

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS**

Vanessa Oliveira Castro

**MEMBRANAS ELETROFIADAS DE POLI(L - ÁCIDO  
LÁCTICO-*CO*-ÁCIDO GLICÓLICO) /  $\beta$  - FOSFATO  
TRICÁLCICO PARA APLICAÇÃO EM  
REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA**

Florianópolis  
2018



Vanessa Oliveira Castro

**MEMBRANAS ELETROFIADAS DE POLI (L - ÁCIDO  
LÁCTICO-*CO*-ÁCIDO GLICÓLICO) /  $\beta$  - FOSFATO  
TRICÁLCICO PARA APLICAÇÃO EM  
REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Claudia Merlini  
Coorientador: Prof. Dr. Marcio Celso Fredel

Florianópolis  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Oliveira Castro, Vanessa

Membranas eletrofiadas de poli (L-ácido láctico  
co-ácido glicólico) /  $\beta$ -fosfato tricálcico para  
aplicação em Regeneração Óssea Guiada / Vanessa  
Oliveira Castro ; orientadora, Claudia Merlini,  
coorientador, Marcio Celso Fredel, 2018.

107 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós  
Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais,  
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Ciência e Engenharia de Materiais. 2.  
Regeneração Guiada Óssea. 3. Membranas eletrofiadas.  
4. PLGA. 5.  $\beta$ -TCP. I. Merlini, Claudia . II.  
Celso Fredel, Marcio. III. Universidade Federal de  
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência  
e Engenharia de Materiais. IV. Título.

Vanessa Oliveira Castro

**MEMBRANAS ELETROFIADAS DE POLI (L - ÁCIDO  
LÁCTICO-CO-ÁCIDO GLICÓLICO) /  $\beta$  - FOSFATO  
TRICÁLCICO PARA APLICAÇÃO EM  
REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais.

Florianópolis, 25 de abril de 2018.

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Claudia Merlini  
Orientadora

---

Prof. Dr. Guilherme Mariz de Oliveira Barra  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andrea C. K. Bierhalz  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marcia Adriana Tomaz Duarte  
Universidade UNISOCIESC



Este trabalho é dedicado aos meus  
queridos pais, Rejane e Luíz



## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Claudia Merlini, meu agradecimento especial pela orientação, incentivo e amizade. Obrigada por toda generosidade e paciência.

Ao meu coorientador, Marcio Fredel, pelas possibilidades criadas. Obrigada por todo o incentivo na área de biomaterias.

Ao professor Guilherme Mariz de Oliveira, pelo suporte e pelas contribuições. Seu apoio foi essencial para o andamento de toda a pesquisa.

Ao pesquisador Águedo Aragones, pelas contribuições nos assuntos relacionados à odontologia. Pela paciência e disponibilidade em sempre ajudar. Agradeço todo o incentivo na área de Regeneração Tecidual.

À professora Federica Bondioli, por todo o apoio na realização de experimentos durante o intercâmbio Erasmus na Itália.

Aos colegas do Policom, pelo acolhimento e ajuda em momentos importantes.

À Carla por toda amizade, pela presença quase diária durante o mestrado. Obrigada pelo companheirismo e carinho.

À Lais por todo incentivo, carinho e amor. Agradeço por toda a ajuda e sugestões na pesquisa. E também por fazer dos meus dias mais leves e felizes.

Aos meus pais Rejane e Luíz, pela educação, incentivo e amor incondicional. E à toda minha família, especialmente minhas tias Bete, Aninha e Inês, pelo amor e apoio em todos os momentos da minha vida.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação Engenharia Mecânica (PGMAT).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que de alguma forma colaboraram na realização deste trabalho.



“Tempo virá em que uma pesquisa diligente e contínua esclarecerá aspectos que agora permanecem escondidos. O espaço de tempo de uma vida, mesmo se inteiramente devotada ao estudo do céu, não seria suficiente para investigar um objetivo tão vasto... Este conhecimento será conseguido somente através de gerações sucessivas.

Tempo virá em que os nossos descendentes ficarão admirados de que não soubéssemos particularidades tão óbvias a eles... Muitas descobertas estão reservadas para os que virão, quando a lembrança de nós estará apagada.

O nosso universo será um assunto sem importância, a menos que haja alguma coisa nele a ser investigada a cada geração... A natureza não revela seus mistérios de uma só vez”.

(Sêneca, Problemas Naturais, Livro, século I)



Trabalhos publicados em congressos científicos:

1- Vanessa O. Castro, Guilherme M. O. Barra, Marcio C. Fredel, Thaianie B. Knopf, Claudia Merlini, Águedo Aragonés. **Obtenção e caracterização de membranas eletrofiadas de PLGA/ $\beta$ -TCP, com potencial para aplicação em engenharia do tecido ósseo.** 14º Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Órgãos Artificiais e Engenharia de Tecidos- SLABO (5ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais - OBI), Maresias SP, 2017.

2- Vanessa O. Castro, Claudia Merlini, Thaianie B. Knopf, Águedo Aragonés, Marcio C. Fredel, Guilherme M. O. Barra. **Desenvolvimento de membranas eletrofiadas de PLA/HA, com potencial para aplicação em engenharia de tecido ósseo.** 14º Congresso Brasileiro de Polímeros, Águas de Lindóia, SP, 2017.



## Resumo

A Regeneração Óssea Guiada (ROG) é uma técnica cirúrgica que utiliza membranas de barreira para a regeneração de defeitos ósseos. A membrana deve possuir propriedades físico-químicas, mecânicas e biológicas adequadas para proteger o defeito ósseo e estimular a neoformação óssea. Contudo, o rompimento total ou parcial da membrana é um problema frequente na ROG. Além disso, pode ocorrer a exposição da membrana devido a deiscências do tecido mole. Estas complicações podem resultar em incompleta regeneração óssea e infecção local no espaço criado pela membrana. Para superar essas complicações e obter uma membrana com desempenho satisfatório para ROG, foram desenvolvidas nesta dissertação membranas eletrofiadas de poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), contendo  $\beta$  - fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP). Um estudo foi realizado para determinar os parâmetros de eletrofição mais adequados para a obtenção de membranas com fibras uniformes e ausentes de defeitos. Subsequentemente, foram adicionadas diferentes frações mássicas (5, 10 e 20 m%) de  $\beta$ -TCP para investigar o efeito na microestrutura, nas propriedades físico-químicas, mecânicas e biológicas das membranas. As membranas de PLGA/ $\beta$ -TCP foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV); ângulo de contato; espectroscopia no infravermelho (FTIR); calorimetria diferencial (DSC); análise termogravimétrica (TGA); análise dinâmico-mecânico (DMA) e ensaio de tração. Foi avaliada também a degradação *in vitro* e a citotoxicidade das membranas. Fibras uniformes e ausentes de defeitos foram obtidas a partir da eletrofição de uma solução de 7,4m% de PLGA, com os seguintes parâmetros: tensão elétrica de 18 kV; distância agulha/coletor de 25 cm e vazão de 1 mL.h<sup>-1</sup>. As membranas de PLGA/ $\beta$ -TCP apresentaram microestrutura adequada para a adesão e proliferação celular, com tamanhos de poros entre 4 - 6,5  $\mu$ m e porosidade entre 60 - 80%. As partículas de  $\beta$ -TCP não aumentaram a hidrofiliabilidade das membranas. A estabilidade térmica, o módulo de armazenamento, o módulo de elasticidade e a resistência à tração aumentaram com a incorporação de 5 e 10m% de  $\beta$ -TCP, enquanto reduziram com a adição de 20 m% de  $\beta$ -TCP. A degradação *in vitro* das membranas não foi evidente no período de 28 dias. As análises de citotoxicidade apresentaram não-citotoxicidade para todas as membranas. Ademais, o aumento da fração mássica de  $\beta$ -TCP aumentou a adesão e proliferação de células fibroblásticas (L929). Enquanto com células osteoblásticas (MC3T3), as membranas de PLGA contendo 5%  $\beta$ -TCP apresentaram o melhor resultado, que são, portanto, adequadas para permitir uma boa integração tecidual durante a ROG. Segundo os resultados obtidos, a partir do ajuste dos parâmetros de eletrofição e da incorporação  $\beta$ -TCP foi possível determinar que a membrana eletrofiada de PLGA contendo 5m% de  $\beta$ -TCP exhibe desempenho mais satisfatório para aplicação na ROG.

**Palavras-chave:** Eletrofição, Regeneração Óssea Guiada, poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico),  $\beta$  - fosfato tricálcico.



## Abstract

Guided bone regeneration (GBR) is a surgical procedure that uses barrier membranes to regenerate bone defects. The membranes used must have the appropriate physicochemical and biological characteristics to protect the bone defect and stimulate new bone formation. However, partial or total membrane disruption is an usual problem that occurs in GBR. Furthermore, the membrane can be exposed due to soft tissue dehiscence. These complications can result in local infection and incomplete bone regeneration at regeneration sites. To overcome these complications and obtain a membrane with the appropriate characteristics for use in GBR, electrospun poly (L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) membranes containing  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) were developed within the scope of thesis. A study was carried out to determinate the most appropriate electrospinning parameters needed to produce membranes with uniform fibers devoid of defects. Subsequently, different mass fractions of  $\beta$ -TCP (5, 10 and 20 wt.%) were added to PLGA solution, and their effects on membrane properties were examined in terms of microstructure, as well as physicochemical, mechanical and biological properties. PLGA/ $\beta$ -TCP membranes were characterized using scanning electron microscopy (SEM), water contact angle, infrared spectroscopy (FTIR), differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetric analysis (TGA), dynamic mechanical analysis (DMA) and tensile tests. In vitro degradation and cytotoxicity were also analyzed. Uniform fibers devoid of defects were obtained from the electrospinning of a PLGA solution at 7.4 wt.% with the following parameters: 18 kV voltage, distance between needle and collector 25 cm, and flow 1 mL.h<sup>-1</sup>. PLGA/ $\beta$ -TCP membranes presented the appropriate microstructure for cell adhesion and proliferation, with 4 - 6.5  $\mu$ m pore sizes and 60 - 80% porosity.  $\beta$ -TCP particles did not increase membrane hydrophilicity. Thermal stability, storage modulus, Young's modulus and tensile strength increased with the incorporation of 5 and 10 wt.%  $\beta$ -TCP, while these same properties decreased with the incorporation of 20 wt.%  $\beta$ -TCP. Samples showed no evidence of in vitro degradation during a period of 28 days. Cytotoxicity analysis indicated non-cytotoxicity for all membranes. Additionally, increasing the  $\beta$ -TCP mass fractions raised fibroblasts (L929) adhesion and proliferation. Analyzing adhesion and proliferation using osteoblastic cells (MC3T3) yielded the best result to PLGA membranes containing 5 wt.%  $\beta$ -TCP, which are therefore shown to be suitable for enabling effective tissue integration during GBR. Based on the results obtained from the electrospinning parameter adjustments and the addition of  $\beta$ -TCP, it was possible to determine that PLGA membranes with 5 wt.%  $\beta$ -TCP exhibit the most satisfactory performance for use in GBR.

**Keywords:** Electrospinning, Guided Bone Regeneration, poly(L-lactic-co-glycolic acid),  $\beta$  - tricalcium phosphate.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplo de aplicação de membranas em ROG.....	32
Figura 2 - Imagem de fluorescência de uma membrana eletrofiada de PLLA/quitosana, com penetração superficial de células fibroblásticas NIH 3T3 em 5 dias de cultura. ....	35
Figura 3 - Esquema da configuração básica do processo de eletrofição.....	38
Figura 4 - Micrografia MEV de fibras eletrofiadas de PLGA, a) fibras aleatórias e b) fibras alinhadas. ....	39
Figura 5 - Micrografia MEV de fibras eletrofiadas de PLGA com osteoblastos aderidos nas membranas: a) no interior das fibras aleatórias e b) na superfície das fibras orientadas.....	40
Figura 6 - Micrografias de fibras eletrofiadas de PCL: a) 12 % m/v, b) 15 % m/v e c) 18% m/v.....	41
Figura 7 - Formação do cone de Taylor.....	43
Figura 8 - Representação da estrutura química do PLGA. ....	45
Figura 9 - Degradação por hidrólise do PLGA.....	47
Figura 10 - Tempo de meia vida <i>in vivo</i> de L-PLGA com diferentes proporções (LA/GA). ....	47
Figura 11 - a) Grau de cristalinidade, b) temperatura de transição vítrea e temperatura de fusão de diferentes PLGAs. Temperatura de transição vítrea (o) e (■) temperatura de fusão. ....	48
Figura 12 - Estrutura cristalina do $\beta$ -TCP padrão ICSD 97500..	50
Figura 13 - Esquema da obtenção do $\beta$ -TCP.....	54
Figura 14 - Esquema ilustrativo da preparação das membranas eletrofiadas de PLGA/ $\beta$ -TCP. ....	55
Figura 15 – a) Equipamento de eletrofição e b) Membrana eletrofiadas de PLGA/ $\beta$ – TCP (espessura $0,03 \pm 0,02$ mm). ....	56
Figura 16 - Equipamento NETZSCH DMA 242E durante o ensaio DMA. ....	59
Figura 17 - Esquema da metodologia utilizada no teste <i>in vitro</i> . 63	
Figura 18 - Esquema geral da metodologia utilizada na pesquisa .....	64
Figura 19 - Micrografias das membranas eletrofiadas a partir das soluções poliméricas de PLGA 4,8 m%, 5,7 m%, 6,5 m% e 7,4 m%, com vazão de alimentação $1 \text{ mL.h}^{-1}$ , tensão elétrica 18 kV e distância agulha/coletor 25 cm. Os histogramas com a distribuição do diâmetro das fibras também são apresentados.....	66
Figura 20 - Micrografias de MEV das membranas eletrofiadas de PLGA puro em função da tensão elétrica aplicada: 16 kV, 18 kV e 20 kV.	

Distância agulha/coletor 25 cm e vazão de alimentação 1 mL.h <sup>-1</sup> . Os histogramas com a distribuição do diâmetro das fibras também são apresentados.....	68
Figura 21 - Micrografias de MEV das membranas eletrofiadas de PLGA puro em função da vazão de alimentação de: 0,5 mL.h <sup>-1</sup> , 1 mL.h <sup>-1</sup> e 2 mL.h <sup>-1</sup> . Tensão elétrica aplicada 18 kV, distância agulha/coletor 25 cm. Os histogramas com a distribuição do diâmetro das fibras também são apresentados.....	69
Figura 22 - Micrografias MEV das membranas eletrofiadas de PLGA puro com distância agulha/coletor de: 15 cm, 20 cm e 25 cm. Tensão elétrica aplicada 18kV e vazão de alimentação 1mL.h <sup>-1</sup> . Os histogramas com a distribuição do diâmetro das fibras também são apresentados.....	71
Figura 23 - Micrografia MEV das partículas de $\beta$ -TCP.....	72
Figura 24 - Difratogramas de DRX do $\beta$ -TCP fabricado no CERMAT- UFSC e $\beta$ -TCP padrão. ....	73
Figura 25 - Espectro de FTIR das partículas de $\beta$ -TCP.....	74
Figura 26 - Micrografias MEV-FEG das membranas eletrofiadas de PLGA puro com diferentes frações mássicas de $\beta$ -TCP (5, 10 e 20 m%), tensão elétrica 25 kV, vazão de alimentação de 1 mL.h <sup>-1</sup> e distância agulha/coletor de 25 cm. Os histogramas com a distribuição do diâmetro das fibras também são apresentados. ....	75
Figura 27 - Teste de ângulo de contato na membrana eletrofiada de PLGA puro.....	76
Figura 28 - Espectro de FTIR das membranas eletrofiadas de PLGA puro e PLGA/ $\beta$ -TCP e partículas de $\beta$ -TCP. ....	77
Figura 29 - Curvas de (a) TG e (b) DrTG das membranas de PLGA puro e PLGA/ $\beta$ -TCP com diferentes frações mássicas de $\beta$ -TCP.....	79
Figura 30 - Curvas DSC das membranas eletrofiadas de PLGA puro e PLGA/ $\beta$ -TCP. ....	81
Figura 31 - Curvas de DMA apresentando (a) módulo de armazenamento e (b) tangente de perda em função da temperatura para as membranas eletrofiadas de PLGA puro e PLGA/ $\beta$ -TCP. ....	82
Figura 32 - Absorção das membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA/ $\beta$ -TCP. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média em triplicata e comparados através da análise de variância one-way (ANOVA) seguida pelo teste Tukey, considerando-os estatisticamente diferentes quando $p \leq 0,05$ .....	85
Figura 33 - Ganho de massa das membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA/ $\beta$ -TCP. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média em triplicata e comparados através da análise de variância one-way	

(ANOVA) seguida pelo teste Tukey, considerando-os estatisticamente diferentes quando $p \leq 0,05$ . .....	86
Figura 34 - Valores de pH da solução de PBS durante o teste de degradação <i>in vitro</i> . Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média em triplicata e comparados através da análise de variância one-way (ANOVA) seguida pelo teste Tukey, considerando-os estatisticamente diferentes quando $p \leq 0,05$ . .....	87
Figura 35 - Atividade metabólica realizados com fibroblastos (L929). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média em triplicata e comparados através da análise de variância one-way (ANOVA) seguida pelo teste Tukey, considerando-os estatisticamente diferentes quando $p \leq 0,05$ . .....	88
Figura 36 - Viabilidade dos fibroblastos (L929), utilizando o kit <i>Live/Dead</i> ®. Em verde podem ser visualizadas as células viáveis e em vermelho as células mortas. ....	88
Figura 37 - Atividade metabólica de células osteoblásticas (MC3T3). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média em triplicata e comparados através da análise de variância one-way (ANOVA) seguida pelo teste Tukey, considerando-os estatisticamente diferentes quando $p \leq 0,05$ . .....	89
Figura 38 - Viabilidade das células osteoblásticas (MC3T3), utilizando o kit <i>Live/Dead</i> ®. Em verde podem ser visualizadas as células viáveis e em vermelho as células mortas.....	90



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estado da arte de alguns estudos (2015 - 2017), destacando-se a composição e os diferentes métodos utilizados na fabricação de membranas para aplicação em ROG.....	36
Tabela 2 - Propriedades dos solventes utilizados neste estudo...	53
Tabela 3 - Lista das composições referente às soluções finais de PLGA puro e PLGA/ $\beta$ -TCP.....	55
Tabela 4 - Lista dos parâmetros de processo investigados.....	56
Tabela 5 - Área de superfície específica, diâmetro das fibras, tamanho de poro, porosidade e ângulo de contato das membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA/ $\beta$ -TCP.....	76
Tabela 6 - Atribuições das bandas de absorção na região do infravermelho das membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA/ $\beta$ -TCP.	78
Tabela 7- Atribuições das bandas de absorção na região do infravermelho das partículas de $\beta$ -TCP.....	78
Tabela 8 - Intervalo de degradação térmica e temperatura de degradação máxima (DrTg) das membranas de PLGA puro e PLGA/ $\beta$ -TCP com diferentes frações mássicas de $\beta$ -TCP.....	80
Tabela 9 - Resultados extraídos das curvas DSC das membranas eletrofiadas de PLGA puro e PLGA/ $\beta$ -TCP.....	81
Tabela 10 - Propriedades mecânicas das membranas de PLGA puro e PLGA/ $\beta$ -TCP com diferentes frações mássica (5,10 e 20 m%).	84



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATR	Reflexão total atenuada
BET	Método de Stephen Brunauer, Paul Hugh Emmett e Edward Teller
Cu	Cobre
d	Diâmetro
DMA	Análise termodinâmica-mecânica
DMF	Dimetilformamida
DCE	Dicloroetano
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DRX	Difração de raios-X
DrTG	Derivada primeira da variação de massa
E'	Módulo de armazenamento
FTIR	Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier
GA	Monômero ácido glicólico
LA	Monômero ácido láctico
MEC	Matriz extracelular
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MEV-FEG	Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo
PLGA	Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)
PVDF	Poli (fluoreto de vinilideno)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
Tan $\delta$	Tangente de perda
TCP	Fosfato tricálcico
$\beta$ -TCP	Fase beta – fosfato tricálcico
T <sub>f</sub>	Temperatura de fusão
T <sub>g</sub>	Temperatura de transição vítrea
T <sub>c</sub>	Temperatura de cristalização
TGA	Análise termogravimétrica
u.a	Unidade arbitrária



## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	Fase alfa
$\beta$	Fase beta
$\gamma$	Fase gama
%	Porcentagem
m%	Fração em massa
mol%	Porcentagem em mol
$\Delta H_f$	Entalpia de fusão
$\lambda$	Comprimento de onda
g	Gramas
°C	Grau Celsius
°C.min <sup>-1</sup>	Grau Celsius por minuto
$\mu\text{m}$	Micrometro
$2\theta$	Ângulo de Bragg
mL	mililitro
nm	Nanometro
pH	Potencial Hidrogeniônico
v/v	Volume/volume



# Sumário

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>27</b>
1.1	OBJETIVOS .....	31
1.1.1	Objetivo geral.....	31
1.1.2	Objetivos específicos .....	31
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>32</b>
2.1	REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA.....	32
2.2	MEMBRANAS REABSORVÍVEIS PARA APLICAÇÃO EM REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA.....	33
2.3	DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS POR ELETROFIAÇÃO.....	37
2.3.1	Parâmetros da solução.....	40
2.3.2	Parâmetros do processo.....	43
2.3.3	Parâmetros ambientais .....	45
2.4	POLI (ÁCIDO LÁCTICO-CO-ÁCIDO GLICÓLICO) .....	45
2.5	$\beta$ -FOSTATO TRICÁLCICO .....	49
2.6	Resumo e discussão da literatura .....	51
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>53</b>
3.1	MATERIAIS.....	53
3.2	MÉTODOS .....	53
3.2.1	Síntese das partículas de $\beta$ -TCP .....	53
3.2.2	Obtenção de membranas eletrofiadas de PLGA puro e PLGA/ $\beta$ -TCP.....	54
3.3	CARACTERIZAÇÃO .....	57
3.3.1	Microscopia eletrônica de varredura.....	57
3.3.2	Densidade.....	57
3.3.3	Difração de Raios-X.....	57
3.3.4	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier 58	
3.3.5	Ângulo de contato .....	58
3.3.6	Área de superfície específica pelo método BET .....	58
3.3.7	Porosidade.....	58
3.3.8	Calorimetria exploratória diferencial .....	59
3.3.9	Análise termodinâmica-mecânica .....	59
3.3.10	Análise termogravimétrica .....	60

3.3.11	Resistência à tração.....	60
3.3.12	Capacidade de absorção.....	60
3.3.13	Degradação <i>in vitro</i> .....	61
3.3.14	Citotoxicidade.....	61
3.3.15	Adesão e proliferação de células osteoblásticas .....	63
3.3.16	Análise Estatística.....	64
3.3.17	Resumo .....	64
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>65</b>
4.1	MEMBRANAS ELETROFIADAS DE PLGA PURO.....	65
4.1.1	Efeito da concentração polimérica.....	65
4.1.2	Efeito da tensão elétrica.....	67
4.1.3	Efeito da vazão de alimentação.....	69
4.1.4	Efeito da distância agulha/coletor.....	70
4.1.5	Considerações parciais.....	71
4.2	MEMBRANAS ELETROFIADAS DE PLGA/ $\beta$ -TCP.....	72
4.2.1	Caracterização das partículas de $\beta$ -TCP.....	72
4.2.2	Caracterização das membranas eletrofiadas .....	74
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>91</b>
5.1	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	93
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIA.....</b>	<b>94</b>
	<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>102</b>
	<b>APÊNDICE B.....</b>	<b>103</b>
	<b>APÊNDICE C.....</b>	<b>104</b>
	<b>APÊNDICE D.....</b>	<b>105</b>
	<b>ANEXO 1.....</b>	<b>106</b>
	<b>ANEXO 2.....</b>	<b>107</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A regeneração de defeitos ósseos tem sido um problema na periodontia e na implantodontia. Usualmente, ocorre a invasão de tecido epitelial e conjuntivo para dentro do defeito ósseo. A invasão destes tecidos dificulta a neoformação óssea e causa uma regeneração insatisfatória do defeito ósseo (DAHLIN et al., 1988). Caso haja uma regeneração óssea insatisfatória, o defeito é reconstruído com baixo volume ósseo, o que impossibilita, por exemplo, o uso de implantes ou ainda, o reestabelecimento de uma estrutura óssea saudável da região afetada em caso de doenças.

A Regeneração Óssea Guiada (ROG) é uma técnica cirúrgica que visa a regeneração de defeitos ósseos através do uso de membranas de barreiras. Esse processo pode ser combinado, ou não, de enxerto ósseo particulado e/ou substitutos ósseos (LIU; KERNS, 2014). As membranas de barreira excluem mecanicamente a invasão de células do tecido epitelial e conjuntivo para dentro do defeito ósseo. Assim, a regeneração óssea é estabelecida através da migração de células osteogênicas ou osteoprogenitoras (se diferenciam em osteoblastos) para dentro do defeito ósseo (DAHLIN et al., 1988) (RAKHMATIA et al., 2013). Para assegurar o sucesso das membranas para a ROG, as mesmas devem atender a certos requisitos, tais como: biocompatibilidade, propriedades de barreira celular, manutenção do espaço, integração tecidual e ser clinicamente manuseável (DEWAIR; BAUR; ZIEGLER, 1985).

As membranas na ROG podem ser divididas em dois principais tipos: não-reabsorvíveis e reabsorvíveis. Membranas não-reabsorvíveis, como de titânio e poli (tetrafluoretileno) (PTFE), são comercialmente muito utilizadas devido, principalmente, à biocompatibilidade associada à boa manutenção do espaço a ser regenerado, além de ser clinicamente manuseável. Entretanto, a principal desvantagem de membranas não-reabsorvíveis é a necessidade de uma segunda cirurgia para a retirada. Além disso, devido a rigidez dessas membranas, as mesmas podem ficar expostas ao meio bucal e aumentar os riscos de infecções. Por esse motivo, gradualmente as membranas reabsorvíveis têm substituído as membranas não-reabsorvíveis (SAM; MADHAVAN PILLAI, 2014). Dentre os materiais mais utilizados para a produção de membranas reabsorvíveis para a ROG, encontram-se o colágeno e os polímeros sintéticos. A principal vantagem do uso destes materiais está na ausência de uma segunda cirurgia para retirada da membrana. Membranas de colágeno, como BioGuide® e Collprotect®, apresentam vantagens em comparação aos polímeros sintéticos, como superior biocompatibilidade,

biodegradabilidade e afinidade celular. Entretanto, o alto custo, fontes indefinidas, baixas propriedades mecânicas e alta taxa de degradação, limitam o seu uso (BEHRING et al., 2008). Já as membranas reabsorvíveis constituídas de polímeros sintéticos apresentam menor custo, além de boas propriedades mecânicas e taxas de degradação que podem ser ajustáveis. Sendo assim, o desenvolvimento de membranas reabsorvíveis a partir de diversos polímeros sintéticos, tais como: policaprolactona (PCL) (CHONG et al., 2007), poli (ácido glicólico) (PGA) (CHEN et al., 2012), poli (L-ácido láctico) (PLLA) (SANTOS et al., 2017) e poli (ácido láctico-*co*-ácido glicólico) (PLGA) (ZHAO et al., 2016) tem sido investigado para a obtenção de membranas que apresentem melhores características para a ROG.

