

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS**

Déborah dos Santos Gomes

***SCAFFOLDS* HÍBRIDOS NANOFIBRILARES DE PLA/PEG/FOSFATO DE CÁLCIO
PRODUZIDOS POR SOLUTION BLOW SPINNING**

Campina Grande – PB

2019

Déborah dos Santos Gomes

**SCAFFOLDS HÍBRIDOS NANOFIBRILARES DE PLA/PEG/FOSFATO DE CÁLCIO
PRODUZIDOS POR SOLUTION BLOW SPINNING**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais como requisito parcial à obtenção do título de **Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais**.

Orientador: Prof. Dr. Romualdo Rodrigues Menezes

Agência Financiadora: CAPES

Campina Grande – PB

2019

G633s Gomes, Déborah dos Santos.
Scaffolds híbridos nanofibrilares de PLA/PEG/fosfato de cálcio produzidos por *solution blow spinning* / Déborah dos Santos Gomes. – Campina Grande, 2019.
84 f.: il. color.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais)
– Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2019.
"Orientação: Prof. Dr. Romualdo Rodrigues Menezes".
Referências.

1. Fosfato de cálcio. 2. Scaffolds. 3. Nanofibras. I. Menezes, Romualdo Rodrigues. II. Título.

CDU 661.635.41(043)

VITAE

- Engenheira de Materiais pela Universidade Federal de Campina Grande - UFCG (2016).

SCAFFOLDS HÍBRIDOS NANOFIBRILARES DE PLA/PEG/FOSFATO DE
CÁLCIO PRODUZIDOS POR SOLUTION BLW SPINNING

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciência e
Engenharia de Materiais como requisito
parcial à obtenção do título de **Mestre
em Ciência e Engenharia de
Materiais**.

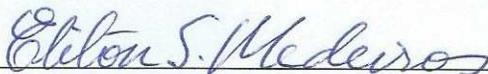
Aprovado em: 22/02/2019



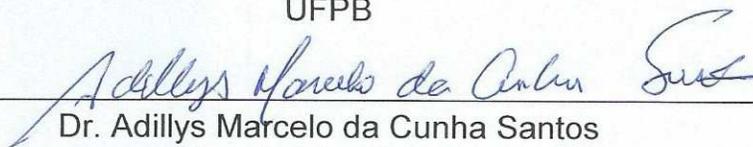
Dr. Romualdo Rodrigues Menezes
Orientador
PPG-CEMat/UAEMa/UFCG



Dr.^a Suédina Maria de Lima Silva
Examinadora Interna
PPG-CEMat/UAEMa/UFCG



Dr. Eliton Souto de Medeiros
Examinador Externo
UFPB



Dr. Adillys Marcelo da Cunha Santos
Examinador Externo
UAEMA/PNPD/CAPES/UFCG

Aos meus pais Cícero e Teresinha
e aos meus irmãos Danielle e Danilo.

Porque família é tudo!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente sou grata à Deus, por todo amor e pelas graças que são derramadas em minha vida. Pois, na certeza de que o Seu amor me guia, eu conseguirei alçar grandes vôos. A minha mãezinha, Maria, por me acolher em seu colo, me proteger com seu manto sagrado e por interceder pelos sonhos plantados no meu coração.

A toda minha família pelo apoio e confiança que sempre depositaram em mim, principalmente a minha mãe, Teresinha, que é mulher digna e honesta, que apesar das dificuldades, na humildade do nosso lar, lutou para oferecer-me uma boa qualidade de estudo, sendo ela minha fortaleza e meu maior exemplo; ao meu pai, Cícero; meus irmãos: Danielle, Danilo, Tayrone e Laila; e meu sobrinho Ícaro. Obrigado por estarem ao meu lado em todas as minhas conquistas e por sempre me motivarem a ir mais longe. Vocês são o sentido da minha vida, eu amo vocês!

As minhas famílias em Cristo, que são presentes enviados por Deus para tornar minha caminhada mais leve. Em especial, ao JFive e aos seminaristas Jefferson Barbosa e Joseque Borges, que sempre me fazem perceber o quanto sou capaz, além de ajudarem no meu crescimento espiritual.

Aos meus amigos, agradeço por toda amizade, compreensão e paciência com minha ausência.

Aos amigos do LTM – Laboratório de Tecnologia e Materiais, em especial ao Dr. Prof. Romualdo Rodrigues Menezes, pela orientação e contribuição na minha formação desde 2013, sempre dispondo de confiança e paciência. Ao Dr. Adillys Marcelo da Cunha Santos, por sua amizade, disponibilidade e auxílio para o desenvolvimento dessa pesquisa. Além de todos que compõem o grupo de fibras, pela troca de conhecimento, ajuda e amizade durante esses dois anos.

Ao Prof. Dr. Eliton Souto de Medeiros, Prof^ª Dra. Suédina Maria de Lima Silva e Prof^ª Dra. Bianca Viana de Sousa por disponibilizarem laboratórios e equipamentos para realização de testes.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indireta para que eu chegasse até o fim desse mestrado.

RESUMO

Os fosfatos de cálcio têm sido amplamente investigados para aplicação no campo biomédico devido a sua bioatividade e biocompatibilidade. No entanto, a natureza frágil destes materiais limita sua aplicação como *scaffolds* para engenharia de tecidos. Esta característica pode ser superada pelo emprego de materiais híbridos. Assim, o objetivo deste estudo foi produzir *scaffolds* nanofibrilares de poli(ácido láctico)/poli(etileno glicol)/fosfato de cálcio (PLA/PEG/CaP) por meio da técnica de solution blow spinning (SBS). Para a produção das nanofibras de CaP foram utilizados o nitrato de cálcio tetrahidratado e o tri-etil fosfato (TEP) como precursores inorgânicos e uma solução polimérica de polivinilpirrolidona (PVP) como agente fiador. As nanofibras de CaP foram produzidas por SBS, com razão Ca/P igual a 1,67 e 1,1, e calcinadas a 1000°C. Para produção dos *scaffolds*, as nanofibras de CaP foram maceradas e dispersas em solvente dimetilcarbonato (DMC) e em seguida foram adicionados PEG e PLA às soluções para posteriormente serem submetidas ao processo de fiação também por SBS. As concentrações finais de PEG nos *scaffolds* variaram de 20 para 30%. As nanofibras e *scaffolds* produzidos foram caracterizados por difração de raios X (DRX), termogravimetria (TG), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET) e ensaio de bioatividade. Através dos resultados obtidos foi possível notar que para ambas as razões Ca/P houve formação da HAp como fase principal. Entretanto, para a razão Ca/P=1,1 houve formação de uma pequena quantidade de trifosfato de cálcio (β -TCP). Os padrões de difração e os resultados termogravimétricos confirmaram a formação do híbrido orgânico/inorgânico. A análise morfológica dos *scaffolds* mostrou que a adição do PEG, tornou possível a redução de defeitos em sua morfologia. Após ensaios de bioatividade em SBF foi possível observar melhor deposição da camada de apatita na superfície dos *scaffolds* compostos de CaP com razão=1,1, ao longo do tempo de ensaio de 14 dias. Concluindo que foi possível obter *scaffolds* híbridos com estrutura aleatoriamente interligada e altamente porosa, com boa dispersão da carga de CaP, além disso, os *scaffolds* com maior percentual de CaP indicam melhor bioatividade para induzir mineralização de cálcio para regeneração óssea.

Palavras-Chaves: Fosfato de Cálcio. Scaffolds. Engenharia de tecidos. Solution Blow Spinning. Nanofibras.

ABSTRACT

Calcium phosphates have been extensively investigated for application in the biomedical field due to their bioactivity and biocompatibility. However, the brittle nature of these materials limits their application as scaffolds for tissue engineering. This feature can be overcome by the use of hybrid materials. Thus, the objective of this study was to produce nanofibrillary scaffolds of poly (lactic acid) / poly (ethylene glycol) / calcium phosphate (PLA / PEG / CaP) by means of the solution blow spinning technique (SBS). Calcium nitrate tetrahydrate and triethyl phosphate (TEP) were used as inorganic precursors and a polyvinylpyrrolidone (PVP) polymer solution was used as the guiding agent for the production of CaP nanofibers. The CaP nanofibers were produced by SBS, Ca / P ratio equal to 1.67 and 1.1, and calcined at 1000 ° C. To produce the scaffolds, the CaP nanofibers were macerated and dispersed in dimethyl carbonate solvent (DMC) and then PEG and PLA were added to the solutions to be further subjected to the spinning process also by SBS. Final concentrations of PEG in the scaffolds ranged from 20 to 30%. The nanofibers and scaffolds produced were characterized by X-ray diffraction (XRD), thermogravimetry (TG), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM) and transmission (TEM) and bioactivity assay. From the obtained results it was possible to note that for both Ca / P ratios there was formation of HAp as the main phase. However, for Ca / P = 1.1, a small amount of calcium triphosphate (β -TCP) was formed. The diffraction patterns and the thermogravimetric results confirmed the formation of the organic / inorganic hybrid. The morphological analysis of scaffolds showed that the addition of PEG made it possible to reduce defects in their morphology. After bioactivity assays in PBS it was possible to observe a better deposition of the apatite layer on the surface of CaP composite scaffolds with ratio = 1.1, over the 14 day test period. In conclusion, it was possible to obtain hybrid scaffolds with randomly interconnected and highly porous structure with good dispersion of the CaP load, in addition, scaffolds with higher CaP percentage indicate better bioactivity to induce calcium mineralization for bone regeneration.

Keywords: Calcium phosphate. Scaffolds. Tissue engineering. Solution Blow Spinning. Nanofibres.

PUBLICAÇÕES

Gomes, D. S.; Santos, A. M. C.; Neves, G. A.; Menezes, R. R. A brief review on hydroxyapatite production and use in biomedicine. **Cerâmica**. Aceito para publicação.

Gomes, D. S.; Campos, S. G. ; Santos, O. J. S. ; Santos, A. M. C. ; Menezes, R. R. **Fiação por sopro em solução de *scaffolds* fibrosos híbridos polímero/fosfato de cálcio**. In: congresso latino-americano de órgãos artificiais e biomateriais, 2018, João Pessoa, PB - Brasil. 10º COLAOB, 2018.

Gomes, D. S.; Santos, A. M. C.; Menezes, R. R. ***Scaffolds* de PLA/PEG/hidroxiapatita produzidos através da técnica de fiação por sopro em solução**. In: Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2018, Foz do Iguaçu, PR - Brasil. 23º CBECiMat, 2018.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura cristalina da HAp (esquerda) e a projeção da estrutura no plano 001 (direita).	21
Figura 2 - Estrutura do poli (ácido láctico) (PLA) (Petinakis et al., 2013).	26
Figura 3 - Estrutura do Poli (etileno glicol) (PEG).....	27
Figura 4 - Desenho esquemático do aparato de fiação por eletrofiação (A) (Ziabari et al., 2009) e fibras de HAp obtidas através dessa técnica por Pasuri et al. (2015) (B) e por Franco et al. (2012) (C).....	30
Figura 5 - Desenho esquemático do aparelho utilizado na técnica de SBS: (1) Reservatório do gás, (2) bomba de injeção, (3) matriz de fiação, (4) distância de trabalho e (5) coletor (Medeiros et al., 2009).....	31
Figura 6 - Fluxograma da metodologia utilizada para obtenção das nanofibras de fosfato de cálcio e dos <i>scaffolds</i> híbridos.....	35
Figura 7 - Representação esquemática do aparato empregado na obtenção das nanofibras pelo método de fiação por sopro em solução em temperatura incrementada: (1) fonte de ar comprimido, (2) uma bomba de injeção para; (3) manômetro, (4) matriz de bicos concêntricos, (5) forno tubular, (6) câmara aquecida e (7) coletor estático.....	36
Figura 8 - Imagens micrográficas das fibras precursoras do fosfato de cálcio antes do tratamento térmico, (a) e (b), e após tratamento térmico, (c) e (d), para as razões de Ca/P de 1,67 e 1,1.	42
Figura 9 - Histogramas representativos das distribuições dos diâmetros das fibras precursoras do fosfato de cálcio antes da calcinação (a) e (b), e após calcinação a 1000°C, (c) e (d).....	44
Figura 11 - Difractogramas de raios X das fibras de fosfato de cálcio com temperaturas de queima de 800, 900 e 1000°C (Ca/P = 1,1).	46
Figura 12 - Espectros de FTIR das fibras de fosfato de cálcio, calcinadas a 1000°C, para duas razões de Ca/P.....	47
Figura 13 - Análise termogravimétrica das fibras precursoras de fosfato de cálcio antes da calcinação obtidas por SBS para as duas razões de Ca/P.....	49
Figura 14 - Fotografia do <i>scaffold</i> híbrido produzido por SBS.....	50
Figura 15 - Imagens micrográficas dos <i>scaffolds</i> de $5\text{CaP}^{1,67}$ (a e b) e $5/5\text{CaP}^{1,67}$ (c e d).	51

Figura 16 - Imagens micrográficas dos scaffolds com PLA e 20%PEG: sem adição do CaP (a); variando a concentração do CaP em 10% (b) e 20% (c) para a razão Ca/P=1,67 e 10% (d) e 20% (e) para razão Ca/P=1,1.	52
Figura 17 - Imagens micrográficas dos <i>scaffolds</i> com PLA e 30%PEG: sem adição do CaP (a); variando a concentração do CaP em 10% (b) e 20% (c) para a razão Ca/P=1,67 e 10% (d) e 20% (e) para razão Ca/P=1,1.	53
Figura 18 - Histogramas representativos das distribuições dos diâmetros das fibras dos scaffolds híbridos (CaP=1,67).	54
Figura 19 - Histogramas representativos das distribuições dos diâmetros das fibras dos scaffolds híbridos (CaP=1,1).	55
Figura 20 - Micrografia de MET do <i>scaffold</i> 20/20CaP ^{1,1} em diferentes ampliações (a,b,c e d) e da partícula de CaP incorporada (e, f). Padrão de difração de elétrons de área selecionada para o <i>scaffold</i> 20/20CaP ^{1,1} (g).	57
Figura 21 - Difrátogramas de raios X dos scaffolds híbridos obtidos pela técnica de SBS, com razão Ca/P=1,67.	58
Figura 22 - Difrátogramas de raios X dos <i>scaffolds</i> híbridos obtidos pela técnica de SBS, com razão Ca/P=1,1.	59
Figura 23 - Espectros de FTIR do CaP, PEG, PLA e dos <i>scaffolds</i> híbridos para a razão Ca/P=1,67.	60
Figura 24 - Espectros de FTIR do CaP, PEG, PLA e dos <i>scaffolds</i> híbridos para a razão Ca/P=1,1.	60
Figura 25 - Análise termogravimétrica dos <i>scaffolds</i> produzidos por SBS com 20% PEG.	61
Figura 26 - Análise termogravimétrica dos <i>scaffolds</i> produzidos por SBS com 30% PEG.	62
Figura 27 - Imagens micrográficas dos scaffolds de PLA/20PEG com incorporação de 10%CaP e 20%CaP submetidos a SBF por 7 e 14 dias para Ca/P=1,67 (a,b,c,d) e Ca/P=1,1 (e,f,g,h).	64
Figura 28 - Imagens micrográficas dos scaffolds de PLA/30PEG com incorporação de 10%CaP e 20%CaP submetidos a SBF por 7 e 14 dias para Ca/P=1,67 (a,b,c,d) e Ca/P=1,1 (e,f,g,h).	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais Fosfatos de Cálcio (Dorozhkin, 2016).....	20
Tabela 2 - Propriedades da hidroxiapatita em comparação com alguns tecidos humanos.....	24
Tabela 3 - Precursores utilizados para o desenvolvimento deste trabalho.	33
Tabela 4 - Parâmetros utilizados no processo de fiação com aquecimento.....	37
Tabela 5 - Concentração das dispersões de fiação utilizadas para obtenção dos <i>scaffolds</i>	38
Tabela 6 - Parâmetros do processo utilizados nas fiações em temperatura ambiente.	38
Tabela 7 - Reagentes utilizados para preparo do SBF.....	40
Tabela 8 - Diâmetro médio e desvio padrão das fibras de fosfato de cálcio obtidas pela técnica de SBS.	44
Tabela 9 - Diâmetro médio e desvio padrão dos <i>scaffolds</i> híbridos produzidos por SBS.....	56

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1. Engenharia de Tecidos e <i>Scaffolds</i>	16
2.2. Fosfatos de Cálcio e Hidroxiapatita.....	19
2.3. Compósitos Contendo Fosfato de Cálcio.....	24
2.4. Nanofibras Cerâmicas e <i>Solution Blow Spinning</i> (SBS).....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1. Materiais.....	33
3.2. Metodologia.....	34
3.2.1. Obtenção das nanofibras de fosfato de cálcio	35
3.2.2. Obtenção dos <i>scaffolds</i> de PLA/PEG/CaP	37
3.2.3. Caracterização.....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1. Nanofibras de Fosfato de Cálcio	42
4.2. <i>Scaffolds</i> de PLA/PEG/Fosfato de Cálcio	49
5. CONCLUSÃO.....	67
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

1. INTRODUÇÃO

Há décadas pesquisas vêm sendo voltadas ao desenvolvimento de materiais com características apropriadas para restauração e substituição óssea no corpo humano. Diversos materiais orgânicos e inorgânicos são utilizados desde a antiguidade, como por exemplo, a utilização de ligas de ouro e prata empregadas para reparações de ossos do crânio pelos Incas em 3000 a.C (Santoni-Rugiu, 1969; Carod-Artal e Vázquez-Cabrera, 2004; Basso, 2014). Desde então a procura e a evolução por esses materiais, assim como os métodos utilizados para produção dos mesmos se intensificaram. Para tentar atender esta demanda, tem-se adotado a engenharia de tecidos.

A engenharia de tecidos é tida como um conjunto de técnicas de engenharia e princípios das ciências biológicas utilizadas para desenvolver estratégias para a reparação e regeneração de tecido perdido ou danificado. (Vacanti e Langer, 1999; Roseti *et al.*, 2017; Turnbull *et al.*, 2017). Na engenharia de tecidos, os biomateriais são utilizados como suportes, denominados de *scaffolds* (arcabouços), que são estruturas tridimensionais biologicamente compatíveis que servem de suporte e guia para o crescimento de células e promovem regeneração de tecidos em três dimensões. Estes devem ser biocompatíveis, biodegradáveis, altamente porosos e interconectados, além de apresentarem características mecânicas confiáveis (Thavornnyutikarn *et al.*, 2014).

A utilização de biomateriais cerâmicos para aplicações em sistemas biológicos gera diversos benefícios para a prevenção e tratamento de doenças ósseas. Dentre os biomateriais cerâmicos que vem sendo bastante utilizados aqueles à base de fosfatos de cálcio (CaPs), principalmente a hidroxiapatita (HAp) $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2]$, tem se destacado devido a sua semelhança química com a componente mineral do osso e tecidos duros dos mamíferos, por favorecer a interação entre o tecido e o biomaterial, ser um material biocompatível e bioativo, e por propiciar aderência e proliferação celular de diferentes tipos de células (Dorozhkin, 2011).

A escolha do biomaterial, de sua morfologia e da técnica a ser utilizada para a fabricação do *scaffold* irá influenciar significativamente nas características e propriedades do produto final, bem como das funções e aplicações deste dispositivo (Ratner *et al.*, 2004; Dhandayuthapani *et al.*, 2011).

Scaffolds produzidos com nanofibras apresentam elevada área específica, elevada possibilidade de adesão celular e porosidade adequada para o fluxo de nutrientes e fluidos orgânicos, o que é fundamental para o crescimento celular e interação com o tecido circundante ao *scaffold*. Deste modo, é de grande importância tecnológica e científica o desenvolvimento desses sistemas porosos na forma nanoestruturada e fibrosa, assim como o aperfeiçoamento das propriedades dos CaPs para a área biomédica.

Por outro lado, *scaffolds* constituídos apenas por CaP apresentam uma característica de fragilidade que dificulta em muito sua manipulação e aplicação. Assim, a utilização de *scaffolds* híbridos, CaP/polímeros, é uma alternativa promissora para ampliar a aplicabilidade deste material e sua eficiência no tratamento de tecidos. Entretanto, são escassos os estudos que tratam da produção de *scaffolds* fibrosos nanoestruturados de polímero/CaP.

Entre os polímeros biodegradáveis mais estudados para esse fim tem-se o poli(ácido lático) (PLA) e o poli(etileno glicol) (PEG). O PLA apresenta excelentes propriedades mecânicas, no entanto, tem sua aplicação limitada por causa da dificuldade em controlar a taxa de hidrólise e por sua fraca hidrofiliabilidade. Por esta razão a combinação de HAp/PLA vem sendo estudada, já que o CaP pode reforçar os materiais e diminuir a taxa de degradação do PLA (Li *et al.*, 2008; Akindoyo *et al.*, 2017; Mao *et al.*, 2017). O PEG é um polímero biocompatível, não tóxico, hidrofílico, solúvel em água, podendo ser usado para melhorar o comportamento hidrofílico de blends com o PLA. Assim, a blenda PLA/PEG é um material promissor para produção de *scaffolds* na engenharia de tecidos.

Portanto, neste estudo foram produzidos *scaffolds* a base de fibras nanoestruturadas de PLA/PEG/CaP por meio da técnica de solution blow spinning (SBS), que é uma técnica de produção de nanofibras que foi desenvolvida na última década e vem apresentando resultados promissores na produção de nanofibras cerâmicas, com uma produtividade várias vezes superior a da técnica mais utilizada atualmente para a produção desses materiais, a eletrofiação (ES).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Engenharia de Tecidos e *Scaffolds*

O aumento das anomalias ou disfunções esqueléticas causadas por doenças ou traumas, estão exigindo a criação de tratamentos mais eficientes e menos traumáticos para os pacientes. Para tentar atender esta demanda, tem-se adotado a engenharia de tecidos. Esta pode ser definida como sendo um conjunto de conhecimentos e técnicas para a reconstrução ou substituição de tecidos e órgãos danificados. É baseada em conhecimentos das áreas de ciência e engenharia de materiais, biológica e médica, que envolve a cultura *in vitro* de células vivas do paciente doador sobre suportes de materiais bioreabsorvíveis. O suporte degrada enquanto um novo órgão ou tecido é formado (Barbanti *et al.*, 2005). Como tal, seu objetivo consiste em colher um pequeno pedaço de tecido, para remover as células e, em seguida, expandir a população de células, que serão subsequentemente reimplantadas utilizando um material transportador que ajuda na geração de uma quantidade substancial de tecido (JENKINS, 2007).

O desenvolvimento e aprimoramento dos biomateriais tem sido primordial para o progresso dos conceitos e abordagens relacionadas ao estudo e controle das interações tecido-biomateriais. Sendo assim, na engenharia de tecidos, os biomateriais desempenham um papel fundamental, pois a extensão do desenvolvimento lógico e rápido desta tecnologia visa proporcionar o desenvolvimento de superfícies de engenharia e arquitetura (que podem ser de escala micro e nano) destinadas à substituição de tecidos disfuncionais ou ausentes, ou até mesmo estimular outras interações fisiológicas (RATNER *et al.*, 2004).

As características requeridas aos biomateriais dependem fundamentalmente de sua aplicação, não sendo possível generalizá-las. Entre estas, podem-se destacar: propriedades biológicas, como biocompatibilidade, baixa ou nenhuma citotoxicidade, estimulação de adesão e proliferação celular; propriedades físicas, como rugosidade e porosidade superficiais; propriedades mecânicas como tensão de ruptura similar a dos tecidos, alongamento e flexibilidade; e as propriedades químicas, como densidade semelhante a dos tecidos, estabilidade, resistência à esterilização e forma adequada de degradação quando em contato com o organismo (Pires *et al.*, 2015).

Biomateriais utilizados para regeneração do tecido ósseo devem exibir uma gama de propriedades semelhantes ao osso, como preencher o tecido danificado e/ou servir de suporte para o crescimento de novas células, ser osteoindutor, osteocondutor, biodegradável e ter osteointegração (Albrektsson e Johansson, 2001; Shishatskaya *et al.*, 2006).

Pode-se definir biocompatibilidade como sendo a capacidade do material ter uma resposta apropriada numa determinada aplicação, com o mínimo de reações alérgicas, inflamatórias ou tóxicas, quando em contato com os tecidos vivos ou fluidos orgânicos (Williams, 2003). Enquanto que materiais biodegradáveis são aqueles que possibilitam que as células saudáveis circundantes ou nele presentes cresçam e substituam a matriz que constitui o biomaterial. O termo osteointegração é definido como o contato direto entre o tecido ósseo vivo e o implante, não havendo o desenvolvimento de tecido fibroso entre eles. Osteoindução é utilizado quando há estímulo para diferenciação das células osteoprogenitoras, podendo resultar na osteogênese (Wilson-Hench, 1987); e osteocondução é utilizado quando uma determinada superfície tem um ambiente adequado para o crescimento ósseo (Brånemark, 1977; Albrektsson *et al.*, 1981).

As construções de engenharia de tecidos (TEC, do inglês *Tissue-engineered Constructs*) são compostas por dois componentes: um grupo de células e um *scaffold*, que é um material suporte sobre o qual as células podem crescer (Bonassar e Vacanti, 1998). O componente celular é responsável pela geração de novos tecidos por meio da produção de uma matriz extracelular (ECM, do inglês Extracellular Matrix), que é fundamental para a síntese de um tecido saudável e funcional. O *scaffold* além de proporcionar estabilidade mecânica, também funciona como um molde para orientar o crescimento celular tridimensional. A interação entre a velocidade de degradação do material com a taxa de síntese celular é fundamental para o sucesso da engenharia de tecidos (Tang e Yu, 2015).

As células necessitam migrar ou crescer em direção a um determinado local, onde permanecerão para o desempenho de suas funções. Eventos de adesão e movimento celular, que ocorrem por reações químicas e espaciais, são de vital importância para unir células individuais em um formato tridimensional, tal como nos tecidos e órgãos corporais. Sendo assim, a morfogênese tem como objetivo criar um ambiente onde as células são estimuladas a formarem estruturas de tecidos funcionais. Logo, as matrizes são projetadas para controlar e orientar a regeneração

do tecido para provocar interações celulares e respostas específicas, servindo também como *scaffolds* para apoiar o transplante de células (JENKINS, 2007).

Um *scaffold* deve proporcionar uma estrutura que possa manter uma distância entre as células parenquimatosas, permitindo a difusão de nutrientes e gases, além da função de remoção do seu resíduo, ocorrendo assim um transporte de massa eficiente, suficiente para satisfazer as necessidades metabólicas da engenharia de tecidos (Curtis e Riehle, 2001). O critério para um *scaffold* ideal baseia-se na escolha adequada dos seus constituintes e na aplicação a que se destina.

De acordo com a técnica escolhida para produção dos *scaffolds*, esses podem apresentar estruturas diferenciadas, tais como: (1) *scaffolds* porosos biodegradáveis, como as espumas ou esponjas; (2) *scaffolds* fibrosos, como os constituídos por nanofibras produzidas pelas técnicas de eletrofição (ES), auto-organização ou separação de fase; (3) *scaffolds* formados por microesferas, incluindo as esferas de materiais híbridos, cerâmicos e poliméricos; e (4) *scaffolds* injetáveis, como os hidrogéis poliméricos ou híbridos que sofrem transição sol-gel *in situ*. Assim, a escolha do biomaterial, de sua morfologia e da técnica a ser utilizada para a fabricação do *scaffold* irá influenciar significativamente nas características e propriedades do produto final, bem como das funções e aplicações deste dispositivo (Ratner *et al.*, 2004; Dhandayuthapani *et al.*, 2011).

Recentemente, muitos estudos têm focado no desenvolvimento de *scaffolds* fibrosos, particularmente aqueles nanoestruturados, buscando mimetizar a estrutura fibrosa da MEC. Os *scaffolds* fibrosos apresentam elevada porosidade e área superficial e vem sendo produzidos principalmente através da técnica de ES. As nanofibras produzidas por ES apresentam dimensões semelhantes a da matriz extracelular fibrosa MEC e constroem um arcabouço que pode servir de suporte e guia para células em tecidos vivos (Pasuri *et al.*, 2015).

