



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Escola de Engenharia - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas,
Metalúrgica e de Materiais – PPGE3M

**EFEITOS DOS PARÂMETROS DE OBTENÇÃO DE FIBRAS DE
CELLPRENE® EPOXIDADO POR *ELECTROSPINNING***

Rafael Machado Carazzai

Porto Alegre

2019



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Escola de Engenharia - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas,
Metalúrgica e de Materiais – PPGE3M

**EFEITOS DOS PARÂMETROS DE OBTENÇÃO DE FIBRAS DE
CELLPRENE® EPOXIDADO POR *ELECTROSPINNING***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais – PPGE3M, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Engenharia. Área de Concentração: Ciência e Tecnologia de Materiais.

Mestrando: Eng. Rafael Machado Carazzai

Orientador: Prof. Dr. Luís Alberto Loureiro dos Santos

Porto Alegre, 2019

DEDICATÓRIA

À minha família

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de viver essa experiência e ter me capacitado para essa conquista.

À minha família pelo incentivo em todos os momentos, principalmente nas horas de desânimo e incertezas do caminho a seguir. À minha esposa pela compreensão e apoio incondicional. Aos meus pais por serem um porto seguro, com conselhos e sabedoria em todas as horas. Essa vitória é de todos nós.

Ao meu orientador, Professor Dr. Luis Alberto, primeiramente pela oportunidade de trabalhar por esses dois anos no Laboratório de Biomateriais. Também pelos ensinamentos e auxílio para a realização deste estudo, bem como seu esforço em transmitir o máximo de conhecimento.

Aos meus colegas de Laboratório, pela ajuda nas análises de resultados, ideias, auxílio na realização de ensaios, mas principalmente pela amizade e pelas conversas e comentários do cotidiano. Saio desta etapa com muitos aprendizados e amigos.

Aos colegas de outros laboratórios, alunos, técnicos e professores, que auxiliaram na realização de análises.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais (PPGE3M), às responsáveis pela secretaria, pela ajuda sempre que necessário. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro através da bolsa de mestrado recebida.

MUITO OBRIGADO A TODOS!

RESUMO

Cellprene® epoxidado é uma blenda polimérica produzida a partir de um polímero sintético, o poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) e um polímero natural (poli(isopreno)) que apresentou potencial para aplicações como biomaterial devido às suas características de biocompatibilidade, hidrofiliçidade, propriedades mecânicas quando obtida em forma de membrana pelo método de *solvent casting*. Em se tratando de um novo material, a produção de fibras, caracterização e avaliação de sua resposta como biomaterial para aplicações na engenharia de tecidos faz-se necessária. O processamento de materiais via *electrospinning* é um método relativamente simples e versátil que possibilita a produção de fibras com dimensões micro e nanométricas através do controle de parâmetros como tensão aplicada, distância entre agulha e coletor, fluxo de solução polimérica, concentração de solução polimérica, etc. A análise de ressonância magnética nuclear protônica demonstrou que a reação de epoxidação do poli(isopreno) natural atingiu um grau de epoxidação de $53,9 \pm 5,7$ mol%. As membranas fibrosas de Cellprene® epoxidado foram produzidas com os seguintes parâmetros: distância entre agulha e coletor de 20 cm, tensão aplicada de 15 kV, taxa de fluxo de material de 5 mL/h e concentração de solução de 5 %m/v. As fibras foram avaliadas e apresentaram diâmetro médio de $4,3 \pm 2,7$ μm . Análises termogravimétricas e calorimetria exploratória diferencial indicaram que a blenda continua imiscível, a análise de FTIR mostrou que não houve mudança química dos grupos funcionais após o processamento do material. O ensaio mecânico de tração mostrou um aumento de cerca de 10 vezes no módulo de elasticidade e redução de aproximadamente 3 vezes na deformação das membranas fibrosas de Cellprene® epoxidado quando comparadas às membranas obtidas via *solvent casting*. As membranas fibrosas não demonstraram efeito citotóxico na análise de cultura celular e apresentaram comportamento hidrofóbico. Com isso, as membranas fibrosas apresentaram características que demonstram potencial para aplicações como biomaterial na produção de *scaffolds*.

Palavras chave: PLGA, poli (isopreno), Cellprene® epoxidado, Engenharia de tecidos, *electrospinning*.

ABSTRACT

Epoxidized Cellprene® is a polymer blend made from a synthetic polymer, poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and a natural polymer (poly (isoprene)) that has potential for applications as a biomaterial due to its biocompatibility, hydrophilicity, mechanical properties when obtained in membrane form by solvent casting method. In the case of a new material, fiber production, characterization and evaluation of its response as a biomaterial for tissue engineering applications is necessary. Electrospinning material processing is a relatively simple and versatile method that enables the production of micro- and nanometer-sized fibers by controlling parameters such as applied tension, needle-collector distance, polymer solution flow, polymer solution concentration. Proton nuclear magnetic resonance analysis showed that the epoxidation reaction of natural poly (isoprene) reached an epoxidation degree of 53.9 ± 5.7 mol%. Epoxidized Cellprene® fibrous membranes were produced with the following parameters: 20 cm of needle-collector distance, 15 kV of applied tension, 5 mL / h of material flow rate and 5% m/v of solution concentration. The fibers were evaluated and presented an average diameter of 4.3 ± 2.7 μm . Thermogravimetric analysis and differential exploratory calorimetry indicated that the blend remains immiscible, FTIR analysis showed that there was no chemical change of the functional groups after material processing. Mechanical tensile testing showed a 10 times increase in modulus of elasticity and a 3 times reduction in deformation of epoxidized Cellprene® fibrous membranes compared to solvent casting membranes. Fibrous membranes showed no cytotoxic effect on cell culture analysis and showed hydrophobic behavior. Thus, the fibrous membranes presented characteristics that demonstrate potential for applications as biomaterial in the production of scaffolds.

Keywords: PLGA, poly (isoprene), Epoxidized Cellprene®, Tissue Engineering, electrospinning.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processo de sangria para obtenção do látex da borracha natural.	22
Figura 2. Esquema de processo de <i>electrospinning</i> (a) com coletor estático e (b) com coletor em rolo.....	24
Figura 3. Produção de fibras via <i>electrospinning</i>	25
Figura 4. Formação do cone de Taylor na ponta da agulha metálica, durante o desenvolvimento do presente trabalho.....	26
Figura 5. Fluxograma de obtenção de Cellprene® epox.....	27
Figura 6. Fluxograma de obtenção do poli(isopreno).....	28
Figura 7. Fluxograma do processo de epoxidação do poli(isopreno).	29
Figura 8. Comparação entre látex seco (esquerda) e PI epox (direita).	29
Figura 9. Membrana de Cellprene® epox após secagem em estufa.	30
Figura 10. Membrana de Cellprene® epox obtida por <i>electrospinning</i>	30
Figura 11. Fluxograma de análises realizadas em cada constituinte da blenda e com o Cellprene® epox.	31
Figura 12. Espectro RMN-H obtido para uma das amostras de poli(isopreno) epoxidado.	37
Figura 13. Efeito das variações feitas na distância entre agulha e coletor na formação de fibras de Cellprene® epox.	39
Figura 14. Efeito da variação da tensão aplicada na formação de fibras de Cellprene® epox.	40
Figura 15. Efeito da variação do fluxo de material na formação de fibras de Cellprene® epox.	42
Figura 16. Efeito da variação da concentração da solução polimérica na formação de fibras de Cellprene® epox pelo processo de <i>electrospinning</i>	43
Figura 17. Micrografia das fibras de Cellprene® epox produzidas pelo processo de <i>electrospinning</i>	45
Figura 18. Espectro FTIR-ATR da amostra de PLGA.	46
Figura 19. Espectros FTIR-ATR obtidos nas amostras PI e PI epox.	48
Figura 20. Espectros FTIR-ATR das amostras de PLGA, PI epox e Cellprene® epox.	49
Figura 21. Análise termogravimétrica do PLGA, PI epox e das fibras de Cellprene® epox.	50

Figura 22. Análise térmica diferencial do PLGA, PI epox e das fibras de Cellprene® epox.	50
Figura 23. Análise de DSC para o PI epox.	52
Figura 24. Análise de DSC para o PLGA.	53
Figura 25. Análise de DSC para o Cellprene® epox produzido via <i>electrospinning</i>	53
Figura 26. Curva tensão versus deformação das membranas de Cellprene® epox.	55
Figura 27. Comparação dos espectros obtidos por FTIR das membranas submetidas ao ensaio de degradação.	58
Figura 28. Microscopia da amostra degradada por 28 dias em água deionizada. ...	59
Figura 29. Microscopia da amostra degradada 28 dias em solução Ringer.	60
Figura 30. Microscopia da amostra degradada por 28 dias em solução fisiológica.	60
Figura 31. Gota depositada sobre a membrana obtida via <i>electrospinning</i> para a medição do ângulo de contato.	61
Figura 32. Gota depositada na membrana de Cellprene® epox obtida via <i>solvent casting</i>	61
Figura 33. Ensaio de cultura celular nas membranas obtidas via <i>electrospinning</i> em (a) regime de controle e com (b) células aderidas.	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Escolha e variação dos parâmetros utilizados no processo de <i>electrospinning</i>	32
Tabela 2. Viscosidade para cada concentração testada no processo de <i>electrospinning</i>	44
Tabela 3. Parâmetros escolhidos para a obtenção de fibras de Cellprene® epox. ..	45
Tabela 4. Bandas características do copolímero PLGA.	47
Tabela 5. Valores de GPC para PI, PI epox e PLGA.	54
Tabela 6. Propriedades mecânicas da membrana de Cellprene® epox.....	56
Tabela 7. Perda de massa das membranas de Cellprene® epox para períodos de tempo de 7, 14, 21 e 28 dias.	57

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
®	Marca registrada
°	Grau
°C	Grau Celsius
µm	Micrometro
cm	Centímetro
g	Gramma
h	Hora
kN	Quilonewton
kV	Quilovolt
L	Litro
m	Massa
m/v	Massa por unidade de volume
m ₀	Massa inicial
mg	Miligramma
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
Mn	Massa molar numérica média
mol%	Porcentagem molar
m _p	Massa no período
MPa	Megapascal
Mw	Massa molar ponderal média
mW	Miliwatt
Pa	Pascal
ppm	Partes por milhão
Tg	Temperatura de transição vítrea

LISTA DE ABREVIATURAS

ASM	<i>American Society of Materials</i> (sigla em inglês)
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i> (sigla em inglês)
DAPI	4,6-diamidino-2-phenilindole
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i> (sigla em inglês)
DTG	<i>Derivative Thermogravimetry</i> (sigla em inglês)
ECM	<i>Extracellular Matrix</i> (sigla em inglês)
ENR-50	<i>Epoxidized Natural Rubber 50 mol%</i> (sigla em inglês)
FTIR	<i>Fourier-Transform Infrared Spectroscopy</i> (sigla em inglês)
FTIR-ATR	<i>Fourier-Transform Infrared Spectroscopy with Attenuated Total Reflectance</i> (sigla em inglês)
GPC	<i>Gel Permeation Chromatography</i> (sigla em inglês)
HPS	Hidroxipropil
IPD	Índice de Polidispersividade
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> (sigla em inglês)
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCL	Poli(ϵ -caprolactona)
PEO	Poli(óxido de etileno)
PGA	Poli(ácido glicólico)
PI	Poli(isopreno)
PI epox	Poli(isopreno) epoxidado
PLA	Poli(ácido láctico)
PLGA	Poli(ácido láctico-co-glicólico)
PVA	Poli(álcool vinílico)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TGA	<i>Thermogravimetric Analysis</i> (sigla em inglês)
THF	Tetrahidrofurano

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	4
RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE SÍMBOLOS	10
LISTA DE ABREVIATURAS	11
1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1. Engenharia de Tecidos	16
3.2. Biomateriais	17
3.2.1. Biomateriais Poliméricos.....	19
3.2.2. Polímeros bioabsorvíveis e biorreabsorvíveis	20
3.2.3. Blendas poliméricas.....	20
3.2.4. Poli (ácido láctico-co-glicólico) - PLGA	21
3.2.5. Borracha Natural.....	22
3.3. <i>Electrospinning</i>	23
3.3.1. Influência dos parâmetros de <i>electrospinning</i> na produção de fibras	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1. Obtenção do Cellprene® epox	27
4.2. <i>Electrospinning</i>	31
4.3. Análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	32
4.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	33
4.5. Viscosidade	33
4.6. Análise FTIR-ATR.....	33

4.7. Análise Termogravimétrica (TGA).....	33
4.8. Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	34
4.9. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC).....	34
4.10. Ensaio Mecânico de Tração.....	34
4.11. Análise de Degradação <i>in vitro</i>	35
4.12. Molhabilidade.....	35
4.13. Análise de Cultura Celular.....	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1. Análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	37
5.2. Parâmetros de obtenção de fibras de Cellprene® epox.....	37
5.2.1. Efeito da distância entre agulha e coletor.....	37
5.2.2. Efeito da tensão.....	39
5.2.3. Efeito da taxa de fluxo de material.....	40
5.2.4. Efeito da concentração da solução polimérica.....	42
5.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	45
5.4. Análise FTIR-ATR.....	46
5.5. Análise Termogravimétrica (TGA).....	49
5.6. Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	51
5.7. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC).....	54
5.8. Ensaio Mecânico de Tração.....	55
5.9. Degradação <i>in vitro</i>	57
5.10. Molhabilidade.....	60
5.11. Análise de Cultura Celular.....	62
6. CONCLUSÕES.....	63
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	64
8. BIBLIOGRAFIA.....	65

1. INTRODUÇÃO

A qualidade de vida de um indivíduo é definida como sensação de íntima de conforto, bem-estar ou felicidade no desempenho de funções físicas, intelectuais e psíquicas dentro da realidade de sua família, do seu trabalho e dos valores da comunidade à qual pertence, e têm sido cada vez mais valorizada (Nobre et al., 1994). Antigamente, a remoção da porção lesada era a prática mais utilizada quando ocorriam grandes lesões teciduais devidas a traumas mecânicos ou doenças degenerativas. Isso levava a um decréscimo significativo da qualidade de vida ao portador da enfermidade (Santos e Wada, 2007).

Dados da Organização Mundial da Saúde indicam o aumento da expectativa de vida humana em cinco anos, no período de 2000 a 2015, que é o avanço mais rápido desde a década de 60. Este aumento da expectativa de vida humana e a busca pela qualidade de vida fazem com que a busca por metodologias para a substituição e regeneração de tecidos lesados seja uma necessidade (Hench, 1998; OMS, 2015). Para isso a Engenharia de Tecidos tem como objetivo regenerar tecidos danificados através da combinação de células com biomateriais, que funcionam como suportes (*scaffolds*) altamente porosos na orientação do crescimento de novos tecidos.

Diversos biomateriais têm sido desenvolvidos, e diferentes técnicas de fabricação têm sido utilizadas para a produção de *scaffolds* para aplicação em diferentes tecidos. Os *scaffolds* devem apresentar: biocompatibilidade, biodegradabilidade, arquitetura e propriedades mecânicas adequadas, e viabilidade clínica e comercial (O'Brien et al., 2011). Algumas das técnicas utilizadas para a produção de *scaffolds* são: *solvent casting*, liofilização, prototipagem rápida, *electrospinning*, entre outras (Eltom et al., 2019).

A técnica de *electrospinning* possibilita a formação de fibras poliméricas com dimensões na escala micro e nanométrica, e a membrana produzida a partir do *electrospinning* apresenta porosidade que é de grande importância na Engenharia de Tecidos. A porosidade permite que as redes celulares realizem, através de vias interconectadas, o transporte de nutrientes e a proliferação celular, reproduzindo o ambiente da matriz extracelular nativa na estrutura implantada (Chan e Leong, 2008).

Cellprene® é uma blenda polimérica de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) e poli(isopreno) da borracha natural que foi desenvolvida no Laboratório de Biomateriais da Universidade Federal do Rio grande do Sul que apresentou potencial para aplicações como biomaterial e mostrou-se imiscível (Marques, 2011). O PLGA é um polímero sintético da família dos poli(ésteres) que é bastante utilizado na produção de *scaffolds* pois são biocompatíveis e biodegradáveis. Uma vez degradado, os componentes monoméricos de cada polímero são removidos por caminhos naturais (Gentile *et al.*, 2014). O poli(isopreno) é um polímero natural presente no látex da borracha natural que é extraído da árvore da espécie *Hevea brasiliensis* e tem sido aplicado como biomaterial devido sua atividade angiogênica e cicatrização de feridas (Borges *et al.*, 2017).

Para melhorar as características do Cellprene®, Guerra (2018) promoveu a reação de epoxidação do poli(isopreno) para aumentar a reatividade e a hidrofiliabilidade e, conseqüentemente, aumentar miscibilidade e biocompatibilidade da blenda. Os resultados obtidos por Guerra (2018) e Henckes e colaboradores (2018) demonstram a elevada biocompatibilidade do Cellprene® epoxidado, permitindo a proliferação de células-tronco mesenquimais em membranas obtidas por *solvent casting*. No entanto, para uso em engenharia de tecidos, os *scaffolds* necessitam da presença de estrutura porosa, que permita a proliferação celular. Neste sentido, o presente trabalho procurou estudar um método de obtenção de estruturas porosas para *scaffolds*, utilizando Cellprene® epoxidado como material base, baseado na eletrofiação (*electrospinning*).

Diante disso, este trabalho teve como objetivos:

2. OBJETIVOS

Obter e caracterizar fibras da blenda Cellprene® epoxidada produzida através do método de *electrospinning* e avaliar seu potencial para aplicações na Engenharia de Tecidos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Por se tratar de um trabalho de natureza multidisciplinar, fez-se necessária a revisão bibliográfica para tratar de assuntos relacionados às ciências da saúde como Engenharia de Tecidos, que faz parte da Medicina Regenerativa, e também assuntos voltados à engenharia como biomateriais e processamento de materiais.

3.1. Engenharia de Tecidos

A engenharia de tecidos é um campo de pesquisa multidisciplinar, que envolve medicina, biologia, ciência dos materiais e engenharia. O principal objetivo da engenharia de tecidos é desenvolver *scaffolds* de biomateriais que permitem a contenção de células e moléculas, e servem como um suporte transplantável, para permitir a regeneração funcional do tecido dentro do hospedeiro como uma alternativa ao transplante de órgãos e métodos de reconstrução de tecidos convencional (Chen *et al.*, 2013).

A engenharia de tecidos foca na integração de *scaffolds*, células e fatores bioativos para produzir tecidos biológicos funcionais (Manoukian *et al.*, 2019). A criação de tecidos e órgãos artificiais ocorre através de um processo que envolve transplante de células e subsequente transformação em novos tecidos e órgãos tendo integridade funcional e estrutural homóloga à natural. O processo requer *scaffolds* de biomateriais que suportem a adesão, crescimento, proliferação e diferenciação celular (Ghosal *et al.*, 2019). As técnicas utilizadas para a fabricação dos *scaffolds* dependem das propriedades do material usado e da aplicação final, pois o tecido em que o *scaffold* será implantado determinará o tipo de estrutura necessária (Castillo-Dalí *et al.*, 2015). Existem diversos tipos de biomateriais utilizados na engenharia de tecidos, mas eles são obtidos principalmente de polímeros naturais, polímeros sintéticos e tecidos descelularizados, que são produzidos por diversas técnicas como prototipagem rápida, descelularização de tecidos e *electrospinning* (Steffens *et al.*, 2018).

3.2. Biomateriais

O termo biomaterial pode ter duas interpretações, a primeira é biomaterial com o sentido de material biológico, e a segunda forma de entendimento é como material do implante que substitui a função do material biológico (Park, 1979). Os biomateriais são definidos por diversos autores, algumas definições apresentam maior e outras menor abrangência. Durante o conselho de Biomateriais de Clemson, no 6º simpósio anual internacional de biomateriais em 1974, biomaterial foi definido como uma substância farmacologicamente e sistemicamente inerte, projetada para implantação dentro ou incorporado a um sistema vivo. Segundo Park (1979) biomateriais são tudo que, de modo contínuo ou intermitente, entra em contato com fluidos corpóreos, mesmo que esteja localizado fora do corpo. Na Conferência de Consenso em Biomateriais para Aplicações Clínicas, 1982, biomateriais foram definidos como toda substância (com exceção de drogas) ou combinação de substâncias, de origem sintética ou natural, que durante um período de tempo indeterminado é empregado como um todo ou parte integrante de um sistema para tratamento, ampliação ou substituição de quaisquer tecidos, órgãos ou funções corporais. Outra definição de biomaterial é: material não biológico utilizado em um dispositivo médico, com intenção de interagir com sistemas biológicos (Williams, 1987). Mirtchi *et. al.*, (1989) definiram os biomateriais como substâncias de origem natural ou sintética que são toleradas de forma transitória ou permanente pelos diversos tecidos que constituem os órgãos dos seres vivos.

Segundo Helmus e Tweden (1995) os biomateriais são polímeros sintéticos, metais, cerâmicas, e macromoléculas naturais que são produzidos e processados como dispositivo médico. Os biomateriais não devem produzir respostas biológicas adversas, locais ou sistêmicas. Assim, devem ser não-tóxicos, não-carcinogênicos e não-trombogênicos. Para que os biomateriais possam ser utilizados na confecção de implantes é necessário que os mesmos sejam: biocompatíveis, biofuncionais, esterilizáveis, e sua degradação deve ocorrer de forma controlada.

Hench e Wilson (1993) classificaram os biomateriais em quatro grupos de acordo com sua resposta biológica ou química:

- Biotoleráveis: são isolados dos tecidos adjacentes pela formação de tecido fibroso. Quanto maior a espessura da camada de tecido fibroso, menor é a tolerabilidade do material pelo organismo.

- Bioinertes: não liberam nenhum tipo de componente, sendo a camada de tecido fibroso praticamente inexistente.
- Bioativos: ligações químicas são feitas entre o material e o tecido devido a sua alta compatibilidade.
- Bioabsorvíveis: são degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo após certo período de tempo em contato com os tecidos.