O desenvolvimento de membranas reabsorvíveis deve considerar, além da composição química do polímero, o processamento utilizado para sua fabricação. O processamento e a composição química do polímero influenciam em diversos fatores, como, microestrutura, taxa de degradação, hidrofiliicidade e propriedades mecânicas. Estes fatores, influenciam no desempenho das membranas para a ROG, uma vez que é necessário, por exemplo, obter um perfil de degradação que acompanhe a neoformação óssea. As membranas também devem apresentar, dentre outras características, resistência mecânica para sustentar os esforços do meio bucal sem colapsar, realizando o papel de barreira celular. Portanto, o processamento e a composição química do polímero escolhido devem atender os requisitos necessários para a aplicação das membranas na ROG.

Diversas técnicas têm sido utilizadas para a produção de membranas para ROG, tais como, evaporação de solvente, evaporação de solvente seguida de lixiviação, inversão de fase e eletrofiação. A eletrofiação é um método que tem ganhado destaque dentre os demais, devido sua versatilidade em processar diversos polímeros, além de permitir o ajuste no tamanho de poro e no diâmetro das fibras produzidas. Somado a isso, a partir da eletrofiação é possível produzir membranas com poros interconectados e com larga área de superfície específica, o que promove a adesão e proliferação celular (ZHANG et al., 2016). No processo de eletrofiação, um campo elétrico (cerca de  $1\text{kV}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) é aplicado à uma seringa metálica pela qual a solução polimérica é alimentada. Após atingido um valor limiar de campo elétrico (inerente a cada processo), as forças eletrostáticas superam a tensão de superfície da solução, formando um jato de solução polimérica em direção a placa coletora. Durante o trajeto, o solvente evapora e as fibras (de diâmetros nano à micrométricas) são depositadas no coletor metálico, produzindo

uma membrana (SILL; VON RECUM, 2008) (REN et al., 2017) (REN et al., 2017).

Dentre os polímeros sintéticos reabsorvíveis o PLGA apresenta-se como um polímero apropriado para a aplicação em ROG. O PLGA é um polímero sintético biocompatível, degradável e bioreabsorvível, sendo aprovado para aplicações biomédicas pela *Food and Drug Administration* (FDA). A versatilidade em propriedades físico-químicas, mecânicas e taxa de degradação do PLGA, provém principalmente da manipulação de três fatores: proporção de seus monômeros ácido láctico (LA) e ácido glicólico (GA) (LA/GA), composição estereoisomérica do ácido láctico, L ou DL (mistura racêmica) e massa molar (AVGOUSTAKIS, 2005). Como exemplo, o PLGA formado pode ser o poli (DL - ácido láctico-co-ácido glicólico) (DL-PLGA) ou poli (L - ácido láctico-co-ácido glicólico) (L-PLGA) (MAKADIA; SIEGEL, 2011).

Membranas eletrofiadas para aplicação em ROG são tipicamente produzidas com o DL-PLGA (STACHEWICZ et al., 2015) (ZHANG et al., 2016) (MENG et al., 2013), no entanto existem poucas pesquisas sobre a utilização do L-PLGA para essa aplicação (SONG et al., 2013). Enquanto o DL-PLGA é um polímero tipicamente amorfo, o L-PLGA é semicristalino, o que aumenta o tempo de degradação de meia vida (50%), de cerca de 1,5 mês para cerca de 4 meses. O uso de L-PLGA pode ser favorável na proteção do defeito ósseo, uma vez que é necessário um tempo de 3 a 4 meses para ocorrer a regeneração do defeito ósseo (ZHANG et al., 2016). O PLGA apresenta boas propriedades mecânicas e, além disso, sua degradação produz ácido láctico e glicólico, que são produtos atóxicos para o corpo humano. Porém, o acúmulo de ácidos derivados de sua degradação pode implicar em inflamação. Somado a isso, a alta hidrofobicidade, proveniente do ácido láctico, ocasiona a falta de sítios de reconhecimento celular e, conseqüentemente, a redução de osteocondutividade (MO et al., 2015).

Com o objetivo de superar as complicações apresentadas pelo PLGA, pesquisas têm realizado o desenvolvimento de membranas eletrofiadas carregadas com fosfatos de cálcio, como hidroxiapatita (Hap) e o  $\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP). Em Fu *et al.* (2017), por exemplo, foi investigado o potencial de membranas eletrofiadas de PLGA/Hap. Os resultados do uso de fosfatos de cálcio demonstram o aumento da biocompatibilidade e osteocondutividade, alcançando a ativação do reconhecimento celular, e além disso, a neutralização dos produtos de degradação do PLGA (JI et al., 2012) (YANG et al., 2008). Ainda, polímeros combinados com fosfatos de cálcio podem apresentar melhores propriedades mecânicas quando comparados com polímeros puros (FU et

al., 2017). Dentre os fosfatos de cálcio, o  $\beta$ -TCP,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , é uma biocerâmica, amplamente aceita pelo corpo humano como biomaterial. Isso se deve a sua bioatividade, osteocondutividade, biocompatibilidade e bioreabsorção. Esta biocerâmica mimetiza a composição química do osso mineral nativo, favorecendo a osteogênese, osseointegração e a regeneração do tecido ósseo (ZHOU; WU; XIAO, 2012). No entanto, esta dissertação identificou uma lacuna no estudo sobre o potencial de membranas eletrofiadas de L-PLGA com a adição de  $\beta$ -TCP.

Dentro desse contexto, o presente estudo objetiva o desenvolvimento de membranas eletrofiadas de PLGA/ $\beta$ -TCP, com microestrutura, propriedades físico-químicas, mecânicas e biológicas para aplicação em ROG. O diâmetro e tamanho dos poros das membranas eletrofiadas foram investigados através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). A resistência mecânica e taxa de degradação, também foram investigadas. Adicionalmente, células fibroblásticas (L929) foram cultivadas nas membranas para investigar a citotoxicidade celular e a linhagem celular osteoblástica (MC3T3), para verificar a adesão, proliferação óssea e, conseqüentemente, seu potencial uso em ROG.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Desenvolver membranas eletrofiadas de PLGA/ $\beta$ -TCP, com microestrutura, propriedades físico-químicas, mecânicas e biológicas satisfatórias para aplicação em ROG.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Investigar e determinar a concentração polimérica da solução e os parâmetros de processo mais adequados para a obtenção de membranas eletrofiadas de PLGA puro, baseado na morfologia das fibras.
- Analisar a influência de diferentes frações mássicas de  $\beta$ -TCP na condutividade da solução, na morfologia, na hidrofiliabilidade, nas propriedades físico-químicas e mecânicas das membranas de PLGA/ $\beta$ -TCP.
- Desenvolver membranas eletrofiadas de PLGA/ $\beta$ -TCP sem defeitos aparentes, com diâmetro de fibras, tamanho de poro e propriedades mecânicas suficientes para proteger defeitos ósseos e estimular a ROG.
- Investigar a potencial aplicação de membranas eletrofiadas de PLGA/ $\beta$ -TCP como barreiras oclusivas na ROG, a partir do teste de degradação, da atividade metabólica e da viabilidade celular *in vitro*.

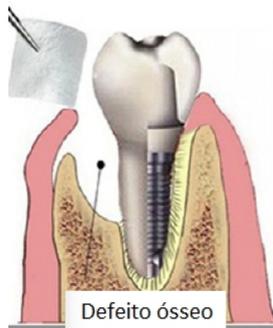
## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA

A Regeneração Óssea Guiada (ROG) é um procedimento cirúrgico que apresenta sucesso para a regeneração de defeitos ósseos. O uso da ROG na periodontia e implantodontia proporciona a reposição do volume ósseo em regiões que não dispõem de estrutura óssea saudável. O volume ósseo é um dos pré-requisitos necessários, por exemplo, para o sucesso de implantes dentários, além de reestabelecer áreas afetadas por deiscências e fenestrações.

O princípio básico da ROG, Figura 1, envolve a inserção cirúrgica de uma membrana de barreira, ou também chamada de membrana oclusiva, com a finalidade de proteger e isolar o defeito ósseo contra a invasão de tecido epitelial e conjuntivo para dentro do defeito ósseo (RETZEPI; DONOS, 2010). Assim, a membrana permite a migração de células osteogênicas ou osteoprogenitoras em um espaço excludente para a regeneração óssea. A ROG pode ser combinada com enxerto ósseo particulado e/ou com substitutos ósseos. Estes servem de suporte mecânico para prevenir o rompimento da membrana e auxiliar no processo de regeneração óssea (LIU; KERNS, 2014). Porém, em alguns casos a ROG pode ser aplicada sem o uso destes materiais.

Figura 1 - Exemplo de aplicação de membranas em ROG.



Fonte: Adaptado de (MASOUDI RAD et al., 2017).

Para assegurar o sucesso das membranas para a ROG, as mesmas devem atender a certos requisitos, tais como: biocompatibilidade, propriedades de barreira celular, manutenção do espaço, integração

tecidual, além de serem clinicamente manuseáveis (DEWAIR; BAUR; ZIEGLER, 1985). A biocompatibilidade refere-se à compatibilidade com os tecidos, ou seja, sem apresentar efeitos adversos no que diz respeito, por exemplo, à resposta imunológica, à toxicidade e à sensibilização. A propriedade de barreira celular relaciona-se com uma porosidade suficiente da membrana para impedir a invasão de células epiteliais e conjuntivas, e permitir a difusão de fluidos, oxigênio, nutrientes e substâncias bioativas. A manutenção do espaço refere-se à resistência mecânica da membrana em suportar a pressão externa, sem se romper. A integração tecidual envolve a adesão do tecido hospedeiro à membrana, garantindo a estabilidade do processo e a integridade da membrana. Espera-se que a membrana seja clinicamente manuseável, ou seja, apresente maleabilidade para o uso clínico sem complicações (RAKHMATIA et al., 2013).

As membranas podem ser divididas em duas principais categorias: não-reabsorvíveis e reabsorvíveis. Diversos materiais têm sido estudados experimentalmente e clinicamente na produção de membranas para a ROG. Membranas não-reabsorvíveis, como de politetrafluoretileno (PTFE) e titânio (Critéria®), são membranas comercialmente utilizadas para regeneração óssea e periodontal pelos seus resultados favoráveis na ROG. No entanto, há limitação no uso destes materiais devido a insolubilidade em meio corpóreo e necessidade de uma segunda cirurgia de remoção da membrana. Além disso, existe uma maior taxa de exposição da membrana ao meio bucal, o que resulta em desconforto para o paciente, além do aumento de custos e possível infecção pós-cirúrgica, o que pode resultar em ineficácia da regeneração óssea (GOTFREDSSEN et al., 1993) (SELVIG et al., 1992) (SIMION et al., 1994). Para superar esses problemas, uma variedade de membranas reabsorvíveis foi desenvolvida.

## 2.2 MEMBRANAS REABSORVÍVEIS PARA APLICAÇÃO EM REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA

Membranas reabsorvíveis são absorvidas e metabolizadas pelo corpo humano sem a necessidade de uma segunda cirurgia, reduzindo o risco de dano tecidual e dor ao paciente. O termo reabsorvível, refere-se a eliminação total do material e dos subprodutos de degradação sem efeitos colaterais residuais (VERT, 1935). Exemplos de membranas reabsorvíveis são: colágeno, poliésteres alifáticos tais como poli (ácido glicólico) (PGA), poli (ácido láctico) (PLA) e seus copolímeros (PLGA), policaprolactona (PCL) (BRUNEL et al., 1998) (GOTTLOW, 1993)

(GREENSTEIN; CATON, 1993) (SANDBERG; DAHLIN; LINDE, 1993). Algumas membranas tornaram-se comerciais, tais como Bio Guide® (colágeno I e III) e Pratrix® (PLGA).

Um dos grandes desafios relacionado ao desenvolvimento de membranas envolve a taxa de degradação controlável, estrutura que mimetiza a matriz extracelular (MEC) e, além disso, que apresente propriedades mecânicas que possibilitem seu uso.

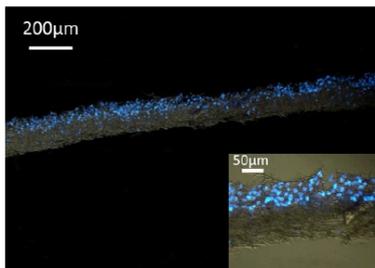
A taxa de degradação da membrana torna-se um fator diferencial no processo de ROG. O processo normal de cicatrização dura cerca de 40 dias, enquanto o tempo para uma regeneração completa e bem sucedida de um defeito ósseo requer em média 3 – 4 meses (LIU; KERNS, 2014). Entretanto, a membrana deve manter sua funcionalidade no mínimo até a cicatrização. Membranas de poli (D, L ácido láctico) (PDLLA), por exemplo, tem uma baixa taxa de degradação, o que resulta em um longo período de degradação (maior que 10 meses), o que limita o seu uso na ROG (ZHANG et al., 2016). Ao contrário, se a membrana degrada-se rapidamente, como as membranas de colágeno Bio-Guide® e Collprotect®, que se degradam entre 1 - 3 meses, pode ocorrer a redução de função de barreira celular e, conseqüentemente, apresentar menor regeneração óssea (ORTOLANI et al., 2015) (SAM; MADHAVAN PILLAI, 2014). Membranas de PLGA possuem a vantagem de possuírem a taxa de degradação controlada, dentre outros fatores, pela proporção entre seus monômeros, ácido láctico e ácido glicólico, e pela composição estereoisomérica do ácido láctico, L ou DL (mistura racêmica). O tempo de degradação pode variar, por exemplo, de cerca de 1,5 mês para o poli (DL - ácido láctico-*co*-glicólico) 50/50, para cerca de 4 meses no caso do poli (L - ácido láctico-*co*-glicólico) 80/20 (ZHANG et al., 2016).

Em ROG, para a estabilidade da membrana é importante a adesão de células osteoblásticas na superfície inferior da membrana, possibilitando assim a produção de matriz óssea não apenas pelas paredes dos defeitos ósseos, mas também a partir da superfície da membrana. No lado superior, em contato com o tecido conjuntivo, é desejada a adesão de células para o fechamento e proteção da membrana em exposição.

A adesão celular na superfície da membrana é influenciada, principalmente, pela sua morfologia e hidrofiliçidade. O tamanho de poro garante a oclusão celular contra a invasão de células epiteliais e conjuntivas para dentro defeito ósseo (BEHRING et al., 2008). Chen *et al.* (2013), analisaram a penetração de fibroblastos em membranas eletrofiadas de PLLA/quitosana, com tamanho de poros ~3 µm e constataram apenas penetração celular superficial, conforme apresentado na Figura 2. Zhang *et al.* (2016) também constaram o mesmo, através de

testes *in vivo*, em seus estudos com membranas eletrofiadas de PDLLA/PLGA e com tamanho de poros de 10 - 15  $\mu\text{m}$ . A porosidade das membranas também garante a troca de nutrientes através da membrana. Porosidades entre 60-80% são consideradas satisfatórias para essa troca (MASOUDI RAD et al., 2017).

Figura 2 - Imagem de fluorescência de uma membrana eletrofiada de PLLA/quitosana, com penetração superficial de células fibroblásticas NIH 3T3 em 5 dias de cultura.



Fonte: (CHEN et al., 2013).

Outro fator morfológico que influencia na adesão celular é o diâmetro da fibra, que está relacionado diretamente com sua área de superfície. Kumbar et al. (2008), analisaram a influência do diâmetro de fibras eletrofiadas de PLGA e constataram um aumento significativo na adesão e proliferação de fibroblastos, para membranas com fibras na faixa de 350-1100 nm.

A hidrofiliabilidade afeta na adesão e proliferação celular, assim como no aumento da taxa de degradação da membrana. Com objetivo de aumentar a hidrofiliabilidade em membranas poliméricas, diversas estratégias são atualmente utilizadas, tais como, modificações superficiais à plasma (ROH et al., 2016), compósitos com colágeno (SADEGHI et al., 2016), quitosana (GANJI; ABDEKHODAIE, 2010) e  $\beta$ -TCP (MASOUDI RAD et al., 2017). Membranas eletrofiadas de PCL/PGS/ $\beta$ -TCP, com a presença de 10% de  $\beta$ -TCP, apresentaram além do aumento da hidrofiliabilidade, aumento na biocompatibilidade e propriedades mecânicas (MASOUDI RAD et al., 2017).

Boas propriedades mecânicas são desejáveis para evitar que as membranas se rompam, para que assim possam manter e proteger o defeito ósseo a ser regenerado. Estudos realizados por Ortolani et al. (2015), analisaram as propriedades mecânicas de membranas fibrosas de colágeno comercial, Bio-Guide®, apresentando como módulo de

elasticidade de 15,7 MPa e resistência máxima à tração de 4,8 MPa. Outro estudo obteve valores similares, com resistência máxima à tração de 5,3 MPa, em membranas eletrofiadas de PLGA puro (ZHANG et al., 2016).

Outras propriedades como osteocondução, osteoindução e osteointegração são importantes na ROG para a propagação e proliferação celular na face da membrana em contato o defeito ósseo. Biocerâmicas como a Hap e o  $\beta$ -TCP, induzem essas propriedades. Em (QI et al., 2016) foi constatado que a presença de Hap aumentou a proliferação de osteoblastos em membranas eletrofiadas. O mesmo efeito foi verificado por Masoudi Rad et al. (2017), em membranas eletrofiadas de PCL contendo  $\beta$ -TCP.

Diversos métodos têm sido utilizados ultimamente para a produção de membranas para ROG, tais como evaporação de solvente, evaporação de solvente seguida de lixiviação, inversão de fase e eletrofição, a partir de diversas composições, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Estado da arte de alguns estudos (2015 - 2017), destacando-se a composição e os diferentes métodos utilizados na fabricação de membranas para aplicação em ROG.

Composição	Método de fabricação	Referência
PLGA/PO <sub>2</sub> /SiO <sub>2</sub>	Evaporação de solvente	(CASTILLO-DALI et al., 2017)
PLGA/Hap/ácido láurico	Evaporação de solvente/lixiviação	(SAARANI et al., 2017)
PLGA/Hap	Inversão de fase	(FU et al., 2017)
PLGA	Eletrofição	(STACHEWICZ et al., 2015)
PCL/gelatina	Eletrofição	(REN et al., 2017)
PCL/PGS/ $\beta$ -TCP	Eletrofição	(MASOUDI RAD et al., 2017)
Proteína da seda	Eletrofição	(LU et al., 2015)

Fonte: Desenvolvido pela Autora.

A técnica de evaporação de solvente é amplamente utilizada na produção de membranas para a ROG devido a sua praticidade. No entanto, as desvantagens da técnica é principalmente devido a estrutura não porosa e a possível colonização de bactérias na interface tecido conjuntivo-membrana (CASTILLO-DALI et al., 2017). Métodos como evaporação de solvente com lixiviação de partículas melhoraram a obtenção de estruturas porosas, entretanto, o difícil controle da uniformidade e do tamanho dos poros é um fator limitante (SAARANI et

al., 2017). A eletrofição têm ganhado destaque na produção de membranas para a ROG que possuem microestrutura formada de micro e nanofibras. Com isso, a eletrofição apresenta como vantagens fibras capazes de mimetizar a MEC, além de alta porosidade (60 - 80%) e alta área de superfície (1 - 100 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>), possuindo composição ajustável e, permitindo assim, atingir propriedades e funcionalidade desejadas (REN et al., 2017) (MASOUDI RAD et al., 2017) (LU et al., 2015).

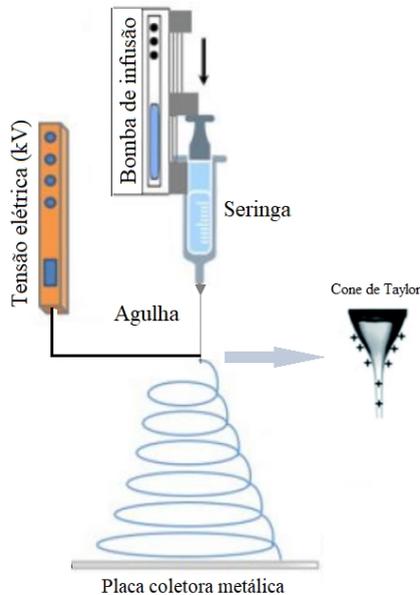
### 2.3 DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS POR ELETROFIÇÃO

A técnica de eletrofição foi patenteada em 1934 pelo pesquisador Formhals (FORMHALS, 1934). O processo de eletrofição é uma técnica considerada relativamente simples e robusta na produção de fibras nano e micrométricas, a partir de uma grande variedade de polímeros. Fibras eletrofiadas são reportadas na literatura a partir de vários polímeros sintéticos e naturais, tais como: poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (STACHEWICZ et al., 2015), poliuretanos (STANKUS; GUAN; WAGNER, 2004), fibroína da seda (KIM et al., 2005), colágeno (MATTHEWS et al., 2002), celulose (MA; KOTAKI; RAMAKRISHNA, 2005) e quitosana/colágeno (CHEN; MO; QING, 2007), blendas que podem incluir proteínas (OHGO et al., 2003) (WNEK et al., 2003) e ácidos nucleicos (TAYLOR; FANG; RENEKER, 1997).

Fibras eletrofiadas foram investigadas nas últimas décadas em diversas aplicações, como por exemplo: filtração, *scaffolds* biológicos, biomedicina, farmácia, biotecnologia, eletrônicos ópticos, engenharia ambiental, sensores ópticos e químicos, Regeneração Tecidual Guiada e Regeneração Óssea Guiada. Com o foco em Regeneração Óssea Guiada, a arquitetura das membranas eletrofiadas influencia fortemente no processo de adesão e migração celular. Por esse motivo torna-se importante a compreensão do sistema e dos parâmetros envolvidos.

A configuração de um equipamento de eletrofição (Figura 3) consiste basicamente em três principais componentes: fonte de alta tensão elétrica, seringa com agulha metálica acoplada à uma bomba de infusão e uma placa coletora metálica.

Figura 3 - Esquema da configuração básica do processo de eletrofiação.



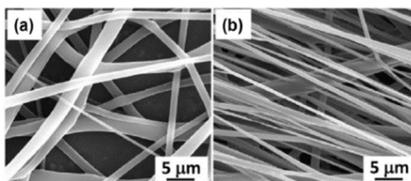
Fonte: Adaptado de (KHAN et al., 2017).

A técnica de eletrofiação utiliza forças eletrostáticas para a produção de fibras a partir de soluções poliméricas ou polímeros fundidos (CHEW et al., 2006). A solução polimérica é obtida através da dissolução do polímero em um solvente apropriado, a qual é posteriormente introduzida em uma seringa para a eletrofiação. A gota da solução polimérica, retida na ponta da agulha, devido a tensão de superfície, é submetida a um campo elétrico. Cargas elétricas são induzidas na gota pendente, de modo que a mesma se alongue, passando a ter um formato cônico, chamado de cone de Taylor. Após ser atingido um valor crítico de campo elétrico (específico para cada sistema), ou seja, um valor suficiente para superar as forças viscosas e de tensão de superfície da gota, a solução polimérica é ejetada do cone de Taylor, formando um jato estável entre a ponta da agulha e o coletor. Durante o trajeto entre a agulha e o coletor, a solução é continuamente alongada, ocorrendo a evaporação do solvente, de modo que fibras secas são depositadas no coletor, levando a formação de uma membrana constituída por fibras (TAYLOR, 1969) (YARIN; KOOMBHONGSE; RENEKER, 2001).

As fibras eletrofiadas podem apresentar imperfeições, como estiramento desuniforme, união longitudinal, devido à evaporação insuficiente do solvente, e defeitos do tipo *beads*. Dentre os defeitos mais comuns, encontram-se os *beads*, que são regiões de aumento localizado no diâmetro das fibras. Os *beads* podem surgir devido à baixa condutividade da solução ou a baixa concentração polimérica, resultando em estiramento insuficiente do jato polimérico (MOHAMMADIAN; HAGHI, 2005).

A distribuição das fibras pode ser controlada através do tipo de coletor e velocidade de rotação. Há dois tipos principais de coletores: os fixos e os rotatórios. Os coletores fixos permitem a produção de fibras aleatoriamente distribuídas (Figura 4, a), enquanto os coletores rotatórios tendem a produzir fibras alinhadas (Figura 4, b) (STACHEWICZ et al., 2015).

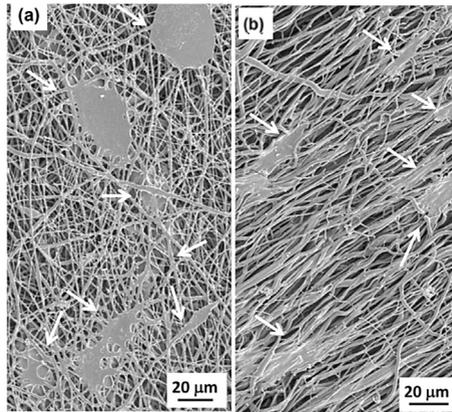
Figura 4 - Micrografia MEV de fibras eletrofiadas de PLGA, a) fibras aleatórias e b) fibras alinhadas.



Fonte: (STACHEWICZ et al., 2015).

Membranas eletrofiadas de PLGA, com fibras alinhadas ou aleatoriamente distribuídas, podem apresentar diferentes respostas no comportamento do crescimento celular. De acordo com Stachewicz et al. (2015), membranas compostas por fibras alinhadas de PLGA limitaram o crescimento celular rápido, sendo apenas na superfície das membranas, (Figura 5, b). Enquanto fibras aleatoriamente distribuídas promoveram a integração dos osteoblastos para dentro das membranas, promovendo uma regeneração tecidual mais extensiva. Isso ocorreu pelo aumento do espaço entre as fibras, permitindo a penetração das células, (Figura 5, a).

Figura 5 - Micrografia MEV de fibras eletrofiadas de PLGA com osteoblastos aderidos nas membranas: a) no interior das fibras aleatórias e b) na superfície das fibras orientadas.



Fonte: (STACHEWICZ et al., 2015).