Gao *et al.* (2017) produziram nanofibras através de uma solução de PLA e fibroína de seda de tussah (TSF), usando ES, tecidas em tecidos multicamadas. Em seguida, obtiveram *scaffolds* compostos por mineralização em fluidos corporais simulados (SBF) usando os tecidos multicamadas como modelo. Os resultados do ensaio biológico mostraram que a estrutura de mineralização e tecido multicamada dos *scaffolds* de nanofibras aumentou significativamente a adesão e proliferação celular, além de promover o aumento na diferenciação das células estaminais

mesenquimais em relação aos osteoblastos. Portanto, estes pesquisadores concluíram que os *scaffolds* fibrosos mineralizados com tecidos multicamadas podem apresentar excelente citocompatibilidade e boa atividade osteogênica, tornando-os conjuntos de estruturas biocompatíveis versáteis para engenharia de tecido ósseo.

Gazquez et al (2017) fabricaram *scaffolds* fibrosos de β -TCP por ES. Observaram que o diâmetro médio da fibra após a sinterização foi de 100-125 nm, que é o menor tamanho de fibra já relatado para o β -TCP, e que a morfologia da nanofibra promoveu o crescimento de grãos unidirecionais durante o estágio de sinterização. Em vista disso, os *scaffolds* produzidos com as nanofibras de β -TCP, segundo os autores, podem oferecer um excelente potencial para estudos de regeneração óssea.

Entretanto, a técnica de ES possui algumas limitações particularmente relacionadas à produtividade, à necessidade de solventes com características polares, à utilização de forças eletrostáticas para produzir fibras finas e à utilização de uma tensão na gama de várias dezenas de quilo volts, demandando um consumo energético elevado. Além disso, essa técnica apresenta desafios para produção de biomateriais à base de CaP, pois a obtenção de fibras cerâmicas envolve a remoção dos componentes poliméricos das fibras recém fiadas, através de um tratamento térmico, promovendo a obtenção de um material frágil.

Portanto, *scaffolds* constituídos apenas por CaP apresentam características de fragilidade que dificultam sua manipulação e aplicação. Assim, a utilização de *scaffolds* híbridos, CaP/polímeros surge como uma alternativa promissora para ampliar a aplicabilidade deste material e sua eficiência no tratamento de tecidos.

2.2. Fosfatos de Cálcio e Hidroxiapatita

Os organismos vivos são capazes de cristalizar e depositar diversos minerais durante os processos de biomineralização, a exemplo dos fosfatos de cálcio (Dorozhkin, 2010). Estes, por sua vez, são produzidos nos vertebrados não apenas em calcificações normais, como em ossos e dentes, mas também em calcificações patológicas, como nos cálculos e pedras urinárias e dentárias assim como nas lesões ateroscleróticas de tecidos (Dorozhkin e Epple, 2002; Dorozhkin, 2016).

As tentativas de determinar a estrutura química e composição dos fosfatos de cálcio (CaP), antes chamados de apatitas, iniciaram em meados do século XVIII. No entanto, apenas no século XIX foi proposta a existência de diferentes fases de CaP (Haider *et al.*, 2017). Na Tabela 1, estão apresentados alguns fosfatos de cálcio que variam em fórmulas químicas e valores de solubilidade.

Tabela 1 - Principais Fosfatos de Cálcio (Dorozhkin, 2016).

Ca/P	Nome	Símbolo	Fórmula	Solubilidade a 25°C (g/L)
0,5	Fosfato monocálcico mono-hidratado	MCPM	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	~18
0,5	Fosfato monocálcico anidro	MCPA	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	~17
1,0	Fosfato dicálcico dihidratado	DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	~0,088
1,0	Fosfato dicálcico anidro	DCPA	CaHPO_4	~0,048
1,33	Fosfato octacálcico	OCP	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_{4.5} \cdot \text{H}_2\text{O}$	~0,0081
1,5	Trifosfato de cálcio- α	α -TCP	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	~0,0025
1,5	Trifosfato de cálcio- β	β -TCP	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	~0,0005
1,2-2,2	Fosfato de cálcio amorfo	ACP	$\text{Ca}_x(\text{PO}_4)_y \cdot n\text{H}_2\text{O}$	-
1,5-1,67	Hidroxiapatita deficiente em cálcio	CDHA	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{4.5-x}(\text{OH})_{2-x}$ ($0 < x < 1$)	~0,0094
1,67	Hidroxiapatita	HA ou HAp	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	~0,0003
2,0	Fosfato Tetracálcico	TTCP	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	~0,0007

A estabilidade das fases dos CaP está diretamente relacionada com a presença de água na etapa de processamento de síntese e no meio onde será aplicado. Na temperatura corporal, que é cerca de 37°C, apenas duas fases desses fosfatos são estáveis, quando em contato com os fluidos corporais. No pH inferior a 4,2 a fase estável é o fosfato dicálcico dihidratado [$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$] e no pH superior a 4,2 a fase estável é a HAp [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$]. Entretanto, em temperaturas mais elevadas outras fases podem estar presentes, como, por exemplo, o trifosfato de cálcio- β (β -TCP) [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] e o fosfato tetracálcico [$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$]. Estes CaP, quando calcinados em alta temperatura e em ambiente seco, ao interagirem com a água ou fluidos corporais, degradam-se e formam HAp (Cao e Hench, 1996).

A HAp é um dos sais mais estáveis em temperatura ambiente e em pHs variando de 4 a 12. Este CaP, de ocorrência natural, é usualmente carbonatado e deficiente em cálcio, com uma relação Ca/P igual a 1,67. A densidade da hidroxiapatita é de $3,156 \text{ g/cm}^3$ e o coeficiente de expansão térmica tem um valor de $11,6 \cdot 10^{-6} \text{ }^\circ\text{K}^{-1}$. (Vallet-Regí e González-Calbet, 2004; Märten *et al.*, 2010). É um composto de grande interesse também na catálise, indústria de fertilizantes e produtos farmacêuticos, aplicações de cromatografia de proteínas e processos de tratamento de água (Cao *et al.*, 2010).

A estrutura mais comumente encontrada da HAp pertence a um sistema hexagonal com grupo espacial $P6_3/m$, com parâmetros de rede $a = b = 9,423 \text{ \AA}$ e $c = 6,875 \text{ \AA}$, apresentando uma simetria perpendicular a três eixos “a” equivalentes (a_1 , a_2 e a_3), que formam ângulos de 120° entre si, como apresentado na Figura 1.

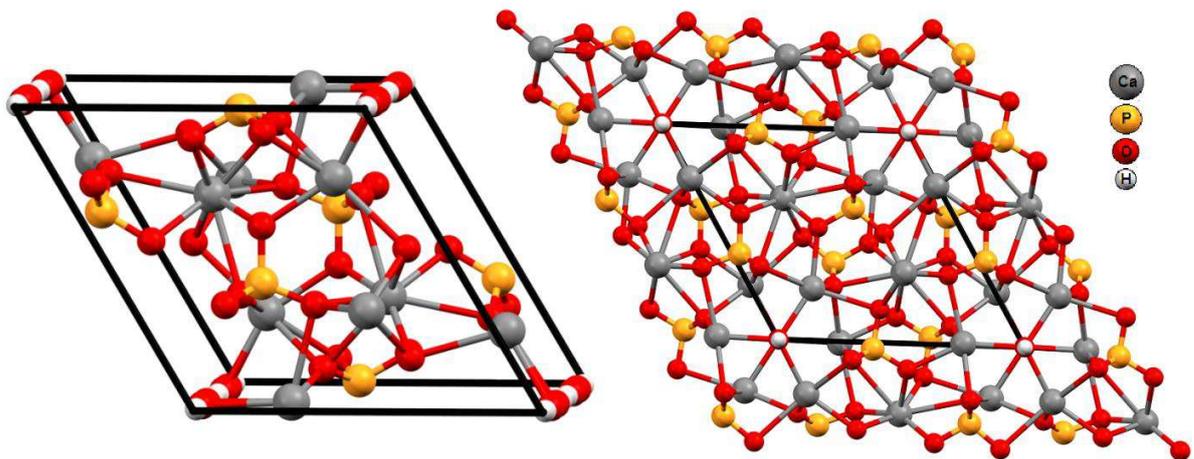


Figura 1 – Estrutura cristalina da HAp (esquerda) e a projeção da estrutura no plano 001 (direita).

Sua célula unitária é composta por cálcio (Ca) e fosfatos e pode ser representada por $M_4M_6(PO_4)_6(OH)_2$, que exibe dois sítios catiônicos independentes de cristalografia, M1 e M2, para 10 átomos de cálcio. Em que quatro átomos de Ca estão rodeados por nove átomos de oxigênio dos grupos fosfato na posição M1, pertencentes ao tetraedro PO_4 e os outros seis átomos de Ca estão rodeados pelos seis átomos de oxigênio remanescentes e por um dos dois OH^- posicionados ao longo da direção [001] (White e Dong, 2003; Uskoković e Uskoković, 2011). Ademais, independentemente da sua origem, o HAp pode conter

impurezas na sua estrutura, tais como íons fosfito (PO_3^{3-}), íons cloreto (Cl^-), íons fluoreto (F^-) e íons hidroxilas (OH^-) (Haider *et al.*, 2017).

De acordo com os métodos utilizados, reagentes e variáveis adotadas é possível obter materiais à base de CaP com fases diversas, o que resulta em materiais com características e propriedades diferenciadas, tais como: defeitos cristalinos, área superficial, afinidade por materiais orgânicos encontrados no meio fisiológico, etc (Ghosh e Sarkar, 2017). Por exemplo, a HAp pode ser sintetizada por uma variedade de técnicas, que podem ser agrupados, de forma geral, em seis conjuntos de metodologias:

- Métodos secos: envolvem as reações de estado sólido e induzidas por meios mecânicos (Fowler, 1974; Rao *et al.*, 1997; Wei e Evans-Freeman, 2002; Ignjatovic *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2016);
- Métodos húmidos: baseados na precipitação química a baixa temperatura (Moreno *et al.*, 1968), co-precipitação (Tas *et al.*, 1997; Ignjatovic *et al.*, 2004; Gentile *et al.*, 2015), rota de sol-gel (Kordas e Trapalis, 1997; Jillavenkatesa e Condrate Sr, 1998; Lopatin *et al.*, 1998; Hsieh *et al.*, 2001; Ramanan e Venkatesh, 2004; Jafari e Khayati, 2018) e hidrólise (Shamrai *et al.*, 2015; Wang, M.-C. *et al.*, 2015);
- Métodos hidrotérmicos: utilizam soluções aquosas de alta temperatura e alta pressão, como o hidrotermal (Yoshimura *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1997; Ashok *et al.*, 2007), emulsão e microemulsão (Koumoulidis *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2016) e sonoquímica (Utara e Klinkaewnarong, 2015);
- Processos de alta temperatura: inclui combustão (Han *et al.*, 2004; Salavati-Niasari *et al.*, 2016) e pirólise (Widiyastuti *et al.*, 2014; Cho *et al.*, 2016);
- Síntese baseada em fontes biogênicas: que pode ser extraída de espinhas de peixe (Milovac *et al.*, 2014), conchas (Pal *et al.*, 2017), cascas de ovos (Goloshchapov *et al.*, 2013; Padmanabhan *et al.*, 2015), ossos de bovino (Heidari *et al.*, 2015; Maleki-Ghaleh *et al.*, 2016); através da presença de biomoléculas (Ding *et al.*, 2015; Gopi *et al.*, 2015; Wang, Z. *et al.*, 2015) ou biomembranas (Zhang *et al.*, 2011);
- Combinação de métodos.

Quando sujeita a tratamentos térmicos em elevadas temperaturas a HAp pode dar origem a outras fases com α e β -TCP, que também são comumente

utilizadas na área biomédica. Na maioria dos casos, a difracção de raio X da hidroxiapatita indica que a transformação ocorre em temperaturas acima de 1200°C. As fases α -TCP e β -TCP apresentam mesma composição química com diferentes estruturas cristalografias, que faz com que a fase α seja mais solúvel. Estas duas fases também apresentam propriedades físicas diferentes, designadamente a densidade da β -TCP (3,07 g/cm³) e da α -TCP (2,86 g/cm³) que diferem da HAp (3,16 g/cm³) (Bohner, 2000).

A taxa de dissolução da fase de fosfato de cálcio está diretamente relacionada à sua relação Ca/P, β -TCP com uma razão de 1,5, é mais solúvel que a HAp, com uma razão de 1,67. A solubilidade do produto final pode ser ajustada usando uma combinação desses materiais (Denry e Kuhn, 2016).

A HAp apresenta uma gama de aplicações que vai desde *scaffolds* sólidos para reconstituição de tecido ósseo na engenharia de tecidos até compostos modelo para biomineralização do corpo humano (Iijima *et al.*, 1997; Jee *et al.*, 2011), inibição do crescimento de muitos tipos de células cancerígenas (Zhao *et al.* (2016), fornecimento de medicamentos (Cellet *et al.*, 2015), reparo do esmalte dentário (Zeitz *et al.*, 2016), cimento ósseo injetável (Huang *et al.*, 2016) e revestimento para implante de prótese metálica (Mistry *et al.*, 2016). A mistura da HAp com outros fosfatos, como o fosfato β -tricálcico (β -TCP) e o pirofosfato de cálcio, proporciona maior aplicabilidade desse material, pois possibilita maior adesão celular e características osteogênicas (Silva *et al.*, 2016).

Como o tecido ósseo é continuamente solicitado, as propriedades mecânicas do suporte devem ser semelhantes às do tecido onde será implantado, de modo que a mobilização do local lesionado possa ocorrer o mais cedo possível (Agrawal e Ray, 2001; Leong *et al.*, 2003). Entretanto, a aplicação do material poroso é restrita a regiões onde o esqueleto não está sendo solicitado mecanicamente, ou como preenchimento de cavidades ósseas, uma vez que são materiais frágeis e que apresentam baixa resistência à fadiga (De Aza *et al.*, 2005). Logo, a aplicação destas cerâmicas pode ser limitada, como por exemplo, quando o defeito ósseo a ser reparado estiver em regiões anatômicas que estão sob constante tensão (Gutierrez *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2010). A Tabela 2 ilustra propriedades mecânicas da HAp em comparação com outros materiais cerâmicos e alguns tecidos duros do corpo:

Tabela 2 - Propriedades da hidroxiapatita em comparação com alguns tecidos humanos.

Material	Resistência à Compressão (MPa)	Resistência à Flexão (MPa)	Módulo de Elasticidade (GPa)	Referências
Hidroxiapatita	300-600	60-115	40-120	(Akao <i>et al.</i> , 1981; Stea <i>et al.</i> , 1995; Ravaglioli e Krajewski, 2012)
Zircônia estabilizada	1700-2000	421-800	195-210	(Silva <i>et al.</i> , 2001)
Alumina	1000-2800	280-420	350-400	(Da Silva <i>et al.</i> , 2014)
Osso cortical	88-230	88-115	3-30	(Legeros e Legeros, 1993; Ravaglioli e Krajewski, 2012; Black e Hastings, 2013)
Dentina	290-380	51,7	15-20	(Ravaglioli e Krajewski, 2012; Black e Hastings, 2013)
Esmalte dentário	250-550	10,3	10-90	(Legeros e Legeros, 1993; Black e Hastings, 2013)

Logeart-Avramoglou *et al.* (2005) não consideram a alta resistência mecânica como uma prioridade fundamental do *scaffold*, já que os autores acreditam que sua principal função é a estimulação do crescimento do tecido ósseo em seu interior, uma vez que a estabilidade mecânica pode ser alcançada, principalmente através de dispositivos ortopédicos apropriados, como pinos internos e intramedulares, ou fixadores externos. Complementarmente, o estudo *in vivo* de Tamai *et al.* (2002) indicaram que a resistência à compressão dos *scaffolds* de HAc aumenta, por exemplo, de cerca de 10 a 30 MPa, devido ao crescimento do tecido ósseo. No entanto, um *scaffold* deve ter, pelo menos, resistência mecânica e tenacidade à fratura suficientes para permitir seu manuseio, sendo, de acordo com Chen *et al.* (2006), uma resistência mecânica entre 0,3 - 0,4 MPa suficiente para o manuseio adequado do *scaffold*.

2.3. Compósitos Contendo Fosfato de Cálcio

Os CaP são caracterizados por serem materiais frágeis e, por esse motivo, muitas pesquisas se concentram no desenvolvimento de revestimentos e compostos desses materiais, com o objetivo de reduzir sua fragilidade estrutural e aumentar a força de adesão do revestimento ao meio, através da incorporação de partículas inorgânicas que atuam como reticuladores multifuncionais (Zhitomirsky, 2000). Assim compósitos polímero/CaP vêm sendo produzidos buscando melhorar as

propriedades mecânicas e biomédicas dos polímeros (Novotna *et al.*, 2014; Logithkumar *et al.*, 2016). Logo, o CaP pode desempenhar dois papéis: reforçar as propriedades mecânicas da matriz polimérica e conferir-lhe um comportamento bioativo da prótese, favorecendo a osteointegração.

Os polímeros usados na regeneração óssea podem ter origem natural ou sintética e ser biodegradáveis ou não degradáveis. No entanto os polímeros biodegradáveis são mais atrativos por se degradarem dentro do corpo humano não deixando resíduos inorgânicos no osso.

Bonfield *et al.* (1981), utilizaram a HAp como reforço em compósitos poliméricos pela primeira vez, para analisarem o efeito da HAp nas propriedades mecânicas do HDPE, para prospectiva aplicação na engenharia de tecidos. Seus resultados comprovaram a eficácia do reforço promovido pela HAp no compósito produzido, resultando em um aumento no módulo de Young.

Entre os polímeros naturais mais utilizados em combinação com HAp encontra-se o colágeno (Muthukumar *et al.*, 2016; Kozłowska *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018), a quitosana (Levengood e Zhang, 2014; Ressler *et al.*, 2018; Sanchez *et al.*, 2018) e a gelatina (Kim *et al.*, 2005), por promoverem um maior crescimento celular, devido a apresentarem estrutura semelhante á matriz extracelular do tecido ósseo. Entretanto, possuem taxa de regeneração não controlável dificultando a sua utilização, além da dificuldade de manuseio e processamento. Dentre os polímeros de origem sintética e biodegradáveis mais estudados para aplicações biomédicas, encontram-se o poli (ácido láctico) e o poli (etileno glicol) (PEG).

O poli (ácido láctico) (PLA), cuja estrutura esta apresentada na Figura 2, foi o primeiro poliéster estudado para aplicação em engenharia de tecidos devido à suas excelentes propriedades mecânicas, biocompatibilidade e biodegradabilidade (Persson *et al.*, 2013; Esquirol *et al.*, 2014). Este é um polímero de fácil processamento, sendo, processado através de métodos convencionais tais como: moldagem por injeção, por sopro, por extrusão e operações de formação de fios, uma vez que o PLA possui sua temperatura de transição vítrea, Tg, na faixa de 55 - 65°C e temperatura de fusão entre 150-175°C. Suas propriedades mecânicas são semelhantes ou, na maioria dos casos, superiores as dos polímeros petroquímicos, como o polipropileno. No entanto, a hidrofobicidade, fragilidade, produtos de degradação ácida e alto custo do PLA restringem sua aplicação. Com a finalidade de

superar a natureza frágil do PLA é útil a incorporação de enchimentos naturais na matriz polimérica (Petinakis *et al.*, 2013).

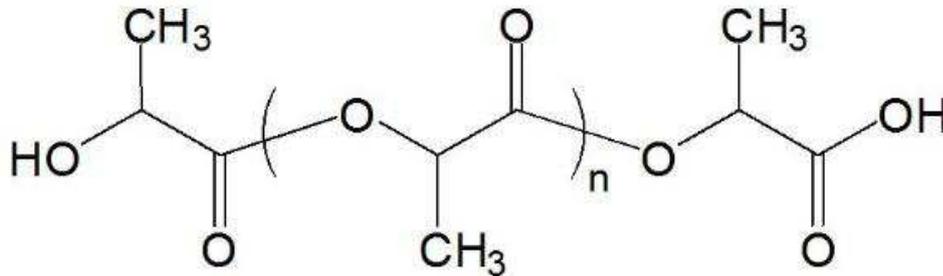


Figura 2 - Estrutura do poli (ácido láctico) (PLA) (Petinakis *et al.*, 2013).

O PLA apresenta três estereoisômeros: poli (L - ácido láctico) (PLLA), poli (D - ácido láctico) (PDLA) e poli (D - L - ácido láctico) (PDLLA). Entre estes, o PDLLA amorfo, é um polímero de bastante interesse para a produção de esqueleto na aplicação de engenharia de tecido ósseo, por possuir excelente biocompatibilidade *in vivo* e boa osteocondutividade (favorecimento do crescimento ósseo), além de possuir elevada estabilidade mecânica (Schmidmaier *et al.*, 2001).

O PDLLA vem sendo bastante utilizado para estudos que envolvem fabricação de *scaffolds* para regeneração óssea. No entanto, a sua hidrofobicidade e superfície lisa impede sua interação com o fluido biológico e a adesão celular. Mao *et al.* (2017), relata a necessidade da incorporação da hidroxiapatita no composto de PLA para promover a bioatividade dos *scaffolds*, uma vez que HAp é o principal componente inorgânico para o tecido duro humano, verificando que a HAp contribui para osteogênese e carga.

Com o intuito de alterar as características da superfície do polímero, Siqueira *et al.* (2015), desenvolveram diferentes técnicas de modificação de superfície para facilitar a aplicação biológica. Os pesquisados produziram nanotubos de carbono/PDLLA super hidrófilos verticalmente alinhados e em seguida fabricaram *scaffolds* de PDLLA/nanohidroxiapatita (nHAp). Seus resultados mostraram que a nHAp provavelmente atuou como um agente de nucleação aumentando a taxa de cristalização do PDLLA sem alteração estrutural, não apresentando efeitos citotóxicos, sendo, portanto, capazes de induzir mineralização detectável. Além disso, o estudo *in vivo* mostrou que os *scaffolds* PDLLA/nHAp imitaram o osso imaturo e induziram o remodelamento ósseo.

No entanto, existem alguns desafios para o composto PLA-HAp que incluem a grande possibilidade de aglomeração da HAp na matriz PLA e a possibilidade de adesão fraca entre o PLA e a HAp. Isso pode levar a uma falha indesejável na interface PLA-HAp e, invariavelmente, a baixas propriedades mecânicas do composto PLA-HAp. Além disso, esses materiais apresentam forte hidrofobicidade, porém os *scaffolds* devem apresentar hidrofiliabilidade moderada para favorecer a fixação e a proliferação celular (Jiang e Liao, 2012). Nesse sentido, a formação de blendas pode oferecer a vantagem de um amplo espectro de propriedades mecânicas e taxas de degradação simplesmente variando a proporção do componente da outra fase para o PLA.

O poli (etilenoglicol) (PEG), estrutura apresentada na Figura 3, com fórmula geral $H(OCH_2CH_2)_n \cdot OH$, é um polímero cristalino solúvel em água, que é bem conhecido por sua propriedade não tóxica, hidrofílica e biocompatível. Vem sendo estudado por ser uma grande promessa como agente plastificante para o PLA, propiciando um aumento significativo do alongamento na ruptura (Baiardo *et al.*, 2003; Gumus *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013), além de introduzir mudanças estruturais e físico-químicas nos *scaffolds* resultantes, como por exemplo o aumento da molhabilidade e taxa de degradação do material. Entretanto, este vem acompanhado de uma perda significativa da resistência à tração e do módulo de elasticidade (Chieng, B. *et al.*, 2013).

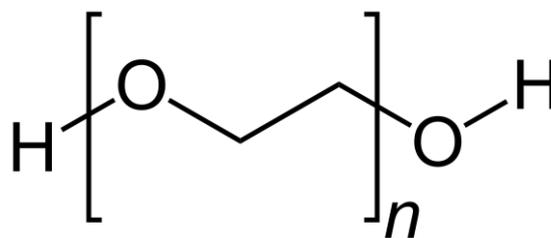


Figura 3 - Estrutura do Poli (etileno glicol) (PEG).

Wang *et al.* (2012) Fabricaram membranas PLA/PEG através da técnica de eletrofição. Os resultados mostraram que o teor de PEG influenciou a taxa de degradação das membranas, indicando também boa fixação e proliferação de células nas membranas, devido a sua biocompatibilidade, sendo um biomaterial promissor para aplicações de engenharia de tecidos. Zhang *et al.* (2013) prepararam *scaffolds* fibrosos PLLA-b-PEG por eletrofição, que exibiram boa flexibilidade e uma

hidrofilicidade aprimorada. No entanto, o copolímero de PLA-PEG foi sintetizado usando catalisador, porém seus resultados indicaram que o uso do catalisador foi prejudicial para a adesão e proliferação celular. No mesmo ano, Chieng, B. W. *et al.* (2013), utilizaram o PEG de baixa massa molar como plastificante com a finalidade de melhorar a ductilidade do PLA. A adição de PEG levou a redução da temperatura de transição vítrea (T_g) de PLA, além de promover aumento do alongamento (> 7000%), porém provocou uma redução da resistência à tração e do módulo de elasticidade. No entanto, a mistura de PLA/PEG não foi estável e as propriedades atraentes foram perdidas ao longo do tempo por causa da separação de fases à temperatura ambiente levando à formação de fases ricas em PLA e em fases ricas em PEG.

Serra *et al.* (2014) estudaram o efeito plastificante do PEG em misturas à base de PLA utilizadas para a fabricação de *scaffolds* pelo método de prototipagem rápida em 3D para aplicações na engenharia de tecidos. Observaram através dos seus resultados que houve aumento do módulo elástico das superfícies estudadas à medida que o PEG foi incorporado. Além disso, os estudos de degradação *in vitro* mostraram que a inclusão de PEG acelerou, de modo relevante, a taxa de degradação do material. Logo, os pesquisadores concluíram que a presença de PEG (5%) indica não só a melhora do processamento de PLA, mas também leva a mudanças significativas de superfície, geométricas e estruturais, incluindo a modulação da taxa de degradação do *scaffold*. Resultados semelhantes foram encontrados por Chen *et al.* (2015).

Mais recentemente, Bhaskar *et al.* (2018) produziram *scaffolds* de PLA/PEG, variando o PEG em relação ao peso de PLA em 0, 10 e 25%, com o objetivo de investigar o efeito da adição do PEG sobre a porosidade e o comportamento de células ósseas. Verificaram que houve aumento da atividade metabólica ao longo do tempo em função do aumento do teor de PEG, a atividade de ALP e a produção de matriz mineralizada também foram significativamente maiores em *scaffolds* contendo 25% de PEG. Além disso, a inclusão de PEG promoveu melhor interconectividade dos poros e melhor crescimento celular em comparação com os arcabouços de PLA puro.

2.4. Nanofibras Cerâmicas e *Solution Blow Spinning* (SBS)

Nas últimas décadas, vêm evoluindo os estudos voltados para as nanoestruturas, tais como os nanotubos, os nanofios, as nanofitas, as nanofibras (Palacios, 2012) e as nanopartículas (Calvié *et al.*, 2014). Tais estudos têm atraído o interesse da comunidade científica, pelas propriedades diferenciadas que esses nanomateriais apresentam. Ao se reduzir o diâmetro das fibras, sabe-se que a razão entre a sua área superficial e o volume aumenta significativamente, havendo redução de defeitos, como também maior funcionalidade de ligações químicas. Tais propriedades fazem com que as fibras cerâmicas nanoestruturadas possuam largo campo de aplicações, como por exemplo, em catálises, membranas e filtração, biomateriais e optico-eletrônicas, conversão e armazenamento de energia, sensores e aplicações estruturais que requerem elevada resistência mecânica (Ramaseshan *et al.*, 2007; Calvié *et al.*, 2014; Kou *et al.*, 2016; Pascariu *et al.*, 2016).

Nesse sentido, fibras de HAp vêm sendo usadas como outra forma de produção deste material, assim como de outras matrizes biocompatíveis para preparar compósitos que ofereçam uma solução para o problema de baixa resistência mecânica de corpos de HAp (Ramaseshan *et al.*, 2007; Calvié *et al.*, 2014; Kou *et al.*, 2016; Pascariu *et al.*, 2016). Fibras de CaP podem ser obtidas por diferentes técnicas de fiação, partindo da síntese via sol-gel, seguido de um processo de fiação direto como eletrofiação (ES). Dentre as técnicas utilizadas para fiação de nanofibras a ES vem sendo a principal técnica de processamento utilizada, por ser relativamente simples e versátil para a geração de nanoestruturas 1D (Ramaseshan *et al.*, 2007; Moradipour *et al.*, 2016).