Os biomateriais têm um papel fundamental na engenharia de tecidos, pois funcionam como uma matriz extracelular artificial de suporte na regeneração (Chen *et al.*, 2013). Os biomateriais são materiais sintéticos ou naturais que são utilizados para reparar, através da interação com sistemas vivos, partes do corpo que foram danificadas. Esses materiais são usados para substituir um componente do corpo humano ou para auxiliar nas funções fisiológicas. Para isso, os biomateriais interagem com células, tecidos e órgãos humanos, e podem desempenhar suas funções. Em geral, os biomateriais podem ser divididos nas seguintes categorias: metais, cerâmicas, polímeros e compósitos. Nas últimas décadas, todas as classes de materiais atraíram atenção de engenheiros e cientistas para aplicações biomédicas (Bose *et al.*, 2018).

Os metais são os mais utilizados para implantes que necessitam suportar cargas, sendo amplamente utilizados na ortopedia, onde podem ser empregados como fios, placas de fixação ou próteses para joelhos, tornozelos e ombros. Dentre os biomateriais metálicos mais utilizados estão o aço inoxidável, titânio puro, ligas de titânio e ligas de Cobalto (ASM International, 2003).

Características como alta biocompatibilidade, resistência à corrosão, resistência à compressão e baixas condutividades térmicas e elétricas fazem dos biomateriais cerâmicos materiais adequados aos implantes. Além disso, os ossos possuem fases minerais presentes nas cerâmicas, fato que permite que as mesmas sejam utilizadas como substituto ósseo ou promotor da regeneração óssea. Fosfatos de cálcio e alumina são exemplos de biomateriais cerâmicos. A hidroxiapatita tem lugar de destaque nesta classe de materiais, sendo utilizada em cirurgias odontológicas como substituto ósseo e também como recobrimento de implantes metálicos odontológicos e ortopédicos (Sáenz *et al.*, 1999).

Biomateriais poliméricos são utilizados quando formas complexas ou alta flexibilidade são requisitos da aplicação (Sáenz *et al.*, 1999). Alguns exemplos de

aplicação de biomateriais poliméricos na engenharia de tecidos incluem reparos de cartilagem, pele, músculos, vasos sanguíneos entre outros (Tang *et al.*, 2014). Poli(ácido lático) (PLA) e poli(caprolactona) (PLC) são alguns dos materiais mais utilizados entre os polímeros sintéticos enquanto elastina e ácido hialurônico são alguns exemplos de polímeros de origem natural.

Os compósitos se referem à combinação de dois ou mais materiais que diferem em composição ou morfologia para obter propriedades químicas, físicas e mecânicas específicas. Os biomateriais compósitos podem produzir *scaffolds* multifuncionais, podendo ser aplicados a ossos, ligamentos e cartilagens (Gloria *et al.*, 2010).

3.2.1. Biomateriais Poliméricos

Os biomateriais derivados de polímeros podem ser divididos em duas categorias: sintéticos e naturais. Materiais à base de colágenos, alginatos e quitosana são exemplos de biomateriais provenientes de recursos naturais, já os polímeros de origem sintética podem ser classificados como bioerodíveis e não bioerodíveis. Os polímeros bioerodíveis têm se tornado muito importantes na engenharia de tecidos, por descartarem procedimento cirúrgico adicional para remoção dos implantes (Khan *et al.*, 2015).

Os biomateriais poliméricos sintéticos e naturais são de grande interesse para a produção de *scaffolds* devido à sua abundância e suas características físico-químicas e biológicas (Abbasian *et al.*, 2019). Bioatividade, biocompatibilidade, degradação de subprodutos não tóxicos e semelhança com a matriz extracelular (ECM) nativa são algumas características positivas dos polímeros naturais para aplicações em engenharia de tecidos. Por outro lado a difícil reprodutibilidade das composições e propriedades associadas aos diferentes lotes de produção e a antigenicidade surgem como pontos negativos desse tipo de material (Sell *et al.*, 2010; Rao *et al.*, 2018).

Enquanto isso, polímeros sintéticos são produzidos sob condições controladas, o que faz com que estes materiais apresentem propriedades mecânicas e físicas como resistência à tração, módulo de elasticidade e taxa de degradação previsíveis (Dhandayuthapani *et al.*, 2011). Entretanto, as principais desvantagens destes materiais são: baixa biocompatibilidade, liberação de produtos de

degradação ácidos e propriedades mecânicas limitadas (Gunatillake e Adhikari, 2003; Gunatillake *et al.*, 2006).

3.2.2. Polímeros bioabsorvíveis e biorreabsorvíveis

Os polímeros bioerodíveis podem ser classificados em bioabsorvíveis e biorreabsorvíveis. Os polímeros biorreabsorvíveis sofrem degradação através de clivagem das cadeias, com redução da massa molar formando oligômeros e monômeros, que são eliminados por rotas metabólicas do organismo (Vert *et al.*, 1992). Segundo Barbanti *et al.*, (2005) biorreabsorção corresponde à eliminação de todo material e subprodutos de degradação sem efeitos colaterais.

Polímeros bioabsorvíveis são materiais poliméricos e dispositivos que podem se dissolver em fluidos corpóreos sem cisão da cadeia molecular ou redução da massa molar. Há uma dissolução do material em soluto orgânico, mas não há clivagem química das cadeias (Chu, 1999). A dissolução lenta de implantes em fluidos orgânicos se dá pela bioabsorção. Se as macromoléculas são excretadas um polímero bioabsorvível pode ser biorreabsorvível (Barbanti *et al.*, 2005). O uso de biomateriais poliméricos biorreabsorvíveis tem a vantagem de eliminar a segunda intervenção cirúrgica para remoção do implante, além de evitar os riscos de corrosão ou desgaste quando comparados aos implantes metálicos (Santos Jr, 2010). Uma das desvantagens é a possibilidade do colapso durante a degradação, resultando na perda da função de barreira e conseqüentemente a invasão de outros tecidos na área de regeneração, levando à falha no procedimento (Sousa *et al.*, 2013).

3.2.3. Blendas poliméricas

Blendas poliméricas são misturas homogêneas macroscópicas de dois ou mais polímeros nas quais a quantidade dos integrantes está acima de 2 % em massa. Na maioria dos casos as blendas são homogêneas em escalas maiores que o comprimento de onda da luz visível, os constituintes da blenda são separáveis por métodos físicos e não é levada em consideração a miscibilidade ou imiscibilidade das macromoléculas que fazem parte da blenda (IUPAC, 1997; Utracki e Wilkie, 2002).

Para que materiais poliméricos sejam capazes de atender aos requisitos para aplicações em engenharia de tecidos, eles devem possuir características físico-químicas, mecânicas, biológicas e de biocompatibilidade aprimoradas, o que

difícilmente ocorre em um único polímero, seja natural ou sintético. Uma alternativa bastante usada para suprir a carência de um material é a mistura física com outro material que possibilite a combinação e otimização de propriedades dos diferentes componentes da mistura (Goonoo *et al.*, 2015).

Biopolímeros naturais são mais difíceis de produzir que polímeros sintéticos devido às suas complexas estruturas químicas, baixa solubilidade e alta tensão superficial, o que torna suas aplicações limitadas, pois também apresentam baixas propriedades mecânicas e rápida biodegradação. Com o objetivo de melhorar as características apresentadas pelos biopolímeros naturais são utilizados os sistemas híbridos, que consistem na mistura de um biopolímero natural e um polímero sintético biocompatível (Liu *et al.*, 2017).

Diversos autores têm desenvolvido blends entre polímeros naturais e sintéticos para aplicações em engenharia de tecidos, como por exemplo: amido de hidroxpropil (HPS)/ poli(óxido de etileno) (PEO) (Silva *et al.*, 2013), PLGA/ colágeno (Sadeghi-Avalshahr *et al.*, 2017), PLGA/ poli(isopreno)/ hidroxiapatita (Oliveira *et al.*, 2019).

3.2.4. Poli (ácido láctico-co-glicólico) - PLGA

Dentre os polímeros sintéticos, os mais utilizados na regeneração tecidual são os polímeros alifáticos, que incluem poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL) entre outros. O PLGA tem recebido atenção devido às suas características mecânicas, taxa de degradação e biocompatibilidade quando implantado *in vivo* (Iqbal *et al.*, 2019).

O PLGA é um copolímero linear sintético semicristalino de poli(ácido láctico) (PLA) e poli(ácido glicólico) (PGA) que pode ser usado em forma de filmes, membranas, *scaffolds* porosos, hidrogéis ou microesferas em aplicações biomédicas (Sun *et al.*, 2017; Gentile *et al.*, 2014). O PLGA é utilizado como biomaterial desde a década de 70, quando foi utilizado como suturas, sendo empregado posteriormente como implantes, enxerto de tecidos e como dispositivos protéticos e terapêuticos (Swider *et al.*, 2018).

O PLGA, assim como o PLA e o PGA pode ser completamente degradado através de hidrólise e enzimólise, e os produtos de degradação podem ser reabsorvidos ou removidos pelo corpo com toxicidade sistêmica mínima. As propriedades mecânicas, taxa de degradação e biofuncionalidades do PLGA podem

ser ajustadas controlando, por exemplo, o peso molecular e a proporção das unidades láctico/glicólico (Shan *et al.*, 2018)

Martins *et al.*, (2018) descreveram o PLGA como um polímero versátil, biocompatível e biodegradável, com propriedades que o tornam único e o polímero mais desejado para aplicações médicas. Devido às suas características particulares, o PLGA pode adquirir diferentes tamanhos e formas, e quando combinado com outros polímeros pode ser o candidato perfeito para ser aplicado como *scaffold* na regeneração tecidual.

3.2.5. Borracha Natural

O termo borracha natural refere-se ao produto coagulado ou precipitado que é obtido do látex da borracha natural. Com propriedades elásticas e após o processo de cura, a borracha natural é dúctil e usada para a produção de elastômeros (Rose e Steinbüchel, 2005). O látex da borracha natural é uma solução branca e leitosa que é extraída quando a árvore denominada *Hevea brasiliensis* é submetida ao processo conhecido como “sangria”, e é apontado como um biomaterial promissor. O látex da borracha natural é um sistema coloidal polidisperso e polifásico que é constituído de 30 a 45 % em massa de moléculas da borracha, poli(*cis*-isopreno), 4 a 5 % em massa de outros componentes como lipídios, proteínas, carboidratos e açúcar, e aproximadamente 50 % em massa de água (Ferreira *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2017). A Figura 1 mostra o processo de obtenção do látex da borracha natural.



Figura 1. Processo de sangria para obtenção do látex da borracha natural (Kerche-Silva *et al.*, 2017).

A borracha natural tem demonstrado estimular a angiogênese, adesão celular e formação de matriz extracelular, além de promover a substituição e regeneração de tecidos (Kerche-Silva *et al.*, 2018). Biocompatibilidade, hipoalergenicidade, impermeabilidade, elasticidade, flexibilidade, baixo custo e resistência também são características do látex (Ribeiro *et al.*, 2017). A borracha natural, composta por unidades *cis*-1,4-poli(isopreno), possui baixa polaridade e é incompatível com polímeros polares. Isso faz com que sejam realizadas modificações na borracha natural para melhorar a compatibilidade com outros polímeros polares (Salaeh *et al.*, 2018; Guerra, 2018).

A reação de epoxidação da borracha natural é um método de modificação química que introduz o grupo epóxi, o qual é muito reativo, dentro da cadeia do poli(isopreno), e provoca o aumento da compatibilidade entre carga-polímero e facilita misturas físicas poliméricas (Jorge *et al.*, 2009). Ou seja, o objetivo principal desta modificação é introduzir grupos polares, ao longo das cadeias de poli(isopreno) como uma forma de melhorar propriedades físico-químicas do material (Mascia *et al.*, 2017). Estudos prévios da blenda polimérica de PLGA e poli(isopreno) com a utilização do poli(isopreno) em sua forma natural e modificado através da reação de epoxidação demonstraram que o material tem potencial para aplicações na engenharia de tecidos como *scaffold* para regeneração de tecidos epiteliais (Marques, 2015; Guerra, 2018)

3.3. *Electrospinning*

O processo de *electrospinning* necessita de quatro componentes básicos para seu funcionamento: uma seringa contendo a solução polimérica, uma agulha metálica, uma fonte de tensão e um coletor metálico. Adaptações e ajustes nesse sistema podem ser feitos como, por exemplo, a utilização de um equipamento para manter o fluxo da solução polimérica contínuo. Exemplos de *electrospinning* com diferentes coletores são apresentados na Figura 2.

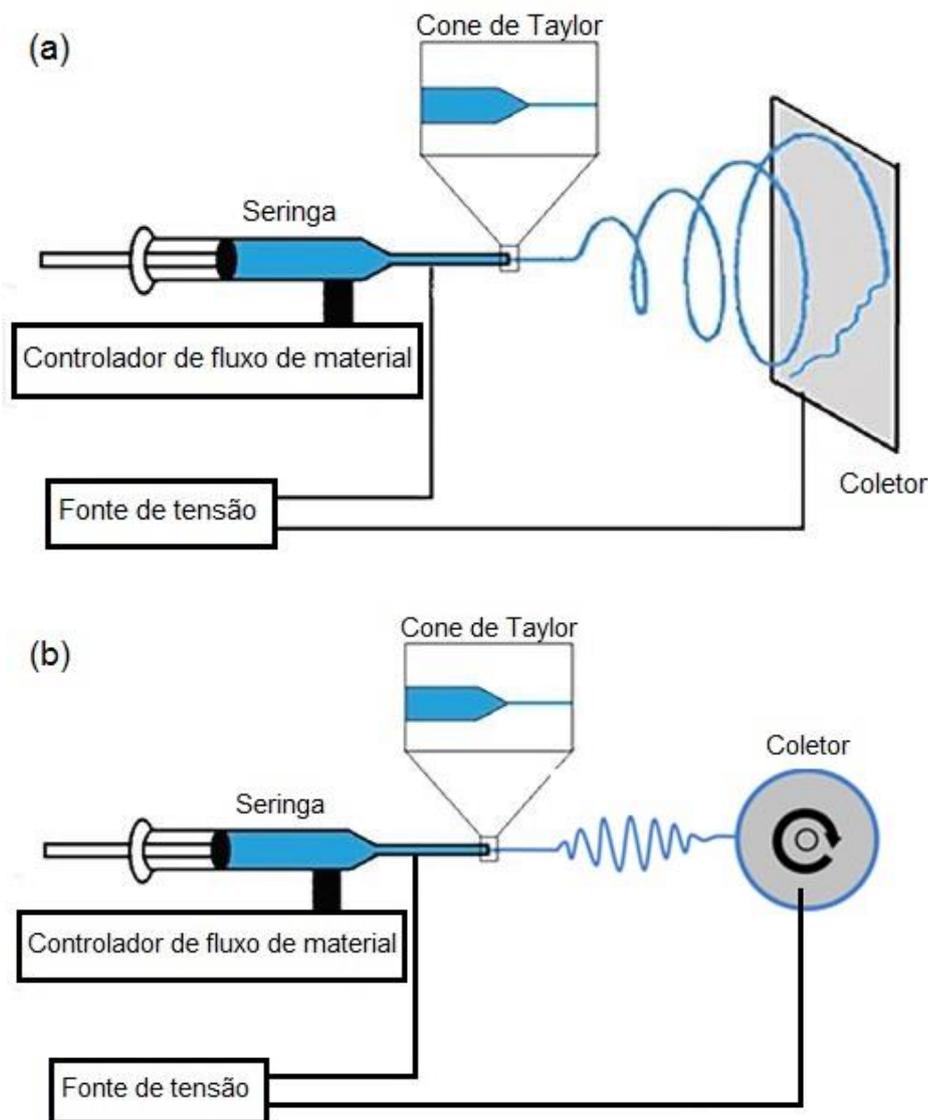


Figura 2. Esquema de processo de *electrospinning* (a) com coletor estático e (b) com coletor em rolo (Li, Bou-Akl, 2016; Leach *et al.*, 2011). Adaptado.

O princípio de funcionamento da técnica denominada *electrospinning* é simples: cargas elétricas são aplicadas pela fonte de tensão à solução polimérica através da agulha metálica, que gera instabilidade na solução polimérica. O aumento da diferença de potencial aplicada ao sistema faz com que a gota de solução polimérica na ponta da agulha tome a forma cônica (Cone de Taylor). Quando a carga eletrostática aplicada supera a tensão superficial da solução polimérica, fibras ultrafinas emergem desta gota e logo em seguida, perdem estabilidade, na zona de instabilidade (*whipping*). Depois da zona de instabilidade as fibras seguem reduzindo seu diâmetro e secando até que o coletor metálico posicionado a uma distância adequada da agulha seja alcançado (Haider *et al.*, 2018; Stepanyan *et al.*, 2016). A

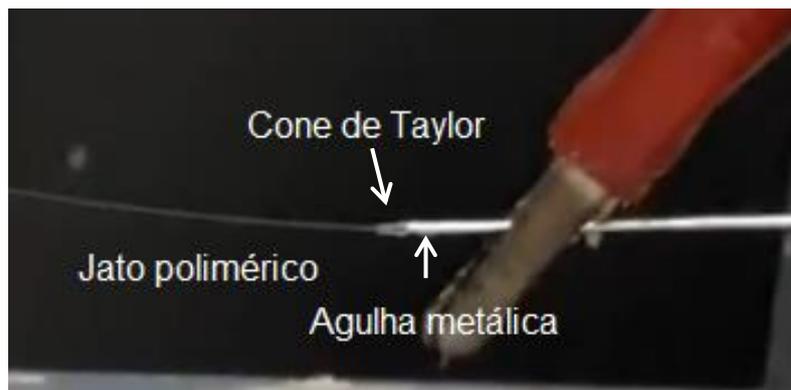


Figura 4. Formação do cone de Taylor na ponta da agulha metálica, durante o desenvolvimento do presente trabalho.

3.3.1. Influência dos parâmetros de *electrospinning* na produção de fibras

O processo de *electrospinning* é afetado por diversos fatores na obtenção de fibras lisas e livres de *beads*. Autores afirmaram que *beads* são defeitos originados de instabilidades do jato de solução polimérica, e sua ocorrência é devida principalmente à diferença de potencial aplicada, tensão superficial da solução e à baixa concentração de polímeros na solução (Fong *et al.*, 1999; Zeng *et al.*, 2003).

Os parâmetros envolvidos na produção de fibras via *electrospinning* podem ser divididos em parâmetros do processo de *electrospinning*, parâmetros de solução e parâmetros ambientais. Dentre os parâmetros do processo de *electrospinning* estão: diferença de potencial elétrico aplicado, o fluxo da solução, velocidade de rotação do coletor, distância entre agulha e coletor. Os parâmetros de solução são: solvente, concentração polimérica, viscosidade e condutividade da solução. Já os parâmetros ambientais incluem umidade relativa e temperatura (Haider *et al.*, 2018). Os parâmetros de processamento e ambientais podem ser controlados, enquanto os parâmetros de solução são interdependentes e seu impacto na morfologia da fibra não pode ser tratado individualmente (Rogina, 2014).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção do Cellprene® epox

Para a obtenção do Cellprene® epoxidado, ou Cellprene® epox, foram seguidos os procedimentos indicados por Marques (2011) e Guerra *et al.*(2018). As etapas do processo são apresentadas fluxograma que segue (Figura 5):

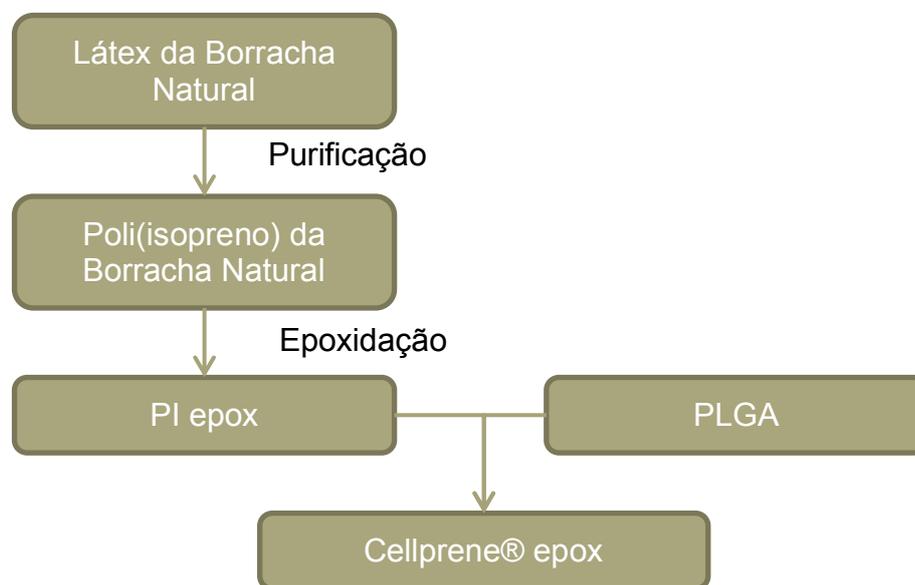


Figura 5. Fluxograma de obtenção de Cellprene® epox.

O poli(ácido Láctico-co-Glicólico) também conhecido como PLGA, utilizado na produção de Cellprene® epoxidado, foi adquirido da empresa PURAC *Biomaterials* com razão de massa 85/15, com nome comercial Purabsorb® PLG8531. O látex natural centrifugado 60%, de onde foi extraído o poli(isopreno), é comercializado pela empresa MAFER Indústria e Comércio de artefatos de borracha e tem origem na Malásia.

O processo de purificação consiste em separar o poli(isopreno) contido no látex natural de outros componentes como proteínas, carboidratos, etc. A purificação do látex natural é feita através de secagem em estufa a 40°C por 48 horas, seguida de solubilização em clorofórmio (Synth-Brasil) (10 g de látex seco em 500 mL de clorofórmio) e reprecipitação em metanol (Synth-Brasil) (500 mL da solução anterior em 500 mL de metanol) seguida de secagem em estufa semi-aberta a 40°C por 2 horas. O processo de reprecipitação e secagem em estufa semi-aberta é repetido três vezes. A Figura 6 mostra o fluxograma do processo de purificação do látex da borracha natural detalhado e obtenção do poli(isopreno).

