



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MARIA JOSÉ DA SILVA LIMA

**PRODUÇÃO DE SUPORTES POLIMÉRICOS A PARTIR DE ELETROFIAÇÃO 3D
PARA CRESCIMENTO DE CÉLULAS ÓSSEAS**

Recife
2022

MARIA JOSÉ DA SILVA LIMA

**PRODUÇÃO DE SUPORTES POLIMÉRICOS A PARTIR DE ELETROFIAÇÃO 3D
PARA CRESCIMENTO DE CÉLULAS ÓSSEAS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestra em química.

Área de concentração: Química Inorgânica.

Orientador (a): Severino Alves Júnior

Coorientador (a): Etelino José Monteiro Vera Cruz Feijó de Melo

***Bolsista FACEPE**

Recife

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Catálogo na fonte
Bibliotecária Mônica Uchôa, CRB4-1010

L732p Lima, Maria José da Silva
 Produção de suportes poliméricos a partir de eletrofiação 3D para
 crescimento de células ósseas / Maria José da Silva Lima. – 2023.
 80 f.: il., fig., tab.

 Orientador: Severino Alves Júnior.
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
 de Ciências Exatas e da Natureza. Programa de Pós-graduação em Química.
 Recife, 2023.
 Inclui referências e apêndice.

 1. Tecido ósseo. 2. Manufatura aditiva. 3. Eletrofiação. 4. Hidroxiapatita.
 5. Poli(ε-caprolactona). I. Rezende, Alves Júnior (Orientador). II. Título.

 546 CDD (23. ed.) UFPE - CCEN 2023 – 209

FOLHA DE APROVAÇÃO

MARIA JOSÉ DA SILVA LIMA

“PRODUÇÃO DE SUPORTES POLIMÉRICOS A PARTIR DE ELETROFIAÇÃO 3D PARA CRESCIMENTO DE CÉLULAS ÓSSEAS.”

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação no
Departamento de Química
Fundamental da Universidade
Federal de Pernambuco, como
requisito parcial para a obtenção do
título de Mestre em Química.

Aprovada em: 16/12/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof. Severino Alves Júnior (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dayane Kelly Dias do Nascimento Santos
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Glória Maria Vinhas
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter colocado em meu caminho pessoas incríveis que deram cor e significado à minha jornada até este ponto tão especial.

Quero dedicar um agradecimento especial, cheio de admiração, ao meu orientador, o Prof. Dr. Severino Alves, e ao meu co-orientador, o Prof. Dr. Etelino Melo. Eles não só foram mentores excepcionais, mas também fontes de apoio e ensinamentos valiosos.

Não posso deixar de mencionar meus parceiros e amigos do laboratório de terras raras (BSTR), cujas conversas e debates foram fundamentais para o sucesso deste projeto.

À minha família, pelo amor, apoio e compreensão constantes, agradeço profundamente por serem minha fonte inesgotável de força nesta jornada de aprendizado e crescimento.

À equipe técnica da central analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE e do Instituto Nacional de Tecnologia em União e Revestimentos de Materiais, pelo suporte em todas as etapas das análises do material produzido.

Um agradecimento especial também à Dayane do laboratório de cultura celular vinculado ao BSTR, que ajudou significativamente nos testes *in vitro*.

Ao técnico Marcos, minha gratidão por sua contribuição valiosa no processo de adaptação da impressora, fazendo toda a diferença.

Quero expressar meu reconhecimento aos membros da banca por terem aceitado o convite e por suas valiosas contribuições. Sua disponibilidade e atenção foram fundamentais para o crescimento deste trabalho.

RESUMO

Um dos principais desafios na medicina contemporânea reside no tratamento de lesões ósseas. Alguns dos implantes utilizados para esse propósito, como os de platina e os de polímeros convencionais, frequentemente resultam em problemas como incompatibilidade e disparidade nos coeficientes de dilatação dos materiais. Assim, procedimentos de substituição ou enxerto são extensivamente adotados para tratar tecidos danificados por doenças graves, traumas ou fatores relacionados à idade avançada. Apesar de sua relevância, o transplante de tecidos ainda enfrenta diversas limitações, que vão desde questões econômicas até problemas associados aos métodos cirúrgicos. Estes podem causar morbidade no local doador, riscos de transmissão de doenças e até rejeição do tecido. Recentemente, avanços nas tecnologias de eletrofiação e manufatura aditiva possibilitaram o desenvolvimento de *scaffolds* altamente organizados, aplicados à regeneração de tecidos. Neste estudo, propomos a produção de *scaffolds* nanofibrosos destinados à engenharia de tecido ósseo, utilizando a combinação dessas tecnologias inovadoras. Criamos um sistema de eletrofiação a curta distância, adaptando uma impressora 3D (Fused Deposition Modeling) para esse fim. Sintetizamos nanopartículas de hidroxiapatita por precipitação química e preparamos três soluções poliméricas distintas: a primeira de poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e as outras duas de poli(ϵ -caprolactona)/hidroxiapatita (PCL/HA) com diferentes proporções de HA. A hidroxiapatita foi caracterizada por meio de técnicas como microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), difratometria de raios-x (DRX) e análise térmica (TGA). Essas análises confirmaram a morfologia, as bandas de absorção características no infravermelho, a estrutura cristalina e a estabilidade térmica do material obtido. Para produzir os *scaffolds* estruturados à base de nanofibras, utilizamos o método de eletrofiação a curta distância acoplada à impressora 3D. Os três *scaffolds* de nanofibras foram caracterizados também por FTIR, TGA, MEV, espectroscopia por energia dispersiva (EDS) e microscopia óptica. Além disso, foram submetidos a testes mecânicos e ensaios de intumescimento, nos quais foram evidenciadas propriedades essenciais de estabilidade e resistência do material, expressas por valores de módulo de Young (E), tensão máxima, tensão de ruptura (TR), alongamento máximo (EM) e grau de intumescimento (GI). Os testes de citotoxicidade confirmaram que o biomaterial é atóxico. As análises realizadas

validaram a eficácia da impressora como um sistema para a produção eficiente de *scaffolds* com orientação de fibras, e evidenciaram a produção bem sucedida de um biomaterial com potencial aplicação na medicina regenerativa.

Palavras-chave: tecido ósseo; manufatura aditiva; eletrofiação; hidroxiapatita; poli(ϵ -caprolactona).

ABSTRACT

One of the primary challenges in contemporary medicine lies in the treatment of bone injuries. Some of the implants used for this purpose, such as platinum and conventional polymer implants, often result in issues like material incompatibility and disparities in coefficients of expansion. Consequently, replacement or grafting procedures are extensively adopted to address tissues damaged by severe diseases, traumas, or factors associated with advanced age. Despite their significance, tissue transplantation still faces several limitations, ranging from economic concerns to issues associated with surgical methods. These can cause donor site morbidity, disease transmission risks, and even tissue rejection. Recently, advancements in electrospinning and additive manufacturing technologies have enabled the development of highly organized scaffolds applied in tissue regeneration. In this study, we propose the production of nanofibrous scaffolds aimed at bone tissue engineering using the combination of these innovative technologies. We have created a short-distance electrospinning system by adapting a 3D printer (Fused Deposition Modeling) for this purpose. We synthesized hydroxyapatite nanoparticles through chemical precipitation and prepared three distinct polymeric solutions: the first consisting of poly(ϵ -caprolactone) (PCL) and the other two of poly(ϵ -caprolactone)/hydroxyapatite (PCL/HA) with different HA proportions. The hydroxyapatite was characterized using techniques such as scanning electron microscopy (SEM), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffractometry (XRD), and thermal analysis (TGA). These analyses confirmed the morphology, characteristic infrared absorption bands, crystalline structure, and thermal stability of the obtained material. To produce structured nanofiber-based scaffolds, we employed the short-distance electrospinning method coupled with the 3D printer. The three nanofiber scaffolds were also characterized by FTIR, TGA, SEM, energy-dispersive spectroscopy (EDS), and optical microscopy. Additionally, they underwent mechanical tests and swelling assays, demonstrating essential stability and material resistance properties expressed by Young's modulus (E), maximum stress, rupture stress (RS), maximum elongation (ME), and swelling degree (SD). Cytotoxicity tests confirmed the biomaterial's non-toxic nature. The conducted analyses validated the printer's effectiveness as a system for the efficient production of fiber-oriented scaffolds and demonstrated the successful production of

a biomaterial with potential application in regenerative medicine.

Keywords: bone tissue; additive manufacturing; electrospinning; hydroxyapatite; poly(ϵ -caprolactone).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do osso	20
Figura 2 - Tríade da engenharia de tecidos	21
Figura 3 - Aparato de eletrofiação	23
Figura 4 - Representação do jato de eletrofiação.....	24
Figura 5 - Representação esquemática de modelagem de deposição fundida.....	30
Figura 6 - Estrutura cristalina da hidroxiapatita em uma célula unitária	31
Figura 7 - Polimerização por abertura do anel da ϵ -caprolactona formando o PCL.....	32
Figura 8 - Unidade monomérica da poli(ϵ -caprolactona).	32
Figura 9 - Etapas de desenvolvimento do trabalho	34
Figura 10 - Etapas experimentais para a síntese da hidroxiapatita.....	37
Figura 11 - Representação esquemática do preparo das soluções de PCL/HA.....	38
Figura 12 - Impressora 3D Cliever (CL-1 Black Edition) e seus principais componen- tes.....	38
Figura 13 - Placa de fibra de vidro virgem	40
Figura 14 – Adaptação da impressora (a) cabeça de impressão a ser substituída; (b) novo suporte instalado para recepção da seringa, da mangueira de pressão e do eletrodo positivo.....	40
Figura 15 - Pistões de bronze	41
Figura 16 - Sistema de eletrofiação após adaptações da impressora 3D	41
Figura 17 - Representação das dimensões do corpo de prova	44
Figura 18 - Espectro FTIR para a hidroxiapatita calcinada a 900 °C.	47
Figura 19 - Difratoograma de raios-X da HA calcinada à 900 °C.	48
Figura 20 - Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura para HA: (a) magnificação 100 kx; (b) magnificação 200 kx.....	49
Figura 21 - Histograma de distribuição por tamanho de partícula para a hidroxiapatita	49
Figura 22 - Curva TG da hidroxiapatita.....	50
Figura 23 - <i>Scaffolds</i> produzidos com escrita orientada de fibras: (a) PCL; (b) PCL/HA5; (c) PCL/HA10.....	51
Figura 24 – Imagens de Microscopia Óptica para <i>scaffolds</i> com escrita de fibras ori- entada.....	52

Figura 25 – Imagens de MEV para escrita orientada de fibras com perfil em xadrez: (a) magnificação 100 kx; (b) magnificação 200 kx.....	52
Figura 26 – Imagens de MEV para escrita orientada de fibras com perfil retilíneo: (a) magnificação 200 kx; (b) magnificação 500 kx.....	53
Figura 27 – Imagens de MEV do <i>scaffold</i> de PCL: (a) magnificação 10 kx; (b) Magnificação 20 kx; (c) histograma de diâmetro da fibra.....	53
Figura 28 – Imagens de MEV e distribuição de diâmetro de fibra para <i>scaffolds</i> de PCL/HA 5%: (a) magnificação 10 kx; (b) magnificação 20,1 kx; (c) histo- grama de diâmetro da fibra.....	54
Figura 29 – Imagens de MEV e distribuição de diâmetro de fibra para <i>scaffolds</i> de PCL/HA 10%: (a) magnificação 10 kx; (b) magnificação 20 kx; (c) histo- grama de diâmetro da fibra.....	55
Figura 30 - Espectro de EDS para <i>scaffolds</i> de PCL/HA: (a) PCL/HA(5); (b) PCL/HA(10).....	56
Figura 31 - Mapa de EDS: (a) para o <i>scaffold</i> de PCL/HA(5); (b) mapa do carbo- no; (c) mapa do oxigênio; (d) mapa do cálcio; (e) mapa do fósforo.	56
Figura 32 - Mapa de EDS: (a) para o <i>scaffold</i> de PCL/HA(10); (b) mapa do carbo- no; (c) mapa do oxigênio; (d) mapa do cálcio; (e) mapa do fósforo.....	57
Figura 33 – Espectro FTIR para HA e <i>scaffolds</i> fibrosos: (a) hidroxiapatita; (b) PCL; (c)PCL/HA.....	59
Figura 34 – Curva TG para <i>scaffolds produzidos</i> : curva de PCL em azul, curva de PCL/HA(5) em verde e curva de PCL/HA(10) em vermelho.....	61
Figura 35 – Gráfico de grau de intumescimento para <i>scaffolds</i> eletrofiados represen- tado com os respectivos desvios padrão.....	62
Figura 36 – Curvas típicas de tensão-deformação dos andaimes de PCL, PCL/HA (5) e PCL/HA(10).....	65
Figura 37 – Propriedades mecânicas dos andaimes: (a) Módulo de Young; (b) Ten- são máxima; (c) Tensão de ruptura; (d) Elongamento máximo.....	66
Figura 38 - Viabilidade celular das células Vero nos <i>scaffolds</i> eletrofiados de PCL, PCL/HA(5) e PCL/HA(10).....	68
Figura 39 – Desenho mecânico do pistão de bronze.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Reagentes/solventes utilizados para desenvolvimento do trabalho.....	34
Tabela 2 - Equipamentos utilizados para desenvolvimento do trabalho.....	35
Tabela 3 - Condições experimentais para produção dos <i>scaffolds</i> eletrofiados....	42
Tabela 4 - Atribuições das frequências vibracionais observadas no espectro de de FTIR da HA.....	47
Tabela 5 - Atribuições das frequências vibracionais observadas no espectro de de FTIR para <i>scaffolds</i> de poli(ϵ -caprolactona)	60
Tabela 6 - Dados obtidos a partir da análise termogravimetrica dos <i>scaffolds</i> produzidos.....	62
Tabela 7 - Valores do grau de intumescimento para os <i>scaffolds</i> eletrofia- dos e seus respectivos valores de desvios padrão.....	63
Tabela 8 – Valores obtidos para cada propriedade mecânica dos <i>scaffolds</i> ele- trofiados e respectivos desvios padrão.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cm	Centímetro
CPU	<i>Central Processing Unit</i>
°C	Graus Celsius
°C/min	Graus Celsius por minutos
DRX	Difração de raio-x
E	Módulo de Young
EDS	Espectroscopia por energia dispersiva
EM	Enlogamento máximo
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
G.I.	Grau de intumescimento
h	hora
HA	Hidroxiapatita
hPDLSCs	Células-tronco do ligamento periondotal humano
Hz	<i>Hertz</i>
ICSD	<i>Inorganic crystal structure database</i>
kV	<i>Kilovolt</i>
L	Litro
min	minuto
mol/L	Mol por litro
MTT	[3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2-5-di-fenil brometo de tetrazolina)]
NFES	<i>Near field electrospinning</i>
nm	Nanômetro
N/min	Newton por minuto
NSF	<i>National Science Foudation</i>
NTC	<i>Negative temperature coefficient</i>
PBS	Solução tampão fosfato-salino
PCL	Poli(ε-caprolactona)
PCL/HA	Policaprolactona e hidroxiapatita
PCL/HA5	Policaprolactona e hidroxiapatita 95:5
PCL/HA10	Policaprolactona e hidroxiapatita 90:10
pH	Potencial hidrogeniônico

TCP	Tricálcio fosfato
TM	Tensão máxima
TR	Tensão de ruptura
u.a	Unidades arbitrárias
UV	Ultravioleta
3D	Tridimensional

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	OBJETIVOS	18
1.1.1	Objetivo geral.....	18
1.1.2	Objetivos específicos.....	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1	O OSSO E A ENGENHARIA DE TECIDO ÓSSEO.....	19
2.2	ELETROFIAÇÃO.....	22
2.2.1	Parâmetros da solução.....	25
2.2.2	Parâmetros ambientais.....	26
2.2.3	Parâmetros do processo.....	26
2.3	ELETROFIAÇÃO DE CAMPO PRÓXIMO.....	27
2.4	IMPRESSÃO 3D.....	28
2.5	HIDROXIAPATITA.....	30
2.6	POLI(ε-CAPROLACTONA).....	32
3	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	34
3.1	MATERIAIS.....	34
3.2	EQUIPAMENTOS.....	35
3.3	SÍNTESE DA HIDROXIAPATITA NANOESTRUTURADA (nHA).....	35
3.4	PREPARO DAS SOLUÇÕES.....	37
3.4.1	Solubilização do PCL.....	37
3.5	ADAPTAÇÃO DA IMPRESSORA 3D PARA O SISTEMA DE ELETROFIA- ÇÃO.....	38
3.6	ELETROFIAÇÃO DOS SCAFFOLDS.....	41
3.6.1	Scaffolds de PCL e PCL/HA.....	41
3.7	TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO.....	42
3.7.1	Microscopia eletrônica de Varredura com acoplamento EDS (MEV-EDS).....	42
3.7.2	Microscopia Óptica.....	42
3.7.3	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	42
3.7.4	Difração de Raio-X (DRX).....	43

3.7.5	Análise Termogravimétrica (TGA).....	43
3.7.6	Grau de Intumescimento (GI).....	43
3.7.7	Ensaio Mecânico.....	43
3.7.8	Cultura Celular.....	44
3.7.9	Ensaio de Citotoxicidade	44
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4.1	NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA.....	46
4.1.1	Caracterização física e química.....	46
4.2	SCAFFOLDS DE PCL e PCL/HA.....	51
4.2.1	Obtenção de <i>scaffolds</i> eletrofiados.....	51
4.2.2	Caracterização física e química.....	51
4.3	ENSAIO DE INTUMESCIMENTO.....	62
4.4	ANÁLISE MECÂNICA.....	64
4.5	ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE.....	68
5	CONCLUSÃO.....	70
5.1	PERSPECTIVA.....	71
	REFERÊNCIAS.....	72
	APÊNDICE A – DESENHO MECÂNICO DO PISTÃO DE BRONZE.....	80

1 INTRODUÇÃO

Procedimentos de substituição ou enxertia óssea são largamente empregados para o tratamento de tecidos danificados por ocorrência de doenças graves, traumas ou fatores relacionados à idade avançada. De fato, é um tratamento que pode ser realizado em diferentes partes do corpo, desde estruturas dentárias até crânio facial [1,2,3] e por isso apresenta vasta aplicabilidade.

Apesar de sua importância, procedimentos de transplante de tecidos ainda apresentam muitas limitações, que vão desde a inviabilidade econômica do procedimento para muitos pacientes [4] até problemas diretamente relacionados ao tipo de mecanismo, como no caso dos enxertos que, a depender do método, pode ocasionar morbidade no sítio doador, riscos de transmissão de doenças e até rejeição [5].

Nesse contexto, a engenharia de tecidos vem ganhando destaque, uma vez que essa área tem como objetivo regenerar ou reparar as funções do tecido doente que não cicatriza espontaneamente, como o osso, e surge como um campo promissor para superar os desafios dos tratamentos convencionais de enxertia óssea. Esta baseia-se em três importantes elementos, são eles: células, fatores de crescimento e *scaffold* ou andaime (matriz polimérica 3D) [2,3].

No que se refere aos *scaffolds*, estes podem ser produzidos a partir de nano e microfibras, sendo assim denominados de fibrosos e desempenham importante papel para o sucesso dos processos aplicados à engenharia de tecidos, pois interagem com as células e os fatores de crescimento para regenerar ou reparar um tecido específico, fornecendo um bom suporte para acomodação celular e assim guiando seu crescimento [3,6].

Uma das características que potencializa o crescimento celular e, consequentemente as funções relacionadas é a orientação das fibras. Os *scaffolds* produzidos a partir de um controle sobre a orientação das fibras são essenciais para gerenciar o crescimento das células e a regeneração de tecidos. *Scaffolds* nanofibrosos são comumente produzidos pelo processo de eletrospiação e quando esse processo é conduzido à curta distância há a possibilidade de produção de materiais com estruturas bem definidas. Avanços recentes nessa tecnologia ainda permitem o acoplamento entre o processo de eletrospiação e à manufatura aditiva para o desenvolvimento de andaimes com elevado grau de controle arquitetônico [7].

Por ser um método simples, versátil e barato a eletrofiação é bastante aplicada na engenharia de tecidos produzindo estruturas para mimetização da matriz extracelular [8]. *Scaffolds* produzidos a partir desta técnica devem apresentar boa biocompatibilidade, biodegradação e serem absorvíveis. Nesse sentido, a ideia de produzir os andaimes compostos por polímeros biodegradáveis e cerâmicas bioativas é uma estratégia promissora para o desenvolvimento de sistemas aplicados à regeneração de tecido ósseo.

A hidroxiapatita (HA) é o principal componente da matriz óssea, sendo o osso um compósito natural cerâmico composto por fibrilas de colágeno contendo materiais inorgânicos nanocristalinos e bastonetes incorporados. Dessa forma, a HA sintética apresenta vasta aplicabilidade no campo da regeneração óssea devido às suas características biológicas [9,10,11]. A estreita semelhança da HA sintética com o osso natural levou a extensos esforços de pesquisas para usá-la como componente de substitutos ósseos. Partículas de HA em nanoescala já provaram ser um material osteocondutor [12].

O poli(ϵ -caprolactona) (PCL), por sua vez, é um polímero biodegradável com notável tenacidade, boa biocompatibilidade e alta resistência mecânica [8,13]. Apresenta fraca molhabilidade da superfície e interação com fluidos biológicos o que dificulta a adesão e proliferação celular e, por esta razão, para obter propriedades mecânicas aprimoradas, o PCL é utilizado frequentemente como matriz polimérica em compósitos incluindo fases inorgânicas osteogênicas (que permitem a formação de novos vasos sanguíneos e estimula a formação de células ósseas) e osteoindutoras (que induzem a diferenciação de células tronco em células osteogênicas após contato com a matriz óssea) [8] como é o caso da hidroxiapatita.

De maneira geral, os biomateriais preparados para a regeneração óssea devem apresentar propriedades mecânicas e estruturais semelhantes ao osso [14] e estruturas favoráveis a adesão, proliferação e diferenciação celular para que haja regeneração efetiva do tecido [3,8].

Felizmente os *scaffolds* produzidos a partir de fibras nano ou micrométricas resultam em materiais que respondem positivamente a diversos estímulos. Assim o ordenamento das fibras pode otimizar as propriedades mecânicas do material promovendo melhorias na adesão e proliferação das células, orientação no crescimento celular, podendo também permitir uma melhor diferenciação osteogênica.

Diante do exposto, este trabalho buscou uma nova estratégia para a produção de *scaffolds* de PCL e PCL/HA [poli(ϵ -caprolactona) e hidroxiapatita] com *design* de fibras orientadas. Trata-se da produção de materiais fibrosos a partir de um sistema de eletrofiação adaptado a uma impressora 3D, que possibilitou obter estruturas que podem mimetizar a matriz extracelular e, além disso, abrir caminhos para impressão estruturada de tecidos danificados.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

- Produzir *scaffolds* de PCL e PCL/HA com escrita de fibras orientada para aplicação na engenharia do tecido ósseo utilizando a técnica de eletrofiação adaptada à impressão 3D.