A técnica de ES consiste na utilização de um campo elétrico de alta intensidade que controla a formação e deposição das fibras em um substrato. A solução flui através de um capilar/seringa e, sob a influência da tensão superficial, forma-se uma gota. Uma tensão elétrica elevada (10-30 kV) aplicada à solução forma um campo elétrico entre a gota e um anteparo aterrado, o coletor. Quando a força exercida por este campo elétrico supera a tensão superficial da gota um fino jato é formado e acelerado em direção ao coletor, provocando estiramento da solução e a rápida evaporação do solvente, chegando no coletor apenas uma rede de fibras ultrafinas aleatoriamente orientadas (Figura 4).

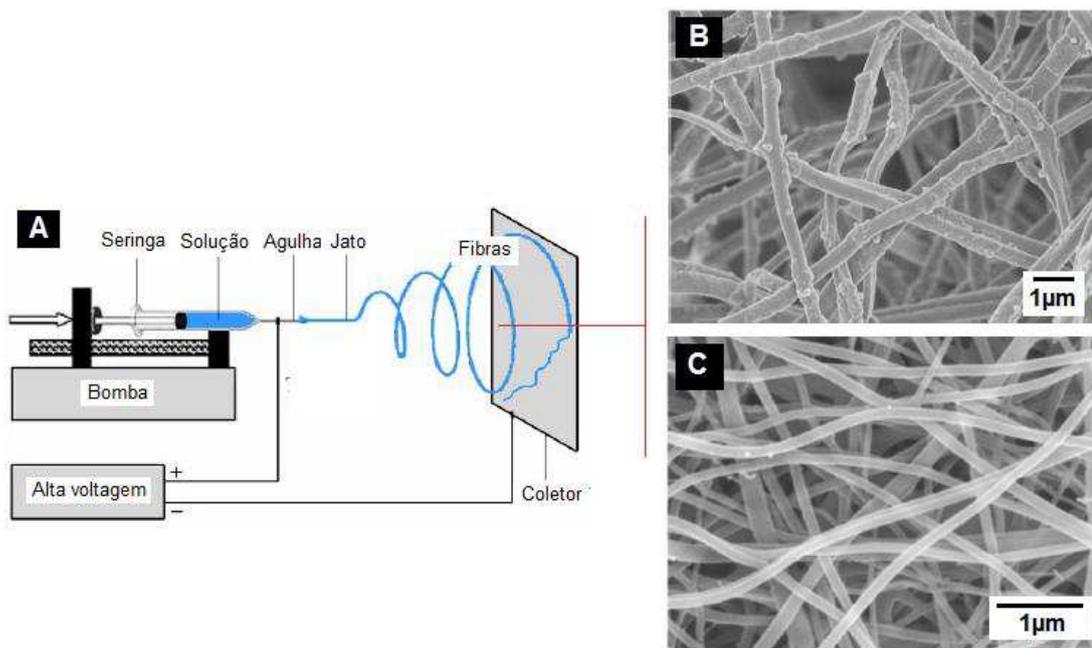


Figura 4 - Desenho esquemático do aparato de fiação por eletrofiação (A) (Ziabari et al., 2009) e fibras de HAp obtidas através dessa técnica por Pasuri et al. (2015) (B) e por Franco et al. (2012) (C).

Alguns processos foram relatados para formação de HAp utilizando esta técnica com veículos poliméricos diferentes, como o PVP e PVA, usando, em conjunto, o $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ como precursor de cálcio, e como precursor do fósforo um fosfato ou um fosfito, como: P_2O_5 , fosfato de trietila, trietil fosfito e fosfato de diamônio. As temperaturas de calcinação nesses trabalhos variaram entre 600 e 800°C e o diâmetro médio obtido para as fibras foi na faixa de 80nm- 1μm (Wu *et al.*, 2004; Kim e Kim, 2006; Dai e Shivkumar, 2007a; b; Hou *et al.*, 2009; Franco *et al.*, 2010; Franco *et al.*, 2012; Holopainen *et al.*, 2014; Lee e Kim, 2014; Pasuri *et al.*, 2015).

Wu *et al.* (2004) também produziram fibras de HAp por eletrofiação através de um sistema sol-gel. Os autores observaram que a superfície das fibras após a calcinação era rugosa, por causa da remoção completa do polímero, obtendo fibras com 10 a 30 μm de diâmetro. Além disso, verificaram que para temperaturas de sinterização de 600°C e 700°C, há formação de fases de CaO e de β-TCP nas fibras de HAp. Mais recentemente, Franco *et al.* (2012), produziram fibras nanométricas (122 ± 32 nm) de HAp e observaram um comportamento semelhante ao trabalho anterior. Após a queima a 700°C as fases CaO e β-TCP começavam a formar devido a decomposição da HAp. Isto evidencia a dificuldade em se obter fibras monofásicas

de hidroxiapatita com escala nanométrica. Resultados análogos foram relatados por Pasuri *et al.* (2015) e Holopainen e Ritala (2016).

Embora a ES desempenhe um importante papel na síntese de nanofibras cerâmicas, ela apresenta algumas limitações, particularmente relacionadas à produtividade, necessidade de solventes com características polares e à utilização de forças eletrostáticas para produzir fibras finas, além de ser necessária uma tensão na ordem de várias dezenas de quilovolts, demandando um consumo energético elevado. Visando superar essas desvantagens um método de fiação de nanofibras foi desenvolvido na última década, denominado de fiação por sopro em solução, ou, do inglês, *solution blow spinning* (SBS).

A técnica de fiação por sopro em solução foi desenvolvida, relacionando elementos conceituais da ES e da fiação convencional, para a produção de fibras nanométricas. Esta técnica vem se destacando por sua alta produtividade e por não necessitar o uso de altas voltagens (Medeiros *et al.*, 2009).

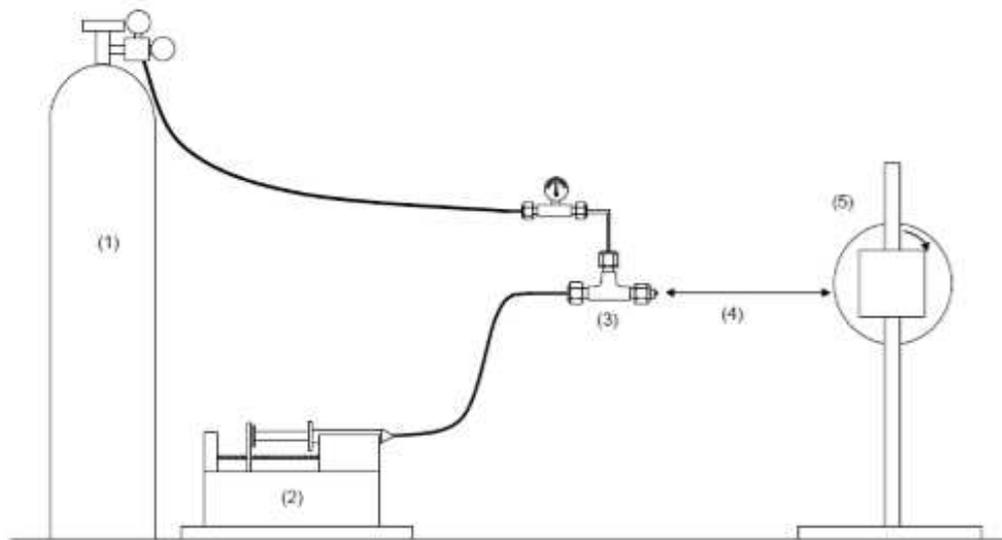


Figura 5 - Desenho esquemático do aparelho utilizado na técnica de SBS: (1) Reservatório do gás, (2) bomba de injeção, (3) matriz de fiação, (4) distância de trabalho e (5) coletor (Medeiros *et al.*, 2009).

A SBS consiste de um sistema de bicos concêntricos em que a solução é bombeada através do bico interno, enquanto um fluxo de gás pressurizado (comumente ar) flui a alta velocidade através do bico externo. Em seguida, a corrente de gás a alta velocidade supera a tensão superficial da solução deformando-a por extiramento e durante o trajeto ao coletor o solvente da solução

evapora, formando as nanofibras (Medeiros *et al.*, 2009). A Figura 5 ilustra o aparato da técnica de SBS.

A manipulação das variáveis de processamento como concentração da solução, distância de protusão da matriz de fiação, distância de trabalho, taxa de injeção da solução e pressão do gás, permitem o controle da morfologia das fibras produzidas (Silva *et al.*, 2015).

Os produtos de tal técnica têm inúmeras aplicações em potencial, como meio filtrante, tecidos médicos, adsorventes de petróleo e isolamento térmico (Zhang, L. *et al.*, 2009) e em diversas áreas distintas como a optoeletrônica, biosensores (Oliveira *et al.*, 2012), catálise, filtração, liberação controlada de fármaco (Souza *et al.*, 2014) e em aplicações biomédicas (Bonan *et al.*, 2015).

A técnica SBS tem sido aplicada com sucesso para produzir micro e nanofibras de vários polímeros incluindo poli (ácido láctico) (PLA) (Oliveira *et al.*, 2012), poli(metacrilato de metila) (PMMA) e poliestireno (PS) (Medeiros *et al.*, 2009). Recentemente, também, tem sido aplicada para produção de nanofibras cerâmicas de mulita, ZnO e TiO₂ (Da Costa Farias *et al.*, 2015; Costa *et al.*, 2016). Entretanto, não tem sido reportado na literatura estudos sobre a produção de nanofibras de HAp utilizando a técnica de SBS.

Holopainen e Ritala (2016) fizeram a primeira tentativa de produção de obtenção de fibras de HAp através da técnica de fiação por sopro em solução (SBS), entretanto o objetivo não foi alcançado, pois obtiveram fibras com agregados de partículas e de baixa qualidade. Para solucionar este problema, propuseram o uso do método de fiação denominada pelos autores de “*electroblowing*”, que consiste na técnica de ES assistida por corrente de ar de alta velocidade, tornando possível a produção de fibras nanométricas (200 ± 70 nm) de hidroxiapatita contendo fase secundária de CaO.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

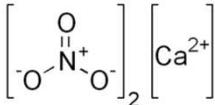
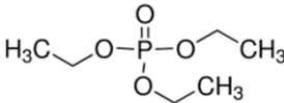
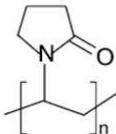
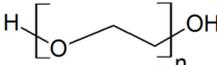
Nessa seção estão descritos os materiais e a metodologia abordada neste trabalho a fim de alcançar os objetivos propostos

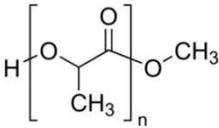
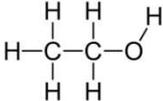
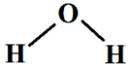
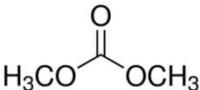
3.1. Materiais

A Tabela 3 apresenta os materiais utilizados nesta pesquisa. Para fabricação das nanofibras de CaP e dos *scaffolds* foram utilizados:

- polivinilpirrolidona, PVP, (Ashland, Mw = 1.300.000 g/mol) foi utilizado como agente de fiação das fibras híbridas PVP/precursores inorgânicos de CaP;
- etanol (EtOH) PA da Synth foi usado como solvente;
- água destilada foi usada como solvente;
- nitrato de cálcio hexahidratado ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (VETEC) e tri-etil fosfato (TEP) (Sigma-Aldrich) foram utilizados como precursores inorgânicos do CaP;
- poli (ácido láctico), PLA, semicristalino (Biomater 07187, Mw = 75000 g/mol) em forma de grânulos e poli (etileno glicol), PEG, em pó (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) foram usados na produção dos *scaffolds*.

Tabela 3 - Precursores utilizados para o desenvolvimento deste trabalho.

Precursor	Sigla	Fórmula química molecular	Fórmula química estrutural	Fabricante
Nitrato de cálcio tetra-hidratado	NCT	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$		VETEC
Tri-etil fosfato	TEP	$(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{PO}_4$		SIGMA-ALDRICH
Polivinilpirrolidona	PVP	$(\text{C}_6\text{H}_9\text{NO})_n$ Mw = $1,3 \times 10^6$ g/mol Tg = 180°C		SIGMA-ALDRICH
Poli(etileno glicol)	PEG	$\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{O}$		SIGMA-ALDRICH

Poli(ácido láctico)	PLA			Biomater
Etanol absoluto	EtOH	C ₂ H ₆ O		SYNTH
Água destilada	-	H ₂ O		
Dimetilcarbonato	DMC	C ₃ H ₆ O ₃		

3.2. Metodologia

O presente trabalho foi dividido em duas etapas distintas, mas dependentes, conforme descrito na seção 3.2.1: na primeira parte, realizou-se a síntese das fibras de fosfato de cálcio, pelo método de fiação por sopro em solução para posteriormente serem calcinadas, caracterizadas e maceradas. Uma vez obtidas as fibras, foi executada a segunda etapa. Foram preparadas dispersões, variando as quantidades de CaP e de PEG, procedendo à obtenção dos *scaffolds* de PLA/PEG/CaP através de fiação por sopro em solução e posteriores caracterizações. A Figura 9 apresenta o fluxograma da metodologia empregada na obtenção das nanofibras de CaP e dos *scaffolds* híbridos.

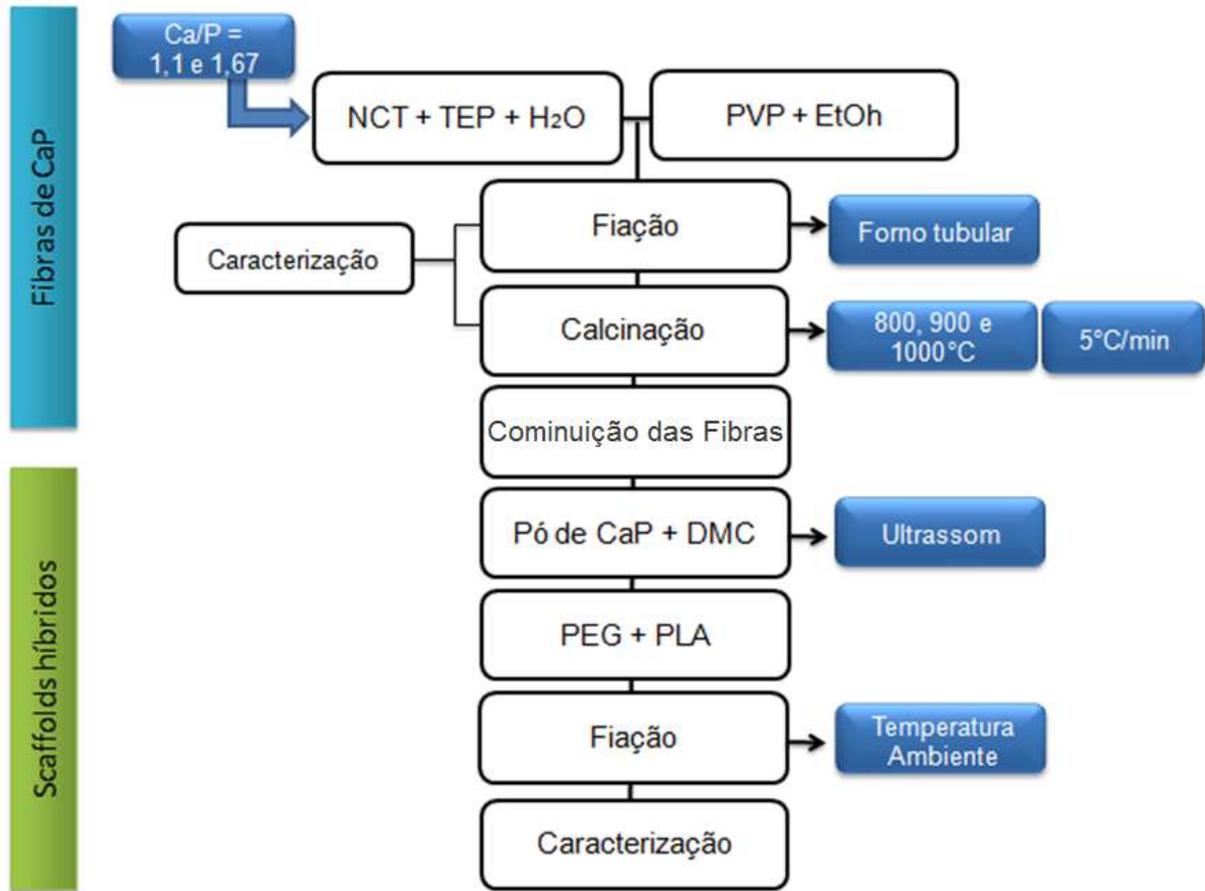


Figura 6 - Fluxograma da metodologia utilizada para obtenção das nanofibras de fosfato de cálcio e dos *scaffolds* híbridos.

3.2.1. Obtenção das nanofibras de fosfato de cálcio

Solução precursora de fosfatos de cálcio

As fases mais utilizadas para CaPs são hidroxiapatita (HAp), β -trifosfato de cálcio- $(\beta$ -TCP) e combinações da HAp com o β -TCP. A taxa de dissolução da fase de fosfato de cálcio está diretamente relacionada à sua relação Ca/P, β -TCP com uma razão de 1,5, é mais solúvel que a HAp, com uma razão de 1,67. A solubilidade do produto final pode ser ajustada usando uma combinação desses materiais (Denry e Kuhn, 2016). Sendo assim, nessa pesquisa foi utilizada a produção de CaP para razão de Ca/P=1,67 e Ca/P=1,1, com o intuito da formação pura da fase de HAp e para combinação das fases de HAp/ β -TCP.

Inicialmente os precursores inorgânicos, para as duas razões Ca/P, foram adicionados cuidadosamente ao meio aquoso e permaneceram por um período de 1h sob agitação magnética constante para permitir a solubilização dos mesmos e a hidrólise do TEP. Em seguida, as soluções precursoras de CaP foram misturadas a uma solução com o veículo de fiação PVP em etanol (15%*m/v*). As soluções

permaneceram sob agitação constante por cerca de uma hora antes do processo de fiação.

Processo de Fiação

Após a completa dissolução do polímero, as soluções obtidas na etapa anterior foram submetidas ao processo de fiação por SBS em um aparato de fiação semelhante ao sugerido por Lisboa et al. (2016), contendo um forno tubular através do qual a fiação é realizada e as fibras coletadas em uma câmara aquecida, como mostra a Figura 7.

As soluções foram alimentadas pelo sistema de injeção através do bico interno a uma taxa de injeção de 6 mL/h. Ar comprimido a uma pressão de 0,28 MPa foi utilizado como força-motriz para o processo de estiramento da solução, formação e secagem das fibras. O sistema de bicos concêntricos (protrusão de 16 mm) foi posicionado a uma distância de trabalho de 80 cm do coletor estático posicionado em uma câmara aquecida (70°C). A temperatura do forno tubular foi ajustada em 400°C durante todo o processo de fiação para auxiliar na evaporação do solvente. A Tabela 4 resume os parâmetros do processamento utilizado neste trabalho.

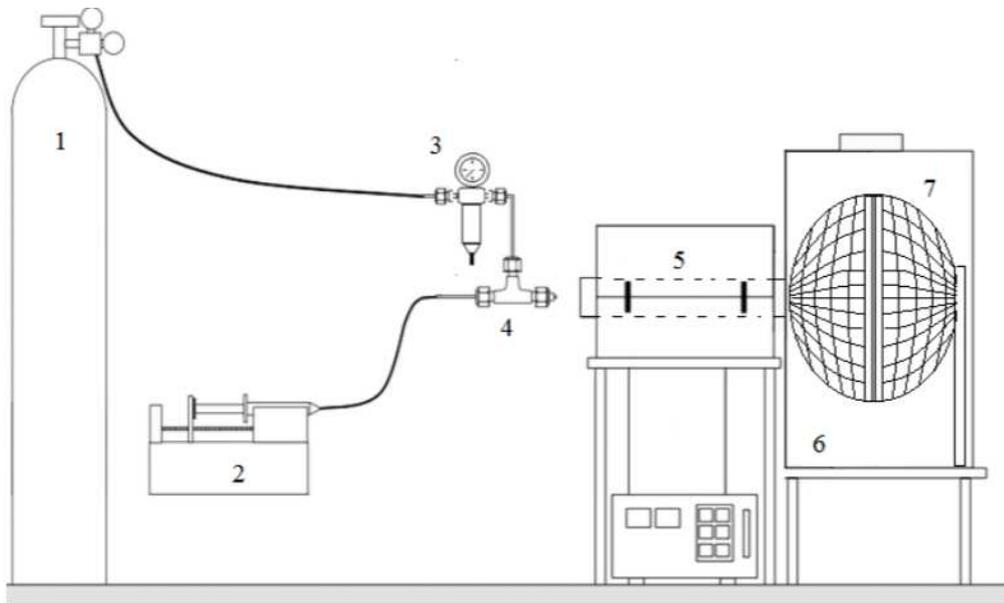


Figura 7 - Representação esquemática do aparato empregado na obtenção das nanofibras pelo método de fiação por sopro em solução em temperatura incrementada: (1) fonte de ar comprimido, (2) uma bomba de injeção para; (3) manômetro, (4) matriz de bicos concêntricos, (5) forno tubular, (6) câmara aquecida e (7) coletor estático.

Tabela 4 - Parâmetros utilizados no processo de fiação com aquecimento.

Parâmetros	
Taxa de injeção (mL.h ⁻¹)	6
Pressão do gás(MPa)	0,28
Distância de trabalho (cm)	80
Natureza do gás comprimido	Ar
Temperatura do forno (°C)	400

Tratamento Térmico

Para a remoção dos compostos orgânicos e formação das fases foi utilizado um forno tipo mufla. As nanofibras híbridas obtidas a partir da técnica de SBS foram calcinadas, a priori, nas temperaturas de 800, 900 e 1000 °C por 3 horas com taxa de aquecimento de 5°C/min.

Após a queima, as nanofibras obtidas foram submetidas à caracterização através das técnicas de difração de raios X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), de acordo com os parâmetros descritos na seção 3.2.3.

3.2.2. Obtenção dos *scaffolds* de PLA/PEG/CaP

Preparação da solução de fiação

Inicialmente, as fibras de CaP produzidas por SBS foram maceradas em um almofariz e em seguida dispersas em DMC com auxílio do agitador magnético e, posteriormente, de um banho ultrassônico. Nessa etapa variou-se a concentração da fibra em 5, 10 e 20% em relação à massa do PLA. Em seguida, o PEG foi adicionado à dispersão anterior sob agitação magnética a temperatura de 40°C, até completa dissolução do polímero. O PEG foi variado em 5, 20 e 30% em relação à massa do PLA. Posteriormente, o PLA foi adicionado à dispersão que permaneceu sob agitação magnética, em temperatura ambiente, até completa dissolução. Por fim, as soluções foram submetidas ao processo de fiação por SBS para obtenção dos *scaffolds* híbridos. A Tabela 5 apresenta os *scaffolds* produzidos após variação das concentrações de PEG e CaP.

Tabela 5 - Concentração das dispersões de fiação utilizadas para obtenção dos *scaffolds*.

Razão Ca/P: 1,67			Razão Ca/P: 1,1		
	PEG(%) ^a	CaP(%) ^a		PEG(%) ^a	CaP(%) ^a
5CaP ^{1,67}	-	5			
5/5CaP ^{1,67}	5	5			
20/10CaP ^{1,67}	20	10	20/10 CaP ^{1,1}	20	10
20/20CaP ^{1,67}	20	20	20/20 CaP ^{1,1}	20	20
30/10 CaP ^{1,67}	30	10	30/10 CaP ^{1,1}	30	10
30/20 CaP ^{1,67}	30	20	30/20 CaP ^{1,1}	30	20

^a Os percentuais são em relação à massa de PLA.

Produção dos *scaffolds* através da técnica de SBS

As dispersões precursoras dos *scaffolds* foram submetidas ao processo de fiação por SBS convencional proposto por Medeiros *et al.* (2009), como visto anteriormente na Figura 5. As dispersões foram alimentadas pelo sistema de injeção através do bico interno a uma taxa de injeção de 6 mL/h. Ar comprimido a uma pressão de 0,34 MPa foi utilizado como força-motriz para o processo de estiramento da solução, formação e secagem das fibras. O sistema de bicos concêntricos foi posicionado a uma distância de trabalho em torno de 70 cm e uma protrusão de 2 mm. Durante o trajeto ao coletor, o solvente da solução evapora formando os *scaffolds*. A Tabela 6 resume os parâmetros do processamento que foi utilizado neste caso.

Tabela 6 - Parâmetros do processo utilizados nas fiações em temperatura ambiente.

Parâmetros	
Taxa de injeção (ml.h ⁻¹)	6
Pressão do gás (MPa)	0,34
Distância de trabalho (cm)	70
Natureza do gás comprimido	Ar

3.2.3. Caracterização

Difração de raios X (DRX)

As nanofibras e os *scaffolds* obtidos foram avaliados por difratometria de raios X para a determinação das fases formadas. Os dados de difração de raios X foram obtidos em dois difractômetros (Shimadzu, XRD 6000) com radiação K α do Cu ($\lambda=0,154\text{nm}$), ambos na Universidade Federal de Campina Grande, sendo um na Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais e outro na Unidade Acadêmica de

Engenharia Química, em uma varredura de 5° por min, com 2 θ entre 20 e 60° para as nanofibras e 2 θ entre 10 e 60° para os scaffolds.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O aspecto morfológico das fibras e *scaffolds* foi avaliado através da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) em amostras previamente recobertas com uma camada condutora manométrica de ouro por “*sputtering*”. Dois equipamentos foram utilizados para realização dessa análise, um localizado na Universidade Federal de Campina Grande (SHIMADZU, modelo SSX-550) e outro na Universidade Federal da Paraíba (Leo 1430 da Zeiss). As micrografias foram realizadas com aumentos na faixa de 500 a 20000x, o que permitiu uma visão geral das estruturas estudadas.

Diâmetro médio e análise estatística

Os diâmetros das fibras e poros dos *scaffolds* foram verificados através do programa ImageJ (Versão 1.48, NIH, USA), com contagem de pelo menos 200 fibras por amostra. A análise estatística dos diâmetros médios das fibras foi realizada através do teste-t pelo programa OriginPro 8. O teste foi aplicado para verificar se as mantas fibrosas possuíam diferença significativa de diâmetros.

Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As amostras foram avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET, FeiTecnai, G2 F20), na Universidade Federal de São Carlos, auxiliando na análise tanto da morfologia dos *scaffolds* fibrilares produzidos como das nanopartículas de CaP incorporadas. As amostras foram dispersas em álcool, colocadas em um porta-amostras recoberto com filme de carbono amorfo e o ensaio foi realizado com tensão de operação de 200kV.

Espectroscopia no infravermelho com transformada de fourier (FT-IR)

As bandas de absorção características dos grupos presentes nos fosfatos de cálcio e *scaffolds* foram estudadas com técnica de espectroscopia no infravermelho em um equipamento da Shimadzu ATR-Fourier Transform Infrared Spectrophotometer, modelo IR Prestige-21 IR Affinity-1 FTIR 8400S (Kyoto, Japan).

As leituras foram realizadas no modo transmissão, aplicado numa faixa de número de onda de 4000 a 400 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} .

Termogravimetria (TG)

O comportamento térmico das amostras foi avaliado por termogravimetria com leituras simultâneas de análise térmica diferencial no equipamento da SHIMADZU (DTG-60H, Japão). Os ensaios foram realizados em cadinho de alumina mantendo uma quantidade de amostra fixa em 5 mg, sob atmosfera inerte (ar comprimido), taxa de aquecimento de 5°C/min, e temperatura final de 800°C.

Bioatividade *in-vitro*: ensaio em SBF (fluido corporal simulado)

O fluido corpóreo simulado foi preparado de acordo com a metodologia descrita por Kokubo e Takadama (2006). Resumidamente, para preparar 1000 ml de fluido corporal simulado (SBF), inicialmente aqueceu-se 700 ml de água destilada até 36,5°C \pm 1,5°C e, em seguida, adicionou-se os reagentes descritos na Tabela 7 um a um, em tempos determinados, até a completa dissolução. A adição do tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), provoca aumento do pH acima de 7,45, o que é corrigido com adição de HCL-1M. Ao final da adição do TRIS, o pH final da solução deve ser exatamente 7,40 em 36,5°C. Por fim, a água destilada é adicionada até o volume final de 1000 ml. O SBF deve ser armazenado em recipiente plástico com tampa hermética e mantido em baixa temperatura (5-10°C).