Diversos parâmetros influenciam na morfologia e diâmetros das fibras formadas, os quais podem ser classificados em: parâmetros da solução, parâmetros de processo e parâmetros ambientais. Os parâmetros da solução incluem principalmente: viscosidade, concentração, tensão de superfície e condutividade. Os parâmetros de processo incluem: tensão elétrica aplicada, vazão de alimentação, distância agulha/coletor e o tipo de coletor. Por último, os parâmetros ambientais incluem a umidade e a temperatura (CHONG et al., 2007). Dessa maneira, para a obtenção de membranas com morfologia e diâmetro de fibras adequados é necessário o entendimento da influência de cada parâmetro (LASPRILLA-BOTERO; ÁLVAREZ-LÁINEZ; LAGARON, 2018), como é detalhado a seguir.

### 2.3.1 Parâmetros da solução

Uma solução polimérica deve ter viscosidade, concentração, massa molar, tensão de superfície e condutividade apropriados para a formação de fibras uniformes e ausentes de defeitos *beads*.

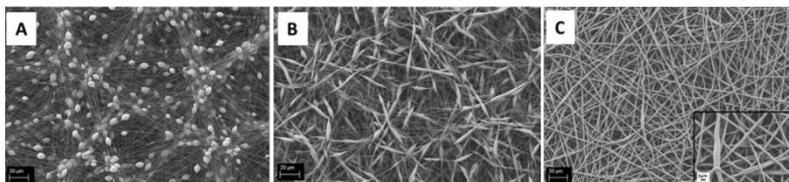
#### 2.3.1.1 Viscosidade e concentração da solução

A viscosidade da solução relaciona-se com a concentração e com a massa molar polimérica. A viscosidade aumenta com o aumento da

concentração polimérica e da massa molar, como comprovado em (SUPAPHOL; MIT-UPPATHAM; NITHITANAKUL, 2004), em seus estudos na eletrofição de poliamida-6 (PA-6). Esse aumento da viscosidade está relacionado com o aumento do grau de emaranhamento das cadeias poliméricas em solução.

A concentração ideal para a formação de fibras uniformes e ausente de defeitos *beads* é, portanto, inerente a cada sistema polímero-solvente. Em valores abaixo dessa concentração ideal, o grau de emaranhamento das cadeias poliméricas em solução não é suficiente. Isso ocasiona instabilidade no jato polimérico e espalhamento eletrostático, formando gotas ou fibras com defeitos (SILVEIRA, 2016). Enquanto em soluções mais concentradas, há um maior tempo de relaxação, o que pode dificultar a vazão de alimentação e o estiramento do jato, resultando em fibras com maiores diâmetros. Liverani e Boccaccini (2016) investigaram a influência do aumento da concentração polimérica tanto no diâmetro de fibras eletrofiadas de PCL, quanto na formação de defeitos *beads*, conforme as micrografias apresentadas na Figura 6. Foi constatado que o aumento da concentração tende a aumentar o diâmetro das fibras e reduzir os defeitos *beads*. Além disso, com o aumento da concentração o formato dos defeitos *beads* muda de esféricos para fusiformes, até finalmente formar fibras contínuas e uniformes.

Figura 6 - Micrografias de fibras eletrofiadas de PCL: a) 12 % m/v, b) 15 % m/v e c) 18% m/v.



Fonte: (LIVERANI; BOCCACCINI, 2016).

Outro efeito observado com o aumento da concentração polimérica é a redução do estiramento do jato polimérico. Como consequência, as fibras são depositadas em uma menor área. Ademais, em soluções altamente concentradas, a gota formada pode secar na ponta da agulha e impedir a eletrofição da solução (PHAM; SHARMA; MIKOS, 2006).

### 2.3.1.2 Tensão de superfície da solução

A tensão de superfície está relacionada com a composição do solvente presente na solução. Além da tensão de superfície, outras propriedades do solvente, como constante dielétrica e temperatura de ebulição, afetam a processabilidade e a taxa de evaporação do solvente. Conseqüentemente, afetam a morfologia das fibras (MEGELSKI et al., 2002). Diferentes solventes podem contribuir com diferentes tensões de superfície, como verificado por Manee-in, Nithitanakul e Supaphol (2006), na análise da influência de vários tipos de solvente, tais como dimetilformamida (DMF) e dicloroetano (DCE), na tensão de superfície em soluções de poliestireno (PS). Verificou-se, por exemplo, cerca de 37 (mN/m<sup>2</sup>) de tensão de superfície para a solução PS-DMF e cerca de 30 (mN/m<sup>2</sup>) para a solução PS-DCE.

De maneira geral, altas tensões de superfície causam instabilidade no jato, gerando gotículas (HOHMAN et al., 2001). Enquanto baixas tensões de superfície permitem a formação de fibras uniformes e em menores campos elétricos. Entretanto, não necessariamente soluções com baixas tensões de superfície são viáveis para a eletrofiação (BHARDWAJ; KUNDU, 2010). Por esse motivo, a escolha adequada do solvente é uma etapa importante.

### 2.3.1.3 Condutividade da solução

Como o processo de eletrofiação requer a transferência de cargas elétricas da agulha até o coletor, um mínimo de condutividade é essencial para que haja o estiramento da solução e, conseqüentemente, a formação de fibras. A condutividade iônica é influenciada tanto pelo polímero e solvente, quanto pela concentração polimérica e a presença de aditivos.

Manee-in, Nithitanakul e Supaphol (2006), realizaram também a análise da influência de vários tipos de solvente na condutividade das soluções de PS. Os valores obtidos foram 7  $\mu\text{S}/\text{cm}$  para soluções de PS-DMF e 3,8  $\mu\text{S}/\text{cm}$  para soluções de PS-DCE. Ainda, a presença de aditivos condutores pode aumentar a condutividade da solução. Merlini (2014), observou esse efeito, alcançando um aumento de 1  $\mu\text{S}/\text{cm}$  para 240  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , com a adição de polipirrol (Py) em solução de poli (fluoreto de vinilideno), PVDF. O efeito do aumento da condutividade da solução foi observado no estudo realizado por Mit-uppatham, Nithitanakul e Supaphol (2004). Os resultados mostram que, com o aumento da condutividade da solução, houve redução no diâmetro das fibras, como uma conseqüência do maior estiramento da solução polimérica.

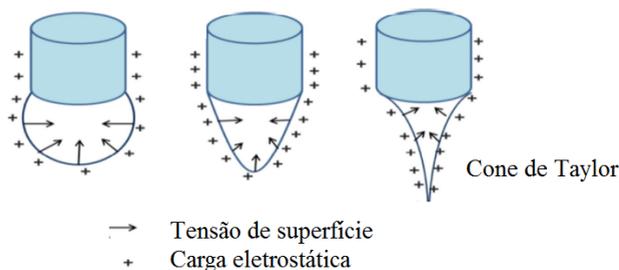
### 2.3.2 Parâmetros do processo

Os parâmetros de processo incluem a tensão elétrica, a distância agulha/coletor e a vazão de alimentação. Estes parâmetros influenciam no desempenho do processo e na morfologia das fibras. Estes parâmetros devem ser ajustados para cada sistema polímero-solvente, afim de obter fibras uniformes e ausentes de defeitos *beads*.

#### 2.3.2.1 Tensão elétrica

A tensão elétrica aplicada na solução é um fator crítico na formação das fibras, visto que o processo de eletrofiação inicia-se somente após uma tensão limiar ser atingida. Dessa maneira, cargas são suficientemente induzidas na solução, através do campo elétrico (BAUMGARTEN, 1971). Durante esse processo, até a tensão limiar, a gota formada na ponta da agulha (gota pendente) sofre mudanças conformacionais. Primeiramente, a gota fica suspensa por tensão de superfície, posteriormente, com o aumento da tensão elétrica, a gota se alonga devido ao aumento do campo elétrico, e então é formado o Cone de Taylor (HAIDER; HAIDER; KANG, 2015), conforme ilustrado na Figura 7.

Figura 7 - Formação do cone de Taylor.



Fonte: Adaptado de (HAIDER; HAIDER; KANG, 2015).

Existe uma divergência na literatura a respeito do efeito da tensão elétrica no processo de eletrofiação. Em (ZHANG et al., 2005) o aumento dos valores de tensão (5 - 13kV), na eletrofiação de poliacetato de vinila (PVA), favoreceu a formação de fibras com maiores diâmetros, devido à redução do Cone de Taylor e maior velocidade do jato polimérico. Enquanto, como reportado por Megelski et al. (2002), o aumento da tensão elétrica (5 - 12kV) na eletrofiação de os causou um maior

estiramento da solução, devido ao aumento das forças eletrostáticas repulsivas na solução e a forte ação do campo elétrico, reduzindo o diâmetro da fibra de 20 para 10  $\mu\text{m}$ . Por outro lado, outros autores como Merlini (2014), constataram que o aumento da tensão elétrica não influenciou significativamente no diâmetro e na morfologia das fibras.

Em (DEITZEL et al., 2001), foi comprovado o aumento na probabilidade de aparecimento de *beads* em tensões superiores a ideal (no caso estudado, acima de 5,5 kV) na eletrofição do poli (óxido de etileno) PEO. Isso ocorreu devido à instabilidade do jato. Assim como, em tensões excessivamente altas, a evaporação do solvente é favorecida, podendo causar até a solidificação da solução na ponta da agulha (HAIDER; HAIDER; KANG, 2015).

### 2.3.2.2 Distância agulha/coletor

A distância entre a agulha e o coletor influencia no tempo de evaporação do solvente. Portanto, a distância deve ser suficiente para que ocorra a evaporação do solvente e a fibra seca seja depositada sobre o coletor. Caso isso não ocorra, as fibras podem coalescer. Além disso, em distâncias muito pequenas ou demasiadamente grandes há formação de defeitos *beads* (GENG; KWON; JANG, 2005). Normalmente são utilizadas distâncias agulha/coletor de 5 a 30 centímetros (MERLINI, 2014).

### 2.3.2.3 Vazão de alimentação

A vazão de polímero determina a taxa de material transferido e a velocidade do jato. A vazão de alimentação deve ser ajustada para cada sistema polimérico. No trabalho reportado por Merlini (2014) taxas entre 0,5 a 2,5  $\text{ml}\cdot\text{h}^{-1}$  foram testadas na produção de membranas de PVDF com polipirrol e foram analisadas as alterações morfológicas das fibras. Foi observado que em baixos valores de vazão polimérica, as fibras apresentaram menores diâmetros, uma vez que menos solução foi expelida pela agulha e, conseqüentemente, houve um maior estiramento das fibras. Entretanto, um mínimo de vazão é necessário para que não haja interrupções no jato. Em geral, maiores vazões são mais desejadas por permitir maiores taxas de produção. Porém, o aumento da vazão causa um aumento no diâmetro das fibras, assim como a incidência de defeitos (BHARDWAJ; KUNDU, 2010). Além disso, em altas vazões pode não haver tempo suficiente para a evaporação do solvente, resultando em

fibras úmidas na placa coletora, e adicionalmente, a solução pode se acumular na ponta da agulha.

### 2.3.3 Parâmetros ambientais

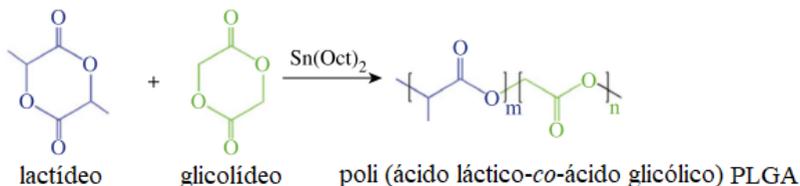
Os principais parâmetros ambientais são a temperatura e umidade relativa do ar. Segundo Mit-uppatham, Nithitanakul e Supaphol (2004), o aumento da temperatura de 25 para 60 °C reduziu o diâmetro de fibras de PA-6. Isso foi atribuído a redução da viscosidade, como consequência do aumento da temperatura. Portanto existe uma relação inversa entre a viscosidade e a temperatura.

O aumento na umidade relativa do ar (maior que 60%) influencia no aparecimento de poros na superfície da fibra ou até mesmo a coalescência das fibras. Este caso foi observado em (CASPER et al., 2004) na eletrofiação de poliestireno (PS). Por outro lado, em baixos valores de umidade, o solvente pode evaporar rapidamente e, em algumas situações, a taxa de evaporação pode ser mais rápida do que o fornecimento de material, solidificando o polímero e interrompendo a eletrofiação (BAUMGARTEN, 1971).

## 2.4 POLI (ÁCIDO LÁCTICO-*co*-ÁCIDO GLICÓLICO)

O Poli (ácido láctico-*co*-ácido glicólico) (PLGA) é um poliéster alifático sintético, biocompatível, biodegradável e bireoabsorvível, pertencente ao grupo dos poli ( $\alpha$ -hidróxi ésteres) saturados (GENTILE et al., 2014), conforme a estrutura química apresentada na Figura 8. É um polímero aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para uso em humanos. Suas aplicações incluem, suturas, fixações ortopédicas, sistemas de liberação controlada de fármacos (MAKADIA; SIEGEL, 2011), Regeneração Tecidual Guiada (ZHANG et al., 2016) e Regeneração Óssea Guiada (SAARANI et al., 2017).

Figura 8 - Representação da estrutura química do PLGA.



Fonte: Adaptado de (PAN; DING, 2012).

A versatilidade em propriedades físico-químicas, mecânicas e taxa de degradação do PLGA, provém principalmente da manipulação de três fatores: proporção de seus monômeros ácido láctico (LA) e ácido glicólico (GA) (LA/GA); composição estereoisomérica do ácido láctico, L ou DL (mistura racêmica) e massa molar (AVGOUSTAKIS, 2005). Como exemplo, o PLGA formado pode ser o poli (DL-ácido láctico-*co*-ácido glicólico) (DL-PLGA) ou poli (L-ácido láctico-*co*-ácido glicólico) (L-PLGA) (MAKADIA; SIEGEL, 2011).

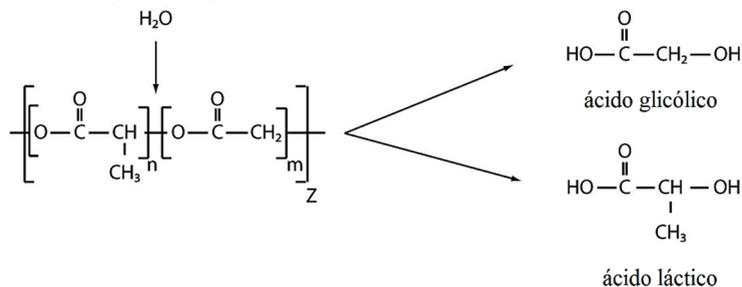
Tipicamente, o PLGA é sintetizado via policondensação do ácido láctico e ácido glicólico ou pela abertura de anel de lactídeos e glicolídeos. Preferencialmente, a polimerização por abertura de anel é escolhida pelo fato de produzir polímeros de maiores massas molares e, conseqüentemente, melhores propriedades mecânicas (GENTILE et al., 2014). Polímeros com alta massa molar (cerca de 160 kDa) podem ser sintetizados por uma variedade de catalizadores, como os ácidos de Lewis e compostos organometálicos e seguem o mecanismo de reação por coordenação. O catalisador octanoato de zinco é o mais utilizado por ser aceito pela FDA (AVGOUSTAKIS, 2005).

O PLGA degrada-se por hidrólise das ligações ésteres, através de erosão heterogênea ou em massa. A degradação pode ser descrita sucintamente em quatro etapas: (i) hidratação, em que há penetração de água nas regiões amorfas, reduzindo a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ); (ii) degradação inicial, através da clivagem de ligações covalentes, com redução da massa molar; (iii) degradação, clivagem por autocatálise, resultando perda de integridade e (iv) solubilização, gerando fragmentos ainda menores (ENGINEER; PARIKH; RAVAL, 2011). A degradação extracelular do PLGA, gera como subprodutos metabólicos o ácido láctico e ácido glicólico, conforme ilustra a Figura 9, que serão posteriormente hidrolizados em lactado e glicolato, e então fagocitados. Em resumo, os subprodutos são convertidos em piruvato dentro das células, posteriormente entram no Ciclo de Krebs e terminam sua rota metabólica em gás carbônico e água, que podem ser eliminados através da urina e da respiração (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005) (AVGOUSTAKIS, 2005).

A taxa de degradação é influenciada por diversos fatores, dentre eles estão: i) a massa molar: o aumento da massa molar aumenta o tempo de degradação, podendo ser de algumas semanas para meses; ii) a proporção LA/GA: PLGA com maior percentual de LA é mais hidrofóbico devido a presença do grupo metil ( $CH_3$ ), o que dificulta o acesso de água por impedimento estérico, absorve menos água e conseqüentemente, degrada mais lentamente, iii) a estereoquímica:

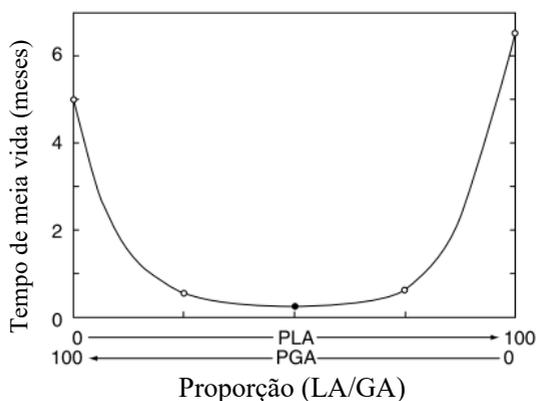
regiões amorfas permitem a penetração de água, o que acelera a degradação do PLGA; iv) os grupos finais: os grupos ésteres possuem maior tempo de degradação de meia vida quando comparados com grupos finais carboxílicos; v) as características do produto: tamanho, forma e porosidade, influenciam na área de contato do material com o meio; vi) o ambiente de degradação: a temperatura e o pH do meio também podem interferir na taxa de degradação (AVGOUSTAKIS, 2005) (WU; WANG, 2001). O efeito da proporção LA/GA na degradação *in vitro* do L-PLGA avaliada em relação ao tempo de meia vida do material pode ser observado na Figura 10.

Figura 9 - Degradação por hidrólise do PLGA



Fonte: Adaptado de (DEYOUNG et al., 2011).

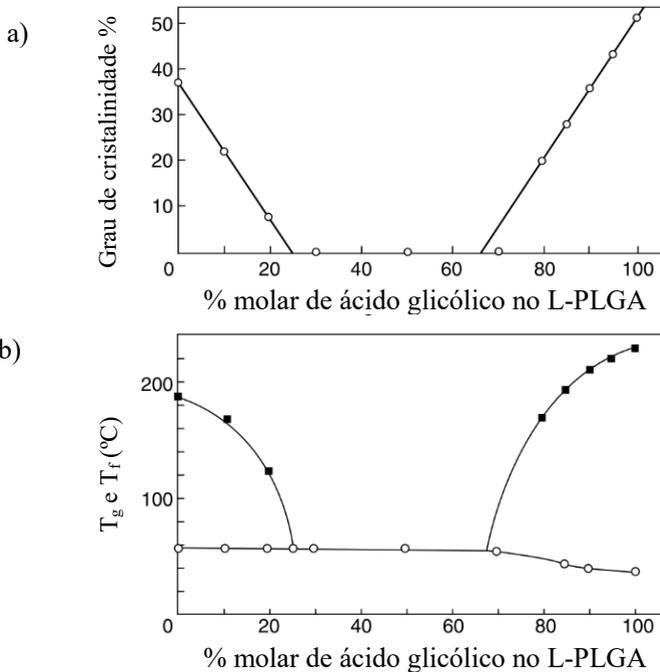
Figura 10 - Tempo de meia vida *in vivo* de L-PLGA com diferentes proporções (LA/GA).



Fonte: Adaptado de (MILLER; BRADY; CUTRIGHT, 1977).

A cristalinidade do PLGA depende da composição química, da proporção (LA/GA) e da composição estereoisomérica dos monômeros. DL-PLGA contendo 0-75% de ácido glicólico são amorfos, assim como o L-PLGA contendo 25-75% de ácido glicólico. Sendo assim, os PLGAs semicristalinos são obtidos fora das faixas de ácido glicólico previamente citadas (AVGOUSTAKIS, 2005). A Figura 11 a) apresenta o grau de cristalinidade, a Figura 12 b) as temperaturas de transição vítrea ( $T_g$ ) e as temperatura de fusão ( $T_f$ ) de diferentes L-PLGAs.

Figura 11 - a) Grau de cristalinidade, b) temperatura de transição vítrea e temperatura de fusão de diferentes PLGAs. Temperatura de transição vítrea (o) e (■) temperatura de fusão.



Fonte: Adaptado de (AVGOUSTAKIS, 2005).

As desvantagens do PLGA, por sua vez, incluem principalmente a falta de sítios de reconhecimento celular e hidrofobicidade. Além disso, apesar da não-toxicidade do PLGA, o acúmulo de produtos de degradação e o inchamento do polímero, podem alterar o pH local e provocar irritação

mecânica no tecido e, em alguns casos, pode provocar resposta inflamatória (JUNG et al., 2011).

Para superar esses problemas, estratégias utilizam membranas contendo fosfato de cálcio, como por exemplo o  $\beta$ -TCP, que possui excelente biocompatibilidade e osteocondutividade. O  $\beta$ -TCP estimula a atividade celular e pode neutralizar os produtos ácidos de degradação do PLGA, através de interação iônica (FU et al., 2017). Além da estrutura química do  $\beta$ -TCP, sua morfologia irregular contribui para o aumento da adesão e proliferação de células osteoblásticas.

## 2.5 $\beta$ -FOSTATO TRICÁLCICO

Biocerâmicas contendo fosfatos de cálcio são usadas em aplicações biomédicas, devido a sua excelente biocompatibilidade, bioatividade e osteocondutividade (ARBEZ; LIBOUBAN, 2017) (LEGEROS, 2002). Por esse motivo, são frequentemente utilizadas como substitutos ósseos no preenchimento de defeitos ósseos em cirurgias maxilofacial (GUILLAUME, 2017) e na Regeneração Óssea Guiada (MASOUDI RAD et al., 2017).

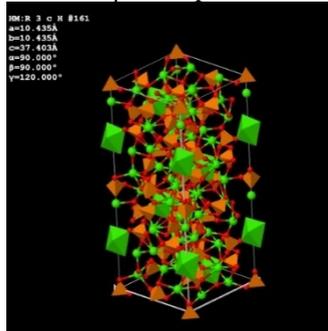
Os fosfatos de cálcio mais utilizados são Hap,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , razão Ca/P = 1,67 e  $\beta$ -TCP,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , razão Ca/P = 1,5 (DOROZHKIN, 2010) (KWON et al., 2003). As propriedades dos fosfatos de cálcio são dependentes da razão Ca/P. Com a redução da razão Ca/P esses materiais tornam-se menos estáveis ao pH do meio fisiológico e a dissolução é mais rápida (DOROZHKIN, 2010). Por esse motivo, a escolha do fosfato de cálcio mais adequado relaciona-se com a aplicação desejada.

O fosfato tricálcico (TCP), possui duas formas alotrópicas,  $\beta$  e  $\alpha$ .  $\beta$ -TCP é estável em temperaturas abaixo de  $1125^\circ$ , acima disso transforma-se em  $\alpha$ -TCP (KUMTA et al., 2005) (MACIEJEWSKI et al., 2008) (KWON et al., 2003). A Figura 12 representa a estrutura cristalina do  $\beta$ -TCP, conforme o padrão ICSD 97500. Além disso, a estabilidade de cada fosfato de cálcio é afetada não apenas por pequenas mudanças na composição, mas também por variações no pH, solvente, temperatura, pressão e outros agentes usados na cinética de reação (KUMTA et al., 2005). Por exemplo, Kwon et al. (2003) obtiveram TCP como única fase em pH = 7,4. Por isso, a síntese dos fosfatos de cálcio não é um processo trivial.

O  $\beta$ -TCP não pode ser sintetizado diretamente por precipitação em meio aquoso, devido à sua instabilidade em água (KUMTA et al., 2005). Por esse motivo, normalmente o  $\beta$ -TCP é sintetizado através da calcinação à  $900^\circ\text{C}$  de TCP. Diversos métodos são utilizados, dentre eles

a neutralização de  $\text{CaCO}_3$  e  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , a precipitação por dupla decomposição de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  e  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  e sintetização pelo método de sol-gel (CHAAIR; LABJAR; BRITEL, 2017).

Figura 12 - Estrutura cristalina do  $\beta$ -TCP padrão ICSD 97500.



Fonte: (ICSD, 2017).

Um dos primeiros estudos reportados na literatura do uso de fosfato de cálcio *in vivo* foi em 1920, em que foi usado com sucesso fosfato de cálcio como enxerto ósseo em ossos de coelhos (ALBEE, 1920). Não houve reação adversa ou toxicidade. Além disso, a osteogênese foi estimulada com a presença do TCP com uma regeneração óssea mais rápida.

Na década de 70, através de estudos histológicos, foi observada a capacidade de bioreabsorção do  $\beta$ -TCP. A bioreabsorção ocorreu simultaneamente à deposição de osso novo, após o recrutamento de osteoblastos. Em testes *in vivo*, realizados com ratos como modelos, a reabsorção do  $\beta$ -TCP ocorreu após 2 semanas da sua inserção, associada com a formação de osso novo após 5 semanas (SURINDAR et al., 1971).

Os mecanismos de degradação do  $\beta$ -TCP ainda não são claros. Basicamente, a degradação do  $\beta$ -TCP é composta por dois estágios: dissolução do material e reabsorção celular (ARBEZ; LIBOUBAN, 2017). Os osteoclastos e macrófagos são os principais responsáveis por esse processo. A degradação do substituto ósseo é influenciada por diversos parâmetros, tais como: o tamanho e localização do defeito ósseo, bem com a composição e porosidade do material (SHEIKH et al., 2015) (SCHAEFER et al., 2011).

Para que ocorra a neoformação óssea na superfície da membrana são necessárias as etapas de recrutamento de células osteoprogenitoras, a partir de células mesenquimais, seguido de adesão, proliferação e diferenciação (ARBEZ; LIBOUBAN, 2017) (SAI NIEVETHITHA et al.,

2017). Estas etapas são dependentes da composição, rugosidade e topografia da membrana (LEGEROS, 2002).

Diversos estudos utilizam o  $\beta$ -TCP na produção de *scaffolds* de PLGA para a regeneração óssea (PANG et al., 2007) (YANG et al., 2008) (ROH et al., 2016) (KHOJASTEH et al., 2016). O  $\beta$ -TCP tem sido utilizado devido às suas características de biocompatibilidade, osteoindução e osteocondução, somada a rápida dissolução em meio corpóreo. Em (MASOUDI et al., 2017), membranas eletrofiadas de PCL/PGS contendo  $\beta$ -TCP apresentaram, além do aumento da biocompatibilidade, o aumento da resistência máxima à tração. Com isso, o  $\beta$ -TCP apresenta-se como um material promissor na Engenharia do Tecido Ósseo.

