (AISSA; AGOUGUI; DEBBABI, 2011; ESLAMI *et al.*, 2010). A maior quantidade de picos observados no espectro da amostra HP 1050 °C (ν_{PO_4} = 1118; 1080; 1022; 972 e 946 cm⁻¹) coincide com o perfil espectral mais intenso, característico do fosfato tricálcico, fase β -TCP (JILLAVENKATESA; CONDRATE, 1998) (CHEN, J. *et al.*, 2011).

Figura 18 – FTIR-KBr (a) da amostra obtida por síntese hidrotermal (HAH), (b) calcinado (HAH 900 °C), FTIR-ATR (c) da amostra sintetizada via úmida (HP) e (d) calcinado (HP 1050 °C)



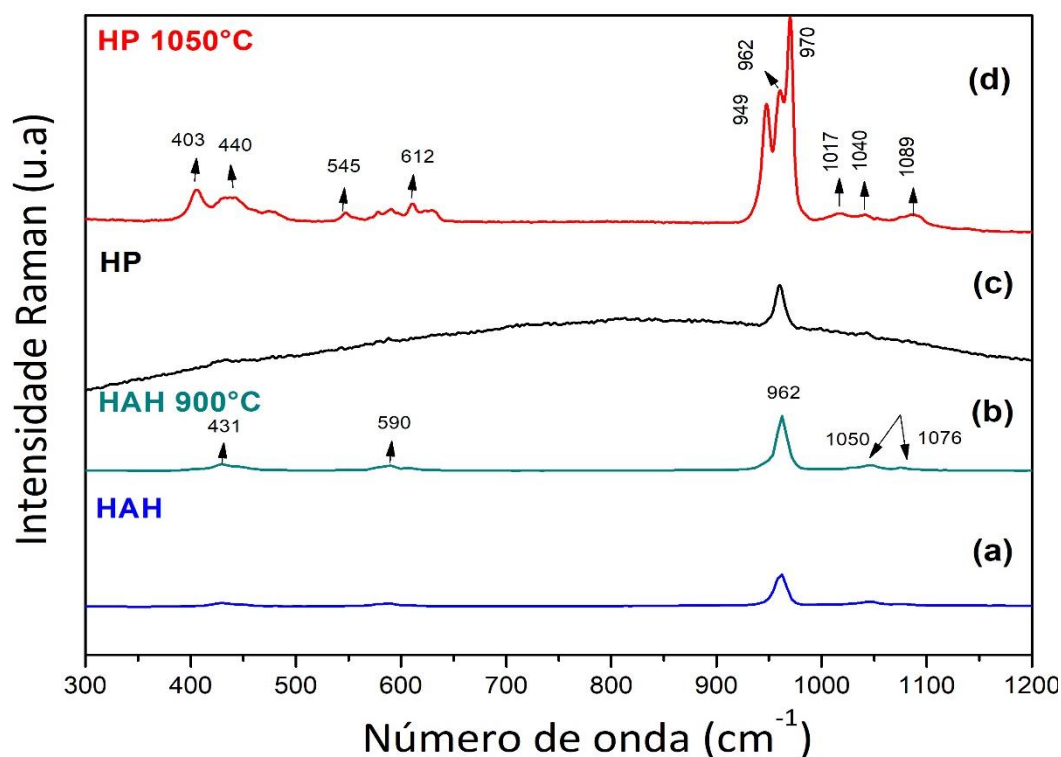
Fonte: A autora (2020).

Informações vibracionais complementares às obtidas por FTIR são mostradas na Figura 19 com a espectroscopia Raman. As amostras HP 1050 °C apresentaram espectros característicos e nítidos de hidroxiapatita onde os modos vibracionais fundamentais do grupo PO_4^{3-} , ν_1 , ν_2 , ν_3 , ν_4 , são observados (CUSCÓ *et al.*, 1998). Além disso, as mesmas apresentaram sinal intenso em torno de 962 cm^{-1} , modo vibracional do PO_4^{3-} , presente em todas as amostras, correspondente ao estiramento simétrico (ν_1) das ligações P-O. Os sinais em 400-490 cm^{-1} , 570-625 cm^{-1} são atribuídos aos estiramentos de flexão simétrico (ν_2) e assimétrico (ν_4) do modo vibracional O-P-O, respectivamente. Enquanto o sinal observado em 1020-1095 cm^{-1} refere-se ao estiramento assimétrico do modo vibracional P-O (ν_3) (CUSCÓ *et al.*, 1998; O'SHEA; BARTLETT; YOUNG, 1974).

Na mesma, Figura 19, o espectro Raman da amostra HP 1050 °C apresenta bandas com características vibracionais dos grupos tetraédricos PO_4^{3-} da molécula β -

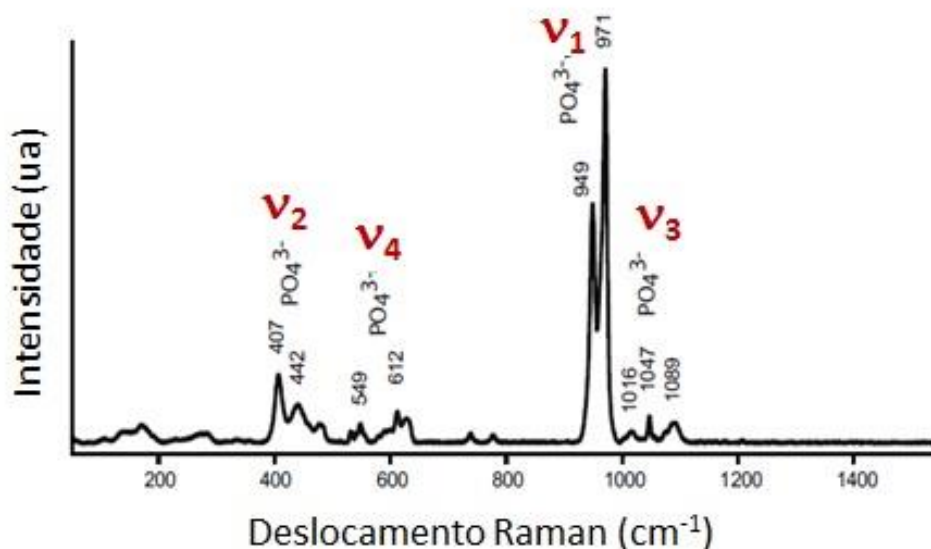
TCP (fosfato tricálcio, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). É nítida à similaridade do espectro Raman obtido para a amostra HP 1050 °C com a do espectro reportado por Arbez e Libouban (2017), apresentado na Figura 20. Isto mostra que houve mudança da estrutura do fosfato de cálcio da amostra HP para β -TCP $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ após a calcinação (MOSTAFA, 2005). O alongamento simétrico das ligações P-O do tetraedro corresponde aos picos com maior intensidade em torno de 949 e 970 cm^{-1} . O alongamento assimétrico que tem menor intensidade está localizado na faixa de 1016 a 1089 cm^{-1} . Os outros modos vibracionais, 407 e 548 cm^{-1} , correspondem às deformações de flexão do O-P-O, simétrica e assimétrica, respectivamente (ARBEZ; LIBOUBAN, 2017; JILLAVENKATESA; CONDRATE, 1998).

Figura 19 – Espectros Raman das amostras sintetizadas por via úmida e hidrotermal, (a) precipitado hidrotermal (HAH) (b) calcinado (HAH 900°C), (c) precipitado por via úmida (HP) e (d) calcinado (HP 1050°C)



Fonte: A autora (2020).

Figura 20 – Espectro Raman do b-TCP do trabalho de Arbez e Libouban 2017, com assinalamento das bandas característicos dos fosfatos (ν_{1-4})

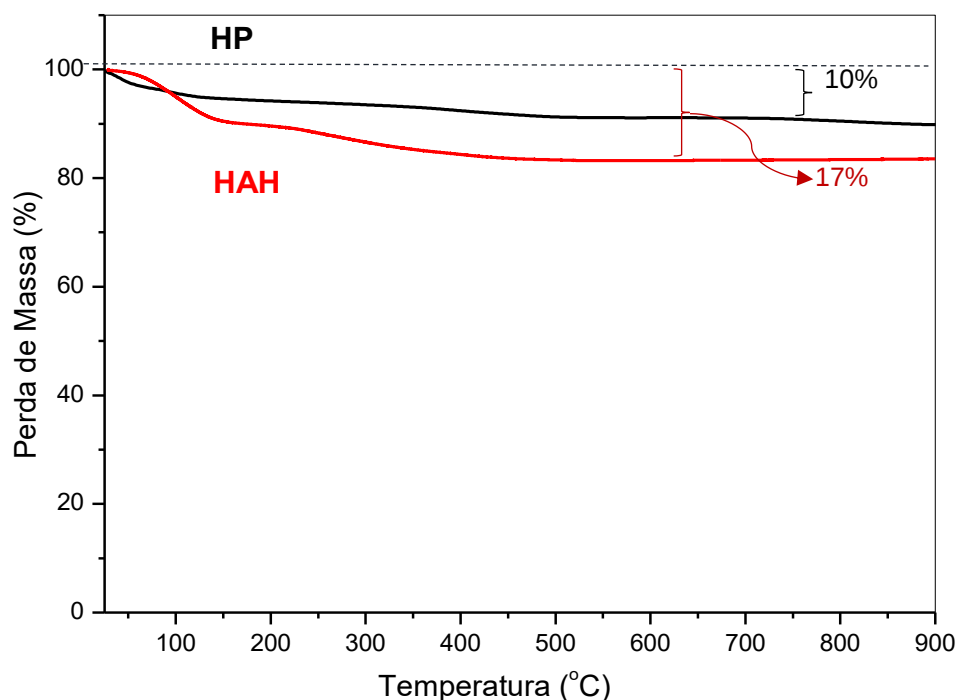


Fonte: Adaptado de (ARBEZ; LIBOUBAN, 2017).

5.1.3 Análise termogravimétrica (TGA)

A Figura 21, mostra as curvas termogravimétricas dos materiais cerâmicos trabalhados nesta pesquisa. A análise destas curvas mostra que as amostras HP e HAH sofrem perda de massa total em torno de 10% e 17%, respectivamente, entre 25 e 420 °C, sugerindo que ambos os componentes voláteis se refere à água adsorvida e absorvida ou de constituição estrutural, que é volatilizada até esta temperatura. Sugere-se que diferença dos conteúdos voláteis seja devida à nano e microestrutura diferenciada das partículas nos grãos das cerâmicas.

Figura 21 – Curvas de TGA das amostras obtidas por síntese hidrotermal (HAH) e precipitação via úmida (HP)



Fonte: A autora (2020).

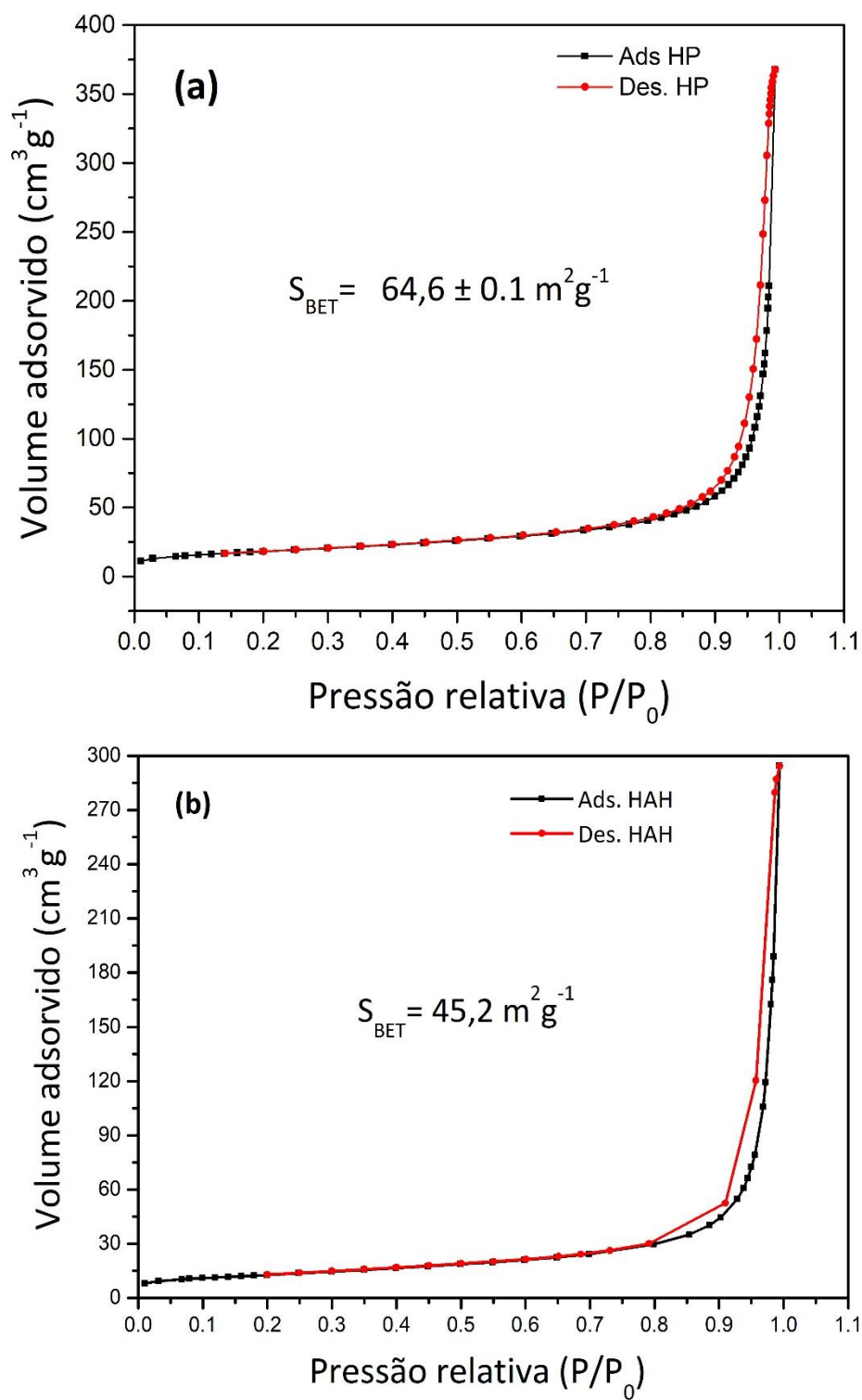
5.1.4 Curvas de adsorção e dessorção de N₂

As Figuras 22 (a) e (b) mostram as respectivas isotermas de adsorção/dessorção de N₂ das amostras sintetizadas por via úmida (HP) e hidrotermal (HAH). Ambos perfis apresentam isoterma do tipo IV, características de materiais mesoporosos ($2 < d < 50$ nm) e histerese do tipo H3 com poros em formato de cunha, cones e placas paralelas, conforme a classificação da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC). Apesar da amostra HAH ser sintetizada por via hidrotermal possuir menor tamanho de partículas, esta mostrou um menor valor da área superficial específica da amostra $45,2 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$, comparada com $62,6 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ da amostra HP. Isto pode ser explicado pelo maior número de partículas aglomeradas durante a análise. Apesar das duas amostras possuírem características de mesoporoso, a amostra HAH apresentou o fenômeno de histerese mais acentuado, o que indica possuir poros menores. Isso mostra que, neste caso, ocorre uma maior diferença entre os processos de condensação e evaporação do que quando o material

apresenta poros de tamanhos maiores (TEIXEIRA; COUTINHO; GOMES, 2001). Este resultado favorece a um maior controle para liberação de fármacos.

Neste caso, as duas amostras apresentaram porosidade e áreas superficiais específicas ideais, uma característica que pode proporcionar troca iônica e interação com proteínas e células (JANUARIYASA; ANA; YUSUF, 2020). A eficácia da osseointegração e degradação de um material em meio biológico depende das características da área superficial das partículas.

Figura 22 – Isotermas de adsorção e dessorção dos precipitados (a) via úmida HP e (b) via hidrotermal HAH

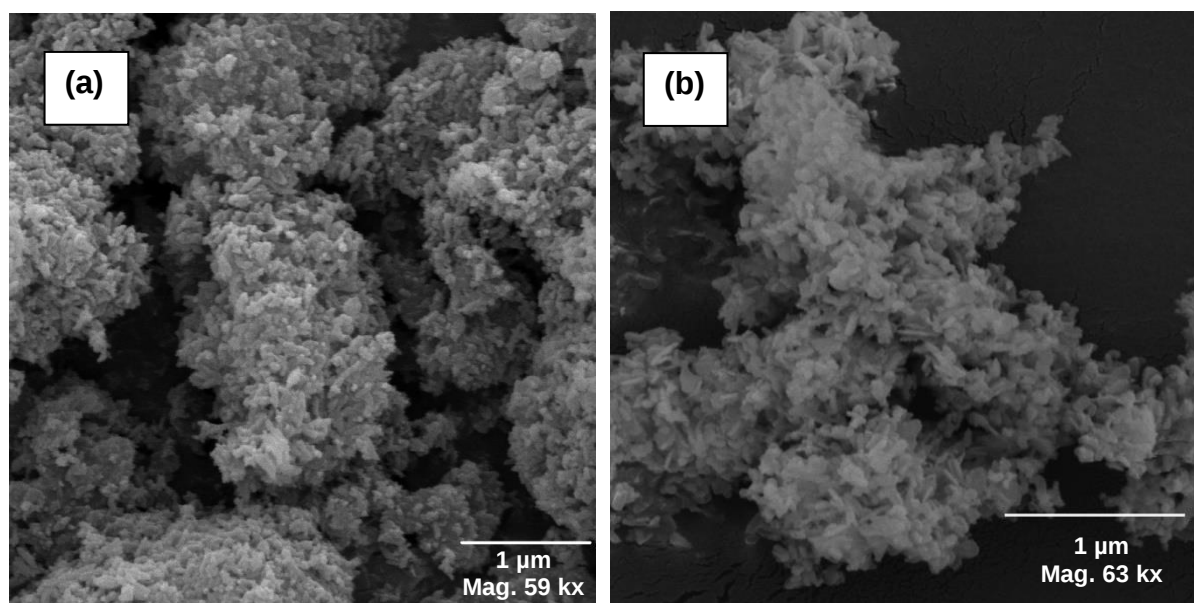


Fonte: A autora (2020).

5.1.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As Figura 23 apresentam a morfologia do pó dos precipitados sintetizados por via úmida-HP (a) e hidrotermal-HAH (b) observada através de MEV. Na imagem da Figura 23 (a) foi observado várias partículas aglomeradas, sendo assim, foi impossível visualizar o tamanho e forma geométrica das partículas por ImageJ e MEV, respectivamente. Enquanto a imagem da Figura 23 (b), mesmo observando aglomeração de partículas, foi possível visualizar partículas com formato de placas finas e tamanhos entre 80 e 170 nm de comprimento e espessuras, respectivamente, definíveis com auxílio do programa ImageJ. Pela literatura, este tamanho de partículas da HAH torna possível sua dispersão homogênea dentro da matriz polimérica e sua eletrofiação.

Figura 23 – Micrografias dos precipitados (a) HP e (b) HAH



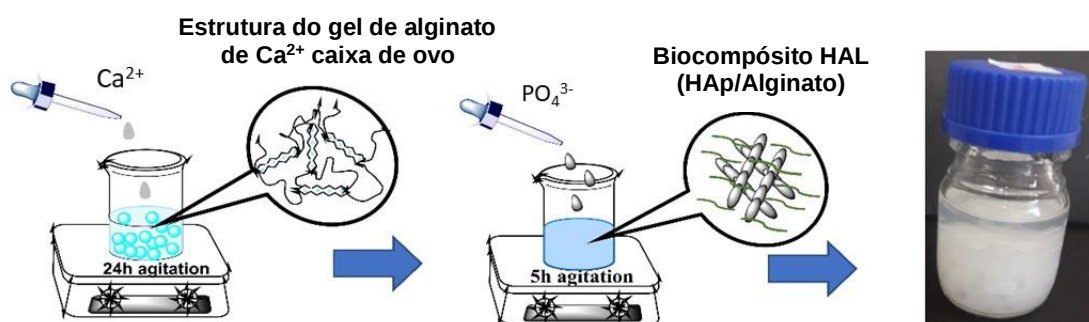
Fonte: A autora (2020).

5.2 Caracterização do biocompósito hidroxiapatita / alginato (HAL)

A Figura 24 mostra o esquema da síntese *in situ* da hidroxiapatita no gel de alginato (HAL). Primeiramente foi possível observar com a adição da solução contendo íons de Ca^{2+} no gel de alginato se transformar em um hidrogel mais

estruturado denominado pela literatura de “caixa de ovo”, já mencionado anteriormente na Seção 3.3.3. Depois, com a adição da solução contendo íons de PO_4^{3-} foi observado uma mudança na coloração translúcida para esbranquiçada, um indicativo da cristalização dos fosfatos de cálcio.