Tabela 7 - Reagentes utilizados para preparo do SBF.

Reagente	Quantidade
NaCl	8,035g
NaHCO ₃	0,355g
KCL	0,225g
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,231g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,311g
HCL 1 M	39 ml
CaCl ₂	0,292g
Na ₂ SO ₄	0,072g
Tris(hidroximetil)aminometano	6,118g

As amostras analisadas foram imersas em SBF (2mg/mL) e mantidas em uma shaker a 37°C por um período de 7 e 14 dias. Após este tempo, as amostras foram lavadas com água destilada e secas em dessecador na temperatura ambiente. As amostras foram posteriormente caracterizadas por MEV para verificação da formação ou não de camada de apatita.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Nanofibras de Fosfato de Cálcio

A Figura 11 mostra as micrografias típicas das fibras antes do processo de calcinação e também das fibras cerâmicas logo após o tratamento térmico a uma temperatura de 1000°C para as duas razões de Ca/P (1,67 e 1,1). As fibras verdes (Figuras 8 a e b) formaram uma estrutura similar a morfologia de um "chumaço de algodão" contendo fibras de seção transversal aparentemente circular, porém com muitas delas unidas umas às outras. Isto é função da baixa evaporação do solvente, principalmente a água destilada. Deve-se destacar que esta estrutura é altamente higroscópica dada a presença do PVP, de natureza hidrofílica, e da afinidade dos íons com a água.

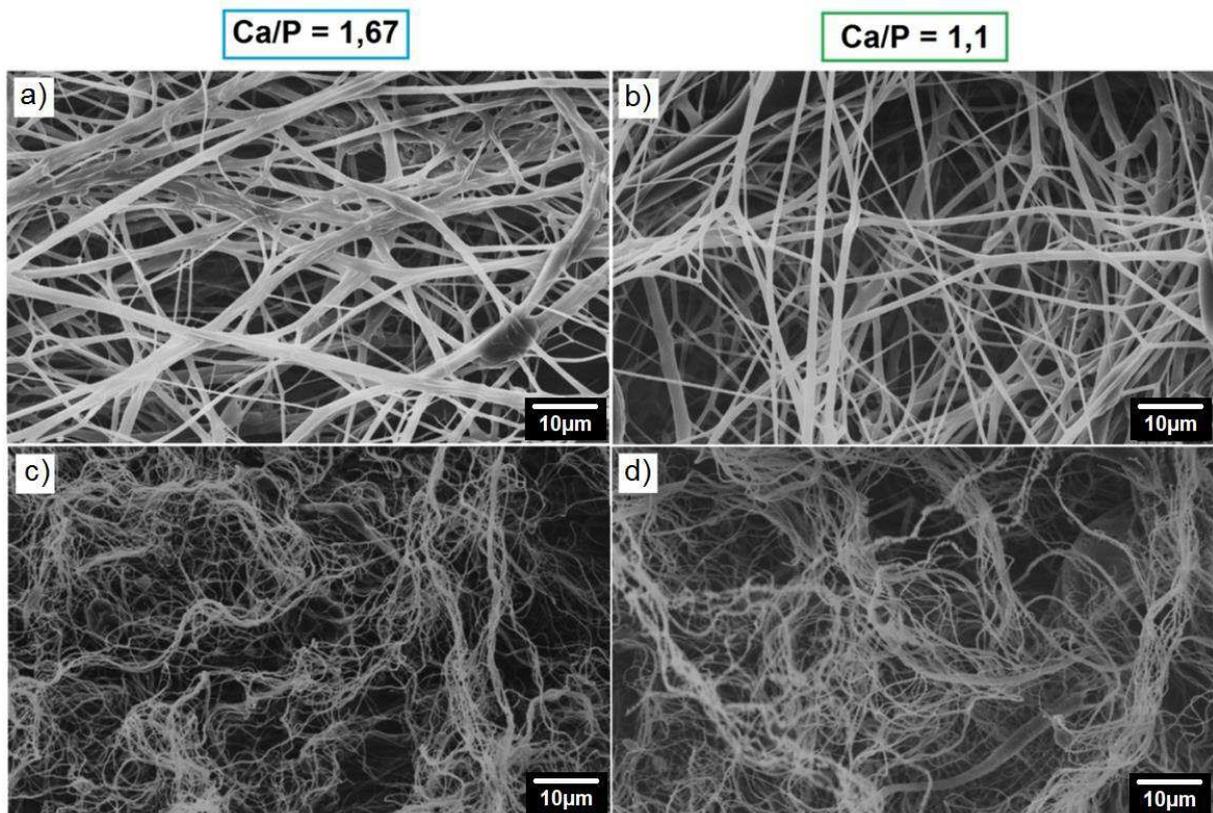


Figura 8 - Imagens micrográficas das fibras precursoras do fosfato de cálcio antes do tratamento térmico, (a) e (b), e após tratamento térmico, (c) e (d), para as razões de Ca/P de 1,67 e 1,1.

Após o processo de calcinação (Figura 8 c e d), a remoção do veículo polimérico levou a redução do diâmetro fibrilar, do volume do chumaço produzido e

ocorreu a formação de fibras de fosfato de cálcio quebradiças e descontínuas. Portanto, este material tem uso limitado para produção de *scaffolds* na engenharia de tecidos, uma vez que são materiais frágeis, não atendendo aos requisitos de propriedades mecânicas desejáveis. Isto pode ser resolvido através da produção de materiais híbridos do tipo compósitos, como será mostrado adiante.

A Figura 9 apresenta os histogramas contendo a distribuição dos diâmetros das fibras antes da calcinação (a) e (b), e das fibras calcinadas a 1000°C, (c) e (d), para ambas as razões Ca/P. Para a razão Ca/P=1,67, as fibras verdes apresentaram diâmetros médios de 827 ± 495 nm com larga faixa de distribuição entre 500 a 1000 nm e as fibras produzidas após a queima a 1000°C resultaram em diâmetros na ordem de 243 ± 106 nm com predominância na faixa de 200 a 300 nm. Para a razão Ca/P=1,1 as fibras produzidas antes da queima apresentaram diâmetros médios de 922 ± 413 nm com larga faixa de distribuição entre 700 a 1200 nm, enquanto que as fibras produzidas após a queima a 1000°C apresentam diâmetros na ordem de 292 ± 128 nm com predominância na faixa de 200 a 300 nm. O p-valor encontrado no teste t de comparação de diâmetros das fibras calcinadas foi de 0,308 ($p > 0,05$), indicando que não há diferença estatisticamente significativa entre os diâmetros das fibras. Resultado oposto foi encontrado para o mesmo teste ao comparar os diâmetros das fibras antes do processo de calcinação. O resultado do p-valor foi de 0,04 ($p < 0,05$), ou seja, para esse nível de significância, os diâmetros das fibras são estatisticamente diferentes.

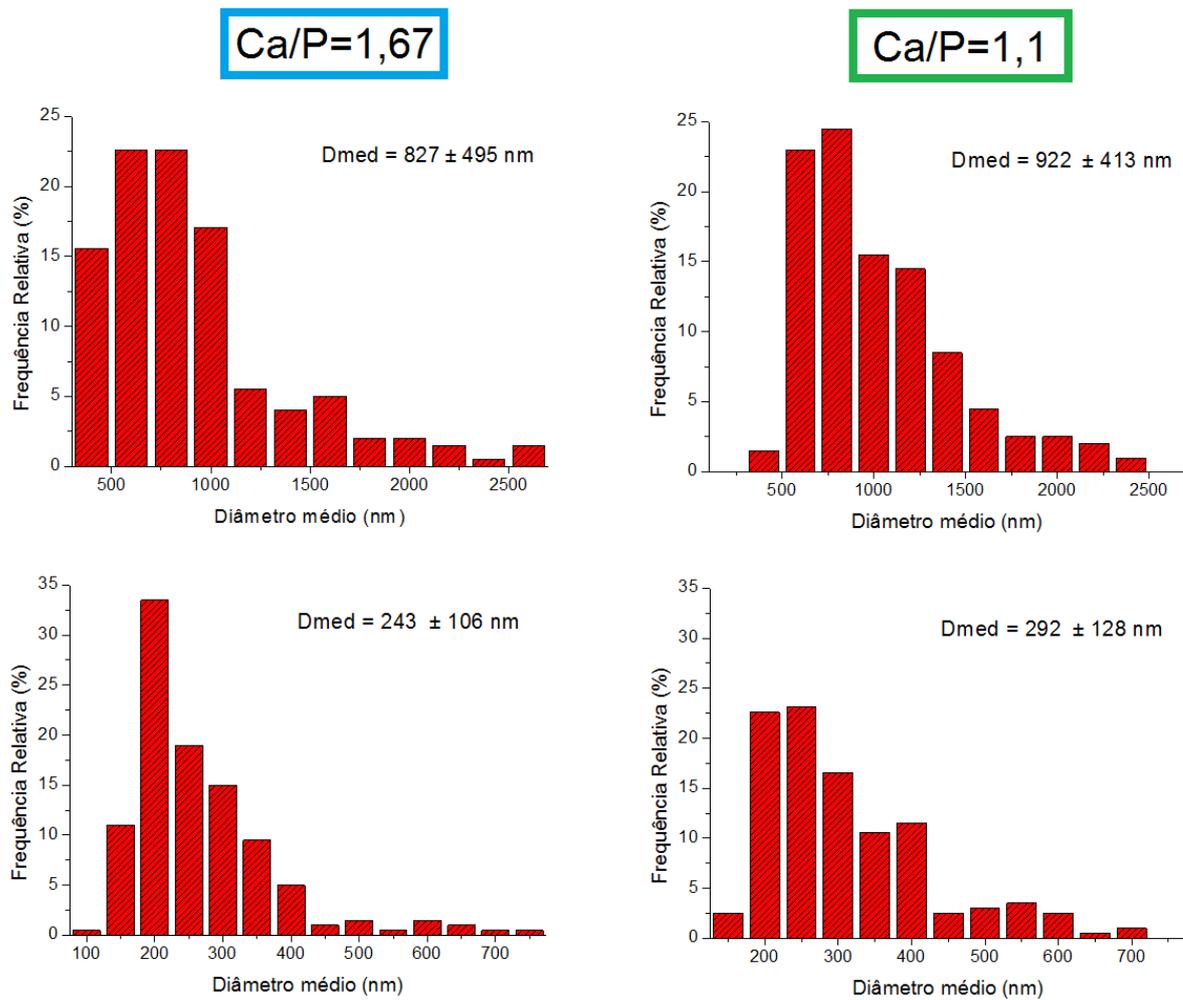


Figura 9 - Histogramas representativos das distribuições dos diâmetros das fibras precursoras do fosfato de cálcio antes da calcinação (a) e (b), e após calcinação a 1000°C, (c) e (d).

Os diâmetros médios das fibras, assim como seus respectivos desvios padrões estão apresentados na Tabela 8. Tais diâmetros comprovam a capacidade da técnica de SBS para obtenção de nanofibras cerâmicas e com distribuição de diâmetros de fibras relativamente estreita. Dados similares aos encontrados por Da Costa Farias *et al.* (2015) e Costa *et al.* (2016) que obtiveram fibras de mulita e TiO_2 e ZnO, respectivamente.

Tabela 8 - Diâmetro médio e desvio padrão das fibras de fosfato de cálcio obtidas pela técnica de SBS.

	Diâmetro médio (nm)	
	Razão Ca/P: 1,67	Razão Ca/P: 1,1
Antes da calcinação	827 ± 495	922 ± 413
1000°C	243 ± 106	292 ± 128

As Figuras 10 e 11 mostram os difratogramas das fibras de fosfato de cálcio obtidas pela metodologia previamente discutida com razões Ca/P de 1,67 e 1,1, respectivamente. Os padrões de difração da Figura 10 (Ca/P=1,67), mostram que todas as amostras apresentam a fase de hidroxiapatita (HAp), sendo os picos identificados com base na carta cristalográfica JCPDS 09-0432, o que está de acordo com a literatura (Ofudje *et al.*, 2017). Entretanto, picos característicos de outras duas fases estão presentes: o carbonato de cálcio (CaCO₃) (carta JCPDS 85-1108) em todas as amostras e o óxido de cálcio (carta JCPDS 82-1690) nas amostras com temperaturas inferiores a 1000°C.

De modo similar, os padrões de difração da Figura 11 (Ca/P=1,1), também mostram que há formação de uma fase principal, a hidroxiapatita (HAp) (carta JCPDS 09-0432), em todas as amostras. Entretanto, devido à variação da razão Ca e P para essa composição houve formação em pequena quantidade de outra fase de fosfato de cálcio: o β-fosfato tricálcico (β-TCP) (carta JCPDS 09-0169), além da presença do carbonato de cálcio (CaCO₃) (carta JCPDS 85-1108).

Na amostra Ca/P = 1,1, pode-se observar que com aumento da temperatura de calcinação há o aumento da intensidade dos picos de HAp e de β-TCP. Em ambas amostras verifica-se que há diminuição da largura dos picos, com o aumento da temperatura de calcinação indicando um aumento da cristalinidade do material produzido (Rusu *et al.*, 2005).

A formação de CaO em detrimento à de HAp é favorecida quando a reação entre o TEP e nitrato de cálcio é incompleta, devido a reação entre os precursores ser lenta, sendo necessário um maior tempo de agitação para formação plena das ligações P-O-Ca, de acordo com a literatura (Eshtiagh-Hosseini *et al.*, 2007; Natarajan e Rajeswari, 2008). O carbonato de cálcio (CaCO₃) é outra impureza bastante comum na síntese de HAp por sol-gel, presente, em diferentes graus, em ambas as amostras. A formação do CaCO₃ também é decorrente de reação incompleta entre os precursores (Natarajan e Rajeswari, 2008).

Pode-se observar através dos difratogramas apresentados que houve menor formação do CaCO₃ nas amostras em que a razão Ca/P=1,1. Indicando que a presença de uma maior concentração do precursor do fósforo induz com mais facilidade a formação do fosfato de cálcio, reduzindo a possibilidade de formação de

impurezas. Além disso, o CaCO_3 tende a se decompor quando há aumento da temperatura de calcinação.

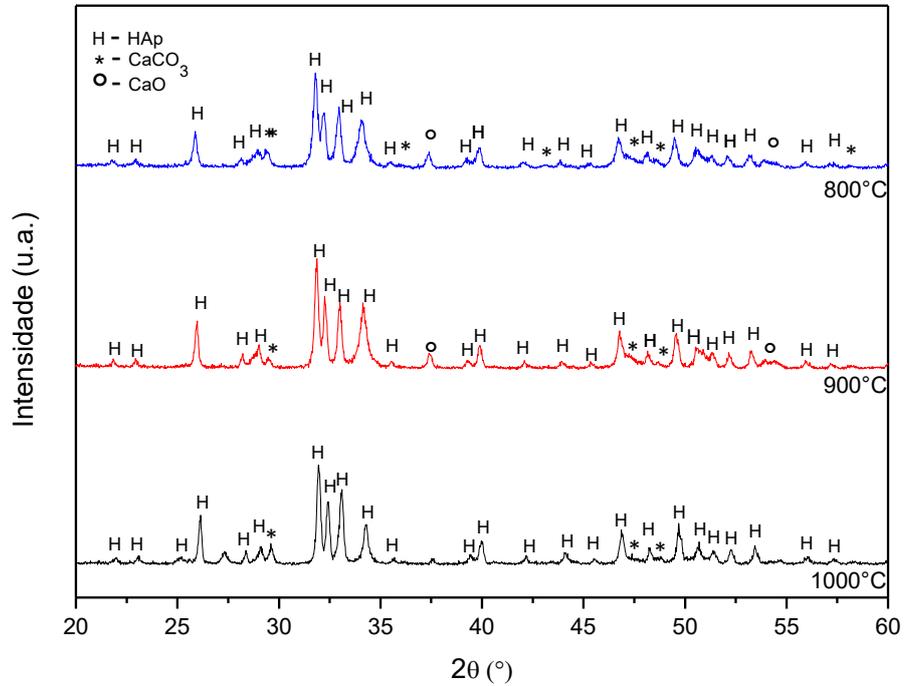


Figura 10 - Difratogramas de raios X das fibras de fosfato de cálcio com temperaturas de queima de 800, 900 e 1000°C (Ca/P = 1,67).

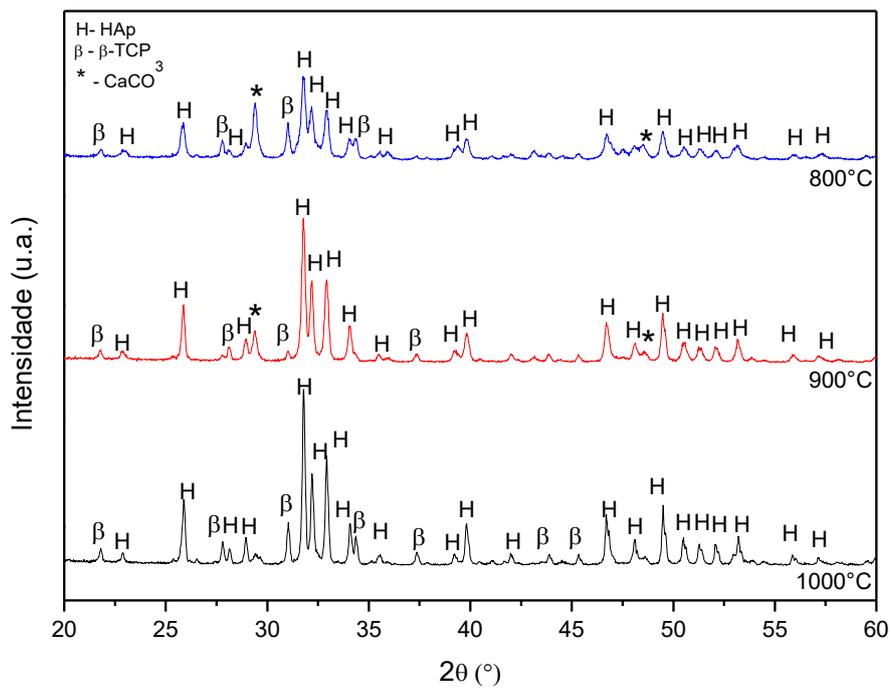


Figura 11 - Difratogramas de raios X das fibras de fosfato de cálcio com temperaturas de queima de 800, 900 e 1000°C (Ca/P = 1,1).

Frente a isso, as fibras utilizadas posteriormente para produção dos *scaffolds* foram calcinadas a temperatura de 1000°C, objetivando uma biocerâmica com maior percentual de fosfato de cálcio. Entretanto, é importante ressaltar que o aumento de temperatura tende a provocar o aumento da rigidez das fibras e sua fragilização, assim, as fibras obtidas após o tratamento térmico em temperaturas mais elevadas apresentaram aspecto mais frágil, conforme mencionado anteriormente.

A Figura 12 ilustra os espectros de FTIR das fibras de fosfato de cálcio obtidas por SBS, após calcinação a 1000°C, para as duas razões Ca/P. A técnica de espectroscopia de infravermelho foi utilizada para identificar bandas de absorção correspondentes aos grupos funcionais como P-O, H-O, C-O e outros.

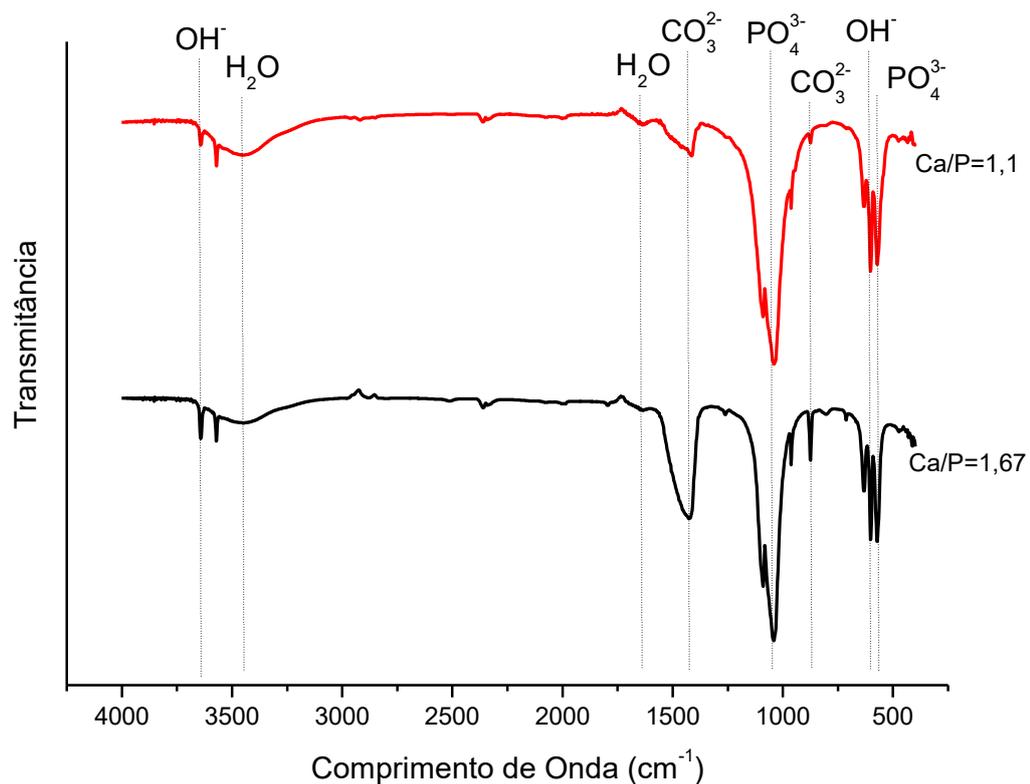


Figura 12 - Espectros de FTIR das fibras de fosfato de cálcio, calcinadas a 1000°C, para duas razões de Ca/P.

Os espectros apresentam bandas características do fosfato de cálcio: abanda em torno de 1030-1090 cm⁻¹ é atribuída à vibração do alongamento do PO₄³⁻ enquanto que a banda em torno de 550-650 cm⁻¹ é atribuída à vibração

deformacional da PO_4^{3-} (Lü *et al.*, 2007); as bandas em 620 cm^{-1} e 3600 cm^{-1} são atribuídas ao alongamento vibracional do grupo hidroxila (OH^-) (Liuyun *et al.*, 2012). Além disso, as bandas em 3450 cm^{-1} e 1637 cm^{-1} são ambas relacionadas à água adsorvida, enquanto que as bandas em 876 cm^{-1} e 1450 cm^{-1} são referentes ao estiramento assimétrico de C-O, presentes na forma de carbonatos. O carbonato é substituído na rede do CaP durante a síntese e está relacionado à concentração de CO_3^{2-} na solução. Esses íons têm sua origem a partir do gás carbônico, presente no ar, e na utilização de soluções que contenham íons carbonatos. A presença do carbonato no CaP promove maior solubilidade em meio aquoso (Legeros, 1991).

A Figura 13 mostra as curvas da análise termogravimétrica das fibras não calcinadas, obtidas por SBS com variação da razão Ca/P. A perda de massa apresentou um padrão composto por quatro etapas principais para ambas as razões. O primeiro estágio de perda de massa correspondeu a 15% e foi observado durante uma faixa de temperatura de aproximadamente $10\text{-}170^\circ\text{C}$. Este estágio corresponde à evaporação da água cristalina e adsorvida no precursor e do solvente. O segundo estágio de perda de massa começou aproximadamente em 170°C até 255°C , correspondendo a 8%, o que provavelmente está relacionado à remoção e decomposição dos precursores inorgânicos.

O terceiro estágio de perda de massa correspondeu a 15% e ocorreu numa faixa de temperatura entre $250\text{-}350^\circ\text{C}$. Este estágio pode ser atribuído à primeira etapa de degradação do PVP, referente à degradação do grupo lateral do polímero. Enquanto que a outra etapa acontece entre $350\text{-}600^\circ\text{C}$, resultante da oxidação e decomposição do polímero residual. As perdas de massa que ocorreram na faixa de $400\text{-}600^\circ\text{C}$ correspondem possivelmente também à decomposição do TEP e à formação de outras fases. Sendo observado nessa faixa maior redução da amostra ($\sim 36\%$). Entretanto, ao aumentar a temperatura para além dos 600°C não há grandes perdas de massa. Assim, é provável que a fibra a 600°C produza um resíduo não volátil contendo predominantemente fosfato de cálcio. A perda total de massa observada foi de 76,3% e 73,4%, para as razões Ca/P igual a 1,67 e 1,1, respectivamente. Dados semelhantes foram encontrados na literatura (Garibay-Alvarado *et al.*, 2017; Ghosh e Sarkar, 2017).

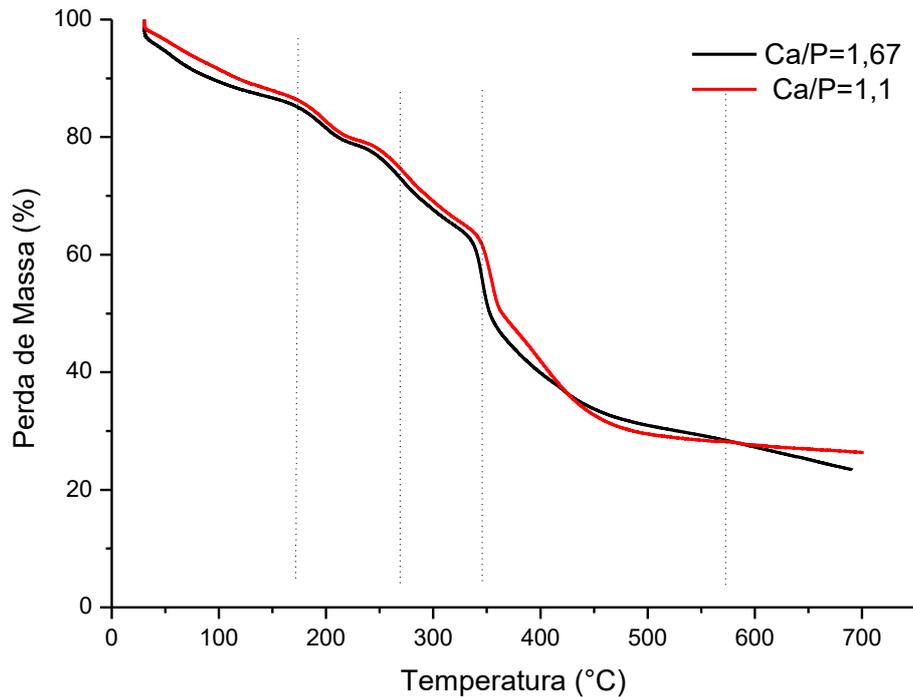


Figura 13 - Análise termogravimétrica das fibras precursoras de fosfato de cálcio antes da calcinação obtidas por SBS para as duas razões de Ca/P.

4.2. *Scaffolds* de PLA/PEG/Fosfato de Cálcio

A Figura 14 mostra a fotografia de um *scaffold* típico de PLA/PEG/CaP obtido através da técnica de SBS, evidenciando sua estrutura do tipo "chumaço de algodão". No *scaffold* híbrido cada componente tem uma função estrutural específica, assim como encontrado nos materiais compósitos. O polímero utilizado fornece a flexibilidade estrutural necessária, dando também sustentação e proteção ao fosfato frágil. Além do mais, o polímero pode controlar o estado de liberação dos íons conforme este degrada no meio. O PLA, polímero hidrofóbico, degrada lentamente no fluido orgânico, e pode ser misturado (formando blendas) junto a polímeros hidrofílicos, como o PEG, para aumentar sua hidrofiliicidade e melhorar a liberação.

Além de afetar o processamento do PLA, a combinação de PLA/PEG pode levar a várias mudanças nas propriedades dos *scaffolds*, incluindo suas propriedades estruturais, de superfície e mecânicas. Portanto, conhecer o efeito da concentração de PEG nas propriedades das misturas e seu comportamento de

degradação é de grande importância para encontrar a interação correta entre a concentração de PEG, o desempenho do material e o processo de fabricação.