## 2.6 Resumo e discussão da literatura

Devido principalmente as características apresentadas pelo PLGA, este material é utilizado na produção de membranas reabsorvíveis para a ROG. A biocompatibilidade e a bioreabsorção caracterizam fatores que permitem a aceitação do PLGA no corpo, além da reabsorção dos produtos atóxicos gerados por sua degradação. Com isso, o uso de membranas de PLGA não requer uma segunda intervenção cirúrgica para sua remoção, o que caracteriza uma vantagem quando comparadas com as membranas não reabsorvíveis.

A produção de membranas de PLGA, quando realizada a partir da técnica de eletrofição, permite a formação de membranas com alta área de superfície e porosidade (REN et al., 2017). Dessa forma, as membranas apresentam condições favoráveis para a adesão e proliferação celular, possibilitando uma boa integração tecidual e consequentemente a proteção de defeitos ósseos na ROG. Como exemplo, Stachewicz et al. (2015) produziram membranas eletrofiadas de PLGA puro, confirmando o crescimento de células osteoblásticas. Contudo, o PLGA puro apresenta hidrofobicidade e a sua biodegradação em meio corpóreo gera produtos, que apesar de atóxicos, podem ocasionar reações inflamatórias nos tecidos. Com intuito de minimizar essas limitações, trabalhos como (FU et al., 2017) e (KHOJASTEH et al., 2016) incorporaram os fosfatos de cálcio Hap e  $\beta$ -TCP. O uso de fosfatos de cálcio aumenta a biocompatibilidade e a osteocondutividade, possibilitando o maior reconhecimento celular, o que favorece a osteointegração (JI et al., 2012). Além disso, membranas eletrofiadas contendo fosfatos de cálcio podem apresentar aumento nas propriedades mecânicas, como observado por Fu et al. (2017). Os fosfatos de cálcio são biodegradáveis e bioreabsorvíveis

e o tempo de absorção dos fosfatos de cálcio é dependente da razão de Ca/P. A Hap possui razão Ca/P de 1,67 e tempo de absorção que varia de 1 a 7 anos, dependendo das características do material (DOROZHKIN, 2010). Enquanto o  $\beta$ -TCP possui razão Ca/P de 1,5 e tempo de absorção de cerca de 2 semanas após sua inserção (SURINDAR et al., 1971). Tendo em vista que o tempo de cicatrização da ferida é de cerca de 40 dias e que a regeneração completa do defeito ósseo é entre 3 e 4 meses, é interessante que haja a absorção tanto do fosfato de cálcio quanto da membrana reabsorvível durante o processo. Assim, o PLGA e o  $\beta$ -TCP tornam-se mais apropriados para a aplicação em ROG. Testes *in vivo* realizados por Surindar et al. (1971), observaram além da dissolução do  $\beta$ -TCP em 2 semanas, a neoformação óssea após 5 semanas. Apesar de existir trabalhos utilizando PLGA contendo  $\beta$ -TCP para a regeneração óssea, como na produção de *scaffolds* em (PANG et al., 2007) (YANG et al., 2008) (ROH et al., 2016) (KHOJASTEH et al., 2016), no entanto, nenhum deles utiliza a técnica de eletrofiação para a produção de membranas eletrofiadas de PLGA, que contenham  $\beta$ -TCP, para a aplicação em ROG.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAIS

O polímero utilizado para o desenvolvimento das membranas foi o PLGA (L-lactídeo e glicolídeo 82:18), com dados do fabricante: Resomer® LG 824 S, viscosidade inerente 1,7 ~ 2,6 [dL/g], Evonik Industries (Germany). Partículas de  $\beta$ -TCP, fórmula química  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , foram sintetizadas no laboratório CERMAT– UFSC. Os reagentes utilizados foram carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ), fosfato de amônio bibásico ( $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ) e álcool etílico absoluto ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ ). Como solventes, Dicloroetano (DCE) e Dimetilformida (DMF), fabricados pela empresa Vetec. Algumas propriedades dos solventes utilizados são apresentadas na Tabela 2.

Para os teste *in vitro* foram utilizados fibroblastos (L929), osteoblastos (MC3T3), solução tampão fosfato-salino (*phosphate buffered saline*) (PBS), CellTiter 96® Aqueous One Solution (MTS) (Promega Corporation, EUA), Kit *Live/Dead® Viability/Cytotoxicity* (Invitrogen, Brasil), Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) (Gibco®, EUA), soro bovino fetal (SBF) (Gibco®, EUA), penicilina e estreptomicina (Gibco®, EUA), tripsina (Gibco®, EUA).

Tabela 2 - Propriedades dos solventes utilizados neste estudo.

Solvente	Tensão superficial (mN.m <sup>-1</sup> )	Constante dielétrica ( $\epsilon$ )	Temperatura ebulição (°C)	Densidade (g.cm <sup>-3</sup> )	Parâmetro solubilidade (MPa) <sup>1/2</sup>	Condutividade (µS/cm)
DCE	32,5	10,2	83,5	1,25	20,2	0,7
DMF	37,1	38,3	153,0	0,95	24,0	6,72

Fonte: Adaptado de (MANEE-IN; NITHITANAKUL; SUPAPHOL, 2006) e (CORRÊA, 2008).

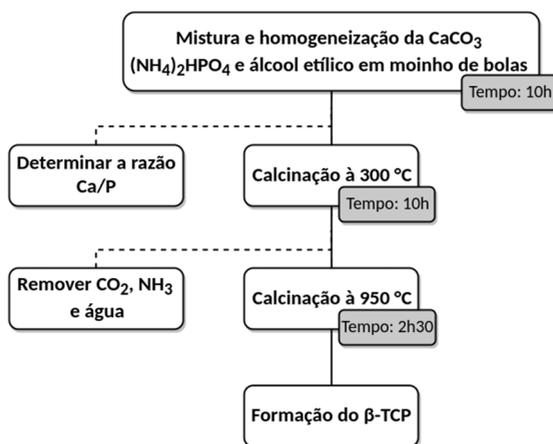
#### 3.2 MÉTODOS

##### 3.2.1 Síntese das partículas de $\beta$ -TCP

O procedimento adotado para síntese de  $\beta$ -TCP foi baseado no procedimento descrito por Corrêa (2008) e Park et al. (2008). A síntese de  $\beta$ -TCP foi realizada através das misturas de 30g de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) e 23 g de fosfato de amônio bibásico ( $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ) em 500 mL de álcool etílico absoluto ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ ). A mistura foi colocada em um jarro de alumina de 2 litros, contendo bolas de 5 tamanhos diferentes,

preenchendo 50% do jarro, e colocado para moer durante 10 horas em um moinho de rolos. Após este período, a mistura foi colocada em vasilhames com papel filtro qualitativos e deixada para secar à temperatura ambiente, até tomar a forma de pó. O pó coletado foi moído manualmente e armazenado em recipientes vedados. Posteriormente, o pó foi calcinado à 300°C por 10h, para a remoção de CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>O e finalmente calcinado a 950°C por 2h30, para a obtenção da fase β-TCP. O fluxograma utilizado é apresentado na Figura 13.

Figura 13 - Esquema da obtenção do β-TCP.



Fonte: Desenvolvido pela Autora.

### 3.2.2 Obtenção de membranas eletrofiadas de PLGA puro e PLGA/β-TCP

A obtenção das membranas eletrofiadas de PLGA puro e PLGA/β-TCP foi dividida em duas etapas: a preparação da solução polimérica e a eletrofição.

#### 3.2.2.1 Preparação da solução polimérica

Para a obtenção da concentração da solução de PLGA puro mais adequada para o sistema, quatro concentrações foram testadas (4,8 m%, 5,7 m%, 6,5 m% e 7,4 m%). Baseado no procedimento adotado por Yang et al. (2016), solubilizou-se o PLGA em DCE/DMF 3:1 (v/v) sob agitação magnética e aquecimento a 50°C, por 2h. A partir desse estudo foi

determinada a concentração mais adequada para o sistema e para a obtenção de fibras uniformes e sem defeitos, a qual foi utilizada para a incorporação do  $\beta$ -TCP.

A partir da solução de PLGA puro, foram preparadas as soluções de PLGA/ $\beta$ -TCP variando a fração mássica de  $\beta$ -TCP em 5, 10 e 20 (m%). Para isso foram preparadas duas soluções, que ao final foram misturadas. A primeira solução, 1,129 g de PLGA foi dissolvido em DCE/DMF 3:1 v/v (6 mL de DCE e 2 mL de DMF), sob agitação magnética e aquecimento a 50 °C, por 2h. Em outro béquer, as partículas de  $\beta$ -TCP (5, 10 e 20 m%), foram dispersas em DCE/DMF 3:1 v/v (3mL de DCE e 1mL de DMF), sob agitação magnética, por 2h. A fração mássica de  $\beta$ -TCP foi calculada em relação a massa total ( $\beta$ -TCP + PLGA). Posteriormente, as duas soluções foram misturadas em um único béquer, sob agitação magnética, por 1h. Por fim, a mistura final foi dispersa por ultrassom durante 5 minutos e, então, eletrofiada. A lista das composições das soluções preparadas é apresentada na Tabela 3 e o esquema ilustrativo da preparação das membranas eletrofiadas de PLGA/ $\beta$ -TCP é apresentado no fluxograma da Figura 14.

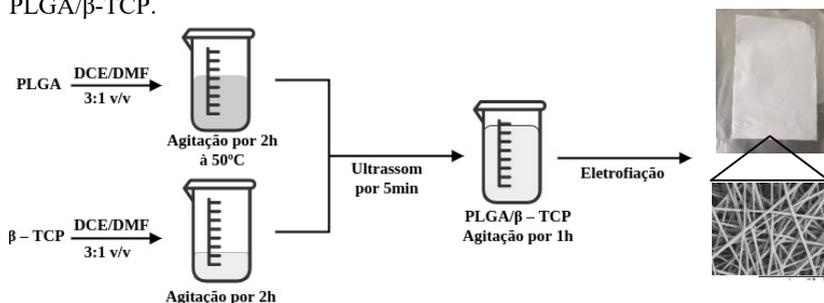
Tabela 3 - Lista das composições referente às soluções finais de PLGA puro e PLGA/ $\beta$ -TCP.

Fração mássica de $\beta$ -TCP (m%)	PLGA (g)	$\beta$ -TCP (g)	DCE/DMF (g)*
0	1,129	0	14,111
5	1,129	0,059	14,111
10	1,129	0,125	14,111
20	1,129	0,282	14,111

\*14,111g de DCE/DMF corresponde a 9 mL de DCE e 3 mL de DMF (3:1 v/v)

Fonte: Desenvolvido pela Autora.

Figura 14 - Esquema ilustrativo da preparação das membranas eletrofiadas de PLGA/ $\beta$ -TCP.



Fonte: Desenvolvido pela Autora.

### 3.2.2.2 Eletrofiação do PLGA puro e PLGA/ $\beta$ -TCP

As membranas de PLGA puro e PLGA/ $\beta$ -TCP foram obtidas pelo processo de eletrofiação (equipamento Instor), conforme mostra a Figura 15 (a). O processo de eletrofiação foi realizado no Laboratório Policom - UFSC. As soluções foram eletrofiadas com a utilização de uma seringa de 5 mL, agulha de 23 gauge (0,6 mm), durante 45 minutos. Os parâmetros ambientais foram definidos em temperatura de  $22 \pm 3^\circ\text{C}$  e umidade relativa de  $55 \pm 5\%$ . Com o objetivo de otimizar as condições de eletrofiação e verificar a influência dos parâmetros do processo na morfologia das membranas, previamente, foram investigados os parâmetros de processos mais adequados para a eletrofiação da solução de PLGA puro, conforme a Tabela 4.

Tabela 4 - Lista dos parâmetros de processo investigados.

Parâmetro	Valores Investigados
Tensão (kV)	16; 18 e 20
Taxa de alimentação ( $\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$ )	0,5; 1,0 e 2,0
Distância entre a agulha e o coletor (cm)	15; 20 e 25

Fonte: Desenvolvido pela Autora.

Com base nos resultados do efeito da concentração polimérica e dos parâmetros de processos, que serão apresentados na Seção 4, foi determinado o melhor conjunto de parâmetros para a obtenção de membranas de PLGA puro. Após o ajuste de parâmetros foram incorporadas diferentes frações mássicas de  $\beta$ -TCP (5, 10 e 20 m%). As membranas foram coletadas em uma folha de alumínio, conforme mostra a Figura 15 (b).

Figura 15 – a) Equipamento de eletrofiação e b) Membrana eletrofiadas de PLGA/ $\beta$ -TCP (espessura  $0,03 \pm 0,02$  mm).



Fonte: Desenvolvido pela Autora.

### 3.3 CARACTERIZAÇÃO

#### 3.3.1 Microscopia eletrônica de varredura

A microestrutura das membranas eletrofiadas de PLGA puro, PLGA/ $\beta$ -TCP e das partículas de  $\beta$ -TCP, foi analisada a partir do microscópio eletrônico de varredura (MEV), fabricado pela empresa Jeol, modelo JSM-6390LV, e pelo microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo (MEV-FEG), da marca Jeol modelo JSM6701F. Ambos localizados no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) – UFSC.

As amostras foram aderidas em porta amostras com fita de carbono dupla face, posteriormente recobertas com ouro e observadas com tensão elétrica de 10 kV (MEV) e 5 kV (MEV-FEG).

A partir das imagens obtidas pelo MEV e MEV-FEG das membranas eletrofiadas, analisou-se o diâmetro médio das fibras e o tamanho de poro médio das membranas, utilizando o *software* livre ImageJ 1.51j. Para cada amostra foram selecionadas aleatoriamente 50 medidas. Foram observadas também a uniformidade e a presença de defeitos tipo *beads* nas fibras.

#### 3.3.2 Densidade

A densidade das partículas de  $\beta$ -TCP foi determinada por picnometria à hélio. A densidade foi obtida pelo equipamento Multipycometer Quantachrome, disponível no laboratório LabMat – UFSC. Para cada amostra foram realizadas sequências de 5 leituras.

#### 3.3.3 Difração de Raios-X

A difração de Raios - X (DRX) das amostras foi realizada com o objetivo de verificar a composição química e a formação da fase  $\beta$  das partículas de  $\beta$ -TCP. Utilizou-se um difratômetro de Raios-X, modelo Philips X'pert, localizado no Laboratório de Caracterização Microestrutural (LCM) – UFSC. A radiação Cu-K $\alpha$  foi fixada em  $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ , operando a potência de 40 kV e 30 mA. As medidas foram realizadas usando geometria Bragg–Brentano ( $\theta$ -2 $\theta$ ), em intervalo de medida de 5° a 80°, com tamanho de digitalização de passo 0,02 ou 0,05°.

### 3.3.4 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), no modo de reflexão total atenuada (ATR), foi utilizada para analisar a composição química das membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA/ $\beta$ -TCP. Os dados foram obtidos a partir de um espectrômetro Bruker, modelo TENSOR 27, disponibilizado pelo Laboratório de Materiais (LabMat) – UFSC.

As amostras de partículas de  $\beta$ -TCP foram prensadas e analisadas em forma de pastilhas, enquanto as membranas eletrofiadas foram analisadas em forma de filme. Os espectros foram obtidos em números de onda de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ , por acúmulo de 32 varreduras e com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.3.5 Ângulo de contato

A hidrofiliabilidade das membranas foi analisada através da análise do ângulo de contato. O experimento foi realizado a temperatura de 24°C em um goniômetro Drop Shape Analyzer DSA25 da KRÜSS, localizado no Laboratório de Materiais (LabMat) – UFSC. Uma gota de 10 $\mu$ L de água deionizada foi depositada por uma seringa colocada verticalmente em relação à superfície da membrana. Após a gota ser depositada por 5s, o ângulo de contato foi medido, de acordo com o procedimento reportado por Roh et al. (2016). Foram feitas cinco gotas para cada amostra, em triplicata. O método utilizado foi gota séssil (sessile drop – SD).

### 3.3.6 Área de superfície específica pelo método BET

A área de superfície específica foi determinada pelo método de adsorção de nitrogênio BET, na Central de Análises - EQA, UFSC.

Foram realizados ensaios de fisissorção para determinar a área BET, pelo procedimento BET (Brunauer, Emmet e Teller) - Norma ASTM D 6556. As amostras foram previamente secas em temperaturas de 70 °C, sob vácuo ( $10^{-7}$  torr) e então a adsorção de nitrogênio gasoso foi medida a 77K, em valores de pressão relativa na faixa de 0 a 1,0.

### 3.3.7 Porosidade

A porosidade das membranas eletrofiadas de PLGA puro e PLGA/ $\beta$ -TCP foram avaliadas de acordo com o método descrito por Chong et al. (2007). A porosidade das membranas eletrofiadas, Equação 2 foi

estimada a partir do cálculo da densidade aparente, Equação 1, das membranas eletrofiadas e membranas densas, obtidas por meio da evaporação de solvente (considerada Bulk).

$$\text{Densidade aparente; } \rho \text{ (m/v)} = \frac{\text{Massa (g)}}{\text{espessura (mm)} \times \text{área (mm}^2\text{)}} \quad (1)$$

$$\text{Porosidade (\%)} = 1 - \frac{\text{Densidade da membrana (g.cm}^{-3}\text{)}}{\text{Bulk densidade (g.cm}^{-3}\text{)}} \times 100 \quad (2)$$

### 3.3.8 Calorimetria exploratória diferencial

As análises de calorimetria diferencial (DSC) foram realizadas para determinar a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), a temperatura de fusão ( $T_f$ ) e a entalpia de fusão ( $\Delta H_f$ ) das membranas. O equipamento utilizado foi o TA DSC2010, disponibilizado pelo Departamento de Engenharia Mecânica, da Universidade de Parma, Itália. As análises foram realizadas a uma taxa de aquecimento de  $10 \text{ }^\circ\text{C.min}^{-1}$  em uma faixa de temperatura de 30 a  $220 \text{ }^\circ\text{C}$ , em atmosfera de nitrogênio, com fluxo de  $100 \text{ mL.min}^{-1}$ .

### 3.3.9 Análise termodinâmica-mecânica

A análise termodinâmica-mecânica (DMA) foi realizada em um equipamento modelo NETZSCH DMA 242E, fabricante Artemis, sob o modo de tração, localizado no Laboratório de Materiais (LabMat) – UFSC, Figura 16. Para a realização das análises, foram utilizados corpos de prova com largura de 5 mm e com comprimento de 10 mm. Os corpos foram ensaiados com frequência de 1 Hz, em uma faixa de temperatura de 25 a  $125 \text{ }^\circ\text{C}$ , a uma taxa de aquecimento de  $5 \text{ }^\circ\text{C.min}^{-1}$  e deslocamento de pico a pico de  $60 \text{ } \mu\text{m}$ .

Figura 16 - Equipamento NETZSCH DMA 242E durante o ensaio DMA.



Fonte: Desenvolvido pela Autora.

### 3.3.10 Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica (TGA) foi realizada com o equipamento Mettler Toledo TGA/SDTA851e, disponibilizado pelo Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade de Parma, Itália. As análises foram realizadas em uma faixa de temperatura de 20 a 500 °C, a uma taxa de aquecimento de 10 °C.min<sup>-1</sup>, com fluxo de nitrogênio de 50 cm<sup>3</sup>.min<sup>-1</sup>.

### 3.3.11 Resistência à tração

O ensaio de tração foi realizado nas membranas eletrofiadas, baseado no método e parâmetros utilizados por Zhang et al. (2016), utilizando o equipamento TesT GmbH model 112,2, disponibilizado pelo laboratório de Ensaio de Materiais, da Universidade de Parma, Itália. Todas as amostras foram cortadas em formas retangulares de 10 mm de largura e 20 mm comprimento. A distância entre as garras foi de 10 mm. O teste mecânico foi executado a uma velocidade constante de 10 mm.min<sup>-1</sup>, à temperatura ambiente. A amostras foram ensaiadas em quadruplicata.

### 3.3.12 Capacidade de absorção

A capacidade de absorção das membranas eletrofiadas de PLGA puro, PLGA/ $\beta$ -TCP com diferentes frações mássicas 5, 10 e 20 (m%), foi avaliada no Laboratório de Tecnologias Integradas (Intelab), localizado no Departamento de Engenharia Química e de Engenharia de alimentos – UFSC.

O ensaio foi realizado com o uso de uma solução tampão fosfato-salino/PBS (*phosphate buffered saline*) pH 7,4. As amostras com dimensões (1 x 1 cm) foram pesadas inicialmente, determinando assim a massa seca inicial ( $M_{seca}$ ). Posteriormente, as amostras foram imersas em 10 mL de PBS, a 37 °C, durante 7, 14, 21 e 28 dias. A cada tempo, o excesso de solução sobre a superfície de cada membrana foi removido com papel absorvente, e as amostras foram pesadas para determinar a massa úmida ( $M_{úmida}$ ). A absorção (%) para cada amostra foi então determinada conforme a Equação 3. Neste mesmo ensaio, foi determinado o pH ao longo dos 28 dias.

$$\text{Absorção (\%)} = \frac{M_{úmida} - M_{seca}}{M_{seca}} \times 100 \quad (3)$$

### 3.3.13 Degradação *in vitro*

A degradação *in vitro* das membranas eletrofiadas de PLGA puro, PLGA/ $\beta$ -TCP com diferentes frações mássicas 5, 10 e 20 (m%), foi avaliada no Intelab, localizado no Departamento de Engenharia Química e de Engenharia de alimentos – UFSC.

Foi utilizada uma solução tampão fosfato-salino/PBS (*phosphate buffered saline*) pH 7,4 para o ensaio. As amostras com dimensões (1 x 1 cm) foram pesadas inicialmente para determinar a massa seca inicial ( $MI_{seca}$ ). Posteriormente as amostras foram imersas em 10 mL de PBS, a 37 °C, em períodos de 7, 14, 21 e 28 dias. Após cada período, as amostras foram retiradas do PBS, congeladas (Ultra-Freezer -80 °C) por 24 horas, liofilizadas por 24 horas e pesadas secas ( $MF_{seca}$ ). O ganho de massa das amostras foi determinado de acordo com a Equação 4.

$$\text{Ganho de massa (\%)} = \frac{MF_{seca} - MI_{seca}}{MI_{seca}} \times 100 \quad (4)$$

### 3.3.14 Citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade em membranas eletrofiadas de PLGA contendo diferentes frações mássicas de  $\beta$ -TCP (5, 10 e 20%), foi realizada conforme a norma ISO 10993-5 (2009), no Intelab, localizado no Departamento de Engenharia Química e de Engenharia de alimentos – UFSC. Foram utilizados fibroblastos de tecido conectivo de camundongo (linhagem L929) que foram avaliados pelos ensaios de atividade metabólica (MTS) e viabilidade celular (*live/Dead*). Os fibroblastos de tecido conectivo de camundongo L929 foram mantidos em nitrogênio líquido, posteriormente descongelados e cultivados em meio de cultura celular Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM). O meio DMEM foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF) e 1% de penicilina/estreptomicina em atmosfera úmida, à temperatura de 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Foi utilizada uma placa de cultura de tecidos (TPP, Suíça) para a propagação celular. Após atingir a confluência de 80% de preenchimento das placas de cultura, as células foram lavadas com PBS para a remoção das proteínas do SBF da superfície das células; em seguida, foi adicionada uma solução de tripsina em volume suficiente para cobrir as células. As placas de cultura de tecidos foram transferidas e mantidas na estufa de CO<sub>2</sub> (Ultrasafe HF 212UV, Brasil) durante 5 min, para a ativação da tripsina e descolamento das células aderidas na placa de cultura. A tripsina e as células foram transferidas para tubos de plástico

de 2 mL e centrifugadas por dois minutos a 24 °C e 5000 RPM. A solução sobrenadante (tripsina) foi removida e as células foram ressuspensas em meio de cultura, e as células viáveis foram quantificadas em câmara de Neubauer (SP Labor, Brasil).

As amostras foram adicionadas nos 96 poços de cultura de tecidos, e imersas em meio de cultura sem soro durante 24h. Fibroblastos de tecido conectivo de camundongo, da linhagem L929, foram semeados na densidade  $9 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>. Após a incubação durante 1, 3 e 7 dias, as membranas foram lavadas com PBS, e a mudança na viabilidade e na morfologia das células aderentes a membrana foram avaliadas. A viabilidade foi determinada pela atividade metabólica (MTS).

### 3.3.14.1 Atividade metabólica

As alterações na viabilidade celular após 1, 3, 5 e 7 dias de cultura foram determinadas pela inferência da atividade mitocondrial, medida com o uso do CellTiter 96® Aqueous One Solution (MTS) (Promega Corporation, EUA) por ensaio colorimétrico realizado de acordo com as instruções do fabricante. Inicialmente, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas suavemente com PBS. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de meio DMEM e 20 µL do reagente MTS nas células. As placas foram mantidas em atmosfera umidificada (5% CO<sub>2</sub>), incubadas a 37 °C durante 2 h, e ao abrigo da luz. Após a incubação, cada amostra foi homogeneizada e 100 µL da solução foram transferidos para uma nova placa de 96 poços. A absorbância (ABS) do sobrenadante foi medida a 490 nm, utilizando espectrofotômetro (Molecular Devices, EUA). O grupo controle foi constituído de células cultivadas em uma placa de cultura. A atividade metabólica das células foi calculada em relação às células controle, determinado pela Equação 5.

$$\text{Atividade metabólica (\%)} = \frac{ABS_{\text{tratamento}}}{ABS_{\text{controle}}} \times 100 \quad (5)$$

### 3.3.14.2 Viabilidade celular

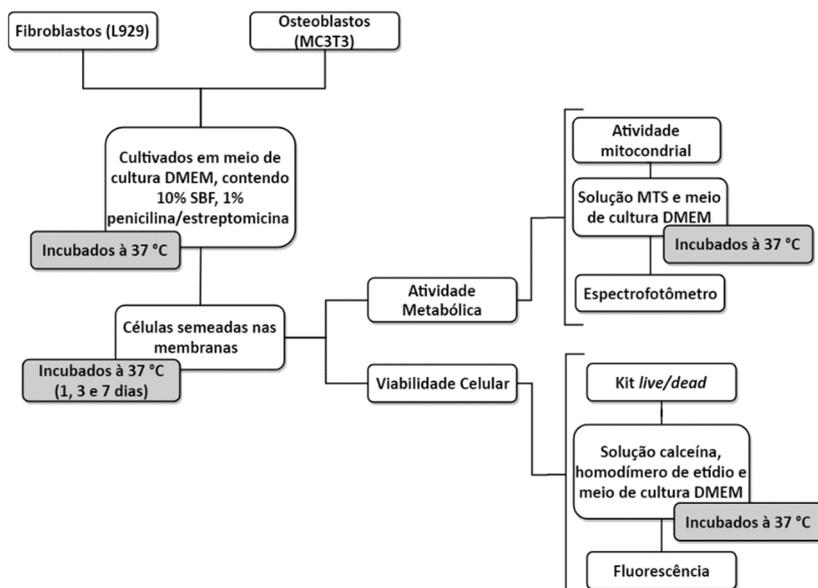
Paralelamente ao ensaio de MTS, foi realizada a análise qualitativa de viabilidade celular pelo do ensaio *Live/Dead*® (Invitrogen, Brasil). Foi preparada uma solução com calceína e homodímero de etídio (4:1) em PBS, e 100 µL desta solução foram adicionados sobre cada amostra contendo 100 µL de meio de cultura. Posteriormente, a placa de cultura foi incubada por 30 minutos a uma temperatura 37 °C e atmosfera de 5%

de CO<sub>2</sub>. Após incubação, as amostras foram colocadas em lâminas e visualizadas em um microscópio de fluorescência de modelo Eclipse Ci-L (Nikon, Japão). A acetometoxi-calceína, ao entrar nas células vivas, é clivada por esterases celulares, liberando a calceína (excitação/emissão 495/515 nm), um composto que fluoresce na cor verde e que fica retido no interior da célula. O iodeto de propídio apenas penetra em células mortas e se intercala no DNA destas células, assumindo uma fluorescência na cor vermelha (excitação/emissão 495/635 nm).