Figura 24 – Esquema da síntese *in situ* da hidroxiapatita no gel de alginato (HAL)

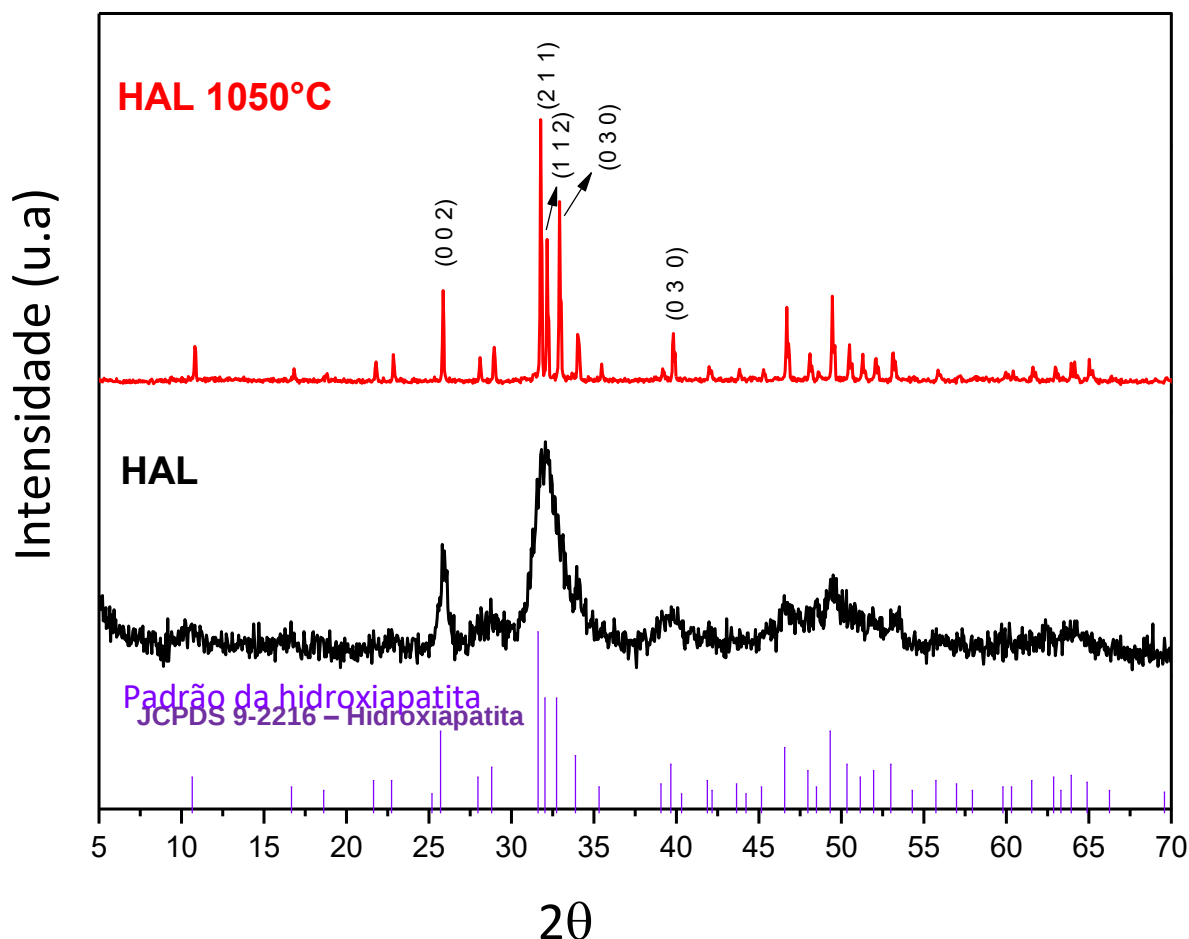


Fonte: A autora (2020).

5.2.1 Difração de raio-X

O padrão de difração do biocompósito HAL, Figura 25, recém preparado e seco, apresentou picos alargados, indicando baixa cristalinidade (provavelmente pela presença do polímero alginato), porém o padrão dos picos da hidroxiapatita pode ser correlacionado ao perfil observado da amostra. Sugere-se que isto se deve à nucleação *in situ* que induz à formação de cristais nanométricos da fase hidroxiapatita. De fato, ao se estimar o tamanho dos cristais nesta fase através da Equação (1) obtém-se valores ~ 17 nm. Após a calcinação do biocompósito (1050°C), o tamanho médio de cristal foi 56 nm, calculado pela Eq. Scherrer (Eq.1). Pelo perfil de difração, após a calcinação, é observado alta cristalinidade (picos finos, sem alargamento da linha de base) e a fase predominante é hidroxiapatita. Para temperatura acima de 700°C o alginato, como mostra a análise termogravimétrica (Figura 29), já se decompõe totalmente sendo liberado como material volátil (ex. CO_2 e H_2O), restando apenas material inorgânico.

Figura 25 – Difratoograma do (a) precipitado do biocompósito HAL e (b) calcinado a 1050°C

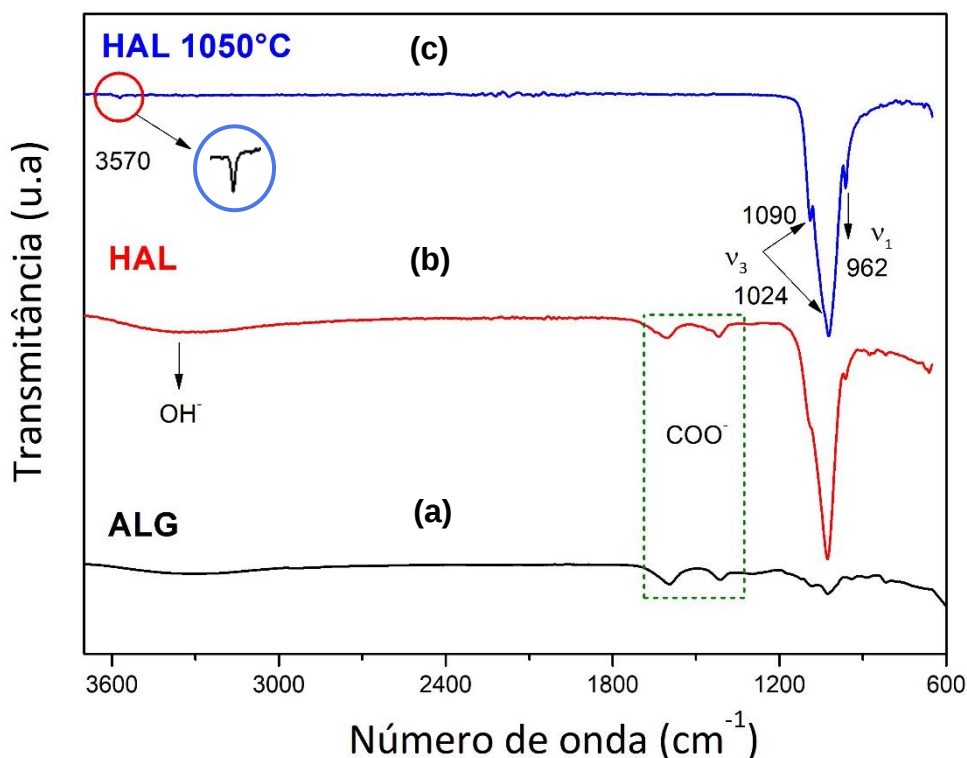


Fonte: A autora (2020).

5.2.2 Caracterização vibracional (FTIR-ATR / Raman)

A Figura 26 mostra os espectros de reflectância vibracional do biocompósito HAL antes e após sua calcinação. As bandas 1090 e 962 cm^{-1} estão presentes na amostra e observa-se uma excelente concordância com os dados da Tabela 8 caracterizando as frequências dos grupos fosfato. Observam-se também os modos vibracionais (COO^-) em 1614 e 1416 cm^{-1} dos grupos carboxilatos presentes na estrutura molecular do alginato (Figura 4), bem como a banda larga do OH^- também presente em sua estrutura ($\nu\text{OH} \sim 3350 \text{ cm}^{-1}$). A Figura 26 apresenta o padrão característico do polímero alginato de sódio utilizado neste estudo, demonstrando as bandas características observadas também no espectro do biocompósito HAL.

Figura 26 – Espectro de reflectância vibracional do (a) alginato de sódio, (b) precipitado do biocompósito HAL e (c) HAL calcinado a 1050 °C

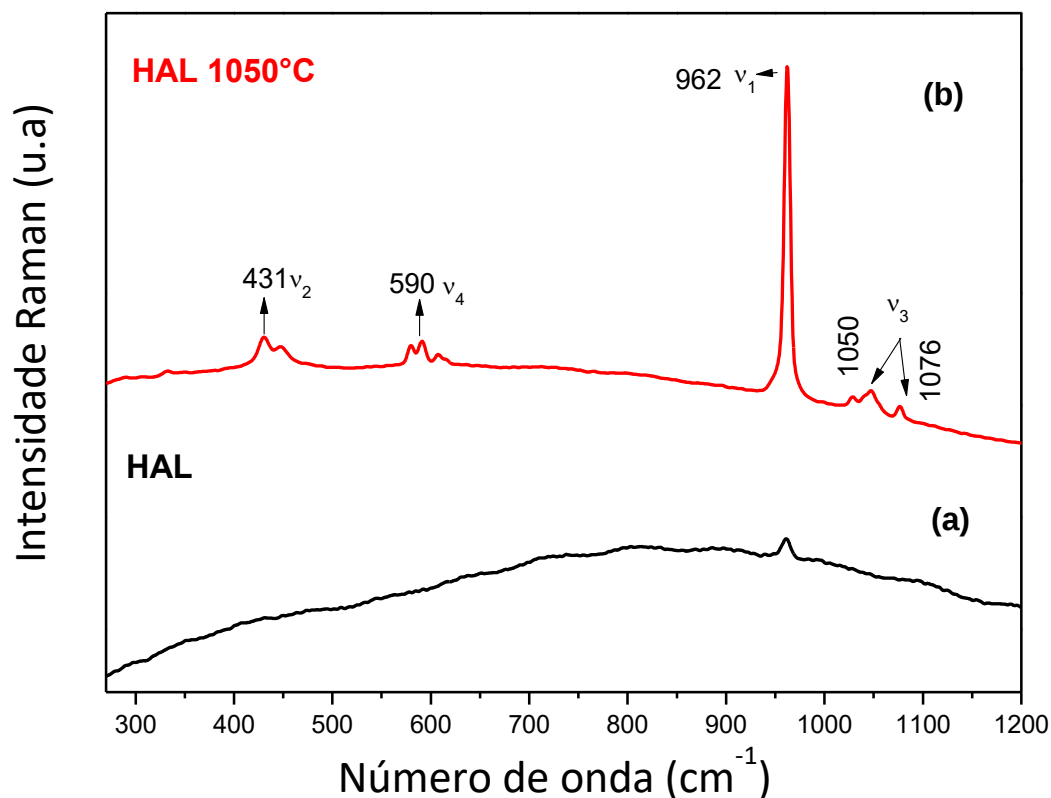


Fonte: A autora (2020).

Após a calcinação, observa-se que as bandas relacionadas aos grupos funcionais do alginato desaparecem, como previsto, restando apenas as bandas dos grupos fosfato e o grupo OH^- da hidroxiapatita. Então já se sabe que, para fabricação de arcabouços prensados e sinterizados, o uso do alginato é útil apenas para o controle do tamanho dos cristais durante a síntese *in situ* da hidroxiapatita.

A análise vibracional Raman, Figura 27, demonstra a presença dos grupos fosfatos nas posições espectrais descritas na Tabela 8 para a fase hidroxiapatita, do biocompósito e calcinados a 1050 °C. A amostra HAL, recém preparada e seca apresentou espalhamento característico do polímero alginato que levanta a linha de base e reduz todos os picos presentes, dificultando a definição espectral. Tal dificuldade já foi relatada anteriormente (PEREIRA, 2018), mas mesmo assim, pode-se reconhecer a presença de banda de espalhamento Raman na região de fosfato do modo vibracional ν_1 (964 cm^{-1}).

Figura 27 – Espectro Raman das amostras (a) HAL e (b) calcinado a 1050 °C



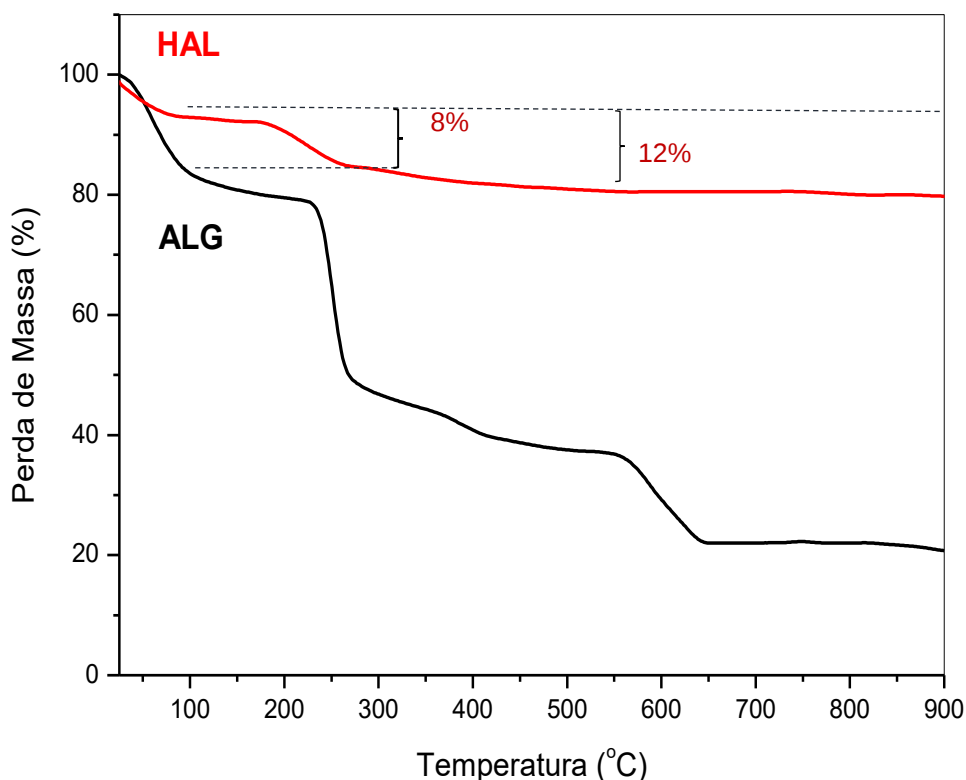
Fonte: A autora (2020).

5.2.3 Análise termogravimétrica (TGA)

Observa-se através da análise do perfil de perda de massa apresentado na Figura 28, que o biocompósito HAL possui uma massa inorgânica equivalente a 80% referente à fase hidroxiapatita. As perdas de massa ~8% e ~12% referem-se ao conteúdo de água adsorvida e ao material orgânico, respectivamente.

A curva termogravimétrica referente à perda de massa do Alginato de sódio mostrou três eventos distintos. As maiores perdas de massa ocorreram entre 150-270 °C (de 30%) e 550-650 °C (de 13,7%), as quais indicam decomposição da cadeia polimérica do alginato (PARHI; RAMANAN; RAY, 2006).

Figura 28 – Curva da análise termogravimétrica (TGA) do biocompósito HAL (vermelho) e alginato, ALG (preto)

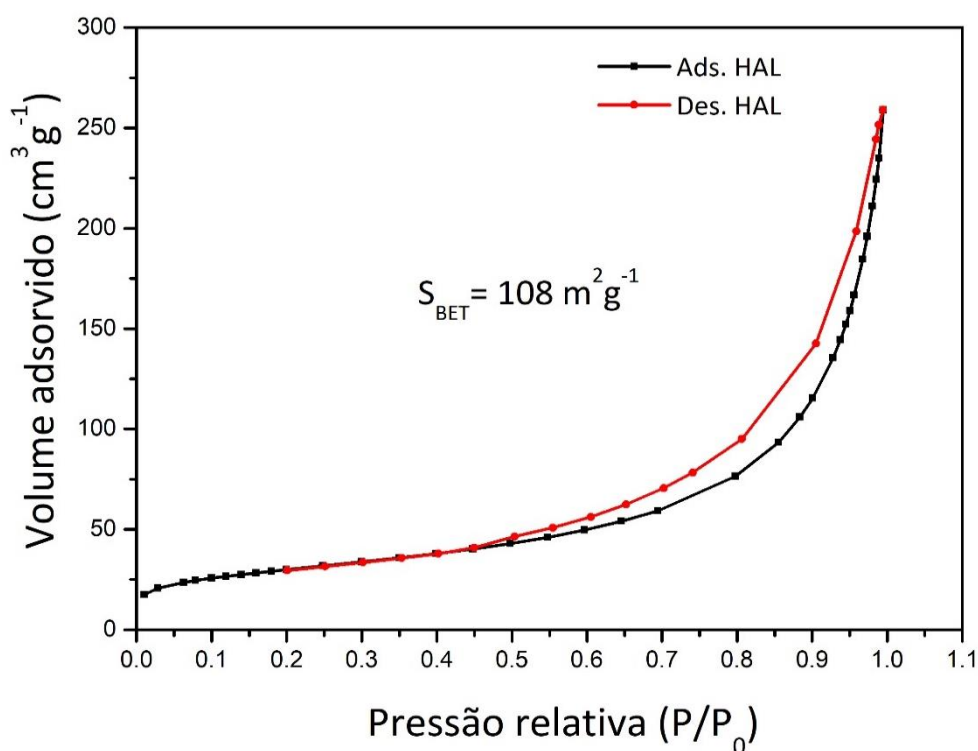


Fonte: A autora (2020).

5.2.4 Isotermas de adsorção e dessorção e área superficial específica

A Figura 29 mostra a isoterma de adsorção/dessorção de N_2 do biocompósito HAL. Observa-se, novamente, o mesmo comportamento determinado para o pó cerâmico obtido via hidrotérmico (Figura 22 (b)). O biocompósito cerâmico HAL apresentou características de pó mesoporoso e histerese do tipo H3 (IUPAC). A área superficial estimada pela aproximação BET ficou em $S_{BET} = 108 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$. Este valor mostrou-se elevado comparado com os pó sintetizados por via úmida (HP = $64,6 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$) e hidrotérmico (HAH = $45,2 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$), Seção 5.1.4. Isto sugere que o gel de alginato retardou o crescimento dos cristais da HAp, devido a retenção dos íons de Ca^{2+} em sua cadeia, mantendo-os em escala nanométrica, bem como, a própria presença do material polimérico na superfície dos nanocristais pode elevar a área superficial do material.

Figura 29 – Isotermas de adsorção e dessorção da HAL



Fonte: A autora (2020).

A Tabela 9 apresenta alguns exemplos de áreas superficiais reportadas na literatura, para alguns pós de HAp e biocompósitos (HAp/polímeros).

Tabela 9 – Dados de áreas superficiais de materiais mesoporos encontrados na literatura.

Material	$S_{\text{BET}} (\text{m}^2 \text{g}^{-1})$	Referências
HAp+Alginato (0.5% Alg)	12,8	GUESMI <i>et al.</i> , 2018
HAp+Alginato (1.6% Alg)	69,3	WANG <i>et al.</i> , 2015
Microesfera de HAp	54,5	LAI <i>et al.</i> , 2016
HAp+PVA	90,0	MOLLAZADEH; JAVADPOUR; KHAVANDI, 2007

Fonte: A autora (2021).