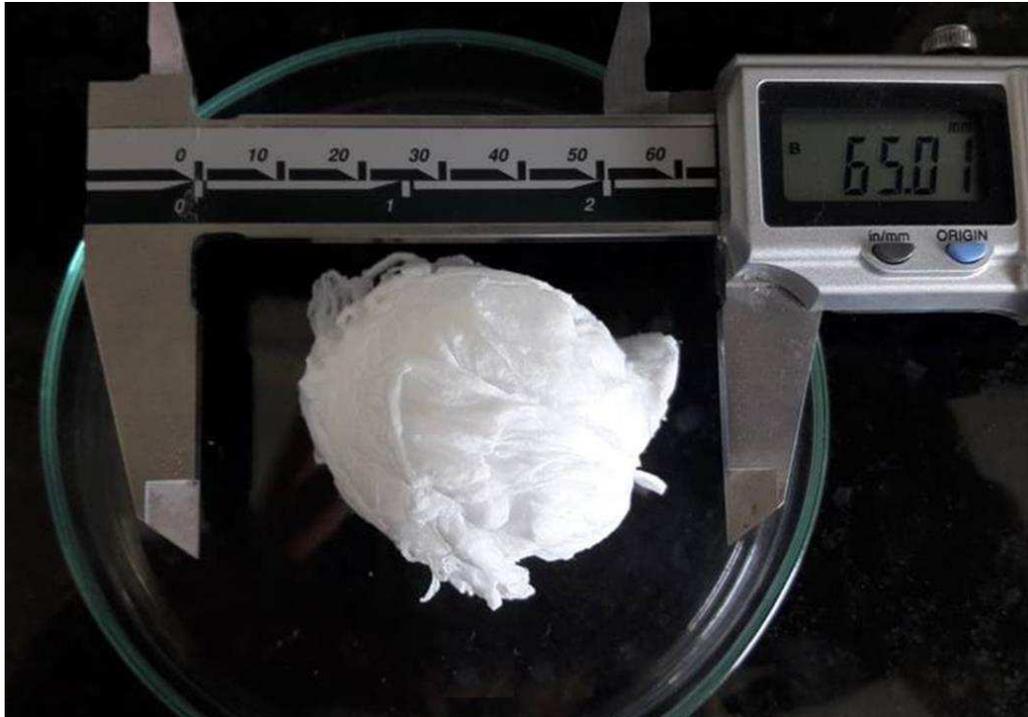


Figura 14 - Fotografia do *scaffold* híbrido produzido por SBS.

Ensaio piloto foram realizados a fim de observar a modificação da morfologia das fibras após a adição do PEG, sendo produzidas as amostras $5\text{CaP}^{1,67}$ e $5/5\text{CaP}^{1,67}$. As micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura estão apresentadas na Figura 15. Pode-se fazer uma avaliação da morfologia dos primeiros *scaffolds* híbridos obtidos com fosfato de cálcio ($\text{Ca/P}=1,67$). Observa-se a presença de um grande número de "beads" (estrutura do tipo contas) na amostra $5\text{CaP}^{1,67}$, o que podem está relacionados com a baixa dispersão do CaP, assim como com a viscosidade da solução de fiação. Muitas fibras aparecem unidas em função da baixa evaporação do DMC. O *scaffold* PLA/5H apresenta diâmetro médio de fibras equivalente a 713 ± 333 nm.

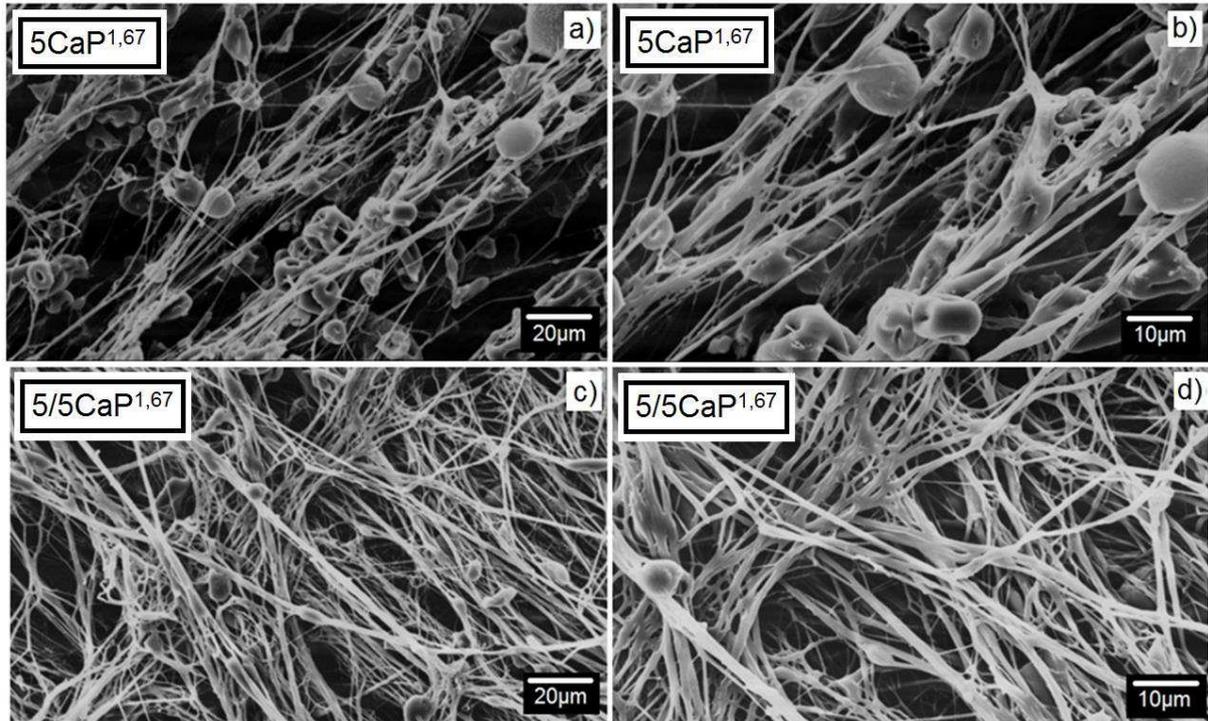


Figura 15 - Imagens micrográficas dos *scaffolds* de $5\text{CaP}^{1,67}$ (a e b) e $5/5\text{CaP}^{1,67}$ (c e d).

Assim, soluções mais viscosas podem possibilitar a formação de *scaffolds* uniformes, proporcionando a formação de sistemas com menor quantidade de “beads”, com a possibilidade de ocorrer o aumento do diâmetro das fibras. Avaliando-se a morfologia do *scaffold* $5/5\text{CaP}^{1,67}$ verifica-se que apresentou diâmetro médio na ordem de 721 ± 385 nm. O p-valor encontrado no teste t ao comparar os diâmetros dos dois *scaffolds* apresentados na Figura 15 foi de 0,874. Valor maior do que a significância de 0,05, indicando que os diâmetros das fibras não são significativamente diferentes. Através da Figura 15 (c e d) pode-se observar que apesar do diâmetro ser muito próximo ao *scaffold* anterior, a adição do PEG, mesmo que em baixas quantidades, tornou possível a redução de defeitos na morfologia do *scaffold* obtido. Assim, acredita-se que o PEG além de atuar aumentando a hidrofiliabilidade do sistema também contribuiu na redução da viscosidade e/ou características viscoelásticas da solução permitindo diminuir a quantidade de defeitos gerados no processo de fiação.

Com o intuito de melhor avaliar a influência do PEG nas fibras produzidas e obter materiais com uma concentração de CaP que proporcione melhor aplicabilidade, aumentou-se a quantidade de PEG para 20 e 30% e a quantidade de CaP para 10 e 20%, além de serem estudados os fosfatos com dois tipos de razão Ca/P (1,67 e 1,1).

Na Figura 16 estão apresentados os *scaffolds* com concentração de PEG de 20%, enquanto que a Figura 17 mostra os *scaffolds* com 30% de PEG. A estrutura superficial das *scaffolds* produzidos variou após a adição do CaP. Em comparação com uma morfologia suave das nanofibras de PLA/PEG (Figuras 16 – a, 17 - a), a adição do CaP resultou em uma estrutura com alguns aglomerados nas superfícies das fibras. Os *scaffolds* mostraram uma estrutura aleatoriamente interligada e altamente porosa, sendo possível observar que a maior concentração desse polímero (30%) provocou uma sutil redução da quantidade de “beads”, assim como formação de uma morfologia mais uniforme, com fibras menos unidas. Entretanto, nota-se que a razão Ca/P também influenciou na morfologia dos *scaffolds*.

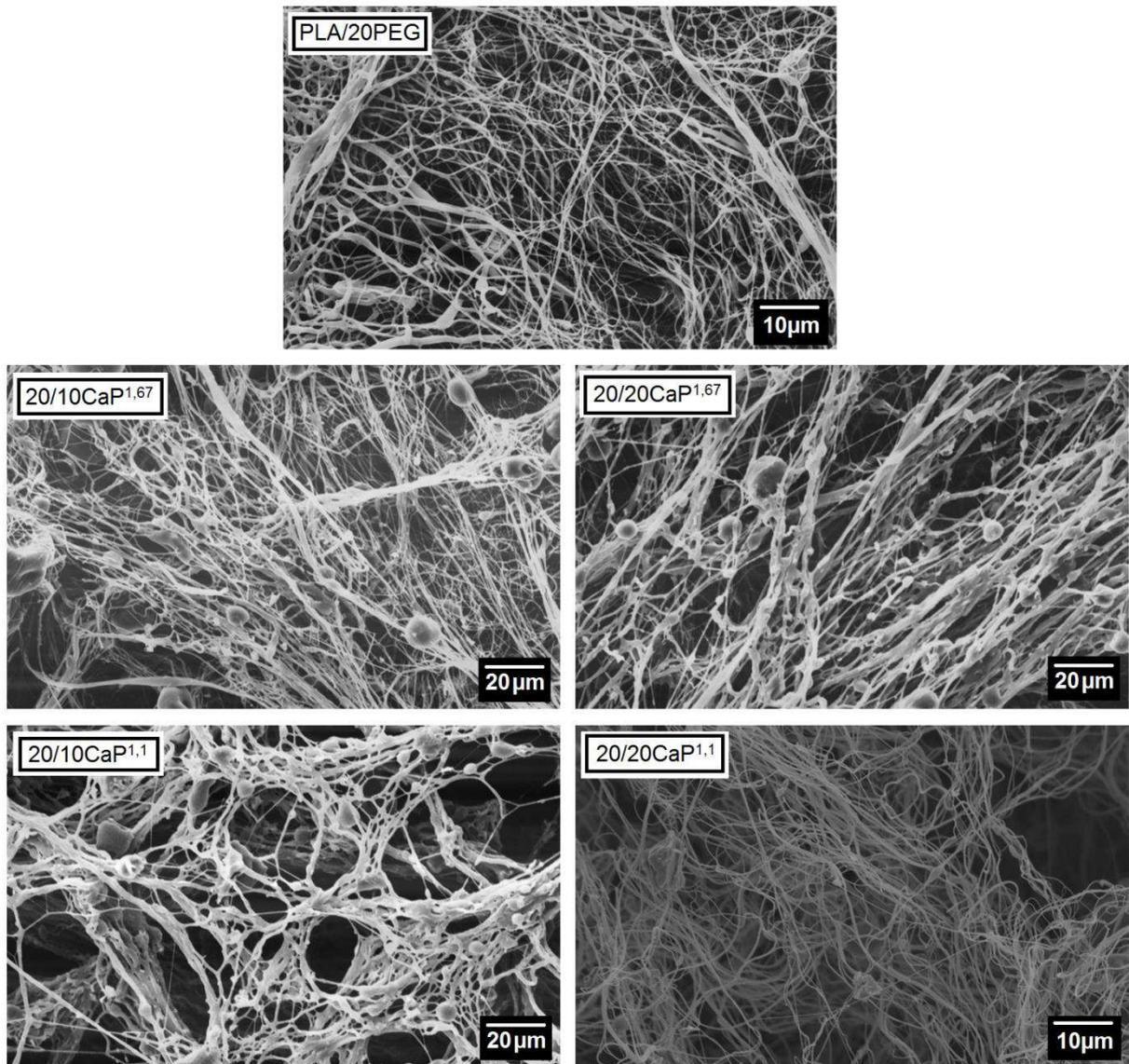


Figura 16 - Imagens micrográficas dos *scaffolds* com PLA e 20%PEG: sem adição do CaP (a); variando a concentração do CaP em 10% (b) e 20% (c) para a razão Ca/P=1,67 e 10% (d) e 20% (e) para razão Ca/P=1,1.

A viscosidade é uma das características que mais influem na produção de fibras e conseqüentemente na distribuição de diâmetro, pois a formação das fibras está correlacionada com o grau de emaranhamento das moléculas em solução (Ito *et al.*, 2005). Nesse sentido, o efeito plastificante do PEG é de grande ajuda para facilitar e otimizar o processo de fabricação a baixa temperatura.

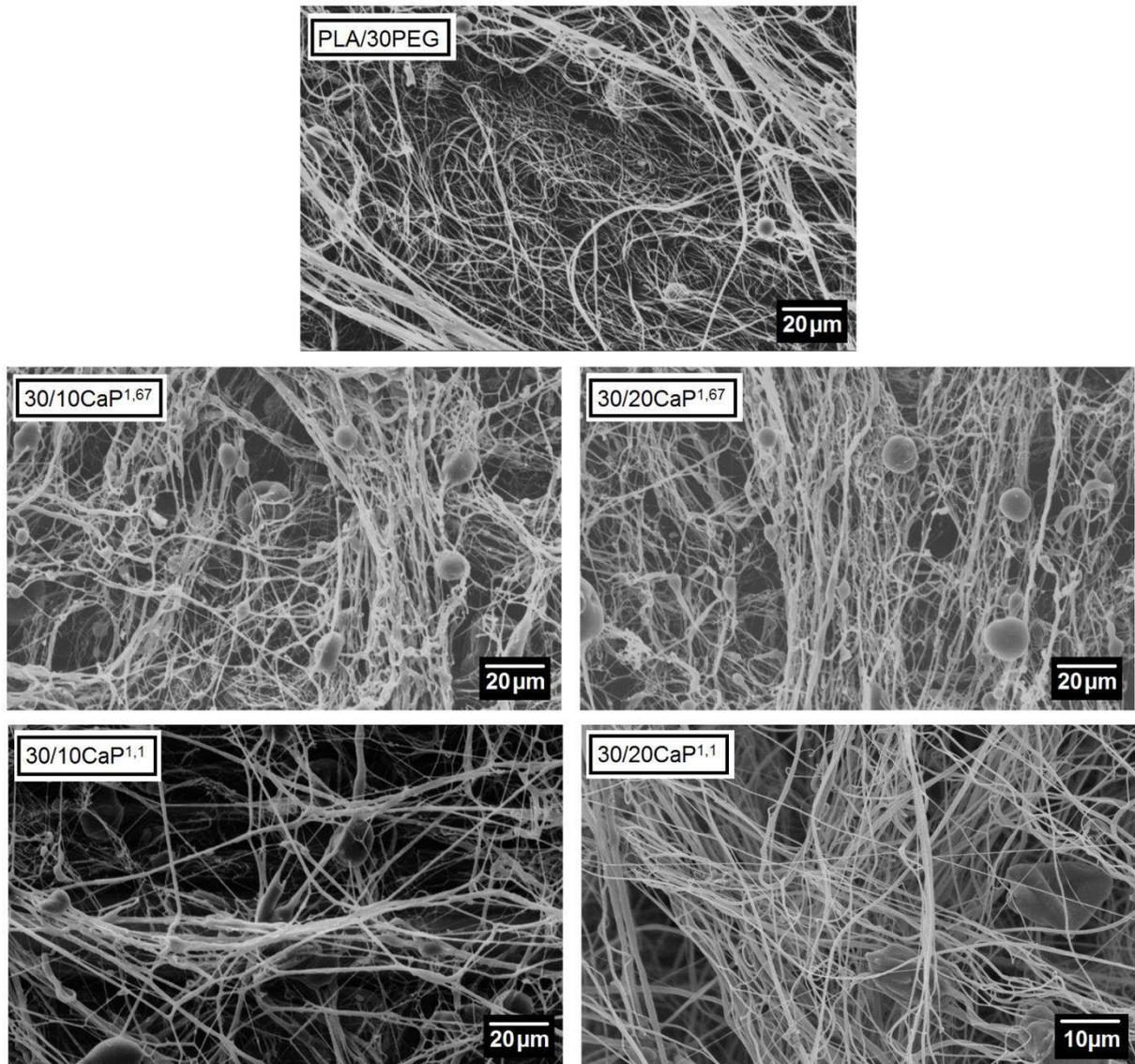


Figura 17 - Imagens micrográficas dos *scaffolds* com PLA e 30%PEG: sem adição do CaP (a); variando a concentração do CaP em 10% (b) e 20% (c) para a razão Ca/P=1,67 e 10% (d) e 20% (e) para razão Ca/P=1,1.

Os *scaffolds* produzidos com Ca/P=1,1 apresenta estrutura mais aberta e com redução significativa da quantidade de “beads” (Figuras 16 e 17 – (d) e (e)). Além disso, o aumento da incorporação do fosfato formado por HAp (Ca/P=1,67) gerou aumento dos diâmetros fibrilares, enquanto que para o fosfato que apresenta

β -TCP em sua composição (Ca/P=1,1), houve redução do diâmetro médio das fibras.

As Figuras 18 e 19 apresentam os histogramas contendo a distribuição dos diâmetros das fibras dos *scaffolds* para as razões Ca/P= 1,67 e 1,1, respectivamente. Para ambas as razões, observa-se que o aumento da concentração do PEG não gerou alterações significativas no diâmetro médio das fibras, assim como na sua faixa de distribuição. Resultados comprovados após a aplicação do teste t-Student, onde $p > 0,5$, indicando que para esse nível de significância, os diâmetros não são estatisticamente diferentes.

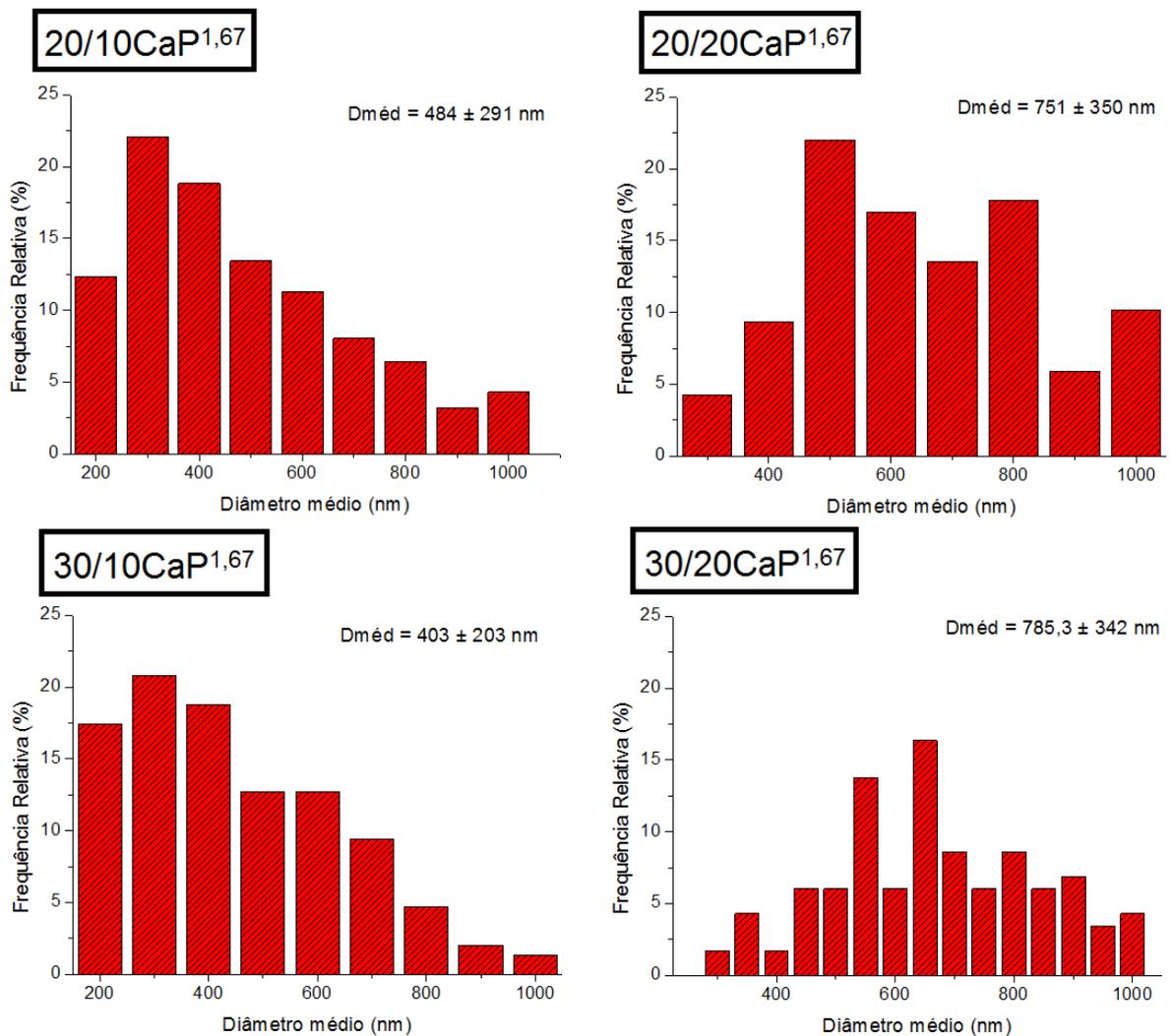


Figura 18 - Histogramas representativos das distribuições dos diâmetros das fibras dos scaffolds híbridos (CaP=1,67).

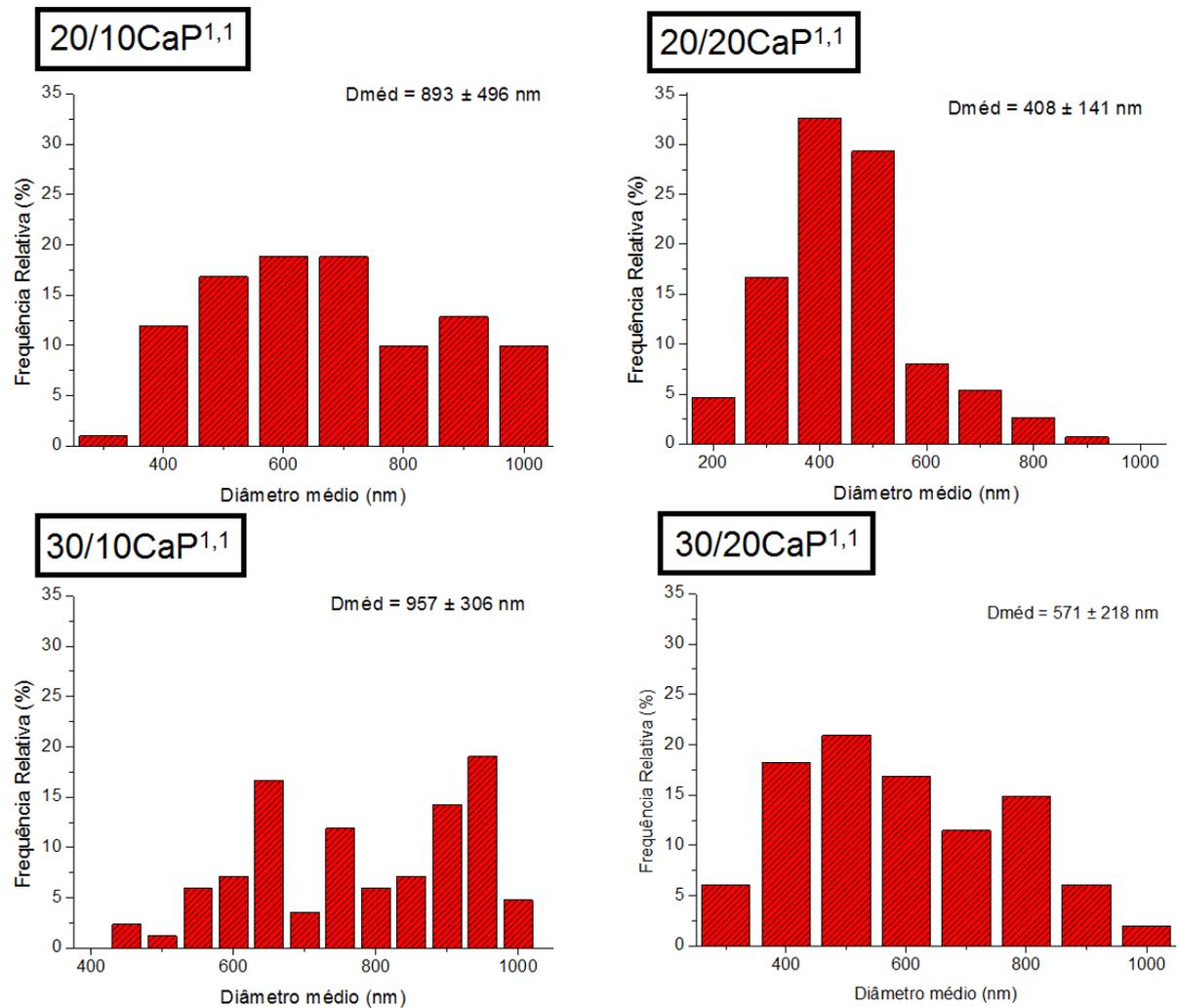


Figura 19 - Histogramas representativos das distribuições dos diâmetros das fibras dos scaffolds híbridos (CaP=1,1).

Nos scaffolds em que foram utilizados CaP com razão Ca/P=1,67, a incorporação de uma maior quantidade de fosfato (20/20CaP^{1,67} e 30/20CaP^{1,67}) gerou aumento considerável no diâmetro médio das fibras, além de aumentar a faixa de distribuição dos tamanhos. De modo oposto, para a razão Ca/P=1,1, a maior concentração do fosfato (20/20CaP^{1,1} e 30/20CaP^{1,1}) gerou redução no diâmetro médio das fibras. A comparação dos diâmetros dos scaffolds 20/10CaP^{1,67}-20/20CaP^{1,67}, 30/10CaP^{1,67}-30/20CaP^{1,67}, 20/10CaP^{1,1}-20/20CaP^{1,1} e 30/10CaP^{1,1}-30/20CaP^{1,1} também foi realizada estatisticamente, indicando que os diâmetros médios são significativamente diferentes, pois apresentaram p-valores < 0,5.

Através da Tabela 9, pode-se observar os diâmetros médios das fibras dos scaffolds produzidos por SBS e seus respectivos desvios padrões. Esses tamanhos

coincidem com a faixa de fibras de colágeno do tecido ósseo (100–2000 nm) (Murugan e Ramakrishna, 2005), o que viabiliza uma semelhança estrutural com os *scaffolds* produzidos.

Tabela 9 - Diâmetro médio e desvio padrão dos *scaffolds* híbridos produzidos por SBS
Diâmetro médio (nm)

	Razão Ca/P: 1,67		Razão Ca/P: 1,1
20/10CaP ^{1,67}	484 ± 291	20/10CaP ^{1,1}	893 ± 496
20/20CaP ^{1,67}	751 ± 350	20/20CaP ^{1,1}	408 ± 141
30/10CaP ^{1,67}	403 ± 203	30/10CaP ^{1,1}	957 ± 306
30/20CaP ^{1,67}	785 ± 342	30/20CaP ^{1,1}	571 ± 218

Em materiais híbridos, a estrutura superficial e interna assim como a dispersão dos componentes é de fundamental importância para as propriedades dos materiais. Para a aplicação na engenharia de tecidos, a distribuição do CaP dentro e fora das fibras influenciará na citocompatibilidade dos *scaffolds*, como adesão e proliferação celular (Šupová, 2009). Portanto, a morfologia dos *scaffolds* fibrilares de PLA/PEG/CaP (20/20CaP^{1,1}) produzidos por SBS, assim como das nanopartículas de CaP incorporadas foi investigada por MET, como mostrado na Figura 23.