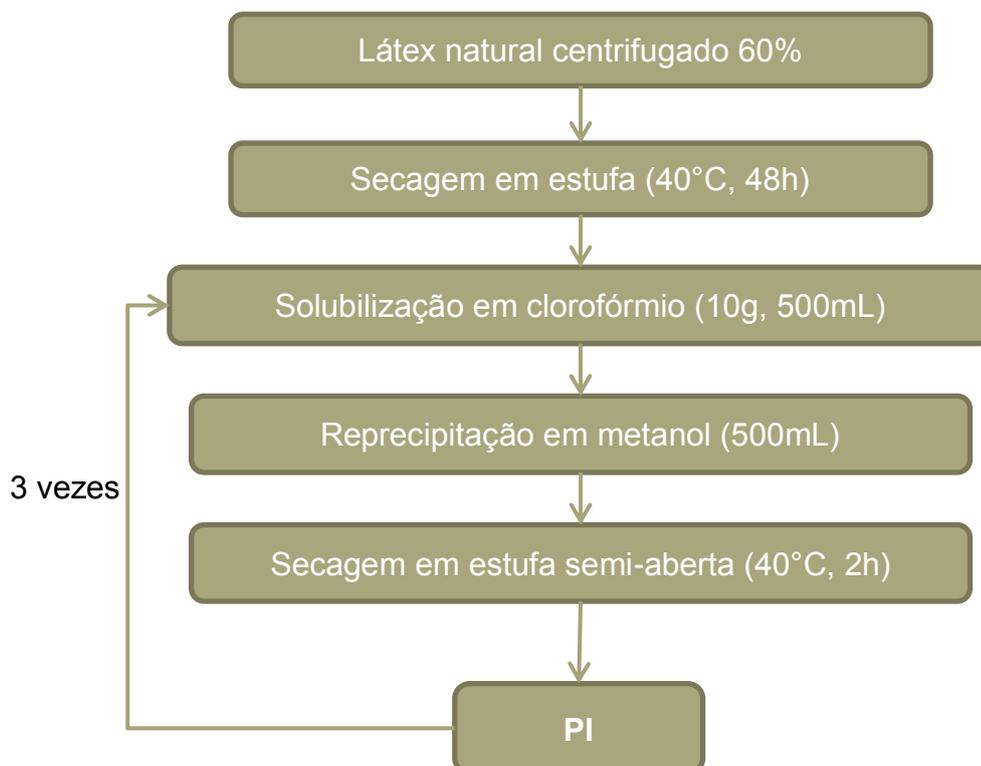


Figura 6. Fluxograma de obtenção do poli(isopreno).

Após a purificação do látex da borracha natural e consequente obtenção do poli(isopreno), o mesmo deve passar pelo processo de epoxidação. Nesta etapa de processamento do material, 5 g poli(isopreno) são dissolvidos em 400 mL de clorofórmio. Com o poli(isopreno) totalmente dissolvido, a solução é aquecida a 50 °C. Feito isso, 5 gotas de surfactante *Tween 20* (Sigma-Brasil) e 6 mL de ácido fórmico (Dinâmica-Brasil) foram adicionados à solução a uma agitação de 200 rpm. O gotejamento lento de 15 mL de peróxido de hidrogênio 35 % (Vetec-Brasil) é iniciado. Para alcançar o grau de epoxidação desejado, a solução deve ser mantida em agitação (200 rpm) e temperatura (50 °C) constante durante 4 horas. Após 4 horas, a solução é neutralizada com Hidróxido de Amônio (Sigma-Brasil). Para remover os resíduos decorrentes da neutralização e o peróxido de hidrogênio foram realizadas lavagens com água deionizada. Após as lavagens, a fase orgânica foi precipitada em metanol e o poli(isopreno) epoxidado (PI epox) foi levado a estufa a 40 °C durante 24 horas. A Figura 7 mostra o fluxograma do processo de epoxidação do poli(isopreno) e a Figura 8 apresenta a comparação do látex seco e PI epox.

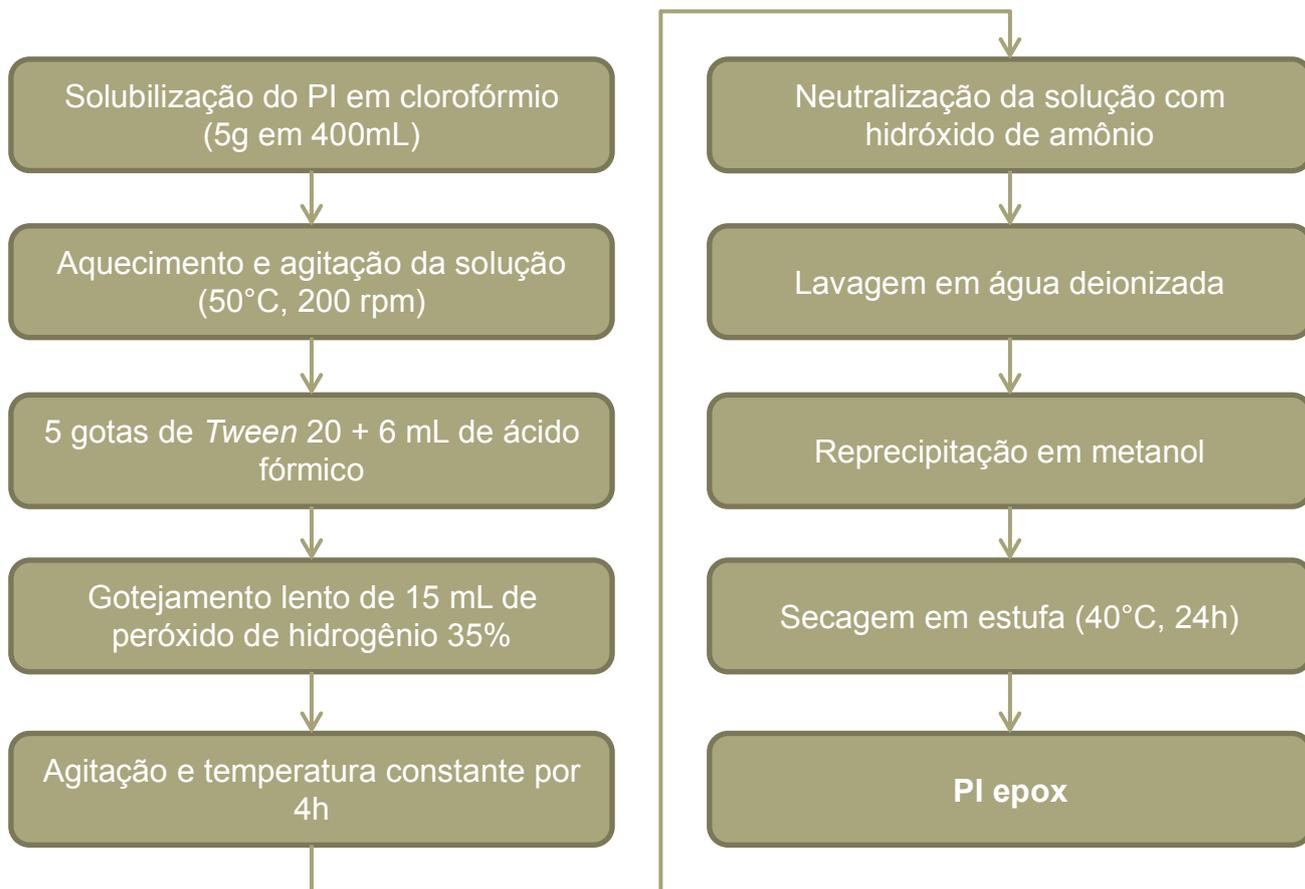


Figura 7. Fluxograma do processo de epoxidação do poli(isopreno).



Figura 8. Comparação entre látex seco (esquerda) e PI epox (direita).

O PLGA e o poli(isopreno) epoxidado foram pesados e misturados 60 % de PLGA e 40 % de PI epox em massa. A blenda foi solubilizada em clorofórmio (10 g da blenda em 500 mL de clorofórmio), seca em estufa (40 °C durante um período de 24 horas) e armazenada. A Figura 9 apresenta a membrana de Cellprene® epox formada após a secagem em estufa.



Figura 9. Membrana de Cellprene® epox após secagem em estufa.

Após a produção do Cellprene® epox, o material foi submetido ao processo de *electrospinning* para a formação de membranas constituídas de fibras. Feito isso, análises foram conduzidas a fim de caracterizar cada material. A Figura 10 apresenta a membrana de Cellprene® epox obtida por *electrospinning* e a Figura 11 indica o fluxograma de análises realizadas com cada constituinte da blenda polimérica bem como com o Cellprene® epox.



Figura 10. Membrana de Cellprene® epox obtida por *electrospinning*.

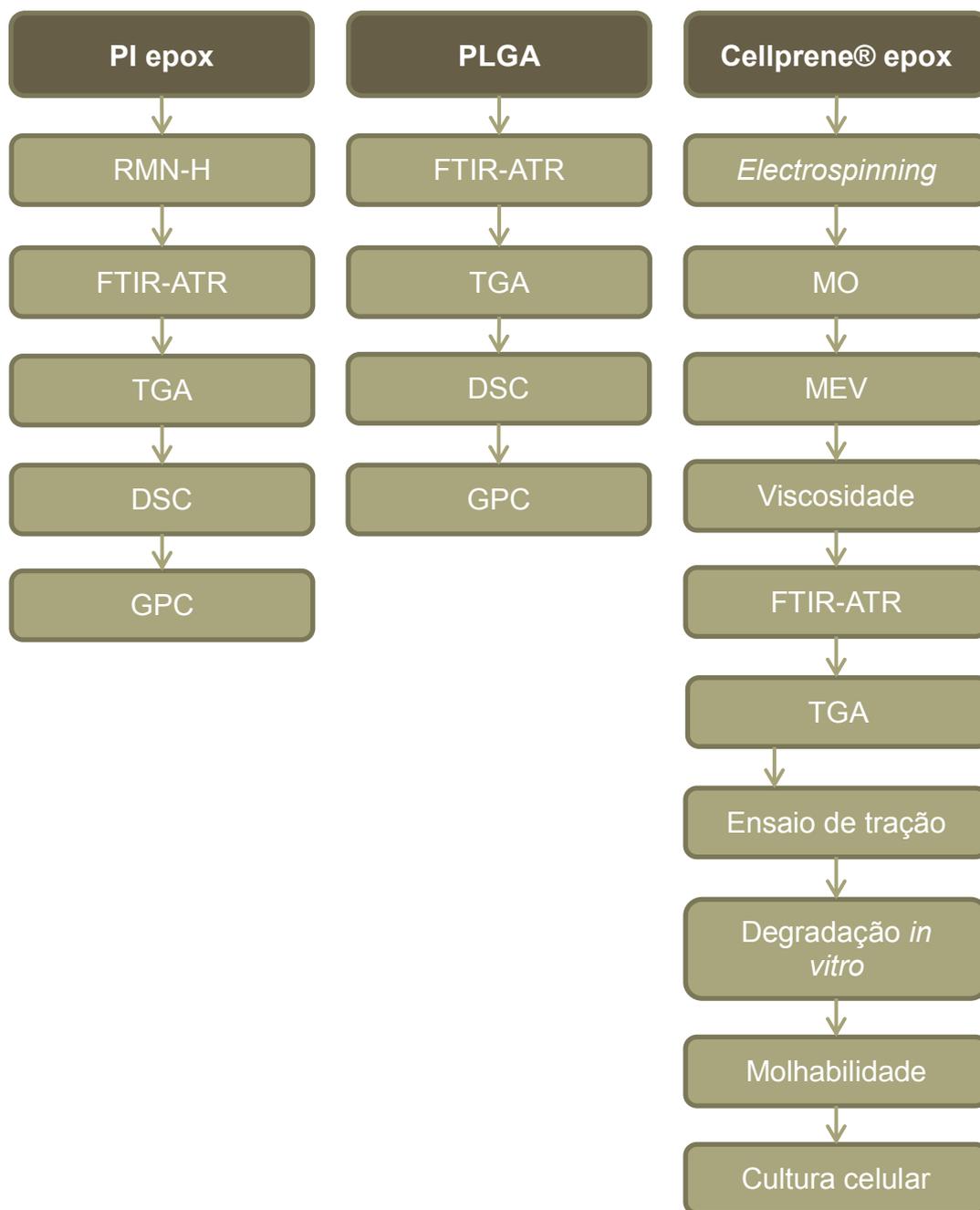


Figura 11. Fluxograma de análises realizadas em cada constituinte da blenda e com o Cellprene® epox.

4.2. *Electrospinning*

Para a produção de fibras de Cellprene® epox via processo de *electrospinning* as membranas obtidas através de *solvent casting* foram recortadas e dissolvidas em clorofórmio. Feito isso, a solução polimérica foi submetida ao processo de *electrospinning*. Os parâmetros do processo foram escolhidos fixando todos os parâmetros com exceção do que estava sendo ajustado. Os parâmetros iniciais foram escolhidos com base nos estudos de Marques (2015) e Guerra (2018).

Assim que o valor do parâmetro que estava sendo ajustado foi escolhido, ele se manteve fixo e os outros foram variados e escolhidos um a um. O coletor foi mantido estático até que todos os parâmetros fossem testados e escolhidos. A escolha dos parâmetros foi realizada através da observação de imagens obtidas com o microscópio digital manual Dino-Lite. Foi realizada microscopia ótica para a escolha dos parâmetros de *electrospinning*, mas as imagens obtidas no Dino-Lite apresentaram melhor qualidade, facilitando a compreensão das mesmas, sendo estas as apresentadas no trabalho. O diâmetro da agulha metálica (0,7 mm) foi mantido em todos os testes. A Tabela 1 apresenta os parâmetros variados na busca pela melhor combinação de parâmetros na obtenção de fibras de Cellprene® epox.

Tabela 1. Escolha e variação dos parâmetros utilizados no processo de *electrospinning*.

Parâmetro	Varição
Distância agulha-coletor (cm)	10, 15, 20
Tensão aplicada (kV)	10, 15, 20
Taxa de fluxo de material (mL/h)	5, 10, 20
Concentração (% massa/volume)	1, 3, 5, 7

4.3. Análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de H (RMN-H) foi utilizada para a investigação do grau de epoxidação atingido nas amostras de PI epox. Para a aquisição de dados foi utilizado o espectrômetro de ressonância magnética nuclear modelo Bruker 400 Ultrashield Avance 400 MHz. As três amostras de PI epox foram dissolvidas em Clorofórmio Deuterado (CDCl₃). Os espectros foram gerados a partir dos dados previamente obtidos e processados com o auxílio do *software* MestReNova versão 9.0.1. O grau de epoxidação foi obtido através da equação 1 (Santin, 2001).

$$\% \text{ epoxidação} = \left(\frac{\text{Au (2,7 a 3 ppm)}}{\text{Au (2,7 a 3 ppm)} - \text{Au (5,1 ppm)}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Onde Au (2,7 a 3 ppm) é a área unitária das bandas referentes à região entre 2,7 e 3 ppm. Au (5,1 ppm) é o valor da área referente à banda na região de 5,1 ppm. Os picos em 5,1 ppm são referentes aos hidrogênios das ligações duplas *cis-trans*,

enquanto a região 2,7- 3 ppm é relacionada aos hidrogênios dos anéis epóxi (Santin, 2001).

4.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Com objetivo de analisar a morfologia das fibras produzidas pela técnica de *electrospinning*, foram realizadas microscopias eletrônicas de varredura com o equipamento *JEOL 6060* com parâmetro de tensão ajustado em 10 kV. Previamente à realização das microscopias, as amostras receberam recobrimento com ouro. Os diâmetros das fibras foram medidos com auxílio do *software ImageJ*. As amostras que foram submetidas ao ensaio de degradação *in vitro* também foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura.

4.5. Viscosidade

As soluções testadas no processo de *electrospinning* foram submetidas à análise de reometria em um reômetro modelo ARES G2, produzido pela empresa *TA Instruments*. Foi realizada a análise da viscosidade dinâmica em um ensaio cone-placa através do método *flow ramp*, com taxa de cisalhamento de 0 a 300 1/s a uma temperatura de 25 °C. Os dados foram obtidos pelo *software* TRIOS e os gráficos foram plotados com o auxílio do *software* Origin 2015.

4.6. Análise FTIR-ATR

Para a identificação dos principais grupos funcionais do PLGA, PI epox e da blenda Cellprene® epox foi realizada a análise de Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada (FTIR-ATR). Foi utilizado um espectrômetro PerkinElmer modelo Frontier, em temperatura ambiente. Os dados foram obtidos na região de 650 a 4000 cm^{-1} e os espectros foram gerados a partir dos dados processados no *software* Origin 2015. As amostras que foram submetidas ao ensaio de degradação *in vitro* também foram analisadas por FTIR-ATR para averiguação dos grupos funcionais após os tempos de degradação.

4.7. Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica (TGA) foi aplicada às fibras de Cellprene® epox em um equipamento modelo TGA 4000 produzido pela empresa PerkinElmer, com

uma taxa de aquecimento de 20 °C/ min entre 30 e 900 °C. Os termogramas foram gerados utilizando o *software* Origin 2015.

4.8. Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Foi realizada análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) em amostras de PLGA, PI epox e membranas de Cellprene® epox obtidas através do processo de *electrospinning*. Nas análises realizadas, foram identificadas as temperaturas de transição vítrea dos materiais. Foi utilizado o equipamento NETZSCH modelo Pegasus® DSC 404 F3. Para investigação das temperaturas de transição vítrea dos materiais a análise variou a temperatura da seguinte forma: aquecimento de 25 °C a 190 °C, resfriamento de 190 °C a -100 °C, seguido de novo aquecimento de -100 °C a 190 °C, todos a uma taxa de 10 °C por minuto. Os dados foram tratados com auxílio do *software* Origin 2015 e Proteus 6.1.

4.9. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

Para avaliar as massas moleculares das amostras de PI, PI epox e PLGA, foi realizada a análise de cromatografia de permeação em gel. As amostras foram dissolvidas em Tetraidrofurano (THF) e injetadas no equipamento Viscotek modelo VE2001, com um detector Viscotek modelo TDA 302 acoplado, equipado com 4 de colunas. O volume e taxa de injeção foram 200 µL e 1 mL/min, respectivamente. Para a construção das curvas de calibração o padrão utilizado foi o poliestireno.

4.10. Ensaio Mecânico de Tração

Os ensaios mecânicos de tração foram realizados com base na norma ASTM D882, a qual descreve o procedimento de preparação de corpos de prova e método de ensaio de resistência à tração para placas e filmes poliméricos com espessura menor que 1 mm. Foram testados 5 corpos de prova de geometria retangular com dimensões de 55 mm de comprimento, 5 mm de largura e aproximadamente 0,04 mm de espessura. Os testes foram feitos no equipamento de ensaio de tração Instron série 3369. Foi utilizada uma célula de carga de 2 kN e uma taxa de deslocamento de 5 mm/min.

4.11. Análise de Degradação *in vitro*

A análise de degradação *in vitro* tem como objetivo quantificar a perda de massa da blenda polimérica Cellprene® epox quando colocada em meio aquoso por determinado tempo. A degradação do material foi verificada em três meios aquosos diferentes: água deionizada, solução Ringer (7,2 g de cloreto de sódio [Dinâmica – Brasil], 0,17 g de cloreto de cálcio dihidratado [Dinâmica – Brasil] e 0,37 g de cloreto de potássio [Vetec – Brasil] em 1 L de água destilada) e solução fisiológica (0,9 g de cloreto de sódio [Dinâmica – Brasil] em 1 L de água destilada). Foram selecionadas 3 amostras com dimensões de aproximadamente 10 x 60 mm para a análise em cada meio aquoso. As amostras foram mantidas a uma temperatura de 37 °C por períodos de 7, 14, 21 e 28 dias em aproximadamente 5 mL de solução. Após cada período as amostras foram secas em estufa a 37 °C por 24 horas e pesadas em balança de 4 casas. A quantidade de massa perdida em percentual foi determinada pela seguinte equação (2):

$$\% \text{ perda de massa} = \left(\frac{m_0 - m_p}{m_0} \right) \times 100 \quad (2)$$

Onde m_0 é a massa inicial da amostra e m_p é a massa da amostra no período analisado.

4.12. Molhabilidade

Foi realizada a análise de ângulo de contato em amostras de Cellprene® epox obtidas através do método de *solvent casting* e em amostras de Cellprene® epox obtidas pelo método de *electrospinning* para averiguar se o material processado apresenta comportamento hidrofóbico ou hidrofílico, e se houve alguma alteração resultando do processo de obtenção do material. Os ângulos de contato foram medidos com auxílio do equipamento DAS 100 (*Drop Shape Analyzer*) e do *software* DSA4. Os ângulos de contato foram medidos três vezes para cada amostra, em quantidades de cinco e dez microlitros de água deionizada para as membranas produzidas via *solvent casting*, e cinco vezes com quantidades de 25 microlitros para as membranas obtidas via *electrospinning*. Foram utilizadas três amostras para cada um dos métodos de processamento do material. As médias e desvios padrão foram calculados com o *software Microsoft Excel 2010*.

4.13. Análise de Cultura Celular

As células-tronco mesenquimais foram cultivadas em placa de 6 poços a uma densidade de 2×10^5 células/poço, contendo 14 mm de diâmetro cada amostra de Cellprene® epox. Cada amostra passou por um tempo mínimo de 24 horas de hidratação. O crescimento celular ocorreu em *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Gibco, USA) suplementado com 20% de soro fetal bovino (Gibco) e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco). A placa foi incubada a 37 °C com 5 % de CO₂ por 48 horas. Este protocolo de cultivo celular no Cellprene® epox foi previamente padronizado pelo grupo em experimentos anteriores (Henckes *et al.*, 2019).

Para a realização da coloração DAP (4',6-diamidino-2-phenylindole, Sigma, USA), as amostras foram lavadas com tampão PBS (*phosphate buffered saline*, Laborclin, Brasil) e, em seguida, fixadas em 4 % de paraformaldeído (Medquímica, Brasil) durante 20 minutos. As amostras foram analisadas em microscopia fluorescente a fim de verificar a adesão celular nas amostras de Cellprene® epox.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Com o objetivo de avaliar o grau de epoxidação alcançado no poli(isopreno) epoxidado, foram realizadas análises de ressonância magnética nuclear. A Figura 12 apresenta um dos espectros obtidos na análise RMN-H. As amostras apresentaram grau de epoxidação igual a $53,9 \pm 5,7$ mol%. Utilizando o mesmo processo de epoxidação, Guerra (2018) atingiu um grau de epoxidação de aproximadamente 55 mol%.