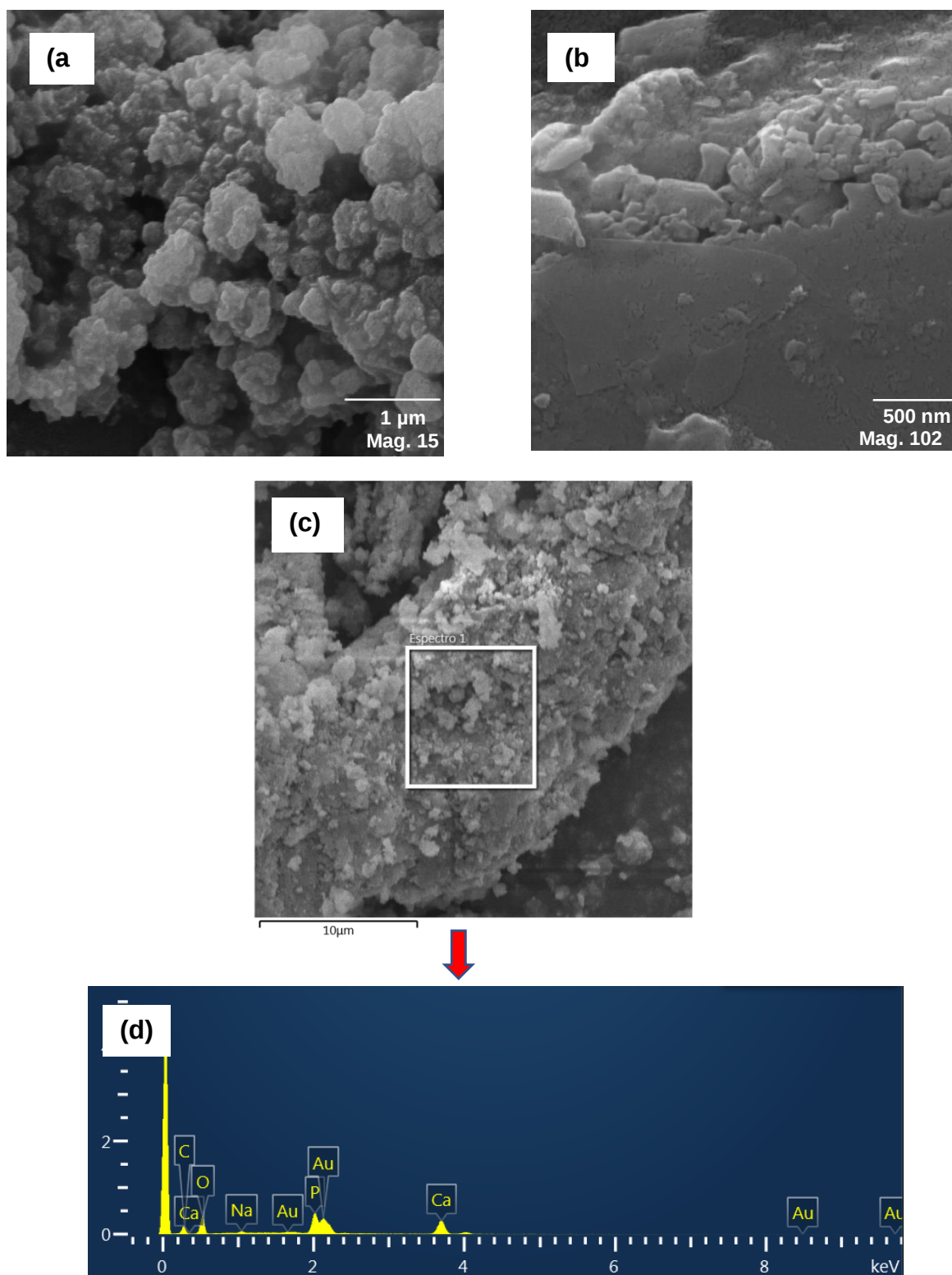
Comparando-se os valores, sugere-se que todos pós sintetizados nesta pesquisa, podem ser utilizados como veículos de adsorção de espécies químicas ativas (p.ex. corantes, nanopartículas metálicas e fármacos), em especial, o biocompósito HAL, que obteve uma alta área superficial específica ($108 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$), confirmado também pelo menor tamanho de cristal (17nm) entre os pós sintetizados.

5.2.5 MEV e análise elementar por EDS

A morfologia das partículas do biocompósito da hidroxiapatita mineralizadas *in situ* no alginato observada por MEV demonstrou aglomerados densos, compostos de precipitados de HAp incorporados na matriz polimérica (Figura 30 (a)). A presença da matriz polimérica é confirmada pela característica da superfície uniforme, lisa e não porosa na imagem da Figura 30 (b). Portanto através desta análise foi possível observar partículas de HAp incorporadas no alginato.

Na Figura 30 (c) mostra uma imagem da região de escala micrométrica do biocompósito utilizada para detectar os elementos químicos presentes na amostra. Os resultados do espectro EDS dos biocompósitos HAL, Figura 30 (d), apresentaram, como esperado, picos referentes ao Ca, P, O e C, elementos constituintes do biocompósito hidroxiapatita/alginato (HAL). O espectro também mostrou picos de baixa intensidade de sódio (Na) que deve estar relacionado ao resíduo de alginato de sódio ainda presente. Esses resultados sugerem a homogeneidade do biocompósito HAL, constituído de estrutura nanométrica, com alta rugosidade.

Figura 30 – Micrografias e análise elemental do biocompósito HAL. Escalas de (a) 1 μm e (b) 500 nm; (c) imagem correspondente a região micrométrica para EDS; (d) análise elemental obtido por EDS



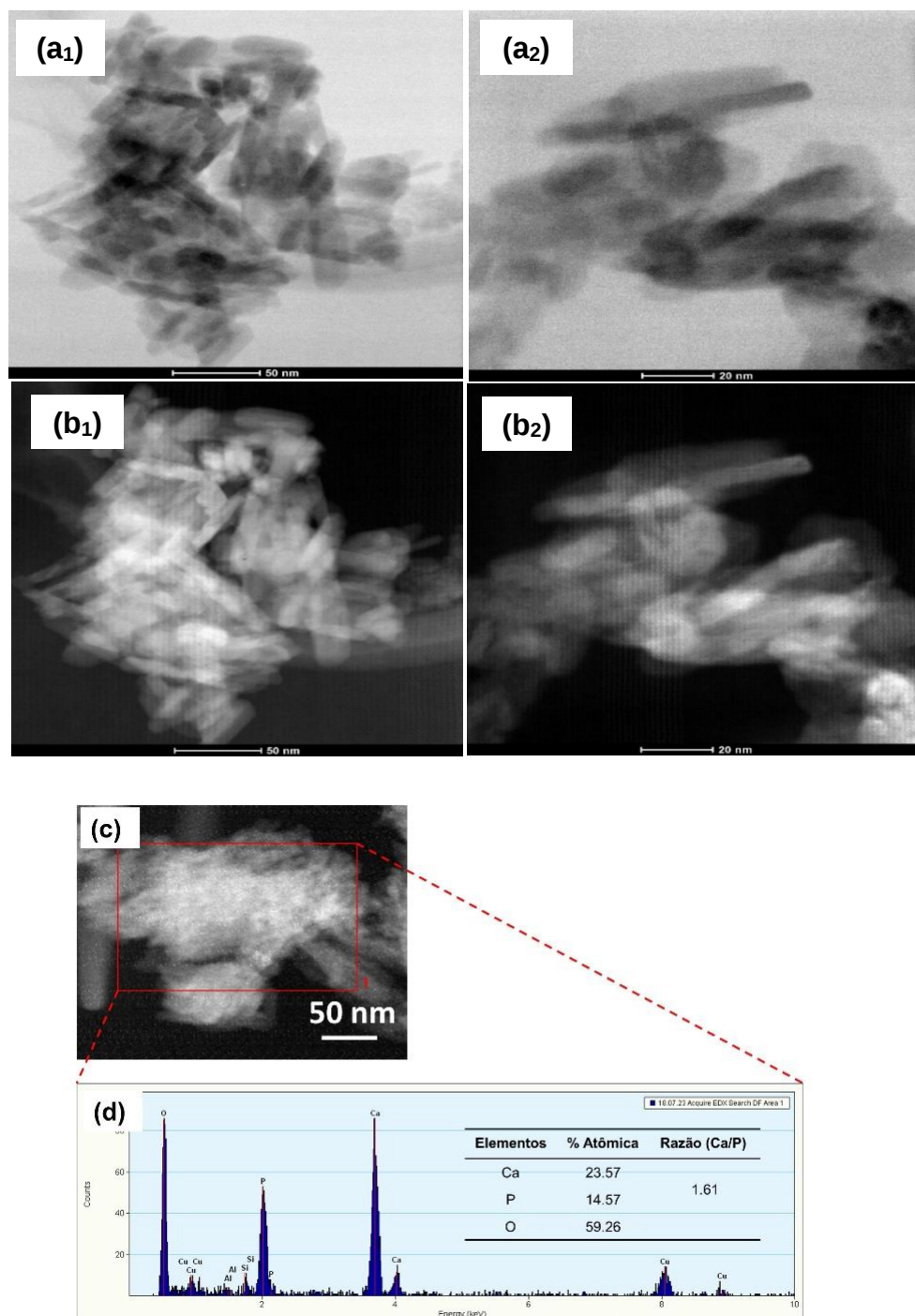
Fonte: A autora (2020).

5.2.6 MET e análise elementar por EDS do HAL

A Figura 31 mostra as imagens de MET do biocompósito HAL. Numa primeira análise observa-se a presença de material cristalizado através das manchas brancas evidenciadas nas imagens de campo escuro na Figura 31 (b.1 e b.2). A análise das imagens de campo claro demonstra que a morfologia do biocompósito sintetizado apresenta partículas de hidroxiapatita com formato de bastões intimamente interligados com a matriz polimérica de alginato. O tamanho médio destas partículas foi calculado manualmente a partir das imagens por MET, medindo-se a largura de 20 bastões individuais do biocompósito para obter o diâmetro médio de $10 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$ e comprimento médio dos bastões $L = 34 \pm 7 \text{ nm}$. A escala de tamanho concorda com os resultados obtidos pela análise de tamanho estimada por difratometria de raios-X. Alguns autores citam um comportamento semelhante de formação *in situ* de hidroxiapatita em fibras de colágeno (LIU, Y. *et al.*, 2011). No presente estudo, não se observa um direcionamento ou alinhamento dos cristais, e sim, a superposição aleatória deles envolvidos na matriz.

A análise elementar dos biocompósitos foi realizada através do detector de espectroscopia por dispersão de energia de raios-X (EDS), acoplado ao microscópio eletrônico de transmissão. A Figura 31 (c) e (d) mostram a imagem da região nanométrica e os elementos químicos analisado por EDS, respectivamente. Os resultados do espectro por EDS, Figura 31 (d), apresentaram picos de maior intensidade, comparado com EDS da Figura 31 (d), referentes ao Ca, P e O, sugerindo também a presença da hidroxiapatita como constituinte do biocompósito HAL. O espectro também mostrou os picos de baixa intensidade de Si, que podem ser atribuídos a contaminação durante a análise. No espectro não foi identificado picos de C, elemento constituinte do alginato (ALG), devido a região da análise (coloração branca) referente somente a parte inorgânica (HAp) do biocompósito. Neste resultado, foi possível notar picos intensos de Ca, P e O que são os principais elementos que compõem a fase inorgânica da hidroxiapatita (HAp).

Figura 31 – Micrografias e análise elementar por EDS do biocompósito HAL. (a₁) e (a₂) representam imagens de campo claro; (b₁) e (b₂) imagens correspondentes de campo escuro; (c) imagem correspondente a região nanométrica para EDS; (d) análise elementar obtido por EDS



Fonte: A autora (2020).

5.3 Caracterização das pastilhas compactadas HP e HAL

5.3.1 Microscopia eletrônica de varredura

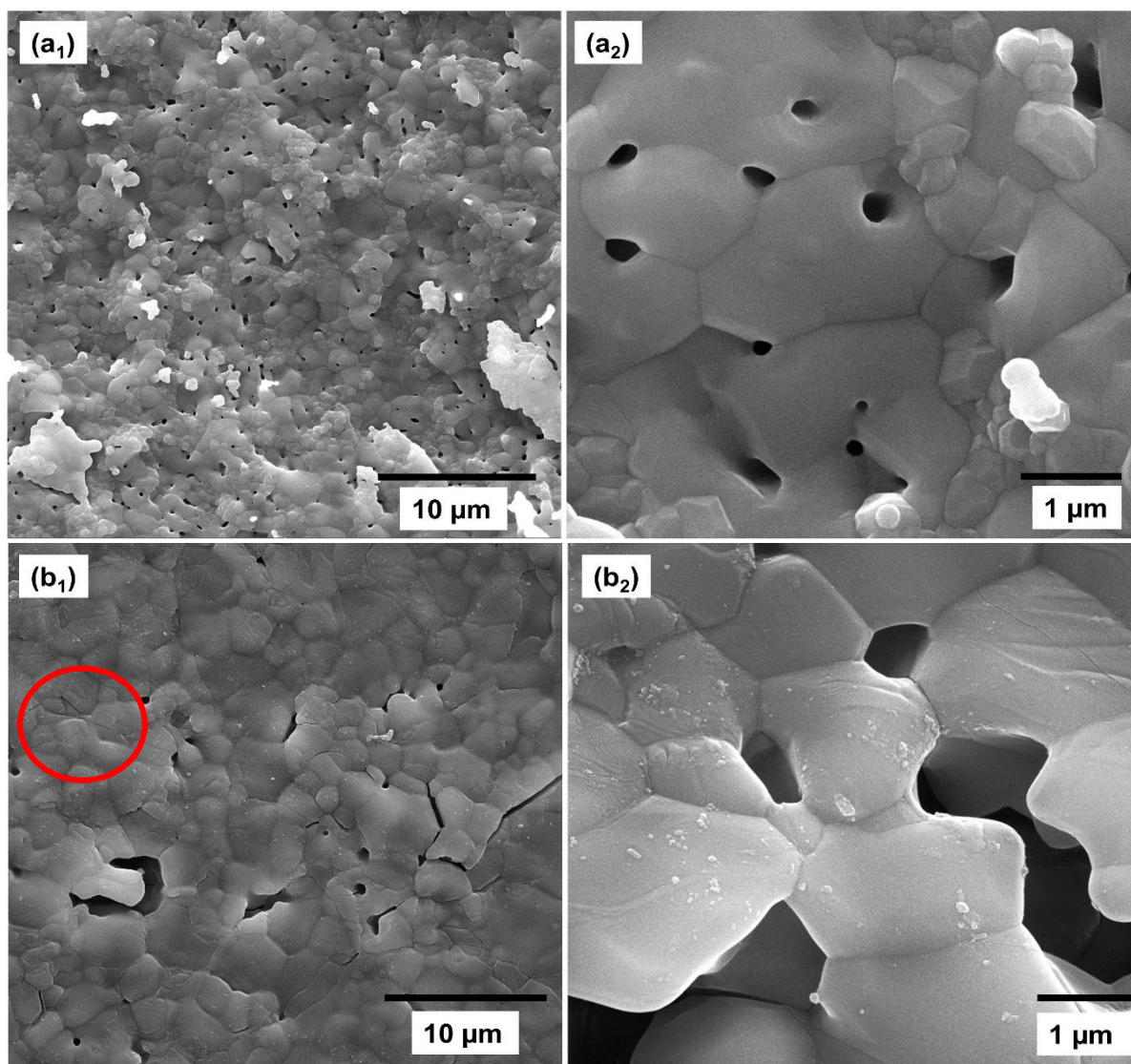
O pó das amostras HP e HAL foram compactados na forma de pastilhas, como descrito na Seção 4.2.

A Figura 32 mostra a imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura das pastilhas sinterizadas a 1050 °C da HP (a_1 e a_2) e HAL (b_1 e b_2) em duas escalas de tamanho: 10 μm e 1 μm . Nestas imagens foi possível verificar o tamanho e geometria dos poros, uma vez que matrizes porosas permitem uma melhor vascularização e, conseqüentemente, o crescimento ósseo (osteocondutividade), garantindo, uma maior resistência do conjunto implante-osso. Por isso, é importante relacionar e controlar o tamanho dos poros com a resistência mecânica, para possíveis aplicações biomédicas que exijam elevada resistência (ALBAYRAK *et al.*, 2016).

Comparando-se as características morfológicas, observa-se que a pastilha HP, Fig. 32 (a_1), apresenta superfície com menor tamanho de grãos e maior quantidade de poros, comparada à amostra densificada a partir do biocompósito HAL (Fig. 32 (b_1)). Na Fig. 32 (b_1 e b_2), é possível observar na amostra HAL que a maioria dos poros são intragranulares se interconectando com outros ao redor do contorno de grão.

Em geral, os poros possuem morfologia cilíndrica na amostra HP, Fig. 32 (a_1 e a_2). Já na amostra HAL observa-se mais poros em forma de fendas irregulares e também, presença de microtrincas (círculo vermelho). A presença de fendas pode estar relacionada a pirólise do alginato (ALG) durante a sinterização da pastilha a 1050 °C (ZHOU *et al.*, 2015).

Figura 32 – Micrografia eletrônica de varredura dos pós cerâmicos compactados sinterizados a 1050°C. Amostra HP (a₁) 10 µm (mag. 45 Kx) e (a₂) 1 µm (mag. 15 Kx); amostra HAL (b₁) 10 µm (mag. 45 Kx), e (b₂) 1 µm (mag. 15 Kx)

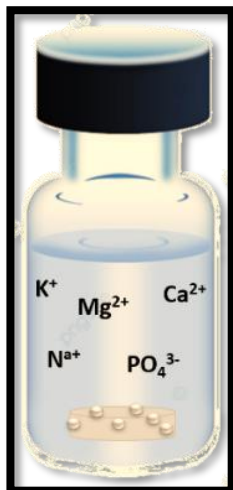


Fonte: A autora (2020).

5.3.2 Bioatividade

A bioatividade é a formação de camadas de apatitas na superfície de biovidros e cerâmicas bioativas dependente do tempo após a implantação no tecido ósseo, como mostra a ilustração na Figura 33.

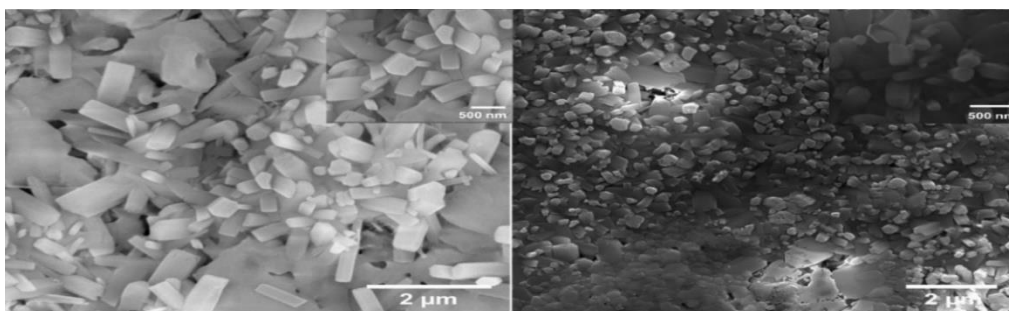
Figura 33 – Esquema do ensaio da bioatividade da pastilha compactada na solução SBF



Fonte: A autora (2020).

O resultado do teste de bioatividade *in vitro* é mostrado na Figura 34 (a) e (b) das pastilhas compactadas dos pós precipitados via úmida (HP) e biocompósito HAp/Alginato (HAL), respectivamente, após um período de 7 dias no SBF. Comparando com as micrografias apresentadas na Fig. 33 verifica-se que alguns espaços na superfície foram preenchidos com precipitados formados após imersão por 7 dias no SBF. Observa-se também nas micrografias, Fig. 34 (a) e (b), que as pastilhas exibiram cristais de apatita com morfologia colunar hexagonal, camada responsável por facilitar a adesão celular para eventuais ligações entre a interface e tecido ósseo.

Figura 34 – MEV das pastilhas compactadas e sinterizadas a 1150 °C dos pós sintetizados (a) por precipitação via úmida HP e (b) biocompósito HAL após 7 dias em imersão no SBF

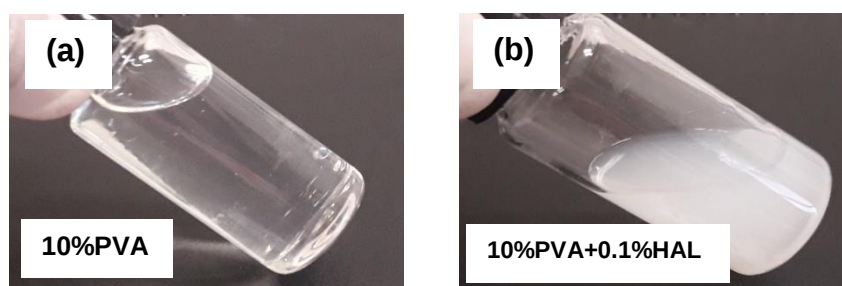


Fonte: A autora (2021).

5.4 Caracterização dos arcabouços eletrofiados

Os arcabouços foram eletrofiados a partir de soluções de PVA puros e PVA+pós fosfato de cálcio e biocompósito. Na Figura 35 é possível observar a mudança da coloração da solução do 10% PVA puro (Fig. 35 (a)) para mistura com 0.1% HAL (Fig. 35 (b)), indicando uma boa dispersão dos pós do biocompósito na solução de 10%PVA.

Figura 35 – Soluções com (a) 10% de PVA puro e (b) 10%PVA+0.1%HAL



Fonte: A autora (2020).

Para as fibras de PVA com hidroxiapatita precipitada por via úmida (HP) não foi possível a eletrofiação homogênea devido, provavelmente, a uma maior agregação das partículas. Isto é observado na sedimentação dos precipitados na solução (Figura 36).

Figura 36 – Seringa com solução de 10% PVA com 0.1% de HP



Fonte: A autora (2020).

5.4.1 Microscopia eletrônica de varredura das fibras eletrofiadas

Na imagem da morfologia das fibras já se observa que estas são distribuídas em uma grande área e que as camadas das fibras são empilhadas umas sobre as outras para formar o arcabouço. Diversos experimentos foram realizados previamente para encontrar o melhor conjunto de parâmetros para a preparação dos arcabouços aplicando o processo de eletrofiação de fibra. Conforme descrito na seção de metodologia, utilizamos duas concentrações de PVA: 10 e 12% (m/v) para testar a melhor viscosidade que resultasse em fibras com maior homogeneidade final. Nessas soluções, incorporamos biocompósito HAL em três concentrações (0.1, 0.25 e 0.5% m/v). Também incorporamos apenas pós HAH (0,1% m/v) em uma solução de PVA a 10% para comparar a morfologia da fibra com as fibras de PVA puro e as fibras compostas de HAL.