A Figura 20 mostra a micrografia de MET da amostra 20/20CaP^{1,1}, típica dos *scaffolds* aqui produzidos. Assim como nas micrografias de MEV, observa-se fibras uniformes de PLA/PEG de seção transversal aparentemente circular, porém com os detalhes das nanopartículas de CaP incorporadas. O CaP sintetizado possui dois tipos de morfologia: uma na forma de partículas pequenas incorporadas na fibra híbrida (Figura 20 - c e d) com tamanho variando entre 10 – 100 nm, apresentando regiões em que as partículas estão dispersas e regiões com formação de aglomerados; a outra morfologia presente está na forma acicular (Figura 20 – e e f), com comprimento e diâmetro médio de 406 ± 196 nm e 134 ± 101 nm, respectivamente. Observa-se também que mesmo com o uso de alta porcentagem de CaP (20%), as partículas residiam principalmente incorporadas nas fibras com ligeira aglomeração, que pode estar relacionada a sua natureza hidrofóbica, como mostra a literatura (Lao *et al.*, 2011).

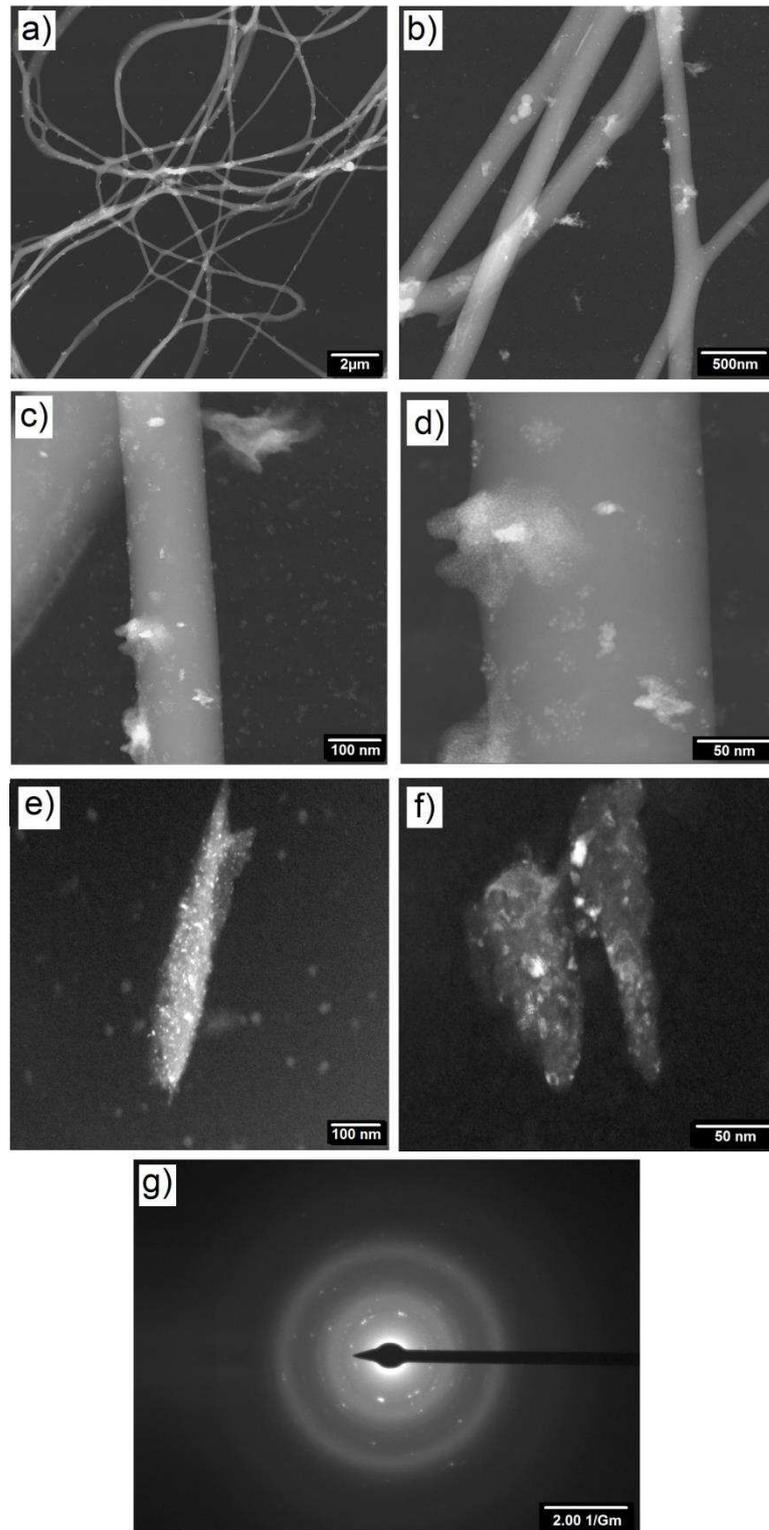


Figura 20 - Micrografia de MET do *scaffold* 20/20CaP^{1.1} em diferentes ampliações (a,b,c e d) e da partícula de CaP incorporada (e, f). Padrão de difração de elétrons de área selecionada para o *scaffold* 20/20CaP^{1.1} (g).

O padrão de difração de elétrons (SAED) da área selecionada (Figura 20 - e) obtido da estrutura do *scaffold* selecionado consiste de halos e pontos de difração.

Os halos indicam a natureza predominante amorfa relacionada à matriz de PLA após o processo de fiação por SBS, o que corrobora com os resultados de raios-X de Santos *et al.* (2018) e os encontrados aqui (vistos mais à frente). Os pontos de difração estão provavelmente relacionados às partículas de CaPs e ao pequeno tamanho de suas partículas dispersas ao longo da fibra (Koch *et al.*, 2007; Bianco *et al.*, 2010). Dados da literatura indicam padrões de difração semelhantes para partículas de CaPs (Dong *et al.*, 2003; Mayer *et al.*, 2008; Arkharova *et al.*, 2016; Zhong *et al.*, 2017).

Nas Figuras 21 e 22 estão representados os difratogramas dos *scaffolds* obtidos por SBS para as diferentes razões Ca/P.

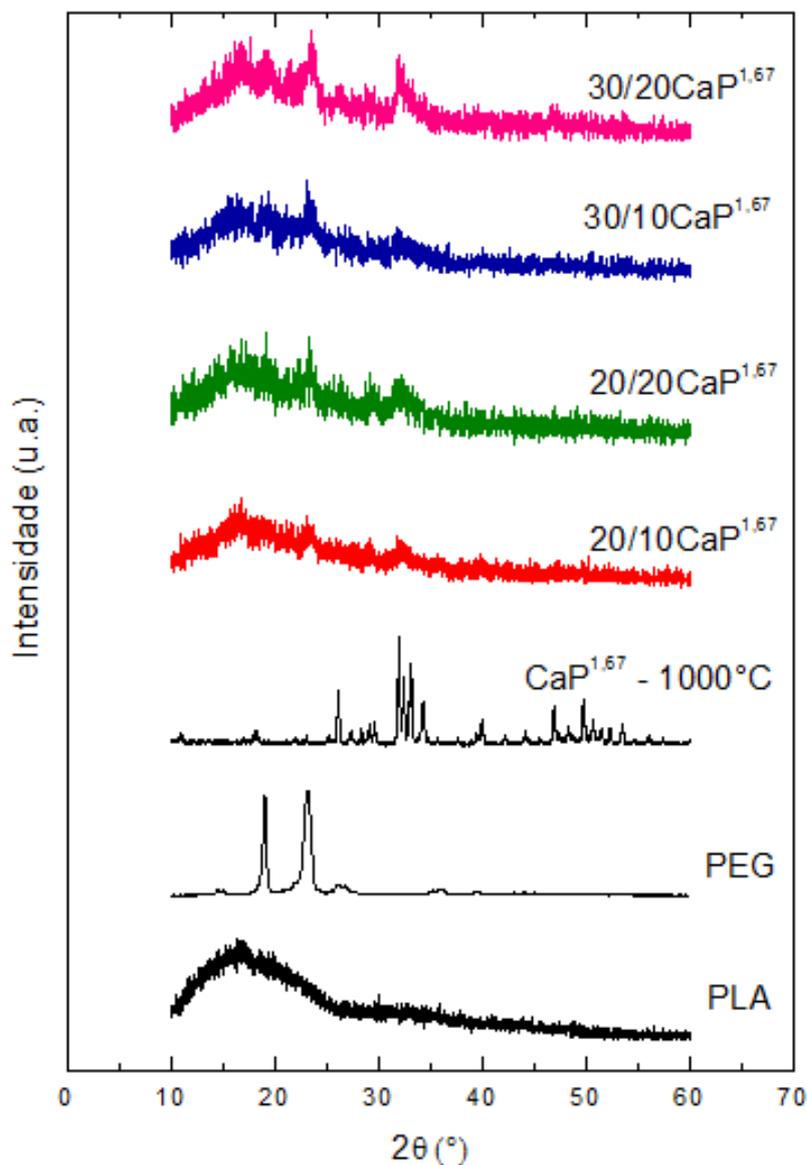


Figura 21 - Difratogramas de raios X dos scaffolds híbridos obtidos pela técnica de SBS, com razão Ca/P=1,67.

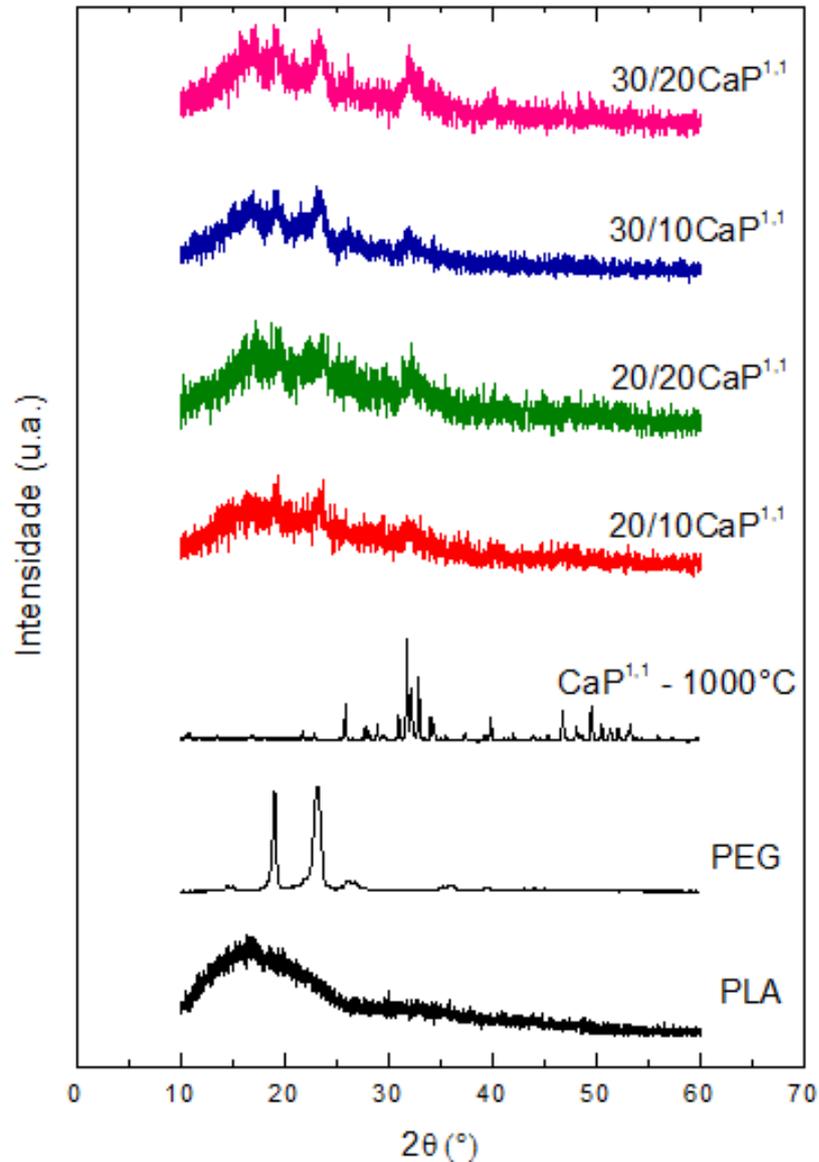


Figura 22 - Difractogramas de raios X dos *scaffolds* híbridos obtidos pela técnica de SBS, com razão Ca/P=1,1.

Através das Figuras 21 e 22 pode-se observar que os *scaffolds* apresentam padrões semelhantes de DRX. O PLA possui um halo amorfo na faixa de $2\theta = 10^\circ$ - $24,5^\circ$, o que indica seu comportamento amorfo da fibra. Enquanto que o PEG apresenta picos mais intensos em cerca de $2\theta = 19,20^\circ$ e $2\theta = 23,28^\circ$ destacando sua estrutura semicristalina, que é evidenciado nos *scaffolds* que possuem a maior quantidade desse polímero. Nas amostras em que a incorporação do fosfato de cálcio é maior (20%), pode-se notar alguns picos de difração relativamente fortes em valores de aproximadamente $2\theta = 26^\circ$, $32,4^\circ$, $33,3^\circ$ e $34,4^\circ$ que podem ser atribuídos aos cristais de HAp (JCPDS 09-0432). Comprovando a composição dos *scaffolds* híbridos de PLA/PEG/CaP.

Para verificar a incorporação do PEG e CaP nos *scaffolds* de PLA ensaios de FTIR foram realizados nos *scaffolds* produzidos por SBS e são apresentados nas Figuras 23 e 24.

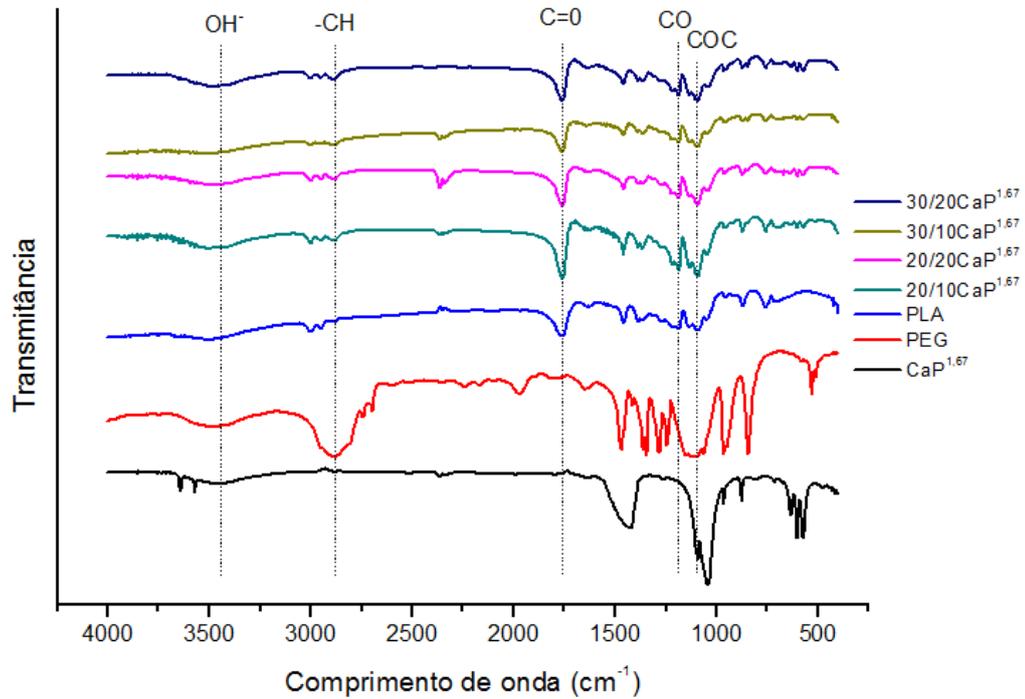


Figura 23 - Espectros de FTIR do CaP, PEG, PLA e dos *scaffolds* híbridos para a razão Ca/P=1,67.

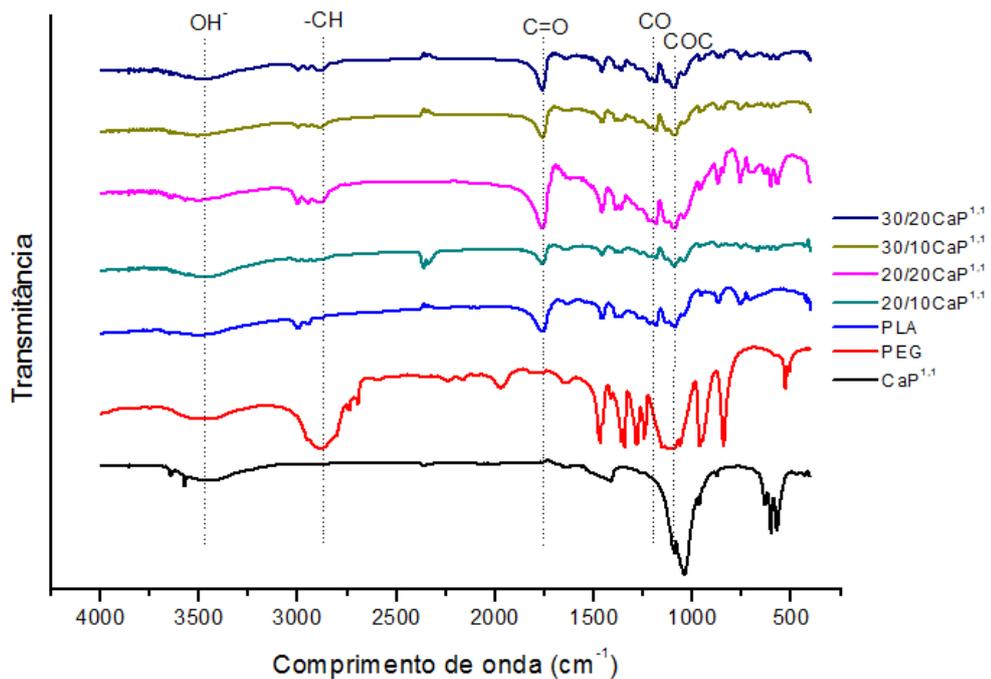


Figura 24 - Espectros de FTIR do CaP, PEG, PLA e dos *scaffolds* híbridos para a razão Ca/P=1,1.

Para a identificação do PLA, pode-se observar, em ambos os espectros, três bandas características resultantes das vibrações dos grupos que compõem o PLA. Portanto, em 1750 cm^{-1} , 1190 cm^{-1} e 1091 cm^{-1} , encontram-se as bandas representativas ao estiramento do C=O, ao estiramento assimétrico do CO e ao estiramento simétrico COC, respectivamente. Para o PEG, as absorções características são uma banda ampla e intensa, em 3447 cm^{-1} , formada devido aos grupos hidroxila terminais da cadeia do PEG serem associados por ligações de hidrogênio, uma banda intensa em 2878 cm^{-1} referente ao estiramento do (CH) e uma banda intensa em aproximadamente 1110 cm^{-1} relativo ao estiramento assimétrico C-O-C, que neste caso, fica sobreposto aos picos característicos do PLA (Chieng, B. *et al.*, 2013; Araújo *et al.*, 2015). Entretanto, este tipo de ensaio não foi eficaz para identificação do fosfato de cálcio nos *scaffolds*, devido à mesma apresentar picos de absorção muito próximos aos característicos do PLA e do PEG, provocando sobreposição.

Os termogramas obtidos na análise de termogravimetria dos materiais estão apresentados nas Figuras 25 e 26, para composição com 20 e 30% de PEG, respectivamente.

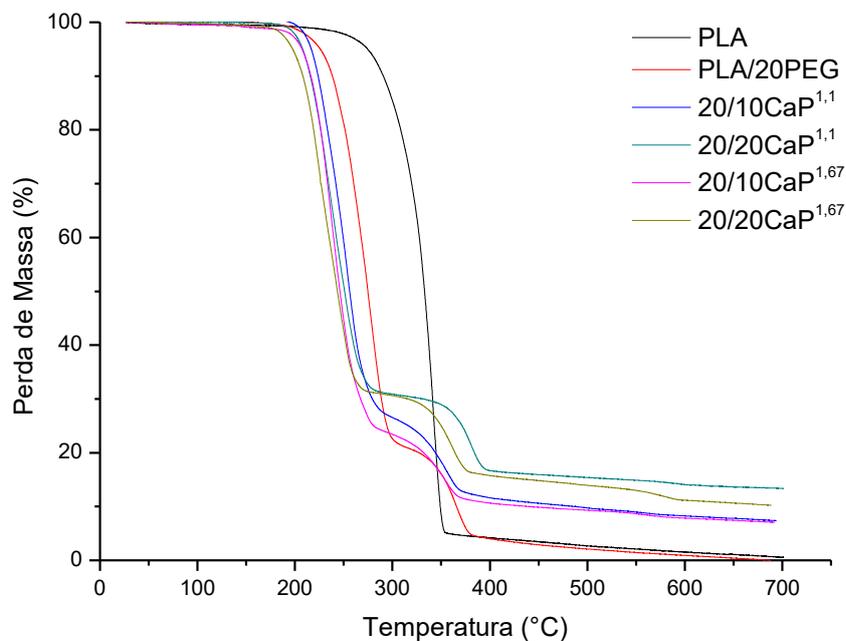


Figura 25 - Análise termogravimétrica dos *scaffolds* produzidos por SBS com 20% PEG.

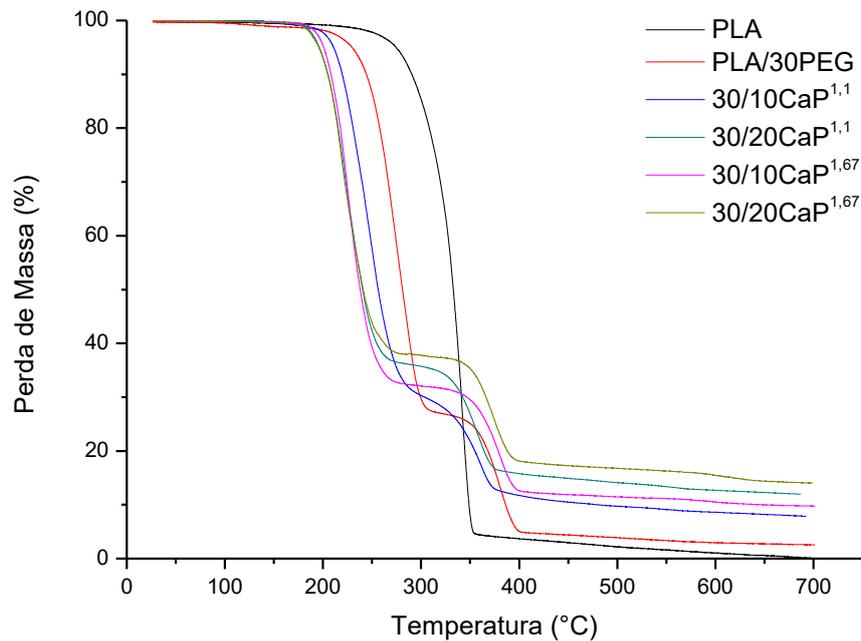


Figura 26 - Análise termogravimétrica dos *scaffolds* produzidos por SBS com 30% PEG.

O processo de degradação para a fibra de PLA puro ocorreu em uma única etapa, que tem início em aproximadamente 230°C até 350°C, degradação gerada pela perda do grupo terminal da cadeia principal ou alteração do éster, não havendo formação de resíduo (Mohapatra *et al.*, 2014). Sendo este o material com maior resistência térmica apresentado. Diferente do que ocorre nos *scaffolds* com adição do PEG que apresentam duas perdas de massas significativas, o primeiro correspondente à degradação do PLA e o segundo à degradação do PEG. Resultado similar ao encontro por Ozdemir *et al.* (2016). A presença do PEG na fibra de PLA gerou redução da temperatura inicial de degradação do material, que teve início em aproximadamente 210°C para a fibra PLA/PEG. Fato também comprovado, pela sutil redução de temperatura ao aumentar o teor do PEG para 30%. Comportamento térmico já reportado pela literatura (Mohapatra *et al.*, 2014). Podendo está relacionado à cristalinidade do PEG, pois a elevada área superficial das *scaffolds* produzidos por SBS, também pode diminuir a cristalinidade dos polímeros (Da Silva Parize *et al.*, 2016). A adição do CaP nas fibras de PLA/PEG também gerou redução da temperatura inicial de degradação dos *scaffolds*. Entretanto, dentre os *scaffolds* híbridos, a incorporação do fosfato, em maior concentração, gerou melhor estabilidade térmica para ambas as razões. Apresentando melhores

resultados os *scaffolds* formados com fosfatos com Ca/P=1,1. Em relação ao resíduo obtido após a análise do material, houve um aumento na quantidade de resíduo em função do aumento do teor de CaP nos *scaffolds*.

A capacidade de mineralização de um biomaterial é uma das propriedades mais importantes na aplicação para regeneração óssea. Pois a nucleação e crescimento de cristais são processos envolvidos em mineralizações biológicas que são de primordial importância quando biocerâmicas à base de fosfato de cálcio entram em contato com uma solução super-saturada de cálcio e fosfato como plasma sanguíneo humano (para cerâmica implantada *in vivo*) ou com soluções sintéticas equivalentes consideradas como fluido corporal simulado (SBF) ou outras solução similar analisada para testar cerâmicas *in vitro*.

Considerando a importância da nucleação e formação de uma camada de apatita em materiais bioativos para fins de aplicação na regeneração óssea, um padrão internacional (ISO standard 23317, 2007) foi publicado para avaliar a capacidade de formação de apatita na superfície de biomateriais em uma solução modelo: fluido corporal simulado (SBF). A solução SBF, proposta por Kokubo et al. nos anos 90, contém minerais em concentrações quase idênticas à do plasma humano (Tabela 7). De fato, tem sido demonstrado que a apatita produzida na superfície do material em soluções SBF é bastante análoga ao mineral ósseo (Rey et al., 2017).

Portanto, a bioatividade dos *scaffolds* produzidos foi investigada *in vitro* em um fluido corporal simulado (SBF). As imagens micrográficas de MEV dos *scaffolds* após o tempo de 7 e 14 dias de imersão em SBF estão apresentadas nas Figuras 30 e 31, em que é possível observar a formação de uma morfologia “couve-flor”, típica da hidroxiapatita (Holopainen e Ritala, 2016).

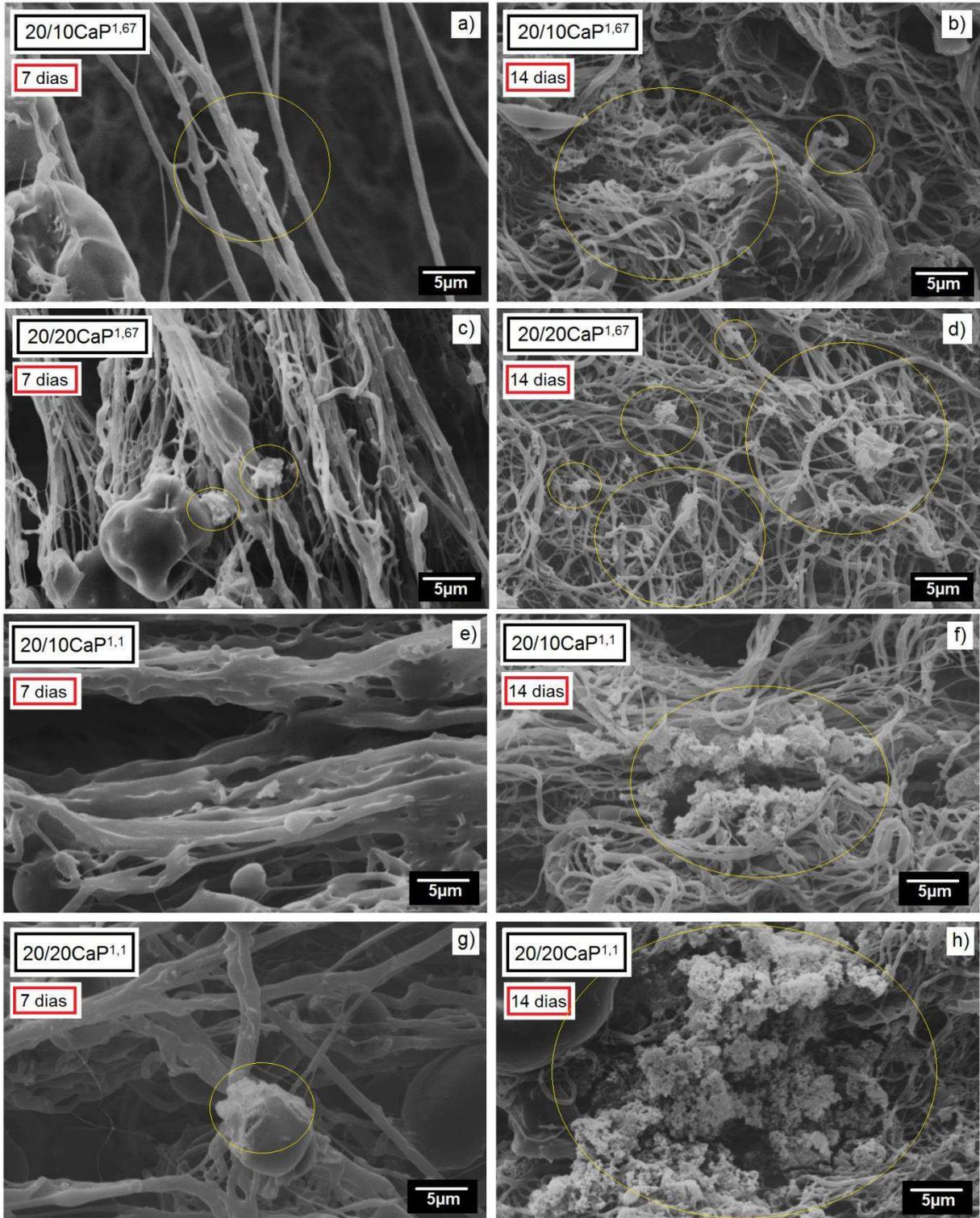


Figura 27 - Imagens micrográficas dos scaffolds de PLA/20PEG com incorporação de 10%CaP e 20%CaP submetidos a SBF por 7 e 14 dias para $\text{Ca/P}=1,67$ (a,b,c,d) e $\text{Ca/P}=1,1$ (e,f,g,h).