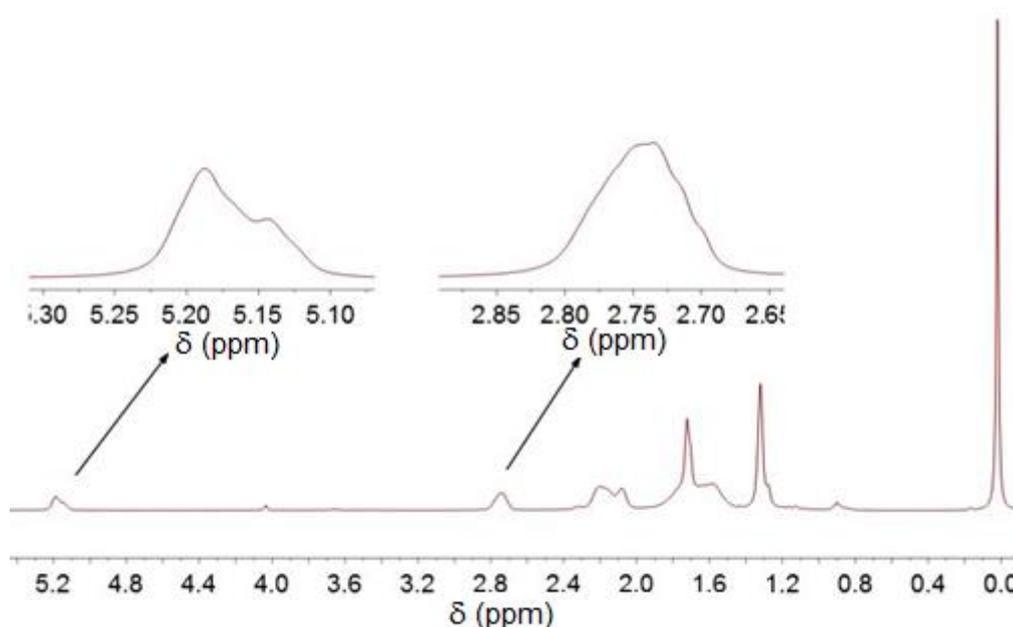


Figura 12. Espectro RMN-H obtido para uma das amostras de poli(isopreno) epoxidado.

5.2. Parâmetros de obtenção de fibras de Cellprene® epox

Neste subcapítulo foram analisados os efeitos dos parâmetros do processo de *electrospinning* e do material na formação de fibras de Cellprene® epox. Foram discutidos e avaliados os efeitos da variação da distância entre a agulha e o coletor, da tensão aplicada, taxa de fluxo de solução e da concentração da solução.

5.2.1. Efeito da distância entre agulha e coletor

A distância entre a ponta da agulha e o coletor tem um papel fundamental na determinação da morfologia da fibra obtida pelo método de *electrospinning*. A distância ideal entre a agulha e o coletor varia de acordo com a solução polimérica utilizada. A morfologia da fibra é afetada por este parâmetro porque ela depende do

tempo de deposição, taxa de evaporação do solvente, e intervalo de instabilidade (Matabola e Moutloali, 2013). Uma distância ótima deve ser mantida para a obtenção de fibras uniformes e lisas e, qualquer alteração nesta distância afetará a morfologia das fibras (Bhardwaj e Kundu, 2010). Diversos pesquisadores concluíram que fibras defeituosas e com grande diâmetro são formadas quando esta distância é pequena, enquanto o diâmetro da fibra diminui à medida que a distância é aumentada (Baumgarten, 1971; Matabola e Moutloali, 2013; Wang e Kumar, 2006). Contudo, em alguns casos, a alteração na distância entre a agulha metálica e o coletor não apresentou nenhum efeito (Zhang *et al.*, 2005).

Para determinar a melhor distância, foram mantidos fixos todos os parâmetros (tensão aplicada, fluxo de material, concentração da solução) e apenas a distância entre agulha e coletor foi variada. Com a distância de 10 cm, grande parte do solvente não evaporou ao longo do trajeto entre a ponta da agulha metálica e o coletor, o que sugere que uma distância maior deve ser ajustada. Mantendo a distância em 15 cm, poucas fibras começaram a ser formadas apresentando *beads*, mas a maior parte do material ejetado da agulha ainda chegou na forma líquida ao coletor. A uma distância fixa de 20 cm entre a ponta da agulha e o coletor, grande quantidade de fibras foi formada, ainda apresentando *beads*, porém distâncias maiores não possibilitaram a formação de fibras. Com isso, a distância escolhida no processo de *electrospinning* foi 20 cm e os outros parâmetros foram variados. A Figura 13 mostra o material obtido com as variações feitas na distância entre agulha e coletor na formação de fibras de Cellprene® epox.

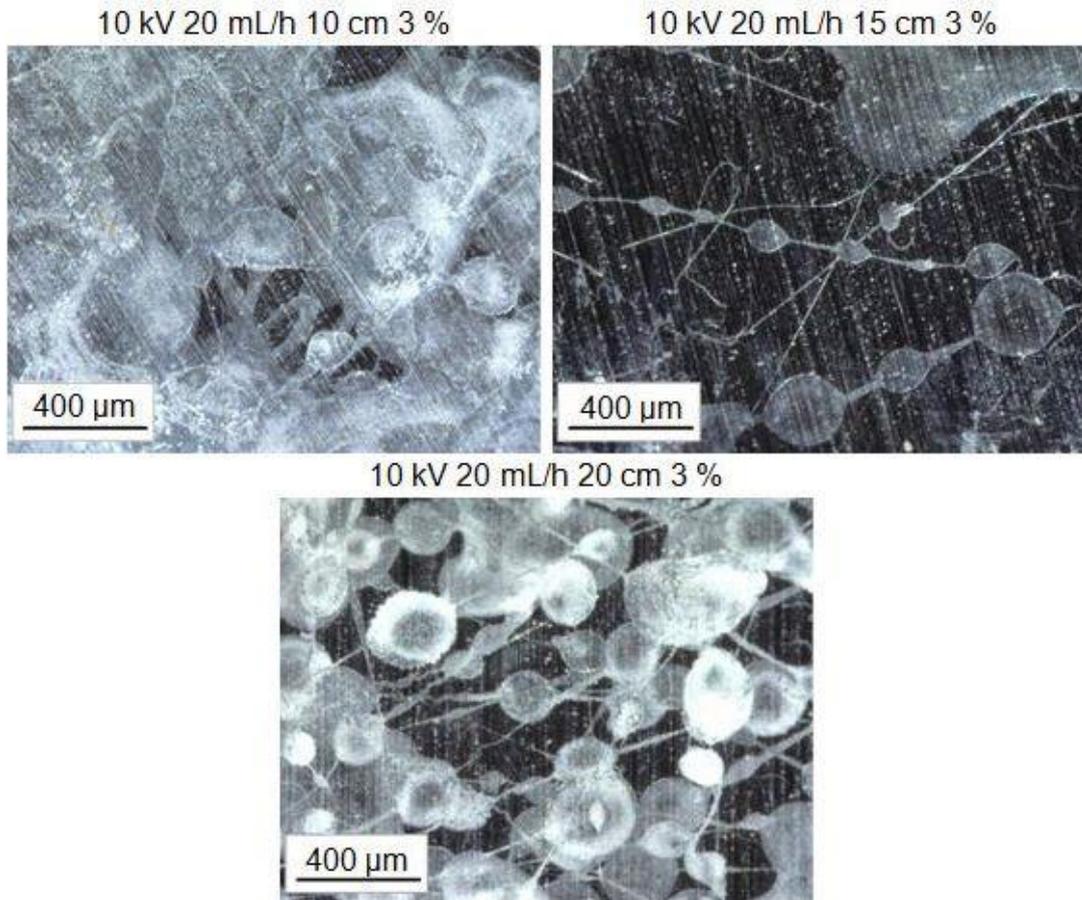


Figura 13. Efeito das variações feitas na distância entre agulha e coletor na formação de fibras de Cellprene® epox.

Outros autores encontraram valores de distância entre agulha e coletor metálico próximos aos relatados neste estudo: 15 cm para a blenda PLGA/PLA (Liu *et al.*, 2012), 20 cm para a blenda PVA/ látex da borracha natural (Panichpakdee *et al.*, 2019) e distâncias de 14 a 24 cm para a produção de fibras da blenda PLA/ borracha natural epoxidada (Mascia *et al.*, 2017).

5.2.2. Efeito da tensão

A tensão aplicada para a formação do Cone de Taylor varia de acordo com as propriedades de cada solução polimérica. Sill e von Recum (2008) afirmaram que a formação de nanofibras com menores diâmetros com o aumento da tensão aplicada é resultado do estiramento da solução polimérica em correlação com a repulsão de carga dentro do jato polimérico. Tensão aplicada além do valor crítico resultará na formação de *beads* e aumento no diâmetro das fibras. Esse efeito é consequência da redução do tamanho do Cone de Taylor e aumento da velocidade do jato polimérico para um mesmo fluxo de material (Haider *et al.*, 2018).

Após a realização de testes variando apenas a tensão aplicada no processo de *electrospinning*, foi observado que com o valor de tensão aplicada igual a 10 kV houve grande formação de *beads*. Com valores de tensão de 15 kV os *beads* diminuíram e houve formação de fibras de forma mais contínua, enquanto com valor de tensão aplicada igual a 20 kV o aumento do diâmetro das fibras foi percebido. Como consequência destes resultados, para os parâmetros testados a tensão aplicada selecionada foi 15 kV. A Figura 14 mostra a comparação das fibras obtidas com diferentes valores de tensão aplicada.

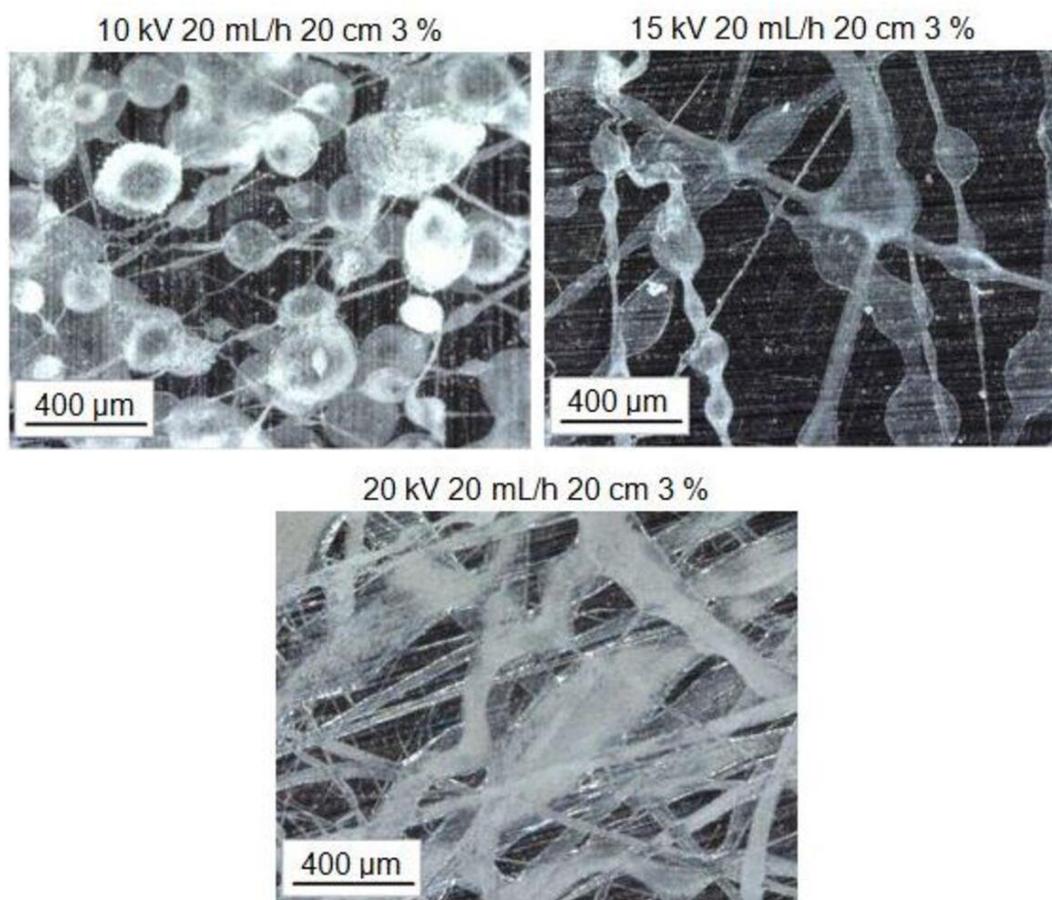


Figura 14. Efeito da variação da tensão aplicada na formação de fibras de Cellprene® epox.

Para a produção de microfibras de poli(isopreno) por *electrospinning* autores utilizaram tensão aplicada de 15 kV (Hao *et al.*, 2010), enquanto para a obtenção de fibras de PLGA através do *electrospinning* autores relataram valores de 17 kV (You *et al.*, 2004).

5.2.3. Efeito da taxa de fluxo de material

O fluxo de material tem influência direta na formação das fibras, pois controla a quantidade de material que é empurrado pela bomba à ponta da agulha e é

exposto à tensão aplicada pela fonte de tensão. Assim como a tensão aplicada, o fluxo da solução polimérica possui um valor crítico que varia para cada sistema, acima do qual ocorre a formação de *beads*, surgimento de poros nas fibras e defeitos semelhantes a fitas. Valores altos de fluxo de material provocam a incompleta evaporação do solvente e baixo estiramento da solução no caminho entre a ponta da agulha e o coletor (Megelski *et al.*, 2002). Com isso, o valor crítico do fluxo de material tende a ser um valor que mantém o equilíbrio entre a solução que sai da agulha para o coletor e a solução que chega à ponta da agulha. Valores de fluxo abaixo do valor crítico não disponibilizam material suficiente para a formação do Cone de Taylor, e com isso, permitem a ocorrência de jatos recuados (jatos que saem diretamente da agulha, sem formar gotas ou cones aparentes), que não são estáveis e são responsáveis pelo aumento do diâmetro das fibras (Zargham *et al.*, 2012). Através da variação do parâmetro de fluxo de material foi possível notar que com fluxo de material igual a 5 mL/h houve formação de fibras com menor diâmetro enquanto fluxos maiores de material apresentaram maior diâmetro e maior ocorrência de *beads*. Fluxos inferiores a 5 mL/h foram testados, mas não houve formação de jato polimérico contínuo. Com isso, o fluxo de material de 5 mL/h foi escolhido como mais adequado para a formação de fibras de Cellprene® epox pelo processo de *electrospinning*. A Figura 15 mostra o efeito da variação do fluxo de material na formação de fibras de Cellprene® epox no processo de *electrospinning*.

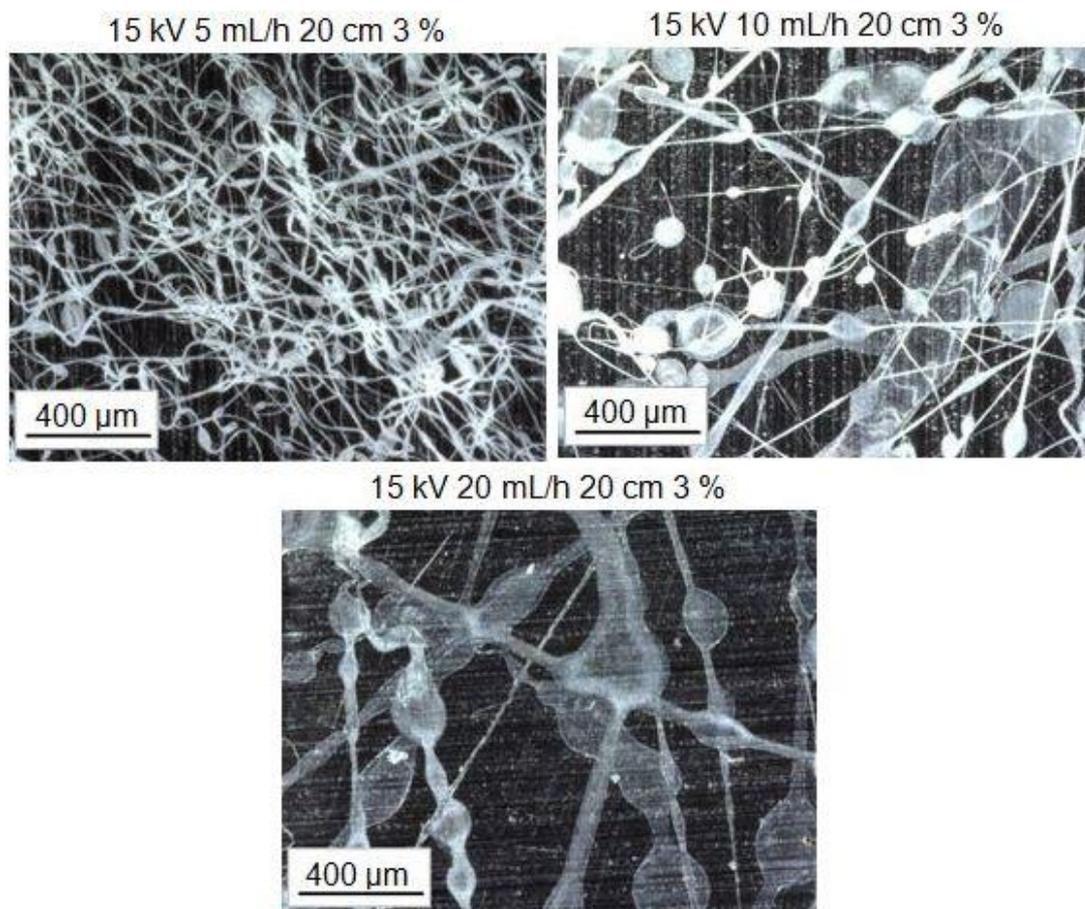


Figura 15. Efeito da variação do fluxo de material na formação de fibras de Cellprene® epox.

You e colaboradores (2012) relataram a produção de fibras de PLGA com fluxo de solução polimérica de 4 mL/h. Marques (2015) utilizou fluxo de material de 30 mL/h na obtenção de fibras de PLGA/ poli(isopreno), enquanto Mascia e colaboradores (2017) produziram fibras de PLA/ borracha natural com fluxo de solução polimérica igual a 1,9 mL/h.

5.2.4. Efeito da concentração da solução polimérica

A concentração da solução polimérica também possui uma faixa onde a formação de fibras é facilitada. Altas concentrações apresentam mais cadeias poliméricas emaranhadas e o jato polimérico começa a estabilizar-se formando estruturas semelhantes a fibras; quanto maior a concentração de polímero, maior o diâmetro da fibra. A partir de certa concentração a formação do jato polimérico é impedida devido à maior tensão superficial. Baixas concentrações apresentam redes menos entrelaçadas e instabilidades na formação do jato polimérico geram gotas e fibras contendo *beads* (Rogina, 2014; Brenner *et al.*, 2012; Genk *et al.*, 2005;

Beachley e Wen, 2009; Lasprilla-Botero *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2008; Yördem *et al.*, 2008; Luo *et al.*, 2012).

Assim como a concentração da solução polimérica, a viscosidade influencia na determinação da morfologia e no tamanho da fibra no processo de *electrospinning*. A viscosidade tem o mesmo efeito da concentração; baixa viscosidade faz com que surjam *beads* durante a formação das fibras, enquanto altas viscosidades causam a secagem do polímero ainda na ponta da agulha (Tiwari e Venkatraman, 2012).

Para definir a melhor concentração para os parâmetros já estabelecidos anteriormente, foram testadas concentrações em % massa de Cellprene® epox/volume de solução de 1%, 3%, 5% e 7%. A solução polimérica com concentração de 1% não formou jatos poliméricos. Acredita-se que este fato se deve às redes menos entrelaçadas e menor tensão superficial como mencionado anteriormente. Soluções com 3% de concentração formaram jatos, não uniformes, nem contínuos, o que sugere que a concentração deve ser aumentada. Quando a concentração de 5% foi testada ela apresentou jatos uniformes e contínuos indicando ser a concentração mais apropriada para o processo de *electrospinning*. A solução polimérica com concentração de 7% não formou jatos poliméricos, pois devido ao pouco solvente para a quantidade de polímero, a solução secou na ponta da agulha impedindo a formação de fibras. A Figura 16 mostra o efeito da variação de concentração polimérica na formação das fibras no processo de *electrospinning*.

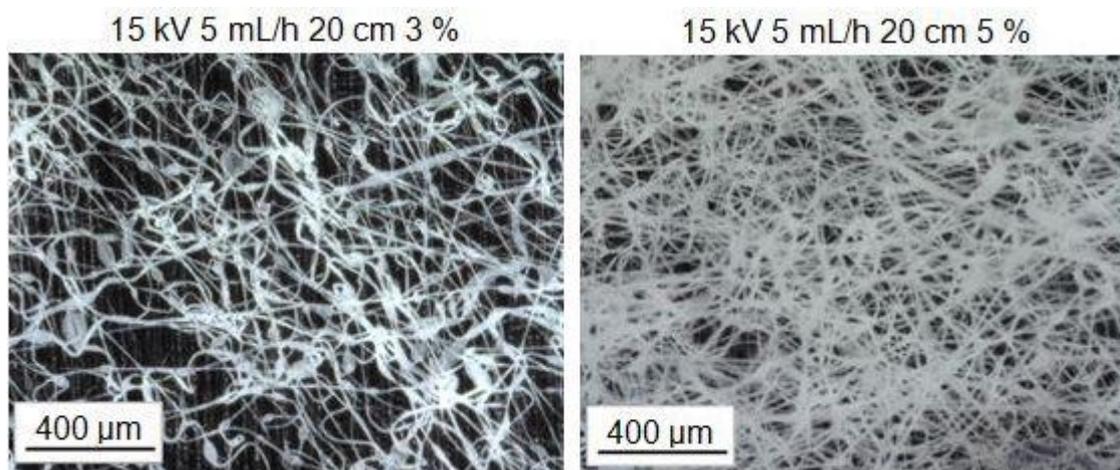


Figura 16. Efeito da variação da concentração da solução polimérica na formação de fibras de Cellprene® epox pelo processo de *electrospinning*.