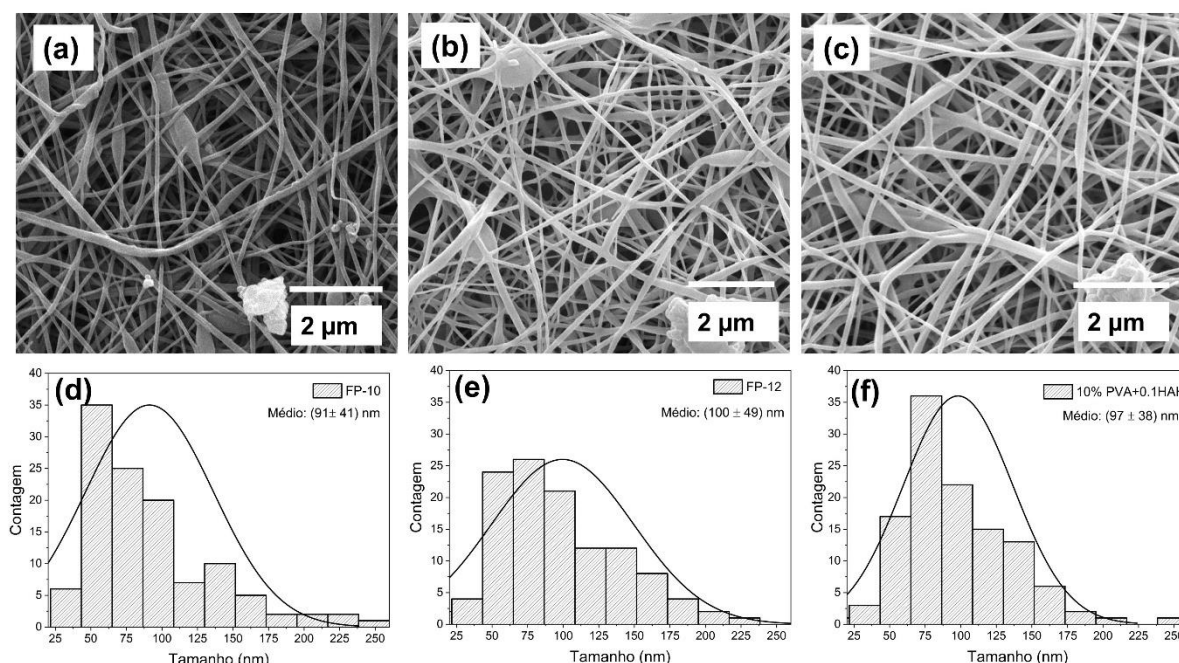
5.4.1.1 Arcabouços de PVA puros e PVA / HAH

A Figura 37 apresenta as imagens de microscopia eletrônica de varredura de fibras de PVA puras e o composto de fibra 0.1% HAH. A curva de distribuição do diâmetro da fibra foi estimada usando o software ImageJ, medindo aproximadamente ~ 100 fibras aleatórias por imagem. O diâmetro médio das fibras eletrofiadas de PVA de 10 (FP-10) e 12% (FP-12) são 91 (Fig.37(d)) e 100 nm (Fig.37(e)), respectivamente, e os dados da literatura relacionam isso como uma tendência esperada devido à menor viscosidade da solução menos concentrada e a tensão superficial mais alta da gota formada durante o processo de eletrofiação (FONG; CHUN; RENEKER, 1999). Essa pequena diferença também pode ser explicada pelo aumento da vazão de 0,6 mL / h (FP-10) e 0,8 mL / h (FP-12), o que dificulta a evaporação do solvente durante o tempo de voo da fibra (FONG; CHUN; RENEKER, 1999; ZHANG, C. *et al.*, 2005).

A morfologia das fibras (a 10% de PVA) após incorporação de 0.1% de HAH é mostrada na Fig.37 (c) a qual apresentou maior número de fibras com distribuição de tamanho de diâmetro mais homogêneo, com diâmetro médio de (97 ± 38) nm (Fig. 37 (f)). Esta homogeneidade na distribuição de tamanho de diâmetros pode ser atribuído a um aumento na condutividade das soluções que levam a maior densidade de carga

do jato ejetado (ÇAY; MIRAFTAB; PERRIN AKÇAKOCA KUMBASAR, 2014) diminuindo respingos e miçangas.

Figura 37 – Micrografias e distribuição de diâmetro de membranas de nanofibras (a, d) FP-10, (b, e) FP-12 e (c, f) 10% PVA + 0.1HAH, magnetização 21,8 kX



Fonte: A autora (2020).

5.4.1.2 Arcabouço do PVA com biocompósito HAL (PVA/HAL)

Imagens de microscopia eletrônica de varredura e da respectiva análise estatística de distribuição do diâmetro médio das nanofibras com concentração de 0.1, 0.25 e 0.5% de biocompósito HAL de 10% PVA (a-c) e (d-f); e 12% de PVA (g-i) e (j-l) são apresentadas na Figura 38. Entre as fibras com 10% PVA, a fibra FH1-0.5 (Fig. 38 (c)) revelou uma superfície mais rugosa e pequena presença de partículas aglomeradas (HAL). Também, na FH1-0.5 (Fig. 38 (c)) foi possível visualizar pontos de junção das fibras e solução não fiados (círculo vermelho) no arcabouço. Este fenômeno ocorre devido à evaporação incompleta do solvente antes que o jato atinja o coletor (HENRIQUES *et al.*, 2009; ZHANG, C. *et al.*, 2005). Já a fibra com mesma concentração de biocompósito HAL (0.5% m/v), porém, contendo 12% de PVA (Fig. 38 (i)), apresentou tamanho menores de partículas aglomeradas na membrana. Entre

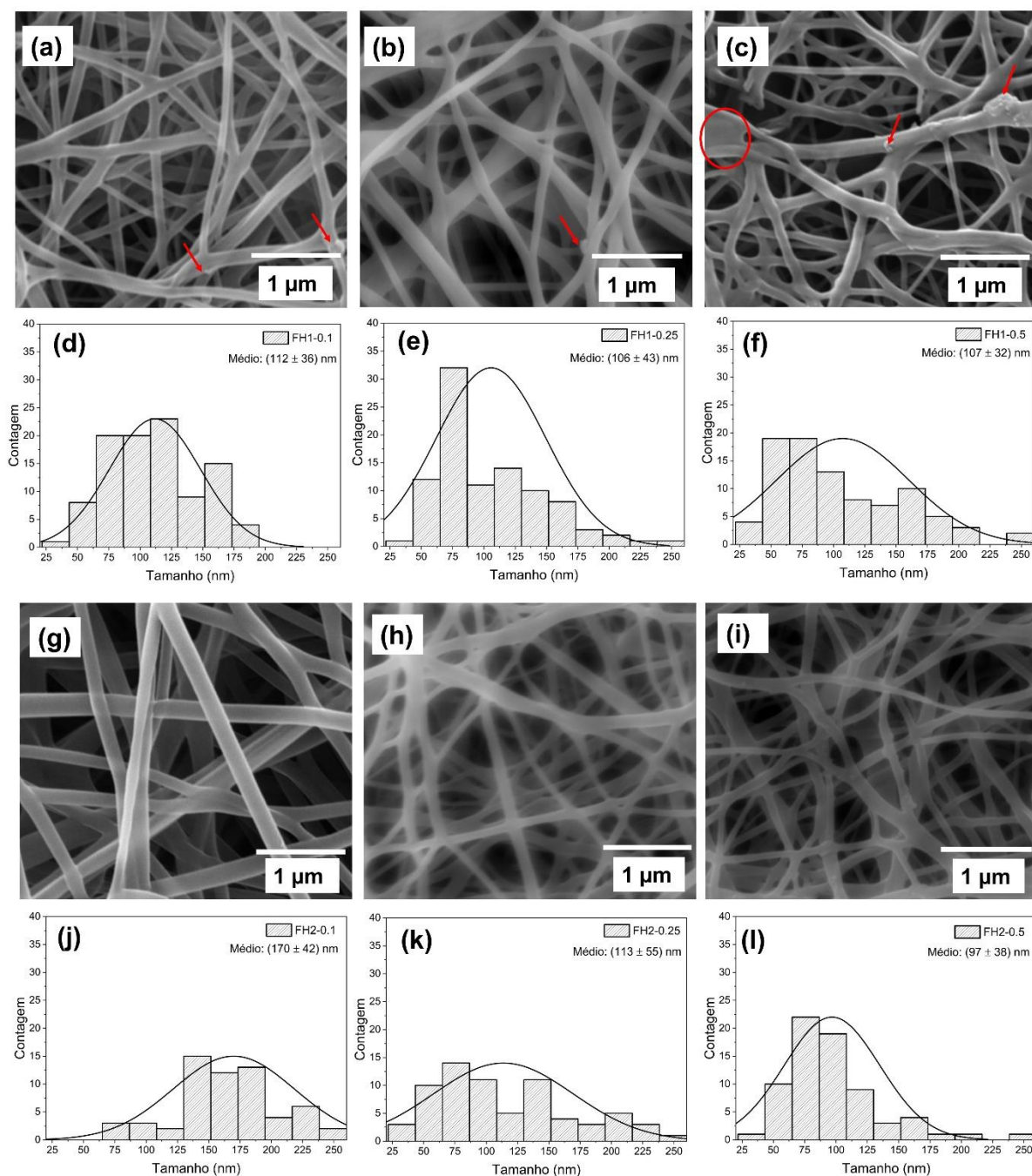
as fibras de 10 e 12% PVA a FH2-0.1 (Fig. 38 (g)) mostrou excelente uniformidade morfológica no comprimento e sem aglomeração de HAL na superfície da fibra.

O diâmetro médio das fibras diminui com aumento do biocompósito HAL para as duas soluções de 10 e 12% PVA. A incorporação, na solução de 10% PVA, de 0.1 para 0.5% (m/v) HAL, leva a uma diminuição do diâmetro médio de (112 ± 36) nm para (107 ± 32) nm (Fig. 38 (d) e (f)), respectivamente. Já na solução de 12% PVA, a redução do diâmetro médio foi mais acentuada, Fig. 38 (j) e (l), de (170 ± 42) nm para (97 ± 38) nm respectivamente. Ni e colls. (2019) trabalharam com mesmos materiais (HAp/Alg/PVA), porém, com metodologias diferentes, obtiveram nanofibras com diâmetro médio maior que 270 nm, talvez pelo maior tamanho de partículas da HAp (>144 nm) (23). A redução do diâmetro da fibra pode ser atribuída ao tamanho nanométrico do HAp (~ 10 nm), e também à pequena quantidade de alginato no biocompósito (HAL) que pode ter reduzido o efeito gelificante do alginato em baixa concentração e alta tensão superficial que tem influência no processo de eletrofiação (FANG *et al.*, 2011). É preciso reduzir o tamanho do diâmetro das nanofibras, pois, o empilhamento das fibras em excesso pode causar redução do tamanho de poros, podendo prejudicar a infiltração celular no arcabouço (SATTARY *et al.*, 2019).

Pode-se concluir que as melhores condições dos parâmetros para formar nanofibras com ausência de imperfeição é do arcabouço que contém 12%PVA, especificamente a amostra FH2-0.1 (Fig. 38 (c)). Apesar de possuir maior diâmetro médio entre as fibras eletrofiadas, (170 ± 42) nm, esta apresentou um tamanho menor comparado com muitos trabalhos na literatura (ISLAM, MD. SHAHIDUL; KARIM, 2010; SONG *et al.*, 2012; TANG *et al.*, 2019). Portanto, conseguimos criar uma membrana de fibra altamente emaranhada com uma alta área de superficial e uma grande estrutura com poros interconectados acarretando em melhor adesão celular.

Um ponto positivo da síntese da HAp *in situ* no alginato (HAL) incorporados na fibra de PVA foram a ausência de grânulos (*beads*), respingo causado pelo PVA, nos arcabouços. Isto sugere que a adição do biocompósito (HAL) ajustou a viscosidade da solução, comparadas com as fibras de PVA puras (Fig. 37 (a) (b)) e somente PVA e HAH (Fig.37 (c)). Segundo Fong e colaboradores (1999), grânulos e fibras com grânulos são menos propensos de serem formados em soluções mais viscosas (FONG; CHUN; RENEKER, 1999).

Figura 38 – Micrografias e distribuição de diâmetro de membranas de nanofibras: (a - c) PVA a 10%: (a, d) FH1-0.1, (b, e) FH1-0.25 e (c, f) FH1-0.5; (g - i) 12% PVA: (g, j) FH2-0.1, (h, k) FH2-0.25 e (i, l) FH2-0.5, magnificação 35 Kx

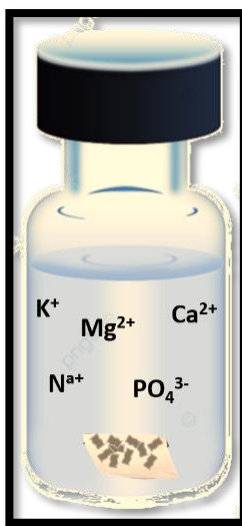


Fonte: A autora (2020).

5.4.1.3 Bioatividade da nanofibra PVA puro, PVA/HAH e PVA/HAL

O frasco utilizado para o ensaio da bioatividade das amostras eletrofiadas que contém o biocompósito nos arcabouços fibrosos é mostrada na Figura 39.

Figura 39 – Representação do frasco utilizado no ensaio de bioatividade da fibra na solução SBF



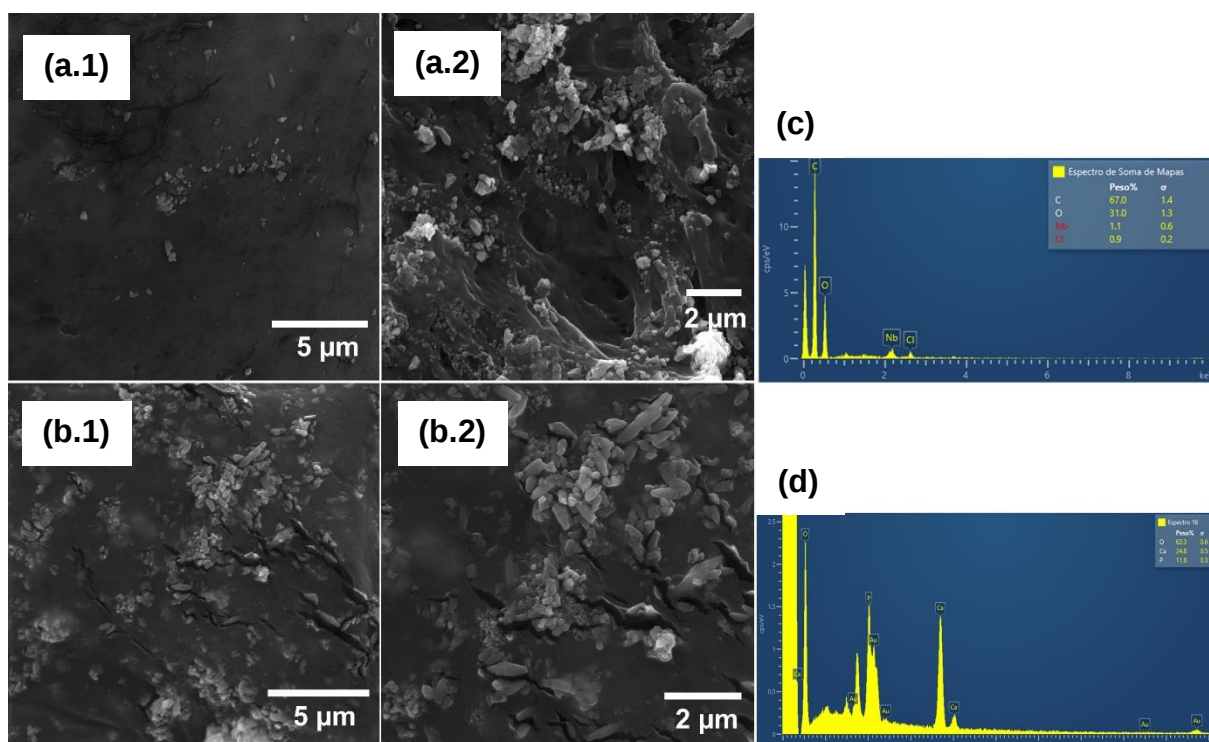
Fonte: A autora (2020).

As Figuras 40 (a) e (b) mostram a morfologia das amostras obtidas por MEV e Figuras 40 (c) e (d) mostram o EDS dos arcabouços 12% PVA puro (FP-12) e 10% PVA + 0.1HAH, respectivamente, após 7 dias de imersão em solução SBF. A Figura 40 (a) mostrou que houve pouca mineralização sobre a superfície das fibras de PVA puro (12%PVA). A adição de apatitas de fosfatos de cálcio em fibras pode intensificar o efeito da mineralização, pois, o processo de formação de apatita depende principalmente de íons negativos, OH^- e PO_4^{3-} , presente na superfície das apatitas que atrai os íons Ca^{2+} presentes no SBF (CHAVAN *et al.*, 2010). Além disso, as apatitas podem estimular a nucleação na superfície devido à dissolução e/ou liberação dos íons de Ca^{2+} e PO_4^{3-} aumentando a concentração local dos íons (FENG *et al.*, 2019; SHEIKH *et al.*, 2010) e neutralizar, através da liberação de substâncias alcalinas, os subprodutos da degradação ácida dos biopolímeros e estabilizar o valor de pH dos ambientes circundantes (FENG *et al.*, 2019). Uma maior quantidade de cristais de apatitas aglomeradas e densas, pode ser observado nas fibras que contém

HAH, Fig. 40 (b), comparada com as fibras de PVA puro (Fig. 40 (a)). Mesmo assim, é possível observar nos dois arcabouços regiões sem revestimento de cristais de apatita, sendo este efeito mais intenso no arcabouço da Figura 40 (a).

Apesar da presença de cristais de apatita (Fig. 40 (a)), apenas C e O foram observados no EDS (Fig. (c)). Enquanto o EDS da Figura 40 (d), referente ao arcabouço 10% PVA + 0.1HAH (Figura 40 (b)), mostrou apenas os elementos representativos da apatita Ca, P e O, com razão molar Ca / P = 2,1.

Figura 40 – (a e b) MEV e (c e d) EDS dos arcabouços nanofibrosos: PVA a 12%: (a.1) 5 μm (Mag. 28.3 kx) e (a.2) 2 μm (Mag. 40 kx); 10% PVA + 0.1HAH (b.1) 5 μm (Mag. 30.1 kx) e (b.2) 2 μm (Mag. 60 kx)



Fonte: A autora (2021).