1.1.2 Objetivos específicos

- Adaptar uma impressora 3D para realizar o processo de eletrofiação com escrita de fibras orientada;
- Sintetizar e caracterizar hidroxiapatita nanoestruturada;
- Produzir *scaffolds* poliméricos de PCL e PCL/HA;
- Caracterizar os *scaffolds* produzidos.
- Realizar testes mecânicos e de intumescimento nos *scaffolds* eletrofiados.
- Avaliar a toxicidade dos *scaffolds*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

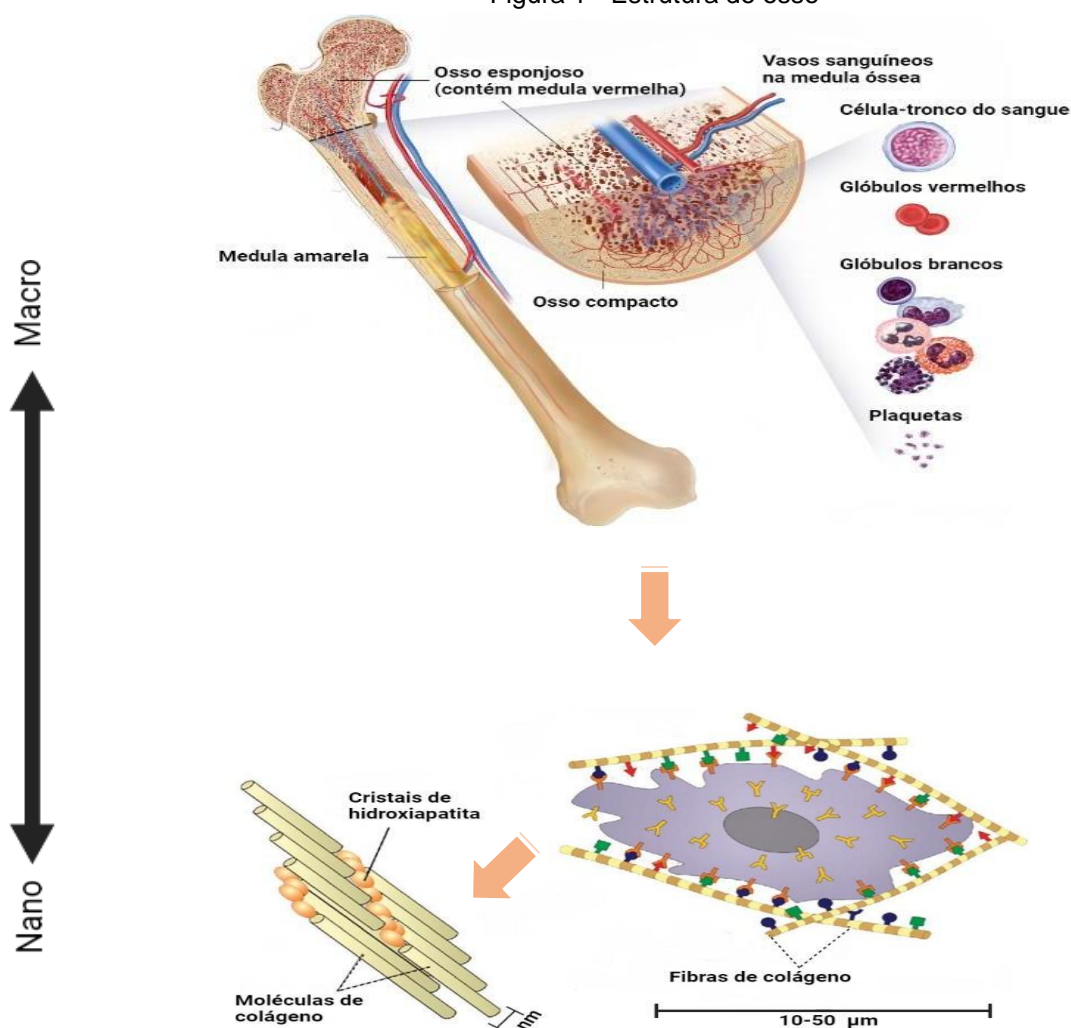
2.1 O OSSO E A ENGENHARIA DE TECIDO ÓSSEO

O osso é uma forma especializada de tecido conjuntivo mineralizado altamente organizado. É um material biocerâmico composto por cerca de 50-70% de constituintes inorgânicos (principalmente nano-hidroxiapatita) e cerca de 20-40% de constituintes orgânicos (principalmente colágeno tipo I), 5-10% de água e 3% de lipídios, e apresenta uma estrutura hierárquica que varia de macro a nano escala [15, 16, 17]. Apesar de seu aspecto inerte, desenvolve diversas funções importantes no organismo como sustentação, proteção dos tecidos moles, armazenamento de cálcio e fosfato e acolhimento da medula óssea [18].

Em uma macro escala, divide-se em osso compacto (a camada externa dura) e osso esponjoso interno ou trabecular (a camada interna esponjosa que contém medula vermelha) como podemos observar na Figura 1 [19]. O osso esponjoso encontra-se principalmente nas extremidades dos ossos. A medula óssea, por sua vez, é encontrada no centro da maioria dos ossos e possui muitos vasos sanguíneos. São dois os tipos de medula óssea, a vermelha e a amarela. A medula vermelha apresenta células-tronco sanguíneas que podem se tornar glóbulos vermelhos, glóbulos brancos ou plaquetas, já a medula amarela é composta principalmente por gordura [20].

Em uma micro escala, têm-se as fibras de colágeno mineralizadas se formando com arranjos planares (lamelas) e em uma nanoescala essas lamelas consistem em fibrilas de colágeno mineralizadas dispostas em padrões geométricos. Sendo as fibrilas um conjunto de moléculas de colágeno que se formam a partir de três cadeias de aminoácidos e nano-HA. O osso compacto, por sua vez, consiste em ósteons e canais de Havers que circundam vasos sanguíneos [21,22].

Figura 1 - Estrutura do osso



Fonte: Adaptado (MITRA, 2013).

O osso apresenta também três tipos de células em sua composição, os osteoblastos mononucleados responsáveis pela formação óssea, os osteócitos derivados dos osteoblastos que são fundamentais para a desintegração da matriz óssea e os osteoclastos multinucleados que são responsáveis pela síntese de enzimas lisossômicas [19].

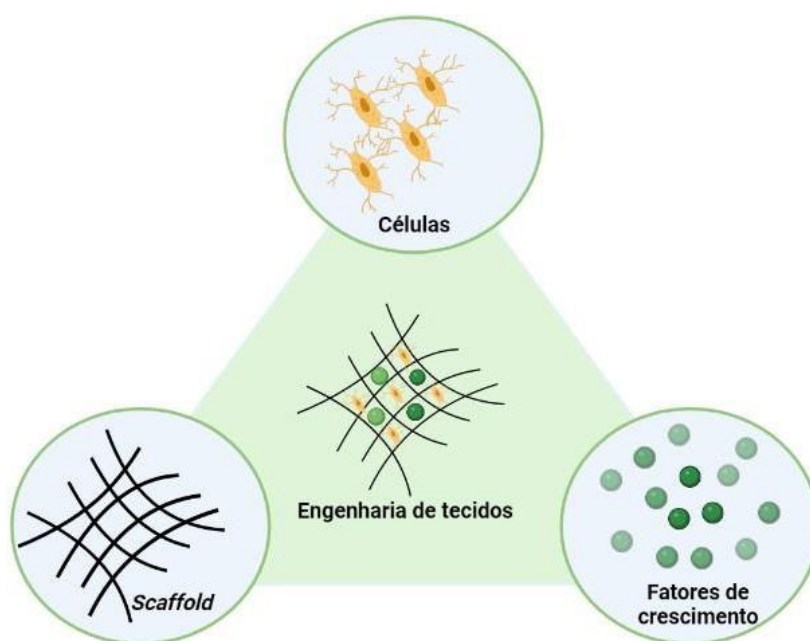
O osso é continuamente renovado pela incidência de ações conjuntas realizadas pelas células ósseas, como: reabsorção óssea pelos osteoclastos e formação óssea pelos osteoblastos, enquanto que os osteócitos atuam como mecanossensores e direcionadores do processo de remodelação óssea [18,19], mas existem diversos fatores que impossibilitam a recuperação óssea completa e, nesse sentido, há a necessidade de consolidação. Esses fatores podem estar diretamente relacionados a acidentes (de trânsito, por exemplo), idade avançada e distúrbios ósseos que trazem enormes prejuízos à saúde e qualidade de vida das pessoas.

Anualmente centenas de procedimentos usando enxertos ósseos ou materiais substitutos são utilizados para tratamento de defeitos, sendo um dos tecidos mais transplantados em todo o mundo [23], no entanto assim como os materiais de enxerto “padrão ouro” a aplicação de enxerto ósseo autólogo também tem seu fornecimento limitado o que faz a regeneração óssea ser uma área bastante atrativa na engenharia de tecidos.

Abdulgani [24] descreve a engenharia de tecidos como o campo da engenharia que se concentra na regeneração dos tecidos danificados através do desenvolvimento de substitutos biológicos que restauram suas funções. O termo “engenharia de tecidos” originou-se em um *workshop* da *National Science Foundation* (NSF) em Granlibakken na Califórnia e foi publicado nos anais do *Workshop* em 1988 por Skalak. Em 1993 Langer e Vacanti [25] reforçaram esta definição e subdividiram a engenharia de tecidos em três grupos principais (representados na Figura 2), são eles:

- I- Implantação de células isoladas;
- II- introdução de fatores de crescimento nas células para estimular o crescimento celular;
- III- e introdução de células sobre ou dentro de diferentes tipos de *scaffolds* (ou andaimes) que têm a função de mimetizar a matriz extracelular.

Figura 2 - Tríade da engenharia de tecidos



Fonte: A autora (2022).

Os *scaffolds* são suportes que fornecem sustentação mecânica e permitem o transporte de nutrientes e outras moléculas regulatórias [26,27]. Dessa forma, a engenharia de tecido ósseo é a parte da engenharia que se concentra no desenvolvimento de substitutos biológicos aplicados à matriz óssea.

Durante a produção dos *scaffolds*, é essencial empregar uma mistura de materiais que culmine em um suporte estrutural que possa promover uma maior atividade biológica. Essa atividade, por sua vez, impulsiona a osteocondução (o crescimento das células ósseas internamente), a osteointegração (a fixação estável do suporte ao tecido circundante) e a osteoindução (o estímulo das células hospedeiras imaturas para se transformarem em células que contribuem para a formação óssea [23]).

Atualmente diversos métodos são promissores para o desenvolvimento de materiais aplicados à regeneração do tecido ósseo. Dois de destaque são: a eletrofiação e a manufatura aditiva (impressão 3D). Esses métodos podem fornecer às células uma estrutura semelhante ao osso e a porosidade apresentada pelo material facilita o fornecimento de nutrientes às células.

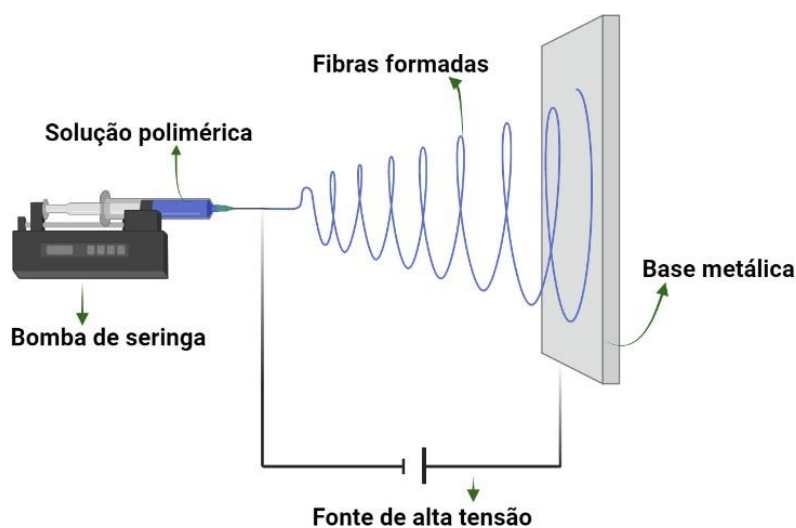
2.2 ELETROFIAÇÃO

A eletrofiação é uma técnica simples, econômica, flexível e viável para produção de fibras poliméricas contínuas que atraiu amplo interesse científico nas últimas décadas devido à sua grande versatilidade e capacidade de fabricar redes nano e microfibrosas altamente ajustáveis [28]. Essa técnica permite a produção de fibras em malhas ou mantas poliméricas com diâmetros que variam de 10nm a 10µm [29].

Membranas nanofibrosas preparadas a partir do processo de eletrofiação possuem propriedades adequadas para aplicação na engenharia de tecidos. Duas dessas propriedades são: alta área de superfície específica e forte plasticidade. Além disso, é possível a manipulação dos componentes da membrana para otimizar suas propriedades. Reduzir o diâmetro da fibra de micrômetros para nanômetros também é uma possibilidade para modificações significativas e potencializadas da resposta da fibra [28,30].

De maneira geral, um sistema de eletrospinning é composto por quatro elementos principais: uma fonte de alta tensão, uma fieira (seringa com agulha), uma bomba de seringa e uma base metálica aterrada, também conhecida por base coletora [31,32]. Na Figura 3 podemos observar a representação de um aparato eletrospinning convencional.

Figura 3 - Aparato de eletrospinning



Fonte: A autora (2022).

O processo é relativamente simples e segue as seguintes etapas: inicialmente os polímeros são dissolvidos por completo até formar uma solução polimérica e o fluido polimérico é inserido na seringa. Os terminais elétricos são ligados na ponta da agulha e no coletor e por fim, é induzida a diferença de potencial pela fonte [33].

Quando a solução polimérica que está depositada na ponta do capilar é submetida ao processo, as cargas injetadas na superfície do líquido são atraídas pelo campo elétrico devido a carga oposta do coletor, criando uma força oposta a tensão superficial [33, 34]. Quando a tensão ultrapassar um valor crítico, a força do campo superará a tensão superficial da gota e a repulsão eletroestática da alta tensão a esticará fazendo com que esta perca sua forma esférica e adquira uma forma cônica, sendo esta forma cônica conhecida como Cone de Taylor [28,35] e está representada na Figura 4.

Figura 4 - Representação do jato de eletrofiação



Fonte: A autora (2022).

Além da área referente ao Cone de Taylor o jato de eletrofiação é ainda subdividido em mais três regiões, sendo elas: a zona de transição (local de início do alongamento da solução polimérica), o segmento estável linear e a zona de dispersão (região onde há formação aleatória de fibras) [36]. O jato de fibra produzido percorre a distância entre a ponta da agulha até o coletor permitindo a evaporação do solvente, que ocorre rapidamente devido à alta superfície de contato da fibra com o ar, ocasionando a deposição de fibras sólidas [29].

A denominação para o Cone de Taylor se deu a partir do estudo da influência do campo elétrico em soluções viscosas. Geoffrey Ingram Taylor foi quem explicou como ocorria a formação do cone na ponta do capilar, ele propôs uma equação que descreve a tensão crítica (V_c) para obtenção do cone em uma solução submetida a ação de um campo elétrico (Eq. 1) [37].

$$V_c^2 = 4 \frac{H^2}{L^2} \left(\ln \frac{2L}{R} - \frac{3}{2} \right) (0,117\pi\gamma R) \quad (Eq.1)$$

Nesta equação a distância entre os eletrodos é determinada por H, o comprimento do tubo capilar é determinado por L, o raio do tubo determinado por R e a tensão superficial do fluido é determinada por γ [37]. Além disso, Taylor explica que as fibras só poderiam ser formadas se o ângulo semivertical do cone fosse de aproximadamente $49,3^\circ$, pois nesta condição um jato estável se formaria sendo capaz de produzir fibras [37].

Existem vários fatores que influenciam o processo de eletrofiação. São esses fatores classificados como parâmetros do processo de eletrofiação, parâmetros da solução e parâmetros ambientais. Esses parâmetros incluem a tensão aplicada pela fonte, a vazão da solução, a distância entre a ponta da agulha e o coletor, a viscosidade e condutividade da suspensão polimérica, temperatura de trabalho e umidade [28,38]. Outro parâmetro muito importante para criação de estruturas organizadas é a distância de trabalho, tendo em vista que o jato de eletrofiação é estável no estágio inicial do processo como descrito neste tópico. A diminuição da distância de trabalho permite o desenvolvimento de estruturas mais definidas [39]. Dessa forma, para se obter uma melhor compreensão da técnica é essencial o entendimento dos efeitos desses parâmetros no material a ser produzido.

2.2.1 Parâmetros da solução

Três parâmetros podem ser destacados quando nos referimos a solução polimérica, são eles: concentração polimérica, viscosidade e condutividade da solução.

A concentração polimérica influencia na viscosidade da solução que é um fator fundamental para a obtenção de fibras eletrofiadas. Também é um fator fundamental para a previsibilidade da morfologia e do diâmetro das fibras produzidas, tendo em vista que o processo de eletrofiação baseia-se no alongamento de um jato unidirecional carregado. O alongamento desse jato é, portanto, afetado de maneira direta pela variação na concentração polimérica da solução [40,41].

Se a solução apresenta uma concentração polimérica muito baixa, consequentemente apresentará uma viscosidade insuficiente para a formação de fibras que, por sua vez, não ocorrerá devido a tensão aplicada não conseguir formar o cone de Taylor (não há o rompimento da tensão superficial). Já as soluções muito concentradas apresentam uma maior viscosidade tornando difícil a aplicação de uma tensão estável. Aumentar a concentração acima do valor crítico (concentração onde há a formação de nanofibras uniformes) dificulta o fluxo da solução pela ponta da agulha podendo até ocasionar o entupimento desta e, portanto, a não formação de fibras [40,41, 42].

Determina-se a condutividade da solução pelas características químicas tanto do polímero quanto do tipo de solvente e também pela presença de íons [40]. Esse

parâmetro afeta tanto a formação do cone de Taylor quanto contribui para o diâmetro da fibra. Em soluções que apresentam uma menor condutividade a superfície da gota não apresentará carga para formar o cone de Taylor e dessa forma não ocorrerá a eletrofiação. Um aumento da condutividade acima de um valor crítico ocasionará uma diminuição no diâmetro da fibra devido ao maior alongamento do jato [5, 41, 43].

2.2.2 Parâmetros ambientais

A temperatura e a umidade são os parâmetros ambientais que influenciam diretamente no processo de eletrofiação, alterando tanto a morfologia quanto o diâmetro da fibra obtida.

O aumento da temperatura resulta em uma alta produção de fibras de baixo diâmetro, pois altera a taxa de evaporação do solvente diminuindo a viscosidade da solução [40,44]. A umidade também altera a taxa de evaporação do solvente ocasionando o aumento da volatilidade o que permite a solidificação do jato e a obstrução da agulha e estimula também a geração de poros na superfície das fibras [40,45].

2.2.3 Parâmetros do processo

São três os parâmetros que se pode destacar que influenciam diretamente o processo de eletrofiação: a taxa de fluxo, a voltagem aplicada e a distância de trabalho (entre a ponta da agulha e a base coletora).

A taxa de fluxo é um parâmetro crucial no processo de eletrofiação pois determina a quantidade de solução polimérica que será disponibilizada para a ponta da agulha. O aumento na taxa de fluxo pode resultar na formação de fibras com morfologias indesejadas, como fibras com nódulos, ou pode também ser usado para produzir fibras porosas pela não vaporização do solvente durante o processo de eletrofiação. Porém se a vazão for inferior a necessária para produção da fibra, pode ocorrer o entupimento no interior da agulha [41].

A voltagem aplicada influencia diretamente na morfologia e no diâmetro do material. Com o aumento da voltagem há a redução do diâmetro das fibras que se justifica pelo aumento da força eletroestática que resulta no alongamento da solução polimérica devido a repulsão da carga dentro do jato [41].

Já a distância entre a ponta da agulha e a base coletora desempenha um papel muito importante na produção de fibras homogêneas. A distância é específica para cada solução polimérica e depende também da temperatura de vaporização do solvente utilizado, pois este deve evaporar antes da chegada ao coletor. Se essa distância for muito pequena pode resultar na formação de fibras planas devido a não evaporação do solvente ocasionando um excesso de umidade; no entanto se a distância for muito grande pode resultar no rompimento das fibras, ocasionando uma morfologia atípica [46].

2.3 ELETROFIAÇÃO DE CAMPO PRÓXIMO

Como descrito anteriormente *electrospinning* ou eletrofiação é um processo de fabricação que resulta na produção de fibras micro e nanométricas. Este processo apresenta potencialidades para produção de *scaffolds* aplicados a regeneração do tecido ósseo pela especificidade do material produzido. Um parâmetro muito importante na produção dessas fibras eletrofiadas, como já apontado, é a distância de fiação que resulta em uma morfologia específica para o andaime fabricado e em variações no seu diâmetro.

Em processos tradicionais de eletrofiação, as fibras são depositadas de maneira “caótica” na base coletora, o que limita sua aplicação em dispositivos que necessitem de uma estrutura fibrosa mais organizada e/ou padronizada. A fim de se ter um controle sobre a morfologia do material obtido, desenvolveu-se nos últimos anos a eletrofiação de campo próximo (em inglês, *Near-field electrospinning* ou NFES) que tem como objetivo principal diminuir a distância de trabalho ao máximo a fim de utilizar o segmento linear do jato de eletrofiação, expandindo significativamente a gama de uso das fibras [39].

O objetivo da NFES é realizar a produção da fibra de forma controlável com eletrofiação de baixa tensão. No processo convencional o jato polimérico carregado flui para longe da gota eletricamente carregada e se move em linha quase reta em um primeiro estágio, à medida que o alongamento e o afinamento ocorrem esse jato fica instável por causa das forças repulsivas e assim as fibras helicoidais ou onduladas são depositadas aleatoriamente no coletor [39, 47,48].

Na abordagem NFES, a instabilidade de flexão pode ser significativamente diminuída com a redução da distância de fiação, de modo que as fibras possam ser

depositadas com bom controle no estágio de segmento linear. Enquanto isso, o coletor é colocado em uma plataforma de movimento bidimensional (2D) que é controlado por um programa de computador para que as fibras com trajetórias predefinidas possam ser depositadas [39,48].

Ao se combinar o movimento correto entre a fonte da solução polimérica e a base coletora, as fibras produzidas podem ser “escritas”, o que permite a construção de *scaffolds* com geometrias específicas que podem ser construídos a partir de sobreposição de camadas, produzindo assim andaimes customizados com geometrias programadas. Isso permite a produção de arquiteturas com poros abertos, fechados ou até mesmo interconectados [49].

Atualmente já existe um grande progresso na fabricação de andaimes poliméricos processados a partir da eletrofiação de campo próximo para aplicações biomédicas. A exemplo, Ren e colaboradores [50] com o objetivo de orientar a regeneração do ligamento periodontal realizaram um estudo comparativo do efeito da nanotopografia na diferenciação de células-tronco de hPDLSCs em fibras eletrofiadas aleatórias e alinhadas. Neste trabalho os autores chegaram à conclusão de que fibras biodegradáveis alinhadas preparadas via eletrofiação de campo próximo guiaram a orientação das hPDLSCs e proporcionaram um melhor microambiente para a regeneração do ligamento periodontal, levando em consideração que a expressão de genes relacionados ao ligamento periodontal foi maior quando o cultivo foi realizado com fibras alinhadas do que quando cultivadas com fibras aleatórias.

Neste trabalho a eletrofiação de campo próximo foi utilizada para produzir *scaffolds* com escrita orientada de fibras aplicados à regeneração do tecido ósseo.

2.4 IMPRESSÃO 3D

A impressão 3D é uma tecnologia disruptiva emergente que está sendo muito aplicada no campo da engenharia de tecidos para fabricação de novos materiais. Essa tecnologia visa essencialmente o desenvolvimento de um produto tridimensional a partir de modelos construídos por *softwares*. É uma técnica de produção de materiais que está em rápida expansão, pois fornece uma maior precisão ao projeto, permite prototipagem rápida e de baixo custo e, além disso, apresenta metodologia de customização livre [51, 52].

Nas últimas duas décadas a impressão 3D proporcionou avanços significativos em diversas áreas, dentre elas a indústria aeroespacial e de produtos de consumo. Na área médica, também já é bastante aplicada principalmente para o desenvolvimento de implantes que são utilizados para substituir tecidos defeituosos ou ausentes [53]. Como nesses casos o material produzido precisa necessariamente ser compatível com os tecidos, os implantes personalizados a partir da impressão 3D se tornam uma solução viável para reprodução anatômica dos pacientes [54].

Com os avanços recorrentes das tecnologias de impressão 3D um número cada vez maior de pesquisadores na área de engenharia de tecidos está utilizando dessa tecnologia enquanto ferramenta transformadora nas suas aplicações. Diversos materiais como biocerâmicas [55] e polímeros biodegradáveis [56] têm sido utilizados na impressão 3D para produzir *scaffolds* biodegradáveis aplicados à regeneração de tecidos.

Em relação à engenharia de tecido ósseo especificamente, os materiais produzidos podem ser osteoindutivos (que induzem a diferenciação de células tronco em células osteogênicas), osteocondutores (que permitem a “invasão” de células osteoprogenitoras do leito para o enxerto) ou reabsorvíveis (que remodelam o osso tanto pela dissolução da estrutura óssea quanto pela formação óssea) e as formas podem ser personalizadas para adequação aos defeitos [57].