Wang e Zang (2012) encontraram valores de concentração da solução polimérica entre 5 e 9% para a preparação de fibras ultrafinas de PLGA. Marques

(2015) produziu fibras de PLGA/ poli(isopreno) com concentração polimérica igual a 3%, enquanto Liu e colaboradores (2012) tornaram possível a obtenção de scaffolds nanofibrosos da blenda PLGA/PLA com concentrações poliméricas de 5%. Autores prepararam microfibras de poli(isopreno) através do *electrospinning* a partir da concentração de 5% (Hao *et al.*, 2010).

A análise da viscosidade foi realizada para amostras com as concentrações testadas na produção de fibras de Cellprene® epox por *electrospinning*. A Tabela 2 mostra a viscosidade para soluções com concentrações de 1, 3, 5 e 7% m/v.

Tabela 2. Viscosidade para cada concentração testada no processo de *electrospinning*.

Concentração (% m/v)	Viscosidade (Pa.s)
1	0,019362 ± 0,00011
3	0,065275 ± 0,00008
5	0,219207 ± 0,00615
7	0,935783 ± 0,01742

O valor de concentração tomado como ideal (5% m/v) apresentou viscosidade igual a 0,22 Pa.s. É possível notar que há um crescimento da viscosidade com o aumento da concentração, o aumento de 1 para 7% m/v gerou um valor de viscosidade 45 vezes maior, passando de 0,02 Pa.s para 0,93 Pa.s aproximadamente.

Como discutido anteriormente, a viscosidade está relacionada à concentração e tem influência considerável na produção das fibras por *electrospinning*. Drew *et al.* (2006) constataram que o aumento da viscosidade do material levou ao desaparecimento dos defeitos chamados *beads* em fibras de poli(óxido de etileno) (PEO). Entretanto, o aumento da viscosidade fez com que o diâmetro das fibras também aumentasse.

Feitas as análises das fibras obtidas em diferentes condições de processamento e solução, os parâmetros escolhidos para a produção de fibras de Cellprene® epox por *electrospinning* são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros escolhidos para a obtenção de fibras de Cellprene® epox.

Parâmetro	Valor escolhido
Distância agulha-coletor	20 cm
Tensão aplicada	15 kV
Taxa de fluxo de material	5 mL/h
Concentração da solução	5% m/v

5.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das fibras produzidas pelo processo de *electrospinning* sob as condições citadas anteriormente foi analisada com o auxílio da microscopia eletrônica de varredura. As micrografias apresentaram fibras com diâmetro igual a $4,3 \pm 2,7 \mu\text{m}$ e superfície porosa. A Figura 17 apresenta a micrografia obtida através da microscopia eletrônica de varredura.



Figura 17. Micrografia das fibras de Cellprene® epox produzidas pelo processo de *electrospinning*.

A porosidade pode ser resultado da evaporação do solvente utilizado ou de um fenômeno chamado “*breath figure*” que envolve um polímero hidrofóbico dissolvido em um solvente que é imiscível em água. Durante o processo de *electrospinning* da solução polimérica em um ambiente úmido, o resfriamento evaporativo do solvente pode causar a condensação das moléculas de água próximas à superfície do filme polimérico. Após a evaporação da água, os espaços

preenchidos anteriormente pela água se transformam em poros (Huang e Thomas, 2018; Liu *et al.*, 2019).

Huang e Thomas (2018) estudaram diferentes mecanismos de fabricação de fibras de PLA porosas via *electrospinning*. Segundo os autores, as fibras de PLA altamente porosas e biocompatíveis têm potencial para aplicações em biomedicina, como por exemplo, liberação controlada e eficaz de fármacos, cicatrização de feridas e engenharia de tecidos. Fibras porosas possuem razão área/volume ainda maior que fibras lisas, o que pode aumentar a funcionalidade das mesmas. Na engenharia de tecidos, os poros presentes nas fibras podem mimetizar a matriz extracelular e facilitar a ligação celular, que é de suma importância na restauração e regeneração de tecidos e órgãos. Esta porosidade, no entanto, tende a reduzir as propriedades mecânicas do *scaffold* em questão (Huang e Thomas, 2018; Li *et al.*, 2014).

5.4. Análise FTIR-ATR

Para verificar se houve alguma alteração nos grupos funcionais causada pelo processo de obtenção da blenda e *electrospinning*, foi realizada a análise FTIR-ATR do PLGA, PI, PI epox e Cellprene® epox. Para fins de comparação entre os espectros em um mesmo gráfico, todos os espectros foram normalizados. A Figura 18 apresenta os espectros FTIR obtidos na amostra de PLGA.

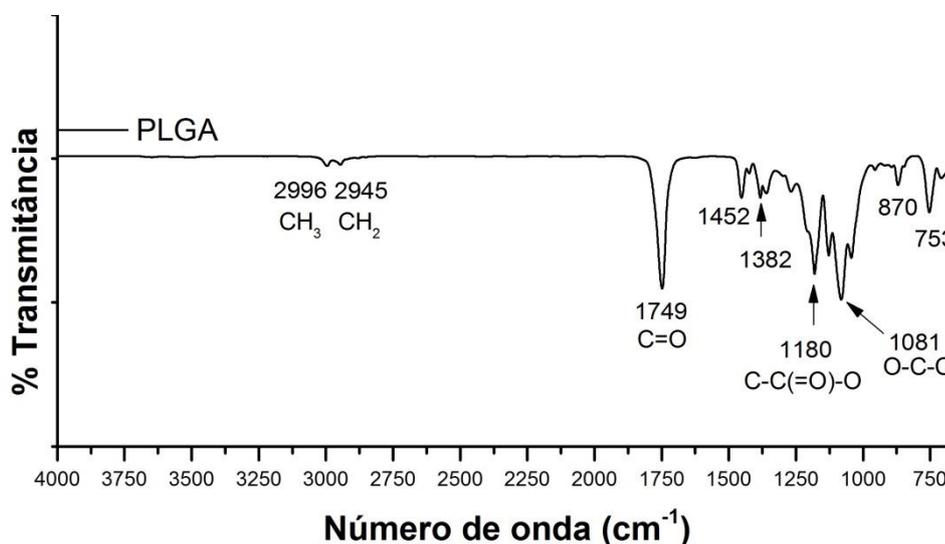


Figura 18. Espectro FTIR-ATR da amostra de PLGA.

Erbetta e colaboradores (2011) realizaram a análise dos espectros obtidos pela técnica de FTIR para PLGA 50/50 e 70/30 e observaram que os espectros dos

copolímeros estudados foram praticamente idênticos sendo apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Bandas características do copolímero PLGA (Erbetta *et al.*, 2011).

Banda característica (cm⁻¹)	Grupo funcional
3700 – 3100	OH
3000 – 2900	CH, CH ₂ e CH ₃
1750 – 1740	C=O
1500 – 1250	CH ₃ e CH ₂
1350 – 1150	CH ₂ e CH
1300 – 1150	C-O

O PLGA apresentou bandas de absorção em 1749 cm⁻¹ referentes ao estiramento da ligação C=O, enquanto as bandas em 1180 cm⁻¹ e em 1081 cm⁻¹ podem representar os estiramentos referentes aos grupamentos C-C(=O)-O e O-C-C, respectivamente. Resultados similares foram apresentados por Guerra (2018). As bandas características do grupamento OH, na região entre 3100 e 3700 cm⁻¹, que indicam a presença de umidade na amostra não foram encontradas na amostra de PLGA (Erbetta *et al.*, 2011).

Na amostra de PI epox analisada através do FTIR-ATR, foi identificado o surgimento de um pico no número de onda igual a 872 cm⁻¹ quando comparada com a amostra de PI, pico que é característico do grupo epóxi assim como o pico em 1250 cm⁻¹. Van Zyl e colaboradores (2003) estudaram a borracha natural epoxidada com conteúdo de epoxidação de 50 mol%. Os autores indicam as bandas 870 cm⁻¹ e 1250 cm⁻¹ como bandas características do grupo epóxi, sendo referentes a deformação assimétrica e simétrica do anel epóxi, respectivamente. Segundo os autores, a banda 1450 cm⁻¹ é atribuída ao grupo etil (CH₂CH₃) e a banda 1370 cm⁻¹ é referente ao grupo metil (CH₃). O grupo funcional apresentado com número de onda 1080 cm⁻¹ pode ser atribuído ao grupo funcional -C-O-C, e o grupo funcional C=C pode ser identificado no número de onda 1650 cm⁻¹. A presença de dióis, ésteres, furanos e grupos hidróxidos podem ser formados durante as reações de abertura do anel epóxi (reações secundárias), e são detectadas na banda característica com número de onda igual a 3600 cm⁻¹, que é banda característica de

grupamentos hidroxila (-OH) (Santin, *et al.*, 2012). A Figura 19 mostra os espectros FTIR obtidos nas amostras de PI e PI epox.

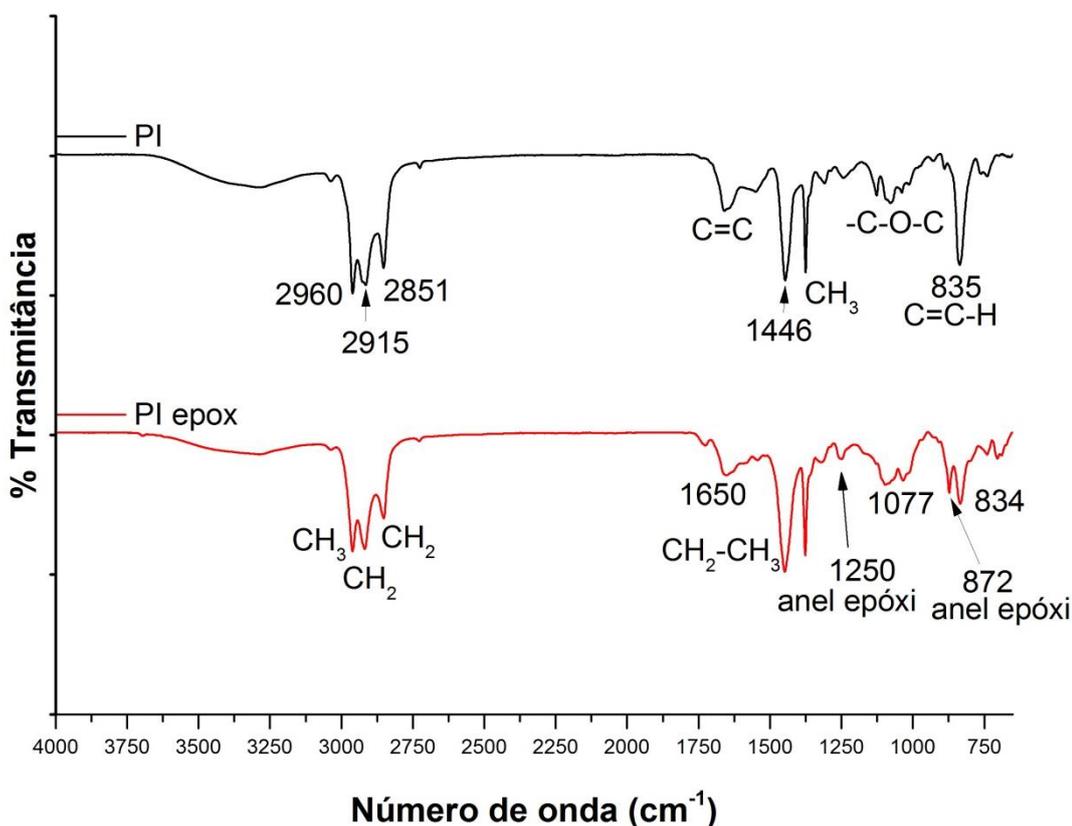


Figura 19. Espectros FTIR-ATR obtidos nas amostras PI e PI epox.

A Figura 20 apresenta os espectros do PLGA, PI epox e Cellprene® epox. Através da comparação dos espectros é possível notar que alguns picos e bandas características se sobrepõem, como é o caso da banda em torno de 870 cm^{-1} , que está presente no espectro do PI epox e do PLGA, por exemplo. Além disso, é possível notar o deslocamento da banda referente a C=O de 1749 cm^{-1} do PLGA para 1756 cm^{-1} na blenda Cellprene® epox. O deslocamento do grupamento C=O para números de onda maiores foi relatado como um indício de possível interação entre o grupo carboxílico de cadeias de PLA e o grupo epóxi da borracha natural epoxidada (Cosme *et al.*, 2016). A banda característica referente ao grupamento C=C, presente no espectro do PI epox em 1650 cm^{-1} , teve sua intensidade reduzida e tornou-se praticamente imperceptível na análise do espectro da blenda Cellprene® epox. Este comportamento também foi observado por Marques (2015).

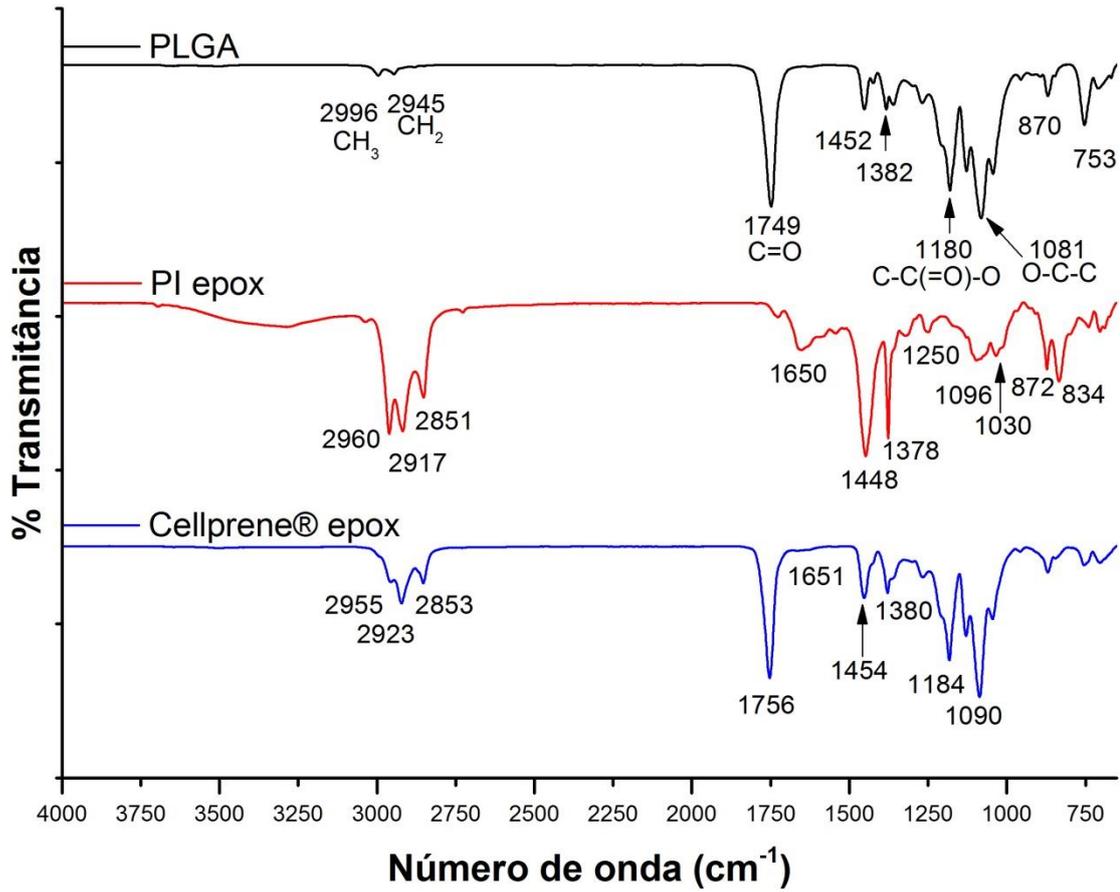


Figura 20. Espectros FTIR-ATR das amostras de PLGA, PI epox e Cellprene® epox.

A análise FTIR-ATR das amostras de Cellprene® epox permitiu a comparação do espectro do mesmo com os espectros de cada um dos constituintes separados, PLGA e PI epox, e não indicou alterações nos grupamentos funcionais após o processamento do material.

5.5. Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica permite a identificação das temperaturas de degradação dos polímeros e a mensuração da perda de massa do material com o aumento da temperatura, possibilitando relacionar a perda de massa com a degradação dos componentes do material. As Figuras 21 e 22 apresentam as curvas de percentual de perda de massa versus temperatura e a derivada do termograma (DTG) versus temperatura, respectivamente.

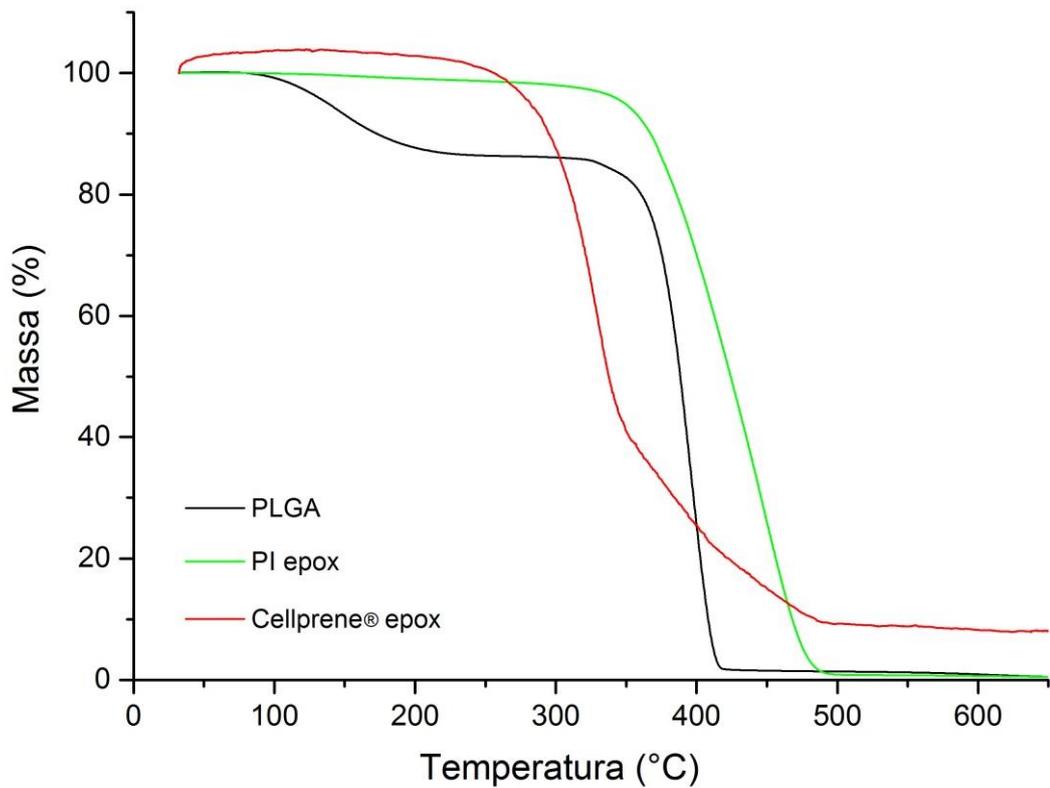


Figura 21. Análise termogravimétrica do PLGA, PI epox e das fibras de Cellprene® epox.

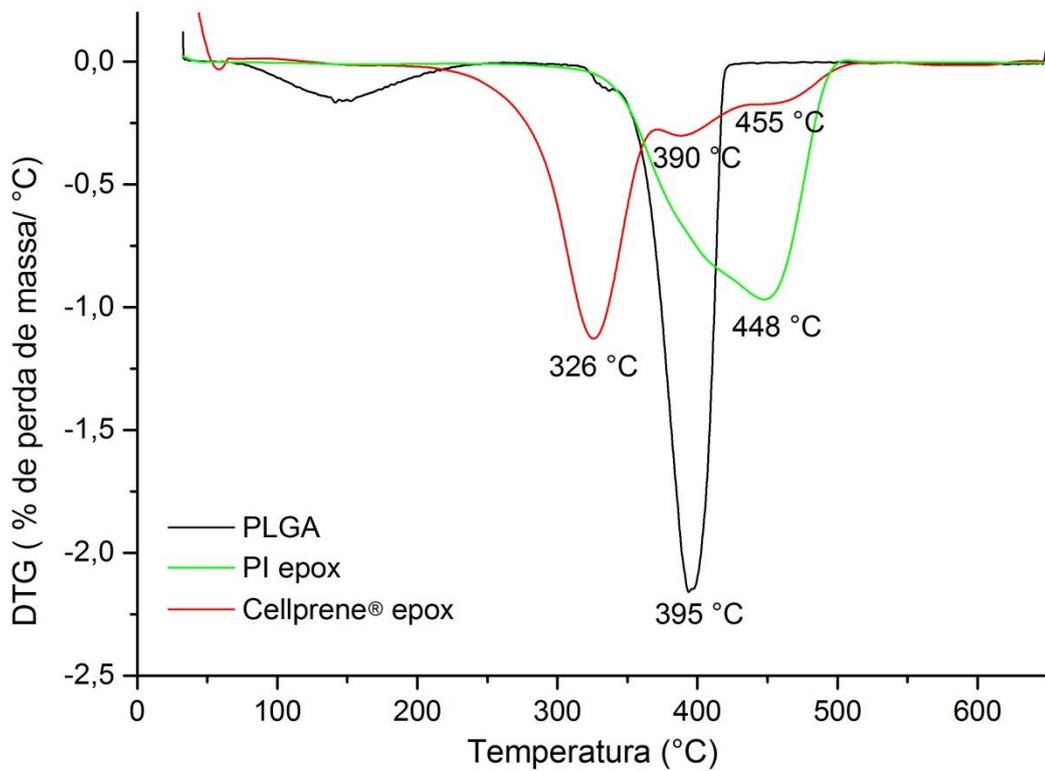


Figura 22. Análise térmica diferencial do PLGA, PI epox e das fibras de Cellprene® epox.