A Figuras 41 (a) e (b) mostram a morfologia das amostras e as Figuras 41 (c) e (d) mostram os espectros por EDS dos arcabouços de PVA com biocompósito HAL das amostras FH1-0.1 e FH2-0.1, respectivamente. Conforme mostrado na Figura 41 (a) e (b), os dois arcabouços estimularam a formação de uma estrutura porosa e de elevada cristalinidade de apatita em suas superfícies. Resultado interessante, pois, manter a porosidade durante a mineralização é essencial para acelerar os processos

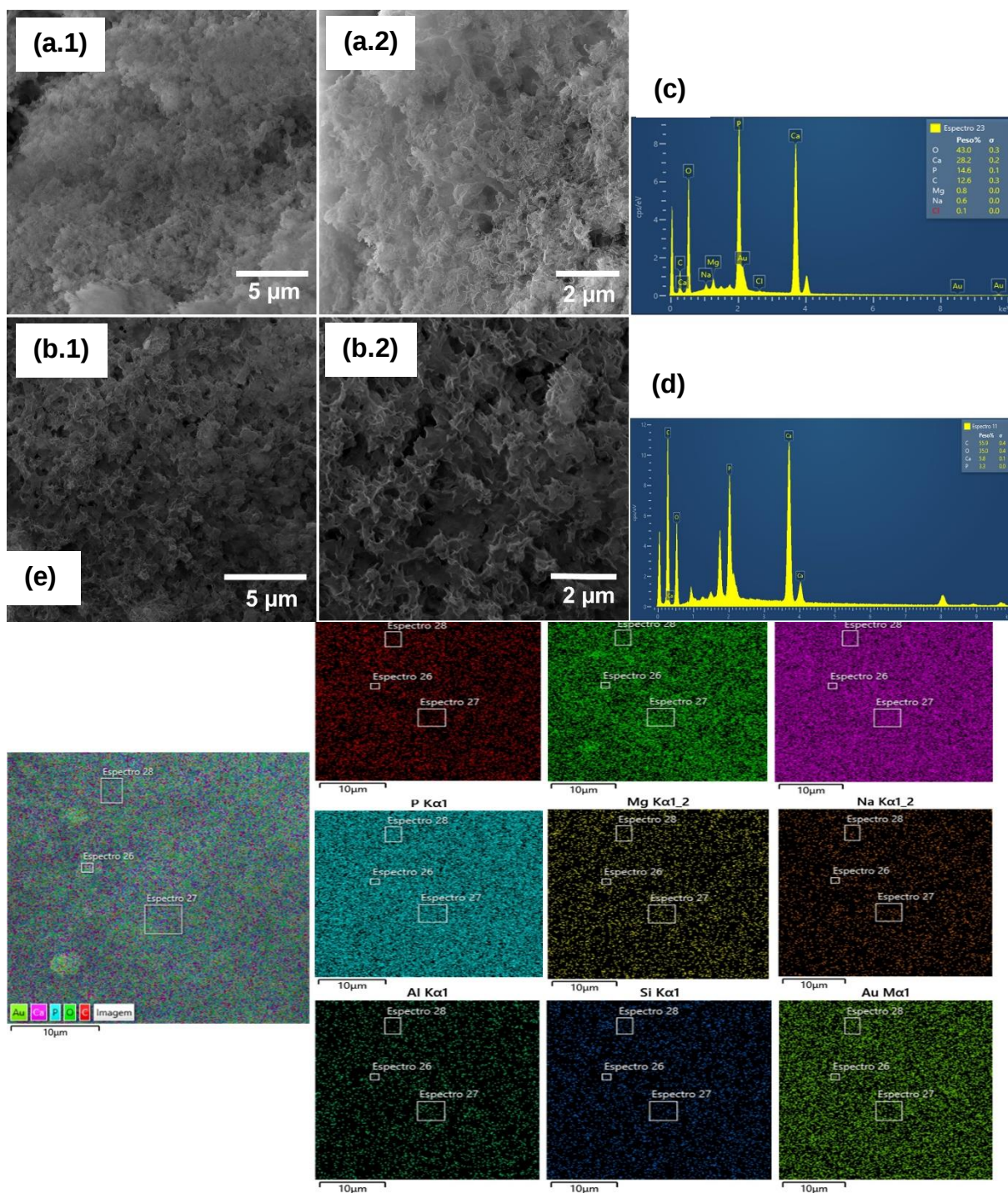
biológicos acentuando os fatores de crescimento e migração celular como mencionado anteriormente na revisão da literatura (SATTARY *et al.*, 2018; VASITA; KATTI, 2006). Entretanto, nas mesmas condições, o arcabouço que contém somente HAH (Fig. 40 (b)) foi incapaz de induzir a formação de apatita porosa. A alta cristalinidade da apatita, Figura 41 (a) e (b), pode ser atribuído a liberação dos íons de Ca^{2+} da HAp e/ou retido na cadeia molecular do alginato (*egg-box*). A troca iônica de cátions bivalentes (Ca^{2+}) por monovalentes (K^+ , Na^+) no alginato, podem acontecer em fluido extracelular (SRINIVASAN *et al.*, 2012). Este aumento na dissolução do íons de Ca^{2+} na solução SBF aumenta a concentração local de íons promovendo a nucleação da apatita na superfície dos arcabouços (FENG *et al.*, 2020).

A morfologia da apatita depositada nos dois arcabouços, Fig. 41 (a) e (b), mostraram-se como folhas agregadas na superfície, já identificada na literatura (CHAVAN *et al.*, 2010; CHEN, C. *et al.*, 2011). Os picos de Ca, P e O no espectro EDS (Figura 41 (c) e (d)) tem intensidades relativa que indicam que a amostra pertence ao grupo das apatitas a base de fosfato de cálcio.

Na Fig. 41 (c) é possível verificar também, traços de outros elementos (Mg e Na) atribuídos a precursores químicos utilizados na solução SBF, enquanto o C é oriundo da matriz do PVA. A Fig. 41 (c) e (d) também revelou que as razões Ca / P da apatita depositada nos arcabouços foram 1,93 e 1,75, respectivamente. O resultado do arcabouço FH2-0.1 (Fig. 41 (d)) torna-se mais atraente, já que a apatita no osso tem Ca / P ~1,67. Além disso, o mapeamento de EDS (Figura 41 (e)) mostrou que os elementos Ca, P, O se apresentam uniformemente distribuídos no arcabouço da FH2-0.1.

Estes resultados confirmam a boa capacidade do biocompósito HAL incorporados nos arcabouços nanofibrosos de PVA para conceder propriedades bioativas.

Figura 41 – (a e b) Micrografias e (c e d) EDS dos arcabouços nanofibrosos: FH1-0.1: (a.1) 5 μm (Mag. 25.7 kx) e (a.2) 2 μm (Mag. 56.2 kx); FH2-0.1 (b.1) 5 μm (Mag. 30 kx) e (b.2) 2 μm (Mag. 60 kx); (e) Mapeamento elemental por imagem



Fonte: A autora (2021).

5.4.2 Propriedade mecânica dos arcabouços

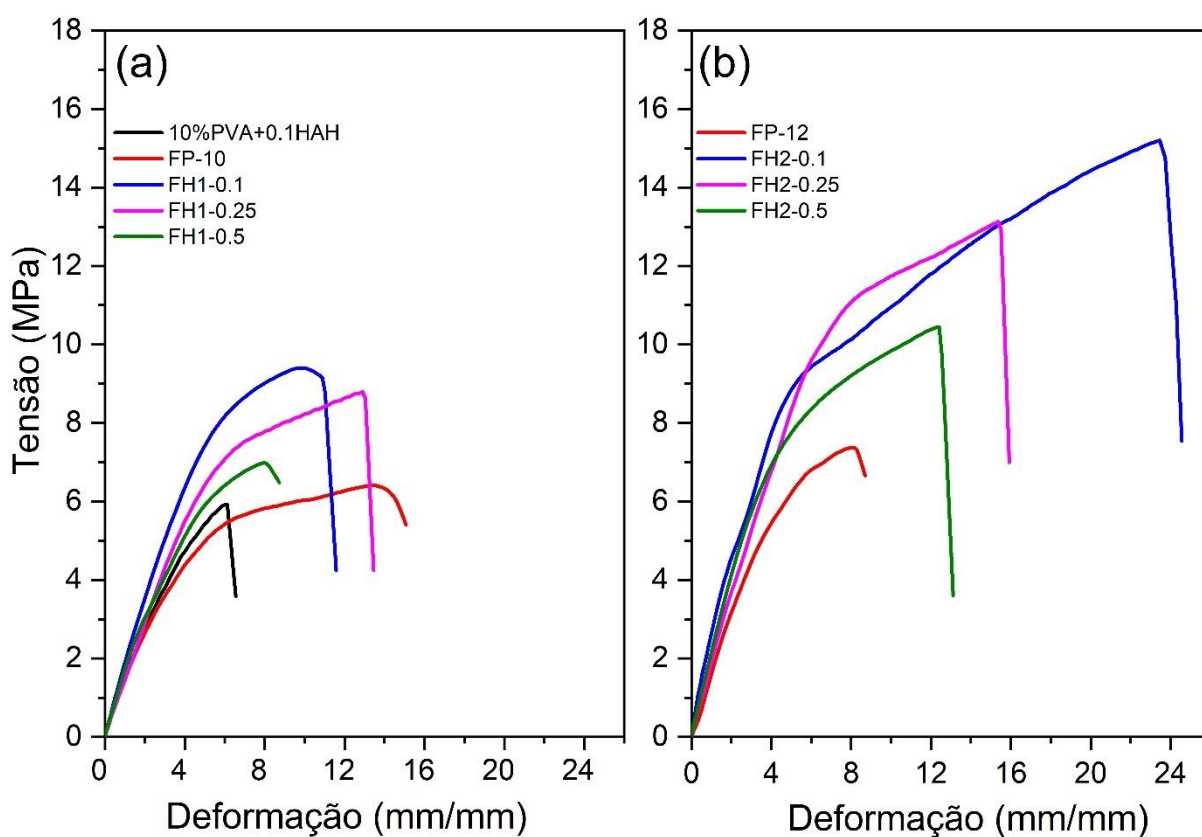
Como mencionado na revisão da literatura, os arcabouços servem como estruturas tridimensionais para guiar a migração, proliferação e diferenciação celular. Além disso, para substituir a matriz extracelular (MEC) é necessário atender critérios específicos, tais como: porosidade elevada, biocompatibilidade, biodegradabilidade e possuir comportamento mecânico semelhante do tecido no local implantado (HENKEL *et al.*, 2013). A rigidez e resistência do arcabouço devem suportar os processos de semeadura celular *in vitro*, pois, as células estão sujeitas às mudanças de forma, as quais podem exercer forças de tração, e também das forças de contração das feridas durante a cicatrização (HUTMACHER *et al.*, 2007).

O efeito das amostras HAL e HAH na propriedade mecânica dos arcabouços fibrosos de PVA submetidos à eletrofiação foram estudados através da curva tensão versus deformação, como mostrado na Figura 42 e na Tabela 10. Neste resultado observou aumento na resistência à tração da membrana fibrosa nas concentrações de PVA de 10 para 12%. Porém, é observado que a resistência à tração aumentou nas amostras com menor quantidade de HAL (0.1%), tanto para 10%, $9,0 \pm 2,0$ MPa (azul) (Figura 42 (a)) quanto para 12%, $15,2 \pm 2,5$ MPa (vermelho) (Figura 42 (b)) de PVA. Isto pode ser explicado por uma melhor distribuição do biocompósito HAL incorporado na fibra. Na Fig. 42 (a) a menor resistência à tração, $5,9 \pm 1,5$ MPa (preto), foi do arcabouço que contém somente HAH (10%PVA+0.1HAH). Na Tabela 9, também é possível observar que este arcabouço possui menor módulo de elasticidade ($42,7 \pm 0,46$ MPa) e alongamento de ruptura ($17,9 \pm 3,6\%$) comparados aos demais arcabouços que contém HAL ($E > 49,8 \pm 0,12$ MPa e alongamento de ruptura $> 35\%$), por isso mostrou um comportamento mais frágil durante o ensaio, provavelmente pela dureza das partículas de hidroxiapatita. Por sua vez, a melhora da resistência à tração dos arcabouços com biocompósito HAL pode ser atribuído a força de interação interna dos grupos $-\text{COO}^-$ do alginato com Ca^{2+} da HAp, fazendo com que partículas de HAp se envolvam no alginato. Isto faz com que evite possíveis fraturas nas interfaces entre partículas da HAp e a matriz polimérica (PVA) em baixas tensões (YANG, D. *et al.*, 2008). É evidente que a síntese *in situ* da HAp no alginato (HAL) aumentou consideravelmente a resistência à tração dos arcabouços fibrosos comparadas com outros polímeros eletrofiados com HAp (ASRAN; HENNING; MICHLER, 2010; ENAYATI *et al.*, 2018; LOPRESTI *et al.*, 2020) e até utilizando mesmos materiais,

porém obtidos com metodologia diferente (NI *et al.*, 2019). Também pode ser sugerido que o aumento da propriedade mecânica (tensão) do arcabouço desta pesquisa deve-se a obtenção de pós (HAL e HAH) e fibras em escala nanométrica (PAI; BOYCE; RUTLEDGE, 2011).

Então, com base nos resultados das propriedades mecânicas todos os arcabouços das nanofibras dos pós HAL e HAH foram capazes de atingir resistência à tração aceitável para serem aplicados como um substituto do osso trabecular, que exige suporte de carga no intervalo de 2-20 MPa (BOCCACCINI; BLAKER, 2005; GOLDSTEIN, 1987; KUHN *et al.*, 1989).

Figura 42 – Curvas de tensão-deformação dos arcabouços eletrofiados (a) 10% PVA + 0.1HAH, FP-10, FH1-0,1, FH1-0,25 e FH1-0,5; e (b) FP-12, FH2-0.1, FH2-0,25 e FH2-0,5



Fonte: A autora (2021).

Tabela 10 – Tensão de ruptura (σ), módulos de elasticidade (E) e alongamento na ruptura dos arcabouços eletrofiados.

Amostras	$\sigma \pm DP$ (MPa)	E $\pm DP$ (MPa)	Alongamento de ruptura $\pm DP$ (%)
FP-10	6,40 $\pm$ 2,6	42,40 $\pm$ 0,59	41,20 $\pm$ 4,9
FP-12	7,36 $\pm$ 1,4	53,39 $\pm$ 0,50	34,50 $\pm$ 4,0
FH1-0.1	9,40 $\pm$ 1,8	57,29 $\pm$ 0,46	31,89 $\pm$ 7,0
FH1-0.25	8,80 $\pm$ 1,0	49,80 $\pm$ 0,12	37,25 $\pm$ 7,4
FH1-0.5	7,0 $\pm$ 0,70	58,13 $\pm$ 0,25	35,07 $\pm$ 5,8
FH2-0.1	15,20 $\pm$ 1,6	66,50 $\pm$ 1,06	68,60 $\pm$ 4,3
FH2-0.25	13,20 $\pm$ 1,4	57,66 $\pm$ 0,32	44,29 $\pm$ 7,6
FH2-0.5	10,50 $\pm$ 0,6	71,66 $\pm$ 0,29	36,26 $\pm$ 2,8
10%PVA+0.1HAH	5,98 $\pm$ 1,5	42,71 $\pm$ 0,46	17,91 $\pm$ 3,6

Fonte: A autora (2021).

5.4.3 Ensaio de Intumescimento

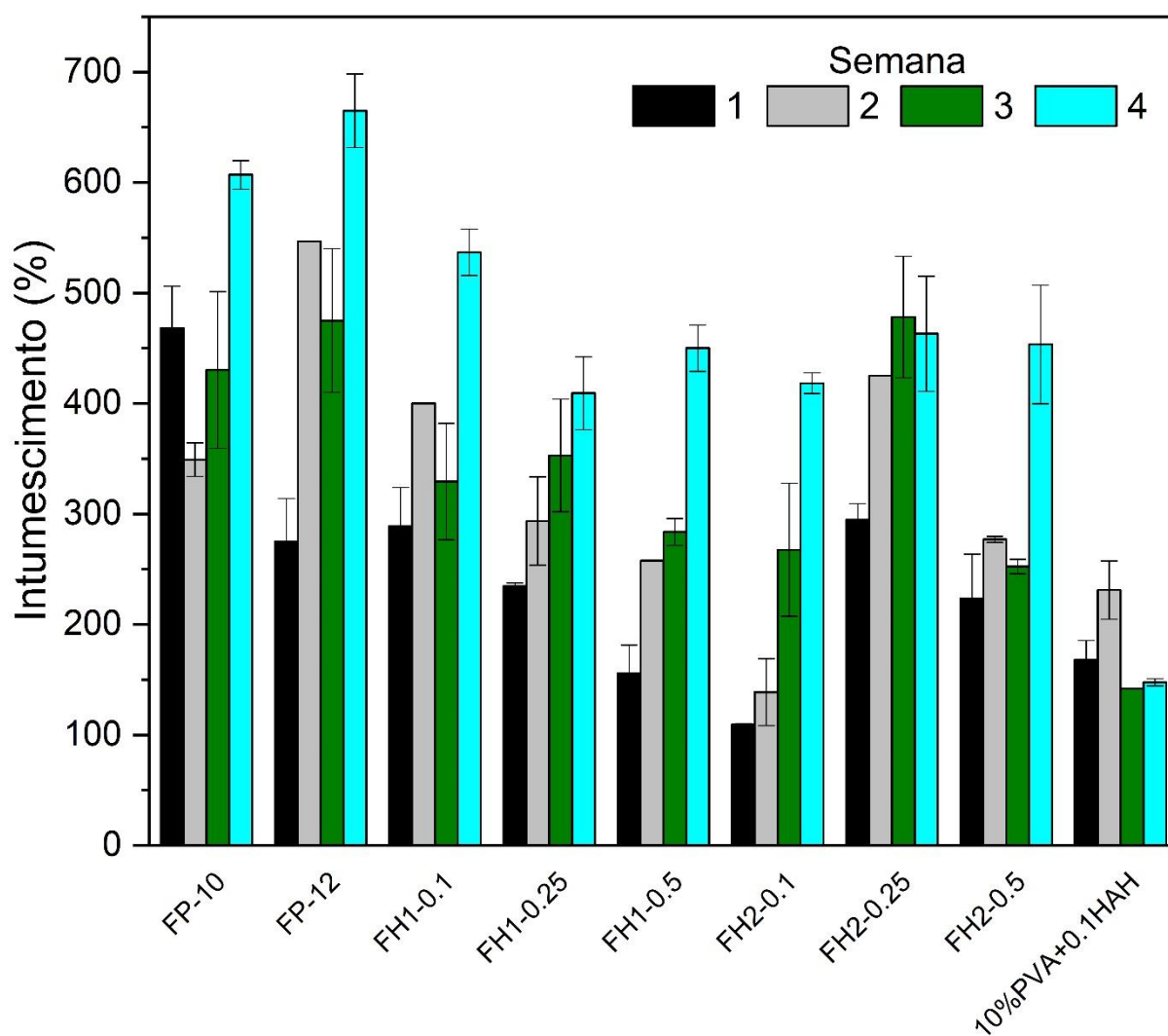
O resultado do intumescimento é mostrado na Figura 43. Este ensaio consiste em avaliar o percentual de expansão por um fluido, neste caso o PBS, nos arcabouços nanofibrosos. Todos os materiais que compõe as fibras, PVA, HAp e Alginato são de natureza hidrofílica possuindo uma grande quantidade de grupos –OH que formam ligações de hidrogênio com H₂O. Então, segundo Kumar (2014) o comportamento de intumescimento em arcabouços fibrosos se deve, principalmente, à presença de grupos de hidroxila livres, às regiões amorfas e ao grau de porosidade (KUMAR *et al.*, 2014). A capacidade de absorver fluidos beneficia a cura de feridas (FADEEVA *et al.*, 2015), e a degradação hidrolítica influencia a biodegradabilidade e a força dos arcabouços para apoiar a proliferação celular (SATPATHY *et al.*, 2019).

A Figura 43 revelou que a maioria dos arcabouços obteve um nível de inchaço mais elevado por PBS na 4 semana (28 dias). Por outro lado, no arcabouço contendo apenas PVA/HAH (10% PVA+0.1HAH), a taxa de inchaço foi menor na maioria dos intervalos específicos em comparação com amostras contendo HAL (HAp+alginato).

Este resultado mostra que a ausência de alginato reduz significativamente a sua capacidade de intumescimento.

O arcabouço contendo a menor proporção de composto HAL, FH1-0.1, mostrou a maior taxa de expansão em todos os períodos estabelecidos. A amostra FH2-0.1, que contém a mesma quantidade de biocompósito HAL em FH1-0.1, mostrou a mais baixa taxa de expansão. Este resultado pode estar associado à presença de pontos de coalescência da solução polimérica formada durante a pulverização da solução (Fig. 38 (c)) na membrana de FH1-0.5 durante o processo de eletrofiação, o que poderia evitar a absorção de líquidos. Todos os arcabouços contendo compósitos HAL apresentam uma capacidade de inchamento semelhante com pequenas variações de intensidade. Comparando este resultado com diferentes trabalhos na literatura (Tabela 11) pode-se concluir que todos os arcabouços possuem capacidade de absorver moderadamente fluidos, o que pode beneficiar a proliferação celular em diferentes mecanismos bioquímicos.

Figura 43 – Comportamento de intumescimento dos arcabouços de PVA puro, PVA/HAH e PVA / HAL em solução de PBS a 37 °C por 1, 2, 3 e 4 semanas



Fonte: A autora (2021).

Tabela 11 –Taxa de intumescimento de diferentes produtos encontrados na literatura

Biocompósito	Técnica de processamento	Produto	Tempo/intumescimento (%)	Ref.
PVA/Alginato/Laponite	Hidrogel/liofilizado	Arcabouço	24h – 274.6±6.5%	(GOLAFSHAN <i>et al.</i> , 2017).
PVA/Alginato/PCL/proteínas (bFGF e BSA)	Hidrogel/liofilizado	Microesfera - 90% PVA/10% Alg.	3h – ~250%	(BAHADORAN; SHAMLOO; NOKOORANI, 2020).
PVA/Alg./HAp/Amoxicilina	Secagem	Filme	7 dias – ~80%	(PRAKASH <i>et al.</i> , 2019).
PVA/Alg/mel	Eletrofiação	Arcabouço	24h - ~300%	(TANG <i>et al.</i> , 2019).
PVA/Alg/Nitrofurazona	Hidrogel/liofilizado	Arcabouço	30 min – ~175%	(KIM, J. O. <i>et al.</i> , 2008).
PHBH/PVA	Eletrofiação	Arcabouço	24h - ~320%	(REBIA <i>et al.</i> , 2018).

Fonte: A autora (2020).