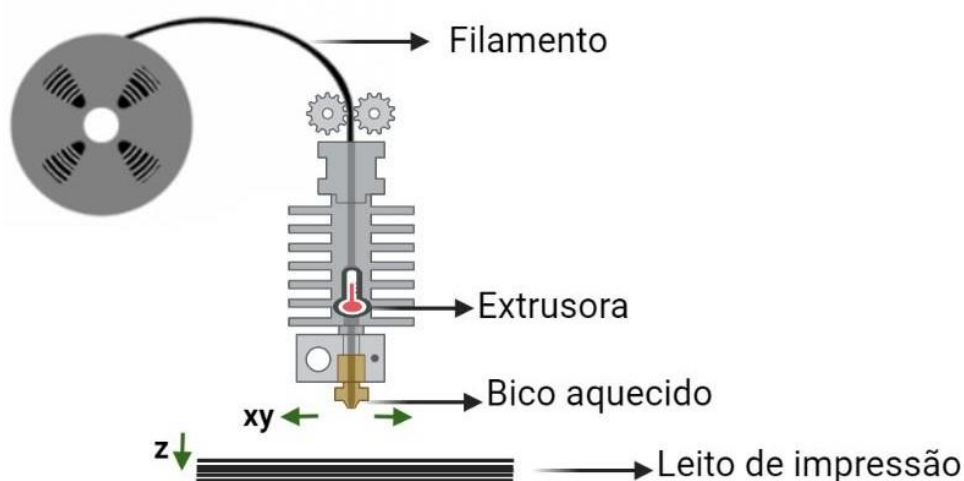
Existe uma série de modelos de impressoras 3D atualmente no mercado e cada tecnologia tem suas peculiaridades, mas todas basicamente seguem o mesmo princípio: a criação de um modelo físico a partir de um modelo digital que é construído de forma aditiva, camada por camada.

Dentre os diferentes processos de impressão 3D acessíveis, o método FDM (*Fused Deposition Modeling* ou modelagem de deposição fundida) é o mais utilizado mundialmente devido sua simplicidade, menor custo e flexibilidade. O processo FDM utiliza filamentos termoplásticos como insumos que são alimentados no bico de impressão [58, 59].

O processo tem início com o filamento geralmente disposto em um rolo sendo empurrado para uma cabeça de aquecimento. A linha do filamento passa por um sistema baseado em motores de passo sendo guiada até o bico de impressão. Neste contato o filamento é derretido e extrusado e, em seguida, deposita-se em camadas finas e regulares sobre um leito (Figura 5). Tanto o leito quanto a cabeça de

aquecimento apresentam movimentação nos três eixos durante o processo de extrusão o que permite a justaposição das camadas com grande precisão. Uma vez resfriado, o objeto se beneficia da dureza dos plásticos e pode ser retirado do leito [58,60,61].

Figura 5 - Representação esquemática de modelagem de deposição fundida



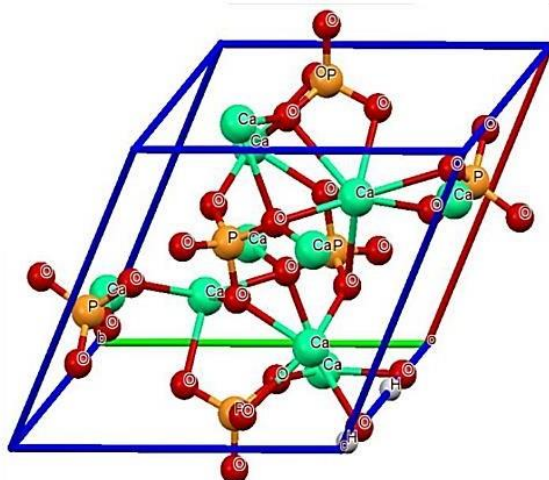
Fonte: A autora (2022).

A manufatura aditiva acoplada a eletrofiação de campo próximo se torna um método promissor para o desenvolvimento de materiais com estruturas bem definidas.

2.5 HIDROXIAPATITA

A hidroxiapatita biológica é o principal constituinte inorgânico dos ossos e dentes em mamíferos. Trata-se de um fosfato de cálcio hidratado que apresenta maior solidez do grupo mineral das apatitas. Tem a seguinte fórmula química: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Sua configuração molecular consiste em 40% Ca, 18,5% P e 3,38% OH em peso, e razão Ca/P de aproximadamente 1,67. Sua estrutura cristaliza-se no sistema hexagonal com grupo espacial P63/m (Fig. 6) e valores de parâmetros de rede igual a: $a = 9,432\text{\AA}$ e $c = 6,881\text{\AA}$ [62,63].

Figura 6 - Estrutura cristalina da hidroxiapatita em uma célula unitária



Fonte: (AWASTHI, 2020).

De maneira geral, o termo Apatita designa os minerais cristalinos que apresentam composição genérica $M_{10}(ZO_4)_6X_2$. Sua estrutura química comporta muitas substituições, portanto, este termo define a estrutura e não a composição do material [64,65,66]. Por apresentar uma excelente afinidade com substâncias biológicas, é largamente utilizada em tratamentos que envolvem o tecido ósseo e pode ser definida como uma substância de origem natural ou sintética [67, 68].

A hidroxiapatita sintética apresenta excelentes propriedades de biocompatibilidade e osteointegração (que se refere a união estável entre o osso e a superfície da hidroxiapatita) [69], a junção de suas propriedades juntamente com sua alta capacidade de adsorver e/ou absorver moléculas fazem com que seja muito aplicada em tratamento de regeneração óssea.

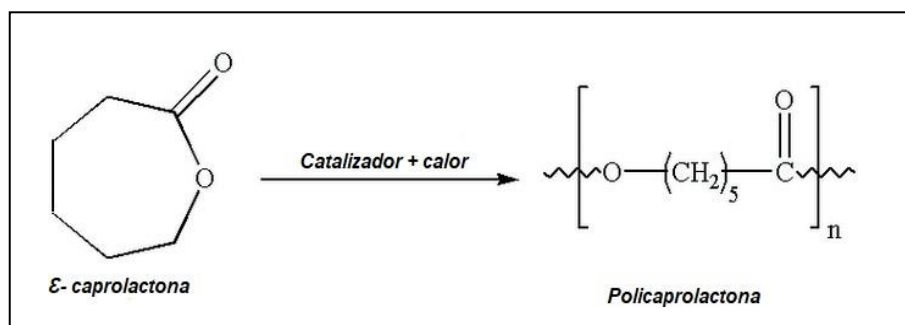
Por apresentar uma grande similaridade com a fase cristalina dos tecidos ósseos, a hidroxiapatita induz o crescimento na região em que se encontra. Esta indução denomina-se osteocondução [63]. A regeneração deste tecido também é induzida pela hidroxiapatita, pois sua superfície permite interações do tipo dipolo, fazendo com que as moléculas de água, proteínas e colágeno sejam adsorvidas em sua superfície. Isso permite a ocorrência de uma forte ligação estabelecida entre a hidroxiapatita e o tecido ósseo na sua superfície sob condições in vivo [70]. Devido à grande semelhança entre a hidroxiapatita sintética e a fase cristalina do tecido ósseo, proliferação de osteoblastos e outras células ósseas são permitidas [71]. A hidroxiapatita tem sido amplamente utilizada em aplicações clínicas, ortopédicas e odontológicas [15].

2.6 POLI(ε-CAPROLACTONA)

A regeneração de tecido ósseo requisita novos materiais de sustento de carga que sejam biocompatíveis e que possibilitem a adesão, proliferação, diferenciação e maturação de células formadoras de ossos [8] e nesse sentido o poli(ε-caprolactona) ou apenas policaprolactona (PCL) apresenta muitas vantagens.

O PCL trata-se de um polímero sintético, biodegradável, biocompatível, semicristalino e que apresenta uma estrutura flexível e alta hidrofobicidade. Este polímero pode ser obtido através da polimerização por abertura de anel da ε-caprolactona como ilustra a Figura 7 ou por policondensação do ácido 6-hidroxicapróico. Seu ponto de ebulição está determinado entre 55 e 60°C e sua temperatura de transição vítrea (Tg) é de aproximadamente -60°C. É solúvel a temperatura ambiente em diversos solventes orgânicos [72,73,74].

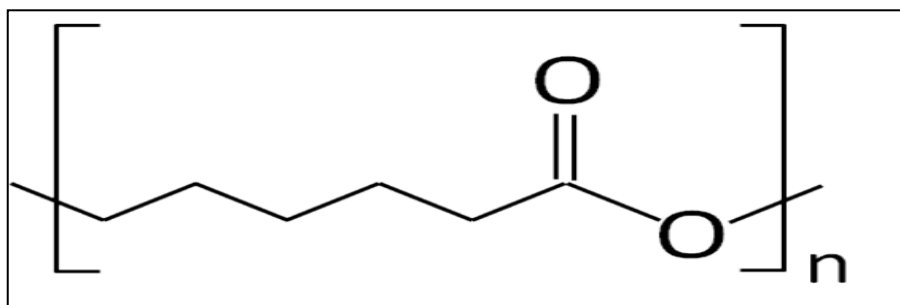
Figura 7- Polimerização por abertura do anel da ε-caprolactona formando o PCL



Fonte: A autora (2022).

Apresenta a seguinte unidade monomérica (Figura 8):

Figura 8 - Unidade monomérica da poli(ε-caprolactona)



Fonte: A autora (2022).

Sua boa solubilidade em vários solventes orgânicos, bem como a possibilidade de encapsulamento de diversos fármacos permitiram que este fosse aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) (órgão governamental dos Estados Unidos responsável pelo controle de alimentos, medicamentos, materiais biológicos, etc.) e assim utilizado clinicamente em sistemas de liberação controlada desde a década de

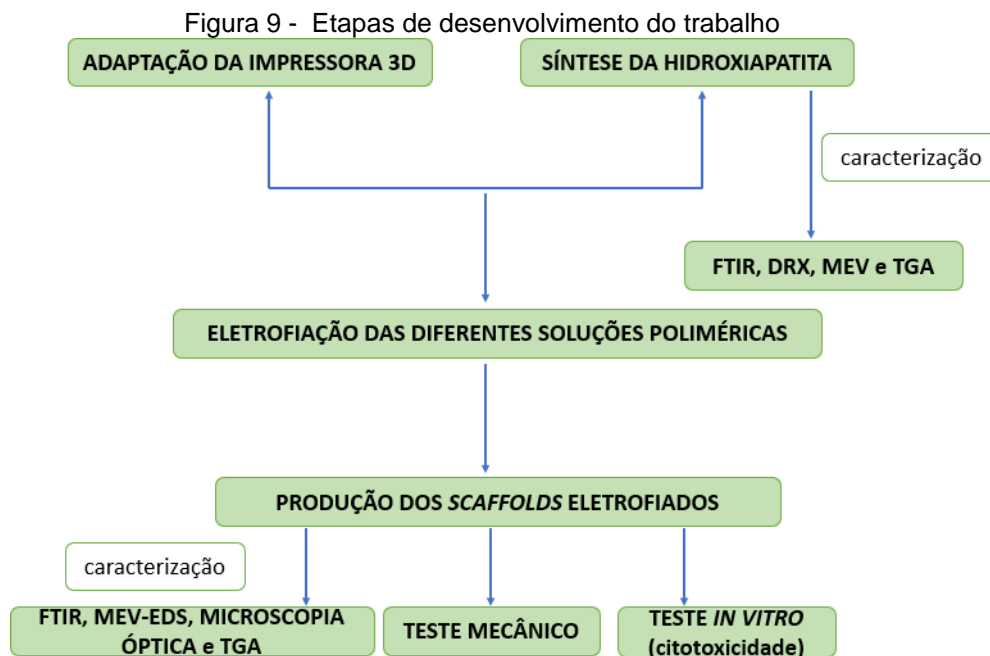
1980 [75]. Por sua vasta disponibilidade em diversos pesos moleculares e pela possibilidade de interação com diferentes tipos celulares tem sido amplamente utilizado na engenharia de tecidos. Por apresentar lenta degradação e alta hidrofobicidade o PCL é geralmente combinado com materiais cerâmicos, como a hidroxiapatita, para ajuste dessa propriedade visando aplicação específica [76].

Vários compósitos, fibras e blendas de policaprolactona têm sido fabricados e aplicados à engenharia de tecido ósseo demonstrando ser um material muito promissor. A exemplo, Park e colaboradores [77] utilizaram o polímero policaprolactona associado ao óxido de grafeno para produção de um material que promovesse a capacidade de diferenciação osteogênica. Neste trabalho, os autores imprimiram *scaffolds* 3D do polímero relatado e revestiram o material com óxido de grafeno confirmando que a metodologia utilizada poderia ser usada para promover a proliferação celular e a diferenciação osteogênica devido as respostas de adesão e proliferação de células-tronco do ligamento periodontal (PDLSCs) nesse material.

Da mesma maneira, WU e colaboradores [78] desenvolveram *scaffolds* tridimensionais impressos a partir de silicato de cálcio (CS), policaprolactona (PCL) e ECM decelularizada (dECM), resultando em uma promissora estratégia para o melhoramento da osteogênese a partir da criação de um ambiente osteoindutor. Neste trabalho, os andaimens de CS/PCL foram revestidos com dECM e seu desempenho biológico foi estudado, resultando em um material que apresenta excelente biocompatibilidade e efetivamente aumenta a adesão celular, proliferação e diferenciação de células-tronco mesenquimais humanas, aumentando a expressão de genes relacionados à osteogênese. A análise histológica de experimentos *in vivo* também apresentou excelentes capacidades regenerativas ósseas do andaime revestido.

3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Uma visão geral das etapas empregadas no desenvolvimento deste trabalho pode ser visualizada no fluxograma da Figura 9.



Fonte: A autora (2022).

3.1 MATERIAIS

Os reagentes e solventes utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Reagentes/solventes utilizados no desenvolvimento do trabalho

Reagentes/Solventes	Fórmula molecular	Densidade (25°C)	Mn/M	Fabricante
<i>Sulfato de cálcio hemihidratado</i>	$\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$	2,73 g/mL	145,15 g/mol	<i>Sigma Aldrich®</i>
<i>Fosfato de amônio monobásico</i>	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1,80 g/mL	115,03 g/mol	<i>Dinâmica®</i>
<i>Hidróxido de amônio</i>	NH_4OH	0,90 g/mL	35,05 g/mol	<i>Sigma Aldrich®</i>
<i>Pellets de poli(ε-caprolactona)</i>	$(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_2)_n$	1,145 g/mL	80,000	<i>Sigma Aldrich®</i>
<i>Dicloro metano</i>	(CH_2Cl_2)	1,33 g/mL	84,93 g/mol	Neon Comercial®

Fonte: A autora (2022).

Todos os reagentes foram utilizados como recebidos do fabricante, sem etapas prévias de purificação.

3.2 EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados para o processo de obtenção da hidroxiapatita e dos *scaffolds* poliméricos, suas sínteses, caracterizações e análises posteriores seguem listados na Tabela 2.

Tabela 2 - Equipamentos utilizados no desenvolvimento do trabalho

Equipamentos	Marca	Modelo
<i>Agitador magnético</i>	FISATOM	753 A
<i>Analisador termogravimétrico</i>	SHIMADZU	DTG-60H
<i>Balança semianalítica</i>	SHIMADZU	AUY 220
<i>Bomba de seringa</i>	NEW ERA	NE1010
<i>Bomba de vácuo</i>	FISATOM	820
<i>Banho ultrassônico</i>	ELMASONIC	EASY
<i>Difratômetro de raios-x</i>	RIGAKU	SMARTLAB
<i>Espectrofotômetro (FTIR)</i>	BRUKER	IFS66
<i>Estufa</i>	QUIMIS	Q317M
<i>Forno Mufla</i>	EDG	F3000 10P
<i>Impressora 3D</i>	CLIEVER	CL1 (BLACK EDITION)
<i>Máquina universal de ensaios</i>	EMIC	DL 10000
<i>MEV com acoplamento EDS</i>	TESCAN	MIRA 3
<i>Microscópio óptico trinocular</i>	MOTIC	SMZ-161-TLED
<i>Phmetro digital</i>	QUIMIS	Q400AS

Fonte: A autora (2022).

3.3 SÍNTESE DA HIDROXIAPATITA NANOESTRUTURADA (nHA)

A hidroxiapatita foi sintetizada via precipitação química. Sendo assim, a metodologia adaptada de KOUTSOPOULOS [79] e proposta por BARBOSA [80] foi a utilizada. A síntese ocorreu a partir dos reagentes sulfato de cálcio hemihidratado

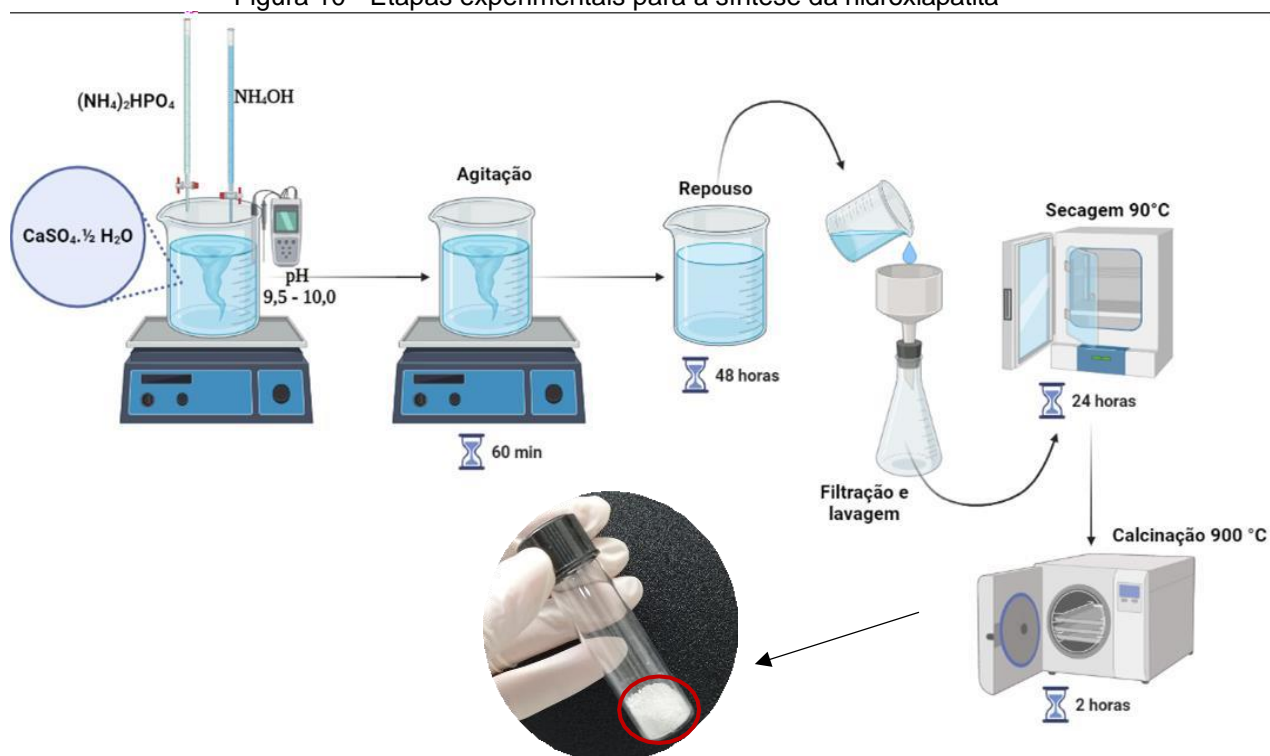
($\text{CaSO}_4 \cdot 1/2 \text{H}_2\text{O}$), fosfato de amônio dibásico ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) e hidróxido de amônio (NH_4OH), todos de grau analítico. Foi realizada, portanto, a mistura de reagentes fonte de cálcio e fósforo mantendo uma razão molar de Ca/P de 1,67.

Inicialmente 500 mL de uma solução de sulfato de cálcio hemihidratado (0,1 mol/L) foi posta em agitação mecânica e seguiu assim durante todas as etapas da síntese. O pH inicial da solução foi definido como sendo 6,0 e elevado até 10 através de adições sucessivas de alíquotas de uma solução de hidróxido de amônio (3,0 mol/L). Em seguida, 500 mL de uma solução de fosfato de amônio dibásico (0,06 mol/L) foi adicionada ao sistema com uma velocidade de incorporação de 20 mL/minuto.

Durante o processo, o pH foi controlado e ajustado para faixa de 10 através do gotejamento da solução de hidróxido de amônio. Após adição dos reagentes o sistema permaneceu sob agitação vigorosa contínua a 25°C durante o período de 1 hora para homogeneização da mistura. Um precipitado de coloração esbranquiçada foi formado e, em seguida, foi envelhecido por 2 dias para formação da hidroxiapatita. A hidroxiapatita sintetizada foi filtrada a vácuo e lavada com água ultrapura até atingir pH 7.

Em seguida, foi submetida ao processo de secagem em estufa a 90°C (para remoção de traços do solvente) por 24 horas e calcinadas em estufa de ar quente durante 2 horas a 900°C. Para confirmar a formação da hidroxiapatita, Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Difração de Raio-X (DRX) foram registrados. A Figura 10 apresenta um modelo esquemático das etapas experimentais para a síntese da hidroxiapatita.

Figura 10 - Etapas experimentais para a síntese da hidroxiapatita



Fonte: A autora (2022).

3.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES

A obtenção dos *scaffolds* eletrofiados de PCL e PCL/HA concretizou-se após uma série de testes para definição dos parâmetros ideais de produção desse material. Algumas variáveis otimizadas foram: distância da ponta da agulha de eletrofição para o coletor, voltagem aplicada e viscosidade da solução.

3.4.1 Solubilização do PCL

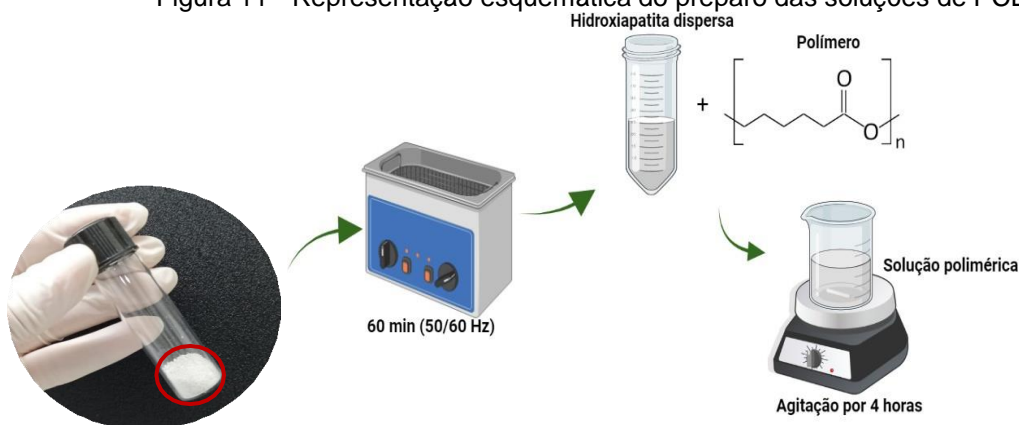
Para preparo dos *scaffolds* eletrofiados foram produzidas soluções de PCL 8,4% (m/v) em diclorometano. A mistura foi posta em agitação por um período de 3 horas à temperatura ambiente e, em seguida, eletrofiada.

3.4.2 Preparo da solução de PCL/HA

Para a produção das soluções de PCL/HA, a hidroxiapatita foi inicialmente dispersa em diclorometano. Essa dispersão foi realizada através de um aparelho de banho ultrassom com frequência ultrassônica de 50/60 Hz, por um tempo de 60 minutos. Em seguida, essa suspensão foi combinada ao polímero de tal forma que a porcentagem em massa do polímero compreendida na mistura fosse de 8,4% em relação ao volume do solvente. As suspensões compreendiam 5 e 10% de HA em relação a massa do polímero (porcentagem definida após amplos testes

experimentais). As misturas foram postas em agitação vigorosa por 4 horas à temperatura ambiente. Dessa forma, duas soluções diferentes foram produzidas, uma contendo PCL e HA na proporção mássica 95:5, e uma segunda na proporção mássica de 90:10. Uma representação esquemática está apresentada na Figura 11.