O termograma das fibras de Cellprene® epox não apresentou perda de massa relativa à presença de umidade, o que condiz com o comportamento

hidrofóbico do material. A degradação completa da blenda polimérica ocorreu após a inflexão observada a 455 °C. A curva DTG versus Temperatura apresenta 3 picos que podem ser relacionados à imiscibilidade dos materiais da blenda e à falta de homogeneidade na epoxidação do poli(isopreno). Como resultado desses fatores, o PLGA apresenta um pico e o PI epox outros dois picos. Marques (2015) observou um desvio no comportamento linear da curva TGA da blenda PLGA/ PI a 360 °C, com uma massa restante de aproximadamente 40%, e sugeriu que esse poderia ser o fim do estágio de degradação do PLGA e início da degradação do PI. Um comportamento semelhante é observado na curva TGA das fibras de Cellprene® epox a aproximadamente 350 °C.

Guerra *et al.*, (2018) reportou em seu estudo uma pequena inflexão em aproximadamente 380 °C, que segundo os autores pode ser atribuída à ligações duplas que ainda existiriam no poli(isopreno) epoxidado. Os autores também indicaram a temperatura máxima de degradação da blenda a 420 °C. A inflexão em 380 °C citada por Guerra *et al.*, (2018) pode ser comparada com a inflexão apresentada em 390 °C das fibras de Cellprene® epox no gráfico da Figura 22.

5.6. Análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Através da análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi possível identificar as temperaturas de transição vítrea (T_g) dos componentes da blenda, indicando a imiscibilidade da blenda polimérica. Esta imiscibilidade da blenda já havia sido constatada por Guerra *et al.*, (2018) onde duas temperaturas de transição vítrea foram encontradas: 13 °C para o poli(isopreno) com grau de epoxidação 55 mol% e 21 °C para o PLGA. Foram realizados dois ciclos de aquecimento, pois o primeiro ciclo é afetado pelo histórico de processamento do polímero, e pode não indicar as propriedades originais do material polimérico (Hausberger e DeLuca, 1995). Com isso, os valores de T_g foram tomados no segundo ciclo de aquecimento das amostras.

Na análise DSC do PI epox a temperatura de transição vítrea encontrada foi -6,8 °C. Como não houve ocorrência de pico endotérmico referente à temperatura de fusão, que é indicativo de cristalinidade do polímero, o PI epox pode ser considerado um polímero amorfo.

Já o PLGA apresentou uma temperatura de transição vítrea na faixa de 63 °C e temperatura de fusão a 152 °C, a qual é observada no primeiro ciclo de aquecimento do material. Ainda no primeiro ciclo de aquecimento do PLGA, um pico exotérmico pode indicar a temperatura de cristalização do material a 94 °C. Marques (2015) observou o pico referente à temperatura de fusão do PLGA a 149,4 °C.

A membrana produzida via *electrospinning* apresentou valores de Tg iguais a -19,6 °C, 9 °C e 59,3 °C. Os primeiros valores acredita-se que sejam referentes ao PI epox, já o último valor de temperatura de transição vítrea supõe-se que seja do PLGA, visto que o mesmo quando em condição isolada possui Tg a 63,2 °C. As Figuras 23, 24 e 25 apresentam as temperaturas de transição vítrea para o PI epox, PLGA e para a blenda Cellprene® epox, respectivamente.

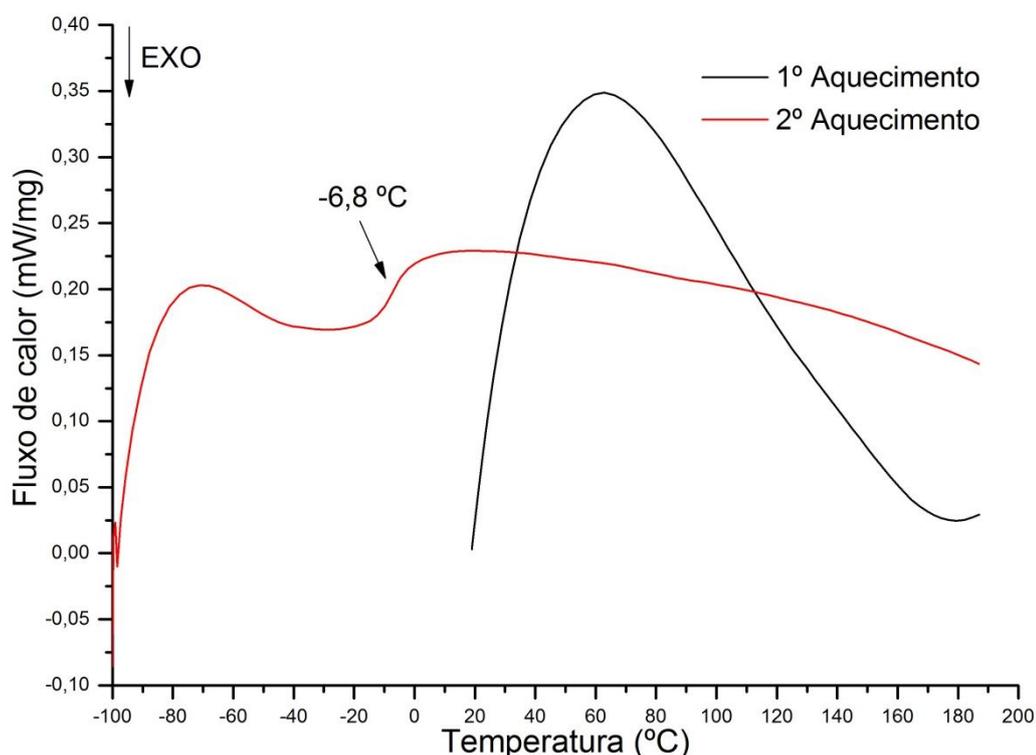


Figura 23. Análise de DSC para o PI epox.

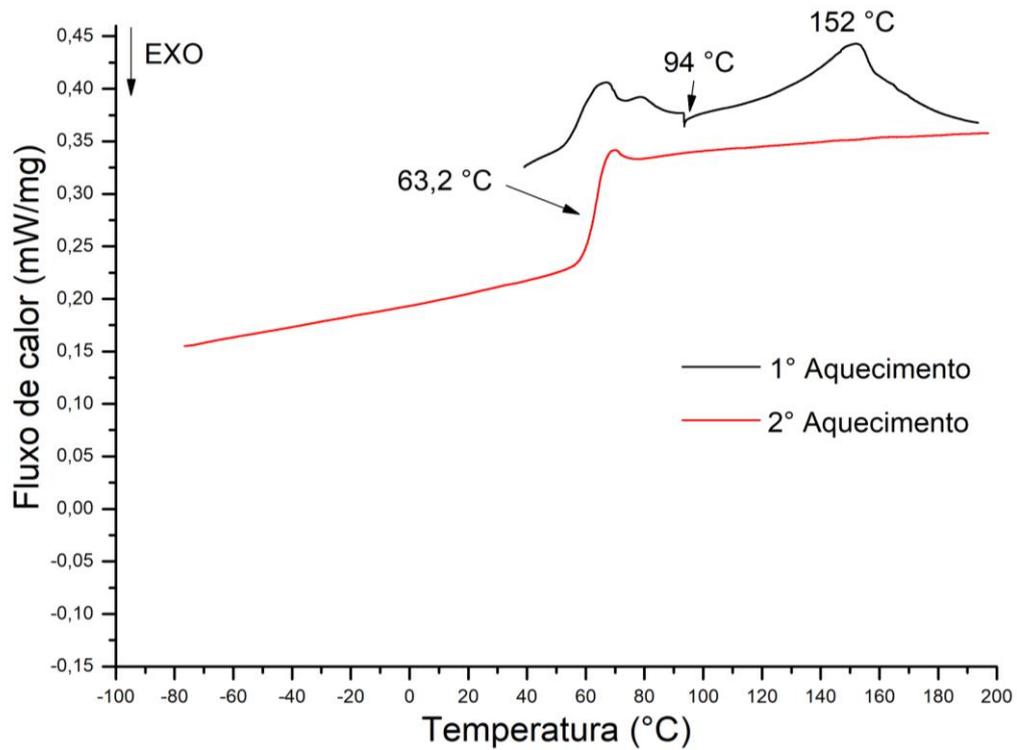


Figura 24. Análise de DSC para o PLGA.

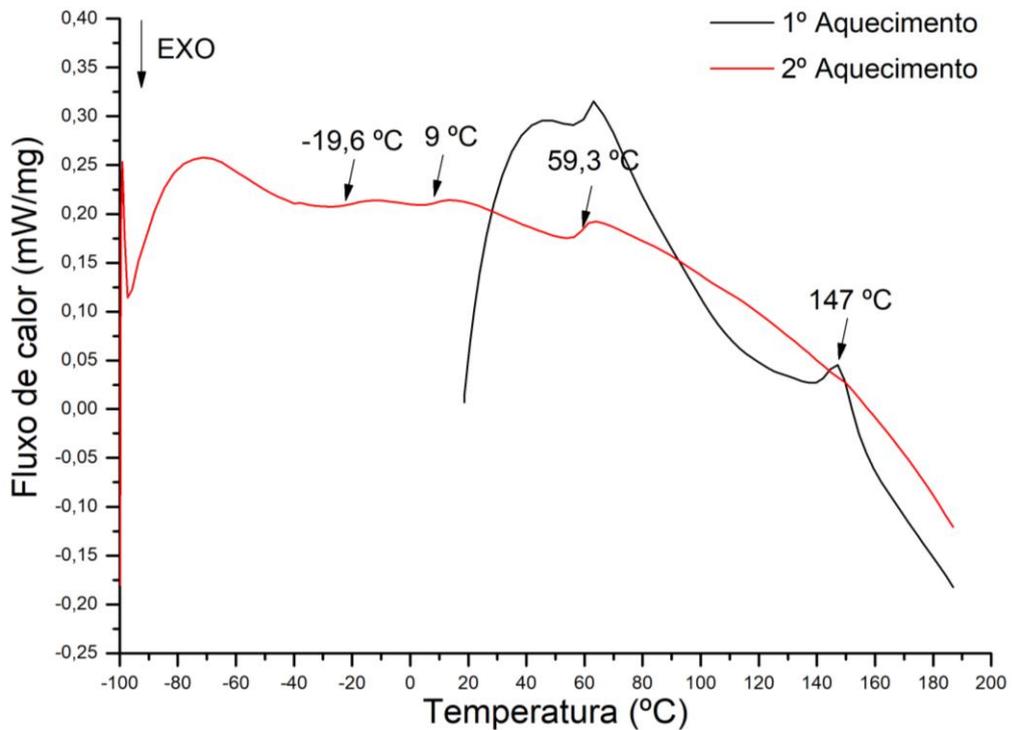


Figura 25. Análise de DSC para o Cellprene® epox produzido via *electrospinning*.

A Figura 25 apresenta um pico no primeiro aquecimento em aproximadamente 147 °C que pode ser considerada correspondente à temperatura de fusão do PLGA, visto que o mesmo apresentou temperatura de fusão a 152 °C

quando analisado em separado. O surgimento de picos relacionados à temperatura de fusão é típico de materiais poliméricos semicristalinos, como é o caso do PLGA.

Dahham e colaboradores (2018) encontraram a Tg da borracha natural com grau de epoxidação 50 mol% igual a -17,7 °C. Kinasih e colaboradores (2017) analisaram o efeito do grau de epoxidação na temperatura de transição vítrea da borracha natural para graus de epoxidação de 10, 20, 30, 40 e 50 mol%. Os autores constataram que para graus de epoxidação de 10, 20, 30 e 40 mol% o processo de epoxidação mostrou-se homogêneo, já para 50 mol% a borracha natural epoxidada apresentou duas temperaturas de transição vítrea, -41,7 °C e -19,4 °C, fato que foi atribuído à heterogeneidade do processo de epoxidação da borracha natural. Acredita-se que o surgimento de temperaturas de transição vítrea em -19,6 °C e 9 °C seja consequência da falta de homogeneidade no processo de epoxidação do poli(isopreno) como relatado por Kinasih *et al.*, (2017).

5.7. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

Para investigar os tamanhos de cadeia dos materiais utilizados e comparar a alteração no tamanho de cadeia proveniente da epoxidação do poli(isopreno) foi realizada a análise de cromatografia de permeação em gel. A Tabela 5 apresenta os valores de massa molar numérica média (Mn), massa molar ponderal média (Mw) e índice de polidispersividade (IPD), que é o quociente entre Mw e Mn, para o PI, PI epox e PLGA.

Tabela 5. Valores de GPC para PI, PI epox e PLGA.

Propriedade	PI	PI epox	PLGA
Mn (g/mol)	317.604	44.904	170.471
Mw (g/mol)	940.086	332.206	364.271
IPD (Mw/Mn)	2,96	7,39	2,13

Observando a Tabela 5 notamos que há uma considerável redução de tamanho de cadeia do poli(isopreno) após a reação de epoxidação. Isto é esperado já que o processo de epoxidação promove a cisão de ligações químicas entre átomos de carbono, e com isso, o tamanho de cadeia tende a reduzir. Também é possível notar o aumento do índice de polidispersividade (IPD) de 2,96 para 7,39 após a reação de epoxidação do PI. O IPD corresponde à distribuição da massa molar das cadeias dentro do polímero (Canevarolo, 2002), portanto o PI epox

apresenta maior variação de tamanho de cadeia que o PI, fato decorrente da epoxidação. O alto IPD pode ser um indicativo da suposta heterogeneidade de epoxidação do PI sugerida na análise de calorimetria diferencial exploratória, pois não houve quebra das cadeias de forma uniforme, e fez a blenda Cellprene® epox apresentar mais de duas temperaturas de transição vítrea.

5.8. Ensaio Mecânico de Tração

O ensaio mecânico de tração foi realizado com o intuito de analisar as propriedades mecânicas da membrana de Cellprene® epox produzida através do *electrospinning* e compará-las com as propriedades mecânicas de tecidos vivos. A curva tensão x deformação das membranas de Cellprene® epox são mostradas na Figura 26.

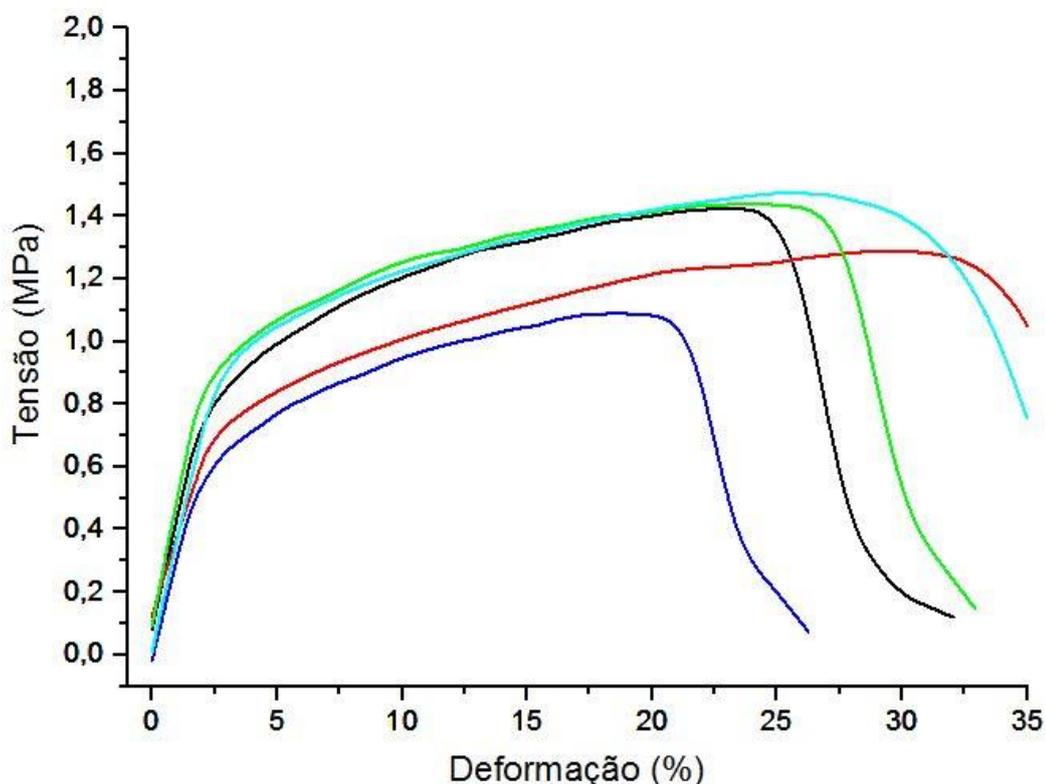


Figura 26. Curva tensão versus deformação das membranas de Cellprene® epox.

Os resultados apresentam certa variação devido à dificuldade de manter tanto as fibras quanto a espessura da membrana formada pelas fibras com dimensões homogêneas. Outro fator importante é o não preenchimento total da área transversal do corpo de prova que é tomada como contínua para os cálculos de tensão que o

material é submetido. A Tabela 6 informa as propriedades mecânicas obtidas nos ensaios de tração do material.

Tabela 6. Propriedades mecânicas da membrana de Cellprene® epox.

Propriedade Mecânica	Valor
Módulo de Elasticidade (MPa)	32,9 ± 5,6
Tensão máxima de ruptura (MPa)	1,43 ± 0,16
Deformação na tensão máxima de ruptura (%)	23,46 ± 4,21

Os valores obtidos podem ser comparados com resultados de outras pesquisas. Guerra *et al.*, (2018) estudando as propriedades mecânicas de membranas do PLGA/PI epox produzido via *solvent casting*, atingiu valores de módulo de elasticidade de 2,97 MPa, cerca de 10 vezes inferior ao módulo da membrana produzida via *electrospinning*. Em termos de tensão máxima, as membranas produzidas por *electrospinning* apresentaram valores inferiores assim como a deformação na tensão máxima, de 3 e 2,5 vezes menor, respectivamente. Marques (2015) avaliou o comportamento mecânico da blenda PLGA/ PI produzida por *electrospinning* com fibras orientadas e chegou a valores de módulo de elasticidade de 103 MPa, deformação na tensão máxima de 2,26 % e tensão máxima de ruptura de 1,4 MPa. As diferenças no módulo de elasticidade podem ser explicadas pela epoxidação do poli(isopreno), pois a rigidez molecular do poli(isopreno) é afetada pela inclusão dos grupos epóxidos (Guerra *et al.*, 2018).

Acredita-se que a diferença da deformação na tensão máxima de ruptura ocorra pelo fato das fibras estarem emaranhadas neste estudo, enquanto Marques (2015) realizou o ensaio em fibras orientadas. Esse emaranhamento faria com que a fibra que não estivesse na direção de tração suportasse um alongamento adicional quando submetida à tração até que a mesma fique paralela à direção da força aplicada.

No que diz respeito à substituição de tecidos moles, a propriedade mecânica de elasticidade do material tem figura de destaque, pois a estrutura elástica determina a resiliência, textura e qualidade do tecido gerado (Marques, 2015). Quando compara-se as propriedades mecânicas da membrana de Cellprene® epox com as propriedades de tecidos, nota-se que o biomaterial formado por fibras pode ser utilizado em algumas aplicações específicas. As membranas de Cellprene® epox apresentaram propriedades mecânicas que podem ser aplicadas a tecidos moles já

que as mesmas possuem valores de módulos de elasticidade relativamente baixos. São exemplos disso: pele das costas de uma criança (0,42 MPa), cartilagem de joelhos (0,13 a 1,91 MPa), músculo dos ombros (4,1 a 16,6 MPa), esôfago (0,077 MPa) e ligamentos (20 MPa) (Agache *et al.*, 1980; Armstrong, Mow, 1982; Akizuki *et al.*, 1986; Itoi *et al.*, 1995; Nachemson e Evans, 1968). Compósitos nanofibrosos de PLGA/ quitosana e gelatina/colágeno/poli(caprolactona) são exemplos de scaffolds que demonstraram potencial para aplicações na reconstrução de tecidos de pele (Ajalloueian *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2019).

5.9. Degradação *in vitro*

A análise da perda de massa do material quando mantido em solução por diferentes períodos de tempo foi realizada. As membranas utilizadas no ensaio de degradação apresentaram inchamento inicial, onde suas massas aumentaram em relação à massa inicial, e por isso, foram submetidas à secagem em ambiente com vácuo. A Tabela 7 apresenta os valores de perda de massa para cada período de tempo em cada solução utilizada.

Tabela 7. Perda de massa das membranas de Cellprene® epox para períodos de tempo de 7, 14, 21 e 28 dias.

Solução	Perda de massa acumulada (%)			
	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
Água deionizada	1,09 ± 1,10	1,10 ± 1,84	2,56 ± 3,83	2,56 ± 3,83
Fisiológica	2,37 ± 0,79	17,10 ± 6,95	17,92 ± 7,27	19,83 ± 5,37
Ringer	17,90 ± 3,06	19,67 ± 4,97	21,21 ± 3,28	21,65 ± 3,95

A análise de degradação *in vitro* mostrou-se mais agressiva para as amostras mantidas em solução fisiológica e Ringer, porém, levando em conta os desvios apresentados para as mostras em solução Ringer e fisiológica, não podemos afirmar qual delas obteve resultados superiores em termos de degradação. As amostras perderam 17,9% de sua massa nos primeiros 7 dias em solução Ringer, nos demais períodos a perda acumulada foi de 19,6%, 21,2% e 21,6%. As amostras submetidas ao ensaio de degradação em solução fisiológica atingiram uma perda de massa total de 19,8% da massa inicial. No período dos primeiros 7 dias a perda de massa foi de 2,3%, enquanto ao final de 14 e 21 dias em solução, as amostras mostraram uma redução de 17,1% e 17,7% de sua massa inicial. As membranas que apresentaram

menor perda de massa foram as colocadas em contato com água deionizada, 2,5% ao final de 28 dias. Antes disso, as membranas tiveram suas massas reduzidas em 1,09%, 1,10% e 2,5% após o contato com água deionizada por 7, 14 e 21 dias, respectivamente.