5.4.4 Ensaio de degradação

A estimativa da dissolução das nanofibras de PVA/HAL foi feita pelo monitoramento da taxa de degradação durante períodos específicos da semana (28 dias), (Figura 44), e para comparação, foram também realizados testes com PVA puro (FP-10 e FP-12) e PVA/HAH (10%PVA+0.1HAH) nanofibras.

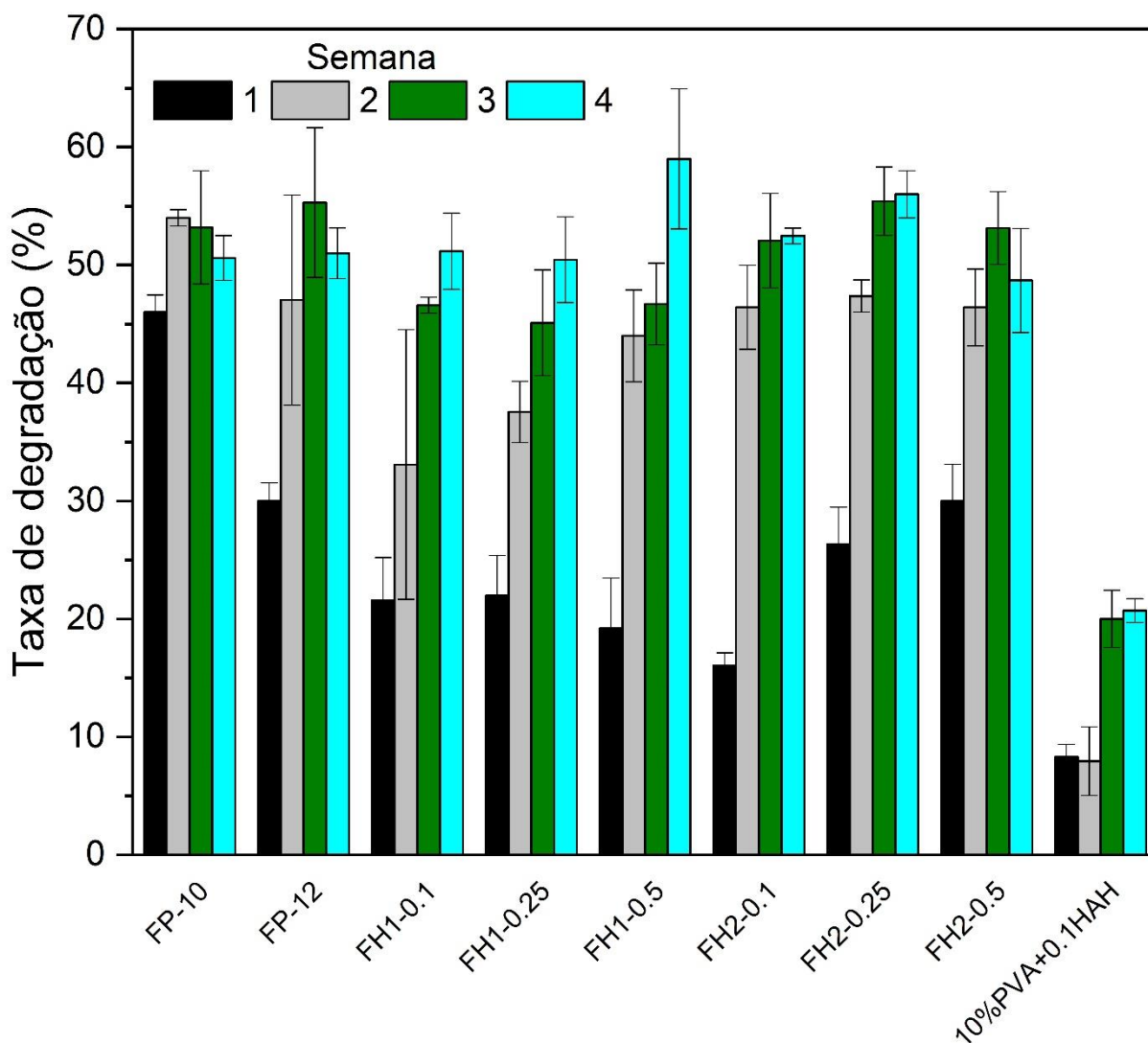
Existem diferentes estudos que determinam a taxa de degradação dos arcabouços de HAp combinados com diversos polímeros e aplicando diferentes metodologias de produção (LIN *et al.*, 2019; MELNIK *et al.*, 2019; SONG *et al.*, 2012; ZHANG, H. *et al.*, 2015), e comparando com o material deste trabalho, apresentaram uma maior capacidade de degradação em meios aquosos. Os perfis da taxa de degradação para todas as nanofibras mostraram um comportamento semelhante, mais acentuado, após a 3ª semana de imersão. No entanto, os resultados foram mais significativos nas nanofibras contendo biocompósito HAL (FH1 e FH2) em

comparação com as outras fibras (10%PVA + 0.1HAH). Também se esperam taxas de degradação mais baixas para fibras contendo diâmetros médios de maior tamanho (FH2-0.1), como mostrado na Fig.38 (j).

A degradação das nanofibras com alginato na composição, (i.e. 10%PVA + 0.1HAH e FH1-0.1) exibiu aproximadamente o dobro da taxa de degradação na maioria das semanas. Isto mostra que a ausência de alginato em nanofibras (10%PVA+0.1HAH) resulta numa taxa de degradação mais lenta e, portanto, limitando o crescimento ósseo no implante após a cicatrização da fratura óssea. A assimilação mais rápida dos nanocristais inorgânicos permite uma maior taxa de mineralização, visando a reconstrução do macro-canal ósseo que pode levar de 3-6 meses (PIŞKIN *et al.*, 2009; ZHANG, H. *et al.*, 2015).

Este aumento da degradação, pode ser atribuído ao mecanismo *in situ* da HAp no gel de alginato levando a uma redução na concentração do íons Ca^{2+} retido na cadeia molecular do alginato (modelo *egg-box*), portanto, reduzindo o efeito da reticulação (REN; SUN; WANG, 2018) e/ou provavelmente a alta interação da troca iônica do Ca^{2+} com outros íons da solução PBS, mencionado anteriormente (SRINIVASAN *et al.*, 2012; ZHANG, X. *et al.*, 2017).

Figura 44 – Comportamento de degradação in vitro de arcabouço de PVA puro, PVA/HAH e PVA / HAL em solução de PBS a 37 °C por 1, 2, 3 e 4 semanas



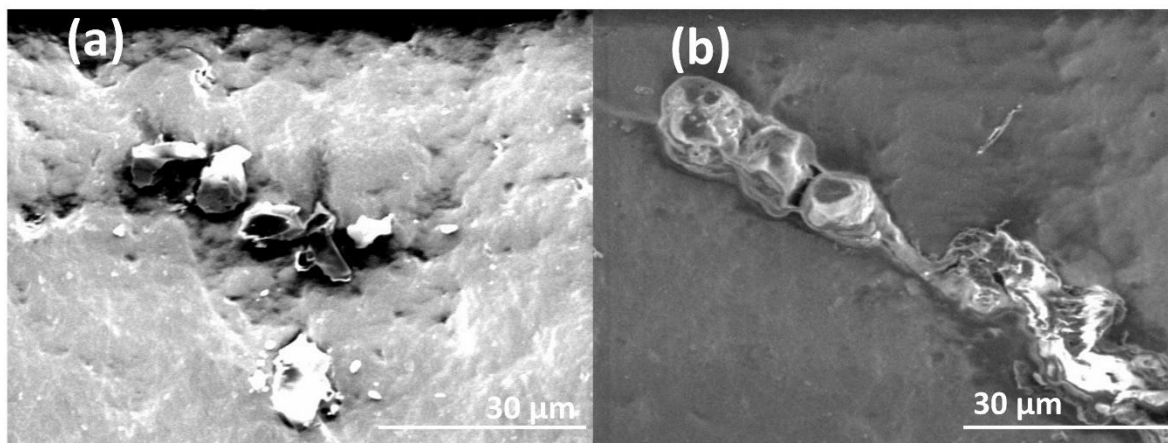
Fonte: A autora (2021).

5.4.5 Ensaio de adesão celular

Em aplicações como substitutos ósseos sintéticos, é desejável aplicar um material que seja biocompatível e osteoindutor. O tamanho e a distribuição dos poros estão altamente relacionados a esses processos. Um estudo relatado por Stachewicz e cols. (2017) analisaram padrões 2D e 3D microscópicos de fibras poliméricas eletrofiadas e a relação de sua morfologia geral e a capacidade de crescimento celular (STACHEWICZ *et al.*, 2019). Os autores sugeriram que o crescimento celular nos arcabouços eletrofiados não é apenas influenciado pelo tamanho dos poros, mas

também por suas formas. A integração profunda das células com nanofibras é influenciada pela interconexão dos poros, ou seja, pela sua arquitetura. É importante verificar a forma e o tamanho dos poros na superfície dos arcabouços, especialmente quando as células são semeadas na superfície. Ao analisar a distribuição dos poros dos arcabouços na Fig. 38, observamos que os poros resultantes apresentam uma grande interconectividade das fibras. Analisamos a capacidade de adesão celular para ambos os arcabouços nanofibrosos compostos por 10 ou 12% de PVA contendo uma quantidade líquida de 10 mg / mL de HAL cada. A morfologia das células de fibroblasto gengival humano (FGH) aderidas à rede fibrosa foi examinada por MEV após o teste de adesão celular de 24h. Observamos na Fig. 45 (a) e (b) que as células não apenas aderiram aos arcabouços nanofibrosos, mas também proliferaram ao longo deles, inferindo que podem ser usados para fins biológicos.

Figura 45 – Micrografias de células de FGH colhidas e aderidas a estruturas fibrosas feitas de (a) FH1-0.1 e (b) FH2-0.1, respectivamente. Mag. 2 Kx



Fonte: A autora (2021).

5.4.6 Ensaio de viabilidade celular

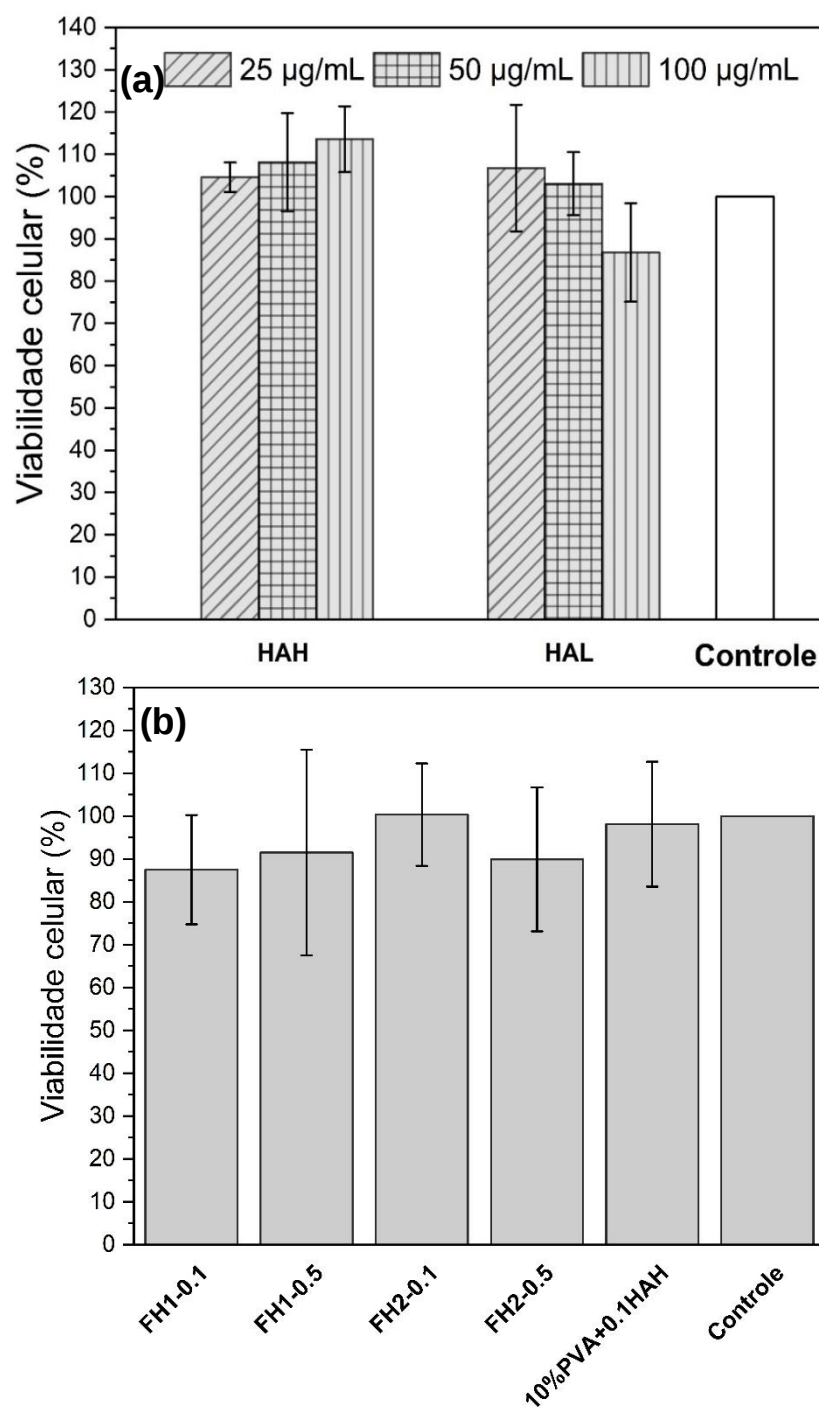
Para ser aprovado no teste de citotoxicidade *in vitro*, um produto não pode ocasionar a morte das células nem afetar as suas funções celulares. Efeito citotóxico pode comprometer a viabilidade celular, isto é, as atividades metabólicas das células. Sabendo a importância desse ensaio para futuros testes *in vivo*, buscou-se reforçar o ensaio de viabilidade celular com células de fibroblasto gengival humano (FGH),

macrófagos (J774A1) e tumoral (MDA), para que possam ter aplicações clínicas, especialmente na área da engenharia de tecido ósseo.

5.4.6.1 Viabilidade celular com linhagem celular FGH

A Figura 46 mostram a viabilidade celular, em comparação com o teste controle (100% viável) dos (a) pós sintetizados por via hidrotermal (HAH) e biocompósito de HAp/Alginato (HAL); e (b) arcabouços nanofibrosos. Na Figura 46 (a), houve aumento da viabilidade celular na amostra HAH de 104% para 113% nas concentrações de 25 e 100 µg/mL, respectivamente. Por outro lado, a amostra HAL exibiu um efeito contrário, ou seja, houve redução na viabilidade celular de 106% para 87% nas mesmas concentrações mencionada acima. Já a Fig. 46 (b), mostra que os valores da viabilidade celular dos arcabouços testado estão entre 87 a 100%. Entre estas, em destaque as amostras FH2-0.1 e 10%PVA+0.1HAH apresentando 100% e 97% das células viáveis, respectivamente.

Figura 46 – Viabilidade celular em comparação com o teste controle da célula FGH dos pós (a) HAH e HAL e (b) arcabouços fibrosos



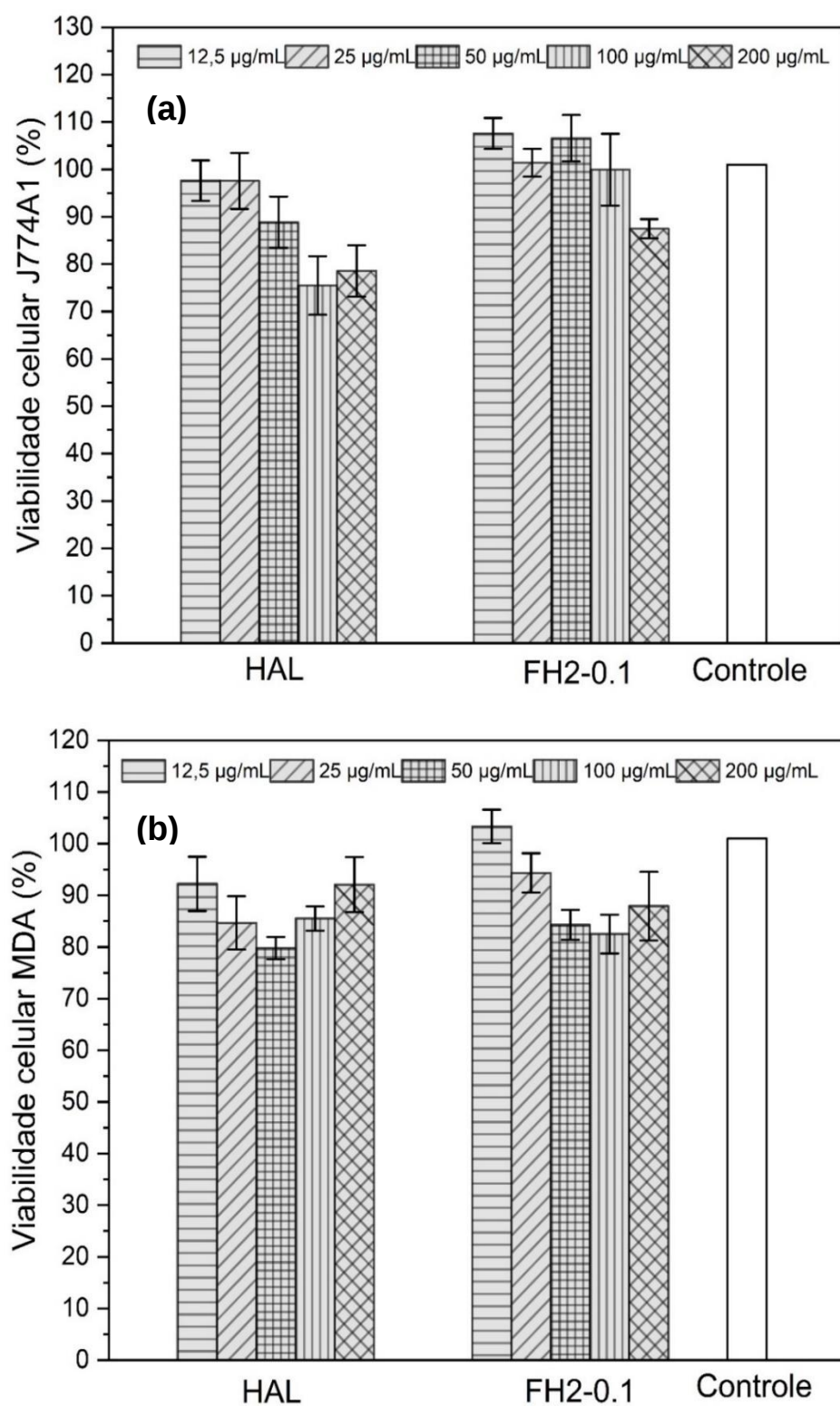
Fonte: A autora (2021).

5.4.6.2 Viabilidade com linhagem celular J774A1 e MDA

A Figura 47 mostra os resultados de viabilidade celular do biocompósito hidroxiapatita / alginato (HAL) e arcabouço formado com 12% PVA + 0.1 HAL (FH2-0.1) com linhagem celular (a) J774A1 e (b) MDA. A Fig. 47 (a) mostra que o biocompósito HAL em baixas concentrações, 12,5 e 25 µg/mL, demonstraram maiores e idênticas porcentagens de células viáveis, 97% e 97%, respectivamente. Este comportamento com maiores taxas de células viáveis em baixa concentração (25 µg/mL) foi observado na amostra testada com célula FGH (Fig.46 (a)). Na mesma linhagem de células (J774 A1) o arcabouço FH2-0.1 apresentou na maioria das concentrações (12,5 a 100 µg/mL) valores próximos e maiores de viabilidade celular (107 a 100%), comparada ao teste controle (100% células viáveis), exceto na concentração 200 µg/mL (88%).

Já para a linhagem da célula MDA (Fig.47 (b)) as duas amostras obtiveram níveis de células viáveis entre 80 – 100%. Somente a amostra FH2-0.1 apresentou nas concentrações 12,5 e 25 µg/mL uma viabilidade um pouco acima de 100% comparada com o teste controle. Apesar da amostra FH2-0.1 mostrar maior porcentagem de células viáveis para as duas linhagens de células, todas as concentrações, das duas amostras (HAL e FH2-0.1), apresentaram resultados não citotóxico, isto é, acima de 70%, de acordo com a norma ISO 10993-5. Sendo assim, todas as amostras, tanto pós quanto arcabouços fibrosos, apresentaram resultados da citotoxicidade satisfatório para futuros teste *in vivo*.

Figura 47 – Viabilidade celular do biocompósito HAL e arcabouço FH2-0.1 da linhagem celular (a) J774 A1 e (b) MDA



Fonte: A autora (2020).