### 3.3.15 Adesão e proliferação de células osteoblásticas

A avaliação da adesão e proliferação de células de osteoblásticas em membranas eletrofiadas de PLGA contendo diferentes frações mássicas de  $\beta$ -TCP (5, 10 e 20%), foi realizada conforme a norma ISO 10993-5 (2009), utilizando osteoblastos (linhagem MC3T3). As membranas foram cultivadas em meio Alfa-MEM pelos ensaios de atividade metabólica (MTS) e viabilidade celular (*Live/Dead*®), como descrito na Subseção 3.3.14. A metodologia utilizada para os testes *in vitro* foi esquematizada conforme resumo apresentado na Figura 17.

Figura 17 - Esquema da metodologia utilizada no teste *in vitro*.



Fonte: Desenvolvido pela Autora.

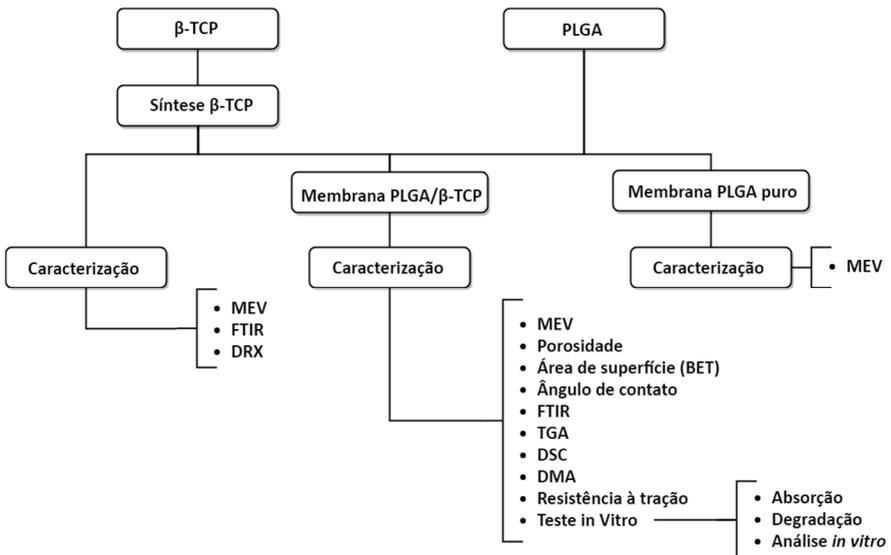
### 3.3.16 Análise Estatística

Os dados foram avaliados estatisticamente utilizando-se os softwares Origin, 16 e Minitab 17. Os resultados experimentais foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão e comparados através da Análise de Variância One-WAY (ANOVA) seguida pelo teste Tukey, considerando-os estatisticamente diferente quando  $p \leq 0,05$ .

### 3.3.17 Resumo

Com o intuito de apresentar uma visão geral dos materiais e métodos descritos neste capítulo, um resumo foi elaborado em forma de esquema. A Figura 18 ilustra os principais materiais e métodos utilizados para o desenvolvimento e caracterização das membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA/ $\beta$ -TCP.

Figura 18 - Esquema geral da metodologia utilizada na pesquisa



Fonte: Desenvolvido pela Autora.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 MEMBRANAS ELETROFIADAS DE PLGA PURO

Devido à grande complexidade de combinações dos parâmetros de processo, da solução e ambiental, optou-se por fixar alguns parâmetros com base em estudos realizados na literatura, como (ZHANG et al., 2016), (YANG et al., 2016) e (SADEGHI et al., 2016). Ainda, outros parâmetros foram fixados com base em estudo realizado no equipamento de eletrofiação utilizado para os experimentos deste trabalho, disponível no Laboratório de Polímeros Compósitos (POLICOM) da UFSC (RACHADEL, 2017). Sendo assim, os parâmetros fixados foram a razão do solvente DCE/DMF em 3:1 (v/v), a temperatura  $22 \pm 3$  °C e a umidade relativa do ar  $55 \pm 5$  %.

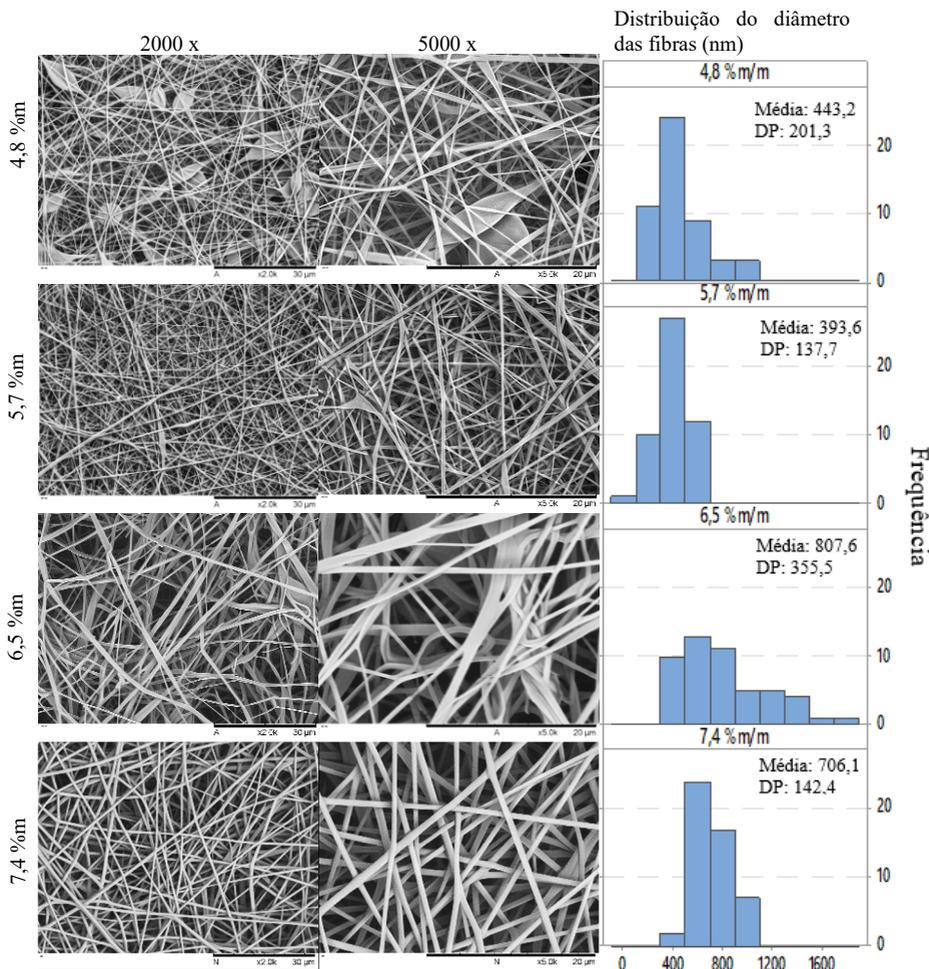
Com o intuito de determinar os parâmetros mais adequados para o sistema e posteriormente adicionar diferentes frações mássicas de  $\beta$ -TCP, foi necessário investigar o efeito da concentração polimérica, da tensão elétrica, da distância agulha/coletor e da vazão de alimentação na morfologia, diâmetro médio e na distribuição de tamanho das fibras obtidas.

#### 4.1.1 Efeito da concentração polimérica

Inicialmente, para a obtenção da concentração polimérica mais adequada para o sistema, fixou-se a distância agulha/coletor em 25 cm, a vazão de alimentação em  $1 \text{ mL.h}^{-1}$  e a tensão elétrica em 18 kV. Os parâmetros fixados foram obtidos a partir de ajustes realizados em um estudo piloto. O estudo piloto considerou como base os parâmetros apresentados em (RACHADEL, 2017). Ainda, foi possível observar nestes testes preliminares, que a condição mínima que evitasse o gotejamento da solução e iniciasse a formação das fibras seria no mínimo de 13 kV. Então, variou-se a concentração de polímero na solução, considerando os seguintes valores: 4,8 m%, 5,7 m%, 6,5 m% e 7,4 m% de PLGA.

As micrografias de MEV e a distribuição dos diâmetros das membranas eletrofiadas a partir de soluções 4,8 m%, 5,7 m%, 6,5 m% e 7,4 m% de PLGA estão apresentadas na Figura 19.

Figura 19 - Micrografias das membranas eletrofiadas a partir das soluções poliméricas de PLGA 4,8 m%, 5,7 m%, 6,5 m% e 7,4 m%, com vazão de alimentação 1 mL.h<sup>-1</sup>, tensão elétrica 18 kV e distância agulha/coletor 25 cm. Os histogramas com a distribuição do diâmetro das fibras também são apresentados.



\* Para o cálculo do diâmetro médio e distribuição de tamanho das fibras, não foram consideradas fibras com defeitos.

Fonte: Desenvolvido pela Autora.

As membranas obtidas a partir da solução com concentração de 4,8m% apresentaram formação de fibras aleatoriamente distribuídas com

uma quantidade elevada de defeito do tipo *beads*. Esse efeito está associado ao curto tempo de relaxação, associado às propriedades viscoelásticas da solução (concentração e massa molar polimérica). Assim, quando uma solução de baixas concentração polimérica é submetida ao campo elétrico, esta não apresentará uma deformação contínua dos emaranhados das cadeias poliméricas, gerando defeitos *beads*. O mesmo efeito foi observado por Liverani e Boccaccini (2016) e Merlini (2014).

O aumento da concentração polimérica tende a gerar fibras mais regulares e com maiores diâmetros. Isto está relacionado com o alto números de emaranhados poliméricos, o que dificulta o estiramento do jato pelo campo elétrico (MOHAMMADZADEHMOGHADAM et al., 2016). Com o aumento da concentração polimérica de PLGA para 5,7 m% e 6,5 m%, conforme a Figura 19, verificou-se que as fibras produzidas apresentaram maior uniformidade e maiores diâmetros. No entanto, ainda é possível observar a presença de fibras desuniformes e com defeitos.

Os resultados destes testes, demonstraram que a solução polimérica de concentração 7,4 m% foi a mais adequada. Isso porque resulta em membranas constituídas com fibras uniformes (distribuição de tamanho estreita), com diâmetro de  $706,1 \pm 142,4$  nm e sem a presença de defeitos *beads*. Como esperado, o aumento da concentração polimérica favoreceu o desemaranhamento contínuo das cadeias poliméricas, não apresentando defeitos *beads*. Por esse motivo, a solução PLGA 7,4 m% foi utilizada nos demais experimentos realizados, sendo referenciada como solução de PLGA puro.

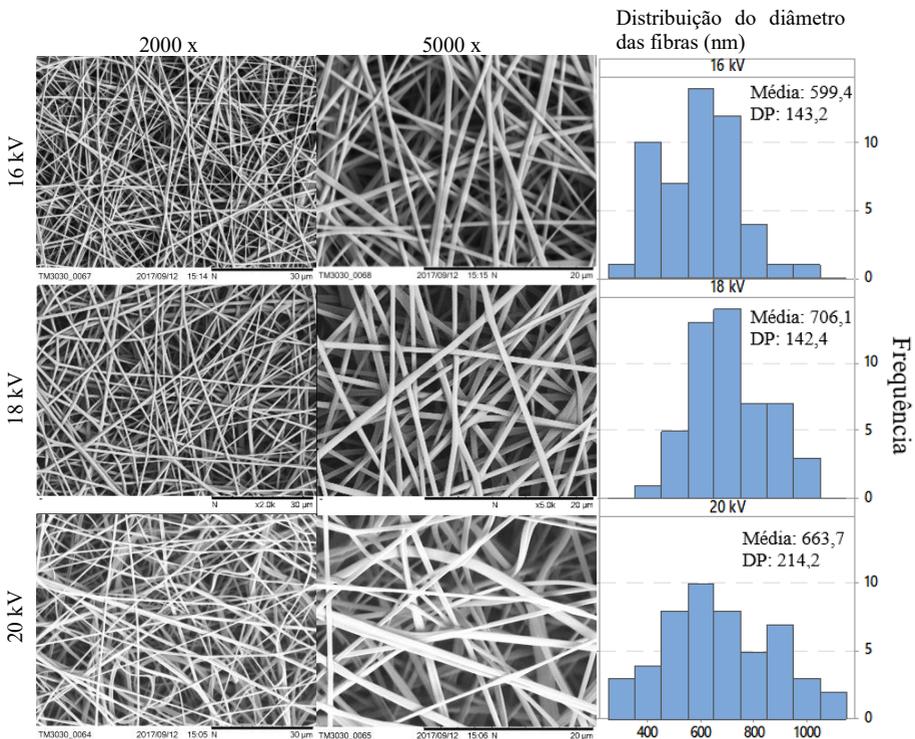
#### 4.1.2 Efeito da tensão elétrica

Para a solução de PLGA puro, anteriormente escolhida (7,4 m%), foi investigado o efeito de diferentes tensões elétricas na morfologia e nos diâmetros das fibras. Para esse sistema, a tensão elétrica crítica é de 13kV, a partir da qual já é possível observar a formação de fibras, no entanto existe a presença de gotículas. Por esse motivo investigou-se o efeito de tensões em 16 kV, 18 kV e 20 kV, de acordo com as micrografias de MEV e a distribuição dos diâmetros apresentadas na Figura 20.

Com o aumento da tensão elétrica de 16 kV para 18 kV, não ocorreu uma grande mudança na morfologia das fibras. No entanto, houve um aumento significativo no diâmetro médio das fibras, de  $554,4 \pm 151,4$  nm para  $706,1 \pm 142,4$  nm, conforme apresentado pela análise de variância – ANOVA (APÊNDICE A). Esse aumento pode ser justificado

por uma pequena redução do tempo de relaxação das fibras, devido a uma maior velocidade do jato em direção ao coletor. Fibras eletrofiadas com tensões de 20 kV apresentaram desuniformidades morfológicas, devido a maior instabilidade do jato. Por esse motivo, optou-se por manter a tensão elétrica em 18 kV, pois demonstrou maior estabilidade do jato observado no processo, além do diâmetro médio de  $706,1 \pm 142,4$  nm ser satisfatório para a adesão e proliferação celular.

Figura 20 - Micrografias de MEV das membranas eletrofiadas de PLGA puro em função da tensão elétrica aplicada: 16 kV, 18 kV e 20 kV. Distância agulha/coletor 25 cm e vazão de alimentação  $1 \text{ mL.h}^{-1}$ . Os histogramas com a distribuição do diâmetro das fibras também são apresentados.



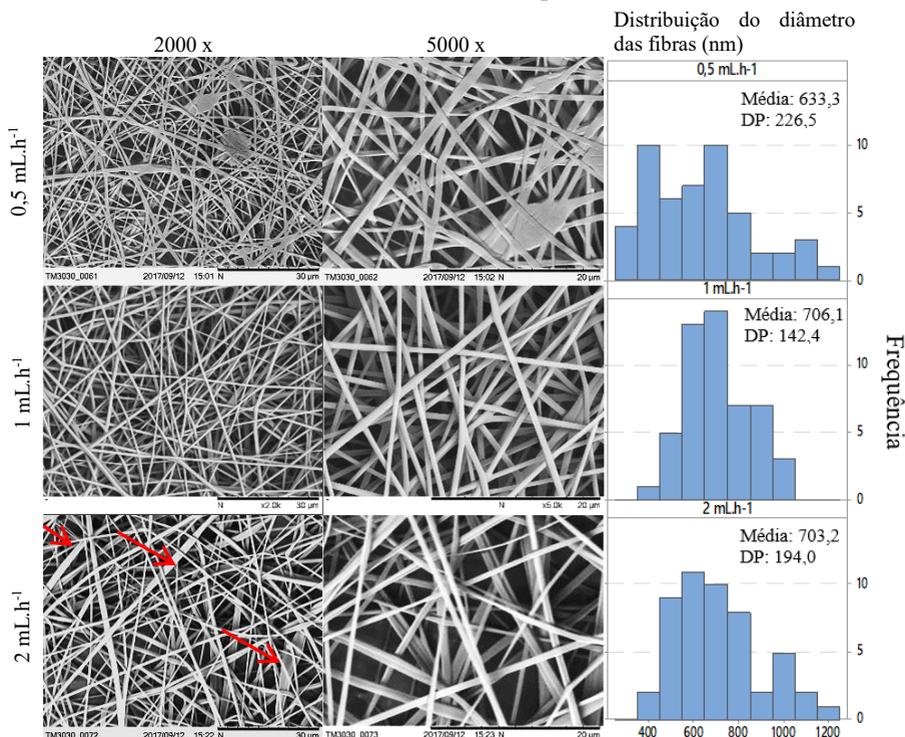
\* Para o cálculo do diâmetro médio e distribuição de tamanho das fibras, não foram consideradas fibras com defeitos.

Fonte: Desenvolvido pela Autora.

### 4.1.3 Efeito da vazão de alimentação

Como estudo do efeito da vazão de alimentação, a Figura 21 apresenta as micrografias de MEV e a distribuição dos diâmetros das membranas eletrofiadas, a partir de diferentes vazões de alimentação da solução polimérica ( $0,5 \text{ mL.h}^{-1}$ ,  $1 \text{ mL.h}^{-1}$  e  $2 \text{ mL.h}^{-1}$ ).

Figura 21 - Micrografias de MEV das membranas eletrofiadas de PLGA puro em função da vazão de alimentação de:  $0,5 \text{ mL.h}^{-1}$ ,  $1 \text{ mL.h}^{-1}$  e  $2 \text{ mL.h}^{-1}$ . Tensão elétrica aplicada 18 kV, distância agulha/coletor 25 cm. Os histogramas com a distribuição do diâmetro das fibras também são apresentados.



\* Para o cálculo do diâmetro médio e distribuição de tamanho das fibras, não foram consideradas fibras com defeitos.

Fonte: Desenvolvido pela Autora.

Como pode ser observado, fibras eletrofiadas com a vazão de  $0,5 \text{ mL.h}^{-1}$  apresentaram defeitos tipo *beads*, possivelmente devido à dificuldade de uma alimentação contínua da solução durante a

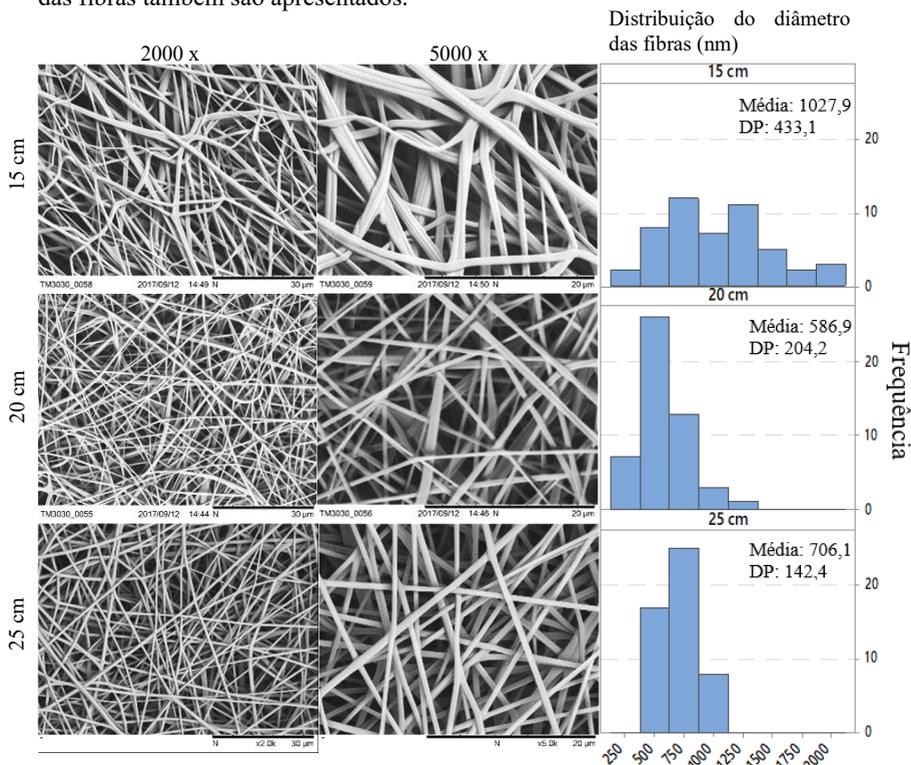
eletrofiação. Com o aumento da vazão para  $0,5 \text{ mL.h}^{-1}$  e  $1 \text{ mL.h}^{-1}$ , os defeitos do tipo *beads* desapareceram e houve o aumento do diâmetro da fibra,  $633,3 \pm 226,5 \text{ nm}$  e  $706,1 \pm 142,4 \text{ nm}$  respectivamente, apresentando diâmetros uniformes. Isso ocorreu devido a um maior volume de solução submetido ao estiramento do campo elétrico. Acima de  $1 \text{ mL.h}^{-1}$ , foi possível observar a presença de alguns defeitos de estiramento das fibras (destacados por setas nas micrografias) para as membranas eletrofiadas a  $2 \text{ mL.h}^{-1}$ . Isso devido à instabilidade do jato polimérico para essa vazão de alimentação. Com estes resultados, baseado na uniformidade e na ausência de defeitos das fibras, comprovou-se que a vazão de  $1 \text{ mL.h}^{-1}$  é mais adequada para esse sistema.

#### 4.1.4 Efeito da distância agulha/coletor

Para estudo do efeito da distância agulha/coletor, a Figura 22 apresenta as micrografias MEV e a distribuição dos diâmetros das membranas eletrofiadas de PLGA, considerando durante a eletrofiação as distâncias agulha/coletor de 15, 20 e 25 cm.

Para essa etapa, a tensão foi fixada em 18 kV e vazão de alimentação em  $1 \text{ mL.h}^{-1}$ , conforme resultados anteriores. A partir das micrografias apresentadas na Figura 22, observa-se que a utilização da menor distância entre a agulha e o coletor (15 cm) resulta em fibras com morfologia desuniforme e unidas longitudinalmente. Isto ocorre devido ao tempo insuficiente de evaporação do solvente, durante o trajeto da fibra até o coletor, resultando em deposição de fibras com solvente residual. Com o aumento da distância de 15 cm para 20 cm (Figura 22), verifica-se que as membranas apresentam fibras com maior uniformidade, mas ainda é possível observar a união longitudinal de algumas fibras. Por fim, com a distância agulha/coletor em 25 cm, o diâmetro aumentou significativamente de  $586,9 \pm 204,2 \text{ nm}$  para  $706,1 \pm 142,4 \text{ nm}$  ANOVA (APÊNDICE C), com a formação de fibras uniformes, ausente de coalescências e de defeitos *beads*. O aumento do diâmetro da fibra, como efeito do o aumento da distância agulha/coletor, pode ser explicado pela redução do campo elétrico e, conseqüentemente, a redução o estiramento do jato. Com esses resultados, baseado na ausência de defeitos e uniformidade das fibras, a distância agulha/coletor de 25 cm foi considerada como a mais apropriada.

Figura 22 - Micrografias MEV das membranas eletrofiadas de PLGA puro com distância agulha/coletor de: 15 cm, 20 cm e 25 cm. Tensão elétrica aplicada 18kV e vazão de alimentação 1mL.h<sup>-1</sup>. Os histogramas com a distribuição do diâmetro das fibras também são apresentados.



\* Para o cálculo do diâmetro médio e distribuição de tamanho das fibras, não foram consideradas fibras com defeitos.

Fonte: Desenvolvido pela Autora.

#### 4.1.5 Considerações parciais

A concentração da solução é um parâmetro que influencia fortemente na morfologia das fibras. A eletrofiação de soluções com concentração de 4,8 m% de PLGA resultou em fibras desuniformes e com defeitos *beads*. No entanto, com o aumento da concentração (de 4,8 m% para 7,4 m% de PLGA), houve uma redução no número de defeitos *beads* e a obtenção de fibras uniformes. A tensão elétrica teve um efeito menos pronunciado na morfologia das membranas eletrofiadas, influenciando apenas nos valores de diâmetro das fibras. A distância entre a agulha e o

coletor influenciou significativamente na obtenção de fibras uniformes e sem coalescências, sendo que a distância agulha/coletor de 25 cm apresentou os melhores resultados em termos de morfologia. Por último, a vazão de alimentação influenciou na uniformidade e na presença de *beads*. O aumento da vazão reduziu o número de *beads* e aumentou o diâmetro das fibras. A membrana com maior uniformidade morfológica e ausente de *beads* foi eletrofiada a  $1 \text{ mL.h}^{-1}$ .

A partir dos resultados apresentados, verificou-se que as condições mais apropriadas para a obtenção de membranas eletrofiadas com fibras uniformes e livres de defeitos são: concentração de PLGA de 7,4m%, tensão de 18kV, distância agulha/coletor de 25cm e vazão de alimentação de  $1 \text{ mL.h}^{-1}$ . Para essas condições, as membranas apresentaram diâmetros médios de  $706,5 \pm 142,4 \text{ nm}$ . Com isso, as membranas produzidas com estes parâmetros apresentam potencial morfológico para aplicação em ROG.