Figura 11 - Representação esquemática do preparo das soluções de PCL/HA

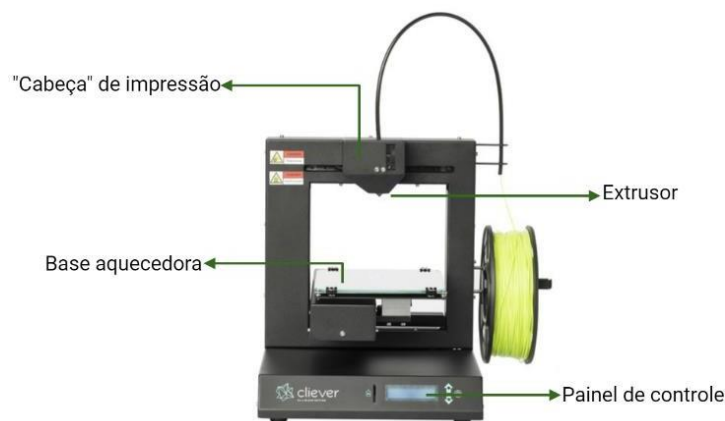


Fonte: A autora (2022)

3.5 ADAPTAÇÃO DA IMPRESSORA 3D PARA O SISTEMA DE ELETROFIAÇÃO

Neste tópico serão descritos os procedimentos realizados para construção de um sistema de eletrofiação à curta distância adaptado a uma impressora 3D a fim de se produzir *scaffolds* eletrofiados com escrita de fibras orientada. A impressora utilizada foi a 3D da marca Cliever, modelo CL-1 *Black Edition* (Fig. 12) que se trata de uma impressora baseada no método de deposição fundida, ou seja, produz a estrutura a partir de filamento polimérico fundido.

Figura 12 - Impressora 3D Cliever (CL-1 Black Edition) e seus principais componentes



Fonte: Adaptado (Manual-da-sua-impressora-3d-cliever-cl1-black-edition.html, 2019).

Originalmente a impressora 3D Cliever (CL-1 *Black Edition*) apresenta a seguinte composição principal: uma “cabeça” de impressão, uma base aquecedora (localizada sob a mesa de vidro utilizada para a deposição do material impresso), um extrusor e um painel de controle [81]. As primeiras adaptações realizadas na impressora resultaram na retirada da base aquecedora e da “cabeça” de impressão, responsáveis por aquecer e injetar o filamento respectivamente. Justifica-se essa retirada pela existência de termistores do tipo NTC (*Negative temperature coefficient*) nesses componentes, responsáveis por enviar para a placa controladora (CPU do equipamento) o sinal correspondente a temperatura daquele bloco.

Os NTC's são termistores de coeficiente negativo, ou seja, apresentam diminuição da resistência ôhmica com o aumento da temperatura, permitindo a circulação de corrente, e, conseqüentemente, produzindo um maior aquecimento, representando assim a capacidade das cerâmicas de NTC de dissiparem potência [82].

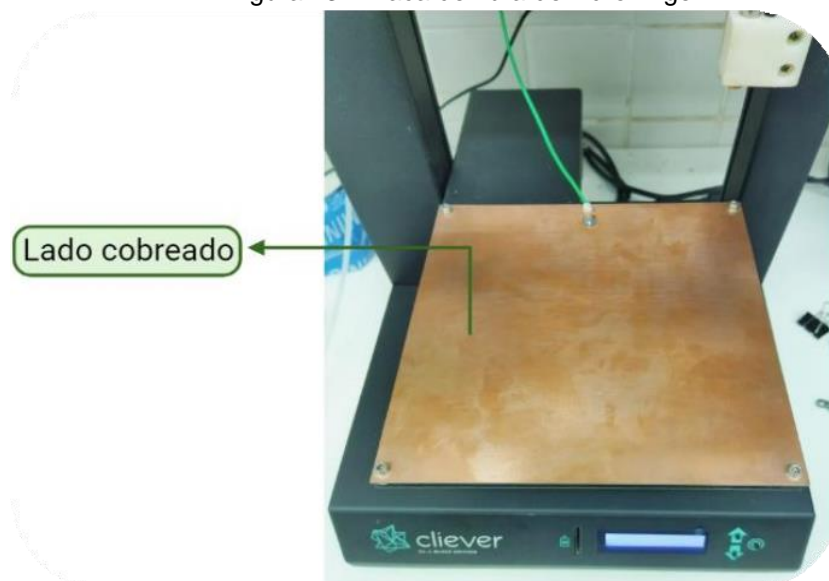
O *software* responsável por enviar os comandos à impressora analisa as temperaturas tanto da base aquecedora quanto da “cabeça de impressão” (também chamada de bico de impressão) e, ao se atingir os valores definidos pelo usuário para a fusão do filamento este aciona os motores e o processo de impressão tem início [81]. Neste trabalho, soluções poliméricas são utilizadas para produção dos *scaffolds* fazendo com que o aquecimento não seja necessário já que filamentos não são manipulados.

Para que a impressora funcione sem aquecimento os NTC's foram substituídos por resistores fixos que têm função limitadora do fluxo de corrente elétrica que por ele passa, tendo essa limitação a denominação de resistência. Resistores fixos apresentam valor de resistência em dois terminais [83].

Essa alteração permite que o processo de eletrofiliação inicie à temperatura ambiente, pois esta será a definida como adequada para início da produção dos *scaffolds*. Após esta modificação, tanto a base aquecedora, quanto a “cabeça de impressão” foram retiradas. A base aquecedora foi substituída por uma placa de circuito impresso de fibra de vidro virgem nas mesmas dimensões com seu lado cobreado voltado para cima como apresenta a Figura 13. Esta placa foi ligada ao

eletrodo negativo da fonte de alta-tensão utilizada nos sistemas convencionais de eletrofiação.

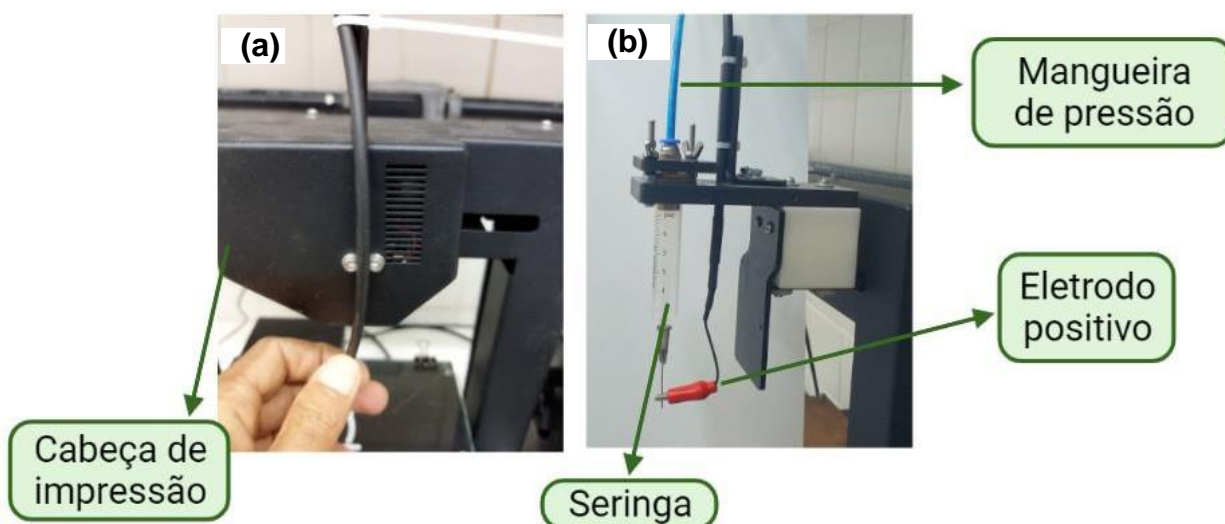
Figura 13 - Placa de fibra de vidro virgem



Fonte: A autora (2022).

Após a realização da retirada da “cabeça de impressão”, um suporte para a recepção da seringa, da mangueira de pressão e do eletrodo positivo (advindo da fonte de alta-tensão) foi construído. Na Figura 14 observa-se a substituição realizada.

Figura 14 - Adaptação da impressora: (a) cabeça de impressão a ser substituída; (b) novo suporte instalado para recepção da seringa, da mangueira de pressão e do eletrodo positivo



Fonte: A autora (2022).

A mangueira de pressão pneumática que apresenta um diâmetro de 4 mm é responsável por injetar pressão de ar no pistão de bronze (Fig. 14) fazendo com que a solução polimérica seja lentamente impulsionada e tenha a vazão efetivada para a

ponta da agulha. Essa injeção é induzida pela bomba de infusão também denominada de bomba de seringa. Os pistões de bronze foram construídos para que, quando acoplados a seringa, permitam a passagem da pressão de ar.

A Figura 15 apresenta os pistões de bronze construídos para adaptar-se as seringas com os respectivos volumes: 1, 5 e 10 mL.

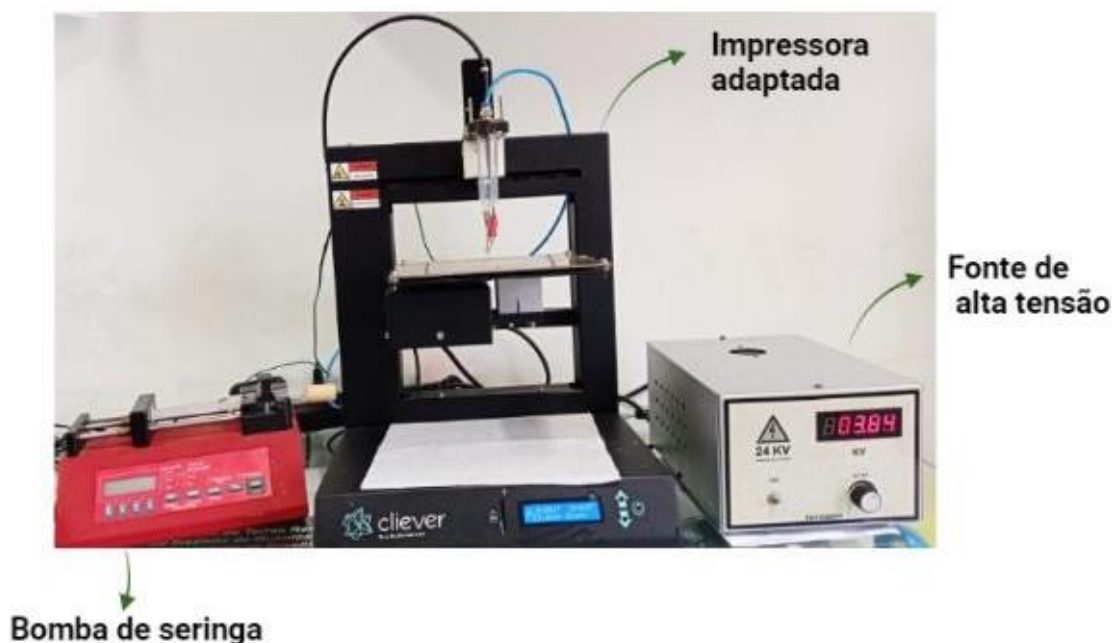
Figura 15 - Pistões de bronze



Fonte: A autora (2022)

O sistema final adaptado pode ser observado na Figura 16.

Figura 16 - Sistema de eletrofiação após adaptações da impressora 3D



Fonte: A autora (2022).

3.6 ELETROFIAÇÃO DOS SCAFFOLDS

3.6.1 Scaffolds de PCL e PCL/HA

Para a eletrofiação dos *scaffolds* de PCL e PCL/HA, 3 mL de cada uma das soluções poliméricas foram postas em uma seringa plástica com agulha metálica de 22G e diâmetro interno de 0,5 μm com ponta romba. A distância percorrida pela solução entre a ponta da agulha até a base coletora foi de 10 mm e as amostras foram

coletadas após 14 minutos de eletrofiiação. Variou-se a voltagem, a concentração de HA e a vazão para cada sistema. As faixas das condições trabalhadas foram registradas na Tabela 3.

Tabela 3 - Condições experimentais para produção dos *scaffolds* eletrofiados

Solução	Voltagem (kV)	Distância (mm)	Vazão (mL/h)	Concentração PCL (% m/v)	Concentração HA (% m/m)
PCL	3,75	10	0,5	8,4	-
PCL/HA	3,85	10	0,5	8,4	5
PCL/HA	3,90	10	0,5	8,4	10

Fonte: A autora (2022).

3.7 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

3.7.1 Microscopia Eletrônica de Varredura com acoplamento EDS (MEV-EDS)

Para as análises morfológicas dos materiais produzidos bem como sua composição foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura (MEV) com o acoplamento EDS (detector de energia dispersiva). As amostras foram fixadas em fitas de carbono que estavam sobrepostas em *stubs* de alumínio e, em seguida, metalizadas com uma fina camada de ouro (aproximadamente 10 nm). Os diâmetros das fibras que formam o *scaffold* foram medidos através do tratamento da imagem utilizando o *software* Image J. Para determinar o diâmetro médio das fibras foram tomadas 200 medidas de cada amostra.

3.7.2 Microscopia Óptica

Para visualização e avaliação do caminho definido das fibras a partir da escrita orientada a microscopia óptica foi adotada.

3.7.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de absorção no infravermelho da hidroxiapatita e dos *scaffolds* eletrofiados foram obtidos por meio das amostras em estado sólido, na forma de pastilhas diluídas em brometo de potássio (KBr). Um espectrofotômetro com transformada de Fourier foi utilizado e as análises foram conduzidas à temperatura ambiente na faixa de 4000-400 cm^{-1} .

3.7.4 Difração de Raio-X (DRX)

Para estudo das fases cristalinas das nanopartículas de hidroxiapatita, a técnica de Difração de Raio-X foi selecionada. Os dados foram coletados à temperatura ambiente, sistema θ - 2θ com varredura angular variando de 04° a 60° , com um tamanho de passo de $0,02^\circ$ e uma velocidade de varredura de $4^\circ/\text{min}$.

3.7.5 Análise Termogravimétrica (TGA)

O comportamento térmico de degradação dos materiais produzidos foi analisado por termogravimetria. A temperatura de análise para a hidroxiapatita foi de $25 - 700^\circ\text{C}$, com taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ sob atmosfera de ar sintético e fluxo de gás de $100 \text{ mL}/\text{min}$. Para os *scaffolds* eletrofiados a temperatura de análise foi de $25-600^\circ\text{C}$, com taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$, também sob atmosfera de ar sintético e fluxo de gás de $100 \text{ mL}/\text{min}$. Para observação, as amostras foram acondicionadas em suportes de platina.

3.7.6 Grau de Intumescimento (GI)

Para análise do grau de intumescimento dos *scaffolds* eletrofiados foram utilizadas amostras com dimensões de $10\text{mm} \times 10\text{mm}$ em triplicata para cada categoria. Os *scaffolds* foram submersos em 20 mL da solução tampão fosfato-salino (PBS) pelos tempos determinados de $0,5\text{h}$, 1h , 3h , 6h , 12 , 24h e 48h , sendo mantido o repouso em temperatura ambiente. No início da análise tomou-se nota das massas iniciais das amostras secas, sendo a massa obtida através da pesagem em balança analítica. Nos tempos determinados as amostras foram retiradas da solução tampão e o excesso da solução removido com papel absorvedor. A capacidade de absorção pelos *scaffolds* quantificada pelo grau de intumescimento (GI) foi calculada utilizando a seguinte equação [84]:

$$GI = \frac{(M_f - M_i)}{M_i} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde M_f é a massa da amostra após período de imersão e M_i é massa da amostra seca inicial.

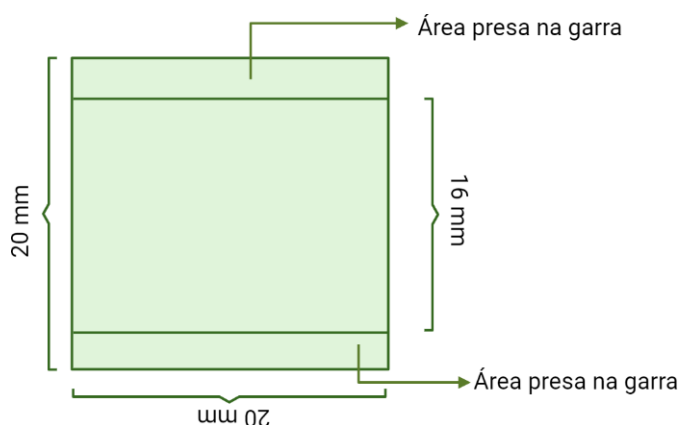
3.7.7 Ensaio Mecânico

Para analisar as propriedades mecânicas dos *scaffolds* foram realizados testes de tração, deformando a amostra até sua fratura a partir da aplicação de uma carga crescente uniaxial. O ensaio de tração foi realizado em um equipamento universal de

ensaios EMIC modelo DL 10000 utilizando o modo tensão de filme. Os testes foram realizados à temperatura ambiente utilizando corpos de provas com as seguintes dimensões: 20 mm x 20 mm e espessura média de 0,5 mm. Os testes foram realizados com uma taxa de força de 5 N/min. Três corpos de prova de cada amostra foram testados. Foi possível obter curvas de tensão-deformação para cada material representando o comportamento da amostra sob tração.

A dimensão final das amostras para a realização do teste, depois de presas nas garras, foi de 16 mm x 20 mm (Figura 17).

Figura 17 - Representação das dimensões do corpo de prova



Fonte: A autora (2022).

3.7.8 Cultura Celular

Células Vero foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 10% (p/v) de soro fetal bovino (*Sigma-Aldrich*) em placas de 12 poços, sendo mantidas em incubadora a 37°C com 5% de dióxido de carbono (CO₂). Culturas de células (10⁶ células/poço) foram usadas para ensaios subsequentes.

3.7.9 Ensaio de Citotoxicidade

Para aferir a qualidade dos *scaffolds* enquanto suporte ao metabolismo celular foram realizados testes de citotoxicidade dos materiais produzidos. Para esse teste, amostras de 0,5 mm de espessura foram cortadas em forma de círculos e esterilizadas por radiação ultravioleta (UV). Para o tratamento por UV, cada lado da membrana foi exposto a essa radiação por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram postas em placas de 12 poços com 35 mm de diâmetro para realização do teste em triplicata para cada grupo de *scaffold* e teve as células sem *scaffolds* como grupo de controle.

O protocolo MTT foi realizado em *scaffolds* eletrofiados. Neste ensaio, o anel tetrazólio do composto solúvel em água brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio quando em contato com células viáveis é clivado e produz cristais de formazan roxos que são insolúveis em soluções aquosas. Esses cristais são consequentemente dissolvidos em solução de solubilização MTT [M-8910]. A quantidade de células viáveis é, portanto, determinada a partir da solução resultante medida espectrofotometricamente. Todas as medidas foram repetidas com 3 amostras para todos os *scaffolds* e seus valores médios foram utilizados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos serão apresentados nesse tópico. Os resultados estão apresentados na seguinte ordem: caracterizações das nanopartículas de hidroxiapatita, produção e caracterização de *scaffolds* de PCL e PCL/HA e, por fim, os resultados referentes aos testes de intumescimento, mecânico e *in vitro* realizados.

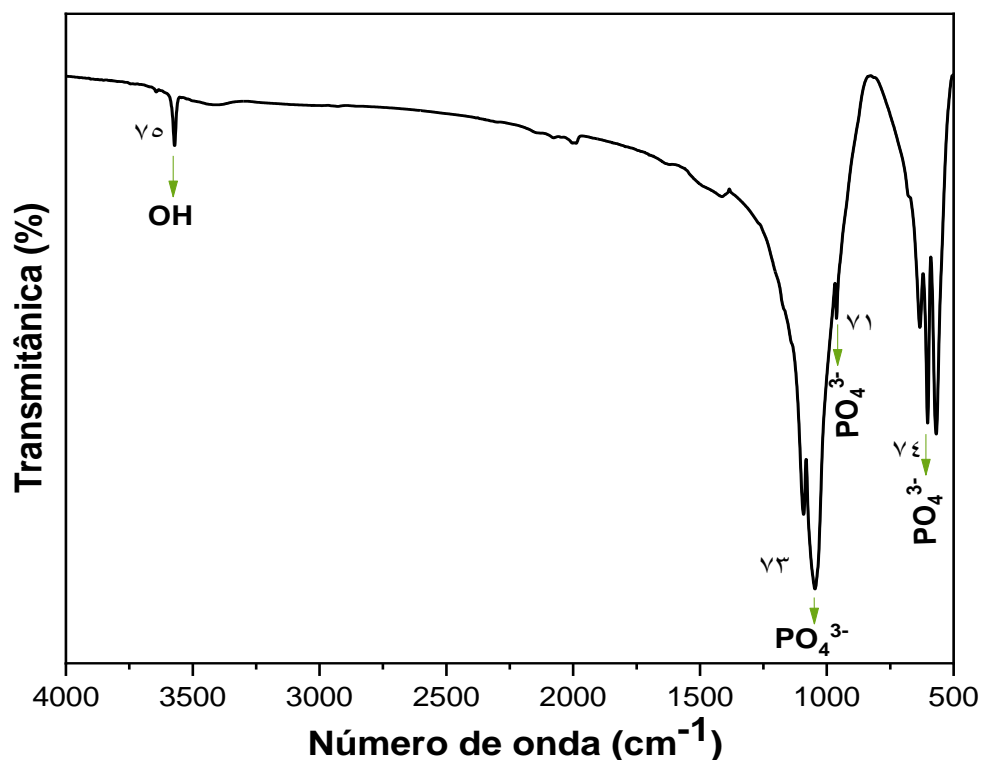
4.1 NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA

4.1.1 Caracterização física e química

A hidroxiapatita foi inicialmente caracterizada a partir da análise dos momentos vibracionais dos grupos funcionais obtidos através do espectro FTIR da amostra. Na Figura 18 é possível observar o espectro do pó de HA após o tratamento térmico a 900°C.

Observa-se uma banda característica de absorção da HA em 3572 cm^{-1} atribuída a ν_5 estiramento O-H de hidroxila. Apresenta também banda de absorção em 1047 cm^{-1} para ν_3 estiramento assimétrico de PO_4^{3-} e em 962 cm^{-1} para ν_1 estiramento simétrico PO_4^{3-} . As bandas de absorção com vibrações em 602 e 569 cm^{-1} são correspondentes a ν_4 deformação O-P-O em PO_4^{3-} ou ν_4 deformação O-P-O em HPO_4^{2-} [85,86].

Figura 18 - Espectro FTIR para a hidroxiapatita calcinada a 900°C



Fonte: A autora (2022).

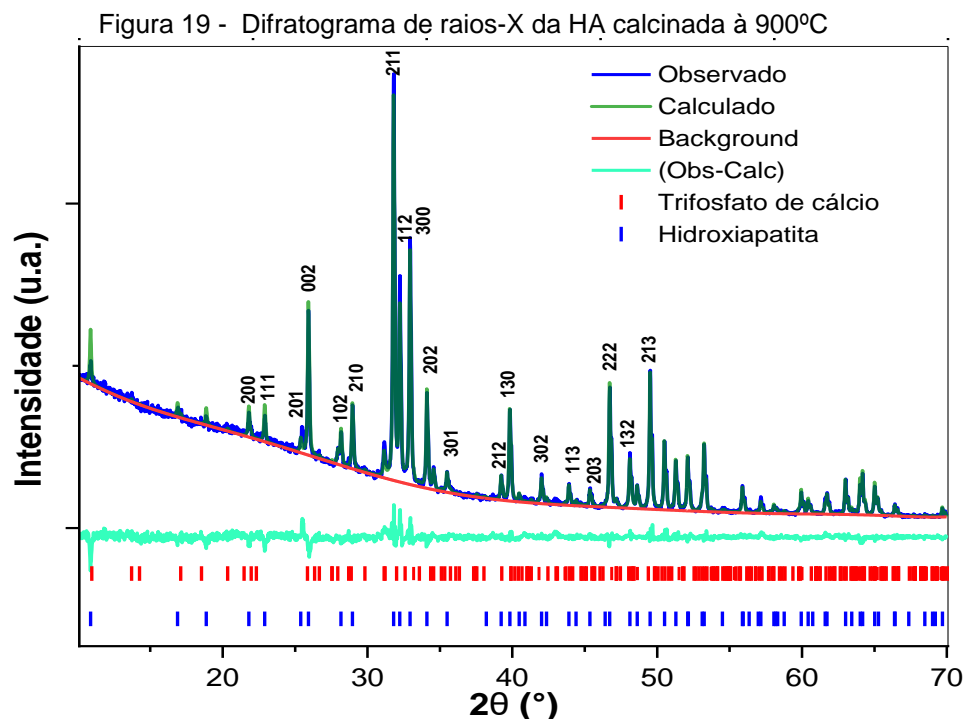
A Tabela 4 apresenta as principais bandas de absorção para a HA e seus respectivos grupos funcionais definidos a partir do espectro de FTIR da Figura 18.

Tabela 4 - Atribuições das frequências vibracionais observadas no espectro de FTIR da HA

Atribuições	Frequências vibracionais cm^{-1}
ν_5 estiramento O-H de hidroxila	3572
ν_3 estiramento assimétrico PO_4^{3-}	1047
ν_1 estiramento simétrico em PO_4^{3-}	962
ν_4 deformação O-P-O em PO_4^{3-} ou ν_4 deformação O-P-O em HPO_4^{2-}	569,602

Fonte: A autora (2022).