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi otimizadas fibras com matriz de 10 e 12% de PVA tanto puras quanto misturadas com pós de apatita a base de fosfato de cálcio, neste caso, a hidroxiapatita sintetizada por via hidrotermal (HAH) e HAp *in situ* no gel de alginato (HAL). Estas fibras foram processadas pela técnica da eletrofiação e caracterizadas para aplicação como substituto do tecido ósseo. Através da análise dos resultados das caracterizações morfológicas, química, físicas e biológicas dos pós de fosfato de cálcio, biocompósito e das fibras permitiu-se chegar as seguintes conclusões:

- As metodologias aplicadas na síntese do precipitado hidrotermal (HAH), via úmida (HP) e biocompósito (HAL) formaram somente fases de hidroxiapatita (HAp). O refinamento do difratograma de DRX do precipitado por via úmida (HP) calcinado a 1050°C, resultou em fase mineral bifásica β -TCP e HAp;
- A morfologia dos precipitados HP foi observada partículas aglomeradas, impossível de visualizar o tamanho e geometria; e HAH apesar de observar partículas aglomeradas foi possível visualizar tamanhos nanométricos, 80 e 170 nm, (largura x comprimento) e forma de placas finas, portanto, o HAL só foi possível a visualização do tamanho através do MET (d ~12 nm);
- A análise morfológica dos pós compactados (HP e HAL) a 100 MPa e sinterizados a 1050°C não sofreram trincas e nem empenamento. Demonstrando um material de alta densidade, poros intragranulares (fendas) interconectados. A uniformidade da pastilha HAL favoreceu para maiores quantidade de apatita mineralizada na superfície;
- De acordo com a morfologia, as fibras com 10 e 12% de PVA com biocompósito HAL os melhores resultados em termos de distribuição de tamanho, ausência e/ou poucos *beads* foram para a mostra 0.1% HAL tanto de 10% quanto 12% PVA.
- Percebeu-se que propriedades mecânicas são mais pronunciadas nas fibras em que há uma melhor distribuição interna dos biocompósitos HAL (FH1-0.1 e

FH2-0.1). Este resultado foi favorável para suportar adesão celular e mineralização;

- Concluiu-se também que todos os arcabouços contendo HAL revelaram capacidade de intumescimento (expansão) e degradação controladas, sendo satisfatório para a bioatividade *in vitro* em SBF.
- Através dos ensaios biológicos constatou-se que o biocompósito HAL inserido nos arcabouços não prejudicou a adesão, proliferação e viabilidade celular desde arcabouços nanofibrosos. Todos esses resultados sugerem que o arcabouço nanofibrosos que contém HAL podem servir como uma matriz resistente mecanicamente, biocompatível e bioativa apropriada para a regeneração do tecido ósseo.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Por se tratar de materiais condicionados ao reparo de defeitos ósseos aplicados na engenharia de tecido é necessário um estudo mais amplo. Assim, este trabalho terá continuidade no estudo da biocompatibilidade como ensaios *in vitro* com células presentes no tecido ósseo, osteoblastos, e, ensaios *in vivo* destinado a auxiliar no reparo de pequenos defeitos ósseos. Além disso, o conjunto de resultados obtidos permite incorporar ao compósito HAL fármacos para acelerar a cicatrização de feridas. Como perspectiva mais clínica, os testes *in vivo* dos materiais são imprescindíveis.

REFERÊNCIAS

- ABD EL-AZIZ, A. M.; EL-MAGHRABY, A.; TAHA, N. A. Comparison between polyvinyl alcohol (PVA) nanofiber and polyvinyl alcohol (PVA) nanofiber/hydroxyapatite (HA) for removal of Zn^{2+} ions from wastewater. *Arabian Journal of Chemistry*, v. 10, n. 8, p. 1052–1060, dez. 2017.
- AGULHON, P. *et al.* Structure of Alginate Gels: Interaction of Diuronate Units with Divalent Cations from Density Functional Calculations. *Biomacromolecules*, v. 13, n. 6, p. 1899–1907, 11 jun. 2012.
- AISSA, A.; AGOUGUI, H.; DEBBABI, M. Surface modification of calcium fluoro and hydroxyapatite by 1-octylphosphonic dichloride. *Applied Surface Science*, v. 257, n. 21, p. 9002–9007, 2011.
- ALBAYRAK, O. *et al.* Preparation and characterization of porous hydroxyapatite pellets: Effects of calcination and sintering on the porous structure and mechanical properties. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part L: Journal of Materials: Design and Applications*, v. 230, n. 6, p. 985–993, 3 dez. 2016.
- AMBEKAR, R. S.; KANDASUBRAMANIAN, B. Progress in the Advancement of Porous Biopolymer Scaffold: Tissue Engineering Application. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 58, n. 16, p. 6163–6194, 24 abr. 2019.
- ANJANEYULU, U. . *et al.* Fabrication and characterization of Ag doped hydroxyapatite-polyvinyl alcohol composite nanofibers and its in vitro biological evaluations for bone tissue engineering applications. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, v. 81, n. 3, p. 750–761, 31 mar. 2017.
- ARAHIRA, T.; TODO, M. Effects of Proliferation and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells on Compressive Mechanical Behavior of Collagen/ β -TCP Composite Scaffold. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, v. 39, p. 218–230, nov. 2014.
- ARBEZ, B.; LIBOUBAN, H. Behavior of macrophage and osteoblast cell lines in contact with the β -TCP biomaterial (beta-tricalcium phosphate). *Morphologie*, v. 101, n. 334, p. 154–163, set. 2017.
- ARMENTANO, I. *et al.* Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review. *Polymer Degradation and Stability*, v. 95, n. 11, p. 2126–2146, nov. 2010.
- ASHOK, M.; MEENAKSHI SUNDARAM, N.; NARAYANA KALKURA, S. Crystallization of hydroxyapatite at physiological temperature. *Materials Letters*, v. 57, n. 13–14, p. 2066–2070, abr. 2003.
- ASRAN, A. S.; HENNING, S.; MICHLER, G. H. Polyvinyl alcohol–collagen–hydroxyapatite biocomposite nanofibrous scaffold: Mimicking the key features of natural bone at the nanoscale level. *Polymer*, v. 51, n. 4, p. 868–876, fev. 2010.

AZEVEDO, M. A. *et al.* Alginate/chitosan nanoparticles for encapsulation and controlled release of vitamin B2. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 71, p. 141–146, nov. 2014.

BAHADORAN, M.; SHAMLOO, A.; NOKOORANI, Y. D. Development of a polyvinyl alcohol/sodium alginate hydrogel-based scaffold incorporating bFGF-encapsulated microspheres for accelerated wound healing. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 7342, 30 dez. 2020.

BAKER, M. I. *et al.* A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 100B, n. 5, p. 1451–1457, jul. 2012.

BARRETT, E. P.; JOYNER, L. G.; HALENDA, P. P. The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances. I. Computations from Nitrogen Isotherms. *Journal of the American Chemical Society*, v. 73, n. 1, p. 373–380, jan. 1951.

BERTHIAUME, F.; MAGUIRE, T. J.; YARMUSH, M. L. Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress, and Challenges. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, v. 2, n. 1, p. 403–430, 2011.

BHARDWAJ, N.; KUNDU, S. C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*, v. 28, n. 3, p. 325–347, maio 2010.

BHAT, S.; KUMAR, A. Biomaterials and bioengineering tomorrow's healthcare. *Biomatter*, v. 3, n. 3, p. e24717, 19 jul. 2013.

BHATT, R. A.; ROZENTAL, T. D. Bone Graft Substitutes. *Hand Clinics*, v. 28, n. 4, p. 457–468, nov. 2012.

BILGINER, R.; ARSLAN YILDIZ, A. A facile method to fabricate propolis enriched biomimetic PVA architectures by co-electrospinning. *Materials Letters*, v. 276, p. 128191, out. 2020.

BLACK, C. R. M. *et al.* Bone Tissue Engineering. *Current Molecular Biology Reports*, v. 1, n. 3, p. 132–140, 15 set. 2015.

BLAKESLEE, K. C.; CONDRATE, R. A. Vibrational Spectra of Hydrothermally Prepared Hydroxyapatites. *Journal of The American Ceramic Society*, p. 559–563, 1971.

BOCCACCINI, A. R.; BLAKER, J. J. Bioactive composite materials for tissue engineering scaffolds. *Expert Review of Medical Devices*, v. 2, n. 3, p. 303–317, 9 maio 2005.

BOHNER, M.; SANTONI, B. L. G.; DÖBELIN, N. β -tricalcium phosphate for bone substitution: Synthesis and properties. *Acta Biomaterialia*, v. 113, p. 23–41, set. 2020.

BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E. Adsorption of Gases in Multimolecular

Layers. *Journal of the American Chemical Society*, v. 60, n. 2, p. 309–319, fev. 1938.

CALLISTER, W. D. J. E; RETHWISCH, D. G. *Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução*. 9. ed. Rio de Janeiro: [s.n.], 2016.

CARNEIRO, L. .; JUNQUEIRA, J. *Histologia Básica*. 12^a ed. Rio de Janeiro: [s.n.], 2012.

ÇAY, A.; MIRAFTAB, M.; PERRIN AKÇAKOCA KUMBASAR, E. Characterization and swelling performance of physically stabilized electrospun poly(vinyl alcohol)/chitosan nanofibres. *European Polymer Journal*, v. 61, p. 253–262, dez. 2014.

CHAVAN, P. N. *et al.* Study of nanobiomaterial hydroxyapatite in simulated body fluid: Formation and growth of apatite. *Materials Science and Engineering: B*, v. 168, n. 1–3, p. 224–230, abr. 2010.

CHEN, C. *et al.* Pressure effecting on morphology of hydroxyapatite crystals in homogeneous system. *CrystEngComm*, v. 13, n. 5, p. 1632–1637, 2011.

CHEN, J. *et al.* A simple sol-gel technique for synthesis of nanostructured hydroxyapatite , tricalcium phosphate and biphasic powders. *Materials Letters*, v. 65, n. 12, p. 1923–1926, 2011.

CHEN, Q.; THOUAS, G. *Biomaterials: A basic introduction*. 1. ed. [S.l.]: CRC Press, 2014. Disponível em: <<https://www.taylorfrancis.com/books/9781482227703>>.

CHEN, S. *et al.* Synthesis of Fiber-like Monetite without Organic Additives and Its Transformation to Hydroxyapatite. *Chemistry of Materials*, v. 31, n. 5, p. 1543–1551, 12 mar. 2019.

CUSCÓ, R. *et al.* Differentiation between Hydroxyapatite and / I-Tricalcium Phosphate by Means of u-Raman Spectroscopy. *Journal of the European Ceramic Society*, v. 22, n. 98, p. 1301–1305, 1998.

DEB, P.; DEOGHARE, A. B.; BARUA, E. Poly ethylene glycol/fish scale-derived hydroxyapatite composite porous scaffold for bone tissue engineering. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, v. 377, n. 1, p. 012009, jun. 2018.

DEMERLIS, C. .; SCHONEKER, D. . Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). *Food and Chemical Toxicology*, v. 41, n. 3, p. 319–326, mar. 2003.

DESAI, K. G. H.; LIU, C.; PARK, H. J. Characteristics of vitamin C immobilized particles and sodium alginate beads containing immobilized particles. *Journal of Microencapsulation*, v. 22, n. 4, p. 363–376, 3 jun. 2005.

DESCAMPS, M.; HORNEZ, J. C.; LERICHE, A. Effects of powder stoichiometry on the sintering of β -tricalcium phosphate. *Journal of the European Ceramic Society*, v. 27, n. 6, p. 2401–2406, jan. 2007.

DESTAINVILLE, A. *et al.* Synthesis, characterization and thermal behavior of apatitic tricalcium phosphate. *Materials Chemistry and Physics*, v. 80, n. 1, p. 269–277, abr. 2003.

DOROZHUKIN, S. V. Self-Setting Calcium Orthophosphate Formulations: Cements, Concretes, Pastes and Putties. *International Journal of Materials and Chemistry*, v. 1, n. 1, p. 1–48, 31 ago. 2012.

DOSHI, J.; RENEKER, D. H. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *Journal of Electrostatics*, v. 35, n. 2–3, p. 151–160, ago. 1995.

DUBOK, V. A. Bioceramics - yesterday, today, tomorrow. *Powder Metallurgy and Metal Ceramics*, v. 39, n. 414, p. 381–394, 2001.

ELIAZ, N.; METOKI, N. Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications. *Materials*, v. 10, n. 4, p. 334, 24 mar. 2017.

ENAYATI, M. S. *et al.* Development of electrospun poly (vinyl alcohol)-based bionanocomposite scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 106, n. 4, p. 1111–1120, abr. 2018.

EPPLEY, B. . Alloplastic Implantation. [S.l.]: Indiana University of Medicine, 1999. p. 1781–1783.

ESLAMI, H. *et al.* Synthesis and characterization of nanocrystalline hydroxyapatite obtained by the wet chemical technique. *Materials Science-Poland*, v. 28, n. 1, 2010.

FADEEVA, I. V. *et al.* Novel approach to obtain composite poly-L-lactide based films blended with starch and calcium phosphates and their bioactive properties. *Biomedical Physics & Engineering Express*, v. 1, n. 4, p. 045011, 3 dez. 2015.

FANG, D. *et al.* Effect of intermolecular interaction on electrospinning of sodium alginate. *Carbohydrate Polymers*, v. 85, n. 1, p. 276–279, abr. 2011.

FENG, P. *et al.* Characterizations and interfacial reinforcement mechanisms of multicomponent biopolymer based scaffold. *Materials Science and Engineering: C*, v. 100, n. December 2018, p. 809–825, jul. 2019.

FENG, P. *et al.* In Situ Generation of Hydroxyapatite on Biopolymer Particles for Fabrication of Bone Scaffolds Owning Bioactivity. *ACS applied materials & interfaces*, v. 12, n. 41, p. 46743–46755, 2020.

FONG, H.; CHUN, I.; RENEKER, D. . Beaded nanofibers formed during electrospinning. *Polymer*, v. 40, n. 16, p. 4585–4592, jul. 1999.

FROHBERGH, M. E. *et al.* Bone Tissue Engineering : Nanomedicine Approaches. *Rev. Cell Biol. Mol. Medicine*, v. 1, n. 2, p. 153–176, 2015.

FUH, L. . *et al.* Preparation of micro-porous bioceramic containing silicon-substituted

hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate. *Materials Science & Engineering C*, 2017.

GALIA, C. R. *et al.* Caracterização físico-química de ossos liofilizados de origem bovina e humana. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, v. 36, n. 2, p. 157–160, abr. 2009.

GOLAFSHAN, N. *et al.* Nanohybrid hydrogels of laponite: PVA-Alginate as a potential wound healing material. *Carbohydrate Polymers*, v. 176, n. June, p. 392–401, nov. 2017.

GOLDSTEIN, S. A. The mechanical properties of trabecular bone: Dependence on anatomic location and function. *Journal of Biomechanics*, v. 20, n. 11–12, p. 1055–1061, jan. 1987.

GÖNCÜ, Y. *et al.* Electrophoretic deposition of hydroxyapatite-hexagonal boron nitride composite coatings on Ti substrate. *Materials Science and Engineering: C*, v. 79, p. 343–353, out. 2017.

GRANT, G. T. *et al.* Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *FEBS Letters*, v. 32, n. 1, p. 195–198, 15 maio 1973.

GUESMI, Y. *et al.* Synthesis of hydroxyapatite-sodium alginate via a co-precipitation technique for efficient adsorption of Methylene Blue dye. *Journal of Molecular Liquids journal*, v. 249, p. 912–920, 2018.

HAIDER, A.; HAIDER, S.; KANG, I. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arabian Journal of Chemistry*, v. 11, n. 8, p. 1165–1188, dez. 2018.

HENKEL, J. *et al.* Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions — A 21st Century Perspective. *Bone Research*, v. 1, n. 3, p. 216–248, 25 set. 2013.

HENRIQUES, C. *et al.* A systematic study of solution and processing parameters on nanofiber morphology using a new electrospinning apparatus. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 9, n. 6, p. 3535–3545, jun. 2009.

HOLMES, T. C. Novel peptide-based biomaterial scaffolds for tissue engineering. *Trends in Biotechnology*, v. 20, n. 1, p. 16–21, 2002.

HUANG, Z. *et al.* A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology*, v. 63, n. 15, p. 2223–2253, nov. 2003.

HUBBELL, J. A. Materials as morphogenetic guides in tissue engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 14, n. 5, p. 551–558, out. 2003.

HUTMACHER, D. W. *et al.* State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v. 1, n. 4, p. 245–260, jul. 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2010.06.007>>.

ILIE, A. *et al.* New composite materials based on alginate and hydroxyapatite as potential carriers for ascorbic acid. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 510, n. 2, p. 501–507, ago. 2016.

ISLAM, MD. SHAHIDUL; KARIM, M. R. Fabrication and characterization of poly(vinyl alcohol)/alginate blend nanofibers by electrospinning method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 366, n. 1–3, p. 135–140, ago. 2010.

ISLAM, MD SHARIFUL; TODO, M. Effects of sintering temperature on the compressive mechanical properties of collagen/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Letters*, v. 173, p. 231–234, jun. 2016.

JANG, J.; CASTANO, O.; KIM, H. Electrospun materials as potential platforms for bone tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 61, n. 12, p. 1065–1083, out. 2009.

JANUARIYASA, I. K.; ANA, I. D.; YUSUF, Y. Nanofibrous poly(vinyl alcohol)/chitosan contained carbonated hydroxyapatite nanoparticles scaffold for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, v. 107, n. March 2019, p. 110347, fev. 2020.

JILLAVENKATESA, A.; CONDRATE, R. A. The Infrared and Raman Spectra of β - and α -Tricalcium Phosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). *Spectroscopy Letters*, v. 31, n. 8, p. 1619–1634, 21 dez. 1998.

JUDAS, F. *et al.* Estrutura e Dinâmica do Tecido Ósseo. *Texto de apoio para os alunos do Mestrado Integrado em Medicina Disciplina de Ortopedia*, p. 51, 2012. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/235352308%0D>>.

KANASAN, N. *et al.* The Effect of Sodium Alginate on the Properties of Hydroxyapatite. *Procedia Engineering*, v. 184, p. 442–448, 2017.

KHAN, A. S. *et al.* Fabrication and in vivo evaluation of hydroxyapatite/carbon nanotube electrospun fibers for biomedical/dental application. *Materials Science and Engineering: C*, v. 80, p. 387–396, nov. 2017.

KIM, J. O. *et al.* Development of polyvinyl alcohol–sodium alginate gel-matrix-based wound dressing system containing nitrofurazone. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 359, n. 1–2, p. 79–86, jul. 2008.

KIM, S. *et al.* Poly (lactide- co -glycolide)/ hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v. 27, p. 1399–1409, 2006.

KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*, v. 27, n. 15, p. 2907–2915, maio 2006.

KORDE, J. M.; KANDASUBRAMANIAN, B. Biocompatible alkyl cyanoacrylates and their derivatives as bio-adhesives. *Biomaterials Science*, v. 6, n. 7, p. 1691–1711, 2018. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C8BM00312B>>.

KÖSEOĞLU, N. C. *et al.* Hydroxyapatite/Bioactive Glass Films Produced by a Sol-Gel Method: In Vitro Behavior. *Advanced Engineering Materials*, v. 11, n. 11, p. B194–B199, nov. 2009.

KUHN, J. L. *et al.* The limitations of canine trabecular bone as a model for human: A biomechanical study. *Journal of Biomechanics*, v. 22, n. 2, p. 95–107, jan. 1989.

KUMAR, A. *et al.* Microstructural and mechanical properties of porous biocomposite scaffolds based on polyvinyl alcohol, nano-hydroxyapatite and cellulose nanocrystals. *Cellulose*, v. 21, n. 5, p. 3409–3426, 18 out. 2014.

KUMAR SAINI, R.; PRASAD BAGRI, L.; BAJPAI, A. K. Nano-silver hydroxyapatite based antibacterial 3D scaffolds of gelatin/alginate/poly (vinyl alcohol) for bone tissue engineering applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 177, p. 211–218, maio 2019.

KUMBAR, S. G. *et al.* Electrospun poly(lactic acid-co-glycolic acid) scaffolds for skin tissue engineering. *Biomaterials*, v. 29, n. 30, p. 4100–4107, out. 2008.

KUSAKABE, A.; HIROTA, K.; MIZUTANI, T. Crystallisation of hydroxyapatite in phosphorylated poly(vinyl alcohol) as a synthetic route to tough mechanical hybrid materials. *Materials Science and Engineering: C*, v. 70, p. 487–493, jan. 2017.

LAI, W. *et al.* Hydrothermal fabrication of porous hollow hydroxyapatite microspheres for a drug delivery system. *Materials Science & Engineering C*, v. 62, p. 166–172, 2016.

LEE, J. S. *et al.* Role of Molecular Weight of Atactic Poly (vinyl alcohol) (PVA) in the Structure and Properties of PVA Nanofabric Prepared by Electrospinning. *Journal of Applied Polymer Science*, n. 1, 2004.

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, v. 37, n. 1, p. 106–126, jan. 2012.