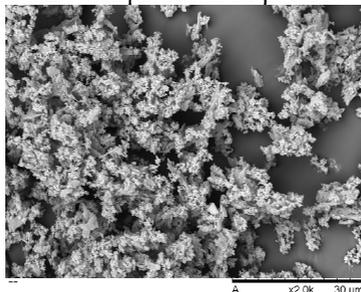
## 4.2 MEMBRANAS ELETROFIADAS DE PLGA/ $\beta$ -TCP

As membranas eletrofiadas de PLGA/ $\beta$ -TCP foram preparadas a partir da eletrofição de uma solução de PLGA puro (7,4 m%), com solvente DCE/DMF 3:1 v/v e incorporação de diferentes frações mássicas de  $\beta$ -TCP (5, 10 e 20 m%).

### 4.2.1 Caracterização das partículas de $\beta$ -TCP

O  $\beta$ -TCP sintetizado apresenta densidade de  $2,10 \text{ g.cm}^{-3}$  e tamanho de partícula ( $d_{50} < 5,77 \text{ }\mu\text{m}$ ), Anexo 1. As partículas exibem uma morfologia constituída de aglomerados, conforme pode ser observado nas micrografias da Figura 23.

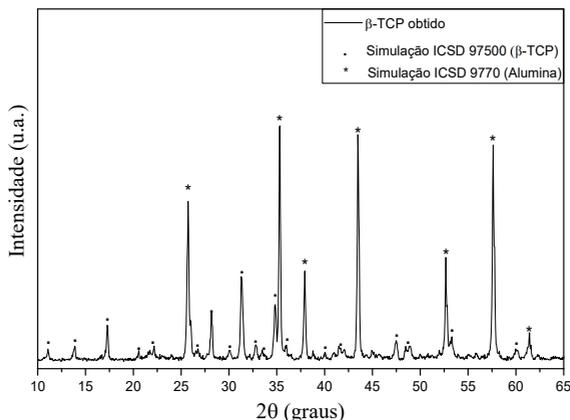
Figura 23 - Micrografia MEV das partículas de  $\beta$ -TCP.



Fonte: Desenvolvido pela Autora.

A Figura 24 apresenta o difratograma de Raios-X das partículas de  $\beta$ -TCP produzidas e a simulação pelo método de Rietveld, utilizando a carta ICSD-97500 (RIETVELD, 1969; YOUNG, 1993). Os picos de difração do  $\beta$ -TCP produzido, correspondem aos picos da carta padrão (ICSD-97500). Esse resultado confirma a obtenção do  $\beta$ -TCP.

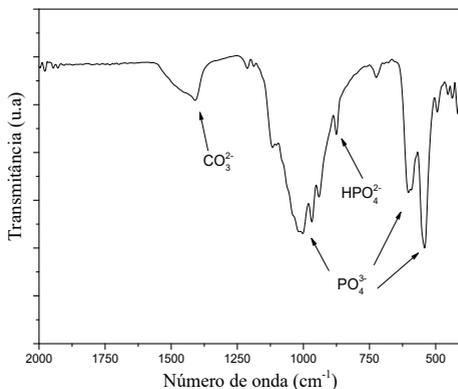
Figura 24 - Difratogramas de DRX do  $\beta$ -TCP fabricado no CERMAT- UFSC e  $\beta$ -TCP padrão.



Fonte: Desenvolvido pela Autora.

O espectro de FTIR das partículas de  $\beta$ -TCP é apresentado na Figura 25. A banda característica  $\text{PO}_4^{3-}$  aparece em  $1000\text{ cm}^{-1}$ ,  $596\text{ cm}^{-1}$  e  $542\text{ cm}^{-1}$ . A banda  $\text{CO}_3^{2-}$  localiza-se na região  $1545\text{-}1360\text{ cm}^{-1}$ , possivelmente derivado de resíduos do reagente carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ). Já a banda  $868\text{ cm}^{-1}$  refere-se ao grupo  $\text{HPO}_4^{2-}$ , que pode ser derivada de um reação de hidratação do grupo  $\text{PO}_4^{3-}$ , conforme também observado por (PARK et al., 2008) (KUMBAR et al., 2008) ou derivado de resíduos do reagente fosfato de amônio bibásico ( $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ).

Figura 25 - Espectro de FTIR das partículas de  $\beta$ -TCP.



Fonte: Desenvolvido pela Autora.

#### 4.2.2 Caracterização das membranas eletrofiadas

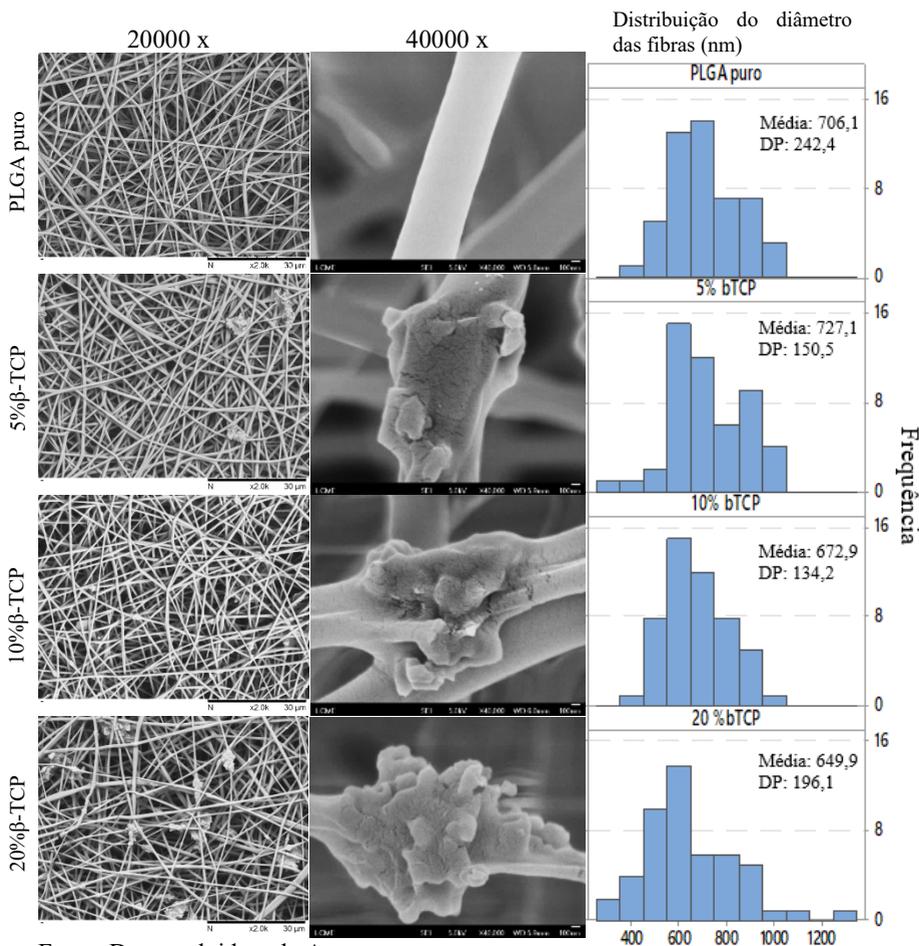
As micrografias de MEV-FEG e a distribuição de diâmetro das membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA contendo diferentes frações mássicas de  $\beta$ -TCP (5, 10 e 20 m%), são apresentadas na Figura 26. Com a adição de  $\beta$ -TCP é possível verificar que a morfologia das membranas se manteve uniforme e sem a presença de defeitos. Porém, são observados aglomerados e encapsulamento de partículas, sendo o efeito mais pronunciado para as fibras de PLGA/20%  $\beta$ -TCP.

A Tabela 5 apresenta os valores de diâmetro médio das fibras (conforme a Figura 26), área de superfície, tamanho de poro, porosidade percentual (%) e o ângulo de contato das membranas eletrofiadas de PLGA puro e PLGA/ $\beta$ -TCP, que serão descritos na sequência. Existe uma tendência de redução do diâmetro médio das fibras com a adição de  $\beta$ -TCP. Houve uma redução de  $706,1 \pm 142,4$  nm, referente as fibras de PLGA puro, para  $649,9 \pm 196,1$  nm, referente as fibras produzidas com PLGA/20%  $\beta$ -TCP. No entanto, estatisticamente a diferença entre as médias não é significativa ( $p < 0,05$ ), conforme a análise ANOVA (APÊNDICE D). Dessa forma, mesmo com a adição de  $\beta$ -TCP, as faixas de diâmetros obtidas são consideradas apropriadas (dentro de 300 - 1100 nm) Kumbar et al. (2008). Isso pois, dentro da faixa de 300-1100 nm, as fibras exibem alta área de superfície para a adesão e proliferação de fibroblastos na superfície das membranas.

A área de superfície das membranas de PLGA/ $\beta$ -TCP aumentou significativamente com a fração mássica de  $\beta$ -TCP, de  $7,7 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$

(PLGA/5% $\beta$ -TCP) para  $46 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  (PLGA/20% $\beta$ -TCP). Isso pode ser explicado pela redução do tamanho médio do diâmetro das fibras com adição de  $\beta$ -TCP. O tamanho (diâmetro médio) dos poros variou entre  $4,2 \pm 0,6 \text{ nm}$  e  $6,5 \pm 1,9 \text{ nm}$ , enquanto que a porosidade percentual variou de  $64 \pm 2\%$  (PLGA puro) para  $77 \pm 4\%$  (PLGA/10%  $\beta$ -TCP).

Figura 26 - Micrografias MEV-FEG das membranas eletrofiadas de PLGA puro com diferentes frações mássicas de  $\beta$ -TCP (5, 10 e 20 m%), tensão elétrica 25 kV, vazão de alimentação de  $1 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$  e distância agulha/coletor de 25 cm. Os histogramas com a distribuição do diâmetro das fibras também são apresentados.



Os tamanhos de poros obtidos (entre 3 e 20  $\mu\text{m}$ ) e a porosidade (entre 60 e 80 %) são considerados satisfatórios. Com esses valores há o impedimento da penetração de fibroblastos para o interior do defeito ósseo e propicia a adesão de células na interface, favorecendo a integração tecidual (CHEN et al., 2013) (MASOUDI RAD et al., 2017). Adicionalmente, a alta porosidade permite a difusão de fluidos, oxigênio, nutrientes e substâncias bioativas (MO et al., 2015).

O teste de ângulo de contato em membranas eletrofiadas é um método comumente utilizado para avaliar a hidrofobicidade da superfície. A hidrofobicidade é uma característica importante em biomateriais devido a sua influência na adesão e proliferação celular (TEODORA et al., 2015). Membranas eletrofiadas de PLGA puro apresentaram ângulo de contato  $125,13^\circ \pm 4,17$ , sugerindo um comportamento fortemente hidrofóbico, conforme apresenta a Figura 27. A incorporação de  $\beta$ -TCP não alterou as propriedades da superfície da membrana, como era esperado. Essa característica hidrofóbica das membranas de PLGA e PLGA/ $\beta$ -TCP pode ter sido dependente da estrutura/rugosidade da membrana e não apenas da composição da superfície.

Figura 27 - Teste de ângulo de contato na membrana eletrofiada de PLGA puro.



Fonte: Desenvolvido pela Autora.

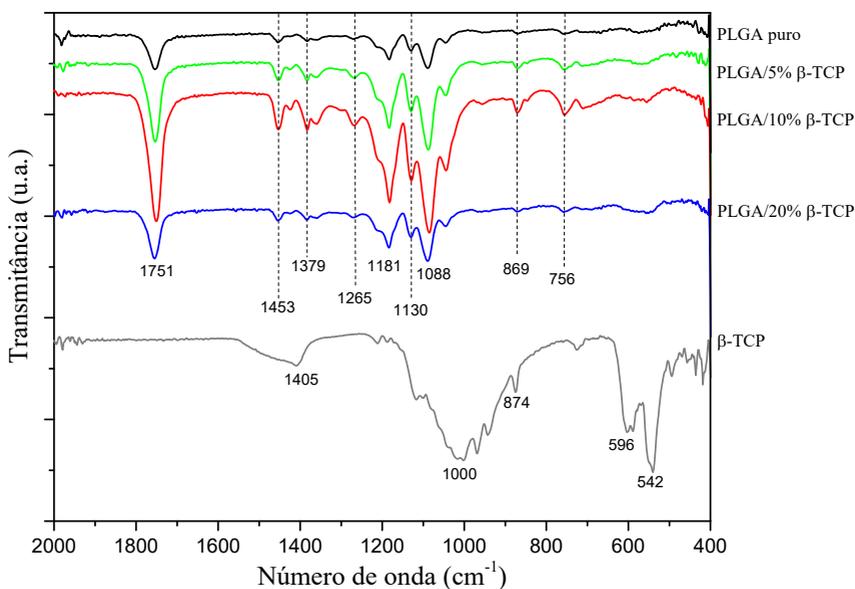
Tabela 5 - Área de superfície específica, diâmetro das fibras, tamanho de poro, porosidade e ângulo de contato das membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA/ $\beta$ -TCP.

Membrana	Área de Superfície ( $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$ )	Diâmetro das fibras (nm)	Tamanho de poro ( $\mu\text{m}$ )	Porosidade (%)	Ângulo de contato ( $^\circ$ )
PLGA puro	-	$706,1 \pm 142,4$	$6,5 \pm 1,9$	$64 \pm 2$	$125,1 \pm 4,2$
PLGA/5% $\beta$ -TCP	7,7	$727,1 \pm 150,5$	$4,7 \pm 1,2$	$67 \pm 12$	$125,6 \pm 3,3$
PLGA/10% $\beta$ -TCP	31	$672,9 \pm 134,2$	$4,2 \pm 0,6$	$77 \pm 4$	$126,5 \pm 4,5$
PLGA/20% $\beta$ -TCP	46	$649,9 \pm 196,1$	$5,4 \pm 0,9$	$75 \pm 13$	$132,1 \pm 0,6$

Fonte: Desenvolvido pela Autora.

A Figura 28 apresenta os espectros de FTIR das membranas eletrofiadas de PLGA puro, das membranas de PLGA com diferentes frações mássicas  $\beta$ -TCP (5,10 e 20 m%) e  $\beta$ -TCP puro, em uma faixa de  $2000\text{ cm}^{-1}$  a  $600\text{ cm}^{-1}$ . Todas as bandas identificadas foram atribuídas, de acordo com os dados apresentados na Tabela 6 e 7. Os espectros das membranas eletrofiadas de PLGA/ $\beta$ -TCP apresentam bandas similares ao de PLGA puro sem qualquer deslocamento. Por esse motivo, pode-se inferir que as partículas de  $\beta$ -TCP não interagiram quimicamente com a matriz polimérica.

Figura 28 - Espectro de FTIR das membranas eletrofiadas de PLGA puro e PLGA/ $\beta$ -TCP e partículas de  $\beta$ -TCP.



Fonte: Desenvolvido pela Autora.

Tabela 6 - Atribuições das bandas de absorção na região do infravermelho das membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA/ $\beta$ -TCP.

<b>Banda de Absorção (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Atribuições</b>
<b>1751</b>	Estiramento C=O do COO
<b>1453</b>	Deformação $\delta$ CH <sub>3</sub> e CH <sub>2</sub>
<b>1379</b>	Deformação CH <sub>3</sub> e CH
<b>1265</b>	Deformação simétrica angular CH <sub>3</sub> e CH <sub>2</sub>
<b>1181</b>	Deformação C-O do COO
<b>1130-1088</b>	Estiramento C-O do CH-O e CH <sub>2</sub> -O
<b>869</b>	Estiramento C-COO e vibração P-O-H no grupo HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
<b>756</b>	Deformação CH

Fonte: Desenvolvido pela Autora, adaptado de (PARK et al., 2008).

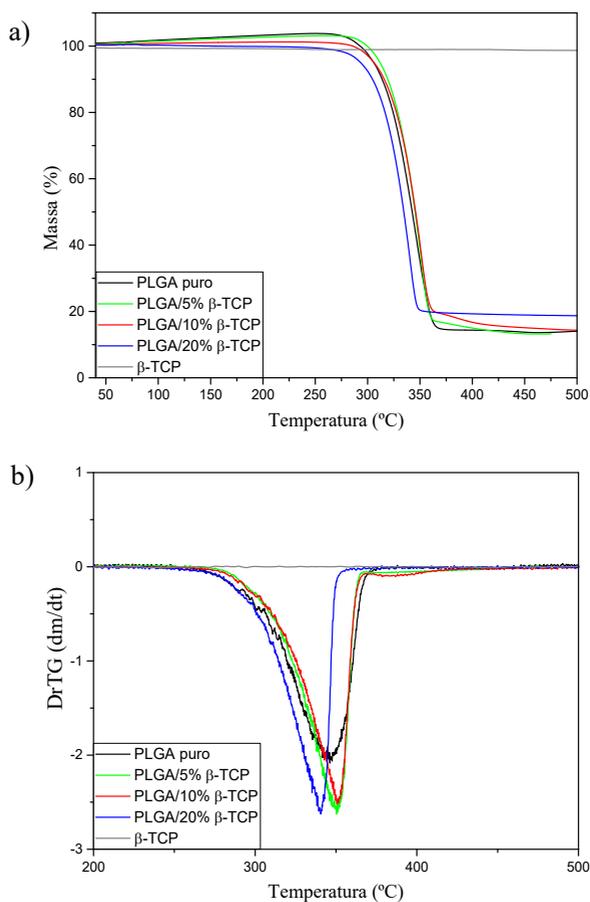
Tabela 7- Atribuições das bandas de absorção na região do infravermelho das partículas de  $\beta$ -TCP.

<b>Banda de Absorção (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Atribuições</b>
<b>1405</b>	Grupo carbonato CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>
<b>1000</b>	Estiramento do grupo fosfato PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
<b>874</b>	Vibração P-O-H no grupo HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
<b>596</b>	Deformação angular do grupo fosfato PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
<b>542</b>	Deformação angular do grupo fosfato PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>

Fonte: Desenvolvido pela Autora, adaptado de (MERLINI, 2014).

As curvas termogravimétricas (TG) e de suas respectivas primeiras derivadas da variação da massa (DrTG), em relação a temperatura, das membranas eletrofiadas de PLGA puro e PLGA/ $\beta$ -TCP são apresentadas na Figura 29 (a e b). A Tabela 8 apresenta os intervalos de degradação térmica e os valores de temperatura de degradação máxima (ponto máximo da curva DrTG) das membranas.

Figura 29 - Curvas de (a) TG e (b) DrTG das membranas de PLGA puro e PLGA/ $\beta$ -TCP com diferentes frações mássicas de  $\beta$ -TCP.



Fonte: Desenvolvido pela Autora.

Tabela 8 - Intervalo de degradação térmica e temperatura de degradação máxima (DrT<sub>g</sub>) das membranas de PLGA puro e PLGA/ $\beta$ -TCP com diferentes frações mássicas de  $\beta$ -TCP.

Membrana	Intervalo de degradação térmica (°C)	Temperatura de degradação máxima (°C)
PLGA puro	278 - 367	347
PLGA/5% $\beta$ -TCP	292 - 410	351
PLGA/10% $\beta$ -TCP	285 - 415	350
PLGA/20% $\beta$ -TCP	272 - 352	340

Fonte: Desenvolvido pela Autora

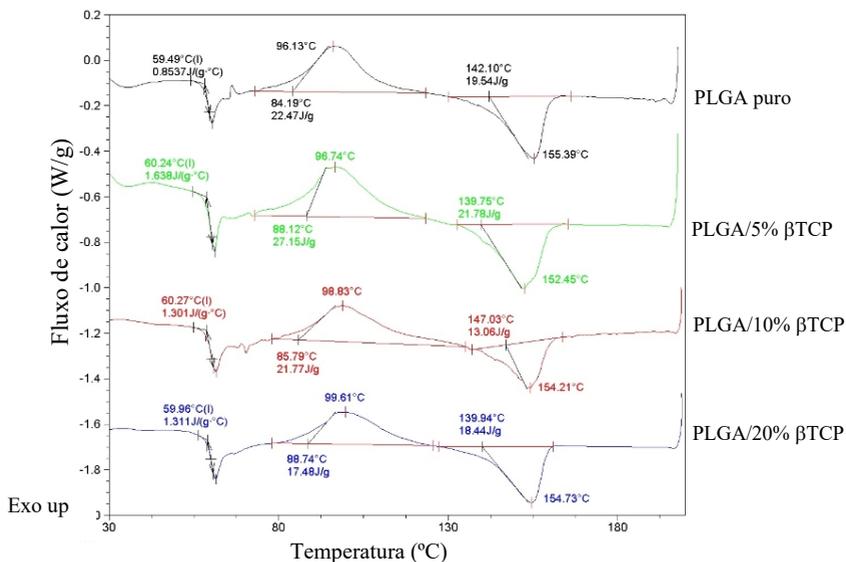
A membrana de PLGA puro apresenta temperatura de degradação máxima de 347 °C, atribuída a decomposição da cadeia polimérica. A temperatura de degradação máxima das membranas eletrofiadas com diferentes frações mássicas de  $\beta$ -TCP foi deslocada para maiores valores, de 347 °C para 351 °C para as membranas de contendo 5 e 10%  $\beta$ -TCP. Enquanto que para as membranas contendo 20% de  $\beta$ -TCP foi deslocada para menores valores, de 347 °C para 340 °C. Esse resultado demonstra que a adição de  $\beta$ -TCP manteve a estabilidade térmica das membranas com 5 e 10% de  $\beta$ -TCP.

A Figura 30 apresenta os termogramas DSC das membranas de PLGA puro e das membranas PLGA/ $\beta$ -TCP com diferentes frações mássicas de  $\beta$ -TCP. A membrana de PLGA puro exibe a temperatura de transição vítrea (T<sub>g</sub>) em 59,49 °C, a qual varia entre 59,96 - 60,27 °C nas membranas PLGA/ $\beta$ -TCP. O pico endotérmico durante a fase de aquecimento está centrado em 155,39 °C na membrana de PLGA puro, relativo a fusão da fase cristalina do PLGA. Após a incorporação de  $\beta$ -TCP, as temperaturas de fusão (T<sub>m</sub>) reduziram de 155,39 °C para valores entre 152,45 - 154,73 °C. Sendo assim, pode-se observar que a adição de  $\beta$ -TCP não alterou significativamente a T<sub>g</sub> e T<sub>m</sub>.

Como apresentado na Tabela 9, a entalpia de fusão ( $\Delta H_f$ ) da membrana de PLGA puro foi de 20,93 J/g, enquanto as membranas de PLGA/ $\beta$ -TCP variaram entre 17,97 J/g - 24,91 J/g. Os resultados sugerem que a adição de 5%  $\beta$ -TCP pode ter influenciado a organização das cadeias poliméricas de PLGA, sendo que o  $\beta$ -TCP pode estar atuando como agente nucleante, favorecendo a cristalização do PLGA. O contrário ocorreu com a adição de 10%  $\beta$ -TCP e 20%  $\beta$ -TCP. Além disso, verifica-se um pico exotérmico em 96,13°C para o PLGA puro, referente a temperatura de cristalização do polímero (T<sub>c</sub>), durante o aquecimento. A presença deste pico de cristalização é decorrente da inabilidade de formação total da fase cristalina (máxima possível para amostra) durante

o processo de eletrofição. Apesar do estiramento do jato polimérico na eletrofição, a formação dos domínios cristalinos foi reestabelecida e finalizada durante o aquecimento realizado no ensaio de DSC.

Figura 30 - Curvas DSC das membranas eletrofiadas de PLGA puro e PLGA/ $\beta$ -TCP.



Fonte: Desenvolvido pela Autora.

Tabela 9 - Resultados extraídos das curvas DSC das membranas eletrofiadas de PLGA puro e PLGA/ $\beta$ -TCP.

Membrana	$T_g$ (°C)	$\Delta H_c$ (J.g <sup>-1</sup> )	$T_f$ (°C)	$\Delta H_f$ (J.g <sup>-1</sup> )
<b>PLGA puro</b>	59	22,47	155	19,54
<b>PLGA/5% <math>\beta</math>-TCP</b>	60	27,15	152	21,78
<b>PLGA/10% <math>\beta</math>-TCP</b>	60	21,77	154	13,06
<b>PLGA/20% <math>\beta</math>-TCP</b>	60	17,48	155	18,44

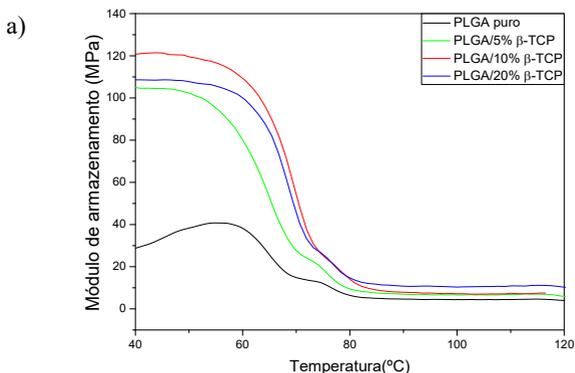
Fonte: Desenvolvido pela Autora.

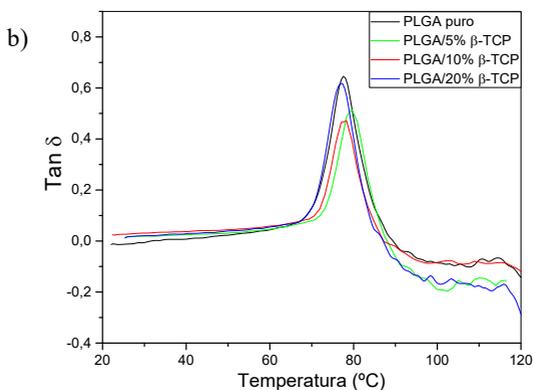
A análise DMA foi realizada nas membranas eletrofiadas de PLGA puro e PLGA/ $\beta$ -TCP. As curvas de módulo de armazenamento ( $E'$ ) em função da temperatura são apresentadas na Figura 31 (a). Ao longo de todo o intervalo de temperatura, os valores de  $E'$  da membrana de PLGA/ $\beta$ -TCP apresentaram um aumento considerável em relação as

membranas de PLGA puro, com maiores valores para as membranas PLGA/10%  $\beta$ -TCP. Esse efeito pode ser atribuído a atuação das partículas de  $\beta$ -TCP como reforço. Houve apenas uma pequena redução do módulo de armazenamento com a adição de 20%  $\beta$ -TCP em relação a membrana com 10%  $\beta$ -TCP. Essa redução pode ser atribuída a grande quantidade de partículas e aglomerados de  $\beta$ -TCP nas fibras.