A Difração de Raios-X foi empregada para avaliar a estrutura cristalina do material. O ensaio de DRX do pó de hidroxiapatita que foi tratado a 900°C pode ser visualizado na Figura 19.



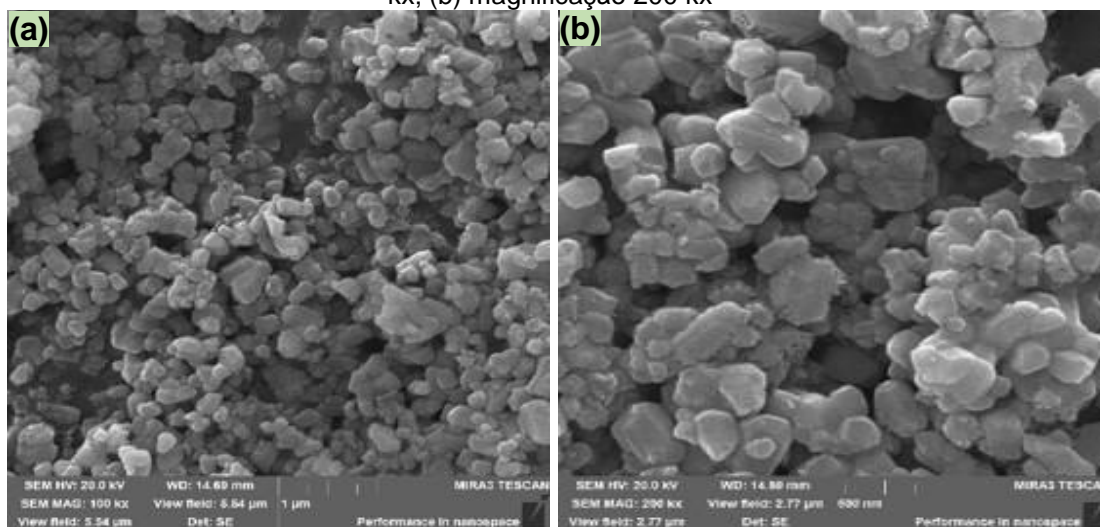
Fonte: A autora (2022).

Os picos de difração foram comparados com as fichas de referência da base de dados ICSD. A formação da hidroxiapatita com estrutura cristalina hexagonal $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ com grupo espacial $P6_3/m$ foi verificada estando em conformidade com o padrão ICSD 16742. Conforme indicado na Figura 19 as principais linhas características de hidroxiapatita (ICSD 16742) se sobrepõem bem aos picos de difração do material sintetizado; além disso, os picos representativos de Tricálcio Fosfato (TCP), $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, com sistema cristalino romboédrico e grupo espacial $R3c$ (ICSD 6191) também estavam presentes em $2\theta = 31,0^\circ$.

O TCP também é um biomaterial e sua presença pode ser justificada pela decomposição térmica da hidroxiapatita durante a calcinação [87].

A morfologia da HA foi analisada através da Microscopia Eletrônica de Varredura. Verifica-se, portanto, aglomerados de partículas nanométricas com distribuição uniforme e morfologia esférica não acentuada (Fig. 20). Além de possibilitar uma visualização e análise de distribuição de tamanhos, dispersão e forma das partículas as imagens de MEV foram utilizadas para obtenção do tamanho médio das partículas como podemos observar na Figura 21. O estudo estatístico do tamanho médio e da distribuição de tamanho das partículas foi realizado através do programa computacional gratuito Image J.

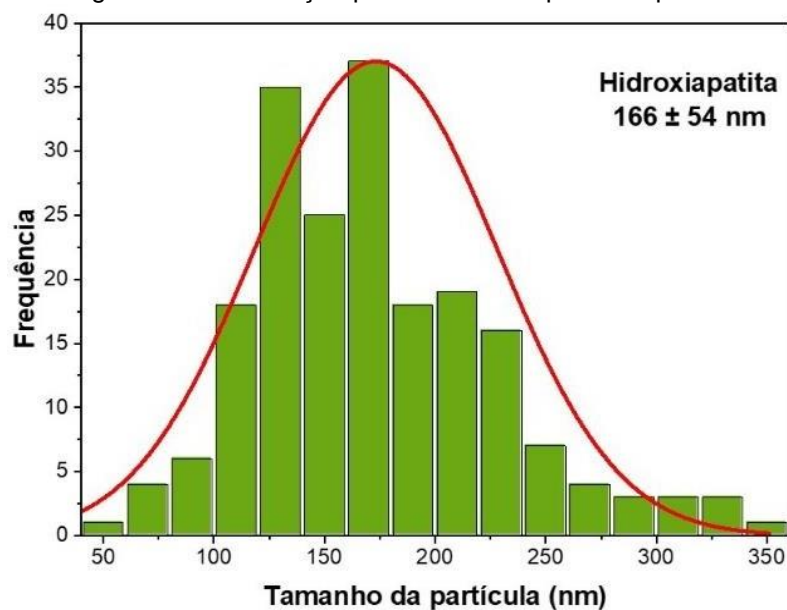
Figura 20 - Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura para HA: (a) magnificação 100 kx; (b) magnificação 200 kx



Fonte: A autora (2022).

Através do estudo estatístico determinou-se um tamanho médio de 166 nm para as partículas de HA com um desvio padrão para análise de ± 54 nm.

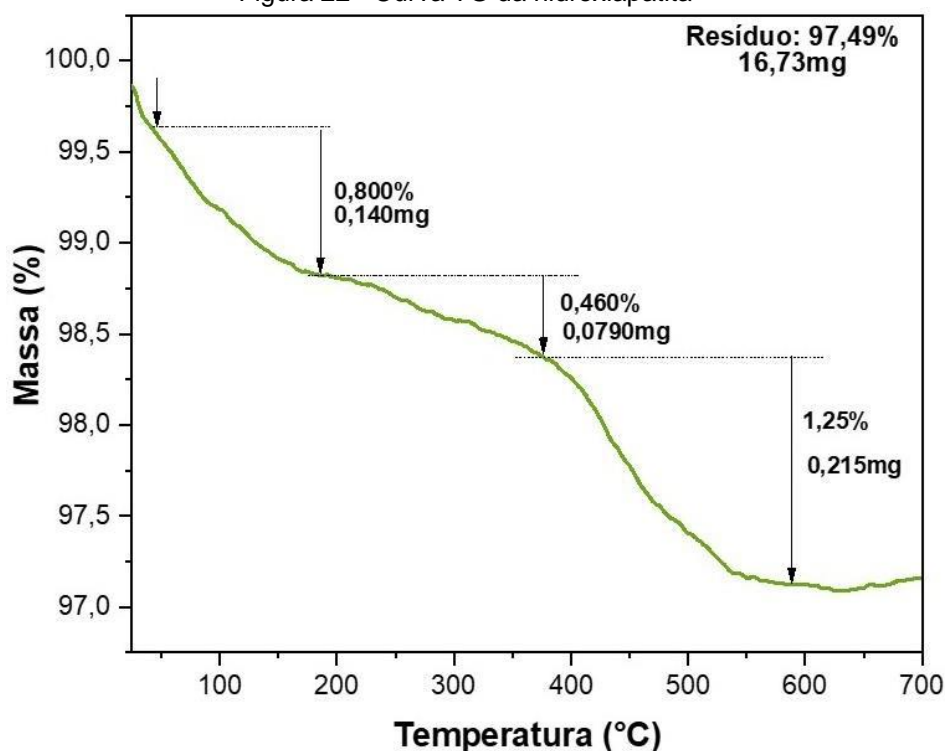
Figura 21 - Histograma de distribuição por tamanho de partícula para a hidroxiapatita



Fonte: A autora (2022).

O comportamento térmico da hidroxiapatita foi avaliado através da sua perda de massa na análise termogravimétrica (TGA). Esse comportamento está representado na Figura 22.

Figura 22 - Curva TG da hidroxiapatita



Fonte: A autora (2022)

A hidroxiapatita apresenta um comportamento que pode ser considerado termicamente estável apresentando três eventos com perda mínima de massa, são eles: um primeiro evento que ocorre um pouco depois de 40°C e termina próximo a 190°C com diminuição de 0,80% em massa e pode ser atribuída à perda de água adsorvida fisicamente na superfície do material; o segundo evento inicia próximo a 190°C e tem término próximo a 375°C com perda de 0,46% e associa-se a perda de água reticular com liberação de energia; e um terceiro evento que aparece entre 375°C e 600°C podendo ser justificado pela reação de duas moléculas de monohidrogenofosfato de cálcio levando a formação de pirofosfato e água [9].

Diversos trabalhos já demonstraram o comportamento termicamente estável da hidroxiapatita. A exemplo, Szustakiewicz *et al.* [88] que atribuíram um valor de 3% de perda de massa para hidroxiapatita pura sintetizada pelo método de coprecipitação em um intervalo de temperatura para análise de até 550°C. Outro exemplo é a pesquisa realizada por Ghedjemis *et al.* [89] que também observaram três eventos de perda de massa para hidroxiapatita obtida a partir de osso de bovino e de dromedário. Totalizando 5,9% de perda de massa para a hidroxiapatita obtida do osso do dromedário e 5,8 do osso bovino, em uma temperatura de análise de até 1.500°C.

Confirmando que o material sintetizado neste trabalho apresenta propriedades comuns àqueles já apresentados na literatura.

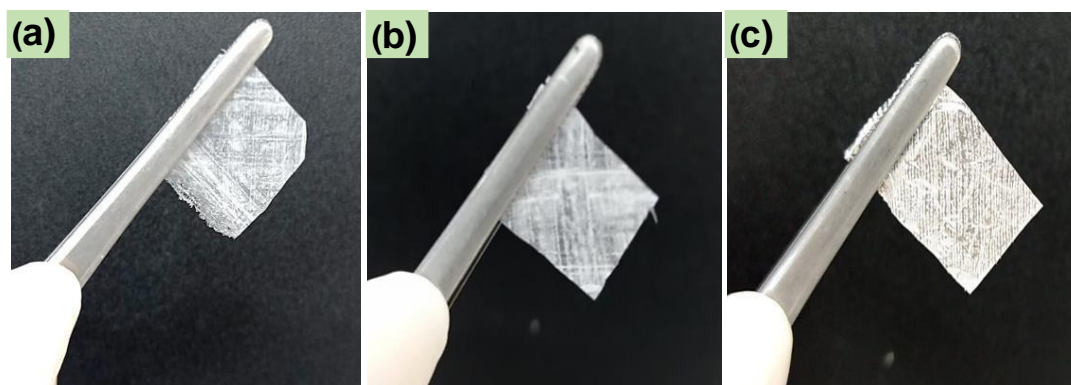
4.2 SCAFFOLDS DE PCL e PCL/HA

Três tipos de *scaffolds* foram produzidos e caracterizados. Um composto apenas pelo polímero poli(ϵ -caprolactona), o segundo composto por poli(ϵ -caprolactona) e hidroxiapatita com uma razão em massa de 5% de hidroxiapatita e o terceiro composto por poli(ϵ -caprolactona) e hidroxiapatita com uma razão em massa de 10% de hidroxiapatita sendo as razões em massa definidas a partir da massa do polímero. A fins de tratamento de resultados o segundo e o terceiro *scaffolds* serão aqui apresentados com a seguinte descrição respectivamente: PCL/HA5 e PCL/HA10.

4.2.1 Obtenção de *scaffolds* eletrofiados

Através da tecnologia de eletrofiação adaptada a uma impressora 3D fez-se possível à obtenção de *scaffolds* eletrofiados com escrita de fibras orientada. Podemos visualizar exemplos dos materiais produzidos na Figura 23.

Figura 23 - *Scaffolds* produzidos com escrita orientada de fibras: (a) PCL; (b)PCL/HA5; (c)PCL/HA10.

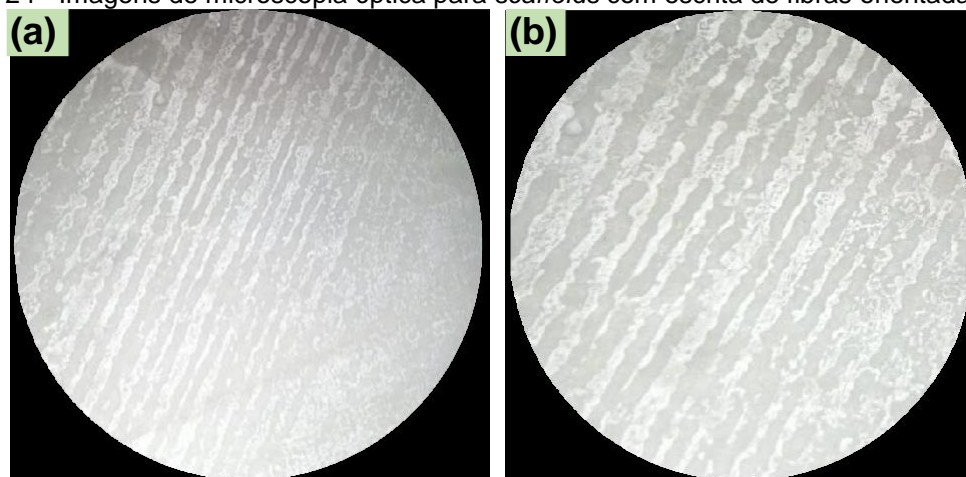


Fonte: A autora (2022).

4.2.2 Caracterização física e química

Para comprovação do comportamento da fibra produzida a partir da escrita orientada com alinhamento pré-definido foi utilizada a microscopia óptica. As imagens produzidas estão apresentadas na Figura 24 (a e b).

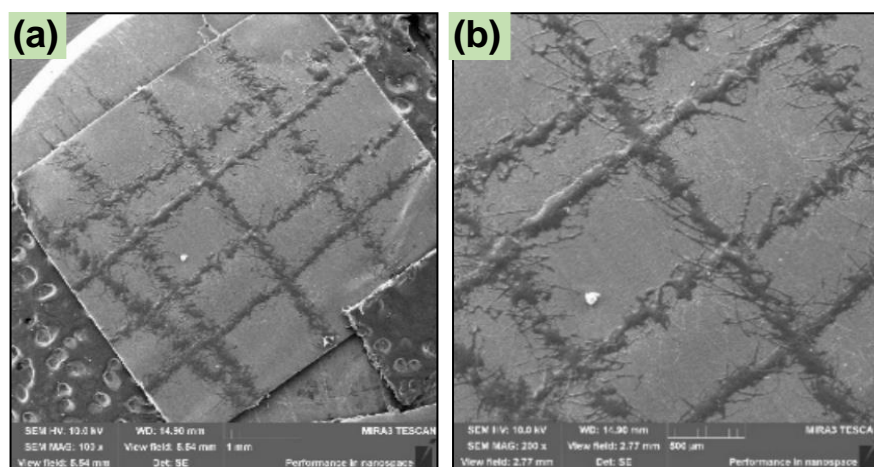
Figura 24 - Imagens de microscopia óptica para *scaffolds* com escrita de fibras orientada



Fonte: A autora (2022).

Exemplos do caminho definido pela escrita orientada estão demonstrados nas Figuras 25 e 26 que foram obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura.

Figura 25 - Imagens de MEV para escrita orientada de fibras com perfil em xadrez: (a) magnificação 100 kx; (b) magnificação 200 kx

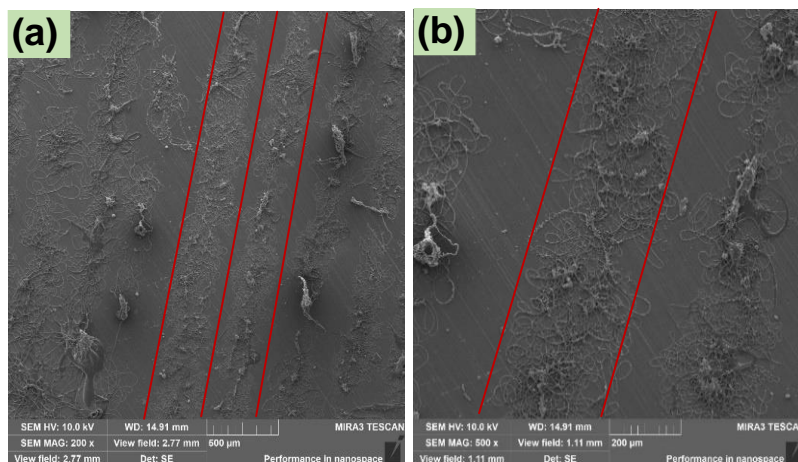


Fonte: A autora (2022).

A Figura 25 (a e b) apresenta o desenvolvimento de um perfil em xadrez para as fibras eletrofiadas comprovando que é possível um controle da escrita a partir de um desenho pré-definido.

A Figura 26 (a e b) apresenta o desenvolvimento de um perfil retilíneo. Apesar de seguir um caminho linear bem estruturado, as fibras produzidas, quando depositadas, apresentam comportamento aleatório.

Figura 26 - Imagens de MEV para escrita orientada de fibras com perfil retilíneo: (a) magnificação 200kx; (b) magnificação 500 kx

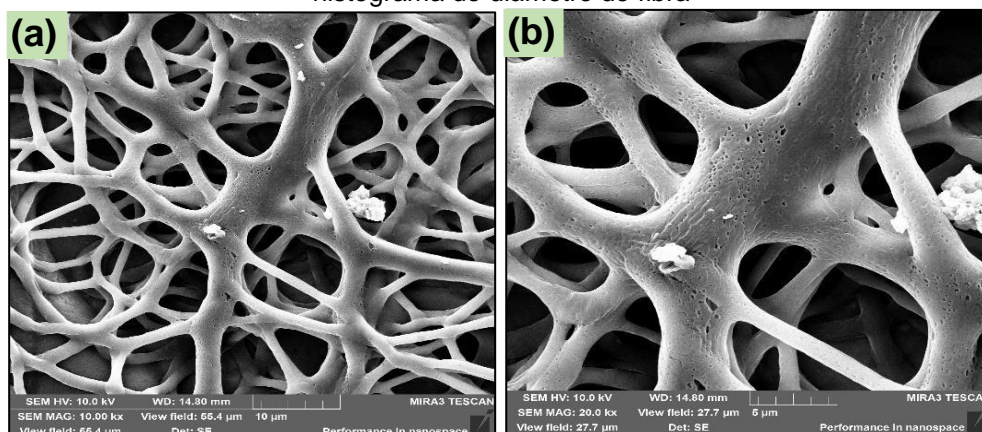


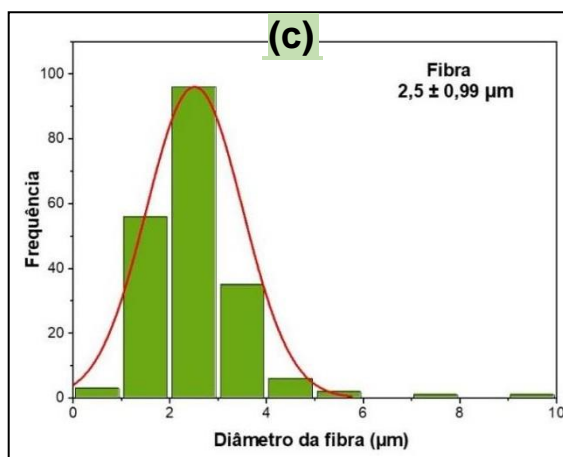
Fonte: A autora (2022).

A partir das imagens (Fig. 25 e 26) é possível afirmar que o caminho da escrita de fibras é bem controlado a partir de um comando ordenado permitindo que seja possível a produção de estruturas definidas. Embora estas apresentem um perfil microscópico aleatório quando depositadas, fica claro que seu caminho de deposição segue o comando pré-definido.

A microscopia eletrônica de varredura também foi utilizada para análise morfológica dos *scaffolds* produzidos. As imagens de MEV revelaram fibras com estrutura porosa e bem definidas no material eletrofiado. Nos *scaffolds* de PCL sem hidroxiapatita observa-se pequenas aglomerações sobre as fibras que podem ser resultantes de contas indesejáveis no momento da eletrofiação. O histograma do diâmetro da fibra revelou que este variou entre 1 e 10 μm e a média de diâmetro foi de 2,5 μm com um desvio padrão de $\pm 0,99 \mu\text{m}$. Podemos observar essas informações na Figura 27 (a,b e c).

Figura 27 - Imagens de MEV do scaffold de PCL: (a) magnificação 10 kx; b) magnificação 20 kx; (c) histograma de diâmetro de fibra

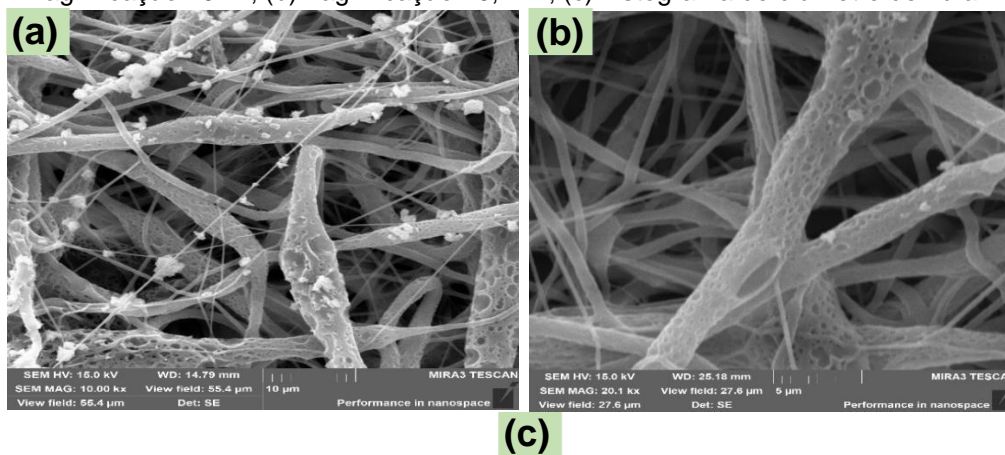




Fonte: A autora (2022).

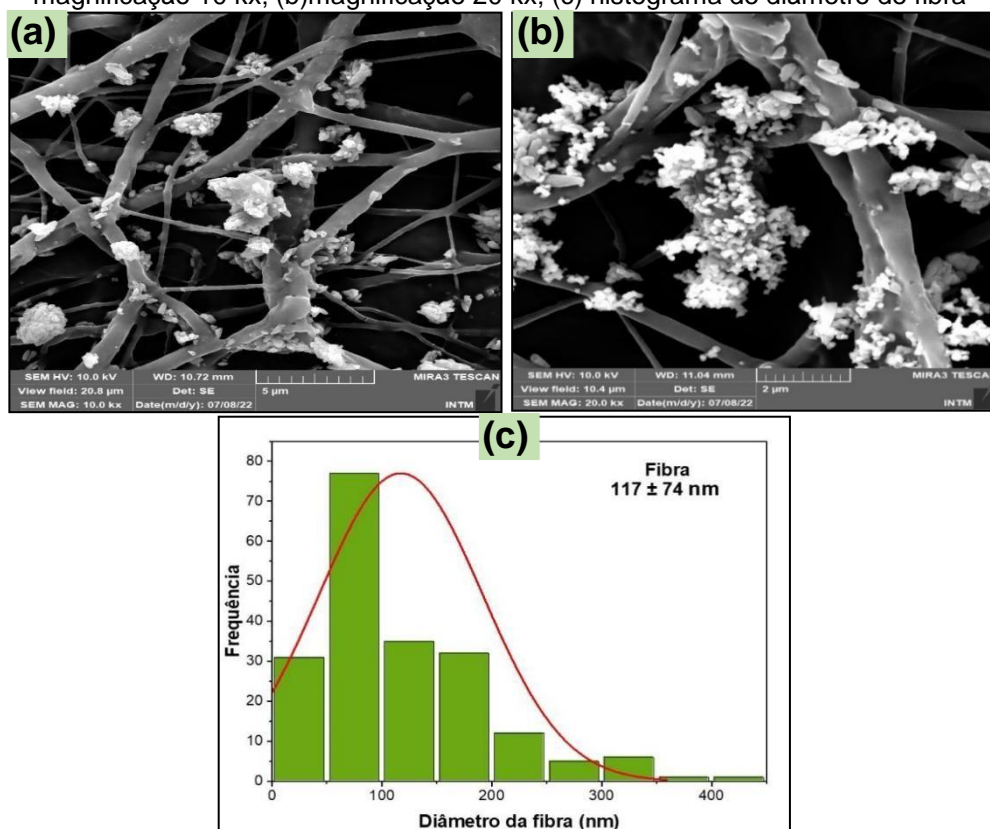
Em relação aos *scaffolds* de PCL/HA, percebe-se agregados de partículas de hidroxiapatita depositados sobre a estrutura das fibras comprovando visualmente a incorporação. Nesse caso, o diâmetro das fibras variou entre 1 e 600 nm. Para os *scaffolds* de PCL/HA com 5% de HA em relação à massa do polímero o diâmetro médio da fibra foi de 140 nm (Fig. 28) já para a incorporação com 10% de HA as fibras apresentaram um tamanho médio de 117 nm (Fig. 29).