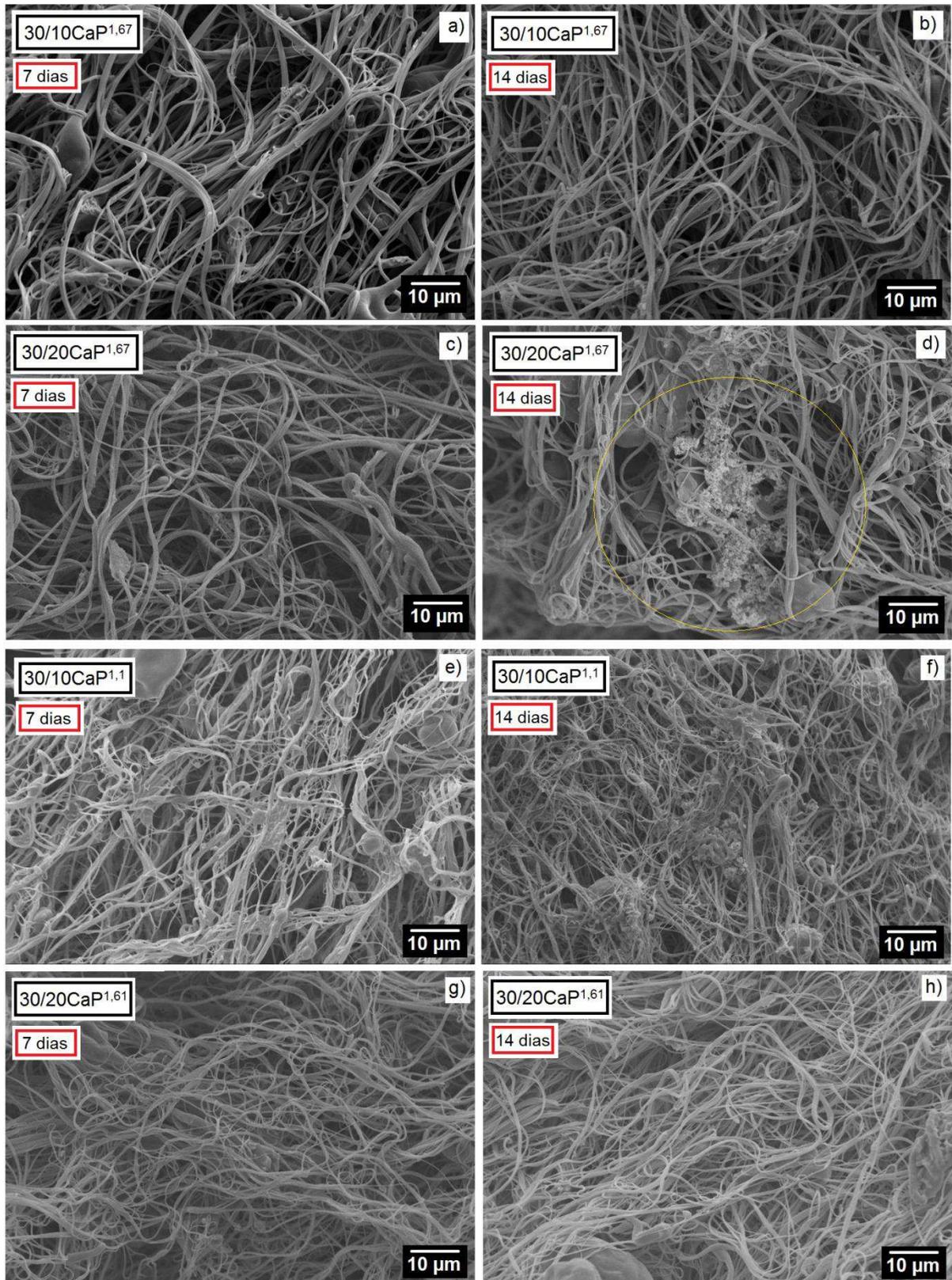


Figura 28 - Imagens micrográficas dos scaffolds de PLA/30PEG com incorporação de 10%CaP e 20%CaP submetidos a SBF por 7 e 14 dias para Ca/P=1,67 (a,b,c,d) e Ca/P=1,1 (e,f,g,h).

A Figura 27 apresenta *scaffolds* produzidos utilizando 20% PEG, variando a concentração de fosfato e a razão Ca/P. Através das micrografias pode-se observar que para o tempo de imersão em SBF de 7 dias (a, c, e, g) houve pouco ou nenhuma deposição da apatita semelhante ao osso na estrutura dos *scaffolds*. Após o aumento do tempo para 14 dias (b, d, f, h) alguns minerais de apatita semelhantes ao osso foram observados na superfície das fibras em comparação com sua morfologia inicial, identificados na imagem através de círculos amarelos. Junto com o prolongamento do tempo de imersão, observa-se que o aumento da quantidade de fosfato incorporado no *scaffold* gerou maior formação de apatita.. Resultado semelhante ao observado por Schneider *et al.* (2008) e Zhang, H. *et al.* (2009).

Os resultados indicam que o PLA sozinho tem pouca capacidade de induzir o crescimento mineral semelhante ao tecido ósseo devido à sua natureza hidrofóbica e falta de grupos funcionais suficientes, enquanto que a incorporação das partículas de CaP podem atuar como locais de nucleação para acelerar o crescimento mineral (Ngiam *et al.*, 2009). Além disso, *scaffolds* produzidos com CaP com razão Ca/P=1,1 (Figura 27) apresentaram maior formação de apatita, o que pode está relacionado a presença do β -TCP, que possui maior solubilidade, quando comparado a HAp, além de possuir propriedades superiores em termos de diferenciação osteogênica, induzindo o crescimento ósseo mesmo em tecidos moles (Yuan *et al.*, 2010).

A Figura 28 apresenta *scaffolds* produzidos utilizando 30% PEG, variando a concentração de fosfato e a razão Ca/P. Através das micrografias podemos observar que o aumento da concentração do polímero, quando comparada a Figura 27, promoveu uma redução da deposição da apatita, não havendo formação após tempo de 7 dias (a, c, e, g). Após 14 dias de imersão a superfície do tecido de nanofibras mostrou pouco crescimento mineral, além de aglomerados irregulares de depósitos minerais em pontos individuais na amostra com 20%CaP (Ca/P=1,67) (d).

Portanto, os resultados da maior capacidade de deposição de apatita nos *scaffolds* de PLA/PEG/CaP são para as amostras de 20/10CaP^{1,1} e 20/20CaP^{1,1}, o que pode indicar melhor bioatividade para induzir mineralização de cálcio para regeneração óssea.

5. CONCLUSÃO

Scaffolds híbridos de PLA/PEG/CaP foram desenvolvidos através da técnica de SBS. Além disso, a técnica de SBS foi eficiente na obtenção de fibras de fosfato de cálcio, obtendo-se fibras submicrométricas com diâmetro médio de $243,7 \pm 106$ nm e $292,2 \pm 128$ nm, para razões Ca/P=1,67 e 1,1, respectivamente. As fibras de fosfato de cálcio produzidas, para ambas as razões, foram constituídas por HAp e fases secundárias. Porém para a razão Ca/P=1,1, houve também a formação em pequena quantidade de β -TCP. No entanto, observou-se que o aumento da temperatura de calcinação das fibras influenciou na redução das fases secundárias, por outro lado, aumenta a fragilidade do material, fazendo necessário a produção de um material híbrido polímero/CaP.

Os *scaffolds* híbridos produzidos por SBS possuem diâmetros médio de suas fibras variando entre 403 ± 203 nm - 957 ± 306 nm, com estrutura aleatoriamente interligada e altamente porosa, além de apresentarem boa dispersão da carga de CaP na fibra polimérica, para os teores de carga estudados (10% e 20%), mesmo com formação de alguns aglomerados. A adição do PEG, tornou possível a redução de defeitos na morfologia dos *scaffolds* obtidos.

Os *scaffolds* produzidos com Ca/P=1,1 apresentaram estrutura mais aberta e com redução significativa da quantidade de “beads”. Além disso, o aumento da incorporação do fosfato formado por HAp (Ca/P=1,67) gerou aumento dos diâmetros fibrilares, enquanto que para o fosfato que apresenta β -TCP em sua composição (Ca/P=1,1), houve redução do diâmetro médio das fibras. O teste de bioatividade por SBF indicou que os resultados da maior capacidade de deposição de apatita nos *scaffolds* de PLA/PEG/CaP são para as amostras de 1020C e 2020C, o que pode indicar melhor bioatividade para induzir mineralização de cálcio para regeneração óssea.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, segue algumas sugestões para trabalhos futuros, visando aplicações desse sistema como *scaffolds*:

- Obter uma metodologia para produção do CaP que gere redução de fases secundárias;
- Selecionar uma metodologia para a determinação da porosidade dos *scaffolds* produzidos por SBS;
- Avaliar as propriedades mecânicas dos *scaffolds*;
- Realizar testes de citotoxicidade e crescimento celular nos *scaffolds*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, C. M.; RAY, R. B. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials**, v. 55, n. 2, p. 141-150, 2001.

AKAO, M.; AOKI, H.; KATO, K. Mechanical properties of sintered hydroxyapatite for prosthetic applications. **Journal of materials science**, v. 16, n. 3, p. 809-812, 1981.

AKINDOYO, J. O.; BEG, M. D. H.; GHAZALI, S.; HEIM, H. P.; FELDMANN, M. Effects of surface modification on dispersion, mechanical, thermal and dynamic mechanical properties of injection molded PLA-hydroxyapatite composites. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, v. 103, p. 96-105, 2017.

ALBREKTSSON, T.; BRÅNEMARK, P.-I.; HANSSON, H.-A.; LINDSTRÖM, J. Osseointegrated titanium implants: requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 52, n. 2, p. 155-170, 1981.

ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **European spine journal**, v. 10, n. 2, p. S96-S101, 2001.

ARAÚJO, J. P.; AGRAWAL, P.; MÉLO, T. J. A. Blendas PLA/PEgAA: Avaliação da reatividade entre os polímeros e da concentração de PEGAA nas propriedades e na morfologia. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 10, n. 3, p. 118-127, 2015.

ARKHAROVA, N. A.; SUVOROVA, E. I.; SEVERIN, A. V.; KHRIPUNOV, A. K.; KRASHENINNIKOV, S. V.; KLECHKOVSKAYA, V. V. SEM and TEM for structure and properties characterization of bacterial cellulose/hydroxyapatite composites. **Scanning**, v. 38, n. 6, p. 757-765, 2016.

ASHOK, M.; KALKURA, S. N.; SUNDARAM, N. M.; ARIVUOLI, D. Growth and characterization of hydroxyapatite crystals by hydrothermal method. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 18, n. 5, p. 895-898, 2007.

BAIARDO, M.; FRISONI, G.; SCANDOLA, M.; RIMELEN, M.; LIPS, D.; RUFFIEUX, K.; WINTERMANTEL, E. Thermal and mechanical properties of plasticized poly (L-lactic acid). **Journal of applied polymer science**, v. 90, n. 7, p. 1731-1738, 2003.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A.; DUEK, E. A. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 1, 2005.

BASSO, R. D. C. F. Uso de scaffolds de Poli L Lactide e de Poli L Lactide com hidroxiapatita em calota craniana: modelo experimental em ratos Wistar. 2014.

BHASKAR, B.; OWEN, R.; BAHMAEE, H.; WALLY, Z.; SREENIVASA RAO, P.; REILLY, G. C. Composite porous scaffold of PEG/PLA support improved bone matrix deposition in vitro compared to PLA-only scaffolds. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 106, n. 5, p. 1334-1340, 2018.

BIANCO, A.; CACCIOTTI, I.; LOMBARDI, M.; MONTANARO, L.; BEMPORAD, E.; SEBASTIANI, M. F-substituted hydroxyapatite nanopowders: thermal stability, sintering behaviour and mechanical properties. **Ceramics International**, v. 36, n. 1, p. 313-322, 2010.

BLACK, J.; HASTINGS, G. **Handbook of biomaterial properties**. Springer Science & Business Media, 2013. ISBN 1461558018.

BOHNER, M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. **Injury**, v. 31, p. D37-D47, 2000.

BONAN, R. F.; BONAN, P. R.; BATISTA, A. U.; SAMPAIO, F. C.; ALBUQUERQUE, A. J.; MORAES, M. C.; MATTOSO, L. H.; GLENN, G. M.; MEDEIROS, E. S.; OLIVEIRA, J. E. In vitro antimicrobial activity of solution blow spun poly (lactic acid)/polyvinylpyrrolidone nanofibers loaded with Copaiba (*Copaifera* sp.) oil. **Materials Science and Engineering: C**, v. 48, p. 372-377, 2015.

BONASSAR, L. J.; VACANTI, C. A. Tissue engineering: the first decade and beyond. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 72, n. S30–31, p. 297-303, 1998.

BONFIELD, W.; GRYNPAS, M.; TULLY, A.; BOWMAN, J.; ABRAM, J. Hydroxyapatite reinforced polyethylene--a mechanically compatible implant material for bone replacement. **Biomaterials**, v. 2, n. 3, p. 185-186, 1981.

BRÅNEMARK, P. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. **Scand J Plast Reconstr Surg**, v. 11, 1977.

CALVIÉ, E.; RÉTHORÉ, J.; JOLY-POTTUZ, L.; MEILLE, S.; CHEVALIER, J.; GARNIER, V.; JORAND, Y.; ESNOUF, C.; EPICIER, T.; QUIRK, J. Mechanical behavior law of ceramic nanoparticles from transmission electron microscopy in situ nano-compression tests. **Materials Letters**, v. 119, p. 107-110, 2014.

CAO, H.; ZHANG, L.; ZHENG, H.; WANG, Z. Hydroxyapatite nanocrystals for biomedical applications. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 114, n. 43, p. 18352-18357, 2010.

CAO, W.; HENCH, L. L. Bioactive materials. **Ceramics International**, v. 22, n. 6, p. 493-507, 1996.

CAROD-ARTAL, F. J.; VÁZQUEZ-CABRERA, C. Paleopatología neurológica en las culturas precolombinas de la costa y el altiplano andino (II). Historia de las trepanaciones craneales. **Revista de neurología**, v. 38, n. 9, p. 886-894, 2004.

CELLET, T.; PEREIRA, G.; MUNIZ, E.; SILVA, R.; RUBIRA, A. Hydroxyapatite nanowhiskers embedded in chondroitin sulfate microspheres as colon targeted drug

delivery systems. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, n. 33, p. 6837-6846, 2015.

CHEN, B. Y.; JING, X.; MI, H. Y.; ZHAO, H.; ZHANG, W. H.; PENG, X. F.; TURNG, L. S. Fabrication of polylactic acid/polyethylene glycol (PLA/PEG) porous scaffold by supercritical CO₂ foaming and particle leaching. **Polymer Engineering & Science**, v. 55, n. 6, p. 1339-1348, 2015.

CHEN, Q. Z.; THOMPSON, I. D.; BOCCACCINI, A. R. 45S5 Bioglass®-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, n. 11, p. 2414-2425, 2006.

CHIENG, B.; IBRAHIM, N.; YUNUS, W.; HUSSEIN, M. Poly(lactic acid)/Poly(ethylene glycol) Polymer Nanocomposites: Effects of Graphene Nanoplatelets. **Polymers**, v. 6, n. 1, p. 93-104, 2013.

CHIENG, B. W.; IBRAHIM, N. A.; YUNUS, W. M. Z. W.; HUSSEIN, M. Z. Plasticized poly (lactic acid) with low molecular weight poly (ethylene glycol): Mechanical, thermal, and morphology properties. **Journal of applied polymer science**, v. 130, n. 6, p. 4576-4580, 2013.

CHO, J. S.; LEE, J. C.; RHEE, S. H. Effect of precursor concentration and spray pyrolysis temperature upon hydroxyapatite particle size and density. **Journal of biomedical materials research Part B: Applied biomaterials**, v. 104, n. 2, p. 422-430, 2016.

COSTA, D. L.; LEITE, R. S.; NEVES, G. A.; DE LIMA SANTANA, L. N.; MEDEIROS, E. S.; MENEZES, R. R. Synthesis of TiO₂ and ZnO nano and submicrometric fibers by solution blow spinning. **Materials Letters**, v. 183, p. 109-113, 2016.

CURTIS, A.; RIEHLE, M. Tissue engineering: the biophysical background. **Physics in medicine and biology**, v. 46, n. 4, p. R47, 2001.

DA COSTA FARIAS, R. M.; MENEZES, R. R.; OLIVEIRA, J. E.; DE MEDEIROS, E. S. Production of submicrometric fibers of mullite by solution blow spinning (SBS). **Materials Letters**, v. 149, p. 47-49, 2015.

DA SILVA, M.; STAINER, D.; AL-QURESHI, H.; HOTZA, D. Blindagens cerâmicas para aplicações balísticas; uma revisão. **Cerâmica**, v. 60, n. 355, p. 323-331, 2014.

DA SILVA PARIZE, D. D.; FOSCHINI, M. M.; DE OLIVEIRA, J. E.; KLAMCZYNSKI, A. P.; GLENN, G. M.; MARCONCINI, J. M.; MATTOSO, L. H. C. Solution blow spinning: parameters optimization and effects on the properties of nanofibers from poly (lactic acid)/dimethyl carbonate solutions. **Journal of materials science**, v. 51, n. 9, p. 4627-4638, 2016.

DAI, X.; SHIVKUMAR, S. Electrospinning of hydroxyapatite fibrous mats. **Materials Letters**, v. 61, n. 13, p. 2735-2738, 2007a.

_____. Electrospinning of PVA-Calcium Phosphate Sol Precursors for the Production of Fibrous Hydroxyapatite. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 90, n. 5, p. 1412-1419, 2007b.

DE AZA, P.; DE AZA, A.; DE AZA, S. Crystalline bioceramic materials. **Boletín de La Sociedad Española de Cerámica y Vidrio**, v. 44, n. 3, p. 135-145, 2005.

DENRY, I.; KUHN, L. T. Design and characterization of calcium phosphate ceramic scaffolds for bone tissue engineering. **Dental Materials**, v. 32, n. 1, p. 43-53, 2016.

DHANDAYUTHAPANI, B.; YOSHIDA, Y.; MAEKAWA, T.; KUMAR, D. S. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review. **International Journal of Polymer Science**, v. 2011, 2011.

DING, G.-J.; ZHU, Y.-J.; QI, C.; LU, B.-Q.; CHEN, F.; WU, J. Porous hollow microspheres of amorphous calcium phosphate: soybean lecithin templated microwave-assisted hydrothermal synthesis and application in drug delivery. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, n. 9, p. 1823-1830, 2015.

DONG, Z. L.; KHOR, K. A.; QUEK, C.; WHITE, T. J.; CHEANG, P. TEM and STEM analysis on heat-treated and in vitro plasma-sprayed hydroxyapatite/Ti-6Al-4V composite coatings. **Biomaterials**, v. 24, n. 1, p. 97-105, 2003.

DOROZHKIN, S. V. Nanosized and nanocrystalline calcium orthophosphates. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 3, p. 715-734, 2010.

DOROZHKIN, S. V. Calcium orthophosphates: occurrence, properties, biomineralization, pathological calcification and biomimetic applications. **Biomatter**, v. 1, n. 2, p. 121-164, 2011.

DOROZHKIN, S. V. Multiphasic calcium orthophosphate (CaPO₄) bioceramics and their biomedical applications. **Ceramics International**, v. 42, n. 6, p. 6529-6554, 2016.

DOROZHKIN, S. V.; EPPLE, M. Biological and Medical Significance of Calcium Phosphates. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 41, p. 3130-3146, 2002.

ESHTIAGH-HOSSEINI, H.; HOUSAINDOKHT, M. R.; CHAHKANDI, M. Effects of parameters of sol-gel process on the phase evolution of sol-gel-derived hydroxyapatite. **Materials Chemistry and Physics**, v. 106, n. 2-3, p. 310-316, 2007.

ESQUIROL, A.-L.; SARAZIN, P.; VIRGILIO, N. Tunable porous hydrogels from cocontinuous polymer blends. **Macromolecules**, v. 47, n. 9, p. 3068-3075, 2014.

FOWLER, B. Infrared studies of apatites. II. Preparation of normal and isotopically substituted calcium, strontium, and barium hydroxyapatites and spectra-structure-composition correlations. **Inorganic Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 207-214, 1974.

FRANCO, P. Q.; JOÃO, C. F. C.; SILVA, J. C.; BORGES, J. P. Electrospun hydroxyapatite fibers from a simple sol-gel system. **Materials Letters**, v. 67, n. 1, p. 233-236, 2012.

FRANCO, P. Q.; SILVA, J. C.; BORGES, J. P. Produção de fibras de hidroxiapatite por electrofiação
Ciência & Tecnologia dos Materiais, v. 22, n. 1/2, 2010.

GAO, Y.; SHAO, W.; QIAN, W.; HE, J.; ZHOU, Y.; QI, K.; WANG, L.; CUI, S.; WANG, R. Biom mineralized Poly (l -lactic-co-glycolic acid)-Tussah Silk Fibroin Nanofiber Fabric With Hierarchical Architecture as a Scaffold for Bone Tissue Engineering. **Materials Science and Engineering: C**, v. 84, p. 195-207, 2017.

GARIBAY-ALVARADO, J. A.; ESPINOSA-CRISTÓBAL, L. F.; YOBANNY, S. Fibrous silica-hydroxyapatite composite by electrospinning. **Int J Res GRANTHAALAYAH**, v. 5, n. 2, p. 39-47, 2017.

GENTILE, P.; WILCOCK, C. J.; MILLER, C. A.; MOOREHEAD, R.; HATTON, P. V. Process optimisation to control the physico-chemical characteristics of biomimetic nanoscale hydroxyapatites prepared using wet chemical precipitation. **Materials**, v. 8, n. 5, p. 2297-2310, 2015.

GHOSH, R.; SARKAR, R. Synthesis and characterization of sintered hydroxyapatite: a comparative study on the effect of preparation route. **Journal of the Australian Ceramic Society**, v. 54, n. 1, p. 71-80, 2017.

GOLOSHCHAPOV, D.; KASHKAROV, V.; RUMYANTSEVA, N.; SEREDIN, P.; LENSIN, A.; AGAPOV, B.; DOMASHEVSKAYA, E. Synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite by precipitation using hen's eggshell. **Ceramics International**, v. 39, n. 4, p. 4539-4549, 2013.

GOPI, D.; KANIMOZHI, K.; KAVITHA, L. Opuntia ficus indica peel derived pectin mediated hydroxyapatite nanoparticles: Synthesis, spectral characterization, biological and antimicrobial activities. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 141, p. 135-143, 2015.

GUMUS, S.; OZKOC, G.; AYTAC, A. Plasticized and unplasticized PLA/organoclay nanocomposites: Short-and long-term thermal properties, morphology, and nonisothermal crystallization behavior. **Journal of applied polymer science**, v. 123, n. 5, p. 2837-2848, 2012.

GUTIERRES, M.; LOPES, M. A.; HUSSAIN, N. S.; CABRAL, A. T.; ALMEIDA, L.; SANTOS, J. D. Substitutos Ósseos: conceitos gerais e estado actual. **Arquivos de medicina**, v. 19, n. 4, p. 153-162, 2005.

HAIDER, A.; HAIDER, S.; HAN, S. S.; KANG, I.-K. Recent advances in the synthesis, functionalization and biomedical applications of hydroxyapatite: a review. **RSC Advances**, v. 7, n. 13, p. 7442-7458, 2017.

HAN, Y.; LI, S.; WANG, X.; CHEN, X. Synthesis and sintering of nanocrystalline hydroxyapatite powders by citric acid sol-gel combustion method. **Materials Research Bulletin**, v. 39, n. 1, p. 25-32, 2004.

HEIDARI, F.; BAHROLOLOOM, M. E.; VASHAEE, D.; TAYEBI, L. In situ preparation of iron oxide nanoparticles in natural hydroxyapatite/chitosan matrix for bone tissue engineering application. **Ceramics International**, v. 41, n. 2, p. 3094-3100, 2015.

HOLOPAINEN, J.; PENTTINEN, T.; SANTALA, E.; RITALA, M. Needleless electrospinning with twisted wire spinneret. **Nanotechnology**, v. 26, n. 2, p. 025301, 2014.

HOLOPAINEN, J.; RITALA, M. Rapid production of bioactive hydroxyapatite fibers via electroblowing. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 36, n. 13, p. 3219-3224, 2016.

HOU, Z.; YANG, P.; LIAN, H.; WANG, L.; ZHANG, C.; LI, C.; CHAI, R.; CHENG, Z.; LIN, J. Multifunctional hydroxyapatite nanofibers and microbelts as drug carriers. **Chemistry—A European Journal**, v. 15, n. 28, p. 6973-6982, 2009.

HSIEH, M.-F.; PERNG, L.-H.; CHIN, T.-S.; PERNG, H.-G. Phase purity of sol-gel-derived hydroxyapatite ceramic. **Biomaterials**, v. 22, n. 19, p. 2601-2607, 2001.

HUANG, Y.; ZHANG, X.; WU, A.; XU, H. An injectable nano-hydroxyapatite (n-HA)/glycol chitosan (G-CS)/hyaluronic acid (HyA) composite hydrogel for bone tissue engineering. **RSC Advances**, v. 6, n. 40, p. 33529-33536, 2016.

IGNJATOVIC, N.; SULJOVRUJIC, E.; BUDINSKI-SIMENDIC, J.; KRAKOVSKY, I.; USKOKOVIC, D. Evaluation of hot-pressed hydroxyapatite/poly-L-lactide composite biomaterial characteristics. **Journal of biomedical materials research Part B: Applied biomaterials**, v. 71, n. 2, p. 284-294, 2004.

IJIMA, M.; MORIWAKI, Y.; YAMAGUCHI, R.; KUBOKI, Y. Effect of solution pH on the calcium phosphates formation and ionic diffusion on and through the collagenous matrix. **Connective tissue research**, v. 36, n. 2, p. 73-83, 1997.

ITO, A.; OTSUKA, M.; KAWAMURA, H.; IKEUCHI, M.; OHGUSHI, H.; SOGO, Y.; ICHINOSE, N. Zinc-containing tricalcium phosphate and related materials for promoting bone formation. **Current Applied Physics**, v. 5, n. 5, p. 402-406, 2005.

JAFARI, M. M.; KHAYATI, G. R. Prediction of hydroxyapatite crystallite size prepared by sol-gel route: gene expression programming approach. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 86, n. 1, p. 112-125, 2018.