LI, H. *et al.* Electrospun membranes: control of the structure and structure related applications in tissue regeneration and drug delivery. *J. Mater. Chem. B*, v. 2, n. 34, p. 5492–5510, 2014.

LI, X. *et al.* Preparation of ultrafine fast-dissolving cholecalciferol-loaded poly(vinyl pyrrolidone) fiber mats via electrospinning. *Polymer Composites*, v. 34, n. 2, p. 282–287, fev. 2013.

LI, Z. *et al.* Greener synthesis of electrospun collagen/hydroxyapatite composite fibers with an excellent microstructure for bone tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine*, p. 3203, abr. 2015.

LIANG, Y. *et al.* Cosynthesis of Cargo-Loaded Hydroxyapatite/Alginate Core–Shell Nanoparticles (HAP@Alg) as pH-Responsive Nanovehicles by a Pre-gel Method. *ACS Applied Materials & Interfaces*, v. 4, n. 12, p. 6720–6727, 26 dez. 2012.

LIAO, J. *et al.* Preparation, bioactivity and mechanism of nano-hydroxyapatite/sodium alginate/chitosan bone repair material. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials*, v. 16, n. 1, p. 28–35, 8 jan. 2018.

LIN, W.-C. *et al.* Long-term in vitro degradation behavior and biocompatibility of polycaprolactone/cobalt-substituted hydroxyapatite composite for bone tissue engineering. *Dental Materials*, v. 35, n. 5, p. 751–762, maio 2019.

LIU, H.; WEBSTER, T. J. Nanotechnology for the Regeneration of Hard and Soft Tissues. *Nano Today*, v. 2, n. 5, p. 45, out. 2007.

LIU, S. *et al.* Tunable Photoluminescence and Energy Transfer Efficiency in β -Ca₃(PO₄)₂-Ca₉La(PO₄)₇:Eu²⁺, Mn²⁺ Solid Solution Phosphors Introduced by Emptying Site and Structural Confinement Effect for Solid-State Lighting Application. *Inorganic Chemistry*, v. 59, n. 6, p. 3596–3605, 16 mar. 2020.

LIU, X.; MA, P. X. Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Annals of Biomedical Engineering*, v. 32, n. 3, p. 477–486, mar. 2004.

LIU, Y. *et al.* Biomaterials Hierarchical and non-hierarchical mineralisation of collagen. *Biomaterials*, v. v.32, n. 5, p. 1291–1300, 2011.

LOPRESTI, F. *et al.* Effect of hydroxyapatite concentration and size on morpho-mechanical properties of PLA-based randomly oriented and aligned electrospun nanofibrous mats. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, v. 101, n. September 2019, p. 103449, jan. 2020.

LU, J.-W. *et al.* Electrospinning of sodium alginate with poly(ethylene oxide). *Polymer*, v. 47, n. 23, p. 8026–8031, out. 2006.

MALLAKPOUR, S.; BEHRANVAND, V. Green hybrid nanocomposites from metal oxides, poly(vinyl alcohol) and poly(vinyl pyrrolidone). *Hybrid Polymer Composite Materials*. [S.l.]: Elsevier, 2017. p. 263–289.

MELNIK, E. V. *et al.* In vitro degradation behaviour of hybrid electrospun scaffolds of polycaprolactone and strontium-containing hydroxyapatite microparticles. *Polymer Degradation and Stability*, v. 167, p. 21–32, set. 2019.

MOKHENA, T. C. *et al.* Electrospun Alginate Nanofibers Toward Various Applications: A Review. *Materials*, v. 13, n. 4, p. 934, 20 fev. 2020.

MOLLAZADEH, S.; JAVADPOUR, J.; KHAVANDI, A. In situ synthesis and characterization of nano-size hydroxyapatite in poly (vinyl alcohol) matrix. *Ceramics International*, v. 33, p. 1579–1583, 2007.

MOREIRA, A. P. D. .; SADER, M. S. .; SOARES, G. D. DE A. . Strontium Incorporation on Microspheres of Alginate / beta - tricalcium Phosphate as Delivery Matrices. *Materials Research*, v. v.17 (4), p. 967–973, 2014.

MOSTAFA, N. Y. Characterization, thermal stability and sintering of hydroxyapatite powders prepared by different routes. *Materials Chemistry and Physics*, v. 94, n. 2–3, p. 333–341, dez. 2005.

NAJAFI-TAHER, R. *et al.* Preparation of an ascorbic acid/PVA–chitosan electrospun mat: a core/shell transdermal delivery system. *RSC Advances*, v. 5, n. 62, p. 50462–50469, 2015.

NI, P. *et al.* Electrospun preparation and biological properties in vitro of polyvinyl alcohol/sodium alginate/nano-hydroxyapatite composite fiber membrane. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 173, p. 171–177, 2019.

O'SHEA, D. C.; BARTLETT, M. L.; YOUNG, R. A. Compositional analysis of apatites laser-raman spectroscopy: (OH , F , Cl) apatites. *Archs oral Biol.*, n. 3, p. 995–1006, 1974.

PAI, C.-L.; BOYCE, M. C.; RUTLEDGE, G. C. Mechanical properties of individual electrospun PA 6(3)T fibers and their variation with fiber diameter. *Polymer*, v. 52, n. 10, p. 2295–2301, maio 2011.

PARHI, P.; RAMANAN, A.; RAY, A. R. Preparation and characterization of alginate and hydroxyapatite-based biocomposite. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 102, n. 6, p. 5162–5165, 15 dez. 2006.

PEREIRA, J. C. B. . Uso do polifosfato de sódio como fonte de fósforo em nutrição parenteral e precursor de cerâmicas para cimento ósseo injetável. *Tese. Departamento de Ciências Farmacêuticas, Recife - PE*, p. 104, 2018.

PIŞKIN, E. *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*, v. 90A, n. 4, p. 1137–1151, 15 set. 2009. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbm.a.32157>>.

PODKOŚCIELNA, B.; SOBIESIAK, M. Synthesis and characterization of organic–inorganic hybrid microspheres. *Adsorption*, v. 22, n. 4–6, p. 631–638, 29 maio 2016.

POURSAMAR, S. A.; AZAMI, M.; MOZAFARI, M. Controllable synthesis and characterization of porous polyvinyl alcohol/hydroxyapatite nanocomposite scaffolds via an in situ colloidal technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 84, n. 2, p. 310–316, jun. 2011.

PRABHAKARAN, M. P.; VENUGOPAL, J.; RAMAKRISHNA, S. Electrospun nanostructured scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, v. 5, n. 8, p. 2884–2893, out. 2009.

PRAKASH, J. *et al.* PVA/alginate/hydroxyapatite films for controlled release of amoxicillin for the treatment of periodontal defects. *Applied Surface Science*, v. 495, n. July, p. 143543, nov. 2019.

PRASANNA, A. P. S.; VENKATASUBBU, G. D. Sustained release of amoxicillin from

hydroxyapatite nanocomposite for bone infections. *Progress in Biomaterials*, v. 7, n. 4, p. 289–296, 27 dez. 2018.

RAFIENIA, M.; SABERI, A.; POORAZIZI, E. A novel fabrication of PVA / Alginate-Bioglass electrospun for biomedical engineering application. *Nanomed.*, v. 4, n. 3, p. 152–163, 2017.

RAJKUMAR, M.; MEENAKSHISUNDARAM, N.; RAJENDRAN, V. Development of nanocomposites based on hydroxyapatite/sodium alginate: Synthesis and characterisation. *Materials Characterization*, v. 62, n. 5, p. 469–479, maio 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044580311000489>>.

REBIA, R. A. *et al.* Biodegradable PHBH/PVA blend nanofibers: Fabrication, characterization, in vitro degradation, and in vitro biocompatibility. *Polymer Degradation and Stability*, v. 154, p. 124–136, ago. 2018.

REN, X.; SUN, Z.; WANG, Y. Alginate-mediated mineralization for ultra-fine hydroxyapatite hybrid nanoparticles. *Interface components: nanoparticles, colloids, emulsions, surfactants, proteins, polymers*, p. 1–69, 2018.

REZWAN, K. *et al.* Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v. 27, n. 18, p. 3413–3431, jun. 2006.

RICE, J. J. *et al.* Engineering the Regenerative Microenvironment with Biomaterials. *Advanced Healthcare Materials*, v. 2, n. 1, p. 57–71, jan. 2013.

RODAN, G. A. Introduction to bone biology. *Bone*, v. 13, p. S3–S6, 1992.

ROEDER, R. K. *et al.* Hydroxyapatite-reinforced polymer biocomposites for synthetic bone substitutes. *JOM*, v. 60, n. 3, p. 38–45, 25 mar. 2008.

ROGALSKI, J.; BASTIAANSEN, C.; PEIJS, T. PA6 Nanofibre Production: A Comparison between Rotary Jet Spinning and Electrospinning. *Fibers*, v. 6, n. 2, p. 37, 5 jun. 2018.

RYAN, A. J. *et al.* Effect of different hydroxyapatite incorporation methods on the structural and biological properties of porous collagen scaffolds for bone repair. *Journal of Anatomy*, v. 227, n. 6, p. 732–745, dez. 2015.

SAFI, S. *et al.* Study of electrospinning of sodium alginate, blended solutions of sodium alginate/poly(vinyl alcohol) and sodium alginate/poly (ethylene oxide). v. v.104, p. 3245–3255, 2007.

SATPATHY, A. *et al.* Bioactive Nano-Hydroxyapatite Doped Electrospun PVA-Chitosan Composite Nanofibers for Bone Tissue Engineering Applications. *Journal of the Indian Institute of Science*, v. 99, n. 3, p. 289–302, 20 set. 2019.

SATTARY, M. *et al.* Incorporation of nanohydroxyapatite and vitamin D3 into electrospun PCL/Gelatin scaffolds: The influence on the physical and chemical

properties and cell behavior for bone tissue engineering. *Polymers for Advanced Technologies*, v. 29, n. 1, p. 451–462, jan. 2018.

SATTARY, M. *et al.* The effect of collector type on the physical, chemical, and biological properties of polycaprolactone/gelatin/nano-hydroxyapatite electrospun scaffold. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 107, n. 4, p. 933–950, 10 maio 2019.

SHEIKH, F. A. *et al.* Synthesis of poly(vinyl alcohol) (PVA) nanofibers incorporating hydroxyapatite nanoparticles as future implant materials. *Macromolecular Research*, v. 18, n. 1, p. 59–66, 5 jan. 2010.

SHEN, W.; HSIEH, Y.-L. Biocompatible sodium alginate fibers by aqueous processing and physical crosslinking. *Carbohydrate Polymers*, v. 102, n. 1, p. 893–900, fev. 2014.

SHIVAKUMARA, L. R.; DEMAPPA, T. Synthesis and Swelling Behavior of Sodium Alginate/Poly(vinyl alcohol) Hydrogels. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 16, n. 3, p. 252–260, 11 jul. 2019.

SILVA, C. C.; SOMBRA, A. S. B. Raman spectroscopy measurements of hydroxyapatite obtained by mechanical alloying. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, v. 65, p. 1031–1033, 2004.

SONG, W. *et al.* Electrospun polyvinyl alcohol–collagen–hydroxyapatite nanofibers: a biomimetic extracellular matrix for osteoblastic cells. *Nanotechnology*, v. 23, n. 11, p. 115101, 23 mar. 2012.

SRINIVASAN, S. *et al.* Biocompatible alginate/nano bioactive glass ceramic composite scaffolds for periodontal tissue regeneration. *Carbohydrate Polymers*, v. 87, n. 1, p. 274–283, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.058>>.

STACHEWICZ, U. *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 and Engineering: C*, v. 95, p. 397–408, 2019.

SUDARSANAN, K.; YOUNG, R. A. Significant precision in crystal structural details. Holly Springs hydroxyapatite. *Acta Crystallographica Section B Structural Crystallography and Crystal Chemistry*, v. 25, n. 8, p. 1534–1543, 15 ago. 1969.

SUKHODUB, L. F. *et al.* Synthesis and characterization of hydroxyapatite–alginate nanostructured composites for the controlled drug release. *Materials Chemistry and Physics*, v. 217, n. June, p. 228–234, set. 2018.

SUKIGARA, S. *et al.* Regeneration of Bombyx mori silk by electrospinning—part 1: processing parameters and geometric properties. *Polymer*, v. 44, n. 19, p. 5721–5727, set. 2003.

SUN, FANCHEN *et al.* Preparation, characterizations and properties of sodium alginate grafted acrylonitrile/polyethylene glycol electrospun nanofibers. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 137, p. 420–425, set. 2019.

SUN, FANGFANG; ZHOU, H.; LEE, J. Various preparation methods of highly porous hydroxyapatite/polymer nanoscale biocomposites for bone regeneration. *Acta Biomaterialia*, v. 7, n. 11, p. 3813–3828, nov. 2011.

SZCZEŚ, A.; HOŁYSZ, L.; CHIBOWSKI, E. Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 249, n. April, p. 321–330, nov. 2017.

TABATA, Y. The importance of drug delivery systems in tissue engineering. *Research focus*, v. 3, n. 3, p. 80–89, 2000.

TANG, Y. *et al.* Honey loaded alginate/PVA nanofibrous membrane as potential bioactive wound dressing. *Carbohydrate Polymers*, v. 219, n. March, p. 113–120, set. 2019.

TAS, A. C. . *et al.* An investigation of the chemical synthesis and high-temperature sintering behaviour of calcium hydroxyapatite (HA) and tricalcium phosphate (TCP) bioceramics. *JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE; MATERIALS IN MEDICINE*, v. 8, 1997.

TEIXEIRA, V. G.; COUTINHO, F. M. B.; GOMES, A. S. Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de divinilbenzeno. *Química Nova*, v. 24, n. 6, p. 808–818, dez. 2001.

TURCO, G. *et al.* Alginate/Hydroxyapatite Biocomposite For Bone Ingrowth: A Trabecular Structure With High And Isotropic Connectivity. *Biomacromolecules*, v. 10, n. 6, p. 1575–1583, 8 jun. 2009.

UMA MAHESHWARI, S. *et al.* Preliminary studies of PVA/PVP blends incorporated with HAp and β -TCP bone ceramic as template for hard tissue engineering. *Bio-Medical Materials and Engineering*, v. 28, n. 4, p. 401–415, 12 jul. 2017.

VASITA, R.; KATTI, D. S. Nanofibers and their applications in tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine*, v. 1, n. 1, p. 15–30, jan. 2006.

VENKATESAN, J. *et al.* Alginate composites for bone tissue engineering: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 72, p. 269–281, jan. 2015.

WANG, Y. *et al.* Alginate-Intervened Hydrothermal Synthesis of Hydroxyapatite Nanocrystals with Nanopores. *Crystal growth e design*, p. 1949–1956, 2015.

WEGST, U. G. K. *et al.* Bioinspired structural materials. *Nature Materials*, v. 14, n. 1, p. 23–36, 26 jan. 2015.

WILLIAMS, D. F. On the nature of biomaterials. *Biomaterials*, v. 30, n. 30, p. 5897–5909, out. 2009.

XUE, K. *et al.* Biomimetic synthesis of novel polyvinyl alcohol/hydroxyapatite composite microspheres for biomedical applications. *Materials Research Express*, v.

5, n. 11, p. 115401, 7 set. 2018.

YANG, D. *et al.* Fabrication and characterization of chitosan/PVA with hydroxyapatite biocomposite nanoscaffolds. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 110, n. 6, p. 3328–3335, 15 dez. 2008.

YANG, J.; XIE, Y.; HE, W. Research progress on chemical modification of alginate: A review. *Carbohydrate Polymers*, v. 84, n. 1, p. 33–39, fev. 2011.

YI, H. *et al.* Recent advances in nano scaffolds for bone repair. *Bone Research*, v. 4, n. 1, p. 16050, 13 dez. 2016.

YUAN, X. *et al.* Morphology of ultrafine polysulfone fibers prepared by electrospinning. *Polymer International*, v. 53, n. 11, p. 1704–1710, nov. 2004.

ZHANG, C. *et al.* Study on morphology of electrospun poly(vinyl alcohol) mats. *European Polymer Journal*, v. 41, n. 3, p. 423–432, mar. 2005.

ZHANG, H. *et al.* Amorphous calcium phosphate, hydroxyapatite and poly(d , l -lactic acid) composite nanofibers: Electrospinning preparation, mineralization and in vivo bone defect repair. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 136, p. 27–36, dez. 2015.

ZHANG, X. *et al.* Preparation and characterization of nanoparticle reinforced alginate fibers with high porosity for potential wound dressing application. *RSC Advances*, v. 7, n. 62, p. 39349–39358, 2017.

ZHAO, H.; LIANG, W. A novel comby scaffold with improved mechanical strength for bone tissue engineering. *Materials Letters*, v. 194, p. 220–223, maio 2017.

ZHOU, K. *et al.* Preparation and characterization of hydroxyapatite – sodium alginate scaffolds by extrusion freeforming. v. 41, p. 14029–14034, 2015.

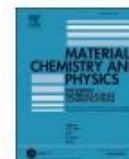
APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO

Materials Chemistry and Physics 282 (2022) 125879



Contents lists available at ScienceDirect

Materials Chemistry and Physics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/matchemphys

In situ preparation of nanohydroxyapatite/alginate composites as additives to PVA electrospun fibers as new bone graft materials

G.S. Correia^{a,b}, J.S.A. Falcão^c, A.G. Castro Neto^d, Y.J.A. Silva^a, L.T.B. Mendonça^e, A.O. S. Barros^f, R. Santos-Oliveira^f, W.M. de Azevedo^{a,g}, S. Alves Junior^{a,e}, B.S. Santos^{a,h,*}

^a Graduate Program in Materials Science, Federal University of Pernambuco, 50740-560, Recife, PE, Brazil

^b Metal Mechanic Department, Federal Institution of Education, Science and Technology of Maranhão, 65030-005, São Luís, MA, Brazil

^c Education and Health Center, Federal University of Campina Grande, 58175-000, Cuité, PB, Brazil

^d Maurício de Nassau University Center, Unit Graças, 52011-000, Recife, PE, Brazil

^e Chemical Technology Department, Federal University of Maranhão, 65080-805, São Luís, MA, Brazil

^f Brazilian Nuclear Energy Commission, Nuclear Engineering Institute, Laboratory of Nanoradiopharmacy and Synthesis of Novel Radiopharmaceuticals, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^g Fundamental Department of Chemistry, Federal University of Pernambuco, Rare Earth Laboratory – BSTR, 50740-560, Recife, PE, Brazil

^h Pharmaceutical Sciences Department, Federal University of Pernambuco, 50740-520, Recife, PE, Brazil

HIGHLIGHTS

- Development of easy procedure of *in situ* rod shape Hydroxyapatite-alginate nanocomposites.
- Application of electrospinning technique to produce a highly controlled fibrous material.
- Incorporation up to 0.5% (weight) of Hydroxyapatite-alginate nanorods within 10–12% PVA electrospun fibers.
- Scaffolds show high biocompatibility, excellent tensile strength, micrometric pore network.
- Material suitable for bone graft applications.

ARTICLE INFO

Keywords:

Hydroxyapatite
Alginate
PVA
Fibers
Electrospinning

ABSTRACT

Aiming at new fibers containing hydroxyapatite (HAp) nanocrystal composites for bone graft applications, we successfully induced *in situ* growth of the ceramic phase in alginate gel (HAL) added them as dried materials at 0.1, 0.25 and 0.5% (w/w) to PVA matrices to prepare electrospun fibers. X-ray diffraction pattern and transmission electron microscopy showed rod-like alginate coated hydroxyapatite nanocrystals with diameter and length of (10 ± 2) nm and (34 ± 7) nm, respectively. Morphological analysis showed that electrospun composite fibers presented a fiber diameter range of (97–170) nm with a greater homogeneity of size distribution and no grain accumulation in 12% PVA fibers containing 0.1% HAL. All the samples showed mechanical strength limits within those expected for bone graft materials but the best tensile strength response among the electrospun scaffolds $[(15.2 \pm 2.5) \text{ MPa}]$ was observed for PVA fiber (12%) containing 0.1% HAL. The swelling ratio of all the composite fibers show that the presence of HAL composites induce a homogeneous swelling throughout the 4-week period, compared to bare fibers. We observe that the presence of HAL composites within the PVA fibers induced a greater degradation rate (54–62) % in one month) compared to PVA bare fibers and we attribute this property to the presence of alginate molecules. Biological assays using human gingival fibroblast cells demonstrated that all the fibrous membranes support cell adhesion and proliferation demonstrating their biocompatibility. The fibers and fibrous scaffolds prepared in the present study show very good morphological and mechanical properties as well as biocompatibility, fundamental conditions for applications as bone graft precursor materials.

* Corresponding author. Graduate Program in Materials Science, Federal University of Pernambuco, 50740-560, Recife, PE, Brazil.

<https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2022.125879>

Received 6 October 2021; Received in revised form 15 January 2022; Accepted 14 February 2022

Available online 20 February 2022

0254-0584/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.