Figura 28 - Imagens de MEV e distribuição de diâmetro de fibra para scaffolds de PCL/HA 5%: (a) magnificação 10 kx; (b) magnificação 20,1 kx; (c) histograma de diâmetro de fibra



Fonte: A autora (2022).

Figura 29 - Imagens de MEV e distribuição de diâmetro de fibra para scaffolds de PCL/HA 10%: (a) magnificação 10 kx; (b) magnificação 20 kx; (c) histograma de diâmetro de fibra

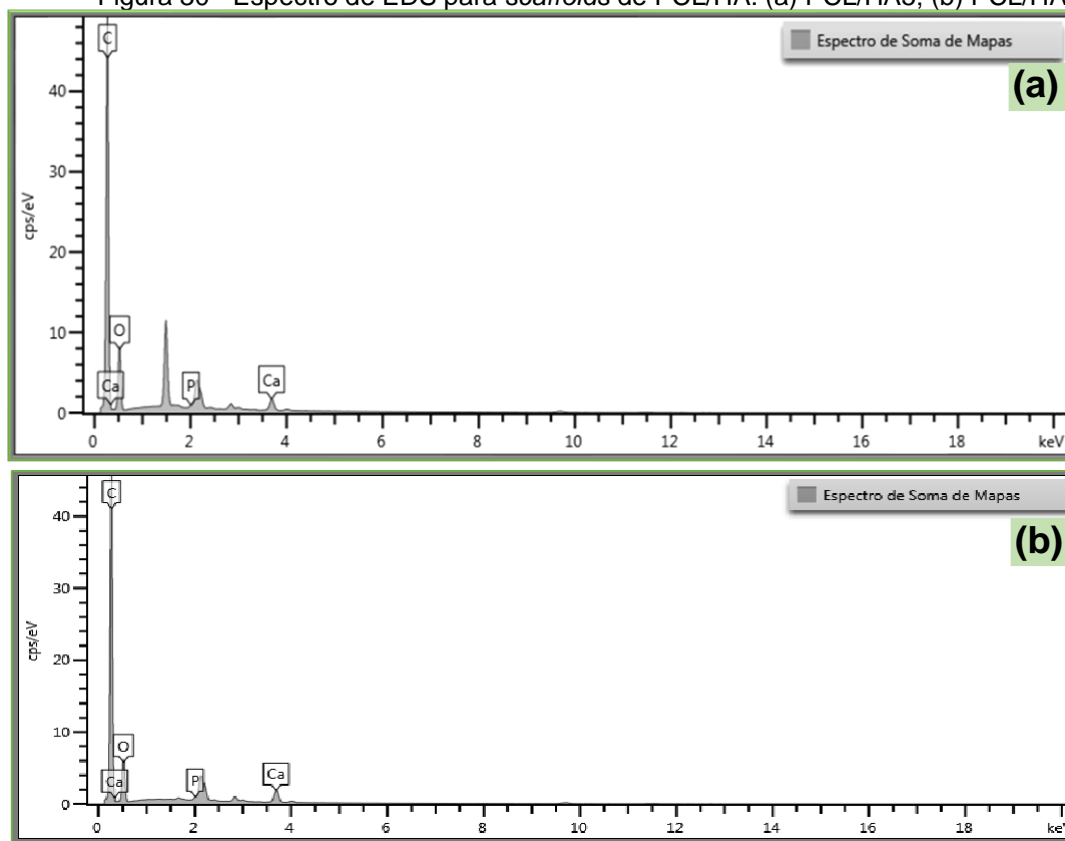


Fonte: A autora (2022).

Verifica-se que a adição de partículas de hidroxiapatita influenciou na redução do diâmetro da fibra. Essa alteração justifica-se pelo fato de que a adição da hidroxiapatita na solução causa um aumento na densidade de carga líquida durante a eletrofiação. Um aumento na carga líquida influencia no aumento da força eletrostática dentro do jato e isso resulta em um maior estiramento, ocasionando, portanto, a diminuição do diâmetro da fibra [90].

Para observação dos elementos químicos presentes nos *scaffolds* foi realizada uma análise por Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-x (EDS). Mapas de EDS foram construídos para os *scaffolds* que continham HA em sua composição. Os espectros obtidos são apresentados na Figura 30. Estes, indicaram a presença de Cálcio e Fósforo, como esperado, confirmando assim a incorporação da hidroxiapatita nos andaimes. Além disso, carbono e oxigênio que estão presentes na estrutura do polímero também foram confirmados.

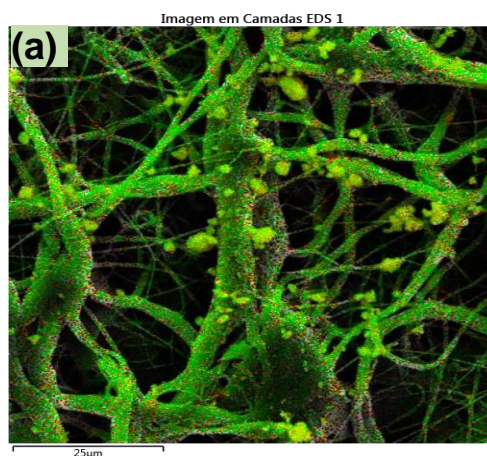
Figura 30 - Espectro de EDS para *scaffolds* de PCL/HA: (a) PCL/HA5; (b) PCL/HA10

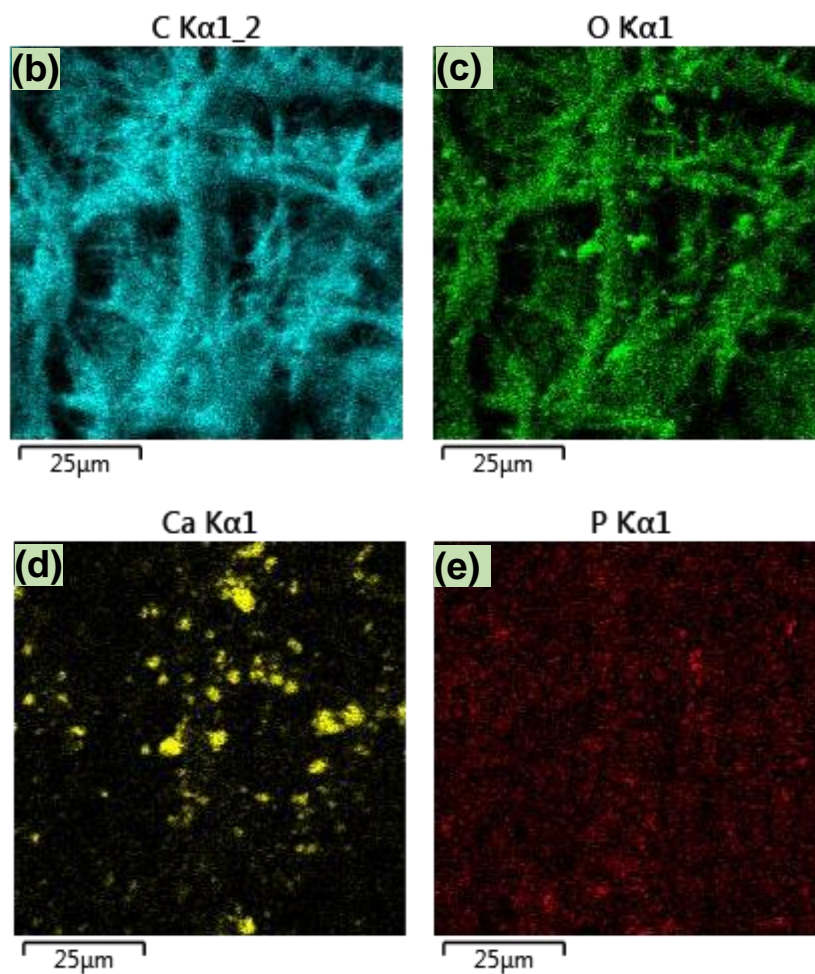


Fonte: A autora (2022).

As Figuras 31 e 32 apresentam os mapas de EDS produzidos. Mapas para os constituintes dos *scaffolds* (carbono, oxigênio, cálcio e fósforo) são indicados nas mesmas Figuras em (b), (c), (d) e (e).

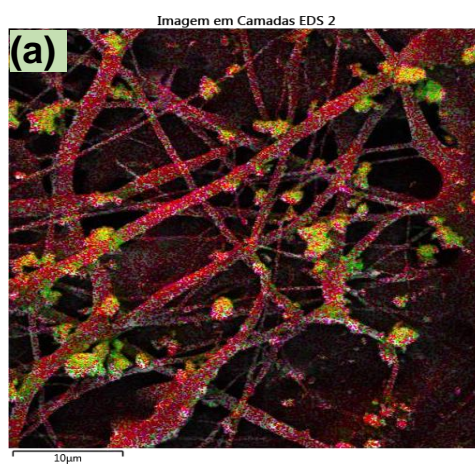
Figura 31 - Mapa de EDS: (a) para o *scaffold* de PCL/HA(5); (b) mapa do carbono; (c) mapa do oxigênio; (d) mapa do cálcio; (e) mapa do fósforo.

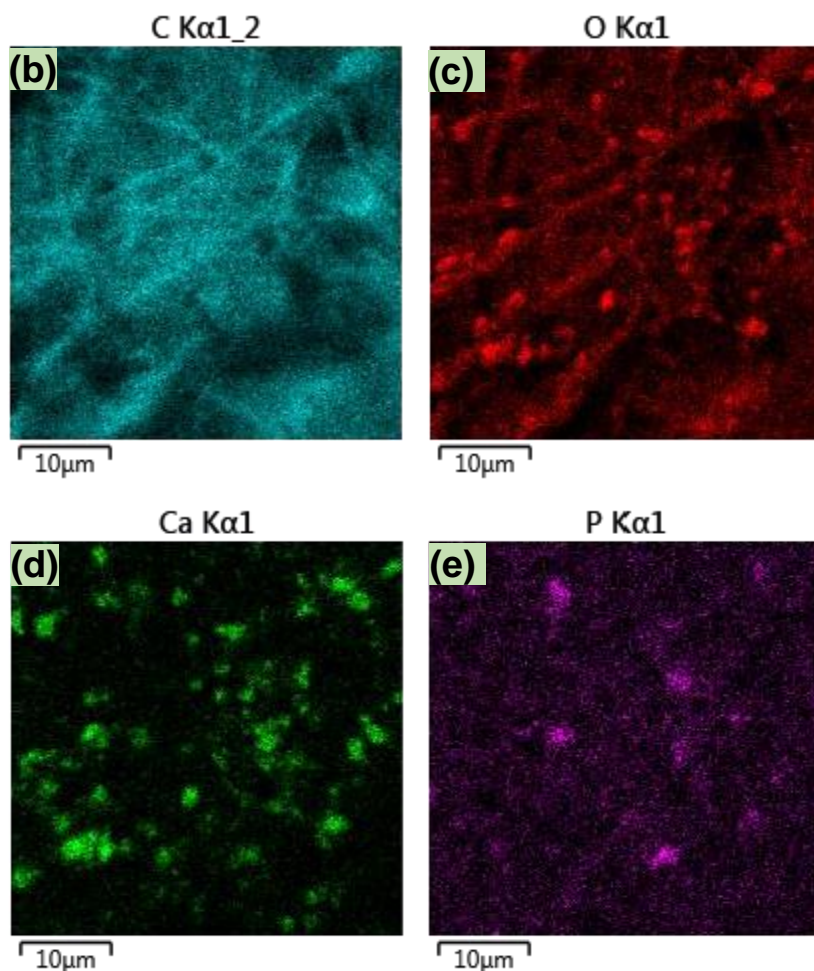




Fonte: A autora (2022).

Figura 32 - Mapa de EDS: (a) para o *scaffold* de PCL/HA(10); (b) mapa do carbono; (c) mapa do oxigênio; (d) mapa do cálcio; (e) mapa do fósforo.

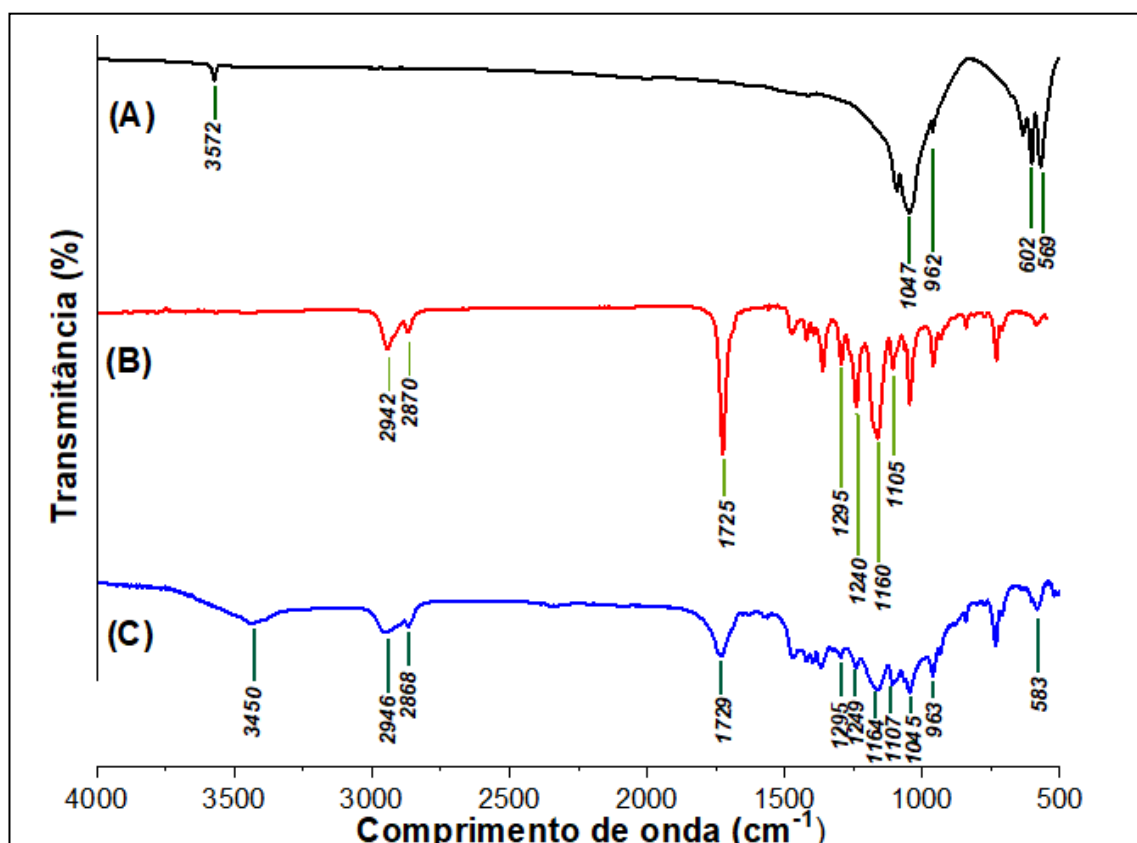




Fonte: A autora (2022).

A partir dos mapas é possível concluir que houve incorporação efetiva da hidroxiapatita nas fibras, pois os elementos característicos estão distribuídos, no mapa, por toda a amostra. A incorporação da hidroxiapatita também foi confirmada a partir da análise dos momentos vibracionais dos grupos funcionais presentes nos andaimes através do espectro de FTIR. Os espectros de FTIR da hidroxiapatita, dos *scaffolds* de PCL e de PCL/HA estão apresentados na Figura 33.

Figura 33 - Espectro FTIR para HA e *scaffolds* fibrosos: (a) hidroxiapatita; (b) PCL; (c) PCL/HA

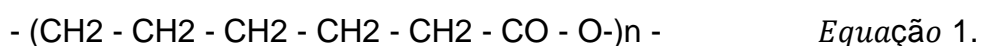


Fonte: A autora (2022).

Em relação ao andaime, a maioria das bandas observadas no espectro correspondem aos materiais PCL e HA confirmando a presença de ambos. As bandas C=O, C-O e C-H foram relacionadas ao PCL e as bandas P-O e O-H foram atribuídas a HA.

Devido a formação de ligações químicas entre a hidroxiapatita e o polímero alguns pequenos deslocamentos de picos no compósito foram observados. A pequena porcentagem em peso da hidroxiapatita presente no compósito resulta em uma maior porcentagem de transmitância em suas bandas características, fenômeno que anteriormente também já foi relatado por REZAEI [12].

O espectro de FTIR para a fibra de PCL (espectro B) exibe características de um poliéster alifático linear, fiel a sua estrutura (Equação 1):



As bandas observadas em 2942 e 2870 cm^{-1} correspondem a deformação axialassimétrica e simétrica do grupo CH_2 , respectivamente. Há o aparecimento de uma banda de forte intensidade atribuída a vibração em tensão da ligação carbonila ($\text{C}=\text{O}$) em 1725 cm^{-1} .

A banda identificada em 1295 cm^{-1} é atribuída aos sítios estruturais C-C e C-O da fase cristalina e a banda identificada a 1105 cm^{-1} corresponde às C-O e C-C da fase amorfa do polímero. A banda característica da vibração C-O-C assimétrica pôde ser observada a 1240 cm^{-1} e a banda identificada em 1160 cm^{-1} corresponde a vibração O-C-O simétrica [90,91,92,93]. A Tabela 5 apresenta as principais bandas de absorção para o *scaffold* de PCL e seus grupos funcionais definidos a partir do espectro de FTIR.

Tabela 5 - Atribuições das frequências vibracionais observadas no espectro de FTIR para o *scaffold* de poli(*t*-caprolactona)

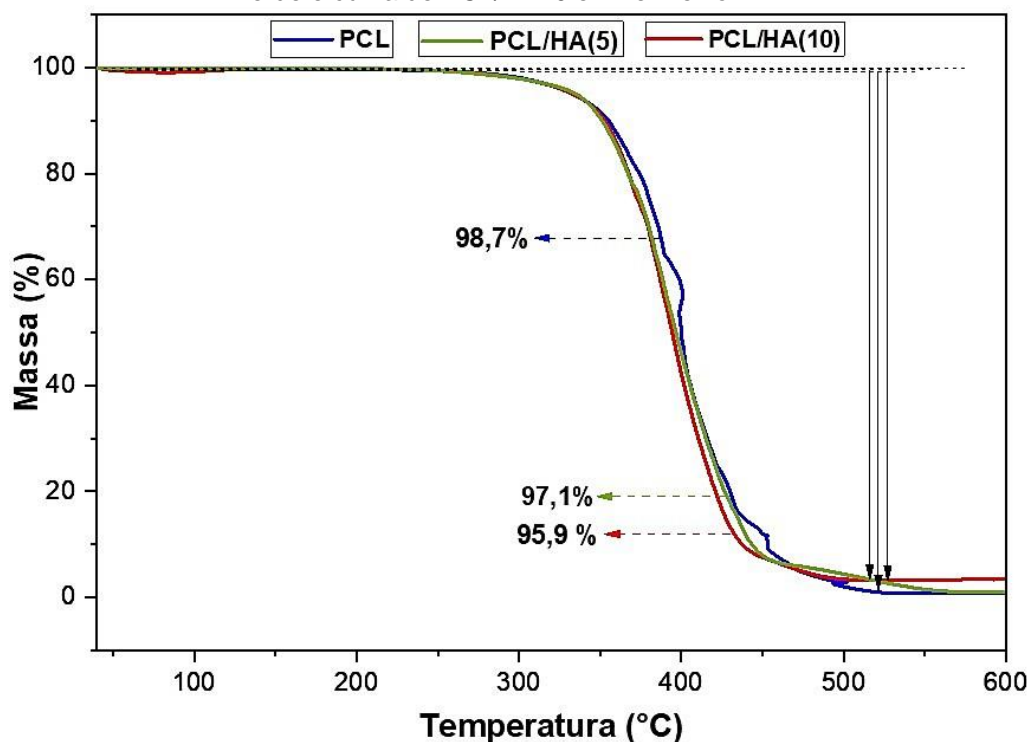
Atribuições	Frequências vibracionais cm^{-1}
ν deformação axial assimétrica CH_2	2942
ν deformação axial simétrica CH_2	2870
ν estiramento C=O	1725
ν C-C e C-O fase cristalina	1295
ν COC assimétrica	1240
ν COC simétrica	1160
ν C-C e C-O fase amorfa	1105

Fonte: A autora (2022).

Nos andaimes modificados com hidroxiapatita (espectro C) bandas características desse material foram identificadas. Observa-se no espectro o principal modo vibracional de estiramento $\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$ em 1045 cm^{-1} . A banda vibracional ν_4 foi detectada para a amostra em 583 cm^{-1} . Além disso, a banda em 3450 cm^{-1} está relacionada ao OH em HA. Os resultados confirmaram uma incorporação bem sucedida de partículas de hidroxiapatita na estrutura das fibras.

O perfil de degradação térmica dos andaimes foi caracterizado por termogravimetria e está apresentado na Figura 34. O mesmo número de estágios de degradação foi obtido para todos os *scaffolds* eletrofiados.

Figura 34 - Curva TG para os *scaffolds* produzidos: curva de PCL em azul, curva de PCL/HA5 em verde e curva de PCL/HA10 em vermelho



Fonte: A autora (2023).

Os *scaffolds* de PCL apresentaram degradação térmica de estágio único. Esta degradação ocorreu na região entre 348°C e 458 °C apresentando um percentual de 98,7% de degradação na faixa de temperatura citada com um percentual residual de 1,3%. A perda de massa nessa faixa de temperatura justifica-se pela reação de clivagem da ligação química das cadeias de poliéster por pirólise [36]. Não foram observadas perdas significativas de massa em temperaturas inferiores aos 340 °C, o que poderia significar a não evaporação do solvente utilizado na síntese. Dessa forma, pode-se concluir que o solvente usado nas soluções eletrofiadas evaporou durante o processo de eletrofiação.

Os *scaffolds* com hidroxiapatita obtiveram os mesmos estágios de degradação que os *scaffolds* sem o conteúdo cerâmico, porém neste caso apresentaram um percentual residual mais elevado pois a hidroxiapatita por ser um composto cerâmico e inorgânico se decompõe minimamente na faixa de temperatura analisada como já observado neste trabalho e também já pontuado por Menezes [5].

Esse comportamento também foi observado por Szustakiewicz [89] que ao produzir *scaffolds* porosos de poli(L-lactídeo)/ hidroxiapatita visualizou que a medida que aumentava a porcentagem de hidroxiapatita nos *scaffolds* o percentual de perda

de massa na análise termogravimétrica diminuía. Sendo este comportamento estável e padronizado.

Para os *scaffolds* contendo 5% em massa de HA a taxa de degradação foi de 97,1% com um percentual residual de 2,9% e para os *scaffolds* contendo 10% em massa de HA o percentual de degradação foi de 95,9% com um percentual residual de 4,1%. Os dados obtidos estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Dados obtidos a partir da análise termogravimétrica dos *scaffolds* produzidos.