JEE, S. S.; KASINATH, R. K.; DIMASI, E.; KIM, Y.-Y.; GOWER, L. Oriented hydroxyapatite in turkey tendon mineralized via the polymer-induced liquid-precursor (PILP) process. **CrystEngComm**, v. 13, n. 6, p. 2077-2083, 2011.

JIANG, S.; LIAO, G. Synthesis and characterization of biocompatible poly (ethylene glycol)-b-poly (L-lactide) and study on their electrospun scaffolds. **Polymer-Plastics Technology and Engineering**, v. 51, n. 12, p. 1237-1244, 2012.

JILLAVENKATESA, A.; CONDRATE SR, R. Sol-gel processing of hydroxyapatite. **JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE**, v. 33, n. 16, p. 4111-4119, 1998.

KIM, H. W.; KIM, H. E. Nanofiber generation of hydroxyapatite and fluor-hydroxyapatite bioceramics. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials**, v. 77, n. 2, p. 323-328, 2006.

KIM, H. W.; SONG, J. H.; KIM, H. E. Nanofiber generation of gelatin-hydroxyapatite biomimetics for guided tissue regeneration. **Advanced functional materials**, v. 15, n. 12, p. 1988-1994, 2005.

KOCH, C.; JOHNSON, S.; KUMAR, D.; JELINEK, M.; CHRISEY, D.; DORAISWAMY, A.; JIN, C.; NARAYAN, R.; MIHAILESCU, I. Pulsed laser deposition of hydroxyapatite thin films. **Materials Science and Engineering: C**, v. 27, n. 3, p. 484-494, 2007.

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

KORDAS, G.; TRAPALIS, C. Fourier transform and multi dimensional EPR spectroscopy for the characterization of sol-gel derived hydroxyapatite. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 9, n. 1, p. 17-24, 1997.

KOU, X.; WANG, C.; DING, M.; FENG, C.; LI, X.; MA, J.; ZHANG, H.; SUN, Y.; LU, G. Synthesis of Co-doped SnO₂ nanofibers and their enhanced gas-sensing properties. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 236, p. 425-432, 2016.

KOUMOULIDIS, G. C.; KATSOUNLIDIS, A. P.; LADAVOS, A. K.; POMONIS, P. J.; TRAPALIS, C. C.; SDOUKOS, A. T.; VAIMAKIS, T. C. Preparation of hydroxyapatite via microemulsion route. **Journal of colloid and interface science**, v. 259, n. 2, p. 254-260, 2003.

KOZLOWSKA, J.; JUNDZILL, A.; BAJEK, A.; BODNAR, M.; MARSZALEK, A.; WITMANOWSKI, H.; SIONKOWSKA, A. Preliminary in vitro and in vivo assessment of modified collagen/hydroxyapatite composite. **Materials Letters**, v. 221, p. 74-76, 2018.

LAO, L.; WANG, Y.; ZHU, Y.; ZHANG, Y.; GAO, C. Poly (lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite nanofibrous scaffolds fabricated by electrospinning for bone tissue engineering. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 22, n. 8, p. 1873-1884, 2011.

LEE, J.-H.; KIM, Y.-J. Hydroxyapatite nanofibers fabricated through electrospinning and sol-gel process. **Ceramics International**, v. 40, n. 2, p. 3361-3369, 2014.

LEGEROS, R. Calcium phosphates in oral biology and medicine (Monographs in Oral Science). Vol. 15. **New York: Basel**, 1991.

LEGEROS, R. Z.; LEGEROS, J. P. Dense hydroxyapatite. In: (Ed.). **An introduction to bioceramics**: World Scientific, 1993. p. 139-180.

LEONG, K.; CHEAH, C.; CHUA, C. Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. **Biomaterials**, v. 24, n. 13, p. 2363-2378, 2003.

LEVENGOD, S. K. L.; ZHANG, M. Chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 21, p. 3161-3184, 2014.

LI, J.; X.L.LU; ZHENG, Y. F. Effect of surface modified hydroxyapatite on the tensile property improvement of HA/PLA composite. **Applied Surface Science**, v. 255, n. 2, p. 494-497, 2008.

LI, X.; SHANG, X.; KONG, H.; WEI, Z.; YU, X.; LIU, Z.; CAO, Y.; WANG, J. Synthesis of hydroxyapatite from cuttlefish bone via hydrothermal solid-state conversion. **Journal of Biomaterials and Tissue Engineering**, v. 6, n. 10, p. 775-779, 2016.

LIU, H.; CHIN, T.; LAI, L.; CHIU, S.; CHUNG, K.; CHANG, C.; LUI, M. Hydroxyapatite synthesized by a simplified hydrothermal method. **Ceramics International**, v. 23, n. 1, p. 19-25, 1997.

LIUYUN, J.; CHENGDONG, X.; DONGLIANG, C.; LIXIN, J. Effect of n-HA with different surface-modified on the properties of n-HA/PLGA composite. **Applied Surface Science**, v. 259, p. 72-78, 2012.

LOGEART-AVRAMOGLU, D.; ANAGNOSTOU, F.; BIZIOS, R.; PETITE, H. Engineering bone: challenges and obstacles. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 9, n. 1, p. 72-84, 2005.

LOGITHKUMAR, R.; KESHAVNARAYAN, A.; DHIVYA, S.; CHAWLA, A.; SARAVANAN, S.; SELVAMURUGAN, N. A review of chitosan and its derivatives in bone tissue engineering. **Carbohydrate polymers**, v. 151, p. 172-188, 2016.

LOPATIN, C.; PIZZICONI, V.; ALFORD, T.; LAURSEN, T. Hydroxyapatite powders and thin films prepared by a sol-gel technique. **Thin solid films**, v. 326, n. 1-2, p. 227-232, 1998.

LÜ, X. Y.; FAN, Y. B.; GU, D.; CUI, W. Preparation and characterization of natural hydroxyapatite from animal hard tissues. In: Key Engineering Materials, Trans Tech Publ, p.213-216, 2007.

MA, X.; CHEN, Y.; QIAN, J.; YUAN, Y.; LIU, C. Controllable synthesis of spherical hydroxyapatite nanoparticles using inverse microemulsion method. **Materials Chemistry and Physics**, v. 183, p. 220-229, 2016.

MALEKI-GHALEH, H.; AGHAIE, E.; NADERNEZHAD, A.; ZARGARZADEH, M.; KHAKZAD, A.; SHAKERI, M.; KHOSROWSHAHI, Y. B.; SIADATI, M. Influence of Fe₃O₄ nanoparticles in hydroxyapatite scaffolds on proliferation of primary human fibroblast cells. **Journal of Materials Engineering and Performance**, v. 25, n. 6, p. 2331-2339, 2016.

MAO, D.; LI, Q.; BAI, N.; DONG, H.; LI, D. Porous stable poly(lactic acid)/ethyl cellulose/hydroxyapatite composite scaffolds prepared by a combined method for bone regeneration. **Carbohydr Polym**, v. 180, p. 104-111, 2017.

MÄRTEN, A.; FRATZL, P.; PARIS, O.; ZASLANSKY, P. On the mineral in collagen of human crown dentine. **Biomaterials**, v. 31, n. 20, p. 5479-5490, 2010.

MAYER, I.; CUISINIER, F.; GDALYA, S.; POPOV, I. TEM study of the morphology of Mn²⁺-doped calcium hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 102, n. 2, p. 311-317, 2008.

MEDEIROS, E. S.; GLENN, G. M.; KLAMCZYNSKI, A. P.; ORTS, W. J.; MATTOSO, L. H. Solution blow spinning: A new method to produce micro-and nanofibers from polymer solutions. **Journal of applied polymer science**, v. 113, n. 4, p. 2322-2330, 2009.

MILOVAC, D.; FERRER, G. G.; IVANKOVIC, M.; IVANKOVIC, H. PCL-coated hydroxyapatite scaffold derived from cuttlefish bone: Morphology, mechanical properties and bioactivity. **Materials Science and Engineering: C**, v. 34, p. 437-445, 2014.

MISTRY, S.; ROY, R.; KUNDU, B.; DATTA, S.; KUMAR, M.; CHANDA, A.; KUNDU, D. Clinical outcome of hydroxyapatite coated, bioactive glass coated, and machined Ti6Al4V threaded dental implant in human jaws: a short-term comparative study. **Implant dentistry**, v. 25, n. 2, p. 252-260, 2016.

MOHAPATRA, A. K.; MOHANTY, S.; NAYAK, S. Effect of PEG on PLA/PEG blend and its nanocomposites: A study of thermo-mechanical and morphological characterization. **Polymer Composites**, v. 35, n. 2, p. 283-293, 2014.

MORADIPOUR, P.; DABIRIAN, F.; RAJABI, L.; DERAKHSHAN, A. A. Fabrication and characterization of new bulky layer mixed metal oxide ceramic nanofibers through two nozzle electrospinning method. **Ceramics International**, v. 42, n. 12, p. 13449-13458, 2016.

MORENO, E. C.; GREGORY, T. M.; BROWN, W. E. Preparation and solubility of hydroxyapatite. **J Res Natl Bur Stand A**, v. 72, p. 773-782, 1968.

MURUGAN, R.; RAMAKRISHNA, S. Development of nanocomposites for bone grafting. **Composites Science and Technology**, v. 65, n. 15-16, p. 2385-2406, 2005.

MUTHUKUMAR, T.; ARAVINTHAN, A.; SHARMILA, J.; KIM, N. S.; KIM, J.-H. Collagen/chitosan porous bone tissue engineering composite scaffold incorporated with Ginseng compound K. **Carbohydrate polymers**, v. 152, p. 566-574, 2016.

NATARAJAN, U. V.; RAJESWARI, S. Influence of calcium precursors on the morphology and crystallinity of sol-gel-derived hydroxyapatite nanoparticles. **Journal of Crystal Growth**, v. 310, n. 21, p. 4601-4611, 2008.

NGIAM, M.; LIAO, S.; PATIL, A. J.; CHENG, Z.; CHAN, C. K.; RAMAKRISHNA, S. The fabrication of nano-hydroxyapatite on PLGA and PLGA/collagen nanofibrous composite scaffolds and their effects in osteoblastic behavior for bone tissue engineering. **Bone**, v. 45, n. 1, p. 4-16, 2009.

NOVOTNA, K.; ZAJDLOVA, M.; SUCHY, T.; HADRABA, D.; LOPOT, F.; ZALOUDKOVA, M.; DOUGLAS, T. E.; MUNZAROVA, M.; JUKLICKOVA, M.; STRANSKA, D. Polylactide nanofibers with hydroxyapatite as growth substrates for osteoblast-like cells. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 102, n. 11, p. 3918-3930, 2014.

OFUDJE, E. A.; RAJENDRAN, A.; ADEOGUN, A. I.; IDOWU, M. A.; KAREEM, S. O.; PATTANAYAK, D. K. Synthesis of organic derived hydroxyapatite scaffold from pig bone waste for tissue engineering applications. **Advanced Powder Technology**, v. 29, n. 1, p. 1-8, 2017.

OLIVEIRA, J. E.; MATTOSO, L. H. C.; MEDEIROS, E. S.; ZUCOLOTTI, V. Poly (lactic acid)/carbon nanotube fibers as novel platforms for glucose biosensors. **Biosensors**, v. 2, n. 1, p. 70-82, 2012.

OZDEMIR, E.; TINÇER, T.; HACALOGLU, J. Characterization of polylactide/poly (ethylene glycol) blends via direct pyrolysis mass spectrometry. **Journal of analytical and applied pyrolysis**, v. 122, p. 315-322, 2016.

PADMANABHAN, S. K.; SALVATORE, L.; GERVASO, F.; CATALANO, M.; TAURINO, A.; SANNINO, A.; LICCIULLI, A. Synthesis and characterization of collagen scaffolds reinforced by eggshell derived hydroxyapatite for tissue engineering. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 15, n. 1, p. 504-509, 2015.

PAL, A.; MAITY, S.; CHABRI, S.; BERA, S.; CHOWDHURY, A. R.; DAS, M.; SINHA, A. Mechanochemical synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite from Mercenaria clam shells and phosphoric acid. **Biomedical Physics & Engineering Express**, v. 3, n. 1, p. 015010, 2017.

PALACIOS, T. Applied physics: Nanowire electronics comes of age. **Nature**, v. 481, n. 7380, p. 152, 2012.

PASCARIU, P.; AIRINEI, A.; OLARU, N.; OLARU, L.; NICA, V. Photocatalytic degradation of Rhodamine B dye using ZnO-SnO₂ electrospun ceramic nanofibers. **Ceramics International**, v. 42, n. 6, p. 6775-6781, 2016.

PASURI, J.; HOLOPAINEN, J.; KOKKONEN, H.; PERSSON, M.; KAUPPINEN, K.; LEHENKARI, P.; SANTALA, E.; RITALA, M.; TUUKKANEN, J. Osteoclasts in the interface with electrospun hydroxyapatite. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 135, p. 774-783, 2015.

PERSSON, M.; LORITE, G. S.; CHO, S.-W.; TUUKKANEN, J.; SKRIFVAR, M. Melt spinning of poly (lactic acid) and hydroxyapatite composite fibers: influence of the filler content on the fiber properties. **ACS applied materials & interfaces**, v. 5, n. 15, p. 6864-6872, 2013.

PETINAKIS, E.; YU, L.; SIMON, G.; DE, K. Natural Fibre Bio-Composites Incorporating Poly(Lactic Acid). 2013.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C.; MORAES, Â. M. Biomaterials: Types, Applications, And Market. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 957-971, 2015.

RAMANAN, S. R.; VENKATESH, R. A study of hydroxyapatite fibers prepared via sol-gel route. **Materials Letters**, v. 58, n. 26, p. 3320-3323, 2004.

RAMASESHAN, R.; SUNDARRAJAN, S.; JOSE, R.; RAMAKRISHNA, S. Nanostructured ceramics by electrospinning. **Journal of Applied Physics**, v. 102, n. 11, p. 7, 2007.

RAO, R. R.; ROOPA, H.; KANNAN, T. Solid state synthesis and thermal stability of HAP and HAP- β -TCP composite ceramic powders. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 8, n. 8, p. 511-518, 1997.

RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. **Biomaterials Science: a Multidisciplinary Endeavor**. Londres: Elsevier Academic Press, 2004. ISBN 008047036X.

RAVAGLIOLI, A.; KRAJEWSKI, A. **Bioceramics: Materials Properties Applications**. Springer Science & Business Media, 2012. ISBN 9401123365.

RESSLER, A.; RÓDENAS-ROCHINA, J.; IVANKOVIĆ, M.; IVANKOVIĆ, H.; ROGINA, A.; FERRER, G. G. Injectable chitosan-hydroxyapatite hydrogels promote the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **Carbohydrate polymers**, 2018.

REY, C.; COMBES, C.; DROUET, C.; GROSSIN, D.; BERTRAND, G.; SOULIÉ, J. 1.11 Bioactive Calcium Phosphate Compounds: Physical Chemistry☆. **Comprehensive Biomaterials II**, p. 244, 2017.

ROSETI, L.; PARISI, V.; PETRETTA, M.; CAVALLO, C.; DESANDO, G.; BARTOLOTTI, I.; GRIGOLO, B. Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the Art and New Perspectives. **Materials Science and Engineering: C**, v. 78, p. 1246-1262, 2017.

RUSU, V. M.; NG, C.-H.; WILKE, M.; TIERSCH, B.; FRATZL, P.; PETER, M. G. Size-controlled hydroxyapatite nanoparticles as self-organized organic–inorganic composite materials. **Biomaterials**, v. 26, n. 26, p. 5414-5426, 2005.

SALAVATI-NIASARI, M.; SOOFIVAND, F.; SOBHANI-NASAB, A.; SHAKOURI-ARANI, M.; FAAL, A. Y.; BAGHERI, S. Synthesis, characterization, and morphological control of ZnTiO₃ nanoparticles through sol-gel processes and its photocatalyst application. **Adv. Powder Technol**, v. 27, p. 2066, 2016.

SANCHEZ, A. G.; PROKHOROV, E.; LUNA-BARCENAS, G.; MORA-GARCÍA, A. G.; KOVALENKO, Y.; MIÑOZ, E. M. R.; RAUCCI, M. G.; BUONOCORE, G. Chitosan-hydroxyapatite nanocomposites: Effect of interfacial layer on mechanical and dielectric properties. **Materials Chemistry and Physics**, v. 217, p. 151-159, 2018.

SANTONI-RUGIU, P. Repair of skull defects by outer table osteoperiosteal free grafts. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 43, n. 2, p. 157-161, 1969.

SANTOS, A.; MOTA, M.; LEITE, R.; NEVES, G.; MEDEIROS, E.; MENEZES, R. Solution blow spun titania nanofibers from solutions of high inorganic/organic precursor ratio. **Ceramics International**, v. 44, n. 2, p. 1681-1689, 2018.

SCHMIDMAIER, G.; WILDEMANN, B.; BAIL, H.; LUCKE, M.; FUCHS, T.; STEMBERGER, A.; FLYVBJERG, A.; HAAS, N.; RASCHKE, M. Local Application of Growth Factors (Insulin-Like Growth Factor-1 and Transforming Growth Factor-B1) From A Biodegradable Poly (D, L-Lactide) Coating of Osteosynthetic Implants Accelerates Fracture Healing in Rats. **Bone**, v. 28, n. 4, p. 341-350, 2001.

SCHNEIDER, O. D.; LOHER, S.; BRUNNER, T. J.; UEBERSAX, L.; SIMONET, M.; GRASS, R. N.; MERKLE, H. P.; STARK, W. J. Cotton wool-like nanocomposite biomaterials prepared by electrospinning: In vitro bioactivity and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials**, v. 84, n. 2, p. 350-362, 2008.

SERRA, T.; ORTIZ-HERNANDEZ, M.; ENGEL, E.; PLANELL, J. A.; NAVARRO, M. Relevance of PEG in PLA-Based Blends for Tissue Engineering 3D-Printed Scaffolds. **Materials Science and Engineering C**, v. 38, p. 55–62, 2014.

SHAMRAI, V.; KARPIKHIN, A.; FEDOTOV, A. Y.; SIROTINKIN, V.; BARINOV, S.; KOMLEV, V. Structural changes during the hydrolysis of dicalcium phosphate dihydrate to octacalcium phosphate and hydroxyapatite. **Inorganic Materials**, v. 51, n. 4, p. 355-361, 2015.

SHISHATSKAYA, E.; KHLUSOV, I.; VOLOVA, T. A hybrid PHB–hydroxyapatite composite for biomedical application: production, in vitro and in vivo investigation. **Journal of Biomaterials science, Polymer edition**, v. 17, n. 5, p. 481-498, 2006.

SILVA, D.; FRIIS, T.; CAMARGO, N.; XIAO, Y. Characterization of mesoporous calcium phosphates from calcareous marine sediments containing Si, Sr and Zn for bone tissue engineering. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 4, n. 42, p. 6842-6855, 2016.

SILVA, T. H.; DE OLIVEIRA, J. E.; DE MEDEIROS, E. S. Obtenção de Micro e Nanofibras de PVC pela Técnica De Fiação Por Sopros Em Solução **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 25, n. 2, p. 229-235, 2015.

SILVA, V. V.; DOMINGUES, R. Z.; LAMEIRAS, F. S. Microstructural and mechanical study of zirconia-hydroxyapatite (ZH) composite ceramics for biomedical applications. **Composites Science and Technology**, v. 61, n. 2, p. 301-310, 2001.

SIQUEIRA, I. A.; CORAT, M. A. F.; CAVALCANTI, B. D. N.; NETO, W. A. R.; MARTIN, A. A.; BRETAS, R. E. S.; MARCIANO, F. R.; LOBO, A. O. In Vitro and In Vivo Studies of Novel Poly (D, L-Lactic Acid), Superhydrophilic Carbon Nanotubes, and Nanohydroxyapatite Scaffolds for Bone Regeneration. **ACS applied materials & interfaces**, v. 7, n. 18, p. 9385-9398, 2015.

SOUZA, M. A.; SAKAMOTO, K. Y.; MATTOSO, L. H. C. Release of the Diclofenac Sodium By Nanofibers of Poly (3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) Obtained From Electrospinning and Solution Blow Spinning. **Journal of Nanomaterials**, p. 56, 2014.

STEA, S.; VISENTIN, M.; SAVARINO, L.; DONATI, M.; PIZZOFERRATO, A.; MORONI, A.; CAJA, V. Quantitative analysis of the bone-hydroxyapatite coating interface. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 6, n. 8, p. 455-459, 1995.

ŠUPOVÁ, M. Problem of hydroxyapatite dispersion in polymer matrices: a review. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, n. 6, p. 1201-1213, 2009.

TAMAI, N.; MYOUI, A.; TOMITA, T.; NAKASE, T.; TANAKA, J.; OCHI, T.; YOSHIKAWA, H. Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnective porous structure exhibit superior osteoconduction in vivo. **Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials**, v. 59, n. 1, p. 110-117, 2002.

TANG, X.; YU, Y. Electrospinning Preparation And Characterization Of Alumina Nanofibers With High Aspect Ratio. **Ceramics International**, v. 41, n. 8, p. 9232-9238, 2015.

TAS, A. C.; KORKUSUZ, F.; TIMUCIN, M.; AKKAS, N. An investigation of the chemical synthesis and high-temperature sintering behaviour of calcium hydroxyapatite (HA) and tricalcium phosphate (TCP) bioceramics. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 8, n. 2, p. 91-96, 1997.

THAVORNYUTIKARN, B.; CHANTARAPANICH, N.; SITTHISERIPRATIP, K.; THOUAS, G. A.; CHEN, Q. Bone tissue engineering scaffolding: computer-aided scaffolding techniques. **Progress in biomaterials**, v. 3, n. 2-4, p. 61-102, 2014.

TURNBULL, G.; CLARKE, J.; PICARD, F.; RICHES, P.; JIA, L.; HAN, F.; LI, B.; SHU, W. 3D Bioactive Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. **Bioactive Materials**, p. 1- 37, 2017.

USKOKOVIĆ, V.; USKOKOVIĆ, D. P. Nanosized hydroxyapatite and other calcium phosphates: chemistry of formation and application as drug and gene delivery agents. **Journal of biomedical materials research Part B: Applied biomaterials**, v. 96, n. 1, p. 152-191, 2011.

UTARA, S.; KLINKAEWNARONG, J. Sonochemical synthesis of nano-hydroxyapatite using natural rubber latex as a templating agent. **Ceramics International**, v. 41, n. 10, p. 14860-14867, 2015.

VACANTI, J. P.; LANGER, R. Tissue Engineering: The Design and Fabrication of Living Replacement Devices for Surgical Reconstruction and Transplantation. **The lancet**, v. 354, p. S32-S34, 1999.

VALLET-REGÍ, M.; GONZÁLEZ-CALBET, J. M. Calcium phosphates as substitution of bone tissues. **Progress in solid state chemistry**, v. 32, n. 1-2, p. 1-31, 2004.

WANG, B. Y.; FU, S. Z.; NI, P. Y.; PENG, J. R.; ZHENG, L.; LUO, F.; LIU, H.; QIAN, Z. Y. Electrospun polylactide/poly (ethylene glycol) hybrid fibrous scaffolds for tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 100, n. 2, p. 441-449, 2012.

WANG, M.-C.; CHEN, H.-T.; SHIH, W.-J.; CHANG, H.-F.; HON, M.-H.; HUNG, I.-M. Crystalline size, microstructure and biocompatibility of hydroxyapatite nanopowders by hydrolysis of calcium hydrogen phosphate dehydrate (DCPD). **Ceramics International**, v. 41, n. 2, p. 2999-3008, 2015.

WANG, Z.; XU, Z.; ZHAO, W.; SAHAI, N. A potential mechanism for amino acid-controlled crystal growth of hydroxyapatite. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, n. 47, p. 9157-9167, 2015.

WEI, M.; EVANS-FREEMAN, J. Synthesis and characterisation of hydroxyapatite and fluorapatite. In: Key Engineering Materials, Trans Tech Publ, p.35-38, 2002.

WHITE, T. J.; DONG, Z. Structural derivation and crystal chemistry of apatites. **Acta Crystallographica Section B: Structural Science**, v. 59, n. 1, p. 1-16, 2003.

WIDIYASTUTI, W.; SETIAWAN, A.; WINARDI, S.; NURTONO, T.; SETYAWAN, H. Particle formation of hydroxyapatite precursor containing two components in a spray pyrolysis process. **Frontiers of Chemical Science and Engineering**, v. 8, n. 1, p. 104-113, 2014.

WILLIAMS, D. Revisiting the definition of biocompatibility. **Medical device technology**, v. 14, n. 8, p. 10-13, 2003.

WU, Y.; HENCH, L. L.; DU, J.; CHOY, K.-L.; GUO, J. Preparation of Hydroxyapatite Fibers by Electrospinning Technique. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 87, n. 10, p. 1988-1991, 2004.

YOSHIMURA, M.; SUDA, H.; OKAMOTO, K.; IOKU, K. Hydrothermal synthesis of biocompatible whiskers. **Journal of materials science**, v. 29, p. 3399-3402, 1994.

YUAN, H.; FERNANDES, H.; HABIBOVIC, P.; DE BOER, J.; BARRADAS, A. M.; DE RUITER, A.; WALSH, W. R.; VAN BLITTERSWIJK, C. A.; DE BRUIJN, J. D. Osteoinductive ceramics as a synthetic alternative to autologous bone grafting. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 107, n. 31, p. 13614-13619, 2010.

ZEITZ, C.; FAIDT, T.; GRANDTHYLL, S.; HÄHL, H.; THEWES, N.; SPENGLER, C.; SCHMAUCH, J. R.; DECKARM, M. J.; GACHOT, C.; NATTER, H. Synthesis of hydroxyapatite substrates: bridging the gap between model surfaces and enamel. **ACS applied materials & interfaces**, v. 8, n. 39, p. 25848-25855, 2016.

ZHANG, H.; LIU, J.; YAO, Z.; YANG, J.; PAN, L.; CHEN, Z. Biomimetic mineralization of electrospun poly (lactic-co-glycolic acid)/multi-walled carbon nanotubes composite scaffolds in vitro. **Materials Letters**, v. 63, n. 27, p. 2313-2316, 2009.

ZHANG, L.; KOPPERSTAD, P.; WEST, M.; HEDIN, N.; FONG, H. Generation of polymer ultrafine fibers through solution (air-) blowing. **Journal of applied polymer science**, v. 114, n. 6, p. 3479-3486, 2009.

ZHANG, W.; CHEN, B.; ZHAO, H.; YU, P.; FU, D.; WEN, J.; PENG, X. Processing and characterization of supercritical CO₂ batch foamed poly (lactic acid)/poly (ethylene glycol) scaffold for tissue engineering application. **Journal of applied polymer science**, v. 130, n. 5, p. 3066-3073, 2013.

ZHANG, W.; YAO, D.; ZHANG, Q.; ZHOU, J. G.; LELKES, P. I. Fabrication of Interconnected Microporous Biomaterials with High Hydroxyapatite Nanoparticle Loading. **Biofabrication**, v. 2, n. 3, p. 035006, 2010.

ZHANG, Y.; LIU, Y.; JI, X.; BANKS, C. E.; SONG, J. Flower-like agglomerates of hydroxyapatite crystals formed on an egg-shell membrane. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 82, n. 2, p. 490-496, 2011.

ZHANG, Z.; MA, Z.; ZHANG, Y.; CHEN, F.; ZHOU, Y.; AN, Q. Dehydrothermally crosslinked collagen/hydroxyapatite composite for enhanced in vivo bone repair. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 163, p. 394-401, 2018.

ZHAO, Z.; ESPANOL, M.; GUILLEM-MARTI, J.; KEMPF, D.; DIEZ-ESCUADERO, A.; GINEBRA, M.-P. Ion-doping as a strategy to modulate hydroxyapatite nanoparticle internalization. **Nanoscale**, v. 8, n. 3, p. 1595-1607, 2016.

ZHITOMIRSKY, I. Electrophoretic hydroxyapatite coatings and fibers. **Materials Letters**, v. 42, p. 262-271, 2000.

ZHONG, S.; CHEN, J.; LI, Q.; WANG, Z.; SHI, X.; LIN, K.; ZHANG, Q. Assembly synthesis of spherical hydroxyapatite with hierarchical structure. **Materials Letters**, v. 194, p. 1-4, 2017.