Os resultados de degradação superiores aos apresentados por Guerra (2018) podem ser atribuídos à porosidade apresentada nas amostras produzidas via *electrospinning*, já que as membranas produzidas via *solvent casting* não possibilitam que a solução alcance o interior das amostras desde o início da análise. Bölgen *et al.*, (2005) explicam que fatores morfológicos e geométricos influenciam a degradação, uma alta razão superfície/ volume provoca uma penetração de água superior, que leva a taxas de degradação também superiores.

Foram realizadas análises FTIR das amostras submetidas ao ensaio de degradação para identificar se houve alguma alteração nos grupos funcionais das mesmas. A Figura 27 apresenta os espectros FTIR das amostras após 28 dias de ensaio de degradação.

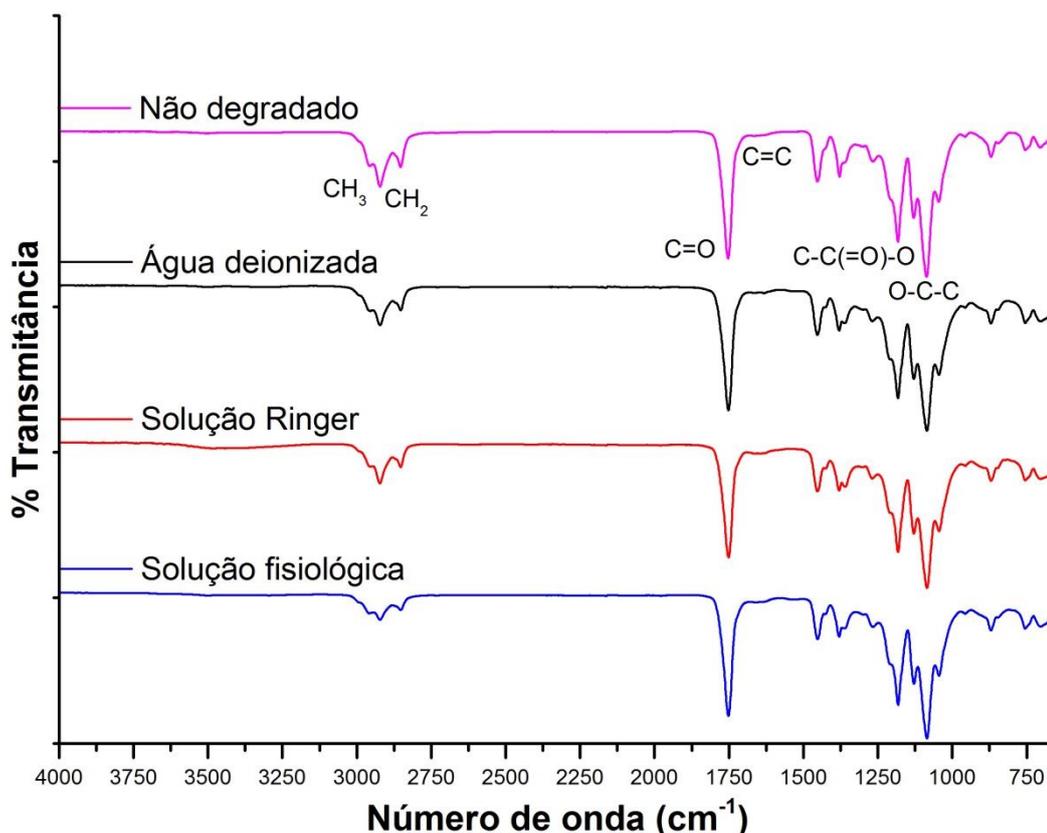


Figura 27. Comparação dos espectros obtidos por FTIR das membranas submetidas ao ensaio de degradação.

A análise FTIR feita nas amostras colocadas em diferentes soluções mostrou que não houve alteração nos grupamentos químicos após 28 dias em solução quando comparados ao material que não foi submetido ao ensaio de degradação *in vitro*.

As amostras que foram mantidas em solução por 28 dias também foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura. As amostras que foram colocadas em solução fisiológica e solução Ringer apresentaram particulados junto às fibras. Acredita-se que possam ser sais provenientes das soluções agregados na membrana polimérica. As Figuras 28, 29 e 30 apresentam as microscopias feitas das membranas colocadas em água deionizada, solução Ringer e solução fisiológica, respectivamente.

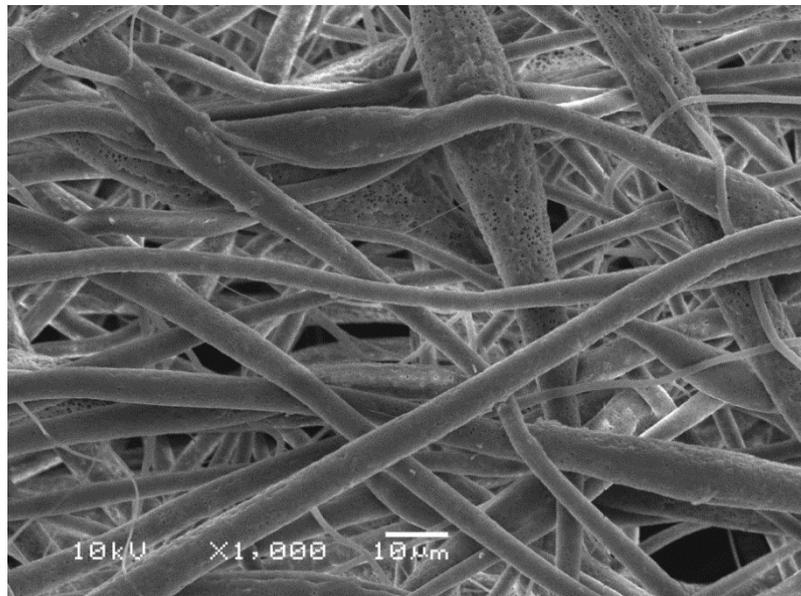


Figura 28. Microscopia da amostra degradada por 28 dias em água deionizada.

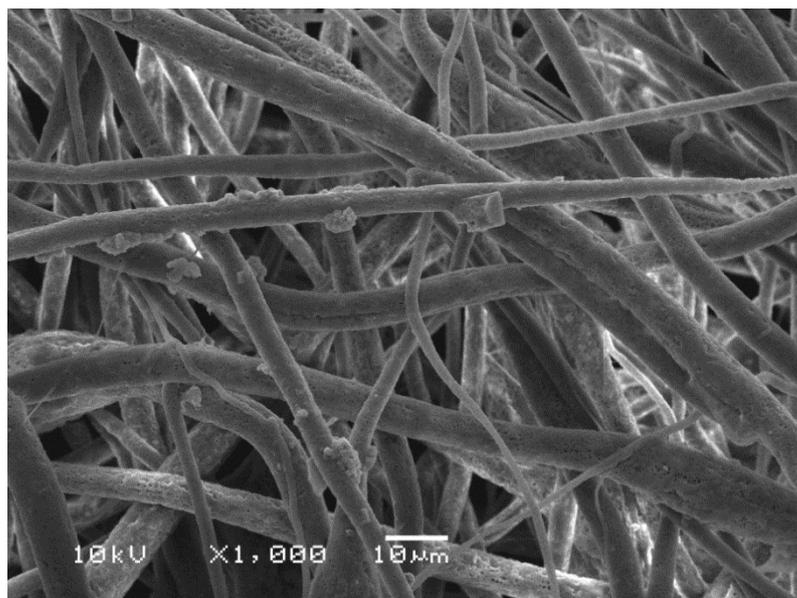


Figura 29. Microscopia da amostra degradada 28 dias em solução Ringer.

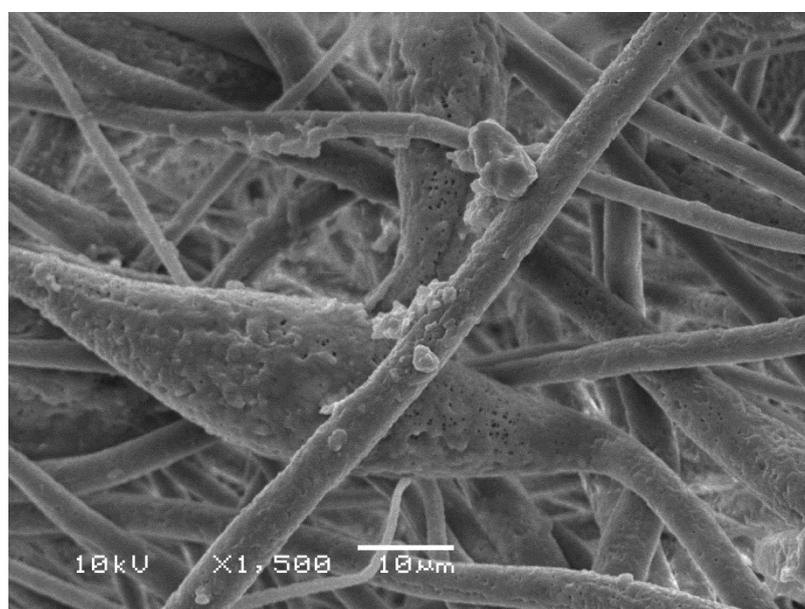


Figura 30. Microscopia da amostra degradada por 28 dias em solução fisiológica.

5.10. Molhabilidade

O ângulo de contato foi medido com o objetivo de determinar se o material tem características hidrofóbicas ou hidrofílicas, de importância fundamental para adesão celular. A fibra produzida pelo método de *electrospinning* apresentou um perfil hidrofóbico, com ângulo de contato igual a $128 \pm 8,1^\circ$. Uma superfície é definida como hidrofóbica quando o ângulo de contato na superfície é maior que 90° (ASTM D7334-08, 2013). A Figura 31 mostra a gota depositada sobre a membrana produzida por *electrospinning* para a medição do ângulo de contato.

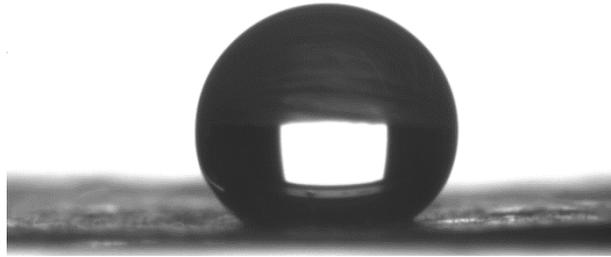


Figura 31. Gota depositada sobre a membrana obtida via *electrospinning* para a medição do ângulo de contato.

Este comportamento pode ser explicado pela alta rugosidade superficial apresentada devido a grande quantidade de poros, e elevada área superficial das fibras que têm seu diâmetro em escala micrométrica. Autores sugerem que a grande quantidade de ar nos poros pode aumentar a hidrofobicidade do material (Guerra, 2018; Li *et al.*, 2010). Ceylan (2009) relatou que as medidas de ângulo de contato não dependem somente do diâmetro das fibras, mas também da estrutura química do polímero e da rugosidade das fibras. Liu *et al.*, 2019, demonstraram que a umidade influencia na porosidade das fibras eletrofiadas e conseqüentemente no ângulo de contato. Os autores testaram a produção de fibras com 40% e 80% de umidade, e as fibras produzidas em condições de maior umidade apresentaram aumento de porosidade de 81% para 92%. Quando avaliado o ângulo de contato, as fibras lisas mostraram 126 ° e as fibras porosas, com maior rugosidade, 150 °.

O ângulo de contato para as membranas produzidas via *solvent casting* também foi analisado e apresentou $83,6 \pm 3,1$ °. A Figura 32 mostra a gota depositada sobre a membrana produzida através do método *solvent casting*.

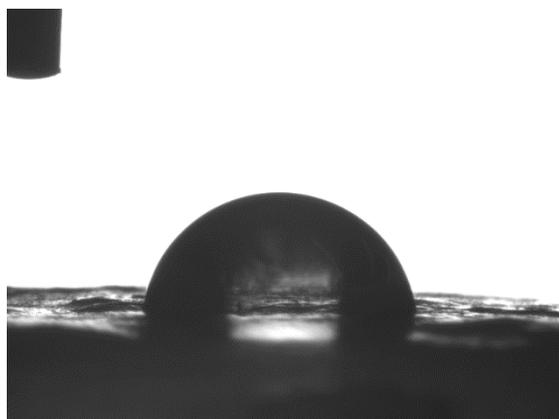


Figura 32. Gota depositada na membrana de Cellprene® epox obtida via *solvent casting*.

Comparando o caráter hidrofóbico/hidrofílico do material, a produção de membranas de Cellprene® epox via *solvent casting* demonstrou comportamento

ligeiramente hidrofílico, enquanto as membranas produzidas via *electrospinning* apresentaram comportamento hidrofóbico. Pesquisadores observaram o ângulo de contato de fibras eletrofiadas e filmes produzidos via *solvent casting* de PLGA, apresentando ângulo de contato de 133 ° e 90 °, respectivamente (Wang e Wang, 2012).

5.11. Análise de Cultura Celular

Para avaliar se a blenda polimérica Cellprene® epox produzida pelo método de *electrospinning* possui potencial para uso como *scaffold* em engenharia de tecidos, foi realizada a análise de cultura celular com a utilização de células-tronco mesenquimais. Membranas com 14 mm de diâmetro foram incubadas em poços a uma densidade de 2×10^5 células/ poço por 48 horas. A Figura 33 mostra a membrana em regime de controle e após o cultivo celular.

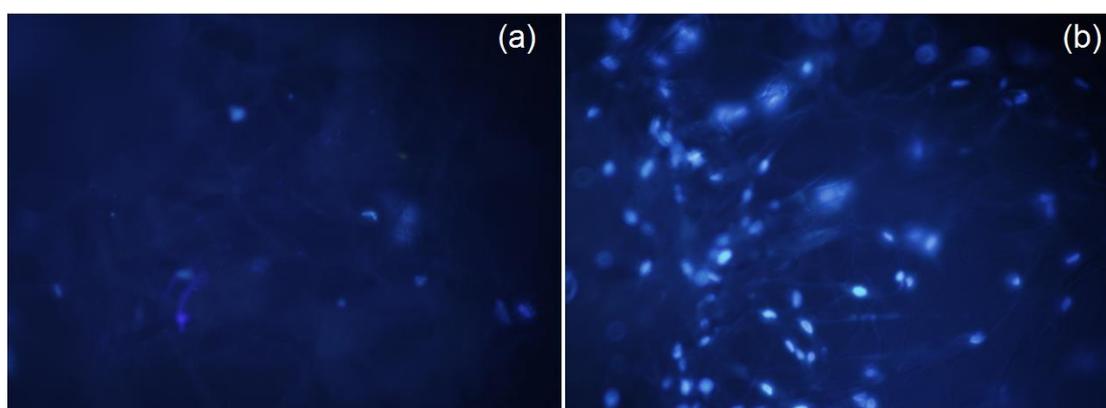


Figura 33. Ensaio de cultura celular nas membranas obtidas via *electrospinning* em (a) regime de controle e com (b) células aderidas.

A análise de viabilidade celular mostrou que as células cultivadas aderiram e proliferaram satisfatoriamente nas membranas fibrosas de Cellprene® epox, demonstrando que o material não apresentou efeitos citotóxicos e mostrou-se biocompatível com células-tronco mesenquimais. As membranas de Cellprene® epox apresentaram uma arquitetura que mesmo tendo características hidrofóbicas, facilitaram a adesão celular através de espaços entre as fibras.

6. CONCLUSÕES

Este estudo mostrou que a produção de fibras da blenda polimérica Cellprene® epox é viável. O poli(isopreno) atingiu um grau de epoxidação igual a $53,9 \pm 5,7$ mol%. Para a produção das fibras a viscosidade mais adequada da solução polimérica foi 0,219 Pa.s, que corresponde a concentração de 5% massa da blenda/volume de clorofórmio.

As fibras produzidas via *electrospinning* apresentaram diâmetro médio de $4,3 \pm 2,7$ μm , limite de resistência à tração igual a $1,43 \pm 0,16$ MPa e módulo de elasticidade igual a $32,9 \pm 5,6$ MPa. A membrana formada por fibras mostrou-se hidrofóbica com um ângulo de contato igual a $128 \pm 8,1$ °, o ensaio de degradação apresentou uma redução de massa de aproximadamente 20% em 28 dias quando as amostras foram colocadas em solução fisiológica e Ringer. Análises FTIR mostraram que não houve alteração nos grupos funcionais após o processamento do material e ensaio de degradação. A análise de calorimetria diferencial de varredura e a termogravimetria indicaram que a blenda é imiscível.

Avaliando os resultados de propriedades mecânicas e adesão celular apresentados na análise de cultivo celular para células-tronco mesenquimais, a blenda Cellprene® epox tem potencial na engenharia de tecidos para aplicações de regeneração tecidual como *scaffold* bioerodível, podendo ser potencialmente utilizada na reparação de tecidos moles por possuir características mecânicas similares.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar o uso de outros solventes para produção da blenda e utilização no processo de *electrospinning*;
- Executar o *electrospinning* em uma câmara com controle de temperatura e umidade;
- Verificar se fibras com diâmetro em escala nanométrica apresentam melhor resposta a adesão e crescimento celular;
- Avaliar adesão celular de fibras produzidas com coletor em movimento (fibras alinhadas);
- Avaliar a utilização de aditivos com objetivos de facilitar a produção de fibras de diâmetro nanométrico;
- Produzir fibras do material através do método de fiação por sopro de solução, que possibilita a deposição do material diretamente sobre a região de interesse;

8. BIBLIOGRAFIA

Abbasian, M., Massoumi, B., Mohammad-Rezaei, R., Samadian, H., Jaymand, M. Scaffolding polymeric biomaterials: Are naturally occurring biological macromolecules more appropriate for tissue engineering? *Macromolecules*. Vol. 134, pp. 673-694, 2019.

Agache, P.G., Monneur, C., Leveque, J.L., De Rigal, J. Mechanical Properties And Young's Modulus Of Human Skin In Vivo. *Archives of Dermatological Research*. Vol. 269, 3, pp. 221-232, 1980.

Ajalloueiian, F., Tavanai, H., Hlborn, J., Donzel-Gargand, O., Leifer, K., Wickhan, A., Arpanaei, A. Emulsion Electrospinning as an approach to fabricate PLGA/Chitosan nanofibers for biomedical applications. *Biomed Research International*. Vol. 2014, p. 13, 2014.

Akizuki, S., Mow, V.C., Müller, F., Pita, J.C., Howell, D.S., Manicourt, D.H. Tensile properties of human knee joint cartilage: I. Influence of ionic conditions, weight bearing, and fibrillation on the tensile modulus. *Journal of Orthopaedic Research*. Vol. 4, pp. 379–392, 1986.

Armstrong, C.G. e Mow, V.C. 1982. Variations In The Intrinsic Mechanical Properties Of Human Articular Cartilage With Age, Degeneration, And Water Content. *The Journal of Bone and Joint Surgery*. 1982, Vol. 64, 1, pp. 87-94.

ASM International. Handbook of Materials for Medical Devices. Chapter 1 – Overview of Biomaterial and Their Use in Medical Devices. 2003.

ASTM D7334-08. Standard Practice for Surface Wettability of Coatings, Substrates and Pigments by Advancing Contact Angle Measurement, 2013.

ASTM D882-18. Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. 2018.

Barbanti, S.H., Zavaglia, C.A.C., Duek, E.A.R. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. Vol. 15, 1, pp.13-21, 2005.

Baumgarten, P.K. Electrostatic spinning of acrylic microfibers. *Journal of Colloid and Interface Science*. Vol. 36, 1, pp. 71–79, 1971.

Beachley, V. e Wen, X. Effect of electrospinning parameters on the nanofiber diameter and length. *Materials Science Engineering C*. Vol. 29, 3, pp.663-668, 2009.

Bhardwaj, N. e Kundu, S.C. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*. Vol. 28, 3, pp. 325–347, 2010.

Bölgren, N., Menciloglu, Y.Z., Acatay, K., Vargel, I., Piskin, E. In vitro and in vivo degradation of non-woven materials made of poly(ϵ -caprolactone) nanofibers prepared by electrospinning under different conditions. *Journal of Biomaterial Science, Polymer Edition*. Vol. 16, 12, pp. 1537-1555, 2005.

Borges, F.A., Barros, N.R., Garms, B.C., Miranda, M.C.R., Gemeinder, J.L.P., Ribeiro-Paes, J.T., Silva, R.F., Toledo, K.A., Herculano, R.D. Application of natural rubber

latex as scaffold for osteoblast to guided bone regeneration. *Journal of Applied Polymer Science*. Vol.134, 39, pp. 1-10, 2017.

Bose, S., Ke, D., Sahasrabudhe, H., Bandyopadhyay, A. Additive manufacturing of biomaterials. *Progress in Materials Science*. Vol. 93, pp. 45-111, 2018.

Brenner, E.K., Schiffman, J.D., Thompson, E.A., Toth, L.J., Schauer, C.L. Electrospinning of hyaluronic acid nanofibers from aqueous ammonium solution. *Carbohydrate Polymers*. Vol. 87, 1, pp. 926–929, 2012.

Canevarolo Jr., S.V. Ciência dos polímeros. Um texto básico para tecnólogos e engenheiros. 2ª edição, editora Artliber. 2002.

Castillo-Dalí, G., Velázquez-Cayón, R., Serrera-Figallo, M.A., Rodríguez-González-Elipe, A., Gutierrez-Pérez, J.L., Torres-Lagares, D. Importance of Poly(lactico-glycolic acid) in Scaffolds for Guided Bone Regeneration: A Focused Review. *Journal of Oral Implantology*. Vol. 41, 4, pp. 152-157, 2015.

Ceylan, M. Superhydrophobic behavior of electrospun nanofibers with variable additives. *Dissertação (Mestrado)*. Universidade do estado de Wichita, 2009.

Chan, B. e Leong K. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal*. Vol. 17, 4, pp. 467-479, 2008.

Chen, Q., Liang, S., Thouas, G.A. Progress in Polymer Science Elastomeric biomaterials for tissue engineering. *Progress in Polymer Science*. Vol. 38, 3–4, pp. 584–671, 2013.

Chu, C.C. Biodegradable Polymeric Biomaterials: an Update Overview. *The Biomedical Engineering Handbook*. CRC Press. Cap. 41, 1999.