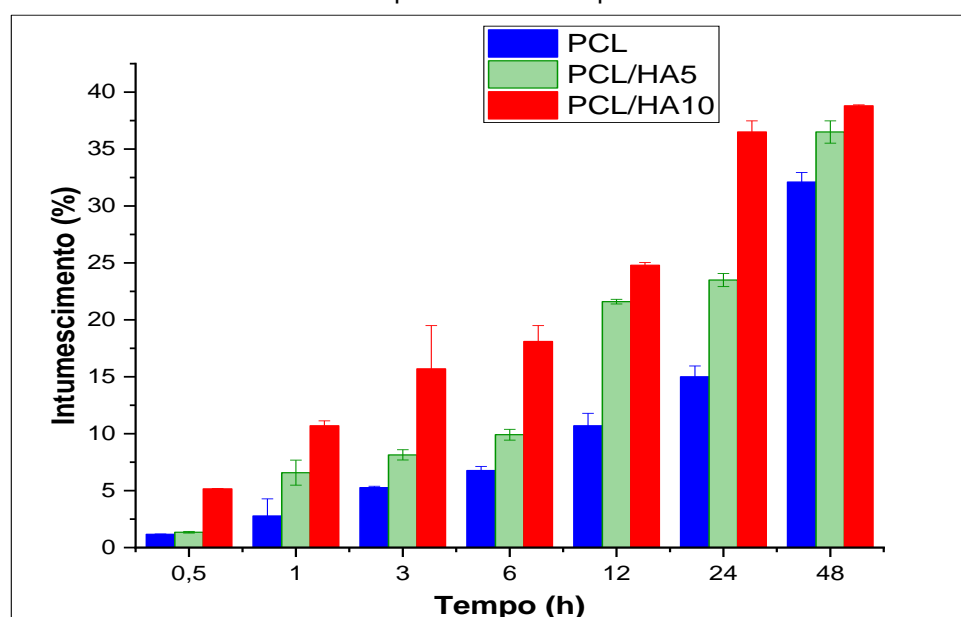
<i>Scaffold</i>	Temperatura de degradação (°C) (estágio único)	Perda de massa (%)	Percentual residual (%)
<i>PCL</i>	348 – 458	98,7	1,3
<i>PCL/HA (5)</i>	348 – 458	97,1	2,9
<i>PCL/HA (10)</i>	348 – 458	95,9	4,1

Fonte: A autora (2023).

4.3 ENSAIO DE INTUMESCIMENTO

Com o objetivo de avaliar o comportamento de inchaço dos *scaffolds* eletrofiados, foi realizado o ensaio de intumescimento durante 48 horas. Como determinado, para análise do grau de intumescimento foi realizada a pesagem das amostras secas e durante o processo de absorção do líquido. A porcentagem de intumescimento apresentada pelos *scaffolds* estudados está demonstrada na Figura 35 e na Tabela 7.

Figura 35 - Gráfico de grau de intumescimento para os *scaffolds* eletrofiados representado com os respectivos desvios padrão



Fonte: A autora (2023).

Tabela 7 - Valores do grau de intumescimento para os *scaffolds* eletrofiados e seus respectivos desvios padrão.

Tempo de análise (h)	Grau de Intumescimento (%) PCL	Grau de Intumescimento (%) PCL/HA(5)	Grau de Intumescimento (%) PCL/HA(10)
0,5	1,17 ± 0,020	1,35 ± 0,07	5,16± 0,035
1	2,78 ± 1,5	6,58 ± 1,10	10,7± 0,43
3	5,26 ± 0,13	8,14± 0,45	15,7± 3,80
6	6,77± 0,36	9,91± 0,47	18,1± 1,4
12	10,7 ± 1,09	21,6± 0,20	24,8± 0,24
24	15,0 ± 0,95	23,5± 0,58	36,5± 0,98
48	32,1 ± 0,84	36,5± 0,98	38,8± 0,08

Fonte: A autora (2023).

Cada valor representa, portanto, a média de 3 testes. De maneira geral, os *scaffolds* compostos pelo polímero policaprolactona (PCL) exibem, devido à sua natureza hidrofóbica, uma capacidade inferior de absorção de líquidos [72,73]. No entanto, a porosidade apresentada pelas estruturas (como observado através da microscopia eletrônica de varredura) se torna um fator importante para facilitar o intumescimento.

Nota-se que a taxa de inchaço aumentou com o tempo de imersão. Por exemplo, cresceu de 1,17 ± 0,020 para 32,1 ± 0,84 após 48 horas de imersão para os andaimes de PCL, enquanto subiu de 1,35 ± 0,07 para 36,5± 0,98 para PCL/HA5 e de 5,16± 0,035 para 38,8± 0,08 para PCL/HA10. Há, portanto, um leve aumento da capacidade de absorção após a adição da hidroxiapatita. Este aumento da hidrofiliabilidade relaciona-se com as interações do tipo dipolo favorecidas pela superfície da hidroxiapatita, o que faz com que moléculas de água sejam absorvidas em sua superfície [70]. Esse comportamento também já havia sido observado por Saska [94] que analisou que a inserção de hidroxiapatita em estruturas de materiais compósitos de celulose bacteriana e colágeno resultava em aumento da hidrofiliabilidade.

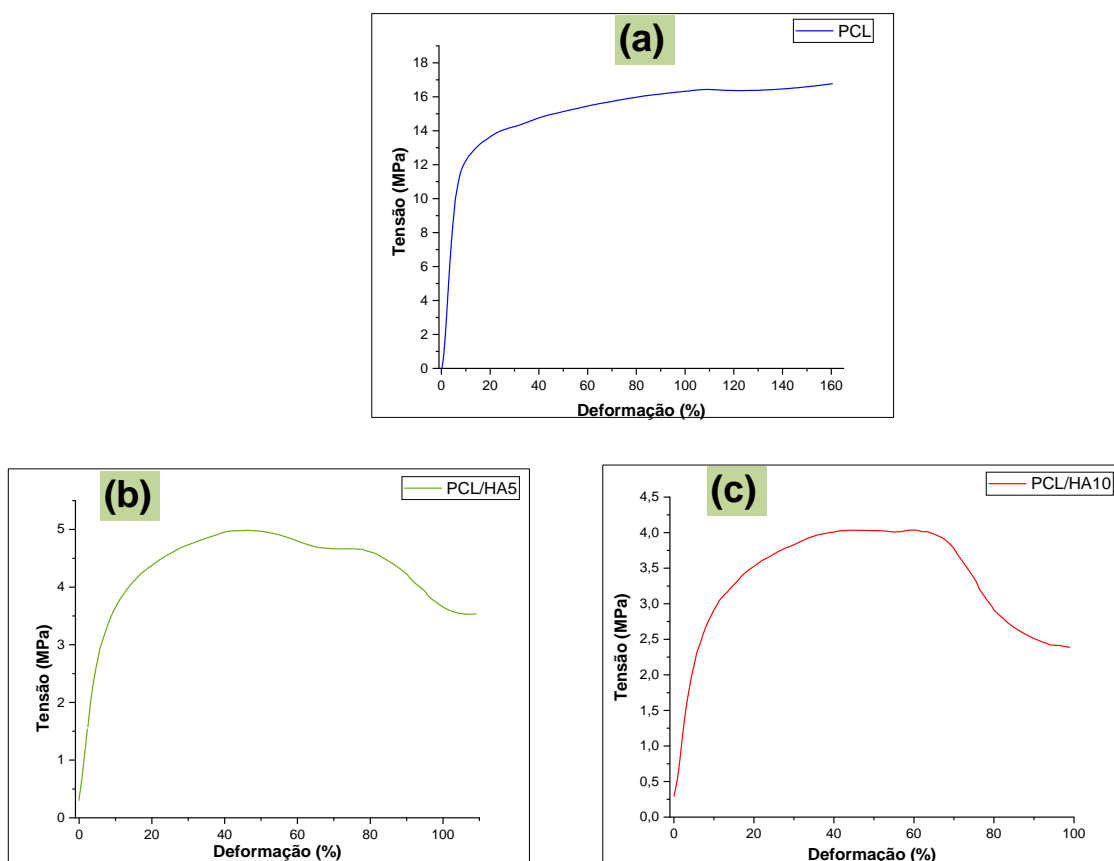
Essa capacidade de absorção de líquidos representa um fator crucial para a regeneração tecidual, pois fornece ao local alvo a umidade necessária para acelerar o processo de cicatrização. Para uma melhor avaliação, uma análise mais prolongada deve ser realizada a fim de estabelecer um grau máximo de intumescimento dos andaimes.

4.4 ANÁLISE MECÂNICA

As propriedades mecânicas do material são muito importantes para equilibrar a estrutura do andaime durante a sua implantação. A reabilitação do tecido após o período de implantação depende diretamente das propriedades mecânicas em uma escala macro e microscópica. Em uma escala macro, o andaime deve ser estável e resistente o suficiente para manipulação clínica e em uma escala micro, o crescimento, diferenciação e proliferação celular dependem das forças envolvidas nas células. Dessa forma, o andaime necessita ser um suporte adequado para resistir as forças que são aplicadas e transferi-las adequadamente para as células e tecidos abrangentes [95,96].

A fim de melhor compreender a influência da inserção de nanopartículas de hidroxiapatita nas propriedades mecânicas dos *scaffolds* eletrofiados foi realizado um ensaio mecânico de tração com teste de tensão vs deformação sendo possível obter os seguintes valores: módulo de Young (E), tensão máxima (TM), alongamento máximo (EM) e tensão de ruptura (TR). A Figura 36 apresenta curvas típicas de tensão-deformação dos andaimes de PCL, PCL/HA(5) e PCL/HA(10).

Figura 36 - Curvas típicas de tensão-deformação dos andaimes de: (a)PCL; (b)PCL/HA(5) e (c)PCL/HA(10)



Fonte: A autora (2022).

Como podemos observar na Figura 36, os andaimes são amplamente esticados com o aumento da tensão. É demonstrado que a resistência a tração dos andaimes diminui a partir da inserção e também do aumento da porcentagem das nanopartículas de hidroxiapatita. Em outras palavras, podemos afirmar que quanto maior a quantidade de hidroxiapatita utilizada para compor os andaimes, menos rígido esse material será. Os *scaffolds* de PCL sem o conteúdo cerâmico apresentaram uma maior deformação plástica. Já os filmes de PCL/HA apresentam um menor valor de deformação plástica e, dessa forma, tiveram uma ruptura da interface mais rápida.

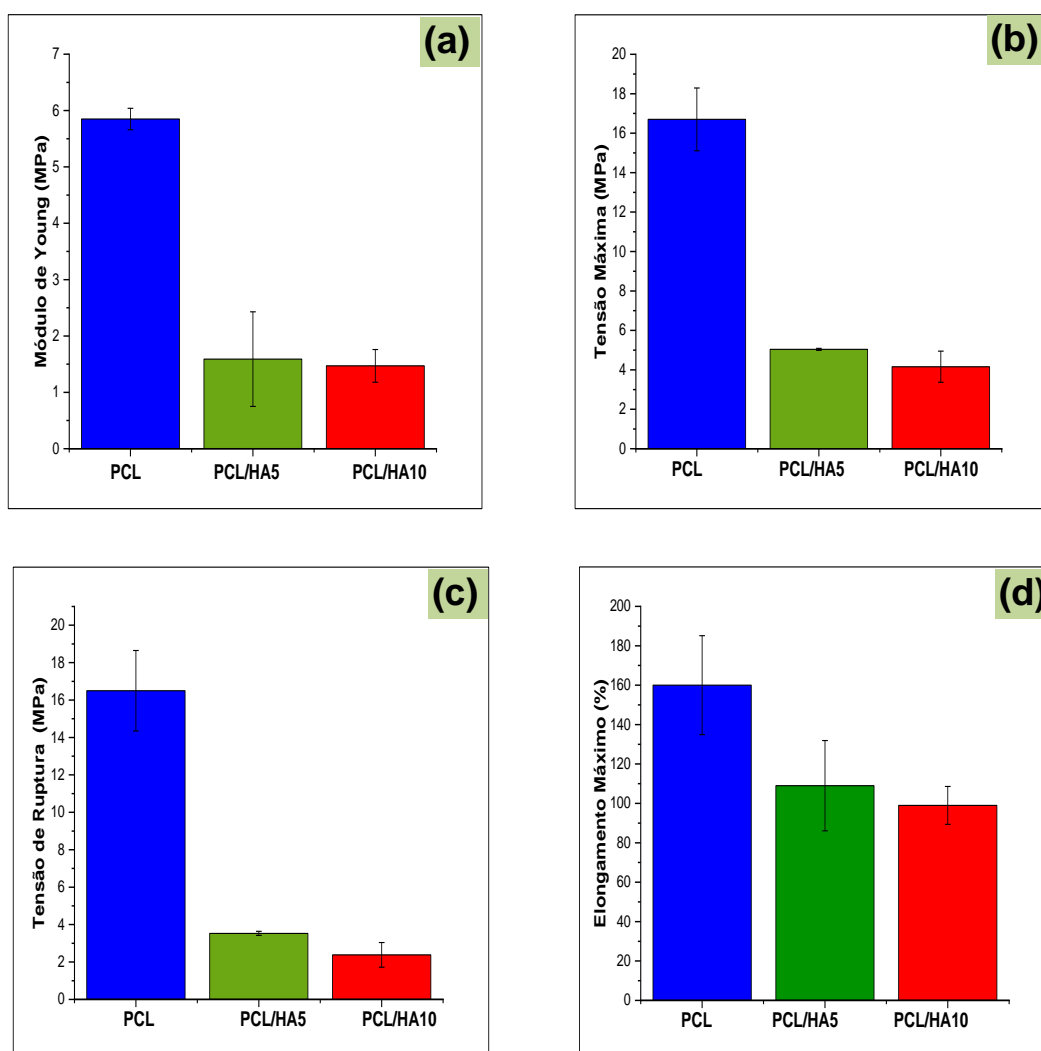
Os dados obtidos para cada propriedade dos *scaffolds* estão apresentados na Tabela 8 e na Figura 37, respectivamente.

Tabela 8 - Valores obtidos para cada propriedade mecânica dos scaffolds eletrofiados e respectivos desvios padrão.

<i>Scaffold</i>	Módulo de Young (MPa)	Tensão Máxima (MPa)	Tensão de Ruptura (MPa)	Elongamento máximo (%)
PCL	$5,85 \pm 0,19$	$16,7 \pm 1,59$	$16,5 \pm 2,15$	$160,0 \pm 25,1$
PCL/HA (5)	$1,59 \pm 0,84$	$5,04 \pm 0,053$	$3,53 \pm 0,11$	$109 \pm 22,9$
PCL/A (10)	$1,47 \pm 0,29$	$4,16 \pm 0,79$	$2,38 \pm 0,66$	$99,0 \pm 9,61$

Fonte: A autora (2022).

Figura 37 - Propriedades mecânicas dos andaimes: (a) Módulo de Young; (b) Tensão máxima; (c) Tensão de ruptura; (d) Elongamento máximo



Fonte: A autora (2022)

Nota-se, portanto, um comportamento mecânico diferenciado para cada tipo de *scaffold* produzido. Diversos trabalhos já confirmaram que a inserção de partículas cerâmicas em matrizes poliméricas resulta em uma diminuição da resistência

mecânica [96,97,98,99]. Hyunryung *et al.* [98] demonstraram que o aumento da concentração de hidroxiapatita em uma matriz polimérica de fibra de seda ocasiona a diminuição da resistência mecânica das nanofibras. Neste trabalho, os autores obtiveram um menor valor de deformação máxima para os andaimes com porcentagem de hidroxiapatita acima de 20%. Resultados semelhantes também foram observados por FU e colaboradores [95] onde a inserção de hidroxiapatita em nanofibras de PLGA resultou em um menor percentual de deformação plástica.

Essa diminuição no percentual de deformação pode ser justificada pela ausência de ligações interfaciais entre o conteúdo cerâmico e a matriz polimérica. Dessa maneira, as partículas de hidroxiapatita funcionaram como um fator de descontinuidade entre as cadeias poliméricas, e a diminuição da distância das partículas, resultado do aumento da porcentagem desta nos *scaffolds*, diminuiu substancialmente a tenacidade. Essa diminuição da tenacidade é resultado da combinação dos defeitos produzidos em torno das nanopartículas de hidroxiapatita ocasionados pela concentração de tensão sob tração resultando em macrofaturas. Dessa maneira, um aumento no teor de hidroxiapatita nas fibras ocasiona uma quebra acelerada da resistência durante os testes de tração [98]

Os testes de tração demonstraram que os andaimes produzidos apresentam boa elasticidade, permitindo suportar extensões de $\pm 165\%$ quando na ausência de hidroxiapatita, $\pm 109\%$ com 5% do conteúdo cerâmico e $\pm 99,0\%$ com 10% do conteúdo cerâmico. O que torna os *scaffolds* potencialmente adequados para esse tipo de aplicação. Em relação a resistência a tração, na literatura alguns autores já relatam a possibilidade de regeneração óssea com valores inferiores ao obtido neste trabalho. A exemplo, Ueyama *et al.* [100] relataram a produção de membranas de alginato e cloreto de cálcio aplicadas a engenharia de tecido ósseo que favoreceram a regeneração óssea e apresentavam um valor de 0,017 MPa de resistência.

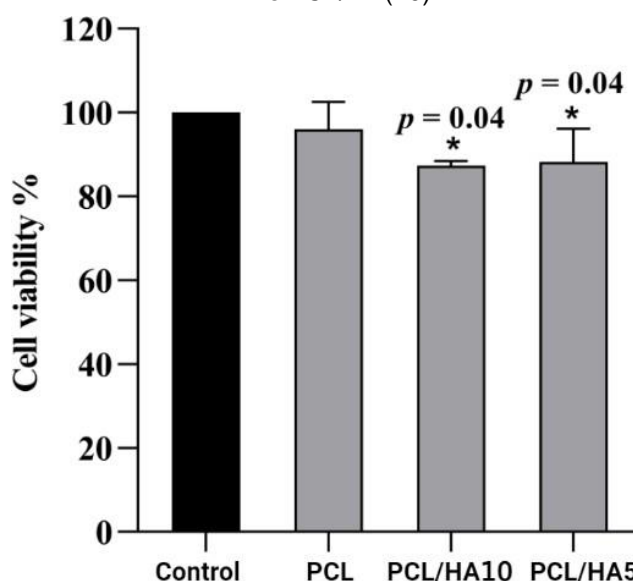
Neste sentido, acredita-se que os *scaffolds* desenvolvidos são resistentes o suficiente para utilização em procedimentos cirúrgicos (acondicionamento e fixação) sem colapsarem. No entanto, é necessário que sejam utilizados para áreas que não apresentem grandes estresses mecânicos tendo em vista que essas áreas necessitem de materiais com altas propriedades elásticas, evitando dessa forma o colapso do osso nos espaços de regeneração. Podendo ser indicado para regiões periondontais, por exemplo.

Para otimização das propriedades mecânicas do material há a possibilidade de aumentar as camadas fibrosas durante o processo de eletrofição otimizando sua espessura. Ou até a funcionalização das partículas de hidroxiapatita para um aumentada adesão interfacial.

4.5 ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE

O teste de toxicologia *in vitro* foi realizado a fim de avaliar se os *scaffolds* produzidos apresentam toxicidade para o crescimento celular provocando morte ou algum tipo de alteração, bem como a influência da adição da hidroxiapatita nos *scaffolds* produzidos. O ensaio foi realizado em triplicata por material e a viabilidade celular em todas as amostras foi medida por ensaio de MTT baseado na absorção óptica. Conforme observado na Figura 38 os *scaffolds* produzidos tiveram impacto negativo muito baixo, sendo a viabilidade celular acima do percentual de potencial citotóxico.

Figura 38 - Viabilidade celular das células Vero nos *scaffolds* eletrofiados de PCL, PCL/HA(5) e PCL/HA(10)



Fonte: A autora (2022)

De acordo com a norma ISO 10993-5 se a viabilidade celular for reduzida para valores inferiores a 70% o material apresenta potencial citotóxico. Observa-se, portanto, que nenhum biomaterial produzido se demonstrou tóxico. Houve, no entanto, uma pequena redução da viabilidade celular nos *scaffolds* se comparados ao controle, justificada pela forte hidrofobicidade do PCL que ocasiona uma dificuldade de aderência das células [5]. Amostras de PCL puro apresentaram um

percentual de 96% de viabilidade celular, as amostras com 5% de hidroxiapatita apresentaram um percentual de 88% e as amostras com 10% de hidroxiapatita apresentaram um percentual de 87%. Nesse sentido, foi observado que a incorporação de nano- hidroxiapatita às fibras de policaprolactona influenciou em um pequeno aumento do potencial citotóxico do material que pode ter sido ocasionado por aglomerações das partículas na extensão das fibras, deixando perceptível a necessidade de um melhoramento no padrão de dispersão.

5 CONCLUSÃO

O desenvolvimento de um sistema de eletrofiação a curta distância adaptada à uma impressora 3D mostrou-se eficiente e satisfatório para a produção de *scaffolds* eletrofiados com escrita de fibras orientadas. A técnica adaptada mostrou-se uma poderosa ferramenta para a produção de fibras com diâmetro micro e nanométricos e de materiais com estruturas controladas para aplicação na regeneração óssea.

Neste trabalho, *scaffolds* eletrofiados foram produzidos visando aplicação na engenharia de tecido. Para a produção dos *scaffolds*, nanopartículas de hidroxiapatita foram previamente sintetizadas. No entanto, para tal aplicação é necessária a caracterização detalhada do material produzido. Dessa forma, a hidroxiapatita foi caracterizada de acordo com suas propriedades físicas e químicas apresentando morfologia definida e estabilidade térmica, além de bandas de absorção e estrutura cristalina bem definidas.

Espectro de FTIR confirmou a presença de hidroxiapatita nos *scaffolds* eletrofiados através de suas bandas características. A presença do material cerâmico também foi confirmada através da análise de microscopia eletrônica de varredura com acoplamento EDS. Fez-se possível a visualização das nanopartículas sobre as fibras que constituíam os *scaffolds* bem como a presença dos elementos que compõem o material no mapa de EDS. A incorporação das nanopartículas na fibra também pôde ser confirmada pela alteração no diâmetro da mesma à medida que a porcentagem de hidroxiapatita aumentava, ocasionado pelo aumento da força eletroestática no jato de eletrofiação e pela alteração na porcentagem de decomposição na análise térmica tendo em vista o comportamento termicamente estável do material cerâmico. Através da microscopia óptica e da microscopia eletrônica de varredura foi possível determinar o comportamento orientado das fibras nos *scaffolds* produzidos, confirmando o controle de escrita no ato de produção do material.

Os materiais foram submetidos a testes mecânicos e de intumescimento, bem como a teste de citotoxicidade. Através dos resultados obtidos é possível validar o material produzido para a aplicação pretendida e avaliar a possibilidade de aplicação do sistema para produção de materiais com outras finalidades que dizem respeito à área médica.

5.1 PERSPECTIVA

- Avaliar o grau de intumescimento máximo dos *scaffolds*;
- Otimizar as propriedades mecânicas dos *scaffolds*;
- Realizar testes *in vivo* para avaliação da regeneração óssea;
- Publicar e divulgar os resultados obtidos nessa pesquisa.

REFERÊNCIAS

- [1] FREITAS, L. A. **Síntese e caracterização de hidroxiapatita porosa com propriedades osteativas**. 2020. 58f. Dissertação (mestrado em ciência dos materiais) - Universidade tecnológica Federal do Paraná. Programa de pós-graduação em ciência dos materiais. Londrina, 2020.
- [2] MORENO, M. *et al.* Scaffolds for bone regeneration: state of the art. **Current pharmaceutical design**, v.22, n.46, p.1-11, fev., 2016.
[https://doi: 10.2174/1381612822666160203114902](https://doi.org/10.2174/1381612822666160203114902).
- [3] MURUGAN, S.; PARCHA, S.R. Fabrication techniques involved in developing the composite scaffolds PCL/HA nanoparticles for bone tissue engineering applications. **J Mater. Sci. Mater. Med.**, v. 32, n. 8, ago., 2021. [https://doi:10.1007/s10856-021-06564-0](https://doi.org/10.1007/s10856-021-06564-0).
- [4] GAUTAM, S.; DINDA, A.K.; MISHRA, N.C. Fabrication and characterization of PCL/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method. **Mater. Sci. Eng.**, v. 33, n.3, p. 1228-1235, apr., 2013.
[https://doi:10.1016/j.msec.2012.12.015](https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.12.015)
- [5] MENEZES, F.C. **Eletrofiação de nanofibras poliméricas para uso em engenharia tecidual**. 2017. 71 f. Dissertação (mestrado em ciência dos materiais) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de pós-graduação em ciência dos materiais, Porto Alegre, 2017.
- [6] MURUGAN, R. RAMAKRISHNA, S. Design strategies of tissue engineering scaffolds with controlled fiber orientation. **Tissue Eng.**, v.13, n.8, p.1845-66, aug., 2007. [https://doi: 10.1089/ten.2006.0078](https://doi.org/10.1089/ten.2006.0078). PMID: 17518727.
- [7] BOLLE E.C.L. *et al.* Production of Scaffolds Using Melt Electrospinning Writing and Cell Seeding. **Methods Mol. Biol.**, v.2147, p.111-124. [https://doi:10.1007/978-1-0716-0611-7_9](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0611-7_9).
- [8] SIDDIQUI N. *et al.* Electropun Polycaprolactone Fibres in Bone Tissue Engineering: A Review. **Mol. Biotechnol.**, v.63, n.5, p.363-388, may, 2021. [https://doi:10.1007/s12033-021-00311-0](https://doi.org/10.1007/s12033-021-00311-0).
- [9] SENRA, M.R. *et al.* Thermal characterization of hydroxyapatite or carbonated hydroxyapatite hybrid composites with distinguished collagens for bone graft. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 9, n.4, p. 7190-7200, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2020.04.089>.
- [10] SHAH, F.A. Characterization of synthetic hydroxyapatite fibers using high-resolution, polarized raman spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v.75, n.4,p.475-479, 2021. [https://doi:10.1177/0003702820942540](https://doi.org/10.1177/0003702820942540).
- [11] SOUZA, D.C. **Biocompósitos eletrofiados de PLLA com alto conteúdo de partículas de fosfato de cálcio funcionalizados para regeneração óssea**. 2017.149f.Tese (Doutorado em Química)- Universidade de São Paulo. Instituto de Química, São Paulo, 2017. [https://doi:10,11606/T.46.2017.tde-14122017-134506](https://doi.org/10.11606/T.46.2017.tde-14122017-134506).