A Figura 31 (b) apresenta as curvas da tangente de perda ( $\text{Tan } \delta$ ) em função da temperatura das membranas eletrofiadas de PLGA puro e PLGA/ $\beta$ -TCP. A temperatura de transição vítrea em aproximadamente 77 °C não é afetada pela presença de  $\beta$ -TCP, assim como observado na análise DSC. A intensidade do pico, correspondente à temperatura de transição vítrea, reduziu com o aumento da fração mássica de  $\beta$ -TCP. No entanto, na membrana eletrofiada PLGA/20%  $\beta$ -TCP a intensidade da  $\text{tan } \delta$  é praticamente a mesma da membrana de PLGA puro. Esse comportamento, está relacionado ao grande número de aglomerados de  $\beta$ -TCP na matriz polimérica, ocorrendo uma saturação das partículas, anulando o efeito da presença destas partículas na matriz polimérica. Esse comportamento também foi observado por Merlini (2014).

Figura 31 - Curvas de DMA apresentando (a) módulo de armazenamento e (b) tangente de perda em função da temperatura para as membranas eletrofiadas de PLGA puro e PLGA/ $\beta$ -TCP.





Fonte: Desenvolvido pela Autora.

A Tabela 10 apresenta os valores obtidos no ensaio de tração das membranas eletrofiadas de PLGA puro e PLGA/ $\beta$ -TCP. As membranas de PLGA puro apresentaram resistência máxima à tração de  $3,04 \pm 1,74$  MPa, módulo de elasticidade de  $30,07 \pm 7,70$  MPa e deformação de  $55 \pm 5\%$ . A adição de 5% e 10%  $\beta$ -TCP apresentou uma tendência de aumento nas propriedades mecânicas analisadas. Enquanto que a adição de 20% de  $\beta$ -TCP reduziu a resistência máxima à tração e o módulo de elasticidade, com apenas um pequeno aumento na deformação. O aumento das propriedades mecânicas nas membranas de PLGA/5%  $\beta$ -TCP e PLGA/10%  $\beta$ -TCP também foi observado no ensaio de DMA. A redução nas propriedades mecânicas para a membrana de PLGA/20%  $\beta$ -TCP pode estar relacionada à presença de aglomerados de partículas de  $\beta$ -TCP ao longo das fibras. Os valores obtidos no ensaio de tração são satisfatórios para o uso em ROG, visto que a membrana comercial BioGuide®, comercialmente muito utilizada, apresenta valores de 4,8 Mpa de resistência máxima à tração (ORTOLANI et al., 2015). Por esse motivo, as membranas desenvolvidas de PLGA/5%  $\beta$ -TCP com resistência máxima à tração de  $4,17 \pm 0,55$  MPa e PLGA/10%  $\beta$ -TCP com  $3,11 \pm 0,54$  MPa possuem grande potencial em relação as propriedades mecânicas para o uso em ROG.

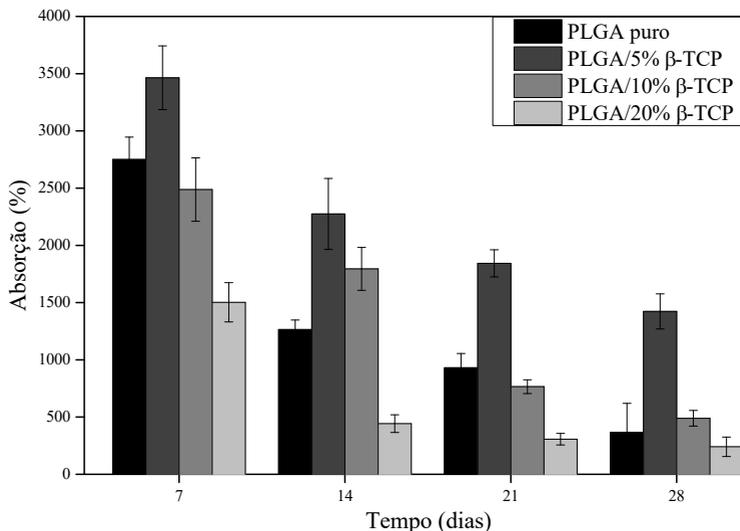
Tabela 10 - Propriedades mecânicas das membranas de PLGA puro e PLGA/ $\beta$ -TCP com diferentes frações mássica (5, 10 e 20 m%).

Membrana	Resistência máxima à tração (MPa)	Módulo de Elasticidade (MPa)	Deformação (%)
PLGA puro	3,04 $\pm$ 1,74	30,07 $\pm$ 7,70	55 $\pm$ 5
PLGA/5% $\beta$ -TCP	4,17 $\pm$ 0,55	41,43 $\pm$ 3,14	82 $\pm$ 11
PLGA/10% $\beta$ -TCP	3,11 $\pm$ 0,54	38,95 $\pm$ 13,05	69 $\pm$ 10
PLGA/20% $\beta$ -TCP	1,17 $\pm$ 0,59	9,51 $\pm$ 3,81	70 $\pm$ 5

Fonte: Desenvolvido pela Autora.

A Figura 32 mostra a capacidade de absorção de solução de PBS das membranas eletrofiadas de PLGA puro e PLGA/ $\beta$ -TCP. O teste de absorção foi realizado durante o teste de degradação, que será apresentado posteriormente, as membranas foram avaliadas após de 7, 14, 21 e 28 dias em PBS à 37 °C. Os resultados obtidos ao longo dos 28 dias de exposição demonstraram que as membranas de PLGA/5%  $\beta$ -TCP absorveram mais solução em relação as demais composições. Por esse motivo, apesar dos resultados de ângulo de contato não terem se alterado com a adição de  $\beta$ -TCP e sugerir um comportamento fortemente hidrofóbico, os resultados de absorção sugerem que a adição de 5% de  $\beta$ -TCP, favoreceu a interação da membrana com a solução e aumentou a hidrofiliabilidade. O aumento da hidrofiliabilidade com a adição de  $\beta$ -TCP também foi observado em (MASOUDI RAD et al., 2017). Consequentemente, o aumento da hidrofiliabilidade pode influenciar no aumento da adesão e proliferação celular, como observado em (PARK et al., 2017) e (DUTRA MESSIAS; ARAGONES; APARECIDA DE REZENDE DUEK, 2009). Além disso, a absorção de solução diminuiu ao longo do tempo para todas as composições. Esse processo pode ser atribuído ao início da degradação por hidrólise das cadeias poliméricas do PLGA, reduzindo assim a capacidade de absorção das membranas.

Figura 32 - Absorção das membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA/ $\beta$ -TCP. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média em triplicata e comparados através da análise de variância one-way (ANOVA) seguida pelo teste Tukey, considerando-os estatisticamente diferentes quando  $p \leq 0,05$ .

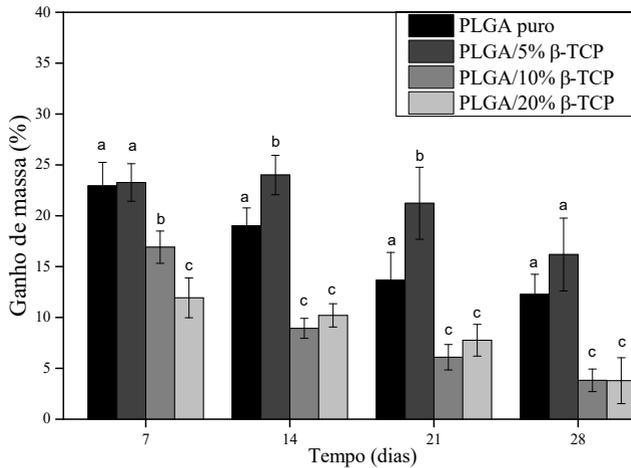


Fonte: Desenvolvido pela Autora

A Figuras 33 e 34 apresentam, respectivamente, o ganho de massa e o pH das membranas eletrofiadas de PLGA puro e de PLGA/ $\beta$ -TCP durante o teste de degradação *in vitro*, após exposição de 7, 14, 21 e 28 dias em PBS à 37°C. Segundo os resultados do teste de degradação, as membranas apresentaram ganho de massa, o que não era esperado. O aumento de massa das membranas pode ser justificado pela formação de cristais de PBS (Anexo 2). Os cristais de PBS foram formados devido ao fato de que as membranas não foram lavadas antes da liofilização e da pesagem. Apesar disso, percebe-se que ao longo do período de 28 dias houve redução no ganho de massa, sugerindo a degradação do PLGA. Na análise de pH, os valores reduziram de cerca de 7,5 para 6,5 na primeira semana, mantendo-se constante em 6,5 até o final do experimento (28 dias) para todas as composições. Essa diminuição pode estar relacionada aos produtos de degradação (ácido láctico e ácido glicólico) do PLGA no meio ou a produtos derivados do metabolismo celular. No entanto não houve confirmação da degradação. A degradação não confirmada das membranas eletrofiadas no período de 28 dias pode ser explicada pela alta

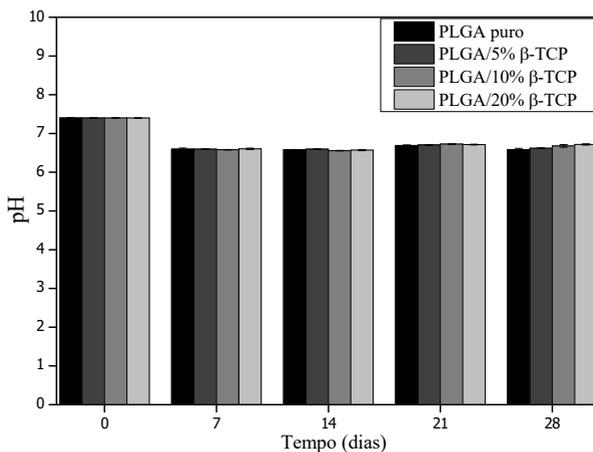
proporção do monômero LA em relação ao GA (82/18) e também devido a semicristalinidade deste PLGA, o que reduz o acesso de água nas regiões amorfas durante a degradação hidrolítica e aumenta o tempo de degradação. É possível observar que a membrana contendo 5% de  $\beta$ -TCP apresentou os maiores valores de ganho de massa em comparação com as demais membranas. Isso pode ser correlacionado com o aumento da cristalinidade das membranas de PLGA/5%  $\beta$ -TCP, como verificado no ensaio de DSC. Assim, conseqüentemente, a membrana de PLGA/ $\beta$ -TCP pode apresentar maior tempo de degradação.

Figura 33 - Ganho de massa das membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA/ $\beta$ -TCP. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média em triplicata e comparados através da análise de variância one-way (ANOVA) seguida pelo teste Tukey, considerando-os estatisticamente diferentes quando  $p \leq 0,05$ .



Fonte: Desenvolvido pela Autora.

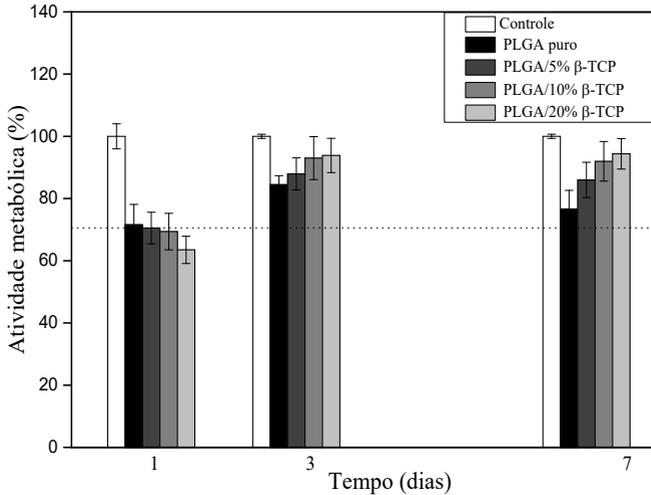
Figura 34 - Valores de pH da solução de PBS durante o teste de degradação *in vitro*. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média em triplicata e comparados através da análise de variância one-way (ANOVA) seguida pelo teste Tukey, considerando-os estatisticamente diferentes quando  $p \leq 0,05$ .



Fonte: Desenvolvido pela Autora

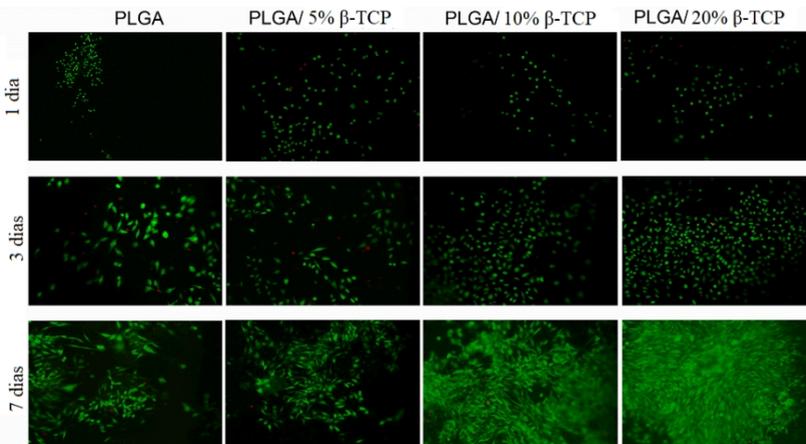
Os ensaios de atividade metabólica (Figura 35) e viabilidade celular *Live/Dead*® dos fibroblastos L929 (Figura 36) foram realizados com o intuito de investigar o comportamento dessas células em contato com a superfície das membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA/ $\beta$ -TCP, em relação a citotoxicidade, adesão e proliferação celular. Os testes foram realizados com fibroblastos de tecido conectivo de camundongo (linhagem L929), após 1, 3 e 7 dias de cultivo. Foi possível observar que a partir do 3º dia de cultura, a atividade metabólica aumentou com o aumento da fração mássica de  $\beta$ -TCP em relação a membrana de PLGA puro. Após esse período, a atividade metabólica manteve-se praticamente constante até o 7º dia, apresentando uma boa adesão e proliferação dos fibroblastos. Além disso, os resultados de atividade metabólica a partir do 3º dia encontram-se acima de 70% (linha pontilhada), indicando a não citotoxicidade das membranas. O teste de viabilidade celular (Figura 36) apresentou o aumento da aderência, propagação e proliferação das células fibroblásticas (L929) com o aumento da fração mássica de  $\beta$ -TCP em relação as membranas eletrofiadas de PLGA puro. Estes resultados demonstraram a ótima viabilidade celular destas células aderidas sobre as membranas.

Figura 35 - Atividade metabólica realizada com fibroblastos (L929). Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média em triplicata e comparados através da análise de variância one-way (ANOVA) seguida pelo teste Tukey, considerando-os estatisticamente diferentes quando  $p \leq 0,05$ .



Fonte: Desenvolvido pela Autora

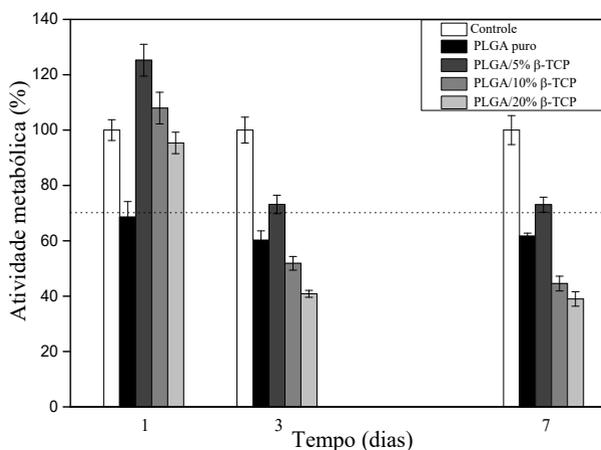
Figura 36 - Viabilidade dos fibroblastos (L929), utilizando o kit *Live/Dead*®. Em verde podem ser visualizadas as células viáveis e em vermelho as células mortas.



Fonte: Desenvolvido pela Autora.

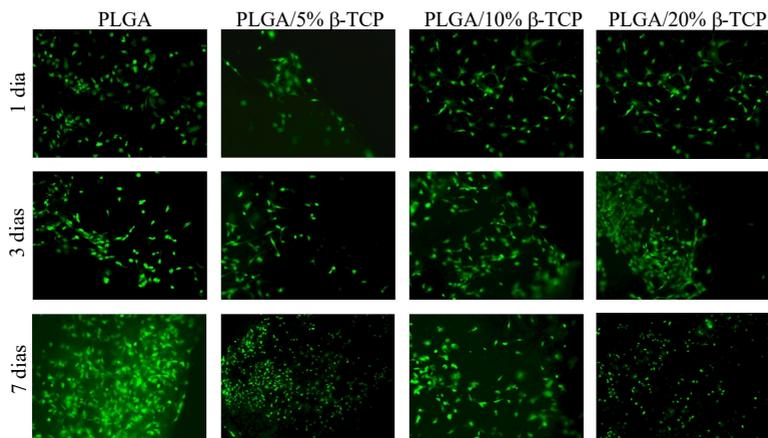
Os ensaios de atividade metabólica e viabilidade celular dos osteoblastos MC3T3 foram realizados com o intuito de investigar o comportamento dessas células em contato com a superfície das membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA/ $\beta$ -TCP, em relação a osseointegração e osteocondução, através da adesão e proliferação. A adesão celular é um comportamento celular importante, visto que afeta diretamente na proliferação e na osteogênese (KHOJASTEH et al., 2016) (ORTOLANI et al., 2015). As Figura 37 e 38 apresentam a atividade metabólica e viabilidade celular de osteoblastos MC3T3, após 1, 3 e 7 dias de cultivo. Pela análise da atividade metabólica, constata-se que todas as membranas não apresentaram citotoxicidade. Os osteoblastos apresentaram uma redução na atividade metabólica e na viabilidade celular no 3º dia de cultura, em comparação com o 1º dia, mantendo-se praticamente constante até o 7º dia. Pode-se observar que, apesar da redução da atividade metabólica e viabilidade celular no 3º dia, os resultados foram satisfatórios. A membrana de PLGA/5%  $\beta$ -TCP apresentou desempenho superior às demais, seguida pela membrana de PLGA puro e PLGA/10%  $\beta$ -TCP. Esse resultado indica que a fração mássica de 5%  $\beta$ -TCP apresentou a melhor adesão de osteoblastos em detrimento as demais frações mássicas de  $\beta$ -TCP.

Figura 37 - Atividade metabólica de células osteoblásticas (MC3T3). Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média em triplicata e comparados através da análise de variância one-way (ANOVA) seguida pelo teste Tukey, considerando-os estatisticamente diferentes quando  $p \leq 0,05$ .



Fonte: Desenvolvido pela Autora.

Figura 38 - Viabilidade das células osteoblásticas (MC3T3), utilizando o kit *Live/Dead*®. Em verde podem ser visualizadas as células viáveis e em vermelho as células mortas.



Fonte: Desenvolvido pela Autora.

## 5 CONCLUSÃO

A partir do estudo realizado nessa dissertação, foi possível determinar a concentração mássica polimérica e os parâmetros de processos mais adequados na obtenção de membranas eletrofiadas de PLGA puro, sem defeitos e uniformes. Conclui-se que a morfologia das membranas de PLGA é influenciada por todos esses parâmetros, com efeito mais pronunciado na concentração mássica polimérica.

A incorporação de diferentes frações mássicas de  $\beta$ -TCP não alterou a uniformidade da fibra, no entanto, aumentou a presença de aglomerados para maiores frações mássicas de  $\beta$ -TCP. Foi constatado que o aumento da fração mássica de  $\beta$ -TCP direcionou a redução do diâmetro da fibra e, conseqüentemente, aumentou a área de superfície da fibra. Foi possível o desenvolvimento de membranas PLGA/ $\beta$ -TCP com tamanhos de poros e porosidade (%) aceitáveis para a ROG, viabilizando a penetração superficial de fibroblastos, a troca de gases e de nutrientes.

A presença de  $\beta$ -TCP não alterou a condutividade iônica da solução, assim como não alterou a hidrofiliçidade, analisada pelo ângulo de contato. No entanto, através do ensaio de absorção, a membrana de PLGA/5% $\beta$ -TCP apresentou maiores valores de absorção em relação as demais, indicando o aumento da hidrofiliçidade para essa fração mássica de  $\beta$ -TCP.

A estabilidade térmica das membranas aumentou brandamente com a adição de 5 e 10% de  $\beta$ -TCP. Porém, não foram observadas alterações significativas na  $T_g$  e  $T_m$  com a adição de  $\beta$ -TCP.

A partir da análise termodinâmica-mecânica conclui-se que a adição de  $\beta$ -TCP aumentou o módulo de armazenamento e reduziu os valores de  $\tan \delta$ , com melhores resultados para as membranas PLGA/5%  $\beta$ -TCP e PLGA/10%  $\beta$ -TCP. Através dos ensaios de tração também foi constatado o aumento das propriedades mecânicas, como o com aumento na tensão de ruptura, no módulo de elasticidade e na deformação, para membranas com 5 e 10% de  $\beta$ -TCP. No entanto, em ambas análises a membrana de PLGA/20%  $\beta$ -TCP apresentou redução nas propriedades mecânicas, devido à presença de aglomerados de  $\beta$ -TCP que reduzem a resistência mecânica.

A degradação das membranas de PLGA puro e PLGA/  $\beta$ -TCP não foi confirmada no período de 28 dias, apresentando um ganho de massa devido a formação de cristais de PBS. Assim, as membranas indicam potencial para proteger o defeito ósseo sem perder sua integridade física.

A partir das análises dos testes *in vitro*, todas as membranas foram comprovadas como não citotóxicas, tanto para as células fibroblásticas

(L929) quanto para as osteoblásticas (MC3T3). Ademais, através dos resultados de atividade metabólica e viabilidade celular, conclui-se que o aumento da fração mássica de  $\beta$ -TCP favoreceu a adesão e proliferação de células fibroblásticas. Enquanto para a linhagem de células osteoblásticas, as membranas de PLGA/5%  $\beta$ -TCP apresentaram a melhor resposta celular, oferecendo condições satisfatórias para a integração tecidual na interface para aplicação em ROG.

Dentro deste contexto, a partir dos resultados apresentados, conclui-se que foi possível desenvolver membranas eletrofiadas de PLGA/ $\beta$ -TCP com microestrutura, propriedades mecânicas e biológicas apropriadas para serem utilizadas na Regeneração Óssea Guiada. Dentre as composições avaliadas, a membrana de PLGA/5%  $\beta$ -TCP exibe propriedades mais satisfatórias para serem utilizadas na aplicação proposta.

## 5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Otimizar a dispersão de  $\beta$ -TCP nas fibras.
- Repetir o ensaio BET para verificar em triplicata a área de superfície das membranas.
- Realizar ensaio de tração pelo ensaio DMA.
- Realizar degradação *in vitro* no mínimo 4 meses, para verificar o tempo de meia vida e a influência do  $\beta$ -TCP no pH do meio.
- Caracterizar o polímero por reometria (massa molar) e acompanhar a redução da massa molar com o teste de degradação.
- Realizar teste de penetração de fibroblastos.
- Repetir testes *in vitro* e verificar adesão com o auxílio do MEV.
- Realizar um estudo das membranas com adição de colágeno ou quitosana com foco na adesão celular.
- Realizar um estudo de uma membrana bicamada.

## 6 REFERÊNCIA

ALBEE, F. H. Studies in Bone Growth: Triple calcium phosphate as a stimulus to osteogenesis. **Annals of surgery**, v. 71, p. 32–39, 1920.

ARBEZ, B.; LIBOUBAN, H. Behavior of macrophage and osteoblast cell lines in contact with the  $\beta$ -TCP biomaterial (beta-tricalcium phosphate). **Morphologie**, v. 302, p. 10, 2017.

AVGOUSTAKIS, K. Polylactic - co - Glycolic Acid ( PLGA ). **Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering**, p. 1–11, 2005.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 1, p. 13–21, 2005.

BAUMGARTEN, P. K. Electrostatic spinning of acrylic microfibers. **Journal of Colloid And Interface Science**, v. 36, n. 1, p. 71–79, 1971.

BEHRING, J. et al. Toward guided tissue and bone regeneration: Morphology, attachment, proliferation, and migration of cells cultured on collagen barrier membranes. A systematic review. **Odontology**, v. 96, p. 1–11, 2008.

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

BRUNEL, G. et al. Guided bone regeneration for immediate non - submerged implant placement using bioabsorbable materials in Beagle dogs. **Clinical oral implants research**, v. 9, n. 5, p. 303–312, 1998.

CASPER, C. L. et al. Controlling surface morphology of electrospun polystyrene fibers: Effect of humidity and molecular weight in the electrospinning process. **Macromolecules**, v. 37, n. 2, p. 573–578, 2004.

CASTILLO-DALI, G. et al. Reliability of new poly (lactic - co - glycolic acid) membranes treated with oxygen plasma plus silicon dioxide layers for pre - prosthetic guided bone regeneration processes. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**, n. February, p. 1–9, 2017.

CHAAIR, H.; LABJAR, H.; BRITEL, O. Synthesis of  $\beta$ -tricalcium phosphate. **Morphologie**, v. 313, p. 5, 2017.

CHEN, C. I. et al. Development of the reversible PGA immobilization by using the immobilized metal ion affinity membrane. **Journal of Membrane Science**, v. 401–402, p. 33–39, 2012.

CHEN, S. et al. Biodegradable electrospun PLLA/chitosan membrane as guided tissue regeneration membrane for treating periodontitis. **Journal of Materials Science**, v. 48, p. 6567–6577, 2013.

CHEN, Z.; MO, X.; QING, F. Electrospinning of collagen - chitosan complex. **Materials Letters**, v. 61, p. 3490–3494, 2007.

CHEW, S. et al. The Role of Electrospinning in the Emerging Field of Nanomedicine. **Current Pharmaceutical Design**, v. 12, n. 36, p. 4751–4770, 2006.

CHONG, E. J. et al. Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution. **Acta Biomaterialia**, v. 3, p. 321–330, 2007.

CORRÊA, R. U. **Synthesis of mineral  $\beta$ -triphosphate of calcium for biomaterials appliance**, 2008.

DAHLIN, C. et al. **Healing of bone defects by guided tissue regeneration** **Plast Reconstr Surg**, 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3362985>>

DEITZEL, J. . et al. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. **Polymer**, v. 42, p. 261–272, 2001.

DEWAIR, M.; BAUR, X.; ZIEGLER, K. Use of immunoblot technique for detection of human IgE and IgG antibodies to individual silk proteins. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 76, p. 537–542, 1985.

DEYOUNG, M. B. et al. Encapsulation of Exenatide in Poly( D,L-Lactide-co-Glycolide) Microspheres Produced an Investigational Long-Acting Once-Weekly Formulation for Type 2 Diabetes. **Diabetes Technology & Therapeutics**, v. 13, n. 11, p. 1145–1154, 2011.

DOROZHKIN, S. V. Bioceramic of calcium orthophosphates. **Biomaterials**, v. 31, p. 1465–1485, 2010.