Cosme, J.G.L., Silva, V.M., Nunes, R.C.R., Picciani, P. Development of Biobased Poly(Lactic Acid)/ Epoxidized natural rubber blends processed by electrospinning: Morphological, Structural and Thermal Properties. *Materials Sciences and Applications*. Vol. 7, 4, pp. 210-219, 2016.

Dahham, O.S., Hamzah, R., Bakar, M.A., Zulkepli, N.N., Ting, S.S., Omar, M.F., Adam, T., Muhamad, K., Dahham, S.S. Synthesis and structural studies of an epoxidized natural rubber/titania (ENR-50/TiO₂) hybrid under mild acid conditions. *Polymer Testing*. Vol. 65, pp. 10-20, 2018.

Dhandayuthapani, B., Yoshida, Y., Maekawa, T., Kumar, S. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. *International Journal of Polymer Science*. p. 19, 2011.

Drew, C., Wang, X., Samuelson, L.A. The effect of Viscosity and Filler on Electrospun Fiber Morphology. *Journal of Macromolecular Science, Part A*. Vol. 40, 12, pp. 1415-1422, 2006. <https://doi.org/10.1081/MA-120025320>

Eltom, A., Zhong, G., Muhammad, A. Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review. *Advances in Materials Science and*

Engineering. p.13, 2019.

Erbetta, C.D.C., Viegas, C.C.B., Freitas, R.F.S., Sousa, R.G. Síntese e caracterização química por RMN e FTIR do copolímero Poly(D,L-Lactídeo-co-Glicolídeo). *11º Congresso Brasileiro de Polímeros*. Campos do Jordão-SP. 2011.

Ferreira, M., Mendonça, R.J., Coutinho-Netto, J., Mulato, M. Angiogenic Properties of Natural Rubber Latex Biomembranes and the Serum Fraction of *Hevea brasiliensis*. *Brazilian Journal of Physics*. Vol. 39, 3, pp. 564-569, 2009.

Fong, H., Chun, I., Reneker, D.H. Beaded nanofibers formed during electrospinning. *Polymer*. Vol. 40, pp. 4585–4592, 1999.

Geng, X., Kwon, O-H., Jang, J. Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution. *Biomaterials*. Vol. 26, 27, pp. 5427-5432, 2005.

Gentile, P., Chiono, V., Carmagnola, I., Hatton, P.V. An Overview of Poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-Based Biomaterials for Bone Engineering. *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 15, 3, pp. 3640-3659, 2014.

Ghosal, K., Agatemor, C., Spítálsky, Z., Thomas, S., Kny, E. Electrospinning tissue engineering and wound dressing scaffolds from polymer-titanium dioxide nanocomposites. *Chemical Engineering Journal*. Vol. 358, pp. 1262-1278, 2019.

Gloria, A., De Santis, R., Ambrosio, L. Polymer-based composite scaffolds for tissue engineering. *Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics*. Vol. 8, 2, pp. 55-67, 2010.

Goonoo, N., Bhaw-Luximon, A., Jhurry, D. Biodegradable polymer blends : miscibility , physicochemical properties and biological response of scaffolds. *Polymer International*. Vol. 64, 10, 2015.

Guerra, N. B. Obtenção e Avaliação da Blenda Poliisopreno Epoxidado - Poli(Ácido Láctico-co-Glicólico) para Engenharia de Tecidos. *Teses (Doutorado)*, UFRGS, 2018.

Guerra, N.B., Cassel, J.B., Henckes, N., Oliveira, F.S., Cirne-Lima, E.O., Santos, L.A.L. Chemical and in vitro characterization of epoxidized natural rubber blends for biomedical applications. *Journal of Polymer Research*. Vol. 25, 172, p. 9, 2018.

Gunatillake, P., Mayadunne, R., Adhikari, R. Recent developments in biodegradable synthetic polymers. *Biotechnology Annual Review*. Vol. 12, pp. 301-347, 2006.

Gunatillake, P.A. e Adhikari, R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *European Cells and Materials*. Vol. 5, pp. 1-16, 2003.

Haider, A., Haider, S., Kang, I-K. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arabian Journal of Chemistry*. Vol. 11, 8, pp. 1165-1188, 2018.

Hao, X., Bai, C., Huang, Y., Bi, J., Zhang, C., Cai, H., Zhang, X., Du, L. Preparation of cis-1,4-Polyisoprene Electrospun Microfibers. *Macromolecular Materials and Engineering*. Vol. 295, 4, pp. 305-309, 2010.

Hausberger, A.G. e DeLuca, P.P. Characterization of biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide) polymers and microspheres. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*. Vol. 13, 6, pp. 747-760, 1995.

Helmus, M.N. e Tweden, K. Materials Selection, In: *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering, Part A*. Vol. 1, pp. 27-59, 1995.

Hench, L.L. Bioceramics. *Journal of the American Ceramic Society*. Vol. 81, 7, pp. 1705-1728, 1998.

Hench, L.L. e Wilson, J. Introduction to Bioceramics, In: *Advanced Series in Ceramics*, Singapura: World Scientific, Cap. 1., pp. 1-23, 1993.

Henckes, N.A.C., Festa, J.C.D., Faleiro, D., Medeiros, H.R., Guerra, N.B., Santos, L.A.L., Terraciano, P.B., Passos, E.P., Oliveira, F.D.S., Cirne-Lima, E.O. Tissue-engineered solution containing cells and biomaterials – an in vitro study: A perspective as a novel therapeutic application. *The International Journal of Organs*. Vol. 42, 6, pp. 307-314, 2019.

Huang, C. e Tomas, N.L. Fabricating porous poly(lactic acid) fibres via electrospinning. *European Polymer Journal*. Vol. 99, pp. 464–476, 2018.

Iqbal, N., Khan, A.S., Asif, A., Yar, M., Haycock, J.W., Rehman, I.U. Recent concepts in biodegradable polymers for tissue engineering paradigms: a critical review. *International Materials Reviews*. Vol. 64, 2, pp. 91-126, 2019.

Itoi, E., Berglund, L.J., Grabowski, J.J., Schultz, F.M., Growney, E.S., Morrey, B.F., An, K.N. Tensile Properties of The Supraspinatus Tendon. *Journal of Orthopaedic Research*. Vol. 13, 4, pp. 578-584, 1995.

IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1997. Online version (2019-) created by S. J. Chalk. ISBN 0-9678550-9-8. <https://doi.org/10.1351/goldbook>.

Jorge, R.M., Ferreira, M.T., Picciani, P.H., Gomes, A.S., Nunes, R.C.R. Caracterização físico-mecânica de filmes de borracha natural epoxidada curáveis em temperatura ambiente. *Polímeros: Ciência e tecnologia*. Vol. 19, 4, pp.329-335, 2009.

Jun, I., Han, H.S., Edwards, J.R., Jeon, H. Electrospun Fibrous Scaffolds for Tissue Engineering : Viewpoints on Architecture and Fabrication. *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 19, 3, 2018.

Kerche-Silva, L.E., Cavalcante, D.G.S.M., Job, A.E. Natural Rubber Latex Biomaterials in Bone Regenerative Medicine. *Biomaterials in Regenerative Medicine*, Chapter 13, Intech Open, pp. 303-318, 2017.

Khan, F., Tanaka, M., Ahmad, S.R. Fabrication of polymeric biomaterials: a strategy for tissue engineering and medical devices. *Journal of Materials Chemistry B*. Vol. 3, 42, pp.8224-8249, 2015.

Kinasih, N.A., Fathurrohman, M.I., Winarto, D.A. Swelling behaviour in n-pentane and mechanical properties of epoxidized natural rubber with different epoxide content. *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering*. Vol. 223, pp. 1-12, 2017.

Lasprilla-Botero, J., Álvarez-Láinez, M., Lagaron, J.K. The influence of electrospinning parameters and solvent selection on the morphology and diameter of polyimide nanofibers. *Materials Today Communications*. Vol. 14, pp. 1-9, 2018.

Leach, M.K., Feng, Z.Q., Tuck, S.J., Corey, J.M. Electrospinning Fundamentals: Optimizing Solution and Apparatus Parameters. *Journal of Visualized Experiments*. Vol. 47, e 2494, p.4, 2011.

Li, H., Xu, Y., Xu, H., Chang, J. Electrospun membranes: control of the structure and structure related applications in tissue regeneration and drug delivery. *Journal of Materials Chemistry B*. 2014, 34, 2014.

Li, X., Su, Y., Liu, S., Tan, L., Mo, X., Ramakrishna, S. Encapsulation of proteins in poly(L-lactide-co-caprolactone) fibers by emulsion electrospinning. *Colloid Surface B*. Vol. 75, 2, pp. 418-424, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.09.014>

Li, Y. e Bou-Akl, T. Electrospinning in Tissue Engineering. *Electrospinning - Material, Techniques, and Biomedical Applications*. IntechOpen, 2016. DOI: 10.5772/65836. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/electrospinning-material-techniques-and- biomedical-applications/electrospinning-in-tissue-engineering>

Liu, G., Gu, Z., Hong, Y., Cheng, L., Li, C. Electrospun starch nanofibers: Recent advances, challenges, and strategies for potential pharmaceutical applications. *Journal of Controlled Release*. Vol. 252, p. 95-107, 2017.

Liu, H., Wang, S., Qi, N. Controllable structure, properties, and degradation of the electrospun PLGA/PLA-blended nanofibrous scaffolds. *Journal of Applied Polymer Science*. Vol. 125, S2, pp. 468-476, 2012.

Liu, Z., Zhao, J., Li, W., Xing, J., Xu, L., He, J. Humidity-induced porous poly(lactic acid) membrane with enhanced flux for oil-water separation. *Adsorption Science and Technology*. Vol. 375 (5-6), pp. 389-400, 2019.

Luo, C.J., Stride, E., Edirisinghe, M. Mapping the influence of solubility and dielectric constant on electrospinning polycaprolactone solutions. *Macromolecules*. Vol. 45, 11, pp. 4669-4680, 2012. <http://dx.doi.org/10.1021/ma300656u>.

Manoukian, O.S., Sardashti, N., Stedman, T., Gailiunas, K., Ojha, A., Penalosa, A., Mancuso, C., Hobert, M., Kumbar, S.G. Biomaterials for tissue engineering and regenerative medicine. *Encyclopedia of Biomedical Engineering*. pp. 462-482, 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64098-9>

Marques, D.R. Obtenção e Caracterização de Blendas Poliméricas de Poli(Ácido Lático-co-Glicólico) e Poliisopreno para Aplicação como Biomaterial. *Dissertação (Mestrado)*, UFRGS, 2011.

Marques, D.R. Fibras de Poli(Ácido Lático-co-Glicólico)/Poliisopreno para aplicação em engenharia de tecidos. *Tese (Doutorado)*, UFRGS, 2015.

Martins, C., Sousa, F., Araújo, F., Sarmiento B. Functionalizing PLGA and PLGA Derivatives for Drug Delivery and Tissue Regeneration Applications. *Advanced Healthcare Materials*. Vol. 7, 1, p. 24, 2018.

Mascia, L., Su, R., Clarke, J., Lou, Y., Mele, E. Fibers from blends of epoxidized natural rubber and polylactic acid by the electrospinning process: Compatibilization and surface texture. *European Polymer Journal*. Vol. 87, pp. 241-254, 2017.

Matabola, K.P. e Moutloali, R.M. The influence of electrospinning parameters on the morphology and diameter of poly (vinylidene fluoride) nanofibers-effect of sodium chloride. *Journal of Materials Science*. Vol. 48, 16, pp. 5475-5482, 2013.

Megelski, S., Stephens, J.S., Chase, D.B., Rabolt, J.F. Micro- and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers. *Macromolecules*. Vol. 35, 22, pp. 8456–8466, 2002.

Mirtchi, A., Lemaitre, J., Munting, E. *Biomaterials*. Vol. 10, pp. 475-480, 1989.

Nachemson, A.L. e Evans, J.H. Some mechanical properties of the third human lumbar interlaminar ligament (ligamentum flavum), *Journal of Biomechanics*. Vol. 1, 3, pp. 211-220, 1968.

Nobre, M.R.C., Lemos, C.L.N., Domingues, R.Z.I., Gabriades, R.H.N. Qualidade de vida, educação em saúde e prevenção de doenças. *Qualimetria*. Vol. 6, pp. 56-59, 1994.

O'Brien, F.J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*. Vol. 14, 3, pp. 88–95, 2011.

Oliveira, P.S., Rodrigues Junior, L.F., Volkmer, T.M., Guerra, N.B., Santos, L.A.L. Obtenção de scaffolds bioabsorvíveis a partir de blenda de PLGA e IR com adição de hidroxiapatita. *Matéria*. Vol. 24, 3, 2019.

OMS- Organização Mundial da Saúde. Relatório mundial de envelhecimento e saúde. 2015.

Panichpakdee, J., Larpkittaworn, S., Nuchchamong, S., Naruepai, B., Leekrajang, M., Somwongsa, P. Electrospinning of natural rubber látex-blended polyvinyl alcohol. *Materials Today: Proceedings*. Vol. 17, pp. 2020-2027, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.06.250>

Park, J.B. Biomaterials, An Introduction. *Plenum Press*, New York. 1979.

Rao, S.H., Harini, B., Shadamarshan, R.P.K., Balagangadharan, K., Selvamurugan, N. Natural and synthetic polymers/bioceramics/bioactive compounds-

mediated cell signalling in bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*. Vol. 110, pp. 88-96, 2018.

Reneker, D.H. e Fong, H. Polymeric nanofibers: Introduction. *Polymeric Nanofibers*. American Chemical Society. Washington, DC. Vol. 918, pp. 1-6, 2006.

Ribeiro, J.A., Rosa, S.R.F., Leite, C.R.M., Vasconcelos, C.L., Soares, J.M. Development Assessment of Natural Rubber Latex Membranes: A New Proposal for Treatment of Amblyopia. *Materials Research*. Vol. 20, 3, pp. 653-660, 2017.

Rogina, A. Electrospinning process: Versatile preparation method for biodegradable and natural polymers and biocomposite systems applied in tissue engineering and drug delivery. *Applied Surface Science*. Vol. 296, pp. 221–230, 2014.

Rose, K. e Steinbüchel, A. Biodegradation of Natural Rubber and Related Compounds: Recent Insights into a Hardly Understood Catabolic Capability of Microorganisms. *Applied Environmental Microbiology*. Vol. 71, 6, pp. 2803-2812, 2005.

Sadeghi-Avalshahr, A., Nokhasteh, S., Molavi, A.M., Khorsand-Ghayeni, M., Mahdavi-Shahri, M. Synthesis and characterization of collagen/PLGA biodegradable skin scaffold fibers. *Regenerative Biomaterials*. Vol. 4, 5, pp. 309-314, 2017.

Sáenz, A., Brostow, W., Rivera-Muñoz, E.M. Ceramic Biomaterials: an introductory overview. *Journal of Materials Education*. Vol. 21, (5-6), pp. 297-306, 1999.

Salaeh, S., Cassagnau, P., Boiteux, G., Wiebner, S., Nakason, C. Thermoplastic vulcanizates based on poly(vinylidene fluoride)/ Epoxidized natural rubber blends: Effects of phenolic resin dosage and blend ratio. *Material Chemistry and Physics*. Vol. 219, pp. 222-232, 2018.

Santin, C.K. Obtenção e propriedades de borrachas de polibutadieno epoxidado. *Dissertação (Mestrado)*, Instituto Federal do Rio Grande do Sul, 2001.

Santin, C.K., Pinto, G.C., Jacobi, M.M. Epoxidação “in situ” Aplicada ao Látex de Borracha Natural. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. Vol. 22, 2, pp. 193-199, 2012.

Santos, A.R. e Wada, M.L.F. Polímeros biorreabsorvíveis como substrato para cultura de células e engenharia tecidual. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. Vol. 17, 4, pp. 308-317, 2007.

Santos Jr, A.R. Bioresorbable Polymers for Tissue Engineering. In *Tissue Engineering* (Book). Chapter 11, pp. 225-246, 2010.

Sell, S.A., Wolfe, P., Garg, K., McCool, J.M., Rodriguez, I.A., Bowlin, G.L. The use of natural polymers in tissue engineering: a focus on electrospun extracellular matrix analogues. *Polymers*. Vol. 2, 4, pp. 522-553, 2010.

Shan, D., Gerhard, E., Zhang, C., Tierney, J.W., Xie, D., Liu, Z., Yang, J. Polymeric biomaterials for biophotonic applications. *Bioactive Materials*. Vol. 3, 4, pp. 434-445, 2018.

Sill, T.J. e von Recum, H.A. Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*. Vol. 29, 13, pp. 1989-2006, 2008.

Silva, I., Gurruchaga, M., Goñi, I., Gutierrez, M.F., Vazquez, B., Román, J.S. Scaffolds Based on Hydroxypropyl Starch : Processing , Morphology , Characterization , and Biological Behavior. *Journal of Applied Polymer Science*. Vol. 127, 3, pp. 1475-1484, 2013.

Sousa, B.G.B., Pedrotti, G., Sponchiado, A.P., Cunali, R.S., Aragones, Á., Sarot, J.R., Zielak, J.C., Ornaghi, B.P., Leão, M.P. Analysis of tensile strength of poly(acid-co-glycolic) (PLGA) membranes used for guided tissue regeneration. *Revista Sul-Brasileira de Odontologia*. Vol. 11, 1, pp. 59-65, 2014.

Steffens, D., Braghirolli, D.I., Maurmann, N., Pranke, P. Update on the main use of biomaterials and techniques associated with tissue engineering. *Drug Discovery Today*. Vol. 23, 8, pp. 1474-1488, 2018.

Stepanyan, R., Ubbotin, A.V., Cuperuas, L., Boonen, P., Dorschu, M., Oosterlinck, F., Bulters, M.J.H. Nanofiber diameter in electrospinning of polymer solutions: Model and experiment. *Polymer*. Vol. 97, 5, pp. 428–439, 2016.

Sun, X., Xu, C., Wu, G., Ye, Q., Wang, C. Poly(Lactic-co-Glycolic): Applications and Future Prospects for Periodontal Tissue Regeneration. *Polymers*. Vol. 9, 6, p. 189-208, 2017.

Swider, E., Koshkina, O., Tel, J., Cruz, L.J., de Vries, I.J.M., Srinivas, M. Customizing poly(lactic-co-glycolic) particles for biomedical applications. *Acta Biomaterialia*. Vol. 73, pp. 38-51, 2018.

Tang, X., Thankappan, S.K., Lee, P., Fard, S.E., Harmon, M.D., Tran, K., Yu, X. Polymeric Biomaterials in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*. pp. 351-371, 2014.

Tiwari, S.K. e Venkatraman, S.S. Importance of viscosity parameters in electrospinning: Of monolithic and core-shell fibers. *Materials Science and Engineering: C*. Vol. 32, 5, pp. 1037-1042, 2012.

Utracki, L.A. Polymer blends handbook. Vol. 1, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/ Boston/ Londres, 2002.

Van Zyl, A.J.P., Graef, S.M., Sanderson, R.D., Klumperman, B., Pasch, H. Monitoring the Grafting of Epoxidized Natural Rubber by Size-Exclusion Chromatography Coupled to FTIR Spectroscopy. *Journal of Applied Polymer Science*. Vol. 88, 10, pp. 2539-2549, 2003.

Vert, M., Li, S.M., Spenlehauer, G., Guerin, P. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. *Journal of Materials Science*. Vol. 3, 6, pp. 432-446, 1992.

Wang, C. e Wang, M. Dual-source dual-power electrospinning and characteristics of multifunctional scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. Vol. 23, 10, pp. 2381-2397, 2012.

Wang, C., Hsu, C-H., Hwang, I-H. Scaling laws and internal structure for characterizing electrospun poly[(R)-3-hydroxybutyrate] fibers. *Polymer*. Vol, 49, 19, pp. 4188–4195, 2008, <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymer.2008.07.033>.

Wang, S. e Zhang, Y. Preparation, structure, and in vitro degradation behavior of the electrospun poly(lactide-co-glycolide) ultrafine fibrous vascular scaffold. *Fibers and Polymers*. Vol. 13, 6, pp. 754-761, 2012. <https://doi.org/10.1007/s12221-012-0754-z>

Wang, T. e Kumar, S. Electrospinning of polyacrylonitrile nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science*. Vol. 102, 2, pp. 1023–1029, 2006.

Wei, L.G., Chang, H.I., Wang, Y., Hsu, S.H., Dai, L.G., Fu, K.Y., Dai, N.T. A gelatin/collagen/polycaprolactone scaffold for skin regeneration. *PeerJ*. Vol. 7, pp. 1-22, 2019.

Williams, D.F. Definitions in Biomaterials, Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials, Chester, Inglaterra, 1986. *Progress in Biomedical Engineering*. Elsevier. Vol. 4, 1987.

Yördem, O.S., Papila, M., Menciloglu, Y.Z. Effects of electrospinning parameters on polyacrylonitrile nanofiber diameter: an investigation by response surface methodology. *Materials & Design*. Vol. 29, 1, pp. 34–44, 2008, <http://dx.doi.org/10.1016/j.matdes.2006.12.013>.

You, Y., Min, B-M., Lee, S.J., Lee, T.S., Park, W.H. In vitro degradation behavior of electrospun polyglycolide, polylactide, and poly(lactide-co-glycolide). *Journal of Applied Polymer Science*. Vol. 95, n. 2, pp. 193-200, 2004. <https://doi.org/10.1002/app.21116>

Zarghan, S., Bazgir, S., Tavakoli, A., Rashidi, A.S., Damerchely, R. The effect of flow rate on morphology and deposition area of electrospun nylon 6 nanofiber. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*. Vol. 7, 4, pp. 42-49, 2012.

Zeng, J., Haoqing, H., Schaper, A., Wendorff, J.H., Greiner, A. Poly-L-lactide nanofibers by electrospinning- influence of solution viscosity and electrical conductivity on fiber diameter and fiber morphology. *Polymers*. Vol. 3, 1, pp. 102-110, 2003.

Zhang, C., Yuan, X., Wu, L., Han, Y., Sheng, J. Study on morphology of electrospun poly(vinyl alcohol) mats. *European Polymer Journal*. Vol. 41, 3, pp. 423–432, 2005.