- [12] REZAEI, A.; MOHAMMADI, M.R. In vitro study of hydroxyapatite/polycaprolactone (HA/PCL) nanocomposite synthesized by an in situ sol-gel process. **Mater. sci. eng. c. mater. biol. appl.** v.33, n.1, p.:390-6, Jan., 2013. [https://doi:10.1016/j.msec.2012.09.004](https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.09.004).
- [13] DWIVEDI, R. *et al.* Polycaprolactone as biomaterial for bone scaffold: Review of literature. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v.10, n.1, p.381-388, nov., 2019. [https://doi:10.1016/j.jobcr.2019.10.003](https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2019.10.003).
- [14] BITTNER S.M. *et al.* Fabrication and mechanical characterization of 3D printed vertical uniform and gradient scaffolds for bone and osteochondral tissue engineering. **Acta Biomater.**, v.90, n.1, p.37-48, mai., 2019. [https://doi:10.1016/j.actbio.2019.03.041](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.03.041).
- [15] COSTA, W. B. **Hidroxiapatitas modificadas com óxidos de Si, Ti e Zr avaliados para aplicações como material odontológico**. 2018. 96f. Dissertação (mestrado em química) - Universidade Federal da Paraíba. Departamento de química. João Pessoa, 2018.
- [16] COLLINS, M. N.; REN, G.; YOUNG, K.; PINA, S.; REIS, R.L.; OLIVEIRA, J.M. Scaffold fabrication technologies and structure/function properties in bone tissue engineering. **Adv. Funct. Mater.**, v. 31, n.21, mar, 2021. <https://doi.org/10.1002/adfm.202010609>.
- [17] CHRISTY, N.P. *et al.* Biopolymeric nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering applications – A review. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 55, n. 101452, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101452>.
- [18] SILVA, R.F. *et al.* Biology of bone tissue: structure, function and factors that influence bone cells. **Biomed. Research international**, v. 2015, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>.
- [19] MITRA. J.; TRIPATHI, G.; SHARMA, A.; BASU, B. Scaffolds for bone tissue engineering: role of surface patterning on osteoblast response. **RSC Adv.**, v.3, n.28, p.11073, 2013.
- [20] **National cancer institute**: structure of the bone. 2022. Disponível em: <<https://training.seer.cancer.gov/anatomy/skeletal/tissue.html>> Acesso em: 03 set. 2022.
- [21] HONGSHI, M.A.; CHUN, F.; CHANG, J.; WU, CHU. 3d-printed bioceramic scaffolds: from bone tissue engineering to tumor therapy. **Acta biomaterialia**, v. 79, p. 37-59, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.08.026>.
- [22] RHO, J.Y; SPEARING, L.K.; ZIOUPOS, P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. **Med. Eng. Phys.**, v. 20, p. 1-11, 1998.
- [23] TURNBULL, G. *et al.* 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. **Bioactive Materials**, v. 3, n. 3, p. 278-314, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.10.001>.
- [24] ABDULGHANI, S.; MITCHELL, G.R. Biomaterials for *In Situ* Tissue Regeneration: a Review. **Biomolecules**, v.19, n.9, nov., 2019. [https://doi: 10.3390/biom9110750](https://doi.org/10.3390/biom9110750).

[25] LANGER, R. VACANTI, J.P. Tissue Engineering. **Science**, v.260, n.5110, p.920-926, may, 1993. doi: 10.1126/science.84935.

[26] MORENO, M.S.M.S. **Engenharia de tecidos na substituição de tecido ósseo**. 2014, 73f. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas) – Universidade Fernando Pessoa. Faculdade de ciências da saúde, Porto, 2014.

[27] BRIÃO, M.M.M. **Desenvolvimento de um substituto ósseo a partir da associação de biomateriais com células-tronco**. 2020. 69f. Dissertação (Mestrado em fisiologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências básicas da saúde. Rio Grande do Sul, 2020.

[28] YAN B. *et al.* Electrospun nanofibrous membrane for biomedical application. **SN Appl. Sci.**, v.4, n.6, p. 172, 2020. <https://doi.org/10.1007/s42452-022-05056-2>.

[29] SOUZA, D.C. **Biocompósitos eletrofiados de PLLA com alto conteúdo de partículas de fosfatos de cálcio funcionalizados para regeneração óssea**. 2017. 57 149f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade de São Paulo. Instituto de Química, São Paulo, 2017. <https://doi.org/10.11606/T.46.2017.tde-14122017-134506>.

[30] SALARIS, V. Shape-Memory Materials via Electrospinning: A Review. **Polymers (Basel)**, v.14, n.5, p.995, feb., 2022. <https://doi.org/10.3390/polym14050995>.

[31] WANG, J.; WINDBERGS M. Functional electrospun fibers for the treatment of human skin wounds. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.119, p.283-299, oct., 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.07.001>.

[32] VASS, P. *et al.* Scale-up of electrospinning technology: Applications in the pharmaceutical industry. **Wires nanomed. Nanobiotechnol.**, v.12, n.4, dec., 2019. <https://doi.org/10.1002/wnan.1611>.

[33] MELO, E. J. M. V. C. F. **Preparação de nanofibras de compósitos poliméricos por eletrofiliação e sua caracterização**. 2012. 116f. Dissertação (Mestrado em química) – Universidade Federal de Pernambuco. Departamento de química fundamental, Recife, 2012.

[34] HAN, S.; NIE, K. LI. *et al.* 3D electrospun nanofiber-based scaffolds: from preparations and properties to tissue regeneration applications. **Stem Cells Int.** v. 2021, jun., 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/8790143>.

[35] LIU, W.; THOMOPOULOS, S.; XIA, Y. Electrospun nanofibers for regenerative medicine. **Adv. Healthc. Mater.**, v.11, n.1, p.10–25, 2012. <https://doi.org/10.1002/adhm.201100021>

[36] SILVA, D.F.; LIMA, K.T.B. *et al.* PCL/Andiroba Oil (*Carapa guianensis* Aubl.) Hybrid Film for Wound Healing Applications. **Polymers (Basel)**, v.14, n.13, p.1591, may, 2021. <https://doi.org/10.3390/polym13101591>.

[37] INGRAM, T. G. Disintegration of water drops in an electric field. **Proc. R. Soc. Lond.**, 1964.

[38] FERRARIS, S.; SPRIANO, S. *et al.* Orientação Topográfica e Biomecânica de Fibras Eletrofiadas para Aplicações Biomédicas. **Polímeros**, v.12, n. 12, p.2896, 2020. <https://doi.org/10.3390/polym12122896>.

[39] HE, X. *et al.* Near-Field Electrospinning: Progress and Applications. **J. Phys. Chem**, v.121, n.16, p.8663–8678,2017. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b12783>.

[40] PÉREZ, G. G.L. *et al.* Mucoadhesive electrospun nanofibers for drug delivery systems: applications of polymers and the parameters. **Roles. Int. j. nanomedicine**, v. 15, n. 14, p. 5271-5285, 2019. <https://doi:10.2147/ijn.s193328>.

[41] HAIDER, A. *et al.* 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, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.11.015>.

[42] GHORANI, B., TUCKER, N.; Fundamentals of electrospinning as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology. **Food Hydrocoll**, n. 51, p. 227-240, 2015.

[43] TAN, S.H. *et al.* Systematic parameter study for ultrafine fiber fabrication via electrospinning process. **Polymer (guildf)**. V. 46, n.16, p. 6128-6134, 2005.

[44] MIT-UPPATHAM, C. *et al.* Ultrafine electrospun polyamide-6 fibers: effect of solution conditions on morphology and average fiber diameter. **Macromolecular chem. phys.**, v.205, n.17, p. 2327-2338, 2004. <https://doi:10.1002/macp.200400225>.

[45] SHAHABADI, S.M.S; KHERADMAND, A.; MONTAZERI, V. ZIAEE, H. Effects of process and ambient parameters on diameter and morphology of electrospun polyacrylonitrile nanofibers. **Polym. sci. ser. A.**, v. 57, n.2, p.155-167, 2015. <https://doi: 10.1134/S0965545X15020157>.

[46] VALIZADEH, A.; FARKHANI, S. Electrospinning and electrospinning nanofibers. **IET Nanobiotechnol**, n.8, v.2, p. 83-92, 2014. <https://doi: 10.1049/iet-nbt.2012.0040>.

[47] RENEKER, D. H.; YARIN, A. L.; FONG, H.; KOOMBHONGSE, S. Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning. **J. Appl. Phys.**, v. 87, p.4531–4547, 2000.

[48] RENEKER, D. H.; YARIN, A. L. Electrospinning jets and polymer nanofibers. **Polymer**, v. 49, p.2387–2425, 2008.

[49] WE, K.III; BOWLIN, G.L. Near-field electrospinning and melt electrowriting of biomedical polymers-progress and limitations. **Polymers (basel)**, v. 30, n. 13, 2021. <https://doi: 10.3390/polym13071097>.

[50] REN, S. *et al.* Aligned Fibers Fabricated by Near-Field Electrospinning Influence the Orientation and Differentiation of hPDLSCs for Periodontal Regeneration. **J Biomed. Nanotechnol**, v.1, n.13; p.1725-1734, 2017. doi: 10.1166/jbn.2017.2451.

[51] ALGHAMDI, S.; JOHN, S.; CHOUDHURY, R.N.; DUTTA, N.K. Additive manufacturing of polymer materials: progress, promise and challenges. **Polymers**, v.13, n.5, p.753, feb., 2021. <https://doi.org/10.3390/polym13050753>.

[52] SALMI M. Additive Manufacturing Processes in Medical Applications. **Materials (Basel)**. v.14, n.1, p.191, jan., 2021. <https://doi:10.3390/ma14010191>.

[53] WANG, X. *et al.* Topological design and additive manufacturing of porous metals for bone scaffolds and orthopaedic implants: A review. **Biomaterials**, v.2016, n.83, p.127–141, 2016. <https://doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.01.012>.

[54] AKMAL, J.S.; SALMI, M.; MÄKITIE, A.; BJÖRKSTRAND, R.; PARTANEN, J. Implementation of industrial additive manufacturing: Intelligent implants and drug delivery systems. **J. Funct. Biomater**, v.9, n.3, p.41, jun., 2018. <https://doi: 10.3390/jfb903004>.

[55] MA, H.S. *et al.*, 3D-printed bioceramic scaffolds: From bone tissue engineering to tumor therapy. **Acta Biomater**, v.79, p. 37-59, 2018.

[56] CHUANLIANG, C. *et al.* Characterization of bone regeneration in 3D printed ductile PCL/PEG/hydroxyapatite scaffolds with high ceramic microparticle concentration. **Biomater. Sci.** v.10, p. 138-152, 2022.

[57] DANNA, N.R.; LEUCHT, P. Designing Resorbable Scaffolds for Bone Defects. **Bull. Nyu Hosp. Jt. Dis.**, v.77, n.1, p. 39-44, mar., 2019. PMID: 30865863.

[58] CAILLEAUX, S. *et al.* Fused deposition modeling (FDM): the new asset for the production of tailored medicines. **Journal of controlled release**, v. 330, p. 821-841, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.10.056>.

[59] KOLLAMARAM, G. *et al.* Low temperature fused deposition modeling (FDM) 3D printing of thermolabile drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v.545, n.1-2, p.144-152, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.04.055>.

[60] AWAD, A. *et al.* 3D printed medicines: A new branch of digital healthcare. **Int J Pharm**, v. 548, n.1, p. 586 – 596, 2018.

[61] **14 tipos de impressora 3D:** veja como funciona cada uma. 2022. Disponível em: < <https://www.wishbox.net.br/blog/tipos-de-impressora-3d/> > Acesso em: 06 set. 2022.

[62] AWASTHI, S. *et al.* A review on hydroxyapatite coatings for the biomedical applications: experimental and theoretical perspectives. **Journal of materials chemistry b**, v.2021, n.2, nov., 2020.

[63] MUNIR, M.U. *et al.* Nano-hydroxyapatite as a delivery system: overview and advancements. **Artificial cells, nanomedicine and biotechnology**, v. 49, n.1, p. 717-727, dec., 2021. <https://doi:10.1080/21691401.2021.2016785>.

[64] LE GEROS, R.Z; LE GEROS, J. Dence hidroxyapatite in handbook of bioactive ceramics. **CRC press**, v. 2, 1990.

[65] LE GEROS, R.Z. Calcium Phosphate in oral biology and medicine. **Monogr Oral Sci.**, v.15, n.1, p. 201, 1991. PMID: 1870604.

[66] AOKI, H.(1991). **Science and medical application of hydroxyapatite**. 1. ed. Tokyo: JAAS.

[67] SHAH, F.A. Characterization of synthetic hydroxyapatite fibers using high-resolution, polarized raman spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v.75, n.4,p.475-479, 2021. <https://doi.org/10.1177/0003702820942540>.

[68] KHAJURIA, D.K.; RAZDAN, R.; MAHAPATRA, D.R. Development, in vitro and in vivo characterization of zoledronic acid functionalized hydroxyapatite nanoparticle based formulation for treatment of osteoporosis in animal model. **Eur J Pharm Sci.**, v.23, n.66, p.173-83, jan., 2015. [https://doi: 10.1016/j.ejps.2014.10.015](https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.10.015).

[69] FÉLIX, M. **Desenvolvimento de hidroxiapatita contendo prata via precipitação e imersão: avaliação do efeito antimicrobiano**. 2015. 67f. Dissertação (mestrado em engenharia e ciência dos materiais) - Universidade de São Paulo. Faculdade de zootecnia e engenharia de alimentos. São Paulo, 2015.

[70] VARMA, H.K. et al. In vitro Calcium Phosphate Growth over funcionalized cotton fibers. **Science: Materials in medicine**, klumwer academic publishers chapman & hall. vol 10, n.10-1, 1999.

[71] ISHIDA, M.A.; VOLKMER, T.M.; SANTOS, L. A. Obtenção de hidroxiapatita cristalina por via úmida. **49º Congresso Brasileiro de Cerâmica**. São Pedro-São Paulo, 2003.

[72] JAVIER, M.A.M. **Produção de nanofibras de policaprolactona e poli(álcool vinílico) / colágeno tipo I por eletrofição coaxial para regeneração de pele**. 2018. 113f. Dissertação (Mestrado em engenharia metalúrgica e de materiais. Programa de engenharia metalúrgica e de materiais, Rio de Janeiro, 2018.

[73] LOH, X.J.; The Effect of pH on the hydrolytic degradation of Poly(e-caprolactone)-block-Poly(ethylene glycol) copolymers. **J. Appl. Polym. Sci**, v. 127, n.3, p. 2046-2056, fev., 2013.

[74] SINHA, V. R.; BANSAL, K.; KAUSHIK, R.; KUMRIA R.; TREHAN, A. Polycaprolactone microspheres and nanospheres: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p. 1-23, 2004.

[75] CIPITRIA, A. *et al.* Design, fabrication and characterization of PCL electrospun scaffolds-a review. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 26, p. 9419-9453, mar., 2011. <https://doi.org/10.1039/C0JM04502K>.

[76] KADE, J.C.; DALTON, P.D. **Polymers for Melt Electrowriting**. *Ad. Heal. Mater*, v.10, n.1, sep., 2020. <https://doi.org/10.1002/adhm.202001232>.

[77] PARK, J. *et al.* Enhanced Osteogenic Differentiation of Periodontal Ligament Stem Cells Using a Graphene Oxide-Coated Poly(ε-caprolactone) Scaffold. *Polymers*, v.13, n. 797, 2021. <https://doi.org/10.3390/polym13050797>.

- [78] WU, Y. *et al.* 3D-Printed bioactive calcium silicate/poly- ϵ -caprolactone bioscaffolds modified with biomimetic extracellular matrices for bone regeneration. **Int. J. Mol. Sci.**, n.20, v. 942, 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20040942>
- [79] KOUTSOPOULOS, S. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods. **Journal of Biomedical Material Research**, v. 62, n.4, p. 600-612, 2002.
- [80] BARBOSA, A. A. **Hidroxiapatita multifuncional**: da síntese e caracterização à aplicação biomédica. 2020. 122f. Tese (Doutorado em Ciência dos Materiais) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2020.
- [81] **Manual Impressora 3D Cliever CL1 Black Edition**. Disponível em: <<https://docplayer.com.br/48907779-Manual-da-sua-impressora-3d-cliever-cl1-black-edition.html>>. Acesso em: 08 jan 2022.
- [82] GRALIK, G.G.B. Caracterização de termistores automotivos do tipo ntc. **Matéria**, v.24, n.4. Rio de Janeiro, 2019. <https://doi.org/10.1590/s1517-707620190004.0827>.
- [83] BRATTI, V. M. **Desenvolvimento de um kit didático experimental para o ensino de resistores, capacitores e circuitos de temporização**. 2018. 129f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ensino de Física) — Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ensino de Física, Campo Mourão 2017.
- [84] ZHANG, S., HUANG, Y., YANG, X., *et al.*; Gelatin nanofibrous membrane fabricated by electrospinning of aqueous gelatin solution for guided tissue regeneration. **J. Biomed. Mater. Res. A.**, v.90, n. 3, p.671-679, 2009.
- [85] EBRAHIMI S.*et al.* Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite powders using Response Surface Methodology (RSM). **PLoS One**, v.16, n.5, may, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251009>.
- [86] YANG, P. *et al.* Bioactive, luminescent and mesoporous europium-doped hydroxyapatite as a drug carrier. **Biomaterials**, v. 29, n. 32, p. 4341–4347, 2008
- [87] PAVINATO, V. P. **Estudo da solubilidade de apatitas em meios de interesse biológico**. 2012. 79f. Dissertação (mestrado em química) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Química, Araraquara, 2012.
- [88] GHEDJEMIS, A. *et al.* A comparative study on properties of hydroxyapatite prepared from bovine and dromedary bone. **Preprint**, v.10, n.1, 2021. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-794688/v1>.
- [89] SZUSTAKIEWICZ, K. *et al.* The influence of hydroxyapatite content on properties of poly(L-lactide)/hydroxyapatite porous scaffolds obtained using thermal induced phase separation technique. **European Polymer Journal**, v. 113, p. 313-320, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.01.073>.
- [90] RAJZER, I. Fabrication of bioactive polycaprolactone/hydroxyapatite scaffolds with final bilayer nano/micro-fibrous structure for tissue engineering application.

J.Mater.Sci., v.49, p.5799-5807, may, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10853-014-8311-3>.

[91] COLEMAN, M. M.; ZARIAN, J. Fourier-transform infrared studies of polymer blends. II. Poly(ϵ -caprolactone)–poly(vinyl chloride) system. **Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition**, v. 17, n. 5, p. 837–850, may, 1979. <https://doi.org/10.1002/pol.1979.180170509>.

[92] ELZEIN T. *et al.* FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 273, n. 2 p.381- 387, may, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.02.001>.

[93] PHILLIPSON, K.; HAY, J. N.; JENKINS, M. J. Thermal analysis FTIR spectroscopy of poly (ϵ -caprolactone). **Thermochimica Acta**, v.595, p.74-82, 2014.

[94] SASKA, S. **Materiais compósitos orgânico-inorgânico a base de celulose bacteriana com peptídeos regulatórios de fatores de crescimento, OGP e OGP [10,14], para regeneração óssea.** 2011. 256f. Tese (doutorado em biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Química, Araraquara, 2011.

[95] SANI, I.S.; *et al.* Preparation and characterization of polycaprolactone/chitosan-g-polycaprolactone/hydroxyapatite electrospun nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 182, p. 1638-1649, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.163>.

[96] FU, C. *et al.* Enhanced cell proliferation and osteogenic differentiation in electrospun PLGA/hydroxyapatite nanofibre scaffolds incorporated with graphene oxide. **Plos one**, v.12, n.11, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188352>

[97] PRABHAKARAN, M. P. *et al.* Electrospun nanostructured scaffolds for bone tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 5, p. 2884-2893, 2009.

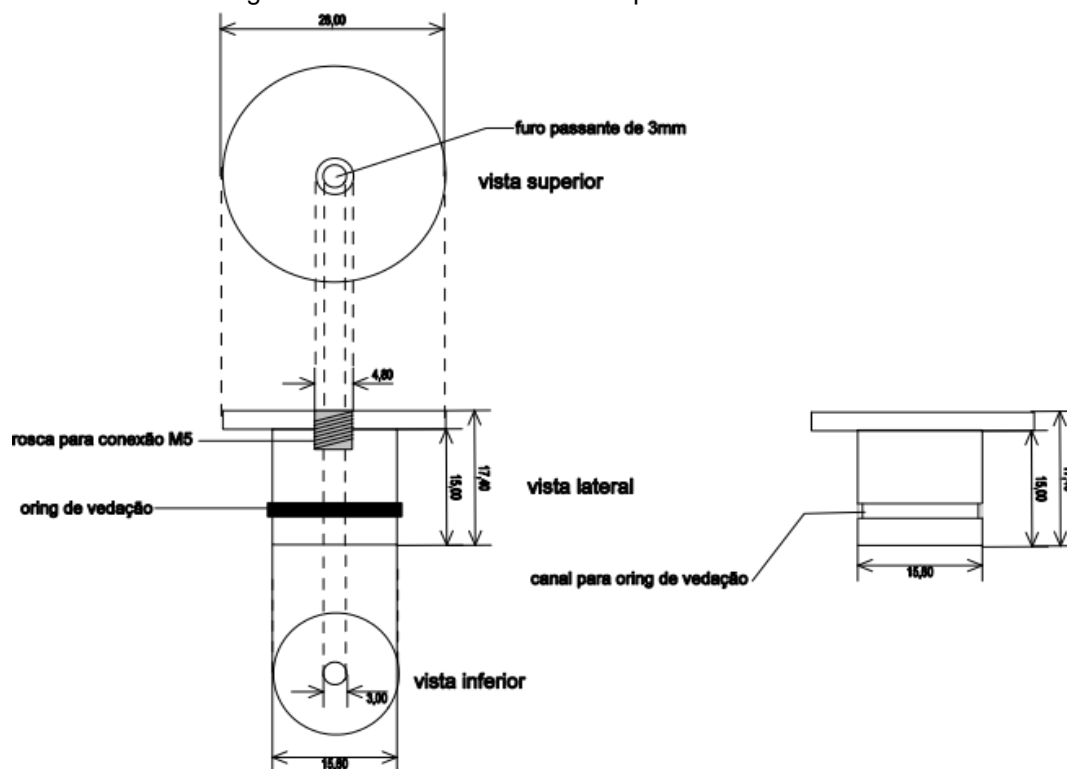
[98] HYUNRYUNG, KYM. *et al.* Mechanically-reinforced electrospun composite silk fibroin nanofibers containing hydroxyapatite nanoparticles. **Materials Science and Engineering: C**, v.40, p. 324-335, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.04.012>.

[99] FUJIHARA, K. *et al.* Guided bone regeneration membrane made of polycaprolactone/calcium carbonate composite nano-fibers. **Biomaterials**, v. 26, n.19, p. 4139-47, 2005.

[100] UEYAMA Y. *et al.* Usefulness as guided bone regeneration membrane of the alginate membrane. **Biomaterials**, v.23, p.2027-33, 2002.

APÊNDICE A – DESENHO MECÂNICO DO PISTÃO DE BRONZE

Figura 39 - Desenho mecânico do pistão de bronze



Fonte: A autora (2022)