DUTRA MESSIAS, A.; ARAGONES, A.; APARECIDA DE REZENDE DUEK, E. PLGA-Hydroxyapatite Composite Scaffolds for Osteoblastic-Like Cells. **Key Engineering Materials**, v. 396–398, p. 461–464, 2009.

ENGINEER, C.; PARIKH, J.; RAVAL, A. Review on Hydrolytic Degradation Behavior of Biodegradable Polymers from Controlled Drug Delivery System. **Trends Biomater. Artif. Organs**, v. 25, n. 2, p. 79–85, 2011.

FORMHALS. **Process and apparatus for preparing artificial threads**, 1934.

FU, L. et al. Bilayer poly(lactic - co - glycolic acid)/nano-hydroxyapatite membrane with barrier function and osteogenesis promotion for Guided Bone Regeneration. **Materials**, v. 10, p. 257, 2017.

GANJI, F.; ABDEKHODAIE, M. J. Chitosan - g - PLGA copolymer as a thermosensitive membrane. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p. 740–746, 2010.

GENG, X.; KWON, O. H.; JANG, J. Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution. **Biomaterials**, v. 26, p. 5427–5432, 2005.

GENTILE, P. et al. An overview of poly(lactic- co-glycolic) Acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 3640–3659, 2014.

GOTFREDSEN, K. et al. Evaluation of guided bone generation around implants placed into fresh extraction sockets: An experimental study in dogs. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 51, p. 879–884, 1993.

GOTTLOW, J. Guided tissue regeneration using bioresorbable and non - resorbable devices: initial healing and long - term results. **The Journal of periodontology**, p. 1157–1165, 1993.

GREENSTEIN, G.; CATON, J. G. Biodegradable barriers and guided tissue regeneration. **Periodontology 2000**, v. 1, p. 36–45, 1993.

GUILLAUME, B. Filling bone defects with  $\beta$ -TCP in maxillofacial surgery: A review. **Morphologie**, p. 1–7, 2017.

HAIDER, A.; HAIDER, S.; KANG, I. K. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. **Arabian Journal of Chemistry**, 2015.

HOHMAN, M. M. et al. Electrospinning and electrically forced jets. II. Applications. **Physics of Fluids**, v. 13, n. 8, p. 2221–2236, 2001.

JI, W. et al. Biocompatibility and degradation characteristics of PLGA - based electrospun nanofibrous scaffolds with nanoapatite incorporation. **Biomaterials**, v. 33, p. 6604–6614, 2012.

JUNG, R. E. et al. Guided bone regeneration with a synthetic biodegradable membrane: A comparative study in dogs. **Clinical Oral Implants Research**, v. 22, p. 802–807, 2011.

KHAN, W. S. et al. Chemical and thermal investigations of electrospun polyacrylonitrile nanofibers incorporated with various nanoscale inclusions. **Journal of Thermal Engineering**, v. 3, n. 4, 2017.

KHOJASTEH, A. et al. Development of PLGA-coated  $\beta$  -TCP scaffolds containing VEGF for bone tissue engineering. **Materials Science & Engineering C**, v. 69, p. 780–788, 2016.

KIM, K. H. et al. Biological efficacy of silk fibroin nanofiber membranes for guided bone regeneration. **Journal of Biotechnology**, v. 120, p. 327–339, 2005.

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

KUMTA, P. N. et al. Nanostructured calcium phosphates for biomedical applications: novel synthesis and characterization. **Acta Biomaterialia**, v. 1, p. 65–83, 2005.

KWON, S.-H. et al. Synthesis and dissolution behavior of  $\beta$  - TCP and HA/ $\beta$  -TCP composite powders. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 23, p. 1039–1045, 2003.

LASPRILLA-BOTERO, J.; ÁLVAREZ-LÁINEZ, M.; LAGARON, J. M. The influence of electrospinning parameters and solvent selection on

the morphology and diameter of polyimide nanofibers. **Materials Today Communications**, v. 14, p. 1–9, 2018.

LEGEROS, R. Z. Properties of osteoconductive biomaterials: Calcium phosphates. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 395, n. 395, p. 81–98, 2002.

LIU, J.; KERNS, D. G. Mechanisms of Guided Bone Regeneration : A Review. **The Open Dentistry Journal**, v. 8, p. 56–65, 2014.

LIVERANI, L.; BOCCACCINI, A. Versatile Production of Poly(Epsilon-Caprolactone) Fibers by Electrospinning Using Benign Solvents. **Nanomaterials**, v. 6, p. 75, 2016.

LU, S. et al. A novel silk fibroin nanofibrous membrane for guided bone regeneration: a study in rat calvarial defects. **American Journal of Translational Research**, v. 7, n. 11, p. 2244–2253, 2015.

MA, Z.; KOTAKI, M.; RAMAKRISHNA, S. Electrospun cellulose nanofiber as affinity membrane. **Journal of Membrane Science**, v. 265, p. 115–123, 2005.

MACIEJEWSKI, M. et al. Phase transitions in amorphous calcium phosphates with different Ca/P ratios. **Thermochimica Acta**, v. 468, p. 75–80, 2008.

MAKADIA, H. K.; SIEGEL, S. J. Poly Lactic - co - Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. **Polymers**, v. 3, p. 1377–1397, 2011.

MANEE-IN, J.; NITHITANAKUL, M.; SUPAPHOL, P. Effects of Solvent Properties, Solvent System, Electrostatic Field Strength , and Inorganic Salt Addition on Electrospun Polystyrene Fibres. **Polymer Journal**, v. 15, n. 4, p. 341–354, 2006.

MASOUDI, M. et al. Fabrication and characterization of two-layered nano fibrous membrane for guided bone and tissue regeneration application. **Materials Science & Engineering C**, v. 80, p. 75–87, 2017.

MASOUDI RAD, M. et al. Fabrication and characterization of two-layered nanofibrous membrane for guided bone and tissue regeneration application. **Materials Science and Engineering C**, v. 80, p. 75–87, 2017.

MATTHEWS, J. A. et al. Electrospinning of collagen nanofibers. **Biomacromolecules**, v. 3, p. 232–238, 2002.

MEGELSKI, S. et al. Micro - and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers. **Macromolecules**, v. 35, n. 22, p. 8456–8466, 2002.

MENG, Z. X. et al. Fabrication of mineralized electrospun PLGA and PLGA /gelatin nanofibers and their potential in bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, p. 699–706, 2013.

MERLINI, C. Desenvolvimento De Membranas Eletrofiadas De Poli (Fluoreto De Vinilideno) Com Polipirrol Para Aplicação Em Sensores De Compressão. p. 171, 2014.

MILLER, R. A.; BRADY, J. M.; CUTRIGHT, D. E. Degradation rates of oral resorbable implants (polylactates and polyglycolates): Rate modification with changes in PLA/PGA copolymer ratios. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 11, p. 711–719, 1977.

MO, Y. et al. Preparation and properties of PLGA nanofiber membranes reinforced with cellulose nanocrystals. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 132, p. 177–184, 2015.

MOHAMMADIAN, M.; HAGHI, A. K. Systematic parameter study for nano - fiber fabrication via electrospinning process. **Bulgarian Chemical Communications**, v. 46, p. 6128–6134, 2005.

MOHAMMADZADEHMOGHADAM, S. et al. **Electrospinning: Current Status and Future Trends**. [s.l: s.n.].

OHGO, K. et al. Preparation of non - woven nanofibers of Bombyx mori silk, Samia cynthia ricini silk and recombinant hybrid silk with electrospinning method. **Polymer**, v. 44, p. 841–846, 2003.

ORTOLANI, E. et al. Mechanical qualification of collagen membranes used in dentistry. **Ann Ist Super Sanità**, v. 51, n. 3, p. 229–235, 2015.

PAN, Z.; DING, J. Poly(lactide-co-glycolide) porous scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. **Interface focus**, v. 2, p. 366–377, 2012.

PANG, L. et al. Surface modification of PLGA /  $\beta$  -TCP scaffold for bone tissue engineering : Hybridization with collagen and apatite. v. 201, p. 9549–9557, 2007.

PARK, J. et al. Fabrication and characterization of 3D-printed bone-like  $\beta$ -tricalcium phosphate/polycaprolactone scaffolds for dental tissue engineering. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 46, p. 175–181, 2017.

PARK, Y. M. et al. Preparation of whisker-shaped hydroxyapatite/ $\beta$ -tricalcium phosphate composite. **Materials Chemistry and Physics**, v. 109, p. 440–447, 2008.

PHAM, Q. P.; SHARMA, U.; MIKOS, A. G. Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review. **Tissue Engineering**, v. 12, n. 5, 2006.

QI, H. et al. Bioactivity assessment of PLLA/PCL/HAP electrospun nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering. **Life Sciences**, v. 148, p. 139–144, 2016.

RACHADEL, P. Desenvolvimento de membranas eletrofiadas de poli (ácido láctico) com montmorilonita/polipirrol. 2017.

RAKHMATIA, Y. D. et al. Current barrier membranes: Titanium mesh and other membranes for guided bone regeneration in dental applications. **Journal of Prosthodontic Research**, v. 57, p. 3–14, 2013.

REN, K. et al. Electrospun PCL/gelatin composite nanofiber

structures for effective guided bone regeneration membranes. **Materials Science and Engineering C**, v. 78, p. 324–332, 2017.

RETZEPI, M.; DONOS, N. Guided Bone Regeneration: biological principle and therapeutic applications. **Clinical Oral Implants Research**, v. 21, p. 567–576, 2010.

ROH, H. et al. In vitro study of 3D PLGA / n-HAp /  $\beta$  - TCP composite scaffolds with etched oxygen plasma surface modification in bone tissue engineering. **Applied Surface Science**, v. 388, p. 321–330, 2016.

SAARANI, N. et al. Antibacterial efficacy of triple-layered poly (lactic - co - glycolic acid) / nanoapatite / lauric acid guided bone regeneration membrane on periodontal bacteria. **Dental Materials Journal** 2017, p. 1–6, 2017.

SADEGHI, A. R. et al. Surface modification of electrospun PLGA scaffold with collagen for bioengineered skin substitutes. **Materials Science & Engineering C**, v. 66, p. 130–137, 2016.

SAI NIEVETHITHA, S. et al. Nanoceramics on osteoblast proliferation and differentiation in bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 67–74, 2017.

SAM, G.; MADHAVAN PILLAI, B. R. Evolution of barrier membranes in periodontal regeneration- “Are the third generation membranes really here?” **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 8 (12), p. 14–17, 2014.

SANDBERG, E.; DAHLIN, C.; LINDE, A. Bone regeneration by the osteopromotion technique using bioabsorbable membranes: An experimental study in rats. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, p. 1106–1114, 1993.

SANTOS, D. et al. Multifunctional PLLA-ceramic fiber membranes for bone regeneration applications. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 504, p. 101–110, 2017.

SCHAEFER, S. et al. How degradation of calcium phosphate bone substitute materials is influenced by phase composition and porosity. **Advanced Engineering Materials**, v. 13, n. 4, p. 342–350, 2011.

SELVIG, K. A et al. Regenerative surgery of intrabony periodontal defects using e-PTFE barrier membranes: scanning electron microscopic evaluation of retrieved membranes versus clinical healing. **The Journal of periodontology**, v. 63, n. 12, p. 974–978, 1992.

SHEIKH, Z. et al. Mechanisms of in vivo degradation and resorption of calcium phosphate based biomaterials. **Materials**, v. 8, p. 7913–7925, 2015.

SILL, T. J.; VON RECUM, H. A. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. **Biomaterials**, v. 29, p. 1989–2006, 2008.

SILVEIRA, A. Fabricação de membranas de poliuretano

termoplástico (TPU) e aditivos condutores à base de polipirrol (PPy) a partir do processo de eletrofição. p. 114, 2016.

SIMION, M. et al. A preliminary report on a method for studying the permeability of expanded polytetrafluoroethylene membrane to bacteria in vitro: a scanning electron microscopic and histological study. **J.Periodontol.**, v. 65, n. 8, p. 755–761, 1994.

SONG, X. et al. Electrospun hydroxyapatite grafted poly(L-lactide)/poly(lactic - co - glycolic acid) nanofibers for guided bone regeneration membrane. **Composites Science and Technology**, v. 79, p. 8–14, 2013.

STACHEWICZ, U. et al. 3D imaging of cell interactions with electrospun PLGA nanofiber membranes for bone regeneration. **Acta Biomaterialia**, v. 27, p. 88–100, 2015.

STANKUS, J. J.; GUAN, J.; WAGNER, W. R. Fabrication of biodegradable elastomeric scaffolds with sub - micron morphologies. **Journal of Biomedical Materials Research**, p. 603–614, 2004.

SUPAPHOL, P.; MIT-UPPATHAM, C.; NITHITANAKUL, M. Ultrafine electrospun polyamide - 6 fibers: Effect of solution conditions on morphology and average fiber diameter. **Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics**, p. 2327–2338, 2004.

SURINDAR, B. N. et al. Biodegradable ceramic implants in bone: electron and light microscopic analysis. **Oral Surg**, v. 32, n. 2, p. 336–46, 1971.

TAYLOR, G. Electrically driven jets. **Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, p. 453–475, 1969.

TAYLOR, P.; FANG, X.; RENEKER, D. H. DNA Fibers by Electrospinning. **Journal of Macromolecular Science**, p. 169–173, 1997.

TEODORA, A. et al. Synthesis, Characterization, and Study of PLGA Copolymer in Vitro Degradation. **Scientific Research Publishing**, v. 6, p. 8–19, 2015.

VERT, M. Degradable, Biodegradable and Bioresorbable Polymers for Time-limited Therapy. p. 1–14, 1935.

WNEK, G. E. et al. Electrospinning of nanofiber fibrinogen structures. **Nano Letters**, v. 3, n. 2, p. 213–216, 2003.

WU, X. S.; WANG, N. Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers. Part II: Biodegradation. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 12, n. 1, p. 21–34, 2001.

YANG, C. et al. A facile electrospinning method to fabricate polylactide/graphene/MWCNTs nanofiber membrane for tissues scaffold. **Applied Surface Science**, v. 362, p. 163–168, 2016.

YANG, Y. et al. In vitro degradation of porous poly (L - lactide - co -

glycolide)/ $\beta$  - tricalcium phosphate (PLGA /  $\beta$  - TCP) scaffolds under dynamic and static conditions. **Polymer Degradation and Stability**, v. 93, p. 1838–1845, 2008.

YARIN, A. L.; KOOMBHONGSE, S.; RENEKER, D. H. Bending instability in electrospinning of nanofibers. **Journal of Applied Physics**, v. 89, n. 5, p. 3018–3026, 2001.

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

ZHANG, E. et al. Electrospun PDLA/PLGA composite membranes for potential application in guided tissue regeneration. **Materials Science and Engineering C**, v. 58, p. 278–285, 2016.

ZHAO, W. et al. Fabrication of functional PLGA-based electrospun scaffolds and their applications in biomedical engineering. **Materials Science & Engineering C**, v. 59, p. 1181–1194, 2016.

ZHOU, Y.; WU, C.; XIAO, Y. The stimulation of proliferation and differentiation of periodontal ligament cells by the ionic products from bioceramics. **Acta Biomaterialia**, v. 8, p. 2307–2316, 2012.

## APÊNDICE A Análise da Variância (ANOVA) para a influência da tensão elétrica (kV) aplicada no processo na distribuição de diâmetros (nm) das fibras de PLGA puro

As médias diferem?

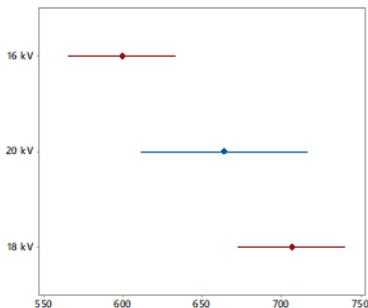


As diferenças entre as médias são significativas ( $p < 0,05$ )

Quais médias diferem?

Amostra	Diferem de
1 16 kV	3
2 20 kV	
3 18 kV	1

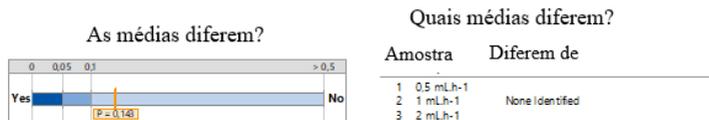
Carta de comparação de médias



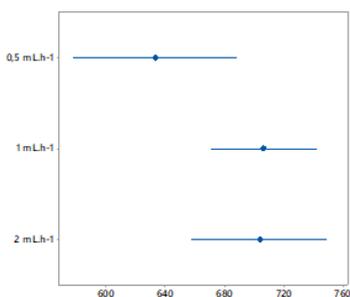
Amostra	Tamanho da amostra	Estatísticas		Intervalo de confiança 95%
		Média	Desvio Padrão	
16 kV	50	599,43	143,29	(558,71; 640,15)
18 kV	50	706,13	142,39	(665,66; 746,60)
20 kV	50	663,75	214,23	(602,87; 724,63)

Fonte: Desenvolvido pela Autora.

## APÊNDICE B - Análise da Variância (ANOVA) para a influência da vazão de alimentação na distribuição de diâmetros (nm) das fibras de PLGA puro



Carta de comparação de médias



Amostra	Tamanho da amostra	Estatísticas		Intervalo de confiança 95%
		Média	Desvio Padrão	
0,5 mL.h-1	50	633,31	226,55	(568,93; 697,69)
1 mL.h-1	50	706,13	142,39	(665,66; 746,60)
2 mL.h-1	50	703,15	193,99	(648,02; 758,28)

Fonte: Desenvolvido pela Autora.

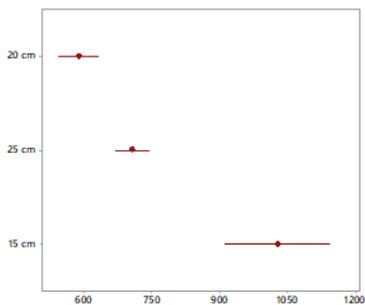
## APÊNDICE C - Análise da Variância (ANOVA) para a influência da distância agulha/coletor (cm) na distribuição de diâmetros (nm) das fibras de PLGA.

As médias diferem?



Amostra	Diferem de
1 20 cm	2 3
2 25 cm	1 3
3 15 cm	1 2

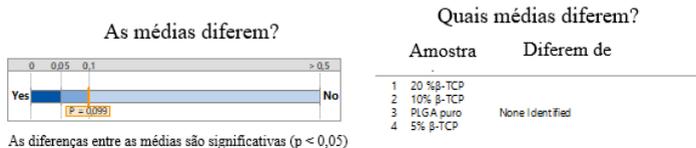
Carta de comparação de médias



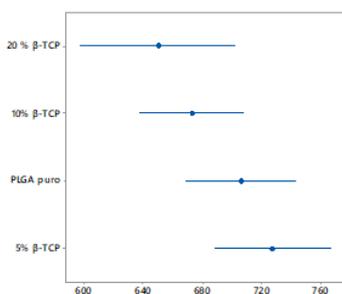
Amostra	Tamanho da amostra	Estatísticas		Intervalo de confiança 95%
		Média	Desvio Padrão	
15 cm	50	1027,9	433,09	(904,84; 1151,0)
20 cm	50	586,94	204,18	(528,91; 644,96)
25 cm	50	706,13	142,39	(665,66; 746,60)

Fonte: Desenvolvido pela Autora.

**APÊNDICE D** - Análise da Variância (ANOVA) para a influência das diferentes frações mássicas de  $\beta$ -TCP na distribuição de diâmetros (nm) das fibras de PLGA.



Carta de comparação de médias



Amostra	Tamanho da amostra	Estatísticas		Intervalo de confiança 95%
		Média	Desvio Padrão	
PLGA puro	50	706,13	142,39	(665,66; 746,60)
5% $\beta$ -TCP	50	727,07	150,51	(684,29; 769,84)
10% $\beta$ -TCP	50	672,90	134,18	(634,76; 711,03)
20 % $\beta$ -TCP	50	649,94	196,14	(594,20; 705,68)

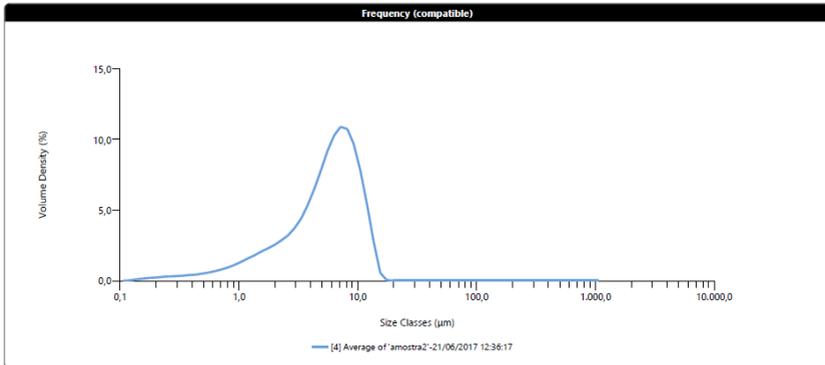
Fonte: Desenvolvido pela Autora.

## ANEXO 1 – Distribuição do tamanho de partículas de β-TCP.

Measurement Details	
Sample Name Average of 'amostra2'	Measurement Date Time 21/06/2017 12:36:17
Operator Name UFSC	Analysis Date Time 21/06/2017 12:36:17
SOP File Name HydroEV.ctg	Result Source Averaged

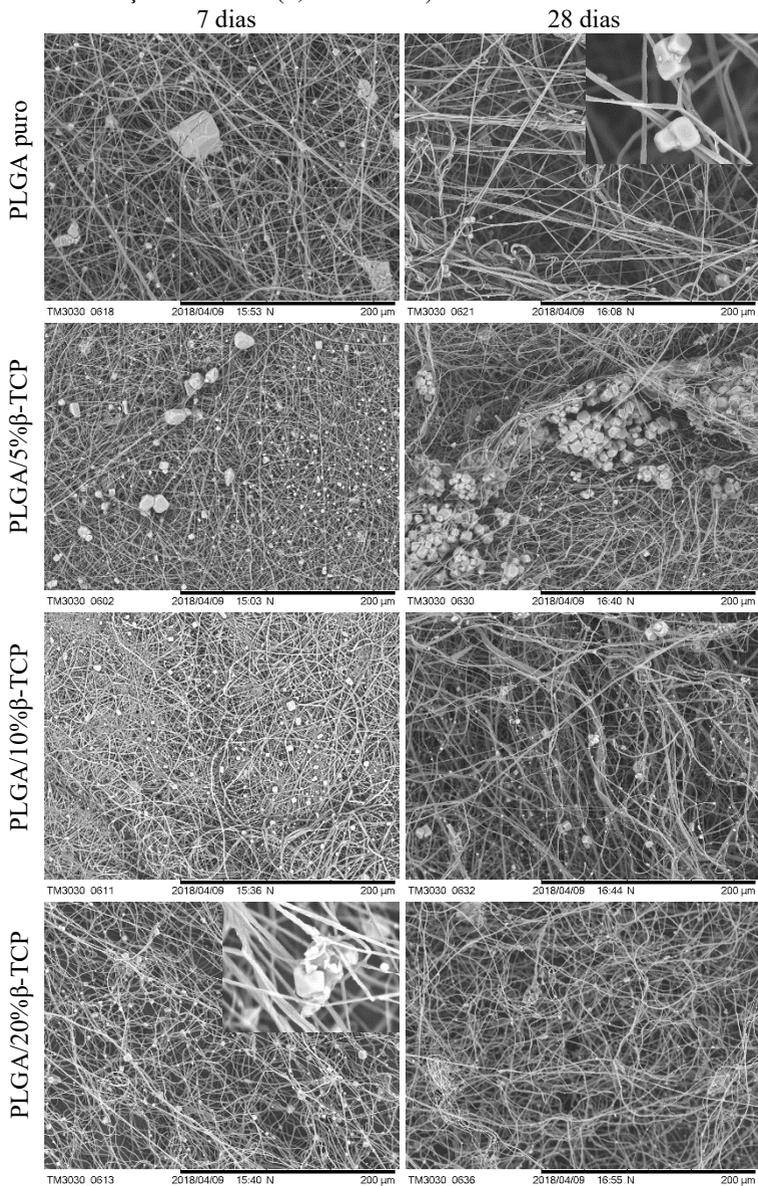
Analysis	
Particle Name [BROWSE]	Particle Refractive Index 2,200
Dispersant Name Ethanol	Dispersant Refractive Index 1,360
Particle Absorption Index 0,100	Laser Obscuration 10,12 %
Weighted Residual 2,27 %	Scattering Model Fraunhofer
Analysis Model General Purpose	Analysis Sensitivity Normal

Result	
Concentration 0,0040 %	Span 1,583
Uniformity 0,481	Result Units Volume
Specific Surface Area 2140 m <sup>2</sup> /kg	Dv (10) 1,45 μm
D [3:2] 2,80 μm	Dv (50) 5,77 μm
D [4:3] 5,93 μm	Dv (90) 10,6 μm



Size (μm)	% Volume In												
0.0995	0.00	0.405	0.36	1.65	1.92	6.72	9.13	27.4	0.00	111	0.00	454	0.00
0.113	0.00	0.461	0.41	1.88	2.13	7.64	9.01	31.1	0.00	127	0.00	516	0.00
0.128	0.08	0.523	0.47	2.13	2.36	8.68	8.13	35.3	0.00	144	0.00	586	0.00
0.146	0.12	0.594	0.56	2.42	2.66	9.86	6.53	40.1	0.00	163	0.00	666	0.00
0.166	0.16	0.675	0.66	2.75	3.07	11.2	4.46	45.6	0.00	186	0.00	756	0.00
0.188	0.19	0.767	0.79	3.12	3.65	12.7	2.33	51.8	0.00	211	0.00	859	0.00
0.214	0.21	0.872	0.95	3.55	4.42	14.5	0.31	58.9	0.00	240	0.00	976	0.00
0.243	0.24	0.991	1.12	4.03	5.40	16.4	0.00	66.9	0.00	272	0.00	1110	0.00
0.276	0.26	1.13	1.31	4.58	6.52	18.7	0.00	76.0	0.00	310	0.00		
0.314	0.29	1.28	1.51	5.21	7.65	21.2	0.00	86.4	0.00	352	0.00		
0.357	0.32	1.45	1.72	5.92	8.60	24.1	0.00	98.1	0.00	400	0.00		

**ANEXO 2** – Micrografias MEV apresentando os cristais de PBS formados durante o ensaio de degradação em 7 e 28 dias nas membranas de PLGA contendo diferentes frações mássicas (5,10 e 20 m%). Aumento de 500 x e 5000 x.



Fonte: Desenvolvido pela